



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DÉBORA SILVA ARAÚJO MOTA**

**EFEITOS DO D-LIMONENO INCORPORADO EM MEMBRANAS BIOATIVAS DE  
COLÁGENO SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS**

**ARACAJU- SE  
2019**

**DÉBORA SILVA ARAÚJO MOTA**

**EFEITOS DO D-LIMONENO INCORPORADO EM MEMBRANAS BIOATIVAS DE COLÁGENO SOBRE A  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS**

**2019**

**DÉBORA SILVA ARAÚJO MOTA**

**EFEITOS DO D-LIMONENO INCORPORADO EM MEMBRANAS BIOATIVAS DE  
COLÁGENO SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof. Dra. Jullyana de Souza Siqueira Quintans

**ARACAJU- SE  
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M917e Mota, Débora Silva Araújo  
Efeitos do D-limoneno incorporado em membranas bioativas de colágeno sobre a cicatrização de feridas cutâneas / Débora Silva Araújo Mota; Jullyana de Souza Siqueira Quintans. – Aracaju, 2019. 65 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Limoneno. 2. Monoterpenos. 3. Colágeno. 4. Cicatrização de feridas. I. Quintans, Jullyana de Souza Siqueira, orient. II. Título.

CDU 61

**DÉBORA SILVA ARAÚJO MOTA**

**EFEITOS DO D-LIMONENO INCORPORADO EM MEMBRANAS BIOATIVAS DE COLÁGENO SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 2019

---

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Jullyana de Souza Siqueira Quintans**

---

**1º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosana de Souza Siqueira Barreto**

---

**2º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Joseilze Santos de Andrade**

PARECER

---

---

---

---

---

---

---

Dedico este trabalho a Deus, por toda força ao longo dessa caminhada;  
aos meus avós maternos, madrinha e esposo, pelo incentivo diário.  
Todo meu amor a vocês.

## AGRADECIMENTOS

“O Teu amor cobre as minhas fraquezas e a Tua fidelidade é maior do que todos os obstáculos na minha vida.” Obrigada, Deus, por me proporcionar força, paciência e fé.

Aos meu avós (Brasilino e Nedite), que sempre me encheram de amor e vida. Obrigada por todos os momentos de felicidade simples e pura. Minha gratidão por tanto amor é diária.

À minha madrinha, mãe e amiga Binha, por ser minha inspiração de mulher honesta, guerreira e independente. Obrigada por me acolher nesse seu coração gigante. Esse momento de alegria é tão seu quanto meu.

À minha afilhada Clarinha simplesmente por existir em minha vida e torná-la mais leve e cheia de amor. Ao meu tio (pai) Edson por aceitar com paciência minha ausência em muitos momentos de lazer e de dificuldade.

Ao meu esposo, companheiro e amigo Diego Mota. O amor e a dedicação que demonstra a mim todos os dias sem dúvidas é presente de Deus. Eu te amo e amo a família que você me deu incondicionalmente. Nossa Valentina tão sonhada, nossa maior riqueza está chegando!!

À todos da minha família, tias e primas em especial à minha irmã Bruna, minha mãe Maridélia (minha raiz) por tanto carinho e compreensão, à Babi, Gui, minha tia Linda e meu padrinho (in memoriam) por sempre incentivar este meu sonho.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dra. Jullyana de Souza Siqueira Quintans por tanta dedicação e paciência. Me emociono quando penso o quanto fui e sou grata por ter uma orientadora tão amiga e presente. Te admiro pela profissional e principalmente pela pessoa que você é. Obrigada por tanto aprendizado e oportunidades concedidas.

Gostaria de agradecer imensamente Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rosana de Souza Siqueira Barreto não só pelo crescimento e valor dado ao projeto ao chegar nas suas mãos, mas também pela presença, dedicação e tanto carinho ao me acolher no grupo de cicatrização.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Juliana Cordeiro da UNIT, pelos ensinamentos e por me receber tão cordialmente em seu laboratório. Agradeço também à sua aluna Alessandra, pela disponibilidade e apoio no início desse projeto. À Nely e ao Prof. Ricardo por disponibilizar o laboratório e pelas importantes orientações.

Aos professores, alunos de pós-graduação e alunos de iniciação científica que compõem o grande e valoroso grupo LANEF e LAFAC, primeiramente por me receberem de braços abertos e por me ensinarem tanto ao longo dessa caminhada. Obrigada pelo companheirismo e dedicação intensa na concretização deste projeto.

Agradeço em especial ao querido grupo de cicatrização (Nathália, Juliana, Mikaella, Cleverton) pelo companheirismo, à Débora Gomes pela dedicação e à Ruthy por transmitir seu conhecimento com tanto empenho. À Bruno Lucena pela entrega e amizade! Cresci muito com seus ensinamentos.

Às amigas que a UFS me deu: Mariana e Fabiolla. Obrigada por fazerem do meu projeto o de vocês. Por cada abraço e palavra de carinho. Cada obstáculo que superei para chegar até aqui tem o empurrão e estímulo de vocês. Deus as abençoe.

Ao LEFT, em especial à Caio, Bruno Lima, Nayara Gomes, Ana Maria e ao professor Adriano Antunes por me acolherem em seu laboratório. Muito obrigada por toda parceria.

À UFS, ao Programa de Pós Graduação em Ciências da saúde, aos funcionários do Biotério setorial e da limpeza, ao departamento de Fisiologia e de Química por contribuírem para a realização deste projeto.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos que direta ou indiretamente torceram e contribuíram para a realização deste sonho!

***“Somos do tamanho dos nossos sonhos”***

**(Fernando Pessoa)**

## RESUMO

Efeitos do D-limoneno incorporado em membranas bioativas de colágeno sobre a cicatrização de feridas cutâneas. Débora Silva Araújo Mota. 2019.

As feridas crônicas são responsáveis por impactar significativamente a saúde e a qualidade de vida dos pacientes portadores em todo mundo. O tratamento destas é considerado caro e de difícil acesso. Sabendo da necessidade de novas propostas para seu tratamento, objetivou-se avaliar o efeito do D-limoneno incorporado à membranas bioativas de colágeno sobre a cicatrização de feridas cutâneas. A análise do efeito do D-limoneno incorporado em membranas bioativas de colágeno foi realizada por meio de excisão cutânea em ratos *Wistar*, fêmeas, 250 – 300 g, divididos em três grupos e submetidos cada uma à tratamento com controle COL/HP – membrana bioativa de colágeno contendo hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD); COL/HPLim - membrana bioativa de colágeno contendo D-limoneno complexado em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; LP (Limpo) – solução salina à 0,9%. As feridas foram avaliadas no período de 7 e 14 dias. Para a avaliação da área final da ferida, as mesmas foram mensuradas e fotografadas no dia da confecção e no dia da retirada da lesão. Para a avaliação do índice de reepitelização da superfície da ferida observou-se a formação de epitélio pavimentoso estratificado na região correspondente a superfície da ferida cirúrgica. Para a avaliação morfológica e histopatológica do tecido de cicatrização, lâminas foram confeccionadas através de técnicas histoquímicas (coradas pelo método HE- Hematoxilina – Eosina). Para a avaliação do imunocontéudo de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) e NF $\kappa$ B (Nuclear Transcription Factor kappa b) foi utilizado a técnica de *Western Blot*. Observou-se na avaliação da ferida de 7 dias que a membrana bioativa contendo D-limoneno complexado em HP- $\beta$ -CD (COL/HPLim) reduziu a área final das feridas. O índice de reepitelização no grupo COL/HPLim demonstrou-se maior quando comparado aos outros grupos. A resposta inflamatória foi considerada severa em todos os grupos e o infiltrado leucocitário foi predominantemente subagudo nos grupos LP e COL/HP e predominantemente crônico inespecífico no grupo COL/HPLim. Observou-se também que o grupo COL/HPLim elevou a quantidade de imunocontéudo de VEGF e diminuiu o imunocontéudo de NF $\kappa$ B, favorecendo o processo de cicatrização induzindo a formação de novos vasos e, conseqüentemente a nutrição tecidual, além provar sua ação anti-inflamatória neste modelo de cicatrização. Na avaliação de 14 dias as feridas apresentaram-se praticamente epitelizadas, evidenciado pelo aspecto histológico com presença de linfócitos e rudimentos de apêndices cutâneos como presença de folículos pilosos em formação e glândulas e uma diminuição substancial do aumento da vascularização, indicando possivelmente uma rápida superação da fase inflamatória e antecipação da fase de remodelação. Sendo assim este estudo mostrou que o D-limoneno complexado em HP- $\beta$ -CD incorporado em membrana bioativa de colágeno promoveu a aceleração no processo de cicatrização neste modelo animal tornando-se um produto com potencial para ser avaliado quanto à cicatrização de feridas cutâneas.

**Descritores:** D-limoneno; Monoterpenos; Colágeno; Cicatrização de feridas.

## ABSTRACT

Effects of D-limonene incorporated into bioactive collagen membranes on the healing of cutaneous wounds. Débora Silva Araújo Mota. 2019.

Chronic wounds are responsible for significantly impacting the health and quality of life of patients worldwide. Treatment of these is considered expensive and difficult to access. Knowing the need for new proposals for its treatment, the objective was to evaluate the effect of D-limonene incorporated into bioactive collagen membranes on the healing of cutaneous wounds. Analysis of the effect of D-limonene incorporated into bioactive collagen membranes was performed by skin excision in female Wistar rats, 250-300 g, divided into three groups and each submitted to treatment with COL / HP-bioactive membrane control collagen containing hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD); COL / HPLim - bioactive collagen membrane containing D-limonene complexed to hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin; LP (Clean) - 0.9% saline solution. The wounds were evaluated in the period of 7 and 14 days. In order to evaluate the final area of the wound, they were measured and photographed on the day of preparation and on the day of removal of the lesion. For the evaluation of the reepithelialization index of the wound surface, the formation of stratified squamous epithelium in the region corresponding to the surface of the surgical wound was observed. For the morphological and histopathological evaluation of the healing tissue, slides were made by histochemical techniques (stained by the HE-Hematoxylin-Eosin method). The Western Blot technique was used to evaluate the immunocontent of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and NF $\kappa$ B (Nuclear Transcription Factor kappa b). It was observed in the 7-day wound evaluation that the bioactive membrane containing D-limonene complexed to HP- $\beta$ -CD (COL / HPLim) reduced the final area of the wounds. The rate of re-epithelialization in the COL / HPLim group was greater when compared to the other groups. The inflammatory response was considered severe in all groups and the leukocyte infiltrate was predominantly subacute in the LP and COL / HP groups and predominantly non-specific chronic in the COL / HPLim group. It was also observed that the COL / HPLim group increased the levels of VEGF concentration and decreased the concentration of NF $\kappa$ B, favoring the cicatrization process, inducing the formation of new vessels and, consequently, tissue nutrition, besides proving its anti-inflammatory in this model of healing. In the evaluation of 14 days the wounds were practically epithelialized, evidenced by the histological aspect with presence of lymphocytes and rudiments of cutaneous appendages such as the presence of hair follicles in formation and glands and a substantial decrease in the increase of vascularization, possibly indicating a rapid overcoming of the inflammatory phase and anticipation of the remodeling phase. Thus, this work showed that D-limonene complexed with HP- $\beta$ -CD incorporated in bioactive membrane of collagen promoted the acceleration in the healing process in this animal model, becoming a product with potential to be evaluated for the healing of cutaneous wounds.

**Descritpors:** D-limonene; Monoterpenes; Collagen; Wound healing.

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Curativos atuais disponíveis para o tratamento de feridas.....	24
<b>TABELA 2:</b> Valores de EC do complexo Lim/HP- $\beta$ -CD e Lim/ $\beta$ -CD.....	43
<b>TABELA 3:</b> Avaliação do perfil do infiltrado inflamatório nos grupos controles e limoneno após 7 dias dos procedimentos cirúrgicos .....	46
<b>TABELA 4:</b> Avaliação do perfil do infiltrado inflamatório nos grupos controles e limoneno após 14 dias dos procedimentos cirúrgicos .....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01: Esquema anatômico da pele.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 02: Feridas e tipos de cicatrização .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 03: Representação esquemática das fases da cicatrização de feridas .....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 04: Estrutura química do D-limoneno .....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 05: Representação esquemática da estrutura da HP-<math>\beta</math>-CD.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 06: Curva de calibração do limoneno (5 – 300 <math>\mu</math>g/mL) .....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 07: Cromatograma do limoneno (padrão) obtido por CLAE .....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 08: Cromatogramas do limoneno nas diversas formulações preparadas.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 09: Efeito de membranas de colágeno contendo D-limoneno complexado em HP-<math>\beta</math>-CD (COML/HPLIM) sobre a área final da ferida (<math>\text{mm}^2</math>) 7 dias após a sua confecção.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 10: Fotomicrografias do efeito do limoneno (LIM) sobre a análise microscópica de feridas de 7 dias em ratos.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 11: Efeito de membranas bioativas sobre a quantidade de imunocontéudo do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) na ferida excisional de ratos 7 dias após sua confecção.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 12: Efeito de membranas bioativas sobre a concentração de fator de transcrição (NF<math>\kappa</math>B) 7 dias após a confecção da ferida.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 13: Comparação sobre o efeito de membranas de colágeno contendo D-limoneno complexado em HP-<math>\beta</math>-CD (COL/HPLim) sobre a área final da ferida (<math>\text{mm}^2</math>) entre 7 e 14 dias após a sua confecção.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 14: Fotomicrografias do efeito do limoneno (LIM) sobre a análise microscópica de feridas de 14 dias em ratos.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 15: Efeito de membranas de colágeno contendo limoneno (COL/HPLim) sobre o índice de reepitelização em feridas cutâneas abertas de 7 dias.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 16: Efeito de membranas de colágeno contendo limoneno (COL/HPLim) sobre o índice de reepitelização em feridas cutâneas abertas de 14 dias.....</b>	<b>54</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1 Estrutura da pele .....	16
2.2 Feridas .....	17
2.3 Epidemiologia das feridas crônicas .....	18
2.4 Cicatrização .....	19
2.5 Curativos e Coberturas .....	23
2.6 Membrana bioativa de Colágeno .....	24
2.7 Limoneno .....	25
2.8 Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina .....	27
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 Obtenção do complexo HP- $\beta$ -CD + Lim .....	30
4.2 Obtenção das Membranas de Colágeno .....	30
4.3 Análises do Limoneno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)....	30
4.4 Animais .....	31
4.5 Grupos experimentais .....	33
4.6 Ferida cutânea excisional aberta .....	34
4.7 Avaliação macroscópica .....	34
4.8 Processamento Histológico .....	35
4.9 Análise histomorfológica da Reação Inflamatória .....	36
4.10 Ensaio .....	36
4.11 Descarte dos animais .....	38
4.12 Análise estatística .....	39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>56</b>
6.1 Conclusão .....	56
6.2 Perspectivas .....	56
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo complexo e requer uma sequência ordenada e coordenada dos passos que envolvem a produção e a participação de vários fatores de crescimento, componente da matriz extracelular, e vários tipos de células (SUREDA et al., 2016). É regulada por um padrão de eventos, incluindo coagulação, inflamação, formação de tecido de granulação, epitelização e remodelação do tecido (CROVETTI et al., 2004).

As feridas crônicas têm um impacto significativo sobre a saúde e a qualidade de vida dos pacientes e suas famílias, causando dor, perda da função e mobilidade, depressão, angústia, ansiedade, vergonha, isolamento social, encargos financeiros, hospitalizações prolongadas, morbidade crônica ou até mesmo a morte (MACDONALD, 2009). Muitas vezes disfarçada como uma comorbidade, feridas crônicas representam uma epidemia silenciosa que afeta uma grande parcela da população mundial (JÄRBRINK et al., 2016).

Estudos demonstram que as feridas abertas formam crosta e epitelizam mais lentamente. Inúmeros curativos são então utilizados para produzir umidade local, melhorando de 35% a 45% a taxa de reepitelização de feridas profundas (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a). Há no mercado mundial diversos materiais de curativo que podem ser utilizados nas diferentes etapas de tratamento das feridas, como: higienização, desbridamento, diminuição da população bacteriana, controle do exsudato, estímulo à granulação e proteção da reepitelização (SMANIOTTO, et al., 2012).

Nesse sentido produtos à base de colágeno são altamente absorventes e mantem um ambiente úmido, que promove o desbridamento autolítico e redução da dor (KIRK, J. F. et al., 2013). O colágeno é um polímero natural biodegradável, que pode ser aplicado como um produto de engenharia tecidual quando o objetivo é reparo ou remodelamento de diferentes tecidos, como pele, cartilagem e ossos, mas não quando a estabilidade do material é necessária por longos períodos, devido justamente à sua característica de biodegradação (PACHENCE, et al., 2000).

É um componente natural do tecido conjuntivo e a maior proteína estrutural de qualquer órgão. Sua estrutura, físico, química, propriedades biológicas e imunológicas têm sido amplamente discutidas na literatura (BOATENG et al., 2008). Conhecido por desempenhar um papel vital no processo natural de cura de feridas de indução de coagulação para a formação e aparência da cicatriz final, o colágeno estimula a formação de fibroblastos e acelera a migração de células endoteliais em contato com o tecido danificado (BOATENG et al., 2008),

desempenha um papel dominante na manutenção da integridade biológica e estrutural da matriz extracelular e é altamente dinâmico, passando por remodelação constante para as funções fisiológicas adequadas (CEN et al., 2008).

Alguns estudos têm investigado a eficiência de incorporação de compostos bioativos, tanto fármacos sintéticos quanto produtos naturais, em biomateriais (HELARY et al., 2006). Dentre os vários compostos de origem natural, o D-limoneno é o monoterpene monocíclico mais abundante na natureza e representa mais de 90% do óleo da casca de laranja. A sua estrutura química é semelhante a muitos monoterpênóides oxigenados com fragrância agradável e, por conseguinte, D-limoneno pode ser utilizado na indústria de sabor como um precursor na síntese desses compostos (BICAS; PASTORE, 2007).

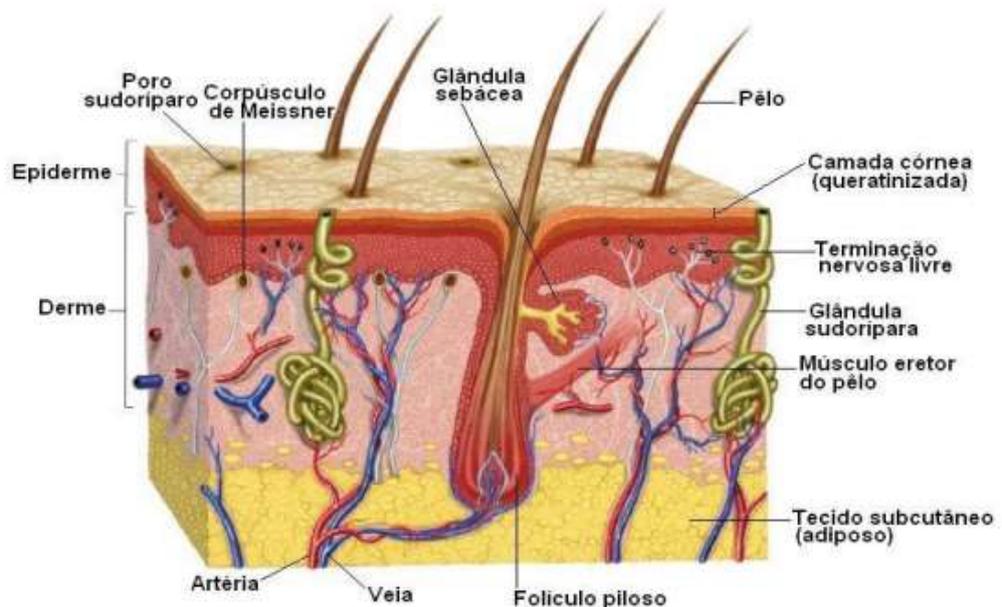
Além disso, pode-se afirmar também que o limoneno apresenta propriedades antiinflamatórias, antidiabético, antioxidante, anticancerígeno, antialérgico, antinociceptivo, e atividades anti-estresse, além de efeitos positivos no tratamento de úlcera gástrica, colite, asma e inflamação das vias aéreas (VIEIRA et al., 2018) além da inibição da angiogênese, que também pode ajudar a reduzir a inflamação (D'ALESSIO et al., 2014).

Nos dias atuais, tornou-se promissor investir em pesquisas com produtos naturais devido à fácil aquisição, eficácia, segurança e baixo custo. Levando em consideração o alto custo do tratamento de feridas crônicas ofertado no mercado atual, faz-se necessário a criação de novos produtos acessíveis à população portadora. Para tanto, o D-limoneno juntamente com o colágeno, torna-se uma alternativa promissora quando comparado aos métodos terapêuticos convencionais pela alta disponibilidade na natureza, perfil de segurança e amplo mecanismo de ação já comprovado. Diante do exposto, buscou-se avaliar o efeito do D-limoneno incorporado em membranas bioativas de colágeno sobre a cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Estrutura da pele

A pele é o maior órgão do corpo humano com inúmeras funções complexas essenciais para a nossa sobrevivência. Pode proteger contra produtos químicos nocivos, radiação ultravioleta, e organismos patogênicos e ao mesmo tempo pode produzir vitamina D e regular a temperatura do corpo e a perda de umidade (SOOD, 2014). Possui sua especificidade demonstrada pelos estímulos táteis, pressóricos, vibratórios, dolorosos, térmicos e pela resposta galvânica da pele. A função secretora engloba as glândulas sudoríparas e sebáceas, importantes para a manutenção tissular (com preservação da camada córnea) (ABOU NEEL et al., 2013).



**Figura 1: Esquema anatômico da pele.** Fonte: Disponível em <<http://www.anatomiadocorpo.com/sistema-tegumentar-epiderme/>> Acessado em 18/09/2018.

É constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme (Figura 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A principal célula componente da epiderme é o queratinócito enquanto o da derme, é o fibroblasto (ISAAC et al., 2010).

A epiderme apresenta ainda três tipos de células: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as de Merckel. A espessura e a estrutura da epiderme variam com a sua localização, sendo mais espessa e complexa na palma das mãos, na planta dos pés e em algumas articulações (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O aporte de oxigênio e nutrientes

dessa área chega por difusão, a partir de vasos sanguíneos da derme, já que essa camada não possui vasos sanguíneos (ALBUQUERQUE-JÚNIOR, 2009).

Esta, organiza-se em cinco camadas: germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea e, à medida que as mais superficiais são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular. A camada germinativa é a mais profunda, e faz limite com a derme, e a camada córnea é a mais superficial e é constituída por células escamosas, cheias de queratinócitos intimamente unidos uns aos outros que fornecem barreira contra a invasão de microorganismos e água. O pigmento melanina na epiderme, protege os tecidos subjacentes dos efeitos nocivos da luz ultravioleta (ARNOLD, ODOM, JAMES, 1994).

Já a derme consiste numa camada de sustentação da epiderme, composta de tecido conjuntivo e, constituída de numerosos fibrócitos que sintetizam as proteínas das fibrilas do colágeno e da elastina, responsáveis pela sustentação tecidual. Nessa parte há acomodação dos vasos sanguíneos e linfáticos que nutrem a epiderme, além de agregar nervos e órgãos sensoriais como, órgão de Ruffni (sensível ao calor), corpúsculo de Vater-Pacini (sensível à pressão), corpúsculo de Meissner (detecção de pressões de intensidades variadas), célula de Merckel (sensível ao tato e à pressão) e folículo piloso, com terminações nervosas associadas; terminação nervosa livre, com dendritos livres sensíveis (IGNÁCIO, 2009).

A ruptura da pele limita a barreira mecânica de proteção contra microrganismos patógenos exógenos e, ao evento de traumas ocorridos na pele provocando descontinuidade tecidual e desarranjo tegumentar em que altera a homeostase, denomina-se ferida (ISERI et al., 2008).

## 2.2 Feridas

Ferida é qualquer interrupção na continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou menor extensão, causada principalmente por trauma ou desencadeada por uma afecção clínica. (LEITE et al., 2012) e pode ser classificada em ferida aguda e crônica, dependendo de sua etiologia. As agudas ocorrem mais comumente devido a acidentes como trauma ou queimaduras e devem cicatrizar normalmente em uma curta duração, desde que o tratamento correto seja dado. Já as feridas crônicas demoram mais tempo para cicatrizar ou às vezes até recorrem devido à patologia subjacente (DORAI, 2012).

Outra classificação, se refere às estruturas comprometidas, e consiste na descrição anatômica da profundidade da ferida. Este sistema é adotado para estadiar alguns tipos de feridas crônicas, como as úlceras por pressão e as queimaduras. O sistema de classificação por

extensão do dano tissular completa o anterior. Engloba a ferida superficial (limitada à epiderme), ferida com perda parcial (limitada à epiderme e porção superior da derme) e a perda total (existe destruição da epiderme, derme, tecido subcutâneo, podendo invadir músculos, tendões e ossos) (FERREIRA, 1995).

A fisiopatologia das feridas crônicas ainda não se encontra totalmente esclarecida, podendo incluir vários fatores, como uma menor atividade mitogênica, o envelhecimento precoce dos fibroblastos, uma maior atividade das MMPs (metaloproteinases da matriz), condicionando maior degradação da MEC (Matriz extracelular), e mecanismos inflamatórios persistentes (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

### 2.3 Epidemiologia das feridas crônicas

Feridas são consideradas um problema de saúde pública, devido ao impacto psicológico, social e econômico para o paciente, com elevados e crescentes custos para o sistema de saúde (LEITE et al., 2012). A taxa de prevalência aproximada para feridas crônicas nos países não desenvolvidos é de 1% a 2% da população geral. A morbidade e os custos associados às feridas crônicas, incluindo amputação e morte, têm sido ignoradas pelas políticas públicas, talvez por não existir especialidade médica específica claramente responsável (NUSSBAUM et al., 2018).

Nos EUA (Estados Unidos da América), as feridas crônicas são responsáveis por cerca de US \$ 6- \$ 15 bilhões de custos anuais com cuidados de saúde. Os custos exatos permanecem desconhecidos devido à dificuldade na obtenção de medições precisas porque os pacientes são vistos em uma variedade de configurações ou até mesmo deixam de acessar o sistema de saúde. Há uma enorme pressão sobre o sistema médico para desenvolver terapias de baixo custo (SOOD et al., 2014).

A natureza dispendiosa de gerenciamento de feridas crônicas é ainda confirmada com as estimativas do Reino Unido, onde o custo para o Serviço Nacional de Cuidados de Pacientes com Doenças Crônicas, que engloba as feridas crônicas foi conservadoramente estimado em US\$ 3,4- 4,6 bilhões por ano (em 2005), o que representa cerca de 3% do despesa total estimada na saúde para o mesmo período (JÄRBRINK et al., 2016).

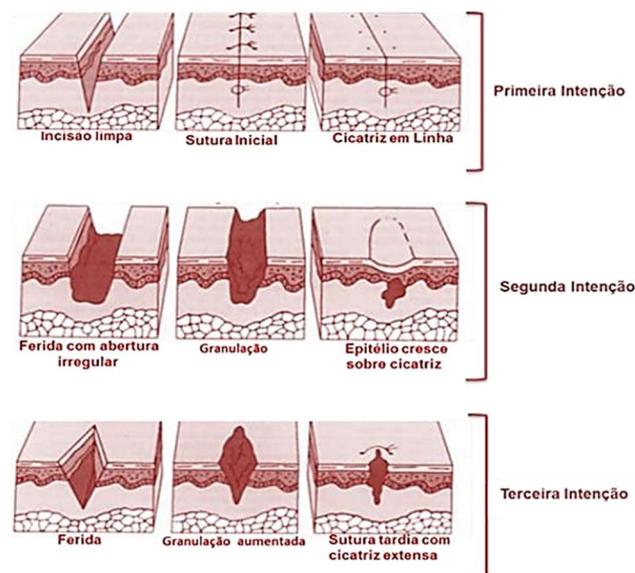
O tratamento da ferida e seus impedimentos terapêuticos representam um fator economicamente desafiador para os cuidados de saúde em todo o mundo. Existem mais de 5,7 milhões de pacientes afetados por feridas crônicas nos EUA e o custo anual do tratamento é estimado em US \$ 20 bilhões. O custo do tratamento de feridas está aumentando

consideravelmente, o mercado internacional para os produtos relacionados foi estimado em US \$ 13 bilhões em 2008 e deverá atingir US \$ 20,4 bilhões em 2021 (MARKETS, 2015).

No Brasil as feridas crônicas são consideradas um dos principais problemas de saúde pública da atualidade. Estimativas do Ministério da Saúde apontam que este problema afeta a rotina de aproximadamente 5 milhões de brasileiros todos os anos. Dados estatísticos, indicam que esta doença, desenvolvida por diversos motivos, está entre as 10 principais causas de afastamento do trabalho no Brasil. (INSS, 2014).

## 2.4 Cicatrização

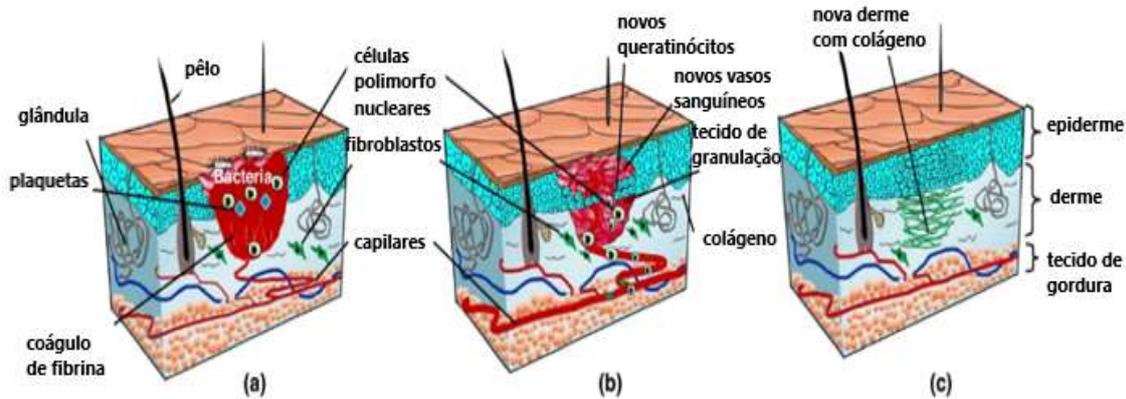
A cicatrização de feridas pode ser classificada em três tipos: cicatrização por primeira intenção, cicatrização por segunda intenção ou cicatrização por terceira intenção, dependendo da natureza da bordas das feridas (Figura 2) (DEALEY, 2008).



**Figura 2: Feridas e tipos de cicatrização.** Modificado de MANDELBAUM *et al.*, 2003.

Em feridas cicatrizadas por primeira intenção, as bordas são suavemente fechadas e nenhuma cicatriz é deixada ou possui uma fina espessura. Na cicatrização por segunda intenção há o envolvimento da formação de tecidos de granulação que preenchem as lacunas entre as bordas da ferida, com perda significativa de tecido, deixando cicatrizes mais evidentes. Já as feridas cicatrizadas por terceira intenção são geralmente deixadas abertas por três a cinco dias até o tecido de granulação aparecer antes de serem suturadas, geralmente resultando em extensa formação de cicatriz (THAKARE et al, 2011).

O processo de reparação tecidual compreende três fases simultâneas e sobrepostas: inflamatória, proliferativa (epitelização, granulação e angiogênese) e remodelação (MURTI, et al., 2011; BUGANZA, et al., 2013) (Figura 3). Essas fases prosseguem com uma interação bem organizada, envolve grande variedade de células (neutrófilos, macrófagos e fibroblastos), fatores locais e sistêmicos como espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (RODRIGUES, 2011; SHEN et al., 2017).



**Figura 3: Representação esquemática das fases da cicatrização de feridas.** (a) Hemostasia e inflamação; (b) Fase de proliferação; (c) Fase de remodelação. Modificado de MOHANTY, C., SAHOO, S., 2017.

A fase inflamatória inicia-se com a lesão vascular e exposição da membrana basal do endotélio, levando à vasoconstrição temporária, que dura entre cinco a dez minutos (MURTI et al., 2011). Além disso, os componentes do sangue são liberados no local da ferida para a ativação da cascata de coagulação. O coágulo resultante induz a hemostasia e proporciona uma matriz para o influxo de células inflamatórias (BARRIENTOS et al., 2008) formando uma barreira contra a invasão de microorganismos além de organizar a matriz provisória necessária para a migração celular (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Durante este processo, as plaquetas liberam citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento tais como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crescimento transformante beta (TGF) - $\beta$ , fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF) (KOH; DIPIETRO, 2011). A resposta inflamatória hiperaguda, é traduzida clinicamente pelos sinais cardinais de inflamação (dor, rubor, calor e edema) que podem durar geralmente 24 a 48 horas, e persistir até 2 semanas (LAUREANO e RODRIGUES, 2011).

Existem células específicas no organismo que desempenham funções importantes na defesa contra agentes agressores. A maioria chega ao local da injúria pela corrente sanguínea, como acontece com os polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), os macrófagos e os

linfócitos (LAMANO, 2008). Esta fase envolve a infiltração de neutrófilos abundante no local da ferida e, através da atividade de explosão respiratória, liberam proteases, radicais livres de oxigênio e mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e IL-1 (interleucina 1).

Um ponto chave na expressão de citocinas pró-inflamatórias é a ativação, nas células, do fator de transcrição nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), que controla a transcrição de genes da maioria dos fatores inflamatórios, incluindo o TNF- $\alpha$  entre outros. O NF $\kappa$ B ativo migra para o núcleo e promove a transcrição de vários genes principalmente envolvidos na inflamação (MOHANTY; SAHOO, 2017).

Estudos sugerem que o NF $\kappa$ B pode ter funções anti-inflamatórias pela inibição da expressão direta de genes e manipulando a expressão ou atividade de citocinas anti-inflamatórias (LAWRENCE, et al., 2010). A perpetuação da inflamação posteriormente prejudica o crescimento do tecido no local de reparação, finalmente resultando no estado de não cicatrização (MOHANTY; SAHOO, 2017).

A infiltração dos macrófagos é predominante do terceiro ao quinto dia após a lesão. Ele ativa o desenvolvimento de tecido de granulação e também atua como removedor fagocítico, que sintetiza e libera proteases, fazendo a remoção de colágeno desvitalizado e coágulos de fibrina da ferida, expressando vários fatores mitogênicos e citocinas (NETO, 2003). Os macrófagos também estimulam a angiogênese, a fibroplasia e a produção de matriz extracelular (MEC), além de ser a ligação entre as fases inflamatória e proliferativa (KASUYA; TOKURA, 2014).

A segunda fase, a proliferação, começa e os macrófagos adotam um fenótipo anti-inflamatório e profibrótico. O fatores de crescimento que eles produzem, como o TGF- $\beta$ , recrutam fibroblastos do tecido não lesionado circundante. Estas e outras células estimulam a migração de células endoteliais na ferida através da produção de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), entre outros fatores, resultando na formação de novos vasos sanguíneos e, portanto, promove o caráter hipervascular de tecido de granulação (ZIELINS et al., 2014).

O VEGF, por exemplo, descoberto em líquido ascético tumoral, foi originalmente descrito por sua capacidade de aumentar a permeabilidade dos micro vasos e o extravasamento de macromoléculas, incluindo fibrinogênio e outras proteínas da coagulação. O extravasamento dessas proteínas resulta na deposição extravascular de fibrina, favorecendo o processo cicatricial (HAMER et al., 2012).

Tanto em condições fisiológicas quanto em patológicas, o VEGF tem sido descrito como importante regulador da angiogênese pois, trata-se de um potente mitógeno para o endotélio

vascular e modula a expressão de muitas enzimas proteolíticas envolvidas no processo de angiogênese. É super expresso durante o início do reparo tecidual quando o crescimento de capilares atinge seu máximo (BAO, et al., 2009). Uma vez restabelecidos o fluxo sanguíneo e a oxigenação, o principal fator desencadeador da angiogênese, o VEGF, é reduzido e os vasos neoformados começam a diminuir (NETO, 2003).

Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (MENDONÇA, R. J; COUTINHO-NETTO J, 2009) e iniciam a síntese e secreção de componentes dessa matriz, como glicosaminoglicanos e fibras colágenas tipo I e III que estão associadas à proliferação e ao crescimento interno dos capilares (angiogênese) (KUMAR et al., 2005).

Estes, são capazes de estimular a proliferação de queratinócitos (células epiteliais) *in vitro* em matrizes de colágeno sugerindo uma íntima relação entre a fibroplasia e o processo de reepitelização na superfície da ferida (VOROTELYAK *et al.*, 2002). A reepitelização, por sua vez, se inicia com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem epitelial remanescente como de apêndices epidérmicos marginais (PATEL et al., 2005).

A remodelação é a última das fases. Ocorre no colágeno e na matriz, dura meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003b). O tecido de granulação gradualmente reúne mais fibroblastos, que estabelecem o colágeno, resultando eventualmente na formação de uma cicatriz contendo um pequeno número de fibroblastos os quais se diferenciam para miofibroblastos (BRAIMAN-WIKSMAN et al., 2007).

Os miofibroblastos contém fibras intracelulares de actinmiosina e formam conexões especializadas, com fibras extracelulares e outras células dentro da cavidade da lesão. Estas propriedades possibilitam aos miofibroblastos contrair ativamente e gerar a tensão necessária para fechar a ferida. Estes, se aproximam das margens da ferida, forçando as fibras de colágeno a se sobreporem e se interlaçarem e desta maneira dando o suporte para o menor tamanho da lesão (NETO, 2003).

Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas e reabsorção de água, são eventos que permitem uma conexão que aumentam a força da cicatriz e diminui sua espessura (MANDELBAUM, 2003). Durante esta fase ocorre diminuição da atividade celular e do número de vasos sanguíneos, além de perda do núcleo dos fibroblastos, levando à maturação da cicatriz (VIEIRA et al., 2002). Há uma diminuição do número de células e um aumento da síntese e da produção de colágeno do tipo I. As fibras de colágeno,

dispostas paralelamente às linhas de tensão, formam feixes de várias unidades, preferencialmente inter cruzadas, enquanto as fibras orientadas aleatoriamente são digeridas pela colagenase (NETO, 2003).

Embora o reparo de feridas geralmente ocorra de forma ordenada, em condições patológicas, algumas feridas não cicatrizam de forma oportuna e ordenada, o que pode resultar em um processo de cicatrização incompleto e prolongado, com falta de restauração da integridade, resultando em feridas crônicas e não cicatrizantes (MOHANTY, C., SAHOO, S., 2017). Estas tornam-se complexas quando existem complicações associadas como infecção, hematoma e seroma que resultam na cicatrização por segunda intenção (BORGES et al., 2016).

Nesse contexto, o tratamento de feridas crônicas é considerado um desafio para o Sistema Único de Saúde (SUS), pois requer a criação de políticas públicas com investimentos que assegurem a incorporação de novas tecnologias e produtos para cuidar desse pacientes.

## 2.5 Curativos e Coberturas

Curativo ou cobertura é definido como um meio terapêutico que consiste na limpeza e aplicação de material sobre uma ferida para sua proteção, absorção e drenagem, com o intuito de melhorar as condições do leito da ferida e auxiliar em sua resolução. Curativos podem ser, em algumas ocasiões, o próprio tratamento definitivo; em outras, apenas uma etapa intermediária para o tratamento cirúrgico (SMANIOTTO et al., 2012).

As duas últimas décadas têm testemunhado a introdução de muitos curativos, com os novos tornando-se disponíveis a cada ano (Tabela 1). Estes curativos modernos são baseados no conceito de criação de um ambiente ótimo para permitir que as células epiteliais circulem com o objetivo de tratar feridas. Tais condições ideais incluem um ambiente úmido em torno da ferida, a circulação eficaz de oxigênio para ajudar as células e tecidos e uma carga bacteriana baixa (BOATENG et al., 2008).

Outra alternativa que apresenta tratamentos com efeitos farmacológicos significativos é o uso das plantas medicinais. A utilização destas é comum entre a população em geral nas regiões em todo o mundo e têm sido largamente estudados para cicatrização de feridas cutâneas. E incluem: Aloe vera, mimosa, videira, Echinacea, camomila, ginseng, chá verde, jojoba, alecrim, limão, soja, confrei, aveia, alho, azeite e curcumina. A fitoterapia pode abrir novos caminhos para a intervenção terapêutica em feridas cutâneas (PAZYAR, et al., 2014).

**Tabela 1:** Curativos atuais disponíveis para o tratamento de feridas (Adaptado de HAN; CEILLEY, 2016)

<b>Tipos de curativos</b>	<b>Curativos comercialmente disponíveis</b>	<b>Características</b>
Gaze	Curity, Vaseline Gauze, Xeroform	Baixo custo; Pode gerar trauma na troca após secagem.
Filmes	Bioclusive, Blisterfilm, Cutifilm, Flexigrid, OpSite, Tegaderm	Oclusivo; Retém a umidade; Indicado somente para feridas não exsudativas.
Hidrocolóides	Aquacel, Comfeel, DuoDERM, Granuflex, Tegaserb	Oclusivo; Permite períodos longos entre as trocas; Indicado para feridas não infectadas.
Hidrogéis	Carrasyn, Curagel, Nu-Gel, Purilon, Restore, SAF-gel, XCell	Reidrata feridas secas; Facilidade de remoção e troca; pode causar super-hidratação
Espumas	3M Adhesive Foam, Allevyn, Lyofoam, Tielle	Isolante; Promove moderada absorção;
Alginatos	Algisite, Kaltostat, Sorbsan, Tegagen	Altamente absorvente; hemostático
Hidrofibras Substitutos de pele	Aquacel Hydrofiber Alloderm, Apligraf, Biobrane, Bioseed, Dermagraft, Epicel, EZ Derm, Hyalograft, Integra Omnigraft, Laserskin, Myskin, TransCyte	Altamente absorvente; Confere à ferida fatores de crescimento; alto custo; oferece risco de infecção.

Coberturas de última geração têm sido desenvolvidas e aplicadas com o objetivo de auxiliar e favorecer um meio adequado à cicatrização, sendo sua seleção associada a um processo de avaliação crítico e contínuo e à promoção de uma terapêutica com base na visão holística do paciente (ALMEIDA et al., 2002). Nesta situação, polímeros naturais têm sido cada vez mais estudados para o manejo de feridas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade e baixa antigenicidade (BAYER et al., 2012; CEN et al., 2008; CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014; LYNN; YANNAS; BONFIELD, 2004; PATI et al., 2012)

## 2.6 Membrana bioativa de Colágeno

A maioria dos biomateriais degradáveis utilizados atualmente compreendem uma classe de sintéticos e/ou polímeros biológicos naturais, tal como o alginato, quitosana, colágeno e fibrina (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). O colágeno é um biomaterial utilizado e que possui diversificadas aplicações na área biomédica, devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradação controlável (KIRK, J. F. et al., 2013).

É amplamente utilizado como matéria prima para a produção de biomateriais nas formas de membranas, esponja, pó, como agente hemostático e materiais para o revestimento de queimaduras e outras lesões, ou ainda como suporte para crescimento de terminais nervosos periféricos danificados (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998). Esses produtos são resistentes à degradação e funcionam como suporte para a adesão, migração e proliferação celular, fatores benéficos à cicatrização de feridas (GIRARDI, 2005, PARENTEAU-BAREIL et al., 2011).

Atualmente as membranas de colágeno hidrolisado (gelatina) têm sido um dos materiais mais estudados, pois o colágeno tipo I representa um importante constituinte proteico da pele. Apresentando um papel relevante na dispersão e dissipação de forças mecânicas, é abundante em tecidos em que forças extremas são transmitidas, como em tendões, ossos e pele (VIEIRA, 1997). Além de criar uma interface mais fisiológica entre a superfície da ferida e o ambiente e serem impermeáveis às bactérias, as membranas de colágeno têm outras vantagens em relação aos curativos convencionais como: facilidade de aplicação e são naturais, não imunogênicos, não pirogênicos, hipoalergênicos e indolores (SINGH et al., 2011).

Os novos materiais resultantes são matrizes colagênicas carregadas, utilizadas como suporte para crescimento celular, géis de colágeno viscoelástico para reposição do humor vítreo, géis de colágeno para liberação de droga ou ainda para o estudo da fibrilogênese do colágeno (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998). Os filmes carregados facilitam esterilização e tornar-se flexível após a hidratação, sem comprometer à sua força mecânica (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014).

## 2.7 D-limoneno

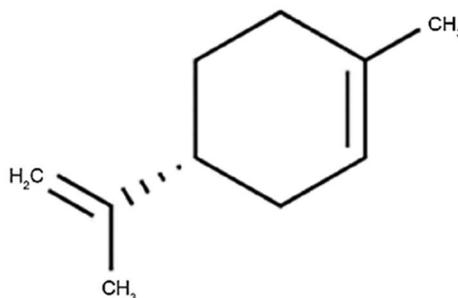
Durante séculos, as plantas medicinais têm sido usadas para tratar várias doenças em todo o mundo, e ainda estão apresentando um papel importante nos sistemas de saúde em muitos países em desenvolvimento. A utilização de extratos de plantas ou de compostos derivados de plantas no tratamento de feridas tem sido bem documentada (IPEK SÜNTAR, et al., 2012).

Os óleos essenciais são óleos voláteis e grande parte deles são retirados das cascas das frutas cítricas e, tem aplicações variadas nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001). Os monoterpenos, são pertencentes a um grande e diversos grupo de compostos químicos chamados “terpenos”, que representam um grupo de ocorrência de compostos orgânicos naturais cuja estrutura base consiste em duas unidades de

isopreno ligados, que são formadas cada uma por uma base- carbono5 (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS-JÚNIOR, 2013).

Eles são as moléculas mais representativas que constituam 90% dos óleos essenciais e têm uma grande variedade de estruturas, que possui propriedades farmacológicas relevantes, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-oxidante, antipruriginosa, hipotensora e atividades analgésicas (BARRETO et al., 2014). Monoterpenos extraídos de óleos essenciais provaram ser úteis para controlar a inflamação e para acelerar a cicatrização de feridas (D'ALESSIO et al., 2014).

O D-limoneno é uma fração oleosa, sendo considerada uma das mais puras fontes de terpeno monocíclico (Figura 4) (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001). É o isômero mais frequente, sendo o principal constituinte de óleos essenciais cítricos, o que representa entre 70 e 96% destes (MENÉNDEZ et al., 2002). É amplamente usado como sabor e fragrância adicionado em alimentos comuns, na formulação de cosméticos, produtos de limpeza, pesticidas ecológicos e também considerado seguro para a conservação de alimentos (VIEIRA et al., 2018).



**Figura 4: Estrutura química do D-limoneno** (YU et al., 2017).

O metabolismo do limoneno e sua cinética de eliminação em humanos foi investigada por SCHMIDT; GÖEN, 2017. Nesse estudo foi descoberto que os seus metabólitos carveol, ácido perílico, limoneno-1,2-diol e limoneno-8,9-diol, mas não álcool perílico ou limoneno em si, eram detectáveis nos sangue dos voluntários após 5 h de uma dose oral de limoneno, evidenciando uma rápida ação do metabolismo. O perfil urinário dos metabólitos é muito semelhante ao do sangue. O limoneno e os seus metabólitos também foram eliminados por via respiratória, deixando um odor característico no ar exalado.

Após administração oral, o limoneno é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, distribuído e metabolizado sendo considerado seguro, por apresentar baixa toxicidade aos humanos, sem indução de risco carcinogênico ou nefrotóxico (SUN, 2007) e ser

quase totalmente eliminado do metabolismo do corpo após 24h de sua ingestão (SCHMIDT; GÖEN, 2017.)

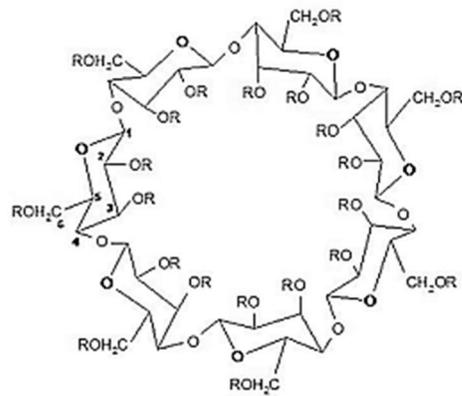
Numerosas propriedades terapêuticas foram atribuídas ao limoneno (CHI, et al., 2013). Segundo VIEIRA et al., 2018, após relato e análise de mais de sessenta artigos publicados nos últimos dez anos sobre diferentes efeitos oferecidos pelo limoneno, pode-se afirmar que o limoneno apresenta propriedades anti- inflamatórias, antidiabético, antioxidante, anticancerígeno, antialérgico, antinociceptivo, e atividades anti-estresse, além de efeitos positivos no tratamento de úlcera gástrica, colite, asma e inflamação das vias aéreas, entre outras atividades.

No âmbito da cicatrização de feridas D'ALESSIO et al., 2014 em seu estudo, inferiu que a administração tópica de d-limoneno tem efeitos positivos na cicatrização de feridas mais provavelmente mediada pelo seu principal metabolito POH (perilil álcool) esses benefícios envolvem a capacidade específica do POH de diminuir inflamação e a neoangiogênese. Isso sugere que as propriedades curativas das feridas destes envolvem um efeito direto nas células epiteliais. Tornando assim o D-limoneno um produto promissor no tratamento de feridas.

## 2.7 -Hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina

Fármacos pouco solúveis em água apresentam, em geral, problemas de biodisponibilidade, sendo a solubilidade o fator limitante para a absorção dos mesmos. Dentre as técnicas empregadas para aumentar a solubilidade e diminuição de toxicidade, destaca-se o emprego da complexação de fármacos com ciclodextrinas (CDs), que são oligossacarídeos cíclicos compostos por unidades de glicose unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 e alteram a intensidade e a duração dos efeitos dos fármacos. As  $\beta$ -CDs são carreadores, levando a molécula hidrofóbica em solução, mantendo-a dissolvida e transportando-a à membrana celular lipofílica (GRILLO et al., 2008).

Como exemplos de derivados sintéticos das ciclodextrinas naturais, pode-se citar a 2-hidroxipropil- - CD (HP- -CD), o 2,6-dimetil- -ciclodextrina e o sulfobutiléter de -ciclodextrina (MATIOLI, 2000). Alguns CDs quimicamente modificados, como a hidroxipropil-  $\beta$  -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) (Figura 5) ganharam importância, por causa de seus tamanhos de cavidade adequados e maior hidrofílicidade. As CDs atuam como excelentes portadores do fármaco hidrofóbico moléculas em fase de solução ao entregá-los à superfície da membrana biológica (ALEEM et al., 2008).



**Figura 5: Representação esquemática da estrutura da HP-β-CD (Adaptado de GRILLO et al., 2007).**

Por fazer parte do grupo de óleos essenciais, apresentar característica hidrofóbica e diante das propriedades já elucidadas na literatura, buscou-se a criação de um complexo de D-limoneno em hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD + Lim). O desenvolvimento deste, permite uma melhor absorção do monoterpene à pele, além de ser um produto promissor quando incorporado à membranas bioativas de colágeno sobre a cicatrização de feridas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Avaliar o efeito do D-limoneno incorporado à membranas bioativas de colágeno sobre a cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal de ferida cirúrgica aberta.

#### 3.2 Específicos

- Desenvolver complexo de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina + Limoneno (HP- $\beta$ -CD + Lim)
- Determinar a eficiência de complexação de hidroxipropil-  $\beta$  -ciclodextrina + Limoneno (HP- $\beta$ -CD + Lim);
- Desenvolver membranas bioativas de colágeno incorporadas com o D-limoneno complexado em hidroxipropil-  $\beta$  -ciclodextrina.
- Caracterizar físico-quimicamente as membranas bioativas de colágeno incorporadas com D-limoneno;
- Avaliar farmacologicamente as membranas bioativas de colágeno incorporadas com o D-limoneno sobre o processo de cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal;
- Determinar alterações morfológicas do processo de cicatrização de feridas cutâneas induzidas pelo D-limoneno incorporado às membranas bioativas de colágeno;
- Quantificar o imunoconteúdo de VEGF e NFkB das feridas cutâneas excisionais em modelo animal.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do complexo HP- $\beta$ -CD + Lim

A obtenção do complexo HP- $\beta$ -CD + Lim foi realizada a partir da inclusão do Limoneno (Sigma, EUA) em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (Sigma, EUA) através do método de liofilização descrito por Carvalho et al. (2017). A solução foi preparada na proporção de 1:1 contendo D-limoneno e a hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, respectivamente. Ambos foram adicionados à água destilada, e a solução foi agitada através de barra magnética a 400 rpm (Quimis Q 261A21, Brasil) com temperatura ambiente por 36 horas. A amostra foi congelada a - 72 °C por 8h e liofilizada por 4 horas.

### 4.2 Obtenção das Membranas de Colágeno

Para a preparação dos filmes foi utilizado o D-Limoneno complexado em HP- $\beta$ -CD na quantidade de 1g (1%). A partir daí foram desenvolvidas dois tipos de membranas: uma contendo colágeno- HP- $\beta$ -CD (COL/ HP) e uma membrana contendo colágeno- HP- $\beta$ -CD-D-limoneno (COL/ HPLim). Para o preparo da membrana COL/HP, foi utilizada a solução contendo colágeno liofilizado, plastificante e ácido acético 0,5 mol/L.

O processo de obtenção da membrana contendo D-limoneno à 1% foi semelhante ao processo de obtenção da membrana COL/HP. A etapa de diferenciação foi realizada a partir do acréscimo do complexo HP- $\beta$ -CD-(D)-limoneno, após a agitação por 24h da solução de preparo de membrana de colágeno. Para obtenção da membrana bioativa, foi utilizado o método denominado "casting" descrito por NUNES et al., (2011) que consiste em verter a dispersão aquosa do polímero (contendo ou não o princípio ativo) em suportes adequados, como por exemplo, suportes de polietileno ou placas de Petri. Estes suportes foram colocados à temperatura ambiente até a secagem para obtenção das membranas.

### 4.3 Análises do D-limoneno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

#### 4.3.1 Preparo da amostra

Para as análises cromatográficas, preparou-se uma solução padrão estoque de D-limoneno (Sigma-Aldrich®, pureza  $\geq 97\%$ ) dissolvido em acetonitrila na concentração de 1

mg/mL. A solução obtida foi submetida à banho de ultrassom por 60 minutos, filtrada em filtros de membrana (PTFE - 0,45 µm) e em seguida, foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

#### 4.3.2 Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo líquido *Shimadzu*®, equipado com um degaseificador DGU-20A3, duas bombas LC-20AD, um injetor automático SIL-20A HT, um forno CTO-20A, um detector de arranjo de diodos SPDM20Avp, acoplados a um sistema controlador CBM-20A. As análises foram executadas em uma coluna analítica C18 *Phenomenex Luna* de 150 x 4,6 mm de diâmetro (5 µm tamanho de partícula), equipada com uma pré coluna C18 *Phenomenex Luna* de 20 x 4 mm de diâmetro (5 µm tamanho de partícula). A fase móvel das análises consistiu de uma mistura de solventes: (B) acetonitrila e (A) água ultrapura (*milli-q system*). O método consistiu de um sistema isocrático de eluição na proporção de 55/45 (B/A) da fase móvel em um tempo de análise de 20 minutos. O fluxo da fase móvel foi de 0,8 mL/min e o volume de injeção da amostra foi de 20 µL. O comprimento de onda para detecção do D-limoneno foi de 210 nm e as análises foram realizadas em temperatura ambiente.

Para confirmar a presença (identificação) do D-limoneno nos complexos de inclusão ou nas membranas bioativas, o pico cromatográfico do D-limoneno obtido nos cromatogramas dessas formulações foram comparados com o cromatograma do D-limoneno padrão, baseando-se no tempo de retenção e espectro UV. Para as análises quantitativas, preparou-se uma curva de calibração do D-limoneno. A curva foi preparada em 5 diferentes concentrações: 5, 50, 100, 150 e 300 µg/mL. Antes das análises por CLAE, todas as amostras da curva foram submetidas a ultrassom sonificador por 30 minutos e filtradas em filtros de membrana (PTFE - 0,45 µm). As análises foram realizadas em triplicata (n = 3).

Para as análises quantitativas, foi preparada uma curva de calibração na faixa de concentração de 5 – 300 µg/mL. A curva obtida apresentou a equação da reta  $y = 10452x + 28158$  e coeficiente de correlação (r) de 0,9993 (Figura 6). A curva apresentou-se adequada, uma vez que, foi preparada a partir de 5 concentrações diferentes e o “r” gerado foi  $\geq$  que 0,99, que é o valor mínimo exigido pela legislação vigente (ANVISA, 2017). Dessa forma, a equação pode ser utilizada para análises quantitativas envolvendo o limoneno em preparações farmacêuticas.

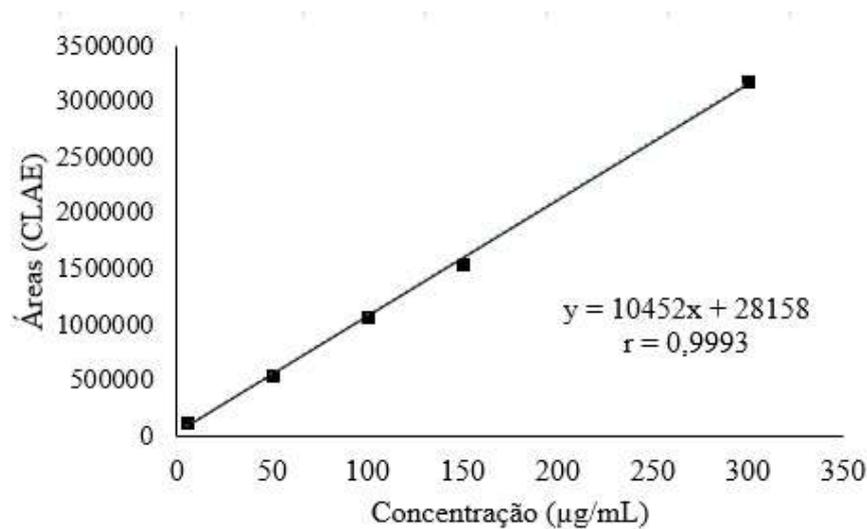


Figura 6: Curva de calibração do limoneno (5 – 300 µg/mL).

#### 4.3.3 Eficiência de complexação (EC)

Inicialmente, foram preparados dois complexos de inclusão do D-limoneno com diferentes ciclodextrinas: limoneno complexado com hidroxipropil-β-ciclodextrina (Lim/HP-β-CD) pelo método de liofilização; limoneno complexado com β-ciclodextrina (Lim/β-CD) pelo método de co-evaporação, ambos preparados de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Para a determinação da EC, 10 mg de cada complexo foram diluídos em 10 mL de acetonitrila. As soluções obtidas foram mantidas em agitação magnética por 24 horas (*overnight*), para garantir que o princípio ativo esteja em solução. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm – 15 minutos) para remover as ciclodextrinas da solução, deixando somente o princípio ativo (ABARCA et al., 2016; CARVALHO et al., 2017). Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado, filtrado em filtros de membrana (PTFE - 0,45 µm) e analisados por CLAE. As análises foram realizadas em triplicata (n = 3). A EC do complexo Lim/HP-β-CD e Lim/β-CD foram determinadas pela equação 1.

$$EC = \frac{\text{Quantidade de limoneno complexado}}{\text{Quantidade inicial de limoneno}} * 100 \quad Eq. (1)$$

4.4.4 Análise da eficiência de incorporação (EI) do complexo Lim/HP-β-CD em membranas bioativas de colágeno por CLAE

Inicialmente, foi preparada a membrana bioativa: membrana de colágeno contendo D-limoneno complexado em hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (membrana COL/HPLim) de acordo com a metodologia descrita anteriormente. Para determinar a EI do D-limoneno na membrana COL/HPLim, as membranas foram fracionadas em área de 7 cm<sup>2</sup> (formato esférico). As frações das membranas foram diluídas em 10 mL de acetonitrila, mantidas sob agitação magnética constante por 12 horas, para permitir que todo D-limoneno incorporado na membrana estivesse em solução (NUNES et al., 2016). Em seguida, a amostra obtida foi filtrada em filtros de membrana (PTFE - 0,45  $\mu$ m) e analisada por CLAE. As análises foram realizadas em triplicata (n = 3). A EI do D-limoneno na membrana COL/HPLim foi calculada de acordo com a equação 2.

$$EI = \frac{\text{Teor do limoneno nas membranas}}{\text{Quantidade inicial de limoneno}} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

#### 4.4 Animais

Foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus*), albinos da linhagem *Wistar*, fêmeas, com peso compreendido entre 250 – 300 gramas oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe (DFS/UFS). Estes foram mantidos em gaiolas de polipropileno (414x344x168), sob as mesmas condições de temperatura ambiente (20 + 2°C), umidade e ruído, no Biotério do Laboratório de Neurociências e Ensaios Farmacológicos (LANEF), no Departamento de Fisiologia, da Universidade Federal de Sergipe. Com ciclo claro-escuro de 12:00 horas, com a fase clara iniciando às 6:00 e terminando às 18:00 horas, recebendo ração comercial (Purina; Labina) e água *ad libitum*, durante todo o período de experimentação científica.

Todos os protocolos experimentais propostos respeitaram os critérios éticos de experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e Internacional Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). O projeto foi submetido ao comitê de ética e pesquisa na UFS e obteve a aprovação com o CEPA 32/2017.

#### 4.5 Grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos distintos: grupo controle tratados com veículo (COL/HP), grupo tratado com membranas bioativas de colágeno contendo D-limoneno à 1% complexado em HP- $\beta$ -CD (COL/HPLim), e grupo com solução salina (LP).

- COL/HP: submetido ao tratamento com veículo – membrana bioativa de colágeno com HP- $\beta$ -CD – foi subdividido em dois subgrupos (n=8, cada subgrupo) que foram tratados, respectivamente, por 7 e 14 dias consecutivos.
- COL/HPLim: submetido ao tratamento com membrana bioativa de colágeno incorporado com complexo D-limoneno à 1%, foi subdividido em dois subgrupos (n=8, cada subgrupo) que foram tratados, respectivamente, por 7 e 14 dias consecutivos.
- LP (solução salina à 0,9%): foi subdividido em dois subgrupos (n=8, cada subgrupo) que foram tratados, respectivamente, por 7 e 14 dias consecutivos a partir da operação até o sacrifício conforme o grupo.

#### 4.6 Ferida cutânea excisional aberta

Esse modelo de ferida cutânea excisional simula uma ferida aberta e consiste na confecção de um ferimento do tegumento da região dorso-costal do animal que envolve a remoção completa da epiderme e da derme com a profundidade dos planos fasciais ou gordura subcutânea o qual permanece aberto para que possa ocorrer uma cicatrização por segunda intenção (BARRETO et al., 2013).

Para a realização do procedimento cirúrgico, todos os animais foram pesados e anestesiados com xilazina na dose de 10 mg/kg e quetamina na dose de 80 mg/kg, por via intraperitoneal. Após atingir o plano anestésico, os animais foram tricotomizados na região do dorso e foi realizada a antisepsia com iodo-povidona tópico a 7,5% (POVIDONE®). Os animais foram colocados sobre mesa cirúrgica em decúbito ventral e a partir desse momento houve a realização da técnica operatória que seguiu a mesma padronização para todos os animais de ambos os grupos. A técnica utilizada consiste na excisão total da pele e hipoderme realizada com um punch metálico para biópsia com 8 mm de diâmetro (RICHTER®) no centro da área epilada, seguida de hemostasia por compressão digital com gaze e sem a realização de curativos oclusivos. Não houve a sutura das bordas da ferida. A cicatrização ocorre a partir das

margens e na base da ferida pela formação de um coágulo de fibrina que é invadida por tecido de granulação e pela migração de uma língua epidérmica ao longo da interface entre o tecido de granulação e coágulo (úlceras). Isso proporciona grande quantidade de tecido de granulação, fundamental para a contagem dos elementos do tecido de granulação (BARRETO et al., 2013; FREITAS et al., 2010).

Os animais do grupo de avaliação de 7 dias foram submetidos à duas feridas na região dorsal com o objetivo de dispor de material suficiente para as análises histológicas de *Western blot*. Os animais do grupo de avaliação de 14 dias foram submetidos a somente uma ferida na mesma região e suas feridas retiradas para análise histológica. Ao fim do procedimento cirúrgico os animais foram realocados (2 a 2) nas suas respectivas gaiolas alocadas biotério do LANEF (Laboratório de Neurociências e Ensaio Farmacológicos) e que dispõe de sistema de exaustão de ar, com ração, água *ad libitum* e com divisória de acrílico transparente, objetivando mantê-los em ambiente comum mas, sem risco de contato com as lesões. Os mesmos foram examinados diariamente quanto à mobilidade e às condições da ferida e suas complicações sendo registrado em fichas individuais (ANEXO 2).

A realização do tratamento das feridas compreendeu numa única aplicação de uma membrana circular nos animais que faziam parte dos grupos COL/HP e COL/HPLim. Esta membrana foi padronizada no tamanho de 8mm e aplicada imediatamente após a confecção da ferida e hemostasia. O grupo LP, teve somente a administração de SF à 0,9% também numa única aplicação. A retirada da ferida somente ocorreu após a eutanásia dos animais ao término de cada grupo de dias de análise (7 e 14 dias).

#### 4.7 Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica ocorreu no dia da realização do procedimento cirúrgico e ao término nos dias 7 e 14. No dia determinado para a eutanásia, os animais foram novamente pesados e então sacrificados com dose letal de anestésico. Após esse procedimento, os ratos foram colocados em mesa cirúrgica e tiveram suas feridas fotografadas com câmera digital (SONY® cyber-shot 7.2 mega pixels, MPEGmovie VX, DSC-W35) e zoom de 3,0 de aproximação fixada em tripé à distância constante de 33 cm da mesa cirúrgica. Foi realizada a medida do diâmetro da ferida residual no eixo crânio-caudal e latero-lateral com paquímetro digital (marca MESSEN®). Para a determinação das áreas das feridas, foi utilizado uma variação da fórmula  $A = \pi \cdot R \cdot r$  preconizadas por Prata et al. (1988), onde  $A$  corresponde a área

da ferida; “ $\pi$ ” o pi que é um valor matemático e que será utilizado até a quarta casa depois da vírgula, ou seja, 3,1415;  $R$  o raio maior da ferida e  $r$  o raio menor da ferida (PRATA et al., 1988). Neste experimento  $R$  e  $r$  corresponderam aos raios das feridas no sentido crânio-caudal e látero-lateral, respectivamente. Os diâmetros obtidos foram divididos por 2 determinado-se, dessa maneira, os raios (BARRETO et al., 2013).

#### 4.8 Processamento Histológico

Após os protocolos de avaliação macroscópica, os ratos foram eutanasiados, ao 7º ou 14º dia pós operatório e a área das feridas residuais foram retiradas com margem de 1cm de pele íntegra em torno da lesão com profundidade até a primeira camada muscular. A peça foi colocada em uma placa de petri e examinada para verificação de crostas, edema, secreções e necroses. Cada peça foi afixada por alfinetes em EVA e colocada em recipiente plástico com solução de formol tamponado a 10% por 48h para a fixação. Após o período de 48h para fixação as peças foram seccionadas longitudinalmente e tratadas convenientemente para a inclusão em parafina e coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) para posterior análise histopatológica.

As lâminas foram avaliadas quanto à proliferação vascular, presença de células mononucleares e polimorfonucleares, proliferação de fibroblastos e reepitelização na área de cicatrização.

#### 4.9 Análise histomorfológica

##### 4.9.1 Análise Histomorfológica da Reação Inflamatória

Para avaliação das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório/reparativo, foram analisadas as secções histológicas coradas em HE, observando-se os seguintes critérios: intensidade e tipo do infiltrado inflamatório.

A intensidade do processo inflamatório foi observada e determinada de acordo com os seguintes critérios: (+1) – quando as células inflamatórias, independentemente de seu fenótipo, constituírem menos de 10% da população celular observada na área da ferida cirúrgica; (+2) – quando as células inflamatórias, independentemente de seu fenótipo, constituírem entre 10% e 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica e (+3) – quando as células inflamatórias, independentemente de seu fenótipo, constituírem mais de 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica (BARRETO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2009).

Para a determinação da tipagem da reação inflamatória foi considerado a análise quantitativa das diferentes células inflamatórias individualmente, a saber: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos, identificadas pela sua morfologia específica. Desta forma, esta análise obedeceu aos seguintes critérios:

- (+1): quando o fenótipo celular estudado corresponder a menos de 10% do total de células inflamatórias sediadas na área da ferida cirúrgica;
- (+2): quando o fenótipo celular estudado corresponder a mais de 10% e menos de 50% do total de células inflamatórias sediadas na área da ferida cirúrgica;
- (+3): quando o fenótipo celular estudado corresponder a mais de 50% do total de células inflamatórias sediadas na área da ferida cirúrgica.

Após a análise anterior, a reação inflamatória foi categorizada de acordo com o fenótipo inflamatório predominante em:

- Inflamação aguda (quando predominarem neutrófilos e/ou eosinófilos);
- Inflamação subaguda (quando houver equilíbrio entre neutrófilos/eosinófilos e linfócitos/plasmócitos);
- Inflamação crônica inespecífica (quando predominarem linfócitos e/ou plasmócitos);
- Inflamação crônica granulomatosa (quando predominarem macrófagos e/ou gigantócitos) (BARRETO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2009).

#### 4.9.2 Determinação do índice percentual de reepitelização da superfície da ferida

Para a obtenção do índice de reepitelização da superfície da ferida foi avaliado observando-se a formação de epitélio pavimentoso estratificado na região correspondente a superfície da ferida cirúrgica. Para obtenção deste índice, foram selecionadas 04 imagens previamente fotomicrografadas de cada secção histológica. Estas foram processadas em um software específico para morfometria (Image Tool®), onde foi determinado o número de pixels correspondente a área de extensão ocupada pela faixa de epitelização na superfície da ferida e a extensão total da superfície da ferida. Posteriormente foi determinado o percentual de epitelização (Ep) em cada caso, calculando-se a razão entre a extensão superficial ocupada pelo epitélio neoformado (Eex) e a extensão total do ferimento (Et), multiplicando por 100 (BARRETO et al., 2013), de acordo com a seguinte fórmula:  $Ep = (Eex/Et) \times 100$ , onde:

Ep – Percentual de epitelização;

Eex – Extensão superficial ocupada pelo epitélio neoformado;

Et – Extensão total do ferimento

#### 4.10 Ensaaios

##### 4.10.1 *Western blot*

Foi utilizada a técnica de *western blot* para a determinação do imunoconteúdo da proteína VEGF e para o fator de transcrição NFκB. A proteína β-actina foi utilizada como controle constitutivo da técnica.

O tecido de granulação foi homogeneizado em tampão RIPA contendo 1 mM de EDTA, 20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EGTA, 1% de deoxicolado de sódio, 1% de nonidet 40, inibidores de proteases e fosfatases. Uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas através do método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para a análise eletroforética foi adicionado nas amostras 25% (v/v) de uma solução contendo 40% de glicerol, 20% de mercaptoetanol, 250 mM de Tris-HCl e 8% de SDS. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos.

Foram aplicadas quantidades iguais de homogenato (30 µg) em um gel de eletroforese de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE) e posteriormente foi realizada a transferência para uma membrana de PVDF por 3h a 80 V, utilizando como tampão de transferência 48 mM de Tris, 39 mM de glicina e 20% de metanol. As membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com tampão TBS-Tween (20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% tween-20) e bloqueadas por 1 hora com uma solução de bloqueio (BSA 5% em TBS-Tween). Em seguida, os anticorpos primários contra as proteínas VEGF (anti-VEGF clone JH121), β-actina (anti β-actina) e NFκB (anti- NFκB) foram incubados por 15 h (4°C). Novamente, as membranas foram lavadas 3 vezes por 15 minutos com TBS-Tween e incubadas por 2 h com anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado com peroxidase. A revelação foi feita com os reagentes do kit ECL para produzir a reação de quimioluminescência. As representações de dados e análise densitométrica foram realizadas utilizando-se o NIH Image 1.62 Beta.

##### 4.11 Descarte dos animais

Os animais sacrificados ao término dos protocolos experimentais foram acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados como material biológico infectante e armazenados no freezer do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia/UFS até a coleta

seletiva de lixo biológico da instituição para descarte adequado de acordo com a legislação vigente.

#### 4.12 Análise estatística

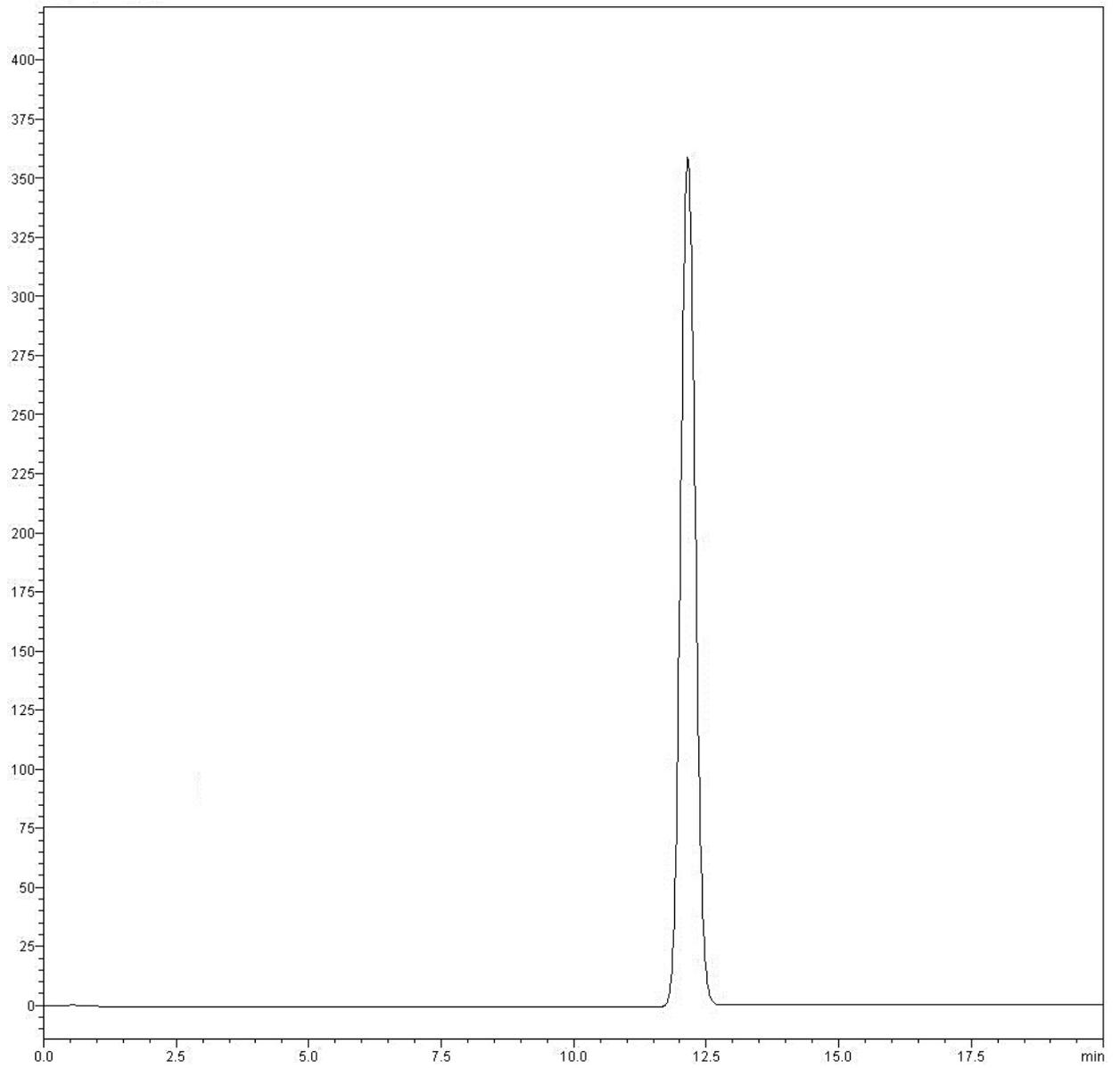
Os resultados obtidos a partir da análise macroscópica e microscópica da ferida cirúrgica foram tratados estatisticamente utilizando-se GraphPad Prism® versão 5.0, através do teste de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey, conforme o caso. Foram consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

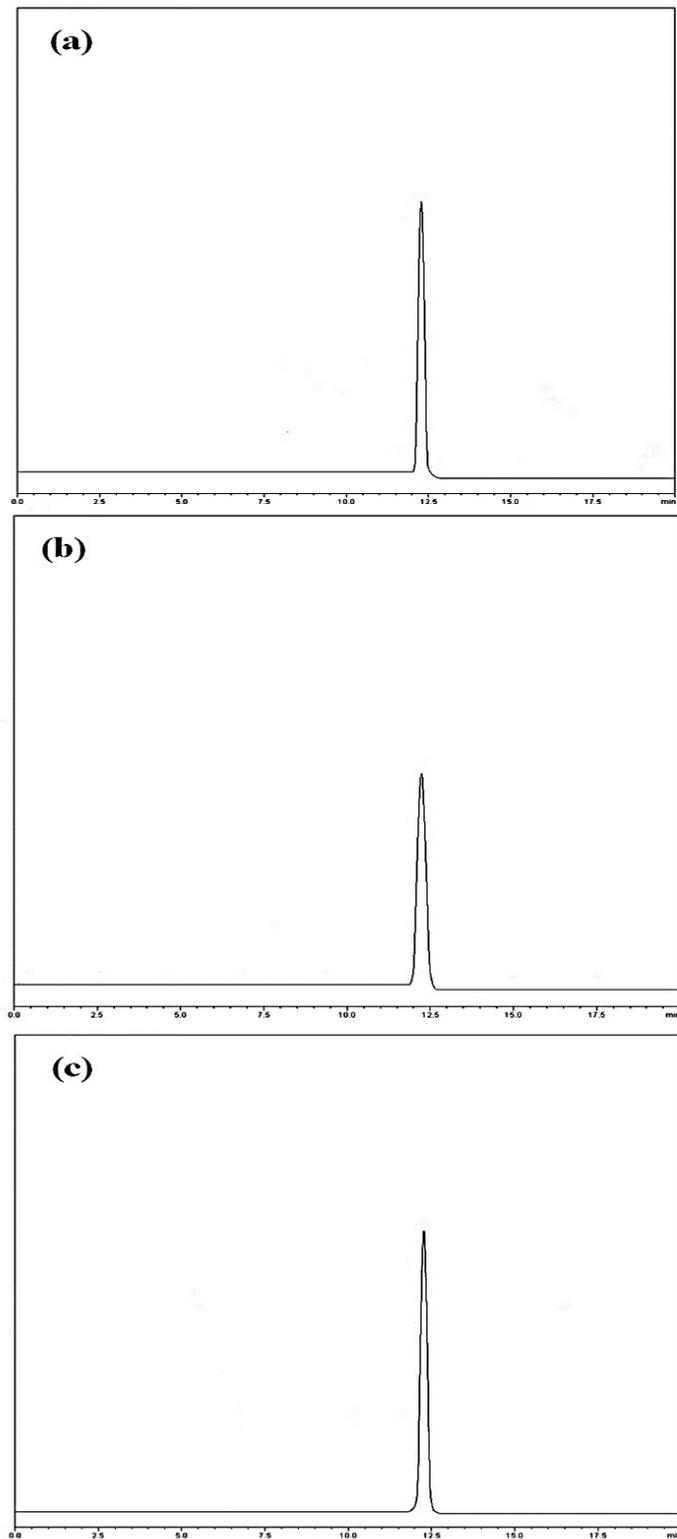
### 5.1 Análises do D-limoneno por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A técnica de CLAE é uma ferramenta analítica bastante utilizada para identificação e quantificação de substâncias em diversas matrizes, tais como: plantas medicinais, plasma sanguíneo, sistemas nanoestruturados e diversas formulações farmacêuticas em geral. Essa técnica cromatográfica permite realizar análises de vários tipos de produtos naturais ou sintéticos na forma livre ou incorporada em alguma preparação farmacêutica de forma segura e eficaz. Além disso, possibilita que as análises sejam realizadas em um curto intervalo de tempo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A figura 7 mostra o cromatograma do D-limoneno (solução padrão) obtido por CLAE e analisado em comprimento de onda de 280 nm. O D-limoneno apresentou pico cromatográfico em 12 minutos de análise, de acordo com a metodologia descrita anteriormente. O pico cromatográfico foi eluído antes dos 20 minutos totais da análise, confirmando que a fase móvel e o tempo de corrida foram adequados para análise, mantendo a boa resolução cromatográfica do cromatograma. O D-limoneno foi identificado nas formulações desenvolvidas (complexo Lim/HP- $\beta$ -CD, complexo Lim/ $\beta$ -CD e membrana Col/Lim/HP- $\beta$ -CD), uma vez que, o pico cromatográfico dessas formulações apresentaram o mesmo tempo de retenção e espectro UV do limoneno padrão, confirmando a incorporação do D-limoneno nas formulações (Figura 8).



**Figura 7:** Cromatograma do limoneno (padrão) obtido por CLAE (280nm).



**Figura 8: Cromatogramas do limoneno nas diversas formulações preparadas. (a): complexo Lim/HP- $\beta$ -CD; (b): complexo Lim/ $\beta$ -CD; (c): membrana Col/Lim/HP- $\beta$ -CD.**

### 5.2 Eficiência de complexação (EC) do D-limoneno nos complexos

A EC é um parâmetro quantitativo utilizado para determinar a quantidade do princípio ativo complexado na ciclodextrina e o valor obtido é expresso em porcentagem (%). A EC foi calculada de acordo com a equação 1 e os valores estão apresentados na tabela 2. O complexo de inclusão Lim/HP- $\beta$ -CD apresentou EC de  $74,32 \pm 0,21$  % (n = 3) e o Lim/ $\beta$ -CD apresentou EC de  $69,19 \pm 0,28$  % (n = 3). Menezes e colaboradores (2016) prepararam um complexo de inclusão do carvacrol com  $\beta$ -CD e obtiveram uma EC de 71,68% (MENEZES et al., 2016). Gaur e colaboradores (2018) prepararam um complexo de inclusão do óleo essencial de orégano com  $\beta$ -CD e obtiveram uma EC de 80,9 % (GAUR et al., 2018). Não existe uma porcentagem mínima para determinar se a EC foi considerada alta ou baixa. Dessa forma, valores de EC próximos à 70% são adequados, uma vez que, mais da metade do D-limoneno utilizado para o preparo do complexo foi incorporado à ciclodextrina. De acordo com os resultados obtidos, o complexo Lim/HP- $\beta$ -CD apresentou melhor EC, o que pode ser explicado, pelo método de obtenção do complexo (liofilização) e também pela afinidade da molécula com o tipo de ciclodextrina.

**Tabela 2:** Valores de EC do complexo Lim/HP- $\beta$ -CD e Lim/ $\beta$ -CD.

Complexo de Inclusão	EC% (n = 3)	Média $\pm$ Desvio Padrão
<b>Lim/HP-<math>\beta</math>-CD</b>	74,08	74,32 % $\pm$ 0,21
	74,52	
	74,35	
<b>Lim/<math>\beta</math>-CD</b>	69,15	69,19 % $\pm$ 0,28
	68,94	
	69,49	

### 5.3 Eficiência de incorporação (EI) do D-limoneno nas membranas COL/HPLim

A EI, assim como a EC, é um parâmetro quantitativo utilizado para calcular a quantidade do princípio ativo incorporado na formulação em estudo, ou seja, nas membranas COL/HPLim. O resultado obtido é expresso em porcentagem (%) e o cálculo foi realizado usando a equação 2. A EI foi determinada nas membranas COL/HPLim fragmentadas em área de 7 cm<sup>2</sup> e a quantidade inicial de D-limoneno por cm<sup>2</sup> utilizada no preparo das membranas foi de 450  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>. O teor de D-limoneno obtido com as análises por CLAE foi de  $300 \pm 0,01$   $\mu$ g/cm<sup>2</sup> (n =

3) e dessa forma a EI do D-limoneno nas membranas COL/HPLim foi de 66,6%. Como explicado anteriormente, assim como a EC, não existe uma porcentagem mínima para determinar se a EI foi considerada alta ou baixa. No entanto, esse valor de 66,6% é aceitável, uma vez que, mais da metade do D-limoneno que estava complexado com HP- $\beta$ -CD foi incorporado nas membranas e assim, está apto a ser liberado da formulação ao aplicar na ferida e realizar os determinados efeitos farmacológicos.

#### 5.4 Efeito da COL/HPLim sobre a área final das feridas de 7 dias

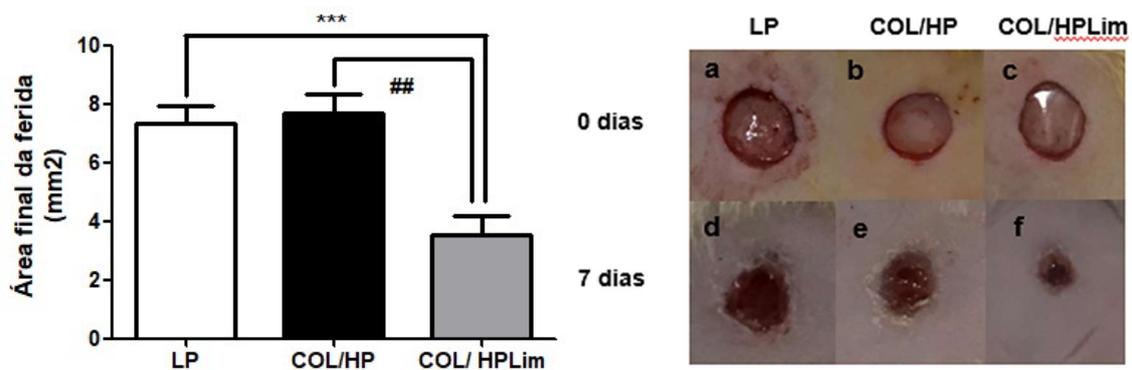
A cicatrização de feridas por segunda intenção ocorre quando as bordas da ferida não podem ser aproximadas, apresentando o leito aberto e o defeito posteriormente seria lentamente preenchido pelo tecido conjuntivo (GUO; DIOIETRO, 2010). O início da cicatrização ocorre após a criação de uma ferida, definida como uma lesão corporal que normalmente envolve laceração ou ruptura de uma membrana e danos aos tecidos subjacentes. A lesão superficial pode ocorrer pela ação de agentes mecânicos ou térmicos, que levam à ruptura da pele ou de outros órgãos e danos ao tecido e sua vascularização. Em seguida ocorre o sangramento, a lesão de endotélio e o extravasamento de proteínas intravasculares e extravasculares. Este ambiente serve como um estímulo para hemostasia, inflamação e outros eventos (MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2016).

No 7º dia de experimentação, com o uso de paquímetro digital obteve-se o valor correspondente à área final da ferida (Figura 9). O grupo COL/HPLim apresentou uma área final da ferida significativamente menor ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo controle e quando comparado ao grupo LP (Limpo).

A redução da área da ferida é registrada pelo processo de contração que é mediada por miofibroblastos presentes no tecido de granulação e abrange uma interação de células, matriz extracelular (MEC) e citocinas (MOULIN et al., 2000). Um estudo realizado por Keskin et al., (2017), demonstrou um efeito cicatrizante com o uso de D-limoneno no modelo de ferida excisional e obteve resultado significativo quanto à contração da ferida no sexto dia, associado à sua atividade anti-inflamatória e antimicrobiana que possivelmente contribuiu para este fato com a síntese de colágeno e diminuição das células inflamatórias. Ao mesmo tempo no 7º dia pós-operatório observou-se a fase proliferativa, com a epitelização, angiogênese e formação da matriz extracelular (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

O uso da membrana bioativa de colágeno por se tratar de um biomaterial que estimula a cicatrização de feridas através da deposição e organização de fibras recém-formadas e tecido

de granulação no leito da ferida, cria um ambiente bom para a cicatrização de feridas (NATARAJ, C. et al., 2007). Nesta avaliação o colágeno, considerado um biomaterial que estimula a cicatrização de feridas através da deposição e organização de fibras recém-formadas e tecido de granulação no leito da ferida, também agiu possivelmente como um veículo carreador do complexo contendo o monoterpene D-limoneno. O uso de membranas de colágeno produzidas à base de produtos naturais como sistema de controle de liberação de fármacos (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009) e compostos químicos isolados, a exemplo de timol (RIELLA et al., 2012), ácido úsnico (NUNES et al., 2011), mangaba (COSTA, et al., 2012) está bem estabelecida, mas nenhum estudo utilizando membranas de colágeno contendo D-limoneno foi relatado anteriormente.



**Figura 9:** Efeito de membranas de colágeno contendo D-limoneno complexado em HP- $\beta$ -CD (COL/HPLIM) sobre a área final da ferida (mm<sup>2</sup>) 7 dias após a sua confecção. LP: Grupo de ratos isentos de tratamento (SF à 0,9%); COL/HP: Animais tratados com membrana de colágeno e HP- $\beta$ -CD; COL/HPLim: Ratos tratados com membrana de colágeno contendo D-limoneno complexado em HP- $\beta$ -CD. Ratos foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 7 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores foram representados pela média  $\pm$  E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey (n = 5/grupo). \*\*\*p < 0,001 ao grupo controle. ##p < 0,01 quando comparado ao LP.

### 5.5 Efeito da COL/HPLim sobre a composição histológica das feridas de 7 dias

No que se refere ao tipo do infiltrado e de acordo com Barreto et al., (2013); Ribeiro et al., (2009), no 7º dia pós lesão, a intensidade da resposta inflamatória foi considerada severa em todos os grupos, o infiltrado leucocitário foi predominantemente subagudo (rico em células polimorfonucleares e mononucleares inflamatórias) nos grupos LP e COL/HP e predominantemente crônico inespecífico (rico em linfócitos e plasmócitos) no grupo COL/HPLim (Tabela 3).

**Tabela 3:** Avaliação do perfil do infiltrado inflamatório nos grupos controles e D-limoneno após 7 dias dos procedimentos cirúrgicos.

Grupo	Animal	Intensidade de Reação Inflamatória	Leucócitos					Células gig
			Neut.	Eosin.	Lif.	Plasm.	Macr.	
LP	R1	+3	+2	+1	+2	+1	+1	+1
	R2	+3	+2	+1	+2	+1	+1	+1
	R3	+3	+2	+1	+3	+1	+1	+1
	R4	+3	+2	+1	+2	+1	+1	+1
	R5	+3	+2	+1	+2	+1	+1	+1
COL HP	R1	+3	+1	+1	+3	+1	+1	+1
	R2	+3	+1	+1	+3	+1	+1	+1
	R3	+3	+2	+1	+2	+1	+1	+1
	R4	+3	+2	+1	+2	+1	+3	+1
	R5	+3	+2	+1	+2	+1	+1	+1
COL/HPLim	R1	+3	+1	+1	+3	+1	+1	+1
	R2	+3	+2	+1	+2	+1	+1	+1
	R3	+3	+1	+1	+3	+1	+1	+1
	R4	+3	+1	+1	+3	+1	+1	+1
	R5	+3	+1	+1	+3	+1	+1	+1

LP: Animais isentos de tratamento (SF à 0,9%); COL/HP: Ratos tratados com veículo (membrana de colágeno com HP- $\beta$ -CD); COL/HPLim: Animais tratados com membrana de colágeno contendo D-limoneno complexado HP- $\beta$ -; R: Rato; Neut.: Neutrófilos; Eosin: Eosinófilos; Linf.: Linfócitos; Macr.: Macrófagos; Cél. Gig.: Células Gigantes. +1: Menos de 10%; +2: Entre 10 e 50%; +3: Mais de 50%.

Quando a ferida completa o seu fechamento e os microorganismos são eliminados, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante em feridas humanas. Os linfócitos, não somente são efetores imunes, mas também, produtores de fatores de crescimento. De forma notável, na etapa de remodelação, eles são atraídos para a região da ferida em igual número que os monócitos e, a partir do décimo quarto dia, são os leucócitos que predominam na região (CURI, et al., 2005). Um estudo realizado por D'Alessio et al, (2014) demonstrou que o uso do D-limoneno em modelo animal de dermatite levou à presença moerada de infiltrados celulares com o predomínio de linfócitos numa avaliação de 7 dias. Dessa forma, a presença de um infiltrado predominantemente crônico inespecífico visto no grupo COL/HPLim, nos leva a inferir que houve um aceleração no processo cicatricial evidenciada pelo leito da lesão encontrar-se rico em linfócitos.

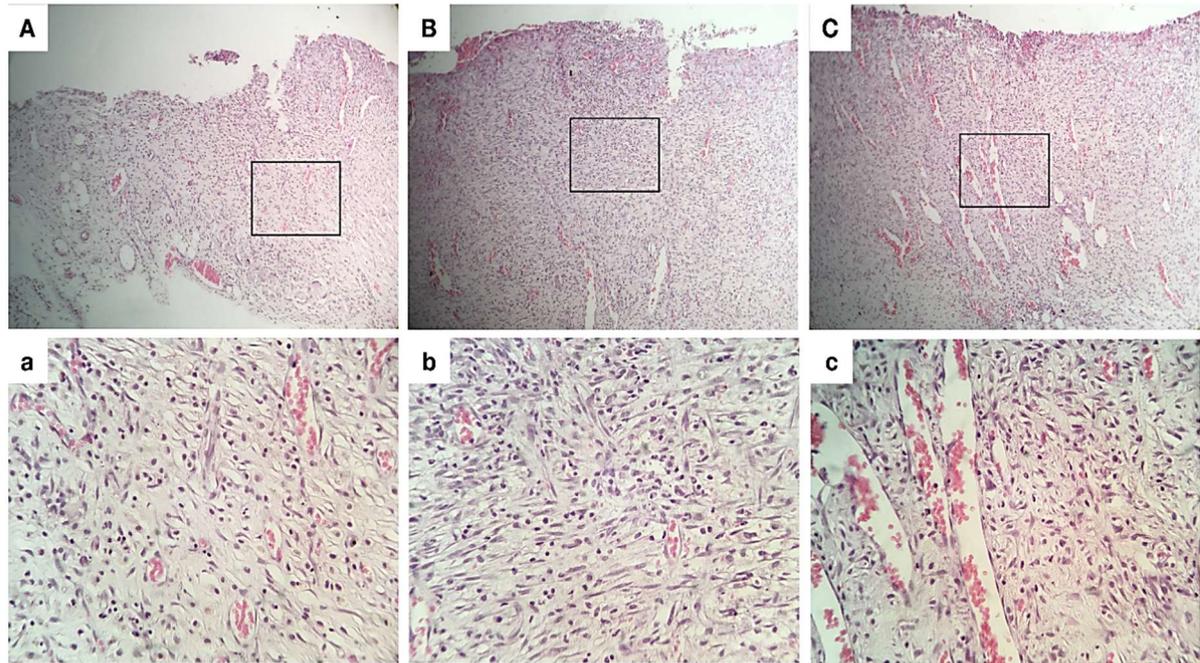
Neste período, os neutrófilos podem constituir até 50% de todas as células presentes na ferida. As principais funções de neutrófilos são defender a ferida de bactérias e remover restos de tecidos. Os neutrófilos liberam vários tipos de enzimas proteolíticas, fragmentando as bactérias. Restos de bactérias e de tecidos são removidos da ferida pela fagocitose dos

neutrófilos (HUNT, T. K., et al., 2006). O efeito positivo na redução dos neutrófilos na resposta inflamatória pode estar na ação do D-limoneno sobre o bloqueio do Fator de transcrição kappaB (NFkB) (LIU, et. al., 2011) o que podemos interpretar como um efeito anti-inflamatório.

Após 48 a 96 horas após o ferimento, os leucócitos predominantes nas feridas são os macrófagos. Da mesma maneira que os neutrófilos, removem da ferida detritos através da fagocitose e secreção de proteases, servindo como uma fonte primária de diversas citocinas e fatores de crescimento, os macrófagos apresentam-se necessários para apoiar o recrutamento e ativação celular, a síntese da matriz extracelular, a angiogênese e a remodelação e estimulam a formação de fibroblastos, a síntese do colágeno pelos fibroblastos e a neoformação de vasos sanguíneos na ferida. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos permanecem dentro de um ferimento até a sua cura completa (MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2016).

Macrófagos iniciam o desenvolvimento do tecido de granulação e liberam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) e fatores de crescimento (fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial (EGF), fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Com a ajuda do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) liberado de plaquetas e FGF, células endoteliais proliferaram e a angiogênese segue. Este processo é essencial para a síntese, deposição e organização de uma nova matriz extracelular (MEC) (HANTASH, et al., 2008).

Nesse estudo pôde-se observar o desenvolvimento de uma delicada rede de vasos capilares formando um tecido de granulação imaturo nos grupos LP, COL/HP e COL/HPLim. Bem como, neste último grupo observou-se também um conteúdo fibroblástico claramente visível em associação com o componente vascular (Figura 10 C e c).



**Figura 10: Fotomicrografias do efeito do limoneno (LIM) sobre a análise microscópica de feridas de 7 dias em ratos.** Severa resposta inflamatória com infiltrado leucocitário rico tanto em neutrófilos quanto em linfócitos nos grupos LP e COL HP (A, a, B e b) e rico em linfócitos no grupo COL HP LIM (C e c) ao 7º dia pós lesão. Conteúdo conspicuo de células fibroblásticas em associação ao componente vascular no grupo COL HP LIM (c).

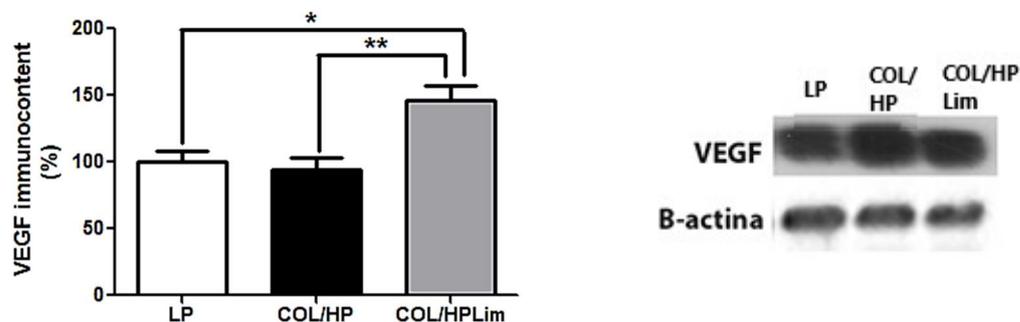
#### 5.6 Efeito da COL/HPLim sobre os níveis de VEGF nas feridas de 7 dias

A produção de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes é acompanhada, na maioria das vezes, por aumento da permeabilidade vascular (BATES; HARPER, 2002). Várias citocinas produzidas durante o processo de cicatrização interferem diretamente na permeabilidade vascular. O FGF, o VEGF e o TGF- $\beta$  são os principais agentes angiogênicos envolvidos (HAMER et al., 2012) sendo o VEGF, o principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento do tecido cicatricial (HOWDIESHELL et al., 2001; NISSEN et al., 1998).

Em todas as feridas, o suprimento sanguíneo dos fibroblastos responsáveis pela síntese de colágeno provém de um intenso crescimento de novos vasos, caracterizando a cicatrização por segunda intenção e o tecido de granulação. A neo-angiogênese é responsável não apenas pela nutrição do tecido, com uma demanda metabólica maior, como também pelo aumento do aporte de células, como macrófagos e fibroblastos, para o local da ferida (TAZIMA, 2008). Esses vasos recém-formados são característicos do tecido de granulação, e tem por finalidade nutrir e oxigenar os tecidos em crescimento (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

No presente estudo, foi avaliado o efeito da membrana bioativa de colágeno contendo D-limoneno complexado (COL/HPLim) sobre a concentração de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) na ferida excisional de ratos 7 dias após a confecção da ferida (Figura 11). O grupo COL/HPLim mostrou-se significativo no que se refere ao aumento de concentração do VEGF ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo LP e também significativo quando comparado ao grupo COL/HP ( $p < 0,01$ ). O que torna-se possível inferir que a aplicação da membrana COL/HPLim elevou a quantidade de imunocontéudo de VEGF neste modelo indicando que o aumento da concentração de VEGF produzido pelo tratamento com COL/HPLim, possivelmente favoreceu a cicatrização, acelerando a fase inflamatória, induzindo a formação de novos vasos e, conseqüentemente, a nutrição tecidual.

Esse achado corrobora com evidências na literatura de que o aumento da quantidade de imunocontéudo de VEGF acelera o processo de cicatrização (MORAES et al., 2013; BREITBART et al., 2001; CORRAL et al., 1999). Porém seriam necessários estudos mais específicos para maior compreensão do efeito da membrana COL/HPLim sobre a vascularização cicatricial cutâneo.



**Figura 11: Efeito de membranas bioativas sobre a quantidade de imunocontéudo do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) na ferida excisional de ratos 7 dias após sua confecção.** LP: Grupo de ratos isentos de tratamento (SF à 0,9%); COL/HP: Animais tratados com membrana de colágeno e HP- $\beta$ -CD; COL/HPLim: Ratos tratados com membrana de colágeno contendo limoneno complexado em HP- $\beta$ -CD. Ratos foram tratadas imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliadas 7 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados pela média  $\pm$  E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo teste de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado ao limpo \*\* $p < 0,01$  quando comparado ao grupo COL/HP.

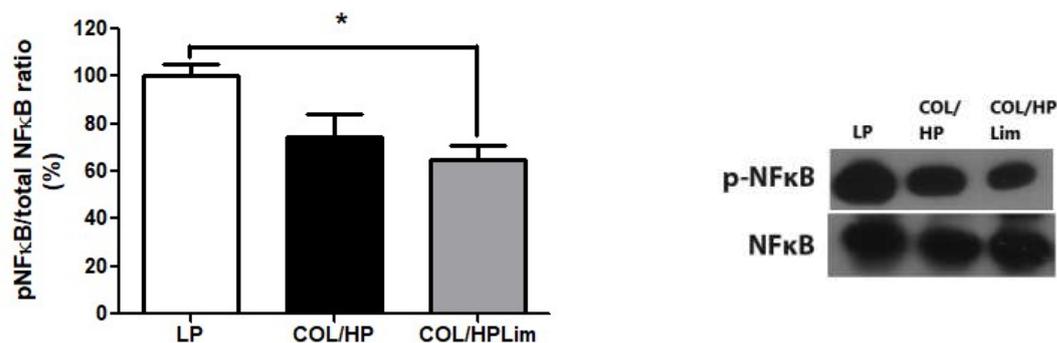
### 5.7 Efeito da COL/HPLim sobre a concentração de NF $\kappa$ B nas feridas de 7 dias

O fator de transcrição nuclear kappa das células B (NF-kappa B) é um grupo de proteínas que participa na expressão de uma ampla variedade de genes que estão envolvidos na

regulação de respostas imunes e inflamatórias (HEWAGAMA; RICHARDSON, 2009). O NFκB ativo migra para o núcleo e liga a transcrição de vários genes principalmente envolvidos na inflamação. A perpetuação da inflamação posteriormente prejudica o crescimento do tecido no local de reparação, finalmente resultando no estado de não cicatrização (MOHANTY, C., SAHOO, S., 2017).

A inflamação persistente é uma característica das feridas que tem um retardo cicatricial, sendo notado o acúmulo prolongado de macrófagos e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, essas feridas tem maiores chances de cronificação da cicatrização (TRENGOVE; BIELEFELD-OHMANN; STACEY, 2008).

Na análise dos níveis do fator de transcrição NFκB no 7º dia após a confecção da ferida (Figura 12), pode-se observar um resultado significativo no grupo dos animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo D-limoneno complexado (COL/HPLim) ( $p < 0,05$ ), quando comparado aos grupos Limpo (LP) e ao grupo veículo (COL/HP) ( $p < 0,05$ ).



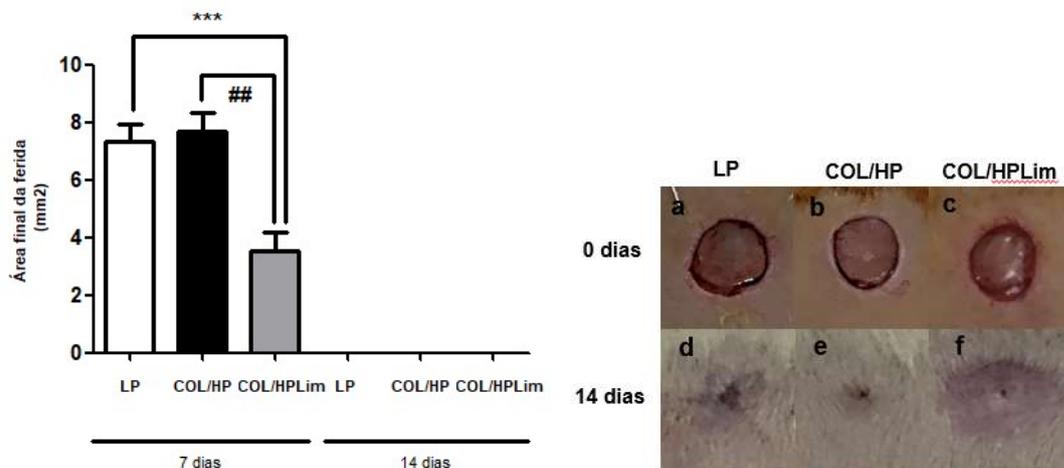
**Figura 12: Efeito de membranas bioativas sobre a concentração de fator de transcrição (NFκB) 7 dias após a confecção da ferida.** LP: Grupo de ratas com tratamento (SF à 0,9%); COL/HP: Animais tratados com membrana de colágeno e HP-β-CD; COL/HPLim: Ratas tratadas com membrana de colágeno contendo D-limoneno complexado em HP-β-CD. As ratas foram tratadas imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliadas no 7º dia após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados pela média ± E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo teste de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado ao limpo de ao grupo limpo.

Estudos demonstraram que os monoterpenos têm propriedades importantes na relação à inflamação (ALMEIDA et al., 2013; DE SANTANA et al., 2015; LEITE et al., 2012; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2013; QUINTANS et al., 2013). Já o papel anti-inflamatório do D-limoneno foi comprovado pela inativação da via de sinalização do NFκB no estudo de Chi et al., 2013. Dessa maneira é possível concluir que a membrana bioativa de colágeno contendo

limoneno complexado diminuiu os níveis de NFκB, provando sua ação anti-inflamatória neste modelo de cicatrização.

### 5.8 Efeito da COL/Lim sobre a área final das feridas de 14 dias

No 14º dia após a confecção das feridas, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos no que se refere à área final da ferida (Figura 13). Este gráfico evidencia praticamente o fechamento total das lesões de 14 dias ao compararmos o grupo experimental de 7 dias.

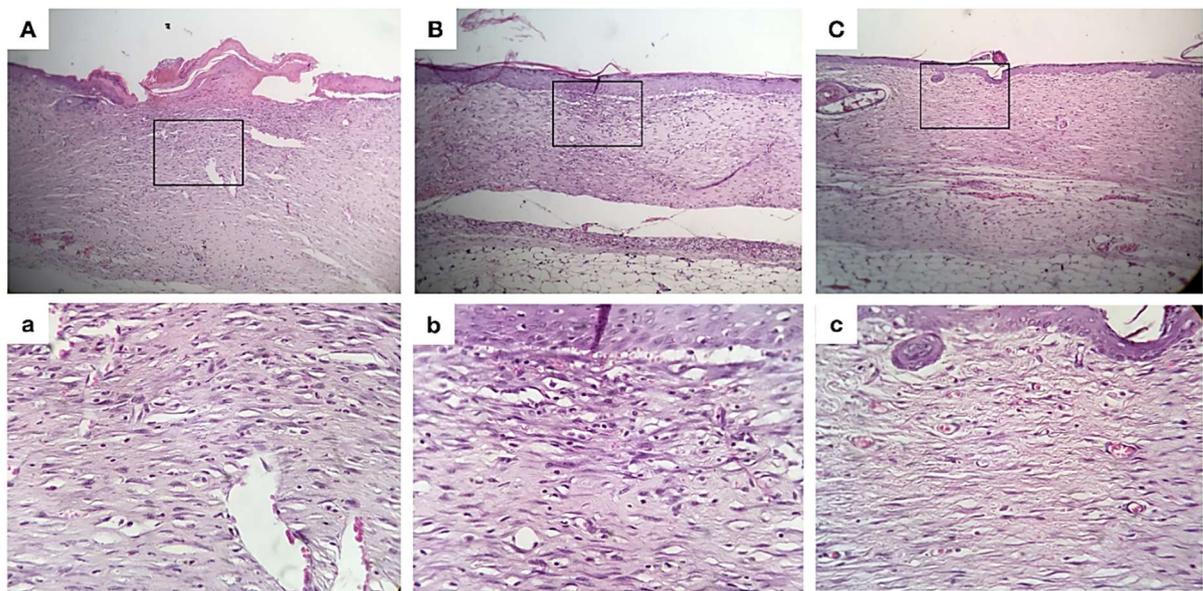


**Figura 13: Comparação sobre o efeito de membranas de colágeno contendo D-limoneno complexado em HP-β-CD (COL/HPLim) sobre a área final da ferida (mm²) entre 7 e 14 dias após a sua confecção.** LP: Grupo de ratas tratadas com SF à 0,9%; COL/HP: Animais tratados com membrana de colágeno e HP-β-CD; COL/HPLim: Ratas tratadas com membrana de colágeno contendo limoneno complexado em HP-β-CD; Ratas foram tratadas imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 14 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores foram representados pela média ± E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ( $n = 5/\text{grupo}$ ). \*\*\* $p < 0,001$  ao grupo controle. ## $p < 0,01$  quando comparado ao LP.

Neste período espera-se que a ferida encontre-se no fim da fase de proliferação, onde observa-se macroscopicamente boa parte da ferida contraída (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Com os resultados, pode-se observar que houve diminuição clara nas dimensões das feridas de todos os animais no 14º dia de avaliação mesmo não havendo, desta forma, diferenças macroscópicas e estatísticas significativas entre os grupos COL/HPLim, quando comparados ao grupo LP e COL/HP.

### 5.9 Efeito da COL/Lim sobre a composição histológica das feridas de 14 dias

Ao 14º dia (figura 14), a intensidade da resposta inflamatória se mostrou moderada nos grupos LP e COL/HP, enquanto que no grupo COL/HPLim (Figura 13 C e c) foi considerada leve. De modo geral, os linfócitos foram os leucócitos mais abundantes do infiltrado observado, sendo o infiltrado classificado desta forma como crônico inespecífico em todos os grupos (Tabela 4). Um notável conteúdo de grandes células fusiformes interpretadas como fibroblastos ativos também foi observado, particularmente no grupo COL/HPLim (Figura 13 c).



**Figura 14: Fotomicrografias do efeito do limoneno (LIM) sobre a análise microscópica de feridas de 14 dias em ratos.** Moderada resposta inflamatória nos grupos LP e COL/HP (a e b), enquanto leve no grupo COL/HPLim(c). E linfócitos mais abundantes no infiltrado leucocitário em todos os grupos no 14º dia (A, B e C). Conteúdo notável de grandes células fusiformes interpretadas como fibroblastos ativos e formação de estruturas epiteliais interpretadas como rudimentos de apêndices cutâneos no revestimento epitelial no grupo COL HP LIM (c).

Durante a formação da cicatriz, a partir da segunda semana, existe um acúmulo contínuo de colágeno e proliferação de fibroblastos. O infiltrado leucocitário, o edema e o aumento da vascularização estão substancialmente diminuídos. Um processo longo de “empalidecimento” é iniciado realizado pelo aumento da deposição de colágeno na cicatriz incisional e pela regressão dos canais vasculares (ROBBINS; COTRAN, 2010). No presente estudo, na avaliação histológica do 14º dia apenas o grupo COL/HP Lim apresentou a formação de "budings" epiteliais interpretados como rudimentos dos apêndices cutâneos no revestimento

epitelial e uma regressão substancial canais vasculares, indicando a superação da fase inflamatória proliferativa e antecipação da fase de remodelação (Figura 14 c).

Tabela 4: Avaliação do perfil do infiltrado inflamatório nos grupos controles e limoneno após 14 dias dos procedimentos cirúrgicos.

Grupo	Animal	Intensidade de Reação Inflamatória	Leucócitos					
			Neut.	Eosin.	Lif.	Plasm.	Macr.	Cél. gig
LP	R1	+2	+1	+1	+3	+1	+1	+1
	R2	+2	+1	+1	+3	+1	+1	+1
	R3	+3	+1	+1	+3	+1	+1	+1
	R4	+2	+1	+1	+3	+1	+1	+1
	R5	+2	+1	+1	+3	+1	+1	+1
COL HP	R1	+2	+1	+1	+3	+1	+1	+1
	R2	+3	+1	+1	+3	+1	+1	+1
	R3	+3	+1	+1	+3	+1	+1	+1
	R4	+2	+1	+1	+3	+1	+3	+1
	R5	+2	+1	+1	+3	+1	+1	+1
COL HP	R1	+2	+1	+1	+1	+1	+1	+1
LIM	R2	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
	R3	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
	R4	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
	R5	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1

LP: Animais tratados com SF à 0,9%; COL/HP: Ratos tratados com veículo (membrana de colágeno com HP- $\beta$ -CD); COL/HPLim: Animais tratados com membrana de colágeno contendo D-limoneno complexado HP- $\beta$ -CD); R: Rato; Neut.: Neutrófilos; Eosin: Eosinófilos; Linf.: Linfócitos; Macr.: Macrófagos; Cél. Gig.: Células Gigantes. +: Menos de 10%; ++: Entre 10 e 50%; +++: Mais de 50%.

### 5.10 Efeito da COL/HPLim sobre o índice de epitelização das feridas de 7 e 14 dias

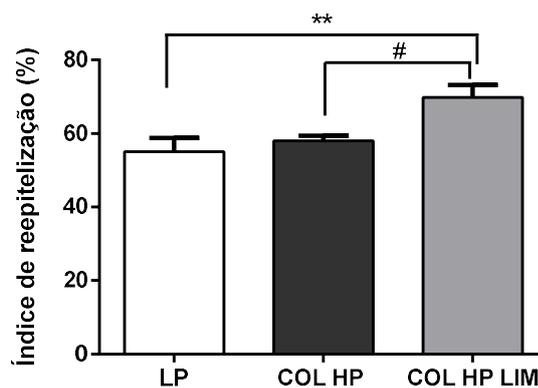
A maturação da ferida tem início durante a 3ª semana e caracteriza-se por um aumento da resistência, sem aumento na quantidade de colágeno (TAZIMA, et al., 2008). No mesmo modo que a angiogênese, a restauração do epitélio começa precocemente no processo de cicatrização, mas não é facilmente perceptível até vários dias após a lesão. A epitelização restabelece a barreira externa que minimiza as perdas de líquidos e a invasão bacteriana. O processo de epitelização começa com espessamento da epiderme ao longo das bordas da ferida (CHILDS; MURTHY, 2017).

As células epiteliais migram, a partir das bordas, sobre a área cruenta, da ferida e dos folículos pilosos próximos, induzindo a contração e a neoepitelização da ferida e, assim, reduzindo a sua superfície. Os queratinócitos, localizados na camada basal da epiderme residual ou na profundidade de apêndices dérmicos, revestidos de epitélio, migram para recobrir a ferida.

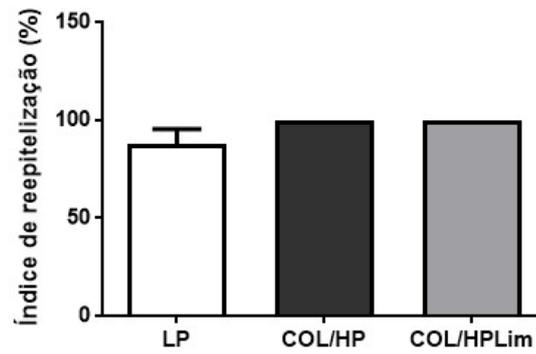
As células epiteliais movem-se, aos saltos e desordenadamente, até as bordas, aproximando-as (TAZIMA, et al., 2008).

A reepitelização da ferida pode ser conceitualmente vista como o resultado de três funções sobrepostas dos queratinócitos: migração, proliferação e diferenciação. Acredita-se que a seqüência de eventos pelos quais os queratinócitos realizam a tarefa de re-epitelização geralmente começa com o início da migração das células basais e de um subconjunto de queratinócitos suprabasilares sobre a matriz da ferida seguidos da mitose. Finalmente, há a recém formação das multicamadas da epiderme e em seguida a restauração da funcionalidade da epiderme (SANTORO; GAUDINO, 2005).

Após 7 dias de experimentação animal, o grupo COL/HPLim registrou uma taxa de reepitelização (Figura 15) significativa quando comparado ao LP (\*\* $p < 0,01$ ) e quando comparado ao grupos COL/HP ( $\#p < 0,01$ ). Já na avaliação dos grupos de 14 dias não foi possível observar distinções estatísticas significativas quanto ao índice de epitelização (Figura16) corroborando com o resultado descrito no item 5.8 onde, as feridas na avaliação macroscópica de 14 dias apresentaram-se epitelizadas e sem diferença significativa entre elas. Além disso, estudos anteriores utilizando produtos naturais já demonstraram que estes quando aplicados em modelos de cicatrização podem agir na modulação do crescimento de células epiteliais e na proliferação de queratinócitos (NUNES, et. al., 2011; VALACCHI, et. al., 2009).



**Figura 15. Efeito de membranas de colágeno contendo limoneno (COL/HPLim) sobre o índice de reepitelização em feridas cutâneas abertas de 7 dias.** LP: Grupo de ratas tratadas com SF 0,9% COL/HP: grupo de ratas tratadas com membrana de gelatina, COL/HPLim: membrana de colágeno contendo limoneno complexado em HP- $\beta$ -CD imediatamente após a lesão cirúrgica e mantido por 7 dias desde a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados  $\pm$  E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo teste de Tukey ( $n = 5/\text{grupo}$ ).



**Figura 16. Efeito de membranas de colágeno contendo limoneno (COL/HPLim) sobre o índice de reepitelização em feridas cutâneas abertas de 14 dias.** LP: Grupo de ratas tratadas com SF 0,9%, COL/HP: grupo de ratas tratados com membrana de gelatina, COL/HPLim: membrana de colágeno contendo limoneno complexado em HP- $\beta$ -CD. Os valores estão representados  $\pm$  E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo teste de Tukey (n = 5/grupo).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 6.1 Conclusão

A partir da análise de eficiência de incorporação, evidenciou-se que mais da metade do D-limoneno que estava complexado com HP- $\beta$ -CD foi incorporado nas membranas comprovando os efeitos farmacológicos a partir da liberação do D-limoneno.

Diante dos dados observados acerca do efeito de COL/HPLim sobre a cicatrização de feridas cutâneas excisionais em roedores, pode-se concluir que a membrana bioativa promoveu a redução da área final das feridas de 7 dias, somada à uma melhor evolução do processo inflamatório evidenciado pelo predomínio de linfócitos já no 7º dia pós lesão. Além de ser capaz nesse modelo de elevar os níveis de VEGF, proporcionando possivelmente a quimiotaxia, vasodilatação e formação de novos vasos, garantindo uma melhor cicatrização e de diminuir o imunocontéudo do fator de transcrição NF $\kappa$ B, na ferida, agindo possivelmente como anti-inflamatório.

Observou-se que o uso de COL/HPLim na avaliação da ferida de 14 dias possivelmente fez efeito sobre a área final da ferida, este evidenciado pelo aspecto histológico com presença de linfócitos e rudimentos de apêndices cutâneos como presença de folículos pilosos em formação e glândulas e uma diminuição substancial do aumento da vascularização, indicando possivelmente uma rápida superação da fase inflamatória e antecipação da fase de remodelação.

Diante do exposto, o uso de produtos naturais associados à tecnologias de incorporação somados ao uso de biomateriais como veículos, à elucidação dos presentes resultados e das atividades descritas previamente para o LIM, como sua ação anti-inflamatória, pode-se sugerir que COL/HPLim representa uma alternativa tecnológica propícia na área de produtos para a cicatrização de feridas especialmente as feridas crônicas e de difícil cicatrização.

### 6.2 Perspectivas

Não foi possível esclarecer todos os mecanismos farmacológicos envolvidos na ação da membrana bioativa de colágeno contendo D-limoneno complexado em HP- $\beta$ -CD no processo de cicatrização no presente estudo. Assim, as próximas etapas deverão conter a realização da análise do TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ , IL-10, CD34, metilperoxidase, estresse oxidativo, alterações morfofisiológicas na cinemática do reparo tecidual, como a participação de miofibroblastos e

de mediadores pró-inflamatórios dentre outros, além da avaliação das fibras de colágeno e do teste da membrana em outros modelos animais de cicatrização.

Dessa maneira é importante ressaltar que o desenvolvimento de um possível produto farmacêutico, seja medicamentoso ou cosmético, será necessário realizar os testes em outras espécies animais (não roedores) e, na etapa clínica, em humanos, de acordo com os parâmetros descritos na RDC-17 de 24/02/00 e RDC-48 de 16/03/04 da ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária).

E por fim, publicação em uma das principais revistas de dermatologia do mundo a BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY, MEDICINA I, A2 e fator de impacto 4,42.

## REFERÊNCIAS

- ABOU NEEL, E. A. et al. Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 429–456, abr. 2013.
- ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. DE et al. Effect of Bovine Type-I Collagen-Based Films Containing Red Propolis on Dermal Wound Healing in Rodent Model. **International Journal of Morphology**, v. 27, n. 4, dez. 2009.
- ALMEIDA, C. E. et al. **Manual para realização de curativos**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2002.
- ALMEIDA, J. R. G. D. S. et al. Borneol, a Bicyclic Monoterpene Alcohol, Reduces Nociceptive Behavior and Inflammatory Response in Mice. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–5, 2013.
- ARNOLD JR, H. L. .; ODOM, R. B. .; JAMES, W. D. A pele: estrutura básica e função. In: **Doenças básicas da pele de Andrews: Dermatologia Clínica**. p. 1–14. 1994
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, 2005.
- BARCA, R. L. et al. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. **Food Chemistry**, v. 196, p. 968–975, abr. 2016.
- BAO, P. et al. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. **Journal of Surgical Research**, v. 153, n. 2, p. 347–358, 2009.
- BARRETO, R. S. S. et al. Evaluation of wound healing activity of atranorin, a lichen secondary metabolite, on rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 310–319, mar. 2013.
- BARRETO, R. S. S. et al. A systematic review of the wound-healing effects of monoterpenes and iridoid derivatives. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 846–862, 2014.
- BARRIENTOS, S. et al. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585–601, set. 2008.
- BATES, D. .; HARPER, S. . Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 4–5, p. 225–237, nov. 2002.
- BAYER, M. L. et al. No donor age effect of human serum on collagen synthesis signaling and cell proliferation of human tendon fibroblasts. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 133, n. 5, p. 246–254, 2012.
- BICAS, J. L.; PASTORE, G. M. Isolation and screening of d-limonene-resistant microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 563–567, set. 2007.
- BOATENG, J. S. et al. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, ago. 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRAIMAN-WIKSMAN, L. et al. Novel Insights into Wound Healing Sequence of Events. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 6, p. 767–779, 25 out. 2007.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, p. 12S–34S, jun. 2006.
- CARVALHO, Y. M. B. G. et al. Inclusion complex between  $\beta$ -cyclodextrin and hecogenin acetate produces superior analgesic effect in animal models for orofacial pain. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 93, p. 754–762, 2017.
- CEN, L. et al. Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials and applications. **Pediatric Research**, v. 63, n. 5, p. 492–496, 2008.
- CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R. T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. **Biopolymers**, v. 101, n. 8, p. 821–833, ago. 2014.
- CHENG, C. W.; SOLORIO, L. D.; ALSBERG, E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 462–484, 2014.
- CHI, G. et al. Suppression of MAPK and NF- $\kappa$ B pathways by limonene contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury. **Inflammation**,

v. 36, n. 2, p. 501-511, 2013.

CHILDS, D. R.; MURTHY, A. S. Overview of Wound Healing and Management. **Surgical Clinics of North America**, v. 97, n.1, 2017.

COLLINS, C. H. .; BRAGA, G. L. .; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1. ed. Unicamp, 2006.

CORAZZA, M. L. .; RODRIGUES, D. G. .; NOZAKI, J. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VINHO DE LARANJA. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 449–452, 2001.

CROVETTI, G. et al. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 30, n. 2, p. 145–151, abr. 2004.

D'ALESSIO, P. et al. Skin Repair Properties of d-Limonene and Perillyl Alcohol in Murine Models. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 29–35, 31 jan. 2014.

DE SANTANA, M. F. et al. The anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles of p-cymene: Evidence for the involvement of opioid system and cytokines. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 11, p. 1583–1590, 2015.

DEALEY, C. **Cuidado de feridas: um guia para enfermeiras**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

DORAI, A. Wound care with traditional, complementary and alternative medicine. **Indian Journal of Plastic Surgery**, v. 45, n. 2, p. 418, 2012.

FREITAS, T. P. et al. Effect of Therapeutic Pulsed Ultrasound on Lipoperoxidation and Fibrogenesis in an Animal Model of Wound Healing. **Journal of Surgical Research**, v. 161, n. 1, p. 168–171, jun. 2010.

GAUR, S. et al. Functionalization of Lipid-Based Nutrient Supplement with  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusions of Oregano Essential Oil. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 6, p. 1748–1756, jun. 2018.

GRILLO, R. et al. Caracterização físico-química de complexo de inclusão entre hidroximetilnitrofurazona e hidroxipropil-beta-ciclodextrina. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 290–295, 2008.

GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Monoterpenes with Analgesic Activity-A Systematic Review. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 1, p. 1–15, 2013.

HAMER, H. M. et al. Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health? **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 302, n. 1, p. G1–G9, jan. 2012.

HANTASH, B. M. Adult and fetal wound healing. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n.12, 2008.

HELARY, C. et al. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behaviour during wound healing. **Biomaterials**, v. 27, n.25, 2006.

HEWAGAMA, A.; RICHARDSON, B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 33, n. 1, 2009.

HUNT, T. K. .; DOHERTY, G. M. .; WAY, L. . **Current surgical diagnosis and treatment**. 12. ed. Nova York: McGraw-Hill, 2006.

IGNÁCIO, C. Desenvolvimento de curativos para cicatrização de feridas por segunda intenção baseados em biomateriais capazes de promoverem resposta celular controlada via estímulo externo. Universidade Federal de Minas Gerais (Tese de Doutorado)- Belo Horizonte, 2009.

ISAAC, C. et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3/4, p. 125, 19 dez. 2010.

IŞERI, S. Ö. et al. Oxytocin ameliorates skin damage and oxidant gastric injury in rats with thermal trauma. **Burns**, v. 34, n.3, 2008.

JÄRBRINK, K. et al. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. **Systematic Reviews**, v. 5, n. 1, p. 152, 8 dez. 2016.

JUNQUEIRA, L. C. .; CARNEIRO. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KASUYA, A.; TOKURA, Y. Attempts to accelerate wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 76, n. 3, p. 169–172, dez. 2014.

KESKIN, I. et al. Effects of Foeniculum vulgare essential oil compounds, fenchone and limonene, on experimental wound healing. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 92, n. 4, 2017.

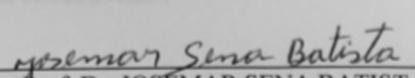
KIRK, J. F. et al. Mechanical and biocompatible characterization of a cross-linked collagen-

- hyaluronic acid wound dressing. **Biomatter**, v. 3, n. 4, p. e25633, 29 out. 2013.
- KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, p. e23, 11 out. 2011.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran – Patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- LAMANO, T. L. C. **Patologia Geral**. Ribeirão Preto, 2008.
- LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de Feridas. **SPDV**, v. 69, n. 3, 2011.
- LAWRENCE, T.; FONG, C. The resolution of inflammation: Anti-inflammatory roles for NF- $\kappa$ B. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 42, n. 4, 2010.
- LEITE, A. P. et al. Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 33, n. 3, p. 198–207, set. 2012.
- LYNN, A. K.; YANNAS, I. V.; BONFIELD, W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 71, n. 2, p. 343–354, 2004.
- MACDONALD, J. Global Initiative for Wound and Lymphoedema Care (GIWLC). **Journal of Lymphoedema**, v. 5, n. 4, p. 172–175, 2009.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393–408, ago. 2003.
- MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, agricultura, biotecnologia, química analítica e produtos gerais**. Maringá: Eduem, 2000.
- MEDEIROS, A. C.; DANTAS FILHO, A. . Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of Surgical and Clinical Research**, v. 7, n. 2, p. 87–102, 2016.
- MENDONÇA, R. J. DE; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257–262, jul. 2009.
- MENÉNDEZ, P. et al. Enzymatic systems involved in D-limonene biooxidation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 2, p. 111–114, jun. 2002.
- MENEZES, P. DOS P. et al. Kinetic and physical-chemical study of the inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin containing carvacrol. **Journal of Molecular Structure**, v. 1125, p. 323–330, dez. 2016.
- MOHANTY, C.; SAHOO, S. K. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1582–1592, out. 2017.
- MOULIN, V. et al. Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. **Burns**, v.26, n.1, 2000.
- NATARAJ, C. et al. Extracellular Wound Matrices: Novel Stabilization and Sterilization Method for Collagen-based Biologic Wound Dressings. **Wounds : a compendium of clinical research and practice**, v. 19, n. 6, p. 148–56, jun. 2007.
- NETO J.C.L. Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em equinos. **Periódicos UFERSA**, 2003.
- NUNES, P. S. et al. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 513, n. 1–2, p. 473–482, nov. 2016.
- NUSSBAUM, S. R. et al. An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. **Value in Health**, v. 21, n. 1, p. 27–32, jan. 2018.
- PATI, F. et al. Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 100 A, n. 4, p. 1068–1079, 2012.
- PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Á. M. Biomaterials: types, applications, and market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.
- PRATA, M. B. et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: esudo experimental em rato. **Acta cir. bras**, v. 3, n. 2, p. 43–8, jun. 1988.
- QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al.  $\beta$ -Cyclodextrin-complexed (-)-linalool produces antinociceptive effect superior to that of (-)-linalool in experimental pain protocols. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 113, n. 3, p. 167–172, 2013.
- QUINTANS, J. D. S. S. et al. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in  $\beta$ -cyclodextrin. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 436–440, 2013.
- RIBEIRO, M. A. G. et al. Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid

- Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660 nm. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 1, p. 49–55, fev. 2009.
- RODRIGUES, H. G. **Modulação do processo de cicatrização pelos ácidos oleico e linoleico**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 26 ago. 2011.
- SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cell Research**, v. 304, n. 1, 2005.
- SANTOS, M. R. V et al. Cardiovascular effects of monoterpenes: A review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 4, p. 764–771, 2011.
- SCHMIDT, L.; GÖEN, T. R-Limonene metabolism in humans and metabolite kinetics after oral administration. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 3, 2017.
- SHEN, C. et al. Kindlin-1 contributes to EGF-induced re-epithelialization in skin wound healing. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 39, n. 4, p. 949–959, abr. 2017.
- SINGH, O. et al. Collagen dressing versus conventional dressings in burn and chronic wounds: A retrospective study. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v. 4, n. 1, p. 12, 2011.
- SMANIOTTO, P. H. DE S. et al. Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, n. 4, p. 623–626, dez. 2012.
- SOOD, A.; GRANICK, M. S.; TOMASELLI, N. L. Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 8, p. 511–529, ago. 2014.
- SUN, J. D-limonene: Safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 6, n.1, 2007.
- SUREDA, A. et al. Antioxidant Response of Chronic Wounds to Hyperbaric Oxygen Therapy. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, 21 set. 2016.
- TAZIMA, M. D. F. G. S. et al. BIOLOGIA DA FERIDA E CICATRIZAÇÃO. **Medicina**, v. 41, n. 3, p. 259, 30 set. 2008.
- VIEIRA, D. C. Estudos da liberação da rolitetraciclina suportada em gel injetável de colágeno aniônico: Ransana 1997. 61p. **Dissertação de Mestrado** apresentada – IFQSC Universidade de São Paulo.
- ZIELINS, E. R. et al. Wound healing: an update. **Regenerative Medicine**, v. 9, n. 6, p. 817–830, nov. 2014.

## ANEXO 1

Formulário de aprovação no COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM ANIMAIS.

 <p><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE</b>  <b>PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA</b>  <b>COORDENAÇÃO DE PESQUISA</b>  <b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)</b></p>	
<b>CERTIFICADO</b>	
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do D-limoneno nanoencapsulado incorporado à membranas bioativas de colágeno sobre a cicatrização de feridas cutâneas", registrada com o nº 32/2017, sob a responsabilidade da Profª. Drª. Jullyana de Souza Siqueira Quintans que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de <b>20/11/2018</b>.</p>	
Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início:11/2018, Término: 03/2020
Espécie/linhagem/raca	Rato Heterogênico
Nº de animais	160
Peso/Idade	250-300g / 02 meses
Sexo	F
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS.
 <hr/> <b>Prof. Dr. JOSÉMAR SENA BATISTA</b> Coordenador do CEPA/UFS	
<hr/> Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos" Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE 49100-000 Fones: 3212 6661/6606	

