



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

MIKAELLA TUANNY BEZERRA CARVALHO

**MEMBRANAS BIOATIVAS DE COLÁGENO CONTENDO CRISINA EM
LIPOSSOMAS REDUZ A INFLAMAÇÃO E PROMOVE MELHORA NA
ANGIOGÊNESE E CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS**

**ARACAJU-SE
2020**

| | |
|--|--|
| | <p>MIKAELLA TUANNY BEZERRA CARVALHO</p> <p>MEMBRANAS BIOATIVAS DE COLÁGENO CONTENDO CRISINA EM LIPOSSOMAS REDUZ A INFLAMAÇÃO E PROMOVE MELHORA NA ANGIOGÊNESE E CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS</p> <p>2020</p> |
|--|--|

MIKAELLA TUANNY BEZERRA CARVALHO

**MEMBRANAS BIOATIVAS DE COLÁGENO CONTENDO CRISINA EM
LIPOSSOMAS REDUZ A INFLAMAÇÃO E PROMOVE MELHORA NA
ANGIOGÊNESE E CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosana de Souza Siqueira Barreto

**ARACAJU-SE
2020**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE –
BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

C331m Carvalho, Mikaella Tuanny Bezerra
Membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas
reduz a inflamação e promove melhora na angiogênese e cicatrização
de feridas cutâneas / Mikaella Tuanny Bezerra Carvalho ; orientadora
Rosana de Souza Siqueira Barreto. – Aracaju, 2020.
118 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade
Federal de Sergipe, 2020.

1. Cicatrização de feridas. 2. Colágeno. 3. Crisina. 4. Lipossomas.
5. Flavona. I. Barreto, Rosana de Souza Siqueira, orient. II. Título.

CDU 616.5-003.92

MIKAELLA TUANNY BEZERRA CARVALHO

**MEMBRANAS BIOATIVAS DE COLÁGENO CONTENDO CRISINA EM
LIPOSSOMAS REDUZ A INFLAMAÇÃO E PROMOVE MELHORA NA
ANGIOGÊNESE E CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS**

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

Data da Aprovação: _____ \ _____ \ _____

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana de Souza Siqueira Barreto

1º Examinador: Prof^a. Dr^a. Tatiana Rodrigues de Moura

2º Examinador: Prof^o. Dr^o. André Sales Barreto

AGRADECIMENTOS

"Que eu saiba agradecer o pouco, para que possa merecer o muito." (Anônimo).

Agradeço primeiramente a Deus, por ser luz na minha vida e por me lembrar que sempre sou mais forte do que penso. E a Santa Terezinha por ter presenteado minha mãe com uma rosa em troca da sua graça alcançada. A eles devo a minha gratidão!

Aos meus pais Eliana e Valmou, peças-chaves que representam meu equilíbrio e força, vocês são os pilares de sustentação que me mantiveram em pé para que não sucumbisse às dificuldades. Obrigada por sempre me apoiarem, por acreditarem em mim e por voarem ao meu lado, sempre me ensinando a buscar nos estudos o atalho para as minhas realizações.

Aos meus irmãos Luisa e Pedro, por estarem sempre do meu lado, por entenderem a minha ausência cuidando dos nossos pais nesses anos em que estive longe de casa. A distância em quilômetros que nos separa há sete anos, ao mesmo tempo nos aproxima e faz com que estejamos cada vez mais unidos e presentes na vida um do outro.

Aos meus avós Josefa e Francisco, por todo carinho, orações e palavras de incentivo.

Aos meus familiares, pelo apoio constante.

A minha orientadora Prof. Dr. Rosana Barreto, que abriu as portas do laboratório para aquela menina ainda desconfiada e assustada com tantas mudanças. Agradeço pela confiança depositada em mim e no meu trabalho. Obrigada por ser minha grande incentivadora para que tudo isso acontecesse e pelas palavras de fé nos meus momentos de aflição, mostrando que Deus age no tempo certo, tendo o poder e controle sobre todas as coisas. Amo você!

A Prof. Dr. Jullyana Quintans, por me mostrar que não há limites aos sonhos. Sua paixão pela pesquisa e a forma como se faz acessível àqueles que buscam por conhecimento me inspiraram!

Aos professores Dr^a. Tatiana Rodrigues e Dr^o. André Sales, membros da banca examinadora, tenho certeza que escolhi as pessoas certas para esse momento especial.

Ao professor Dr. Adriano Antunes, por ceder seu laboratório e alunos para que pudesse realizar a caracterização das membranas. Em especial, Ana Maria pela gentileza, disponibilidade e carinho.

A Ruthynha, que esteve ao meu lado durante toda essa jornada. Você faz parte da realização desse sonho. Obrigada por dividir comigo momentos de alegria, tristeza, risadas e

choros/desespero (e foram muitos), sempre segurando minha mão e mostrando que eu era maior que os meus medos. Tenho certeza que és um anjo de Deus na minha vida e a permissão de dividirmos este trabalho durante esses anos, tornou a caminhada mais leve e feliz.

Ao meu amigo e irmão de coração Heitor Gomes, grande incentivador para que eu seguisse nesta área de pós-graduação. Obrigada por acreditar em mim desde o primeiro ano em Campina Grande. Você me inspira!

As minhas amigas Lenise e Mônica, que me deram todo apoio e incentivo fundamentais para a conclusão desta jornada. Obrigada por serem sempre tão atenciosas, cuidadosas e amáveis.

Aos amigos da faculdade Iago, Larissa, Aísha e Valéria, pelo ombro amigo nos momentos difíceis e pela risada fácil nos momentos de comemoração.

A minha amiga de apartamento Carol, pelo carinho, respeito e dedicação na convivência diária. Para nós que estamos sempre tão distantes da família, poder dividir o lar com uma pessoa tão especial é uma verdadeira dádiva de Deus.

Aos meus queridos amigos Danillo, Juliana, João, Eric, Thallita, Marília, Marlange, Erik, Wagner, Lícia, Fabíolla, Natália, Cleverton e Luana, pelos momentos de alegria e aprendizado. Sem dúvidas, o acolhimento de todos me deu força para superar todos os desafios enfrentados durante o mestrado.

A todos os integrantes do LANEF e LAFAC, que me acompanharam em cada fase me ajudando a vencer o medo e a ansiedade. A presença de vocês foi indispensável para a concretização desse sonho.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia, em especial as meninas da limpeza, que sempre me receberam com um sorriso frouxo todas as manhãs.

Aos animais, que doaram suas vidas pelo bem da ciência.

Ao CNPq, FAPITEC, Universidade Federal de Sergipe e CAPES, pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

Por fim, a todos que me ajudaram a me tornar o que sou hoje e a chegar aonde cheguei, o meu: **MUITO OBRIGADA!**

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

CARVALHO, M.T.B. **Membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas reduz a inflamação e promove melhora na angiogênese e cicatrização de feridas cutâneas.** 2020. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Universidade Federal de Sergipe – UFS, Aracaju, 2020.

RESUMO

A eficácia da terapia farmacológica para o tratamento das feridas é variável, assim como seus efeitos colaterais, o que impulsiona a busca por novas modalidades terapêuticas, dentre elas os produtos com base em plantas medicinais e nanotecnologia. A crisina, um flavonoide encontrado em várias espécies de plantas apresenta propriedades farmacológicas tais como: antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antibacterianas e antialérgicas que podem contribuir para um adequado reparo cicatricial. Desta forma, o trabalho objetivou avaliar os efeitos das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas sobre a cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal de ferida cutânea excisional. Foram utilizados 72 Ratos (*Wistar*) e 18 camundongos (*Swiss*) machos, submetidos a uma excisão cutânea e randomizados nos grupos conforme tratamento: sem intervenção - (SI); controle - membrana de colágeno contendo lipossomas (COL) e membrana de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) – patente requerida junto ao INPI BR 10 2019 018341 1. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo CEPA/UFS (55/2018). As áreas das feridas foram mensuradas através do paquímetro digital de 8 mm de diâmetro no 3º, 7º, 14º e 21º dia pós-lesão e avaliadas histologicamente (coloração hematoxilina-eosina) quanto à resposta e tipo de infiltrado inflamatório, tecido de granulação, proliferação de fibroblastos, deposição de fibras colágenas e reepitelização na área de cicatrização. O efeito das membranas contendo crisina foi avaliado quanto ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator nuclear kappa B (NFκB) por *Western blot*, interleucinas IL-1β e IL-6 por ELISA e SOD e CAT pelo método colorimétrico. As diferenças entre os grupos foram analisadas por meio do teste ANOVA, uma via, seguido pelo pós- teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. e considerados significativos quando $p < 0,05$. O teor da crisina nas membranas foi de $165,37 \pm 11,70 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, obtendo eficiência de encapsulação de 87,82%. Na análise da área de redução das feridas, os animais tratados com COL/CRI aumentaram significativamente o percentual de redução das feridas no 3º dia quando comparado ao grupo SI ($p < 0,05$) e no 7º dia quando comparado aos grupos SI ($p < 0,001$) e COL ($p < 0,01$). Na avaliação da intensidade da reação inflamatória, COL/CRI diminuiu o perfil inflamatório no 3º e 7º dia quando comparado aos grupos SI ($p < 0,001$) e COL ($p < 0,01$) respectivamente. Na análise histomorfológica, COL/CRI aumentou significativamente as taxas de epitelização das feridas residuais no 3º dia quando comparado aos grupos SI ($p < 0,001$) e COL ($p < 0,05$) e no 7º dia quando comparado aos grupos SI ($p < 0,001$) e COL ($p < 0,01$). Na avaliação da atividade inflamatória no 7º dia pós-lesão, o grupo COL/CRI diminuiu significativamente os níveis do NFκB quando comparado ao grupo SI ($p < 0,05$) e os níveis das interleucinas IL-1β e IL-6 ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo SI ($p < 0,001$). No 7º dia pós-lesão, COL/CRI aumentou significativamente os níveis de VEGF quando comparado ao grupo SI ($p < 0,01$) e COL ($p < 0,001$). Na avaliação antioxidante no 7º dia pós-lesão, COL/CRI aumentou significativamente os níveis de SOD quando comparado ao grupo SI ($p < 0,05$) e CAT quando comparado ao grupo SI ($p < 0,001$). Conclui-se, assim, que as membranas contendo crisina apresentam ações antioxidantes, anti-inflamatórias, angiogênicas e cicatrizantes representando uma alternativa biotecnológica promissora com aplicação clínica para o tratamento de feridas.

DESCRITORES: Cicatrização de feridas. Colágeno. Flavona. Crisina. Lipossomas.

CARVALHO, M.T.B. **Bioactive collagen membranes containing chrysin in liposomes reduces inflammation and promotes improvement in angiogenesis and healing of skin wounds.** 2020. Dissertation. Postgraduate Program in Health Sciences - Federal University of Sergipe - UFS, Aracaju, 2020.

ABSTRACT

The effectiveness of pharmacological therapy for the treatment of wounds is variable, as well as its side effects, which drives the search for new therapeutic modalities, among them products based on medicinal plants and nanotechnology. Chrysin, a flavonoid found in several plant species, has pharmacological properties such as: antioxidants, anti-inflammatories, antimicrobials, antibacterials and antiallergic agents that can contribute to an adequate scar repair. In this way, the work aimed to evaluate the effects of bioactive collagen membranes containing chrysin in liposomes on the healing of skin wounds in an animal model of excisional skin wounds. 72 rats (Wistar) and 18 male mice (Swiss) were used, submitted to a cutaneous excision and randomized in the groups according to treatment: without intervention - (SI); control - collagen membrane containing liposomes (COL) and collagen membrane containing chrysin in liposomes (COL / CRI) - patent filed with INPI BR 10 2019 018341 1. The experimental protocols were approved by CEPA / UFS (55/2018). Wound areas were measured using an 8 mm diameter digital caliper on the 3rd, 7th, 14th and 21st day post-injury and histologically evaluated (hematoxylin-eosin stain) for response and type of inflammatory infiltrate, granulation tissue, proliferation fibroblasts, deposition of collagen fibers and re-epithelialization in the healing area. The effect of membranes containing chrysin was evaluated for vascular endothelial growth factor (VEGF) and kappa nuclear factor B (NFkB) by Western blot, interleukins IL-1 β and IL-6 by ELISA and SOD and CAT by the colorimetric method. Differences between groups were analyzed using the one-way ANOVA test, followed by the Tukey post-test. The results were expressed as mean \pm E.P.M. and considered significant when $p < 0.05$. The chrysin content in the membranes was $165.37 \pm 11.70 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, obtaining an encapsulation efficiency of 87.82%. In the analysis of the wound reduction area, the animals treated with COL / CRI significantly increased the percentage of wound reduction on the 3rd day when compared to the SI group ($p < 0.05$) and on the 7th day when compared to the SI groups ($p < 0.001$) and COL ($p < 0.01$). In assessing the intensity of the inflammatory reaction, COL / CRI decreased the inflammatory profile on the 3rd and 7th day when compared to the SI ($p < 0.001$) and COL ($p < 0.01$) groups, respectively. In histomorphological analysis, COL / CRI significantly increased the rates of epithelialization of residual wounds on the 3rd day when compared to the SI ($p < 0.001$) and COL ($p < 0.05$) groups and on the 7th day when compared to the SI groups ($p < 0.001$) and COL ($p < 0.01$). In the assessment of inflammatory activity on the 7th post-injury day, the COL / CRI group significantly decreased NFkB levels when compared to the SI group ($p < 0.05$) and the levels of interleukins IL-1 β and IL-6 ($p < 0.001$) when compared to the SI group ($p < 0.001$). On the 7th post-injury day, COL / CRI significantly increased VEGF levels when compared to the SI ($p < 0.01$) and COL ($p < 0.001$) group. In the antioxidant evaluation on the 7th day after injury, COL / CRI significantly increased SOD levels when compared to the SI group ($p < 0.05$) and CAT when compared to the SI group ($p < 0.001$). It is concluded, therefore, that the membranes containing chrysin have antioxidant, anti-inflammatory, angiogenic and healing actions representing a promising biotechnological alternative with clinical application for the treatment of wounds.

DESCRIPTORS: Wound healing. Collagen. Chrysin. Flavone. Liposomes.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Tipos de coberturas disponíveis para o tratamento de feridas..... | 34 |
| Tabela 2- Teor ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) e EE (%) da CRI nas Membranas de Colágeno Contendo Lipossomas..... | 60 |
| Tabela 3- Avaliação da intensidade e tipo de infiltrado inflamatório das feridas residuais 3 dias após a confecção cirúrgica..... | 68 |
| Tabela 4- Avaliação da intensidade e tipo de infiltrado inflamatório das feridas residuais 7 dias após a confecção cirúrgica..... | 69 |
| Tabela 5- Avaliação da intensidade e do tipo de infiltrado inflamatório das feridas residuais 14 dias após a confecção cirúrgica..... | 70 |
| Tabela 6- Avaliação da intensidade e do tipo de infiltrado inflamatório das feridas residuais 21 dias após a confecção cirúrgica..... | 71 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Representação esquemática da pele..... | 21 |
| Figura 2- Fases do processo de cicatrização de feridas..... | 26 |
| Figura 3- Representação do Lipossoma..... | 38 |
| Figura 4- Estrutura geral dos flavonoides..... | 41 |
| Figura 5- Estrutura química da crisina..... | 42 |
| Figura 6- Processo de extração do colágeno..... | 48 |
| Figura 7- Punch metálico de 8mm para biópsia..... | 52 |
| Figura 8- Paquímetro digital para mensuração do índice de retração da ferida..... | 53 |
| Figura 9- Membrana bioativa de colágeno contendo crisina em lipossomas, após a secagem, obtida pelo método de <i>casting</i> | 59 |
| Figura 10- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a mensuração da redução da área da ferida (%) 3 dias após a confecção da ferida..... | 61 |
| Figura 11- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a mensuração da redução da área da ferida (%) 7 dias após a confecção da ferida..... | 62 |
| Figura 12- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a mensuração da redução da área da ferida (%) 14 dias após a confecção da ferida..... | 63 |
| Figura 13- Efeito de membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a mensuração da redução da área da ferida (%) 21 dias após a confecção da ferida..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Figura 14- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a análise histológica das feridas residuais dos animais no 3º, 7º, 14º ou 21º dias após a confecção da ferida excisional..... | 66 |
| Figura 15- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a intensidade da reação inflamatória no 3º, 7º, 14º e 21º dia pós-lesão..... | 72 |
| Figura 16- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o índice de epitelização em feridas cutâneas abertas no 3º dia..... | 73 |
| Figura 17- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o índice de epitelização em feridas cutâneas abertas no 7º dia..... | 74 |
| Figura 18- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o índice de epitelização em feridas cutâneas abertas no 14º dia..... | 75 |
| Figura 19- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o índice de epitelização em feridas cutâneas abertas no 21º dia..... | 76 |
| Figura 20- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a concentração de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na ferida excisional de ratos 7 dias após a confecção da ferida..... | 77 |
| Figura 21- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a concentração do fator de transcrição nuclear kappa das células B (NFkB) na ferida excisional de ratos 7 dias após a confecção da ferida..... | 78 |

Figura 22- Efeito das membranas de colágeno contendo crisina (COL/CRI) sobre o nível de interleucina 1- β (IL- 1 β) na ferida excisional de camundongos 7 dias após a confecção da ferida.....79

Figura 23- Efeito das membranas de colágeno contendo crisina (COL/CRI) sobre o nível de interleucina 6 (IL- 6) na ferida excisional de camundongos 7 dias após a confecção da ferida.....80

Figura 24- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) na ferida excisional de ratos 7 dias após a confecção da ferida.....81

Figura 25- Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o atividade enzimática da catalase (CAT) na ferida excisional de ratos 7 dias após a confecção da ferida.....82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|--|
| AL | Alcoxila |
| bFGF | Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos |
| CAT | Catalase |
| CEPA | Comitê de Ética de Pesquisa em Animais |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| COL | Membranas bioativas de colágeno pura |
| COL/CRI | Membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas |
| CRI | Crisina |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético |
| EE | Eficiência de Encapsulação |
| EGF | Fator de Crescimento Epidérmico |
| EGTA | Ácido Egtazico |
| EROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| FGF | Fator de Crescimento de Fibroblastos |
| GPx | Glutationa peroxidase |
| HO | Radical Hidroxila |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| ICLAS | <i>International Council for Laboratory Animal Science</i> |
| IL - 1 | Interleucina 1 |

| | |
|---------------------------------|---|
| IL - 10 | Interleucina 10 |
| IL - 12 | Interleucina 12 |
| IL - 1β | Interleucina 1 β |
| IL - 2 | Interleucina 2 |
| IL - 4 | Interleucina 4 |
| IL - 6 | Interleucina 6 |
| INSS | Instituto Nacional do Seguro Social |
| L | Radical Alquila |
| LAFAC | Laboratório de Farmacologia Cardiovascular |
| LANEF | Laboratório de Neurociências e Ensaio Farmacológicos |
| LOO | Peroxila |
| SIS | Lipopolissacarídeo |
| MEC | Matriz extracelular |
| MMPs | Metaloproteinases |
| NFκB | Fator Nuclear Kappa B |
| O₂ | Radical Superóxido |
| PDGF | Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas |
| RNS | Espécies Reativas de Nitrogênio |
| SBAC | Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório |
| SI | Sem Intervenção |
| SOD | Superóxido dismutase |

| | |
|---------------------------------|--|
| TGF-β | Fator de Crescimento Transformador |
| TIMPs | Inibidores Teciduais das Metaloproteinases |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral α |
| VEGF | Fator de Crescimento Endotelial Vascular |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 20 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 2.1 | Pele | 22 |
| 2.2 | Feridas | 24 |
| 2.3 | Cicatrização de feridas | 26 |
| 2.3.1 | Fase de hemostasia | 27 |
| 2.3.2 | Fase inflamatória | 28 |
| 2.3.3 | Fase proliferativa | 31 |
| 2.3.4 | Fase de remodelação | 32 |
| 2.4 | Tratamento de Feridas | 33 |
| 2.5 | Biopolímeros e Colágeno | 36 |
| 2.6 | Lipossomas | 38 |
| 2.7 | Plantas Medicinais | 40 |
| 2.8 | Crisina | 43 |
| 3 | OBJETIVOS | 47 |
| 3.1 | Objetivo Geral | 47 |
| 3.2 | Objetivos Específicos | 47 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 48 |
| 4.1 | Materiais e Substâncias | 48 |
| 4.2 | Extração do Colágeno | 48 |
| 4.3 | Preparo das Membranas | 49 |
| 4.4 | Teor e Eficiência de Encapsulação da Crisina nas Membranas de Colágeno Contendo Lipossomas | 50 |
| 4.5 | Protocolos Experimentais | 51 |
| 4.5.1 | Animais | 51 |

| | |
|---|-----------|
| 4.5.2 Grupos de Estudo | 51 |
| 4.6 Modelo de Ferida Cutânea Excisional | 52 |
| 4.7 Determinação do Índice de Retração das Feridas | 53 |
| 4.8 Processamento Histológico | 54 |
| 4.9 Análise Histomorfológica | 55 |
| 4.9.1 Análise da Reação Inflamatória..... | 55 |
| 4.9.2 Determinação do índice percentual de epitelização da superfície da ferida..... | 56 |
| 4.10 Ensaio Imunoenzimático | 56 |
| 4.10.1 Dosagem de proteínas para <i>Western blot</i> e ELISA: | 56 |
| 4.10.2 <i>Western blot</i> | 57 |
| 4.10.3 Imunoensaio ELISA | 57 |
| 4.11. Avaliação da Atividade Antioxidante..... | 58 |
| 4.11.1 Catalase (CAT)..... | 58 |
| 4.11.2 Superóxido Dismutase (SOD) | 58 |
| 4.12 Descarte dos Animais..... | 59 |
| 4.13 Análise Estatística | 59 |
| 5 RESULTADOS | 60 |
| 5.1 Obtenção das Membranas COL/CRI..... | 60 |
| 5.2 Eficiência de Encapsulação (EE) da CRI nas Membranas de Colágeno Contendo Lipossomas | 60 |
| 5.3 Efeito da COL/CRI sobre a Área de Redução das Feridas..... | 61 |
| 5.4 Efeito da COL/CRI sobre a Composição Histomorfológica das Feridas..... | 66 |
| 5.5 Efeito da COL/CRI sobre os Níveis de VEGF..... | 77 |
| 5.6 Efeito da COL/CRI sobre os Níveis de NFκB | 78 |
| 5.7 Efeito da COL/CRI sobre os Níveis de Citocinas Inflamatórias | 79 |
| 5.8 Efeito Antioxidante da COL/CRI..... | 81 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 84 |

| | |
|--|-----|
| 7 CONCLUSÃO | 93 |
| PERSPECTIVA | 94 |
| REFERÊNCIAS | 95 |
| ANEXOS | 110 |
| ANEXO A - Declaração de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFS. | 110 |
| ANEXO B - Patente de Invenção (PI): Bioprodutos contendo crisina com atividade cicatrizante..... | 111 |
| ANEXO C - Certificado da apresentação do trabalho no VII Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco. Setembro/2019..... | 114 |
| ANEXO D - Certificado de premiação de trabalho em 2º lugar na área de ciências biológicas e da saúde no 11º Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (11º EIDTI)..... | 115 |
| ANEXO E – SUBMISSÃO DE ARTIGO..... | 116 |

1 INTRODUÇÃO

De modo geral as feridas são definidas como o rompimento da continuidade da pele e do tecido celular subcutâneo, podendo atingir camadas mais profundas como músculos, tendões e ossos (KANJ; WILKING; PHILLIPS, 1998; SMANIOTTO et al., 2012). Podem ser classificadas como agudas e de fácil cicatrização ou crônicas quando ultrapassam mais de 90 dias para cicatrizar (THOMAS, 2000). O processo de cicatrização é caracterizado por uma sequência de fases que se sobrepõem de forma contínua e temporal descritas em: hemostasia, fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelagem (CLARK, 1998; PARK et al., 2018).

Embora os dados epidemiológicos sobre incidência e prevalência sejam escassos, alguns estudos trazem que cerca de 3% dos brasileiros são portadores de feridas crônicas, com prevalência de 12% a 39% dessas feridas em pessoas idosas nas instituições de longa permanência (DE SOUZA; DE GOUVEIA SANTOS, 2010; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; VIEIRA; ARAÚJO, 2018). Deste modo, observa-se um alto grau de morbimortalidade, grande impacto psicológico, social e econômico para o paciente, além de custos elevados para o sistema de saúde, sendo as feridas consideradas um problema de saúde pública (TRICCO et al., 2015).

Recentemente várias pesquisas têm sido realizadas no intuito de identificar substâncias capazes de contribuir no processo de reparação tecidual. Na cicatrização de feridas, esses produtos devem ser eficientes e seguros (ARAVINTHAN et al., 2018; FENG et al., 2016; ZAHEDI et al., 2010; ZHAO et al., 2016). Os recursos clínicos adotados no tratamento de feridas incluem métodos clínicos e cirúrgicos, sendo o curativo o mais utilizado para auxiliar na reparação tecidual (SMANIOTTO et al., 2012; VOINESKOS et al., 2009). Dentre os produtos disponíveis no mercado, estão disponibilizadas cerca de 2.500 opções terapêuticas para o tratamento das feridas agudas e crônicas, incluindo desde coberturas simples até as mais complexas como os curativos bioativos, que têm como objetivo principal atuar ativamente em todas as fases do processo de cicatrização (ARASTEH et al., 2019; ÇALAMAK et al., 2014; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; SABOKTAKIN et al., 2011).

Nesse contexto, polímeros naturais vêm sendo cada vez mais estudados e estão entre uma das alternativas mais promissoras para veiculação de princípios ativos destinados a cicatrização de feridas (ZUBER et al., 2015). Já utilizado no tratamento de feridas, o colágeno, é um polímero de origem natural altamente dinâmico e flexível, desempenhando

papel importante na manutenção da integridade biológica e estrutural da MEC, através de constantes remodelações para um maior reparo da função do tecido lesado (BAYER et al., 2012).

Além dos curativos, os produtos naturais, tais como plantas medicinais e seus metabólitos secundários, estão entre as principais alternativas para o tratamento de feridas, principalmente nos países em desenvolvimento, devido a sua acessibilidade e seu baixo custo (DAS; BEHERA; PRAMANIK, 2017; SÜNTAR et al., 2012). Dentre os produtos naturais com interesse pela indústria para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos no tratamento de feridas e na prevenção de doenças crônicas, destacam-se os flavonoides, apresentado como um grupo diversificado de substâncias de origem natural e que compõem o grupo mais comum de polifenóis presente na dieta humana (CHEN et al., 2007, 2014).

Presente naturalmente no mel, própolis, e em várias espécies de plantas, incluindo espécies do gênero *Pelargonium*, *Passiflora* e da família *Pinaceae*, a crisina um flavonoide que pertence à classe das flavonas, vem sendo um dos nutracêuticos polifenólicos mais estudados da atualidade (CHADHA et al., 2017; PICHICHERO et al., 2011). Alguns efeitos farmacológicos já foram descritos para a crisina, tais como antioxidante, anti-inflamatório, antialérgico e atividade antibacteriana, efeitos desejados ao se considerar o processo de cicatrização de feridas (ANAND et al., 2012; BAE; LEE; KIM, 2011; CHADHA et al., 2017; GRESA-ARRIBAS et al., 2010). Estudos mostram que a veiculação de substâncias lipofílicas, como a crisina, em lipossomas promovem aumento da biodisponibilidade, redução da toxicidade, melhorias nas propriedades físico-químicas e efeito farmacológico (ŁUKASIEWICZ et al., 2016; MARCONDES SARI et al., 2017).

Atualmente, os lipossomas têm sido uma alternativa promissora para administração de medicamentos por serem estáveis, biocompatíveis, promovendo melhorias nos perfis farmacodinâmicos e farmacocinéticos do fármaco, além de reduzir a toxicidade e proteger contra os efeitos colaterais de algumas drogas (ADAIR et al., 2010).

Considerando-se o aumento da incidência das feridas cutâneas, o presente estudo buscou determinar o efeito cicatrizante das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas aliado as características do colágeno como um curativo ideal e aos possíveis efeitos farmacológicos da crisina como atividades cicatrizantes e angiogênicas.

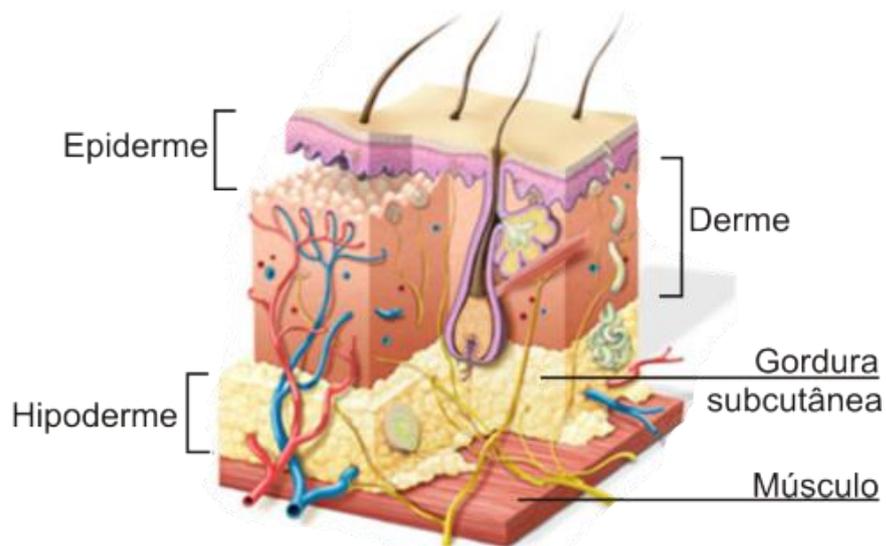
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pele

Considerada o maior órgão e a primeira barreira do corpo, a pele apresenta funções importantes na prevenção de patógenos, na perda excessiva de água e regulação da temperatura. Como órgão imune ativo, hospeda elementos celulares do sistema imune inato e adaptativo, fornecendo proteção contra agentes nocivos externos, além de desempenhar um papel fundamental na manutenção da homeostase do organismo (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008). Juntamente com esta função defensiva, a pele também possui propriedades regenerativas que requer uma coordenação entre vários tipos de células, fatores de sinalização e interações com a matriz extracelular (MEC) para restabelecer a integridade e função do tecido (DEVERAJ, 2014; RODRIGUES et al., 2019).

De modo geral, a pele é composta por três camadas principais: a epiderme, derme e a hipoderme (Figura 1). A epiderme é a camada mais externa da pele, sendo constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e dividida em cinco subcamadas, o estrato basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (LORENCINI et al., 2014).

Figura 1: Representação esquemática da pele.



Fonte: Disponível em: <https://afh.bio.br/imgs/sistemas/tegumentar/Pele_hipoderme.jpg>. Acesso em: 01 de julho de 2019.

Nessa camada são encontrados queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e Merkel. Os queratinócitos são responsáveis pela barreira mecânica, produção de citocinas e sinalização celular; os melanócitos pela proteção contra os raios ultravioletas; as células de Langerhans pela apresentação dos antígenos e por fim, as células de Merkel, responsáveis pela síntese de catecolaminas e sensibilidade tátil (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008; RABE et al., 2006).

Considerada a subcamada mais profunda da epiderme, o estrato basal juntamente com a camada espinhosa apresentam uma intensa atividade mitótica, sendo responsáveis pela constante renovação da epiderme. Localizada logo acima do estrato espinhoso, o estrato granuloso apresenta células irregulares e alongadas, além da presença de grânulos de queratohialina no seu citoplasma que estão associados ao processo de queratinização do epitélio. Já o estrato lúcido, é constituído por uma fina camada de células achatadas preenchidas por queratina, o que torna a membrana plasmática impermeável a fluídos. Por fim, o estrato córneo, que é considerado a camada mais superficial da epiderme, é formado por células mortas, achatadas, anucleadas e queratinizadas que atuam como uma barreira de proteção contra lesões e infecções (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008; GARTNER, 2007; MESCHER, 2009).

Abaixo da epiderme, encontra-se a derme, uma camada espessa de tecido conjuntivo altamente vascularizado e inervado, com presença de folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. A derme está dividida em duas camadas: a camada papilar formada por tecido conjuntivo frouxo e a camada reticular, constituída por tecido conjuntivo mais denso. Os fibroblastos são as células mais comuns dessa camada, sendo responsáveis pela produção das fibras de colágeno e elastina, que conferem a função de resistência e sustentação a essa camada (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008; LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009). Diferentes tipos de células estão presentes em sua estrutura, incluindo macrófagos teciduais, mastócitos, leucócitos sanguíneos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e plasmócitos (HENDRIKS, 2005).

Por fim, a hipoderme também conhecida como tecido subcutâneo é a camada mais interna da pele sendo constituída em sua grande parte por células denominadas de adipócitos. A presença das fibras colágenas provenientes da derme se entrelaçam com as células de gordura da hipoderme, favorecendo a fixação da pele e suas estruturas subjacentes. Essa camada desempenha funções importantes para o corpo, como reserva de nutrientes e energia, isolamento térmico e proteção contra choques físicos (COUTURAUD, 2009; WOLF;

ARNOLDO, 2012). No entanto, quando ocorre uma perda tecidual em alguma dessas camadas temos o surgimento das feridas que podem comprometer a pele de forma parcial ou até mesmo total (ALIASL et al., 2015).

2.2 Feridas

Definidas como uma descontinuidade do revestimento das camadas da pele, as feridas podem atingir desde a epiderme até as estruturas mais profundas, acionando uma série de eventos complexos visando restabelecer a integridade cutânea. Podem ser classificadas de acordo com vários parâmetros, tais como: agente causal, profundidade, grau de contaminação, tempo de reparação e tipos de cicatrização das lesões (GROEBER et al., 2011).

Em relação ao agente causal podem ser cirúrgicas, traumáticas e ulcerativas. As cirúrgicas são realizadas intencionalmente mediante incisão, excisão ou punção na pele. Traumáticas quando provocadas acidentalmente por agentes mecânicos, químicos e físicos e ulcerativas que resultam de quadros de hipóxia e impedimento do suprimento sanguíneo no local da lesão. Quanto à profundidade podem ser superficiais quando atingem a epiderme e parte da derme e profundas quando ultrapassam a hipoderme, comprometendo tendões e músculos (BORGES; CALIRI; HAAS, 2007; ZHAO et al., 2016).

Pelo grau de contaminação são classificadas em limpas, contaminadas e infectadas. As limpas ocorrem em ambiente cirúrgico seguindo adequadamente todos os protocolos de assepsia e antissepsia. Contaminadas quando não respeitam as técnicas assépticas desencadeando um quadro inflamatório moderado. E as infectadas que apresentam um quadro inflamatório severo, levando a destruição do tecido lesado e em alguns casos até o óbito do paciente (FRYKBERG; BANKS, 2015).

Em relação ao tempo de cicatrização são classificadas em agudas e crônicas. As feridas agudas são consideradas recentes e desencadeadas por cirurgias ou traumas, cicatrizando por primeira intenção. Apresentam um reparo tecidual organizado, adequado e sem intercorrências, seguindo todas as fases do processo de cicatrização de forma ordenada e cronológica. (DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012).

Já as feridas crônicas caracterizam-se como de difícil cicatrização levando de quatro semanas até mais de três meses para cicatrizarem, geralmente ocorrem por segunda ou terceira intenção (LAZARUS et al., 1994). A falha em prosseguir com um processo de

reparação ordenado e oportuno leva a incapacidade do tecido em restabelecer sua integridade anatômica e funcional (JÄRBRINK et al., 2016). São representadas por uma fase inflamatória prolongada, com níveis elevados de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias, apresentando episódios de infecções recorrentes que levam a incapacidade das células dérmicas e epidérmicas em responderem aos estímulos de reparação tecidual. Normalmente são classificadas em úlceras vasculares, diabéticas e úlceras por pressão (EDWARDS; HARDING, 2004; EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007).

Em relação ao tipo de cicatrização, podem ocorrer por: primeira, segunda e terceira intenção. As feridas que cicatrizam por primeira intenção são caracterizadas pela aproximação das bordas por suturas ou fitas cirúrgicas, com perda mínima de tecido e geralmente com ausência de cicatrizes. Na cicatrização por segunda intenção ocorre uma perda mais extensa de tecido, não há aproximação das bordas e o tecido de granulação cresce a partir das margens para concluir o processo de reparação. Já na cicatrização por terceira intenção, após a formação do tecido de granulação entre o quarto e sexto dia, as feridas são intencionalmente fechadas provocando o surgimento de cicatrizes extensas e em alguns casos aberrantes (ATTINGER et al., 2006; CHHABRA et al., 2017).

No Brasil, mais de cinco milhões de pessoas são acometidas por feridas crônicas, os estudos sobre a incidência e prevalência dessas feridas na população são escassos e desatualizados devido à falta de registros adequados durante os atendimentos e multiplicidade de abordagens destinadas a esses pacientes, tornando-as uma epidemia silenciosa (ALBUQUERQUE; ALVES, 2010). Uma pesquisa realizada por Mandelbaum *et al.* (2003) apontou que mais de 3% da população brasileira era portadora de algum tipo de lesão, dado que se eleva quando levamos em consideração os pacientes acometidos com diabetes mellitus (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

O aumento da expectativa de vida da população, aliado ao crescimento da prevalência e incidência das doenças crônicas estão entre os principais fatores para o desenvolvimento dessas feridas (BALSA; CUSI, 2015). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2025, 85% da população brasileira com 60 anos ou mais, apresentará pelo menos uma doença (IBGE, 2010). Considerada como um desafio de saúde pública nos sistemas de saúde, no setor previdenciário, as feridas crônicas são responsáveis pelo afastamento de cerca de cinco milhões de brasileiros, sendo a 14ª maior causa de afastamento de trabalho no país, com mais de 200 mil afastamentos de forma temporária ou permanente (INSS, 2015).

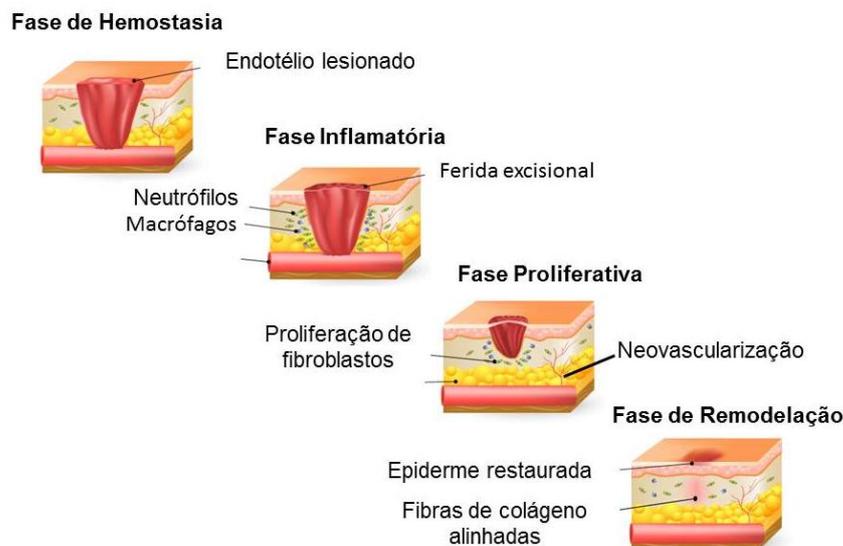
Nos países desenvolvidos como os Estados Unidos, as feridas crônicas acometem mais de 6,5 milhões de pacientes com aproximadamente 300.000 pacientes hospitalizados, ultrapassando mais de US \$ 25 bilhões de gastos para os sistemas de saúde (DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012; HAN; CEILLEY, 2017). Já na Alemanha, a prevalência e a incidência dessas feridas aumentaram ao longo dos anos. Em 2012, 786.407 da população alemã foi acometida por feridas, sendo 196.602 só de feridas crônicas (HEYER et al., 2016). No Reino Unido, esses gastos foram responsáveis por US \$ 3,4 a 4,6 bilhões por ano (POSNETT; FRANKS, 2008).

Dado o impacto dos custos relacionados ao tratamento das feridas crônicas, é grande a busca pelo desenvolvimento de novos recursos e tecnologias que atuem acelerando o processo de cicatrização, possibilitando um tratamento eficaz e de baixo custo para os pacientes (JÄRBRINK et al., 2016). Nesse sentido, um dos principais problemas encontrados durante o desenvolvimento de uma terapia que possa auxiliar o processo de reparação tecidual, diz respeito à dificuldade de definir em qual das fases do processo de cicatrização será empregado o possível fármaco, o que torna necessário o conhecimento das etapas que envolvem esse processo (SUN; SIPRASHVILI; KHAVARI, 2014).

2.3 Cicatrização de feridas

Com a finalidade de restaurar os tecidos lesados, o processo de cicatrização de feridas é considerado complexo e dinâmico, sendo composto por quatro fases sobrepostas e interdependentes descritas em: hemostasia, inflamatória, proliferativa e remodelagem ou maturação (SORG et al., 2017). Cada fase (Figura 2) ocorre de maneira precisa e coordenada envolvendo a produção e participação de fatores de crescimento, componentes da MEC, citocinas, quimiocinas e vários outros tipos de células para restaurar os danos teciduais (GUO; DIPIETRO, 2010).

Figura 2: Fases do processo de cicatrização de feridas.



Fonte: Adaptado por GUO;DIPIETRO, 2010.

2.3.1 Fase de hemostasia

Marcando o primeiro estágio do processo de cicatrização, a hemostasia ocorre em resposta ao dano vascular causado pela ruptura dos vasos sanguíneos e extravasamento dos seus constituintes, com ativação da cascata de coagulação, vasoconstrição na parede dos vasos, ativação plaquetária e formação dos coágulos de fibrina (LEONE et al., 2009).

Imediatamente após a lesão, vasoconstritores como a endotelina é liberada pelo endotélio vascular para reduzir o sangramento após o rompimento da microvasculatura. Outros mediadores derivados das catecolaminas como epinefrina, noradrenalina e prostaglandinas também são liberadas pelas células lesionadas para regularem a vasoconstrição (CALEY; MARTINS; O'TOOLE, 2015).

Consideradas uma das primeiras células a chegarem ao local da lesão, as plaquetas circulam próximas as células endoteliais e ajudam no trabalho da hemostasia através do processo de adesão, agregação e desgranulação (BLAIR; FLAUMENHAFT, 2009). Após sua adesão à parede do endotélio lesado, agregam-se umas às outras permitindo a formação dos coágulos de fibrina e trombina, que atuam como uma barreira protetora para impedir o sangramento contínuo e a entrada de microorganismo (MANNE; XIANG; RONDINA, 2017; MORRELL et al., 2014).

Com a formação desses coágulos ocorre a desgranulação plaquetária que envolve a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, como fator de crescimento transformador (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF), além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, importantes para a constituição da MEC provisória e manutenção das outras fases da cicatrização (BERGMEIER et al., 2018).

Uma vez controlado o sangramento, as células inflamatórias migram para a superfície da lesão por quimiotaxia e promovem a fase inflamatória, caracterizada pela infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos que serão peças chaves para o avanço das etapas seguintes (BERGMEIER et al., 2018; BLANPAIN; FUCHS, 2014).

2.3.2 Fase inflamatória

Apresentando um papel fundamental no processo de reparação tecidual, a resposta inflamatória no local da lesão é caracterizada pelo surgimento dos sinais típicos da inflamação como rubor, edema, dor e calor, a fim de reestabelecer a homeostase do organismo. Com uma duração em torno de três a quatro dias, é representada pelo início da vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento das células inflamatórias para o leito da ferida. Essa vasodilatação permite o influxo da migração leucocitária, células primordiais para a resolução dessa etapa que subdivide-se em neutrófilos, macrófagos, mastócitos, eosinófilos e monócitos (BLANPAIN; FUCHS, 2014; MORRELL et al., 2014).

Nas primeiras 24 – 48 horas após a lesão, os neutrófilos ou células polimorfonucleares, considerados a primeira linha de defesa do corpo, são recrutados pela sua atividade microbicida e medeiam a liberação de proteases, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (EROS) que ajudam a matar e degradar os possíveis patógenos por meio da fagocitose (MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2014).

Realizada a remoção dos patógenos no local da ferida, a atividade dos neutrófilos diminui gradativamente sendo posteriormente eliminados pelo processo de apoptose, onde seus corpos apoptóticos são fagocitados pelos macrófagos. Os macrófagos, células do sistema imunológico que participam da imunidade inata e condicionam a adaptativa, apresentam ação importante no processo inflamatório devido a sua capacidade de fagocitose, ativação das

metaloproteinases da matriz (MMPs), produção de fatores de crescimento, tais como o PDGF, TGF- β , FGF e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além da produção de mediadores pró - inflamatórios, a exemplo da interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e anti – inflamatório como a interleucina 10 (IL-10) (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014; WILGUS; ROY; MCDANIEL, 2013).

Os macrófagos são ativados por duas vias distintas, como a via clássica e a via alternativa, podendo apresentar diferentes designações e finalidades. Quando ativados pela via clássica são denominados de M1 e considerados indutores da inflamação, por estarem envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 12 (IL-12) e TNF- α , bem como as EROS que facilitam a atividade microbicida (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008; MANTOVANI et al., 2013). Por outro lado, a ativação da via alternativa dá origem ao macrófago do tipo M2, responsável pela produção das citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e interleucina 4 (IL-4) e fatores de crescimento como o TGF- β , células importantes para a resolução da inflamação e reparação tecidual (ARKHIPOV et al., 2013).

Vale ressaltar, que a presença desses macrófagos M1 e M2 devem estar em equilíbrio para que o funcionamento do sistema imunológico aconteça de maneira correta. Isto porque, durante uma injúria tecidual, a resposta pró-inflamatória é seguida pela resposta anti-inflamatória de modo a proporcionar um reparo adequado, e o desbalanço entre essas respostas podem estar associados à cronicidade das feridas (ANOWER et al., 2014; MULDER; BANETE; BASTA, 2014).

Dentre as principais citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos macrófagos, a IL-1 β está relacionada na regulação do processo inflamatório. Sua produção ocorre através dos estímulos bacterianos e inflamatórios no local da lesão, tendo como objetivo principal participar na resposta imune do hospedeiro contra os microorganismos (BROEKMAN et al., 2016). Já a IL-6 e o TNF- α , também conhecidos como mediadores pró-inflamatórios, são liberados rapidamente após o trauma sendo importantes na expressão de moléculas de adesão, fato que contribui para o recrutamento de fagócitos na área da lesão (SERRA et al., 2017). Quando produzidos em excesso, inibem a resolução da inflamação, induzindo danos indesejados ao tecido (BROEKMAN et al., 2016)

Por sua vez, as interleucinas anti-inflamatórias liberadas pelos macrófagos como IL-10 e IL-4, tem sua atividade anti-inflamatória mediada pela inibição da produção de citocinas

inflamatórias e na quimiotaxia de leucócitos, que inibe a resposta imune excessiva evitando a cronificação do processo (MOTTA et al., 2014).

Mediante o exposto, a produção de todos os mediadores inflamatórios nessa fase é finamente regulada, e um dos pontos de regulação é a ativação/inibição do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB). Na presença desses mediadores ele é ativado e transloca-se para o núcleo na sua forma fosforilada, o que permite sua ligação em regiões específicas do DNA levando a síntese das citocinas pró-inflamatórias. A indução desta cascata de sinalização é necessária para que ocorra a resposta imune, entretanto, ela deve ser eficientemente desligada a fim de evitar danos teciduais, tais como apoptose, necrose e fibrose (ISHISE et al., 2015; MESSADI et al., 2004).

Uma das primeiras respostas da imunidade inata é a produção de EROS ao detectar a presença de invasores microbianos (SAREILA et al., 2011). Os radicais livres de oxigênio são altamente tóxicos para os patógenos e são utilizados como uma ferramenta para impedir a colonização de tecidos por microorganismos (CIRCU; AW, 2010). As EROS incluem ânion radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (HO), alcoxila (AL), radical alquila (L) e peroxila (LOO) (AMINZADEH et al., 2013). Uma vez instalado o dano tecidual, o quadro inflamatório pode ocasionar o estresse oxidativo através do desequilíbrio da oxidação celular com a atividade antioxidante das células, que resultam no surgimento das EROS provocando a quebra do DNA, peroxidação lipídica e inativação enzimática (ZHANG et al., 2019).

A concentração intracelular das EROS depende da produção/remoção pelo sistema antioxidante. As células contêm um grande número de antioxidantes para prevenir ou reparar os danos causados pelas EROS, bem como para regular as vias de sinalização sensíveis ao sistema redox (BEN DJEMAA et al., 2016). Dentre as enzimas antioxidantes, temos o superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) que atuam como mecanismos de defesa mantendo quantidades aceitáveis das EROS para o bom funcionamento do organismo (SOUZA et al., 2015). A SOD é responsável por converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (O_2), enquanto que a catalase converte o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (ZHAO et al., 2017).

No processo de reparo tecidual os tecidos lesionados afetam o processo de cicatrização aumentando a formação das EROS e reduzindo vários sequestradores de radicais livres enzimáticos e não enzimáticos. No entanto, quando o excesso de EROS transcende o efeito benéfico, o tecido sofre estresse oxidativo ocasionando um atraso no processo de contração da

ferida, migração de queratinócitos e reepitelização, o que acaba interferindo no avanço da reparação tecidual (SPOONER; YILMAZ, 2011).

Também ativado pelo quadro oxidativo exacerbado, o NFkB pode produzir em excesso várias citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-12 ocasionando uma lenta regeneração dos tecidos (AMINZADEH et al., 2013). Por fim, à medida que a resolução da inflamação ocorre, as células envolvidas entram em apoptose iniciando a fase proliferativa (WILGUS; ROY; MCDANIEL, 2013).

2.3.3 Fase proliferativa

Caracterizada por uma intensa atividade celular, a fase proliferativa começa em torno do 4º dia e prolonga-se até o 14º dia. Consiste em quatro estágios fundamentais: reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de fibras colágenas, todos com o objetivo de reparar o tecido conjuntivo e formar tecido de granulação e epitélio (PASTAR et al., 2014).

Presentes na fase de proliferação, os fibroblastos migram para a matriz provisória, proliferando e produzindo as MMPs que serão responsáveis pela degradação dessa matriz de modo a auxiliar na restauração da ferida. Eles também produzem colágeno, proteoglicanos, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos e fibronectina para formar o tecido de granulação, que preenche o espaço da ferida e fornece suporte para adesão, migração, crescimento e diferenciação celular durante o reparo da ferida (FENG et al., 2016).

Como consequência do aumento do estresse mecânico e da expressão de citocinas, como TGF- β , os fibroblastos são estimulados a se diferenciarem em miofibroblastos, que expressam uma actina do músculo liso com função contrátil, favorecendo a locomoção dessas células das bordas ao centro da lesão permitindo a contração da ferida (GANESHKUMAR et al., 2012).

Durante a reepitelização, a migração dos queratinócitos para o leito da ferida e os anexos epiteliais estimulados pela liberação dos fatores de crescimento são os principais responsáveis pelo aumento das mitoses e pela hiperplasia epitelial (LEVINSON, 2013). Em tecidos normais, as células da camada basal encontram-se em inibição por contato, um mecanismo inibitório do organismo que protege essas células do processo mitótico inadequado (TAKEO; LEE; ITO, 2015). Instalada a lesão, essa inibição desaparece e as células epiteliais migram através da MEC provisória do tecido de granulação e começam a se

proliferar para preencher o local da ferida e estratificar o novo epitélio (ARWERT; HOSTE; WATT, 2012).

À medida que a superfície da ferida vai sendo coberta por essas células, o mecanismo de inibição por contato é ativado e o processo mitótico é bloqueado, permitindo que as células epiteliais voltem ao tamanho normal e a nova MEC seja reconstituída por um novo epitélio que restaura a sua função no organismo (ZHAO et al., 2017).

Simultaneamente a formação do tecido de granulação, temos a produção das fibras de colágeno que passam pelas etapas de produção, deposição, digestão e reorganização. Fibras de colágeno tipo 3 são as primeiras a serem depositadas no leito da lesão, geralmente de forma desorganizada, com um aspecto fino e sem resistência. Posteriormente, na tentativa de organizá-los, eles sofrem degradação através de enzimas de ação produzidas por neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, como as MMPs, que absorvem esse colágeno degradado e substitui por outro mais espesso e organizado (MANTOVANI et al., 2013; PENN; GROBBELAAR; ROLFE, 2012).

Essencial para a nutrição e oxigenação do novo tecido que está sendo formado a angiogênese é considerada uma etapa importante nessa fase, sendo reconhecida pela formação de novos vasos a partir de preexistentes. É iniciada por fatores de crescimento, como VEGF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) (CHEN et al., 2019). Após secretarem enzimas proteolíticas para dissolver a lâmina basal, as células endoteliais escapam dos vasos sanguíneos existentes, proliferam e migram para a fonte de estímulo angiogênico que fornecem oxigênio para manutenção das funções celulares (GUO; DIPIETRO, 2010; JOHNSON; WILGUS, 2014)

Ao final desta etapa, a circulação já foi restabelecida pela neovascularização e o leito da ferida encontra-se totalmente preenchido por tecido de granulação, que aos poucos é enriquecido com mais fibras colágenas, começando a dar à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa (MANTOVANI et al., 2013).

2.3.4 Fase de remodelação

Última etapa do processo de cicatrização de feridas, a fase de remodelação tem início em torno do 21º dia com duração de meses ou anos. Nessa fase, novas fibras de colágeno são produzidas e depositadas de maneira mais organizada de acordo o tecido conjuntivo adjacente (PENN; GROBBELAAR; ROLFE, 2012).

De forma notável, nessa fase, o colágeno tipo 3 que foi produzido rapidamente na MEC durante o reparo tecidual é substituído pelo colágeno tipo 1, que possui maior resistência à tração. Posteriormente, as colagenases, como as MMPs, começam a dissolver as fibras de colágeno não funcionais, enquanto que a deposição das fibras funcionais continuam e, por ativação dos inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz (TIMPs), finaliza-se o processo de deposição e degradação de colágeno (DE ALENCAR FONSECA SANTOS et al., 2018). Esse novo colágeno formado será composto por fibras maiores, com maior número de fibrilas e com uma quantidade significativa de ligações cruzadas entre elas, como as pontes de hidrogênio, caracterizando um aumento no diâmetro da fibra e na resistência à tração adquirida pela cicatriz (LANDÉN; LI; STÅHLE, 2016).

Vale ressaltar que nessa fase de remodelação temos a presença dos anexos da pele como folículos pilosos e glândulas sebáceas, tecido de granulação totalmente preenchido por fibras colágenas, retração dos vasos sanguíneos e apoptose de todas as células que participaram do processo cicatricial (KALLIS; FRIEDMAN, 2018).

Por fim, é notável a importância do conhecimento das etapas que envolvem o processo de cicatrização, isso por que, dependendo da etapa, determinadas células e mediadores possuem relevância mais destacada, sendo importante no desenvolvimento de novas opções terapêuticas como também na escolha do tratamento adequado (ARAVINTHAN et al., 2018).

2.4 Tratamento de Feridas

Nos últimos anos, vários estudos para compreender os fenômenos envolvidos nas diversas fases do processo de cicatrização de feridas vêm sendo discutidos para o desenvolvimento de novos recursos e tecnologias com o potencial de tratar diferentes tipos de feridas agudas e crônicas da pele, com efeitos adversos mínimos e facilidade de aplicação (LI et al., 2019; SORG et al., 2017; YAN et al., 2017).

Várias opções de tratamento e substitutos cutâneos podem ser utilizados na regeneração cutânea de feridas. Dentre os tratamentos, destacam-se os métodos invasivos, como desbridamento de feridas, e técnicas não invasivas, como curativos, coberturas, terapia hiperbárica com oxigênio, terapia de pressão negativa, de ultra-sons, e estimulação elétrica (ATKIN, 2019; SANTOS, 2000). Já os substitutos cutâneos são originados da pele humana ou de forma sintética, e agem estimulando a proliferação e diferenciação celular e a neoformação

da vascularização, contribuindo eficientemente em várias fases do processo de cicatrização (MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014; SORG et al., 2017).

Pesquisas na área da engenharia de tecidos e biotecnologia têm sido realizadas com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica dos curativos em relação aos tradicionais (SAMPAIO, 2018). Os curativos modernos são geralmente classificados como produtos passivos, interativos e bioativos. Os passivos são não - oclusivos, como algodão e compressas de gazes, apresentam baixo custo e alta absorção, os interativos que são semi-oclusivos e os oclusivos, mantém o ambiente úmido facilitando a cicatrização e os bioativos que são preparados a partir de polímeros contendo substâncias que apresentam atividades biológicas no intuito de acelerar a reparação tecidual e a prevenção da colonização bacteriana (ABDEL-SAYED et al., 2019; SAMPAIO, 2018).

Reconhecido pela função de limpar, desbridar e cobrir lesões, a escolha do tipo de curativo a ser utilizado dependerá de fatores como aspectos, localização, tamanho e profundidade da ferida, conforto e custo/efetividade para o paciente (HAN; CEILLEY, 2017). A existência da diversidade de tipos de feridas, com suas fases e modos variados de cicatrização, levou ao desenvolvimento de materiais para o manejo desses curativos, denominados de coberturas (BORGES, 2012).

Existe uma grande variedade de coberturas que estão disponíveis no mercado para o tratamento de feridas (Tabela 1), com diferentes aplicações, vantagens e desvantagens. Essas coberturas devem apresentar propriedades físicas e químicas compatíveis com a natureza da ferida, além de proteger contra agentes flogísticos e proporcionar um ambiente úmido ao redor da ferida para favorecer o processo de cicatrização (ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011).

Com base no tipo e local da ferida, a escolha da cobertura deve basear-se na sua capacidade de melhorar a migração epidérmica, promover a angiogênese, permitir a troca gasosa entre o tecido ferido e o ambiente, ser facilmente aplicado e removido sem causar traumas, além de ser estéril, atóxico e não alérgico. O tratamento bem-sucedido das feridas requer a compreensão do processo de cicatrização, combinada ao conhecimento das propriedades das coberturas disponíveis (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; WELLER; SUSSMAN, 2006).

Dentre os diversas coberturas disponíveis no mercado, muitas apresentam baixa efetividade farmacológica, custos elevados para os pacientes e algumas limitações como produtos opacos e não- biodegradáveis, tornando-se necessário o desenvolvimento de novas

alternativas que sejam mais baratas e acessíveis à população, como também aperfeiçoar os produtos utilizados como recursos terapêuticos (ABDELRAHMAN; NEWTON, 2011; BREM et al., 2009; HAN; CEILLEY, 2017).

Tabela 1: Tipos de coberturas disponíveis para o tratamento de feridas.

| TIPOS DE COBERTURAS | PRODUTOS DISPONÍVEIS NO MERCADO | INDICAÇÃO | CONTRAINDICAÇÃO / DESVANTAGENS |
|------------------------------|--|--|---------------------------------------|
| Filmes Semipermeáveis | Bioclusive® Blisterfilm® Cutifilm® Flexigrid® OpSite® Tegaderm® | Feridas secas e superficiais | Feridas exsudativas |
| Hidrocolóides | Aquacel® Comfeel® DuoDERM® Granuflex® Tegasorb® | Feridas com baixo a moderado teor de exsudato. | Feridas infectadas |
| Hidrogéis | Carrasyn® Curagel® Nu-Gel® Purilon® Restore® SAF-gel® XCell® | Feridas secas, espessas e necróticas | Pode causar excesso de hidratação |
| Espumas | 3M Adhesive Foam® Allevyn® Lyof foam® Tielle® | Feridas com moderado a alto teor de exsudato, indicada como cobertura primário ou secundário | Feridas secas |
| Alginato | Algisite® Kaltostat® Sorbsan® Tegagen® | Feridas com moderado a alto teor de exsudatos e feridas com muito sangue. | Feridas secas |
| Substitutos da pele | Alloderm® Apligraf® Biobrane® Dermagraft® | Estimula a ativação fatores de crescimento | Alto custo e risco de infecções |

Fonte: Adaptado de HAN; CEILLEY, 2017 e ABDELRAHMAN E NEWTON, 2011.

Nesse contexto, várias alternativas têm sido propostas, como o uso de materiais com atividade biológica, que podem ser agregadas em coberturas para melhorar e acelerar o processo de cicatrização (MOURA et al., 2013). Dentre esses materiais destacam-se os biopolímeros, que apresentam alta biocompatibilidade e biodegradabilidade junto à ferida para promover a reparação tecidual, além da sua capacidade de ser facilmente incorporado com produtos naturais para melhorar seu desempenho do tratamento de feridas (WIEGAND; HIPLER, 2010).

2.5 Biopolímeros e Colágeno

Atualmente, estudos têm sido realizados no intuito de identificar substâncias capazes de favorecer o processo de reparo (MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014; MOURA et al., 2013; WIEGAND; HIPLER, 2010). Na cicatrização de feridas, esses produtos devem ser eficazes, seguros, a fim de proporcionar um ambiente favorável para o tratamento dessas lesões (PENHAVEL et al., 2016).

Nesse contexto, biopolímeros naturais vêm sendo cada vez mais estudados e estão entre uma das alternativas mais promissoras para o tratamento de lesões cutâneas, devido as suas características de biocompatibilidade, baixa toxicidade, hipoalergenicidade, fácil obtenção e baixo custo na maioria dos casos (AL-HADA et al., 2016).

Um dos polímeros de base natural que vêm sendo amplamente utilizado é o colágeno, considerado uma das principais proteínas estruturais da MEC, é encontrado em tecidos conjuntivos como tendão, ligamento, cartilagem, ossos e pele (BAKER; NUMATA, 2013). Além de desempenhar importante papel na estrutura dos tecidos, o colágeno é capaz de guiar a formação de tecidos em desenvolvimento, como por exemplo, a reconstituição da nova MEC no processo de cicatrização de feridas, tornando-o altamente favorável no âmbito do reparo tecidual (HOLZAPFEL et al., 2013).

Biomateriais à base de colágeno originam-se a partir de várias técnicas, dentre elas através da extração colágena por meio de tecidos biológicos, utilizando a solubilização por ácidos, por enzimas ou por sais neutros (VULCANI, 2004). Entre as principais fontes de colágeno exógeno está à pele animal, principalmente a de bovinos e suínos na região dos tendões calcâneos (PEI et al., 2013). Friess *et al.* (1998) observaram que a extração ácida é mais eficaz que a por adição de sal, porém, a união dos dois métodos proporcionam um maior

rendimento final, e isto é possível devido a capacidade do sal neutro de solubilizar e remover outras proteínas e polissacarídeos (FRIESS, 1998).

Processado em inúmeras formas como esponjas, géis, membranas bioativas, e dispersões, além da função de carrear substâncias a fim de regenerar tecidos, o colágeno tem sido usado para diversas aplicações no campo biomédico de acordo com suas propriedades e características (MANO et al., 2007; WISE et al., 2016).

Vários estudos envolvendo a aplicação de diferentes formulações de colágeno já foram realizados, tais como: esponjas de colágeno na cicatrização de feridas profundas da pele em modelos experimentais; complexo de colágeno-glicosaminoglicano como curativo para feridas gengivais; membranas reabsorvíveis de colágeno para curativo de feridas orais; hidrogéis à base de colágeno-minociclina para o tratamento de feridas com infecções cutâneas e biopolímero contendo colágeno-ácido algínico reticulável com propriedades termoestáveis e biodegradáveis como curativo (DATTA; MITRA; PATWARDHAN, 2011; GHICA et al., 2011; PATINO et al., 2002; ROUSSILLE; BARTHET, 1991; SEDLARIK et al., 1992).

O potencial do colágeno para aplicações hemostáticas na área clínica foi descrito por Yan *et al.* (2017), que desenvolveram um estudo *in vivo* em modelo animal de trauma hepático e em modelo da artéria da orelha de coelhos usando esponjas de colágeno revestidas com nanofibras de quitosana. O tempo hemostático e a perda sanguínea foram registrados medindo o peso das amostras (sangue) antes e depois do tratamento. Os resultados comprovaram que o tratamento com as esponjas de colágeno foi capaz de ativar a via intrínseca da cascata de coagulação, induzindo a aderência das plaquetas através de uma coagulação sanguínea adequada a fim de obter um controle rápido da hemorragia, sugerindo que as esponjas apresentam um potencial promissor para aplicações hemostáticas (YAN et al., 2017).

Como membranas bioativas, o colágeno tem sido utilizado para aplicações como coberturas, por serem rapidamente reabsorvidas pelo organismo e apresentarem uma morfologia similar à da pele com propriedades adequadas para um bom desenvolvimento do processo de cicatrização das feridas, estimulando a angiogênese e permitindo adesão, migração e proliferação celular no local da lesão (GIRARDI, 2005). São normalmente transparentes, duráveis, fáceis de manipular, semi-permeável ao oxigênio e ao vapor de água, e muitas vezes impermeável à contaminação líquida e bacteriana, além de serem usadas diretamente na ferida ou em associação a outros tipos de coberturas para melhorar suas propriedades no processo cicatricial (FONDER et al., 2008; WELLER; SUSSMAN, 2006).

A escolha de membranas de colágeno para o tratamento de lesões deve-se ao fato da sua resistência à pressão exercida pelos tecidos durante a cicatrização, além das suas características biológicas de biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades hemostáticas e sua baixa antigenicidade (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012). Uma membrana ideal deve apresentar elasticidade, ser flexível e suave para que não sofra rupturas provocadas pelos movimentos bruscos no local da lesão, além de uma adequada força bioativa (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005).

Mrué *et al.* (2004) utilizando um modelo de úlceras dérmicas agudas em orelhas de coelhos avaliaram a biocompatibilidade de biopolímeros como as membranas bioativas. Nesse estudo, os resultados demonstraram que o grupo tratado com as membranas apresentou epitelização precoce, já no sétimo dia, em relação ao grupo controle e, nas amostras histopatológicas, evidenciou-se a presença de fibras colágenas organizadas e formação de novos vasos sanguíneos (MRUE *et al.*, 2004).

Neto e Melquiades (2011) por meio de estudos utilizando modelo animal de lesão cutânea aberta provaram a eficácia das membranas bioativas à base de colágeno contendo genipina no tratamento dessas lesões. O tratamento com essas membranas foi capaz de induzir um maior índice de contração da ferida, acelerar o processo inflamatório e depositar de forma organizada as fibras de colágeno na nova MEC, sugerindo seu efeito promissor no tratamento de feridas abertas (NETO; MELQUIADES, 2011).

Por fim, diante de todas as propriedades mencionadas, pesquisas científicas envolvendo nanotecnologia e biopolímeros crescem a cada dia, principalmente as relacionadas à prevenção e tratamento de doenças crônicas (DAS; BAKER, 2016; NUNES *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2017).

2.6 Lipossomas

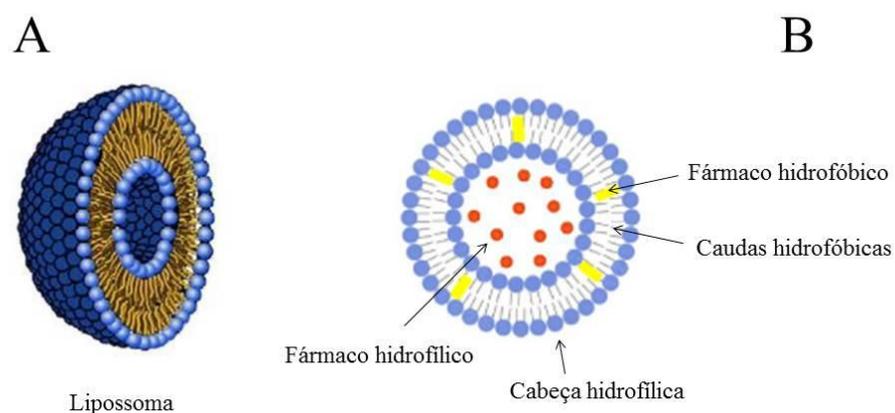
Nos últimos anos, estruturas utilizando nanotecnologia, como microemulsões, etossomos, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas, têm atraído cada vez mais atenção, pois podem proporcionar uma melhor chance de adesão às membranas biológicas, ao mesmo tempo em que administram medicamentos de maneira controlada (DAVATGARANTAGHIPOUR *et al.*, 2017). Essas estruturas em nanoescala são capazes de proporcionar uma

forma de dosagem de fármacos mais adequada, liberação direta nos tecidos alvos, bem como, melhorar sua penetração nas células (MONTENEGRO et al., 2008; MURA et al., 2014).

Os lipossomas são vesículas microscópicas (Figura 3) com um núcleo aquoso cercado por uma ou mais bicamadas externas compostas de fosfolipídios, apresentando uma cabeça hidrofílica e duas caudas hidrofóbicas. São compostos principalmente de fosfolipídios, especialmente fosfatidilcolina, mas também podem incluir outros lipídios, como a fosfatidiletanolamina, sendo classificados de acordo com sua estrutura, tamanho, método de preparação e composição, onde cada parâmetro desses dependerá do tipo de molécula a ser encapsulada (ELSANA et al., 2019; TORCHILIN, 2006).

Um estudo realizado por Nunes *et al.* (2011) com membranas de colágeno e gelatina contendo ácido úsnico incorporado em lipossomas, demonstrou uma melhora eficaz do processo de cicatrização em queimaduras utilizando modelo animal. Os autores sugerem que esta melhora esteve relacionada à modulação de alguns eventos biológicos envolvidos neste processo, tais como a resposta inflamatória, a epitelização e a formação de colágeno (NUNES et al., 2011).

Figura 3: Representação dos Lipossomas. A: Estrutura básica dos lipossomas. B: Representação esquemática da incorporação de fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos nos lipossomas.



Fonte: Disponível em: <http://www.wikilectures.eu/index.php/Liposomes_as_drug_carriers> Acesso: 27 de outubro de 2019.

Os lipossomas têm sido amplamente utilizados como nanocarreadores seguros e eficazes para transportar fármacos pouco solúveis em água, de forma a aumentar a biodisponibilidade e propiciar sua administração. São altamente versáteis para o desenvolvimento de novas pesquisas visando o uso terapêutico, pois apresentam atividades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa imunogenicidade, podendo encapsular uma variedade de substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, a fim de melhorar a biodisponibilidade da droga e reduzir seus efeitos colaterais (TSAI et al., 2015).

Essas novas alternativas farmacológicas envolvendo nanotecnologia têm sido desenvolvidas visando principalmente, aumentar a estabilidade, a solubilidade e reduzir efeitos colaterais, tornando a utilização terapêutica das substâncias mais segura e eficiente (LIRA et al., 2009).

Nos últimos anos, no âmbito das feridas, pesquisas experimentais envolvendo o desenvolvimento de produtos com nanotecnologia a partir de produtos naturais foram capazes de acelerar o processo cicatricial, aumentando a síntese de fibroblastos e permitindo uma otimização da reparação da pele (BARRETO et al., 2016; NUNES et al., 2011, 2016). Com isso, a incorporação de substâncias hidrofóbicas em sistemas lipossomais poderá melhorar suas propriedades físico-químicas e eficácia farmacológica, contribuindo para os avanços relacionados à biodisponibilidade e o desenvolvimento de estudos para futuro uso clínico.

2.7 Plantas Medicinais

Historicamente, a utilização de plantas medicinais na prevenção e tratamento de várias condições clínicas indesejáveis é umas das formas mais antigas da prática medicinal da humanidade (ARAÚJO-FILHO et al., 2016). As plantas medicinais destacam-se na pesquisa farmacológica e no desenvolvimento de medicamentos não só quando os constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como materiais de partida para a síntese de medicamentos, a exemplo dos fitoterápicos, ou como modelos para compostos farmacologicamente ativos (DUTRA et al., 2016). Nas últimas décadas, devido ao reconhecimento do seu valor na prática clínica, o interesse público em terapias naturais aumentou muito com o uso crescente de plantas medicinais e fitoterápicos, tornando os estudos químicos e farmacológicos essenciais para que o seu uso se torne seguro e melhore a sua eficácia (GUIMARÃES; QUINTANS; QUINTANS, 2013; QUINTANS et al., 2014).

Considerado um dos maiores centros de biodiversidade vegetal do planeta, o Brasil apresenta inúmeros ambientes e floras específicas que foram introduzidas na cultura popular e utilizados para os mais diversos fins, entre eles o uso no tratamento de diferentes doenças agudas e crônicas (COSTA; MAYWORM, 2011; DUTRA et al., 2016). Buscando estimular o acesso da população as práticas complementares e as plantas medicinais, em 2006 o Ministério da Saúde implementou no Sistema Único de Saúde (SUS) a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), ambas com o objetivo de permitir o uso dessas plantas de forma eficaz e segura no cuidado à saúde (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b).

Essas plantas são reconhecidas por sua capacidade em produzir uma grande variedade de metabólitos secundários que apresentam atividades biológicas e farmacológicas destinadas ao tratamento de doenças (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Além do seu potencial na medicina popular através das suas finalidades terapêuticas, as plantas medicinais vêm contribuindo ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos utilizados na prática clínica (MENDES; RODRIGUES-DAS-DORES; CAMPIDELI, 2015).

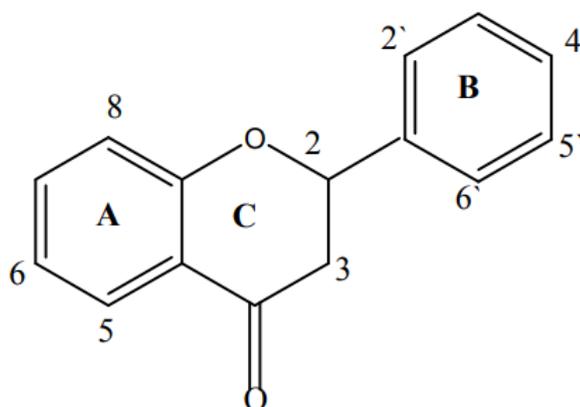
A busca de medicamentos que possam acelerar o processo cicatrização no tratamento de feridas crônicas vem aumentando a cada dia. (MORESKI; BUENO; LEITE-MELLO, 2018). Desafios como efeitos colaterais indesejados, desenvolvimento de resistência por microorganismos, bem como o alto custo dos medicamentos, voltaram à atenção dos pesquisadores para as fontes naturais de remédios contra as lesões cutâneas (OTANG; AFOLAYAN, 2016).

Até o momento, vários estudos sobre as atividades biológicas e fitoquímicas de muitas plantas medicinais já foram descritos na literatura. Um estudo realizado por Amorim *et al.* (2006), analisaram o uso tópico do extrato aquoso do babaçu em feridas cutâneas de ratos, os resultados demonstraram um aumento significativo nas taxas de epitelização, além da diminuição da quantidade de células mononucleares no 14º dia, sugerindo que esse extrato apresenta atividade anti-inflamatória essencial para o progresso da reparação tecidual (AMORIM et al., 2006). Oliveira *et al.* (2010) estudaram as cascas do jucá na cicatrização de feridas cutâneas abertas em caprinos, os resultados evidenciaram uma intensa atividade anti-inflamatória e antimicrobiana no local da lesão obtendo um efeito significativo na cicatrização da pele desses animais (OLIVEIRA et al., 2010).

Representando um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural, estão os flavonoides (Figura 4) (CHEN et al., 2014; DI CARLO

et al., 1999). Esses compostos são reconhecidos como fitoquímicos fenólicos com uma ampla gama de estruturas que consistem em dois anéis de benzeno designados como A e B, que são ligados por três carbonos e um átomo de oxigênio para formar o anel central de pirona, designado como C (C6-C3-C6) (MENEZES et al., 2017; SAK, 2017).

Figura 4: Estrutura geral dos flavonoides.



Fonte: Adaptada por DI CARLO et al., 1999.

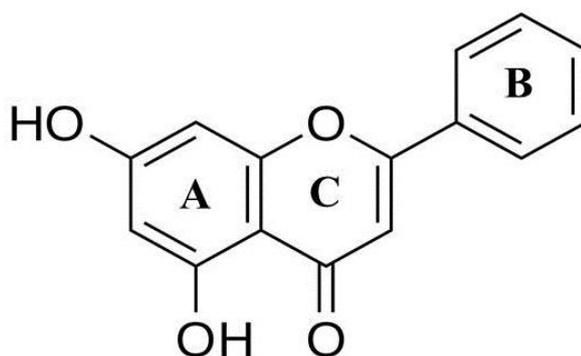
São encontrados naturalmente nas frutas, vegetais, flores, chocolate, chá, vinho e em outras fontes vegetais, estando presentes na dieta humana com um consumo entre 1-2g por dia (DE VRIES et al., 1997). De acordo com a diversidade da sua estrutura, os flavonoides são subdivididos em: flavonas, flavanonas, flavonois, isoflavonas, chalconas, auronas, antocianidinas e antocianinas (BRAVO, 1998).

Essa classe de compostos tem atraído muita atenção em virtude da sua ampla variedade de funções biológicas, incluindo modulação neuroprotetora, antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e antialérgica, apresentando uma fonte importante para novos produtos com potencial farmacêutico, com elevada atenção para o seu papel na prevenção de doenças crônicas (AMAWI; ASHBY; TIWARI, 2017).

2.8 Crisina

Dentre os flavonoides promissores para indústria farmacêutica destaca-se a crisina (5,7-di-hidroxiavona) que pertence à classe das flavonas e é encontrada naturalmente no mel, própolis, e em várias espécies de plantas, incluindo espécies do gênero *Pelargonium*, *Passiflora* e da família *Pinaceae*, sendo a *Passiflora coerulea* (regionalmente conhecida como maracujá do mato) sua principal fonte natural (PICHICHERO et al., 2011). Tal flavonoide caracteriza-se quimicamente por dois anéis fundidos, A e C, e um anel fenil B, anexado à segunda posição do anel C (Figura 5) (ANAND et al., 2012). A crisina foi isolada pela primeira vez em 1990, tornando-se um dos flavonoides mais estudados da atualidade por apresentar um grande potencial terapêutico (CHADHA et al., 2017; MEDINA et al., 1990). Ações antioxidantes (PUSHPAVALLI et al., 2010), anti-inflamatórias (BAE; LEE; KIM, 2011), antimicrobianas (ZHU et al., 2016), antibacterianas (SURESH BABU et al., 2006), antialérgicas (CHOI et al., 2017), anticâncer (PICHICHERO et al., 2011) e neuroprotetoras (GOES et al., 2018) já foram descritas.

Figura 5: Estrutura química da crisina.



Fonte: Adaptada por CHEN et al., 2014.

Considerado um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e os mecanismos de defesa antioxidante de uma célula ou tecido, o estresse oxidativo é responsável pela peroxidação lipídica, danos ao DNA e inativação de muitas enzimas (SPEAKER et al., 1997). Pushpavalli *et al.* (2010), por meio de estudos da hepatite induzida por D-galactosamina em

ratos machos, provaram a eficácia da crisina em sua ação antioxidante. O tratamento com a crisina resultou em aumento das atividades de enzimas antioxidantes como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Px), sugerindo que este composto pode ser útil na neutralização de danos nos tecidos mediados por radicais livres (PUSHPAVALLI et al., 2010).

Estudos sobre a atividade antioxidante de flavonoides sugerem a relação da presença de hidroxilas na bioatividade destes compostos, onde a capacidade antioxidante dos flavonoides geralmente podem estar relacionada com a hidroxilação do anel B. No entanto, as hidroxilas presentes nos carbonos 5 e 7 do anel A da crisina desempenham uma função significativa na atividade antioxidante deste composto (CHEN et al., 2014). Atualmente, o uso da crisina como suplemento dietético vem sendo utilizado com a intenção de controlar os níveis de testosterona, além de ajudar na prevenção do câncer, redução do estresse oxidativo e controle dos quadros de inflamação, não sendo atribuído até o presente momento nenhum efeito colateral da crisina na literatura médica (KASALA; BODDULURU; BARUA, 2016).

No que diz respeito à atividade anti-inflamatória da crisina, vários estudos foram realizados para investigar esse efeito. Um estudo *in vitro* realizado por Ha *et al.* (2010), comprovaram que o tratamento com crisina em células microgliciais estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS) inibiu a produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α ativando macrófagos através da via NF κ B, atenuando consideravelmente a fase inflamatória e regulando o *status* dos macrófagos através da supressão da inflamação (HA; MOON; KIM, 2010). A atividade da crisina frente à supressão da inflamação alérgica foi investigada por Bae *et al.* (2012), onde os resultados demonstraram que a crisina atenuou a inflamação alérgica ao inibir a expressão do NF κ B e das citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que este flavonoide apresenta uma potente ação anti-inflamatória, tornando-se uma promissora abordagem terapêutica (BAE; LEE; KIM, 2011).

O potencial da crisina como antimicrobiano foi descrito na literatura por Zhu *et al.* (2016), que desenvolveram um estudo *in vitro* usando uma concentração inibitória mínima (CIM) com diferentes tipos de cepas e comprovaram sua ação contra diversos microorganismos, tais como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* (ZHU et al., 2016).

A atividade da crisina frente à *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella aerogenes* e *Chromobacterium violaceum* foi investigada por Suresh *et al.* (2006). Os resultados apresentados nesse estudo (*in vitro*) demonstraram que o tratamento

com crisina exibiu uma atividade antibacteriana eficaz contra essas bactérias gram-positivas e gram-negativas (SURESH BABU et al., 2006).

Choi *et al.* (2017) por meio de estudos utilizando modelo animal de dermatite atópica (DA), provaram a eficácia da crisina em sua ação antialérgica. Para tanto, utilizaram o dorso de camundongos para exposição repetida de 2,4-dinitroclorobenzeno que provocou lesões na pele do tipo DA. O tratamento com crisina foi capaz de diminuir a infiltração de mastócitos e do nível sérico de histamina, além de atenuar a expressão de IL-33 estimulada por TNF- α / IFN- γ nos queratinócitos primários desses camundongos. A IL-33 é considerada uma das citocinas mais cruciais do desenvolvimento das doenças de pele, estando relacionada ao aparecimento de alguns sinais e sintomas como coceira e prurido. Logo, os resultados indicam que a crisina suprimiu os sintomas de DA, sugerindo seu efeito promissor no tratamento de DA e doenças alérgicas da pele (CHOI et al., 2017).

A atividade anticâncer da crisina foi descrita por Pichichero *et al.* (2011), onde investigaram a atividade antiproliferativa em modelo de melanoma em camundongos (B16-F1) e humanos (A375), sendo registrado que esse flavonoide foi capaz de reduzir a proliferação celular e induzir a diferenciação das células nos modelos de melanoma. Os autores atribuíram o efeito da crisina em induzir a morte celular, devido a sua participação nos mecanismos dependentes da caspase que envolve a regulação negativa de ERK 1/2 e ativação de p38 MAPK (PICHICHERO et al., 2011). Xue *et al.* (2016) comprovaram que o principal mecanismo de ação da crisina no tratamento anticâncer, consiste na diminuição da proliferação celular, indução de morte celular por apoptose e redução da inflamação através da via intrínseca de sinalização mitocondrial, sugerindo que a crisina pode ser considerada um potencial candidato à prevenção e tratamento do câncer (XUE et al., 2016).

Goes *et al.* (2018), ao administrarem crisina em camundongos machos, por via oral (10 mg/kg) em modelo experimental crônico da Doença de Parkinson, conseguiram comprovar que o tratamento com crisina foi capaz de atenuar as alterações comportamentais e locomotoras, protegendo contra o aumento do estresse oxidativo e reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias. Este estudo demonstrou a atividade neuroprotetora da crisina onde o seu efeito foi atribuído ao seu forte potencial antioxidante e papel inibitório em diferentes eventos-chave envolvidos na neuroinflamação preservando os níveis de fatores neurotróficos (GOES et al., 2018).

A crisina apresenta propriedades promissoras no tratamento de feridas, devido as suas atividades antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e antimicrobiana (ANAND et al.,

2012; BAE; LEE; KIM, 2011; SURESH BABU et al., 2006; ZHU et al., 2016). Apesar das inúmeras atividades já descritas na literatura, seus efeitos terapêuticos tornam-se limitados devido a sua baixa solubilidade em água e estabilidade físico-químico desfavoráveis (GRESA-ARRIBAS et al., 2010; SOUZA et al., 2015; YANG et al., 2014). A veiculação de substâncias lipofílicas através de sistemas de liberação envolvendo nanotecnologia, são capazes de promover o aumento da biodisponibilidade, redução da toxicidade, melhorias nas propriedades físico-químicas e efeito farmacológico, como exemplo: os sistemas lipossomais, que permitem o desenvolvimento de uma formulação capaz de inserir a crisina no mercado farmacêutico (ŁUKASIEWICZ et al., 2016; MARCONDES SARI et al., 2017).

Nesse contexto, a incorporação da crisina em lipossomas utilizando membranas de colágeno, podem apresentar um novo passo para a obtenção de coberturas mais eficientes na melhora da cicatrização de feridas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal de ferida cutânea excisional.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas;
- Determinar o teor e a eficiência de encapsulação da crisina nas membranas bioativas de colágeno contendo lipossomas.
- Determinar alterações morfológicas do processo de cicatrização de feridas cutâneas induzidas pelas membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas;
- Inferir sobre a capacidade angiogênica das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas sobre a cicatrização de feridas cutâneas;
- Determinar o perfil inflamatório (IL-1 β , IL-6 e NF κ B) induzido pelas membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas sobre a cicatrização de feridas cutâneas;
- Averiguar a ação das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas sobre a atividade antioxidante enzimática em modelo animal de feridas cutâneas excisionais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais e Substâncias

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados anticorpo anti-VEGF clone JH121 (Santa Cruz Biotechnology, EUA); Anticorpo anti- β -actina 13E5 (Cell Signalling, EUA); EDTA (Vetec, Brasil); Formaldeído (Vetec, Brasil); Glicerol (Vetec, Brasil); Glicina (Vetec, Brasil); Soro Albumina Bovina (BSA; Sigma, Brasil); Tampão fosfato (PB; UFS, Brasil); Tris-acetato (UFS, Brasil); Tris/HCl (UFS, Brasil); Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®) e (\pm)- Crisina (C15H10O4, $\geq 97\%$, Sigma-Aldrich®). Para o preparo das membranas de colágeno foi empregado colágeno liofilizado extraído do tendão bovino (UFS, Brasil); Propilenoglicol (Proquimios®) e Ácido acético (Neon®). Para o preparo dos lipossomas, utilizou-se o lipídio Fosfatidilcolina (Lipoid GMBH®); (\pm)- Crisina (C15H10O4, $\geq 97\%$, Sigma-Aldrich®) e Clorofórmio (Dinâmica®). Dimetilsulfóxido (Sytmh®) e Tampão Fosfato pH 7,4 (Neon®) foram utilizados como meios de dissolução para as membranas. Metanol (*HPLC gradient grade*, Sigma-Aldrich®) e Água ultrapura (*milli-q system*, millipore®) foram utilizados como fase móvel para os procedimentos analíticos.

4.2 Extração do Colágeno

O colágeno foi extraído a partir de tendão bovino, segundo método descrito por (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009). O tendão foi cortado em pequenos pedaços (Figura 6) e tratado com acetona para remoção de material gorduroso. Posteriormente, 5 g do material foram lavados com água destilada e colocados em solução de NaCl 10% (m/V) durante 24h à temperatura de 4°C. Após esse período, o material foi novamente lavado com água destilada e colocado em solução de tampão citrato 0,02mol/L pH 4,3 durante 48h em temperatura ambiente, para o intumescimento do tecido.

O tecido intumescido foi homogeneizado em 500 mL de uma solução de ácido acético 0,5 mol.L⁻¹, na presença de pepsina na proporção de 1:50 (m:m) em relação a massa inicial do material. O gel formado (Figura 6) foi mantido por 24h a 4°C. Após esse período, a proteína foi precipitada por *salting out* adicionando ao gel 5% de NaCl (m/V).

O colágeno precipitado foi dialisado durante 72 horas contra água destilada e posteriormente foi realizada a liofilização. O colágeno liofilizado foi guardado em tubos falcon, protegidos contra temperatura e umidade.

Figura 6: Processo de extração do colágeno. A: Tendão cortado em pedaços. B: Formação do gel de colágeno



Fonte: Própria do autor

4.3 Preparo das Membranas

As membranas de colágeno contendo crisina incorporado em lipossomas (COL/CRI) foram preparadas de acordo com o método descrito por NUNES *et al.* (2016). Inicialmente, preparou-se a solução de colágeno, contendo 1 g de colágeno liofilizado, 60 mL de ácido acético (0,5 mol/L) e 0,2 g de propilenoglicol (agente plastificante). Essa solução foi submetida à agitação magnética durante 24 horas.

Os lipossomas foram preparados dissolvendo 250 mg de fosfatidilcolina e 10 mg de crisina em 20 mL de clorofórmio (NUNES *et al.*, 2011). Essa solução foi sonicada em banho de ultrassom por 10 minutos e após esse procedimento, o solvente orgânico foi evaporado pela técnica de rotaevaporação sob temperatura de 40°C. Após a evaporação do solvente, formou-se um filme fosfolipídico no fundo do balão, o qual foi ressuspenso com 40 mL de água ultrapura e em seguida foi submetido a banho de ultrassom por 30 minutos, formando uma dispersão de lipossomas em meio aquoso. Após 24 horas de agitação da solução de colágeno, verteu-se a solução dos lipossomas, mantendo-se sob agitação magnética por mais 24 horas.

As membranas COL/CRI foram obtidas utilizando o método de *casting* (NUNES et al., 2016). Nesse método as dispersões aquosas dos polímeros foram vertidas em suportes adequados, tais como: superfícies de polietileno ou placas de petri. Dessa forma, após as 24 horas de agitação, verteu-se a solução das membranas em placas de petri de 14 cm de diâmetro, as quais foram depositadas em capela para secagem à temperatura ambiente.

Membranas de colágeno contendo lipossomas sem crisina (COL) foram preparadas utilizando a mesma metodologia, com exceção do uso da crisina. Nessa formulação, a fosfatidilcolina foi dissolvida no clorofórmio e adicionada diretamente na solução de colágeno. Essas membranas sem crisina, ou seja, contendo o colágeno puro, foram utilizadas como formulação controle em um grupo experimental para fins de comparação de resultados.

4.4 Teor e Eficiência de Encapsulação da Crisina nas Membranas de Colágeno Contendo Lipossomas

O teor e a eficiência de encapsulação (EE) da crisina foram determinados através da dissolução de segmentos das membranas de colágeno contendo crisina em lipossomas com área de 7 cm² em 10 mL de metanol, mantidos sob agitação magnética constante (250 rpm) por 12 horas, para permitir que toda crisina encapsulada na membrana estivesse em contato com a solução. Em seguida, a solução obtida foi filtrada em filtros de membrana (PTFE) de 0,45 µm e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os segmentos foram obtidos a partir de três membranas de colágeno contendo crisina em lipossomas diferentes (A, B e C) e as análises foram realizadas em triplicata (n= 3). A EE foi calculada de acordo com equação 5, descrita abaixo:

$$Eq.(5): EE = C1/C2 * 100$$

onde, C1 é o teor de crisina presente nas membranas e C2 é a quantidade inicial de crisina utilizado para preparar as membranas de colágeno contendo crisina em lipossomas

4.5 Protocolos Experimentais

4.5.1 Animais

Foram utilizados 72 ratos (*Rattus norvegicus*), albinos da linhagem *Wistar*, machos, com peso compreendido entre 250 – 300 gramas e 18 camundongos entre 25 – 30 gramas, albinos da linhagem *Swiss*, machos, todos oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe (DFS/UFS). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (41x34x16cm) sob as mesmas condições de temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade, ruído, 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, no Biotério do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LAFAC), no Departamento de Fisiologia, da Universidade Federal de Sergipe. 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 55/2018.

4.5.2 Grupos de Estudo

Os ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos distintos e subdivididos em quatro subgrupos que foram tratados, respectivamente, por 3, 7, 14 e 21 dias consecutivos (n=6, cada subgrupo):

- **SI:** Grupo sem intervenção (foi confeccionada apenas uma ferida e os animais permaneceram sem tratamento até a eutanásia);
- **COL:** Grupo controle tratado com membrana de colágeno pura contendo lipossomas;
- **COL/CRI:** Grupo tratado com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas.

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em três grupos distintos tratados, respectivamente, por 7 dias consecutivos (n=6, cada subgrupo):

- **SI:** Grupo sem intervenção (foi confeccionada apenas uma ferida e os animais permaneceram sem tratamento até a eutanásia);
- **COL:** Grupo controle tratado com membrana de colágeno pura contendo lipossomas;
- **COL/CRI:** Grupo tratado com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas.

4.6 Modelo de Ferida Cutânea Excisional

Para a realização do procedimento cirúrgico, todos os animais foram pesados e anestesiados (quetamina na dose de 80 mg/kg e xilazina na dose de 10 mg/kg), por via intraperitoneal e após atingir o plano anestésico, os animais foram submetidos à tricotomia e a antisepsia com álcool a 70% e iodo-povidona tópico a 10% (POVIDONE®). Posteriormente, os animais foram colocados sobre a mesa cirúrgica e posicionados em decúbito ventral para a realização do modelo de ferida excisional.

O modelo de ferida cutânea excisional, que mimetiza uma ferida cutânea aberta, foi padronizada para todos os animais de ambos os grupos e consiste na excisão total da pele e hipoderme (região dorsal) realizada com um *punch* metálico para biópsia com 8 mm de diâmetro (RICHTER®) (Figura 7) no centro da área tricotomizada. Não foi realizada sutura das feridas. A hemostasia foi feita por compressão digital com compressa de gaze.

Cada animal foi submetido à confecção de apenas uma ferida, com exceção apenas dos animais submetidos à avaliação por 7 dias, que foram submetidos à confecção de 2 feridas na região dorsal para a obtenção de tecido necessário a serem direcionados para a análise histológica e avaliação do imunoc conteúdo de VEGF e NFκB por *Western blot*. Ao final do procedimento cirúrgico, os animais foram realocados (2 a 2) nas suas respectivas gaiolas com ração e água *ad libitum* e foram examinados diariamente quanto à mobilidade e às condições da ferida e suas complicações. Os animais presentes na mesma gaiola foram separados por divisória de acrílico transparente, de modo a evitar que nenhum animal ficasse isolado,

alterando o hábito de viver em grupo, e de permitir contaminação da ferida pelo outro animal. O ambiente de alocação dos animais contou ainda com um adequado sistema de exaustão de ar diretamente com o ambiente externo.

O tratamento dos animais de acordo com o seu grupo, consistiu na aplicação da membrana (mesma dimensão do *punch* metálico – 8mm de diâmetro) diretamente sobre a ferida uma única vez, no momento de realização da ferida, especificamente após a hemostasia.

Figura 7: Punch metálico 8 mm para biópsia.



Fonte: Própria do autor.

4.7 Determinação do Índice de Retração das Feridas

A avaliação macroscópica ocorreu no 3º, 7º, 14º e 21º dias após a confecção da ferida. Os animais foram novamente pesados e então sacrificados com dose letal de anestésico pela via intraperitoneal. Após a eutanásia, os animais foram colocados em mesa cirúrgica e tiveram suas feridas fotografadas com câmera de celular iphone 7 12.0 megapixels, com resolução 4608 x 2592 pixels, à distância constante de 30 cm da mesa cirúrgica. Foi realizada a medida do diâmetro da ferida residual no eixo crânio-caudal e latero-lateral com paquímetro digital (MESSEN®) (Figura 8). Para a determinação das áreas das feridas, utilizou-se uma variação da fórmula $A = \pi \times R \times r$, onde:

A - Área da ferida;

π - Valor matemático utilizado até a quarta casa após a vírgula (3,1415);

R - Raio maior da ferida;

r - Raio menor da ferida.

Neste experimento *R* e *r* corresponderam aos raios das feridas no sentido crânio-caudal e látero-lateral, respectivamente (PRATA et al., 1988). Os diâmetros obtidos foram divididos por 2 determinando-se, dessa maneira, os raios (BARRETO et al., 2013a). Para a determinação da área de redução (AR), utilizou-se a fórmula $AR = [(A0 - At) / A0] \times 100$, onde: AR = Área resultante; A0 – Área inicial após confecção; At – Área final medida antes da retirada da ferida nos dias 3,7,14 e 21 dias (AGRA et al., 2013).

Figura 8: Paquímetro digital para mensuração do índice de retração das feridas.



Fonte: Própria do autor.

4.8 Processamento Histológico

Após os protocolos de avaliação macroscópica, os animais foram eutanasiados, ao 3º, 7º, 14º ou 21º dia de pós-operatório e a área das feridas residuais foram retiradas com margem externa 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, para uma avaliação qualitativa por análise macroscópica. Em seguida, cada peça foi fixada por alfinetes em EVA e colocada em recipiente plástico com solução de formol tamponado a 10% por no mínimo 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 (BARRETO et al., 2013b).

As lâminas foram avaliadas quanto à intensidade da reação inflamatória, tipo de infiltrado inflamatório, índice de epitelização, formação do tecido de granulação, vascularização, proliferação de fibroblastos e deposição de fibras colágenas no 3º, 7º, 14º e 21º dias pós-cirúrgicos (avaliação duplo cego).

4.9 Análise Histomorfológica

4.9.1 Análise da Reação Inflamatória

Para avaliação das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório/reparativo, foram analisadas as secções histológicas coradas em HE (10 campos), 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:

- **LEVE:** (+1) – quando as células inflamatórias, independentemente de seu fenótipo, constituírem menos de 10% da população celular observada na área da ferida cirúrgica;
- **MODERADA:** (+2) – quando as células inflamatórias, independentemente de seu fenótipo, constituírem entre 10% e 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica;
- **SEVERA:** (+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., 2013a; RIBEIRO et al., 2009a).

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 (BARRETO et al., 2013b; RIBEIRO et al., 2009b). Desta forma, esta análise obedeceu os mesmos critérios de classificação descritos acima: +1,+2 e +3.

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., 2013a; RIBEIRO et al., 2009a).

4.9.2 Determinação do índice percentual de epitelização da superfície da ferida

O índice de epitelização da superfície da ferida foi determinado pelo 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., 2013a), 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 Ensaio Imunoenzimáticos

4.10.1 Dosagem de proteínas para *Western blot* e ELISA:

A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando-se albumina bovina como padrão.

4.10.2 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 de lise contendo 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 20 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de ácido egtazico (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 uma eletroforese de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE) e posteriormente transferidas 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), fosfo-NFκB (anti-fosfo-NFκB) e total 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 Imojej.

4.10.3 Imunoensaio ELISA

A técnica de ELISA foi realizada nos camundongos e utilizada para a quantificação das citocinas pró – inflamatórias IL - 1β e IL- 6, através do kit e-Bioscience (Thermo Fisher Scientific, San diego, lote – 4337664) para a quantificação das citocinas presentes na amostra.

Amostras do tecido de granulação do 7º dia após a confecção das feridas foram homogeneizadas em Salina Tampão Fosfato (PBS; 50 mM) acrescido de inibidor de proteases. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10000 rpm, 10 min) e uma alíquota foi retirada para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Posteriormente, quantidades iguais de amostra (50 µg) ou de solução padrão do *kit* foram adicionadas ao poço contendo o anticorpo de captura previamente imobilizado. Em seguida, o conteúdo foi incubado (*overnight*, 4°C). O “sanduíche” foi formado pela adição de um segundo anticorpo biotinizado, que se liga ao alvo em outro epítipo, e incubado a temperatura ambiente por 2 h. Posteriormente, foi adicionada a avidina ligada à peroxidase e incubada a temperatura ambiente por 30 min. Após a incubação e várias lavagens, a revelação foi realizada através da adição do substrato da enzima que produziu um sinal proporcional à quantidade de analito. A sensibilidade do *kit* utilizado foi de 8pg/ml.

4.11. Avaliação da Atividade Antioxidante

Após os protocolos de avaliação macroscópica, os animais (ratos) foram eutanasiados ao 7º, dia pós- lesão e amostras do tecido de granulação foram recolhidas e separadas para o estudo e posteriormente homogeneizados em salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7.4). Após centrifugação para separar os *debris* celulares, as amostras foram utilizadas para a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes descritas a seguir:

4.11.1 Catalase (CAT)

As amostras foram incubadas em um tampão fosfato (50 mM) na presença de peróxido de hidrogênio 10 mM. A atividade foi medida pela taxa do decaimento da absorbância correspondente ao nível de peróxido de hidrogênio no tampão, medida no espectrofotômetro (240 nm) (GELAIN et al., 2004).

4.11.2 Superóxido Dismutase (SOD)

As amostras foram incubadas em um tampão fosfato contendo adrenalina a 37 °C, e a atividade foi medida espectrofotometricamente pela taxa de inibição da formação auto-

catalítica de adrenocromo, através da quantificação espectrofotométrica do adrenocromo (480 nm)(DAL-PIZZOL et al., 2001).

4.12 Descarte dos Animais

Os animais eutanasiados 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.

4.13 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm E.P.M. A normalidade das amostras foi avaliada através do teste de Shapiro – Wilk. Nas análises da área de redução das feridas, índice de epitelização (3°,7°,14° e 21° dia pós-lesão), imunoconteúdo de VEGF e NFkB e mensuração das interleucinas IL-1 β e IL-6 (7° dia pós-lesão) as diferenças entre os grupos foram analisadas através do teste de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. A análise semi-quantitativa da reação inflamatória foi analisada pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Todos os resultados foram tratados estatisticamente utilizando-se GraphPad Prism® versão 5.0. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção das Membranas COL/CRI

Após a secagem a temperatura ambiente, as membranas foram removidas das placas com o auxílio de uma pinça de metal e em seguida suas características organolépticas foram analisadas. As membranas COL/CRI (patente já requerida junto ao INPI - BR 10 2019 018341 1), foram embaladas, lacradas, identificadas e armazenadas em dessecador. Macroscopicamente, apresentaram uma coloração levemente amarelada, baixa opacidade, boa flexibilidade, sem odor característico e exibiram uma superfície lisa, sem a presença de grumos, rachaduras ou ranhuras (Figura 9).

Figura 9: Membrana bioativa de colágeno contendo crisina em lipossomas, após a secagem, obtida pelo método de *casting*.



Fonte: Própria do autor.

5.2 Eficiência de Encapsulação (EE) da Crisina nas Membranas de Colágeno Contendo Lipossomas

O teor da CRI obtido com as análises através do método de CLAE foi de $165,37 \pm 11,70 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ e dessa forma a EE foi de 87,82% (Tabela 2). O valor da EE próximo a 100% indica que praticamente toda a crisina foi incorporada nos lipossomas/membranas.

Tabela 2: Teor ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) e EE (%) da Crisina nas Membranas de Colágeno Contendo Lipossomas.

| | Teor ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) | Média \pm DP (Todas as amostras) | EE (%) |
|-------------------|--|---------------------------------------|---------------|
| Membrana A | Média \pm DP (n=3) | 165,37 \pm 11,70 | 87,82% |
| Segmento 1 | 159,27 \pm 14,34 | | |
| Segmento 2 | | | |
| Segmento 3 | | | |
| Membrana B | Média \pm DP (n=3) | | |
| Segmento 1 | 157,99 \pm 6,33 | | |
| Segmento 2 | | | |
| Segmento 3 | | | |
| Membrana C | Média \pm DP (n=3) | | |
| Segmento 1 | 178,87 \pm 5,00 | | |
| Segmento 2 | | | |
| Segmento 3 | | | |

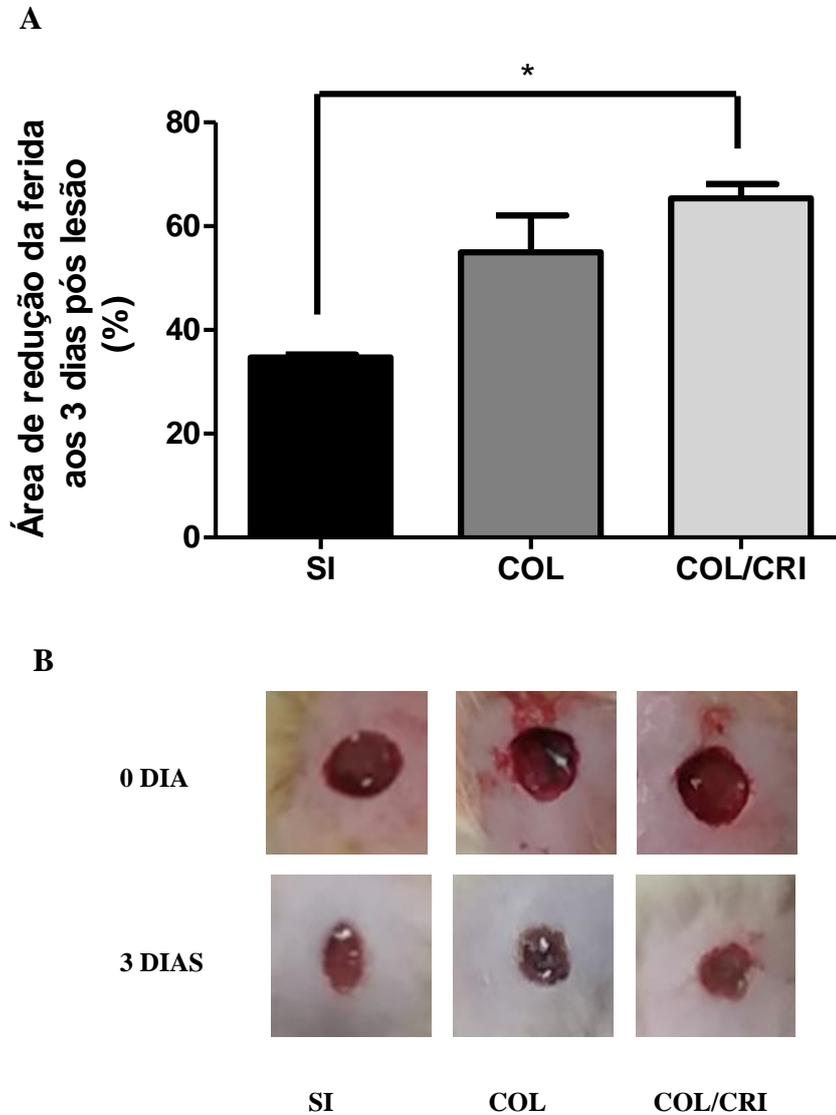
Fonte: Própria do autor.

5.3 Efeito da COL/CRI sobre a Área de Redução das Feridas

A determinação da área reducional das feridas indica a progressão do processo cicatricial das lesões dos animais em estudo (SI, COL e COL/CRI) no seu respectivo tempo (dias) de retirada da ferida residual.

Aos três dias pós-lesão (Figura 10), os animais tratados com crisina apresentaram uma redução significativa da área residual da ferida quando comparado ao grupo SI ($p < 0,05$).

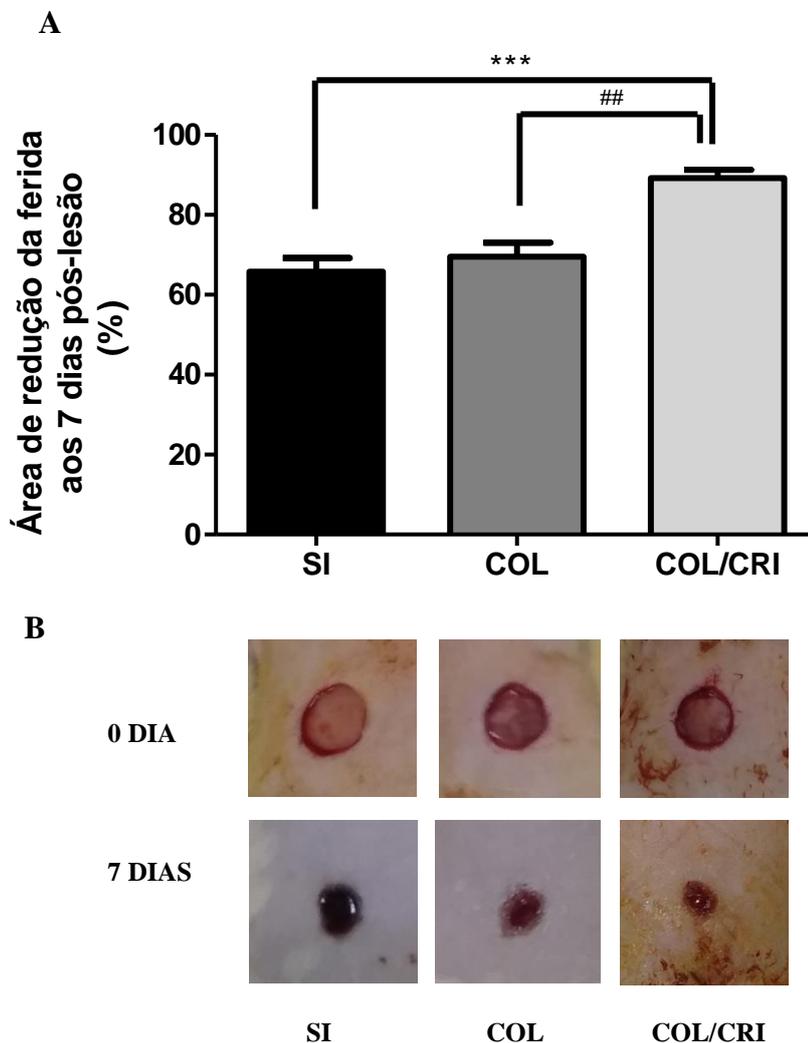
Figura 10: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a mensuração da redução da área da ferida (%) 3 dias após a confecção da ferida. A: Cálculo da área de redução (%). B: Exemplo fotográfico de cada grupo.



SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Os animais foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 3 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados pela média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SI. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($n = 6/\text{grupo}$).

No 7^o dia de experimentação (Figura 11), o grupo COL/CRI atenuou significativamente a área de redução da ferida, quando comparado ao grupo COL ($p < 0,01$) e quando comparado ao grupo SI ($p < 0,001$). O grupo COL não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo SI.

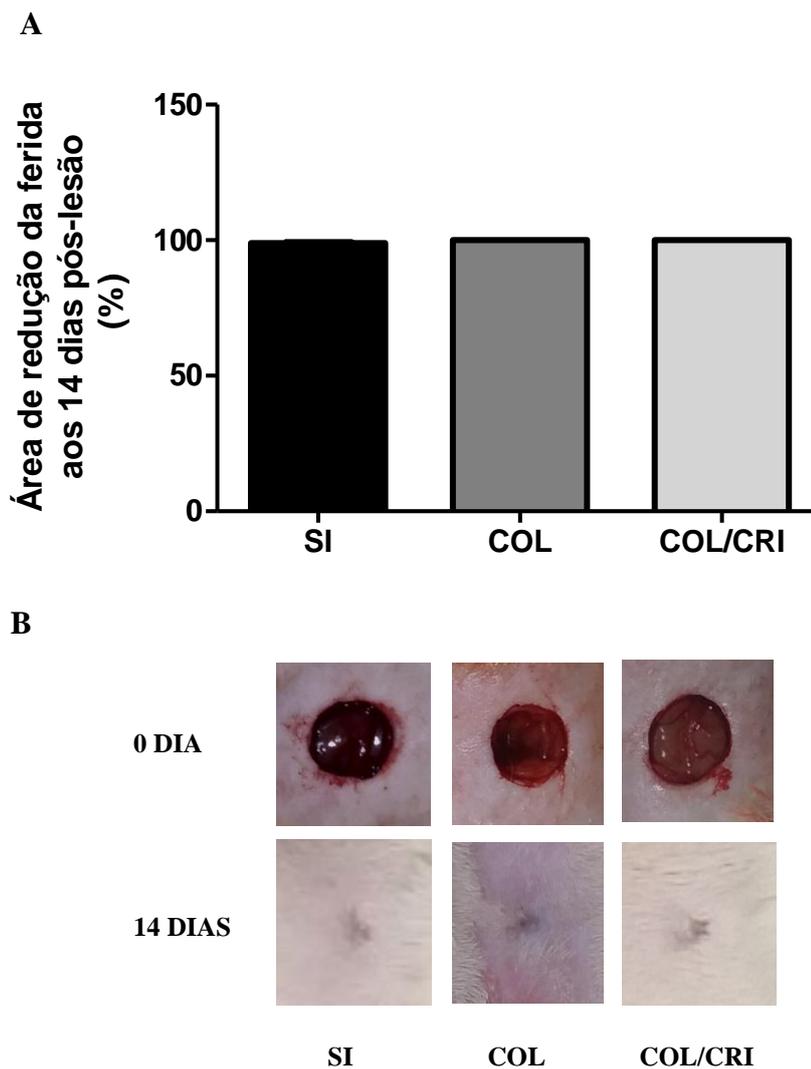
Figura 11: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a mensuração da redução da área da ferida (%) 7 dias após a confecção da ferida. A: Cálculo da área de redução (%). B: Exemplo fotográfico de cada grupo.



SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Os animais foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 7 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados pela média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SI e ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo COL. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($n = 6/\text{grupo}$).

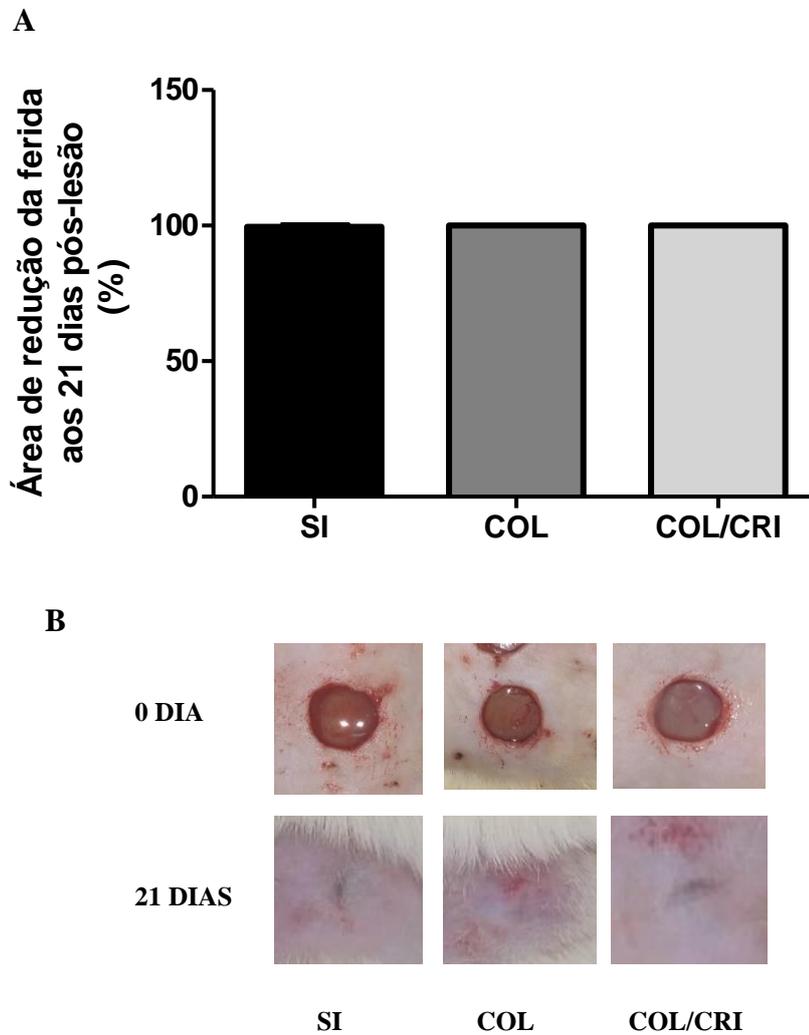
No 14º e 21º dia de experimentação (Figura 12 e 13), o grupo COL/CRI não apresentou diferença estatística quando comparado aos grupos COL e SI, no que se refere à área de redução da ferida.

Figura 12: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a mensuração da redução da área da ferida (%) 14 dias após a confecção da ferida. A: Cálculo da área de redução (%). B: Exemplo fotográfico de cada grupo.



SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Os animais foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 14 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados pela média \pm E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey (n = 6/grupo).

Figura 13: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a mensuração da redução da área da ferida (%) 21 dias após a confecção da ferida. A: Cálculo da área de redução (%). B: Exemplo fotográfico de cada grupo.



SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Os animais foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 21 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados pela média \pm E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($n = 6/\text{grupo}$).

5.4 Efeito da COL/CRI sobre a Composição Histomorfológica das Feridas

A avaliação histopatológica foi constituída por análise descritiva e semiquantitativa (lâminas coradas em HE) das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório/reparativo. Foram observados os critérios de intensidade da reação inflamatória, tipo de infiltrado inflamatório, índice de epitelização, formação do tecido de granulação, vascularização, proliferação de fibroblastos e deposição de fibras colágenas no 3º, 7º, 14º e 21º dias pós-cirúrgicos, conforme os grupos e o dia estabelecido para a eutanásia (Figura 14).

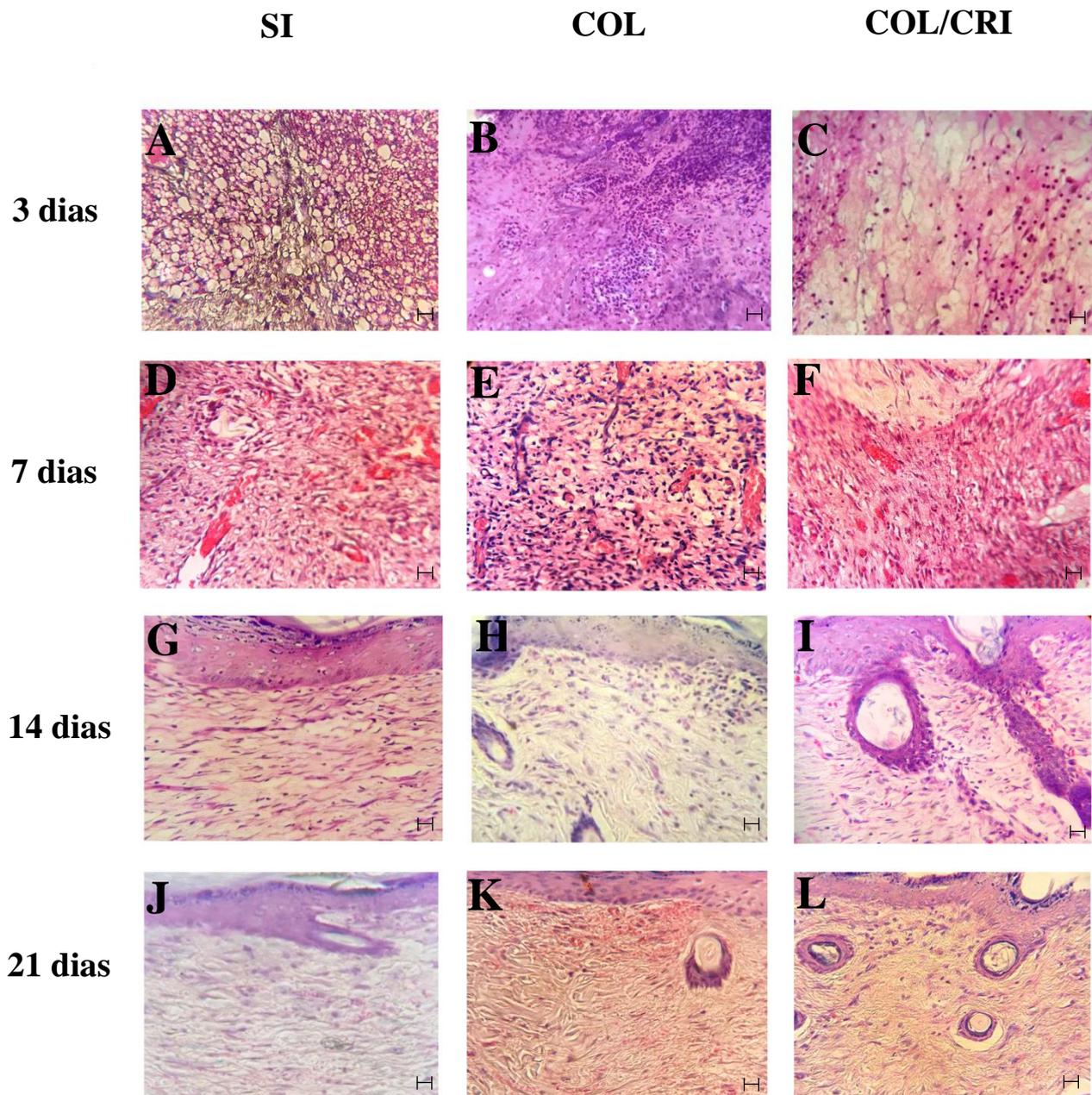
No 3º dia pós-cirúrgico, foi possível observar nos grupos SI e COL uma migração de adipócitos para a região central da lesão, além de um intenso infiltrado neutrofílico e edema difuso distribuídos por toda extensão da ferida cirúrgica (Figura 14 a/b). Diferentemente, no grupo COL/CRI foi possível observar uma menor migração de células adiposas e infiltrado inflamatório (Figura 14 c), o que corrobora com os achados referentes à área de redução das feridas (Figura 10), onde o mesmo grupo apresentou um aumento significativo da área de redução quando comparado ao grupo SI.

No 7º dia, o infiltrado leucocitário se manteve severo no grupo SI (Figura 14 d), enquanto que no grupo COL e COL/CRI foi possível observar uma diminuição dessas células, sendo considerada uma resposta inflamatória moderada (Figura 14 e/f). Ainda, foi possível notar no grupo COL/CRI (Figura 14 f), a presença de um tecido de granulação exuberante, marcado por densa rede de vasos sanguíneos e conteúdo considerável de grandes células fusiformes (interpretados por fibroblastos em intensa atividade) com conseqüente deposição de fibras colágenas mais espessas quando comparado aos grupos SI e COL (Figura 14 d/e).

Ao 14º dia pós-operatório, foi possível observar uma redução da resposta inflamatória em todos os grupos com marcada proliferação fibroblástica e considerável deposição colágena, embora no grupo SI esta tenha se mostrado menos proeminente (Figura 14 g/h/i). De maneira ainda diferente, os grupos COL e COL/CRI (Figura 14 h/i), apresentaram grandes células fusiformes (interpretados como fibroblastos ativos), bem como folículos pilosos e glândulas sebáceas bem formados, enquanto que no grupo SI foi observado apenas a presença de brotos epiteliais interpretados como rudimentos sugestivos de apêndices cutâneos (Figura 14 g).

No 21º dia, nos grupos COL e COL/CRI a intensidade inflamatória mostrou-se bastante reduzida ou ausente, com a presença de uma proliferação fibroblástica, folículos pilosos na derme, além da deposição de fibras colágenas mais densas e entrelaçadas com características que se aproximaram aos aspectos da derme normal (Figura 14 k/l).

Figura 14: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina a em lipossomas (COL/CRI) sobre a análise histológica das feridas residuais dos animais no 3º, 7º, 14º ou 21º dias após a confecção da ferida excisional. Os animais foram tratados e avaliados no 3º, 7º, 14º ou 21º dia, respectivamente, após a confecção da ferida. (HE, ampliação de 400x).



Por sua vez, no tratamento com COL/CRI, as deposições das fibras colágenas encontraram-se mais entrelaçadas e mais espessas, o que proporciona um menor espaço entre elas a fim de garantir uma melhor maturação do tecido, além da presença de folículos pilosos nesse grupo (Figura 14 1). Diante disso, pode-se sugerir que o tratamento com a crisina proporcionou um avanço nas fases do processo de cicatrização quando comparados aos outros grupos.

Ao analisarmos a intensidade e tipo de infiltrado inflamatório nas lâminas coradas em HE 3 dias após o procedimento cirúrgico, foi possível observar que nos grupos SI e COL a intensidade inflamatória mostrou-se severa com a presença de >50% de células inflamatórias no centro da lesão. Enquanto que o grupo COL/CRI mostrou uma redução desse infiltrado leucocitário caracterizado como moderado. Todos os grupos foram categorizados como inflamação aguda pelo predomínio de células polimorfonucleares como neutrófilos e macrófagos (Tabela 3).

No 7º dia, a resposta inflamatória ainda se manteve severa nos grupos SI e COL pela presença >50% de células inflamatórias. Diferente, no grupo COL/CRI essa intensidade inflamatória foi menor sendo categorizada como moderada (Tabela 4).

Em relação ao infiltrado inflamatório, o grupo SI foi categorizado com uma inflamação aguda, devido ao predomínio de células polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos). Enquanto o grupo COL mostrou um equilíbrio entre células polimorfonucleares e mononucleares (linfócitos e plasmócitos) sendo categorizado como inflamação subaguda. E no grupo tratado com COL/CRI foi possível observar a marcada diminuição do infiltrado neutrofílico, como também a presença de um nível expressivo de linfócitos >50%, categorizando o padrão inflamatório predominantemente mononuclear como crônico inespecífico.

Tabela 3: Avaliação da intensidade e tipo de infiltrado inflamatório das feridas residuais 3 dias após a confecção cirúrgica.

| GRUPOS | Animais | Intensidade da reação inflamatória | Leucócitos | | | | | |
|-----------|---------|------------------------------------|------------|--------|-------|--------|-------|-----------|
| | | | Neut. | Eosin. | Linf. | Plasm. | Macr. | Cél. Gig. |
| SI | R1 | +3 | +2 | +1 | +1 | +1 | +3 | +1 |
| | R2 | +3 | +2 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 |
| | R3 | +2 | +3 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 |
| | R4 | +3 | +3 | +1 | +1 | +1 | +3 | +1 |
| | R5 | +3 | +3 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 |
| | R6 | +3 | +2 | +1 | +1 | +1 | +3 | +1 |
| COL | R1 | +2 | +2 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 |
| | R2 | +3 | +2 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 |
| | R3 | +2 | +2 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 |
| | R4 | +3 | +2 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 |
| | R5 | +2 | +2 | +1 | +1 | +1 | +3 | +1 |
| | R6 | +3 | +2 | +1 | +1 | +1 | +3 | +1 |
| **COL/CRI | R1 | +2 | +2 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 |
| | R2 | +2 | +1 | +2 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R3 | +1 | +2 | +2 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R4 | +2 | +2 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R5 | +2 | +2 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 |
| | R6 | +1 | +2 | +2 | +1 | +1 | +2 | +1 |

SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas; R: Rato; Neut.: Neutrófilos; Eosin: Eosinófilos; Linf.: Linfócitos; Plas.: Plasmócitos; Macr.: Macrófagos; Cél. Gig.: Células Gigantes. LEVE +1: < 10%; MODERADA+2: Entre 10 e 50%; SEVERA +3: > 50%. **p<0,01 COL/CRI quando comparado ao grupo SI. Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn (n= 6/grupo).

Diante da diminuição das principais células que participam e mantém ativamente a fase inflamatória, podemos inferir que a cronificação da inflamação presente no grupo tratado com crisina acelerou o processo de cicatrização conforme demonstrado na tabela 4. Esse resultado corrobora com os achados referentes à análise da área residual das feridas, onde no 7º dia os animais do grupo COL/CRI apresentaram um aumento significativo na área de redução das feridas quando comparado aos grupos SI e COL, sugerindo uma sobreposição da fase inflamatória com a fase proliferativa, o que contribui para um reparo tecidual mais rápido.

Tabela 4: Avaliação da intensidade e tipo de infiltrado inflamatório das feridas residuais 7 dias após a confecção cirúrgica.

| GRUPOS | Animais | Intensidade da reação inflamatória | Leucócitos | | | | | |
|----------|---------|------------------------------------|------------|--------|-------|--------|-------|-----------|
| | | | Neut. | Eosin. | Linf. | Plasm. | Macr. | Cél. Gig. |
| SI | R1 | +2 | +2 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R2 | +3 | +2 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R3 | +3 | +2 | +1 | +2 | +1 | +2 | +1 |
| | R4 | +3 | +2 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 |
| | R5 | +2 | +2 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 |
| | R6 | +3 | +2 | +1 | +2 | +1 | +1 | +1 |
| COL | R1 | +2 | +1 | +1 | +2 | +2 | +1 | +1 |
| | R2 | +3 | +2 | +1 | +2 | +1 | +1 | +1 |
| | R3 | +2 | +1 | +1 | +3 | +1 | +1 | +1 |
| | R4 | +3 | +2 | +1 | +2 | +1 | +2 | +1 |
| | R5 | +2 | +1 | +1 | +2 | +1 | +2 | +1 |
| | R6 | +2 | +1 | +1 | +2 | +1 | +1 | +1 |
| *COL/CRI | R1 | +2 | +1 | +1 | +3 | +1 | +1 | +1 |
| | R2 | +2 | +1 | +1 | +2 | +2 | +1 | +1 |
| | R3 | +2 | +1 | +2 | +3 | +1 | +1 | +1 |
| | R4 | +1 | +1 | +1 | +3 | +2 | +2 | +1 |
| | R5 | +1 | +1 | +2 | +3 | +1 | +1 | +1 |
| | R6 | +1 | +1 | +2 | +2 | +1 | +1 | +1 |

SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas; R: Rato; Neut.: Neutrófilos; Eosin: Eosinófilos; Linf.: Linfócitos; Plas.: Plasmócitos; Macr.: Macrófagos; Cél. Gig.: Células Gigantes. LEVE +1: < 10%; MODERADA+2: Entre 10 e 50%; SEVERA +3: > 50%. *p<0,05 COL/CRI quando comparado ao grupo SI. Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn (n= 6/grupo).

No 14º dia pós-operatório, notou-se que nos grupos SI e COL houve uma redução na intensidade inflamatória, sendo classificada como de leve a moderada <10% ou entre 10-50% de células inflamatórias. Nesses grupos, o predomínio das células mononucleares como os linfócitos e macrófagos no centro da ferida classificam essa inflamação como crônica inespecífica. Diferente dos outros grupos, os animais tratados com COL/CRI, também apresentaram uma redução da intensidade inflamatória que foi categorizada como leve ou ausente correspondendo a <10% de células inflamatórias no local da lesão (Tabela 5).

Tabela 5: Avaliação da intensidade e tipo de infiltrado inflamatório das feridas residuais 14 dias após a confecção cirúrgica.

| GRUPOS | Animais | Intensidade da reação inflamatória | Leucócitos | | | | | Cél. Gig. |
|---------|---------|------------------------------------|------------|--------|-------|--------|-------|-----------|
| | | | Neut. | Eosin. | Linf. | Plasm. | Macr. | |
| SI | R1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 |
| | R2 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 | +1 | +1 |
| | R3 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R4 | +2 | +1 | +1 | +2 | +1 | +2 | +1 |
| | R5 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R6 | +2 | +1 | +1 | +2 | +1 | +2 | +1 |
| COL | R1 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 | +1 | +1 |
| | R2 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R3 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R4 | +2 | +1 | +1 | +2 | +1 | +2 | +1 |
| | R5 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R6 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| COL/CRI | R1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | 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 |
| | R6 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |

SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas; R: Rato; Neut.: Neutrófilos; Eosin: Eosinófilos; Linf.: Linfócitos; Plas.: Plasmócitos; Macr.: Macrófagos; Cél. Gig.: Células Gigantes. LEVE +1: < 10%; MODERADA+2: Entre 10 e 50%; SEVERA +3: > 50%.

Novamente, pode-se observar que quando comparado aos grupos SI e COL, a fase de proliferação no grupo COL/CRI encontra-se no seu estágio final sendo posteriormente seguida pela fase de remodelação. Esse resultado corrobora com os achados histológicos no sétimo dia, no qual esse mesmo grupo apresentou uma redução no nível das células polimorfonucleares com avanço da fase proliferativa quando comparado aos demais grupos.

No 21º dia pós – cirúrgico, em todos os grupos (Tabela 6), a reação inflamatória foi leve ou ausente, uma resposta totalmente esperada, já que etapas posteriores do processo de reparação tecidual são representadas por uma progressiva redução do estímulo quimiotático levando a uma redução do infiltrado leucocitário característico do curso natural do processo de cicatrização.

Tabela 6: Avaliação da intensidade e tipo de infiltrado inflamatório das feridas residuais 21 dias após a confecção cirúrgica.

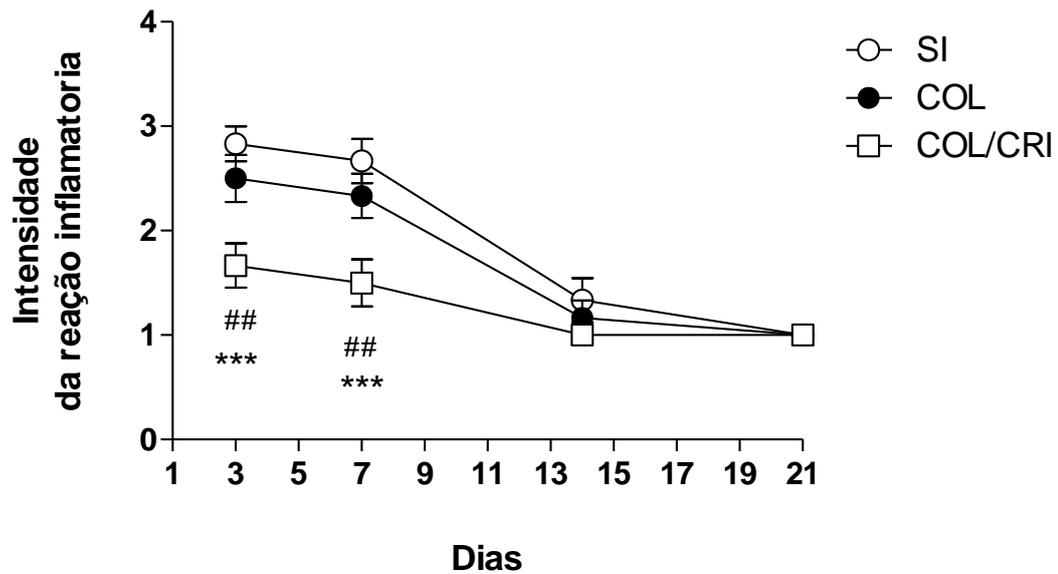
| GRUPOS | Animais | Intensidade da reação inflamatória | Leucócitos | | | | | Cél. Gig. |
|---------|---------|------------------------------------|------------|--------|-------|--------|-------|-----------|
| | | | Neut. | Eosin. | Linf. | Plasm. | Macr. | |
| SI | R1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | 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 |
| | R6 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| COL | R1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | 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 |
| | R6 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| COL/CRI | R1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R2 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R3 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |
| | R4 | +1 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 | +1 |
| | R5 | +1 | +1 | +1 | +2 | +1 | +1 | +1 |
| | R6 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 | +1 |

SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas; R: Rato; Neut.: Neutrófilos; Eosin: Eosinófilos; Linf.: Linfócitos; Plas.: Plasmócitos; Macr.: Macrófagos; Cél. Gig.: Células Gigantes. LEVE +1: < 10%; MODERADA+2: Entre 10 e 50%; SEVERA +3: > 50%.

Visando avaliar a intensidade da reação inflamatória entre os dias 3, 7, 14 e 21, foi possível observar que no 3º dia pós-lesão houve uma diminuição significativa na intensidade da reação inflamatória nos animais tratados com COL/CRI ($1,66 \pm 0,21$) quando comparados ao grupo SI ($2,88 \pm 0,16$, $p < 0,001$) e COL ($2,50 \pm 0,22$, $p < 0,01$). A mesma resposta foi observada no 7º dia pós-lesão nos animais do grupo COL/CRI ($1,50 \pm 0,22$) quando

comparado aos grupos SI ($2,66 \pm 0,21$, $p < 0,001$) e COL ($2,33 \pm 0,21$, $p < 0,01$). Por fim, no 14º e 21º dia pós-cirúrgico não foi observada diferença estatística entre os grupos (Figura 15).

Figura 15: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a intensidade da reação inflamatória no 3º, 7º, 14º e 21º dia pós-lesão.

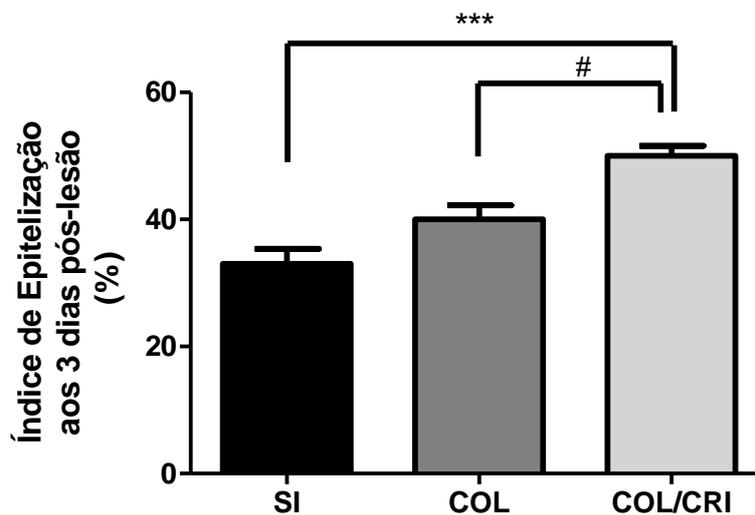


SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Os animais foram tratados e avaliados no 3º, 7º, 14º e 21º dia após a confecção da ferida. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SI e ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo COL. Os valores estão representados média \pm E.P.M. ANOVA duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($n = 6$ /grupo).

Após as análises histomorfológicas, o índice de epitelação da superfície da ferida foi avaliado através da observação da migração de queratinócitos na região correspondente a área lesionada.

Ao 3º dia pós-lesão o grupo tratado com crisina apresentou um aumento significativo nas taxas de epitelação quando comparado aos grupos SI ($p < 0,001$) e COL ($p < 0,05$) (Figura 16). O grupo COL não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo SI.

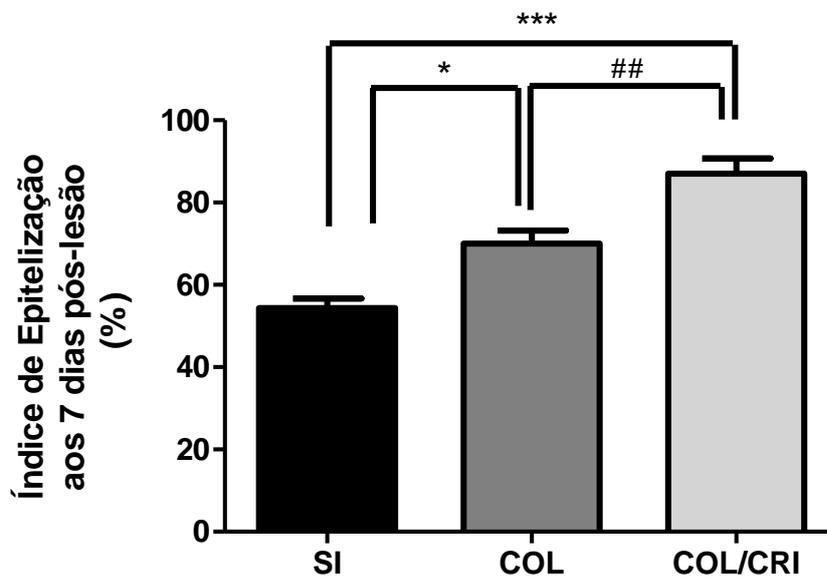
Figura 16: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o índice de epitelação em feridas cutâneas abertas no 3º dia pós-lesão.



SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Os animais foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 3 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SI e # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo COL ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($n = 6/\text{grupo}$).

No 7º dia, o grupo COL/CRI apresentou um aumento significativo nas taxas de epitelização quando comparado aos grupos SI ($p < 0,001$) e COL ($p < 0,01$), enquanto que o grupo COL apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo SI ($p < 0,05$) (Figura 17).

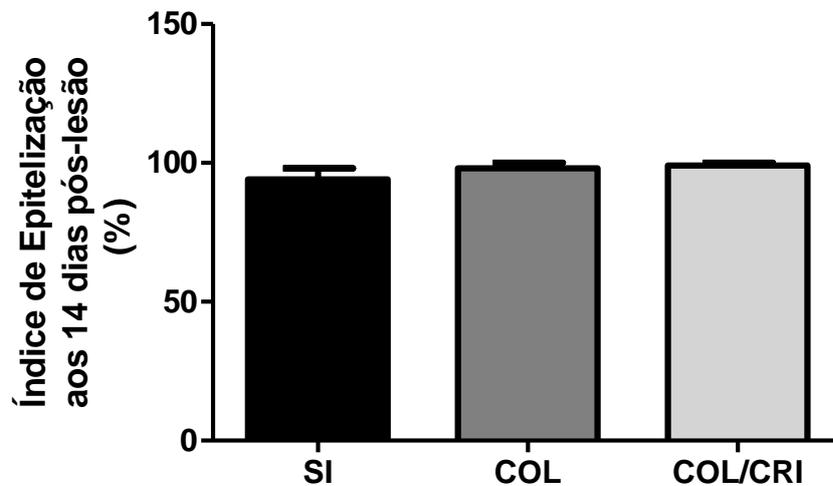
Figura 17: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o índice de epitelização em feridas cutâneas abertas no 7º dia pós-lesão.



SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Os animais foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 7 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SI; ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo COL e * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SI. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($n = 6$ /grupo).

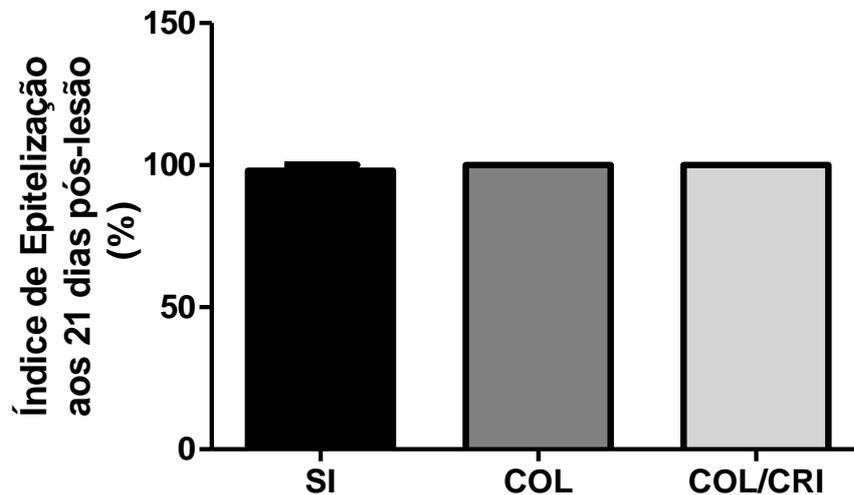
Já na avaliação dos grupos do 14º e 21º dia pós-cirúrgico, não foi possível observar distinções estatísticas significativas quanto ao índice de epitelização (Figura 18 e 19).

Figura 18: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o índice de epitelização em feridas cutâneas abertas no 14º dia pós-lesão.



SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Os animais foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 14 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados média \pm E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey (n = 6/grupo).

Figura 19: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o índice de epiteliação em feridas cutâneas abertas no 21º dia pós-lesão.

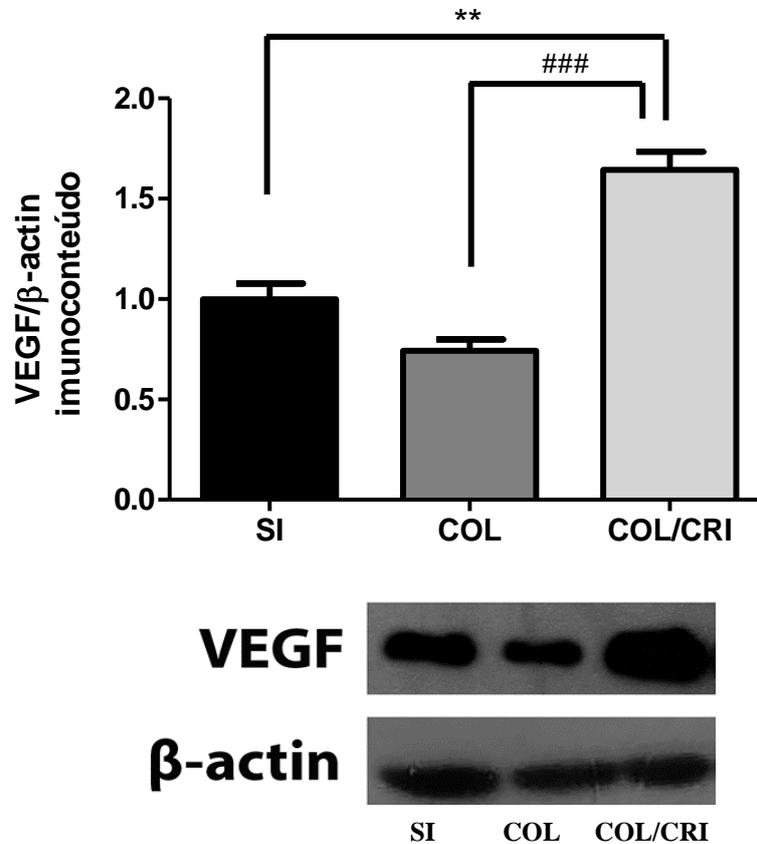


SI: Animais isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Os animais foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 21 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados média \pm E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey (n = 6/grupo).

5.5 Efeito da COL/CRI sobre os Níveis de VEGF

O tratamento com COL/CRI foi capaz de aumentar significativamente (Figura 20) o nível do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nas feridas excisionais abertas, 7 dias após a sua confecção, quando comparado ao grupo SI ($p < 0,01$) e quando comparado ao grupo COL ($p < 0,001$).

Figura 20: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a concentração do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na ferida excisional de ratos 7 dias após a confecção da ferida.

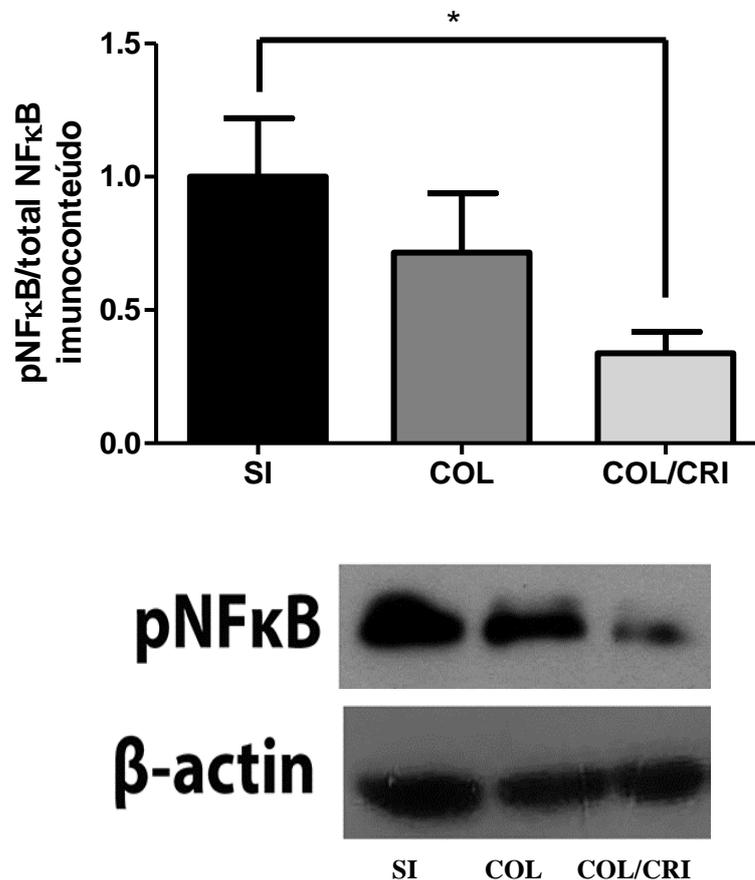


SI: Animais isentos de tratamento (n = 3/grupo); COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura (n = 3/grupo); COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (n = 3/grupo). Os animais foram tratados após a lesão cirúrgica e avaliados 7 dias após a confecção da ferida aberta. Os valores estão representados pela média ± E.P.M. ** p<0,01 quando comparado ao grupo SI; ### p<0,001 quando comparado ao grupo COL. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.6 Efeito da COL/CRI sobre os Níveis de NFκB

Na análise do imunocontéudo do fator de transcrição nuclear kappa (NFκB), o grupo COL/CRI, apresentou uma redução significativa (p <0,05) no nível desta proteína nas feridas excisionais abertas, 7 dias após a sua confecção, quando comparado ao grupo SI (Figura 21), sem apresentar diferença estatística quando comparado ao grupo COL.

Figura 21: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre a concentração do fator de transcrição nuclear kappa (NFκB) na ferida excisional de ratos 7 dias após a confecção da ferida.



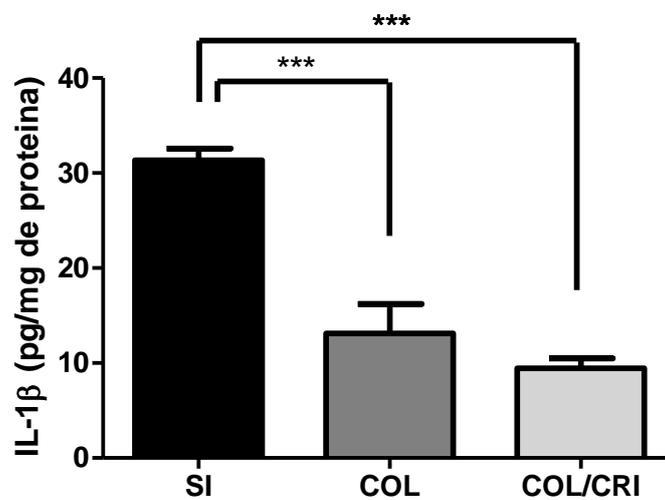
SI: Animais isentos de tratamento (n = 3/grupo); COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura (n = 4/grupo); COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (n = 6/grupo). Os animais foram tratados após a lesão cirúrgica e avaliados 7 dias após a confecção da ferida aberta. Os valores estão representados pela média ± E.P.M. * p<0,05 quando comparado ao grupo SI. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey.

5.7 Efeito da COL/CRI sobre os Níveis de Citocinas Inflamatórias

No 7º dia pós-cirúrgico, citocinas pró-inflamatórias foram dosadas na ferida dos animais não tratados (SI) e tratados (COL e COL/CRI). Os resultados mostraram que os animais tratados com COL/CRI apresentaram uma diminuição significativa (p<0,001) no

nível de IL - 1 β quando comparados ao grupo SI, sem apresentar diferença significativa quando comparado ao grupo COL (Figura 22). Porém, o grupo COL quando comparado ao grupo SI também apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,001$) no nível dessa citocina.

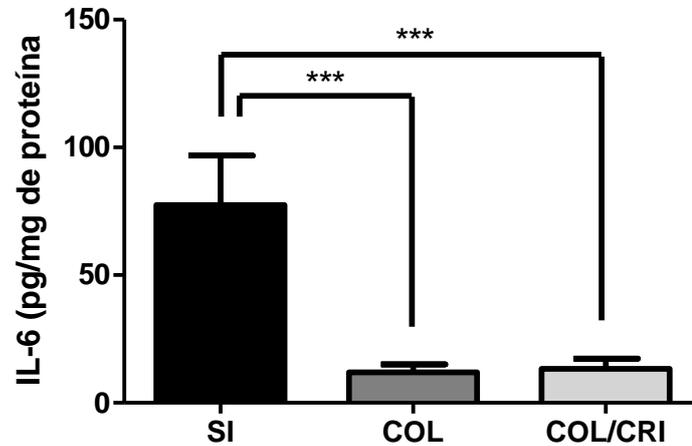
Figura 22: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o nível de interleucina 1- β (IL- 1 β) na ferida excisional de camundongos 7 dias após a confecção da ferida.



SI: Grupo de camundongos isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Camundongos foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 7 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados pela média \pm E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($n = 6/\text{grupo}$). *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SI.

Em relação a IL-6, animais tratados com COL/CRI apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo SI, sem apresentar diferença significativa quando comparado ao grupo COL (Figura 23). Já, o grupo COL quando comparado ao grupo SI também apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,001$) no nível dessa citocina.

Figura 23: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o nível de interleucina 6 (IL-6) na ferida excisional de camundongos 7 dias após a confecção da ferida.

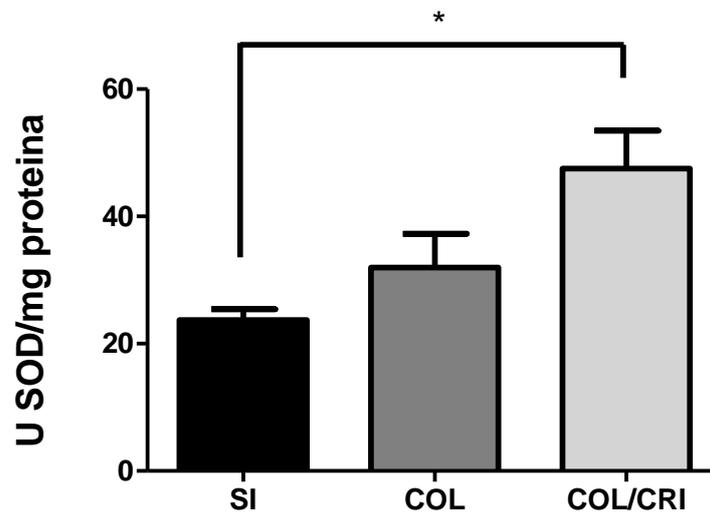


SI: Grupo de camundongos isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Camundongos foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 7 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados pela média \pm E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($n = 6/\text{grupo}$). *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SI.

5.8 Efeito Antioxidante da COL/CRI

No 7º dia pós-lesão, enzimas antioxidantes foram dosadas na ferida excisional dos animais de todos os grupos experimentais. Os resultados mostraram que os animais tratados com COL/CRI apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no nível da SOD quando comparados ao grupo SI, sem apresentar diferença significativa quando comparado ao grupo COL (Figura 24).

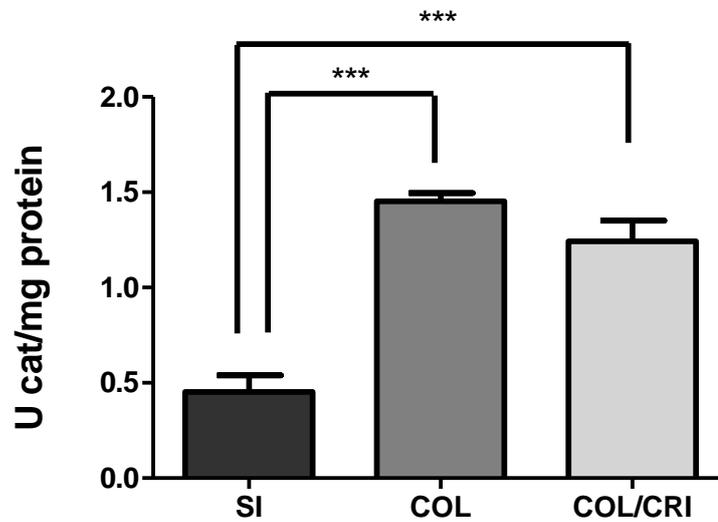
Figura 24: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) na ferida excisional de ratos 7 dias após a confecção da ferida.



SI: Grupo de camundongos isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Camundongos foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 7 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados pela média \pm E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($n = 6/\text{grupo}$). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo SI.

Em relação à catalase (CAT), os animais tratados com COL/CRI apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo SI, sem apresentar diferença significativa quando comparado ao grupo COL (Figura 25). Já, o grupo COL quando comparado ao grupo SI também apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,001$) no nível dessa enzima antioxidante.

Figura 25: Efeito das membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas (COL/CRI) sobre o atividade enzimática da catalase (CAT) na ferida excisional de ratos 7 dias após a confecção da ferida.



SI: Grupo de camundongos isentos de tratamento; COL: Animais tratados com membrana de colágeno pura; COL/CRI: Animais tratados com membranas bioativas de colágeno contendo crisina em lipossomas. Camundongos foram tratados imediatamente após a lesão cirúrgica e avaliados 7 dias após a confecção da ferida cutânea aberta. Os valores estão representados pela média \pm E.P.M. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($n = 6/\text{grupo}$). *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo SI.

6 DISCUSSÃO

O processo de cicatrização de feridas tem início logo após a lesão tecidual, envolvendo fenômenos biológicos, químicos e fisiológicos, que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (ALIASL et al., 2015). Os avanços na compreensão da base molecular e celular que compõem esse processo têm auxiliado na busca por alternativas terapêuticas e métodos profiláticos que visem acelerar o processo de reparo, contribuindo para o restabelecimento da homeostasia do organismo e redução de possíveis complicações (SUN; SIPRASHVILI; KHAVARI, 2014).

A procura de novos tratamentos que acelerem o fechamento das feridas tem sido alvo constante de várias pesquisas (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009; DAS; BAKER, 2016; THAKUR et al., 2011). Dentre as inúmeras propriedades biológicas que a crisina possui tais como: atividade anti-inflamatória, antioxidante, antialérgica, optou-se por incorporar esse flavonoide a uma formulação contendo colágeno em lipossomas, visando diminuir os obstáculos da crisina devido a sua baixa solubilidade em água e baixa estabilidade físico-química *in vivo*. Os lipossomas são estruturas vesiculares com elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade, que permitem a incorporação de várias moléculas apolares, com liberação lenta, sustentada e controlada da droga, reduzindo sua degradação de forma a aumentar a biodisponibilidade e propiciar sua administração (BOZZUTO; MOLINARI, 2015; DIMER et al., 2013).

A fim de mensurar o percentual de encapsulação do princípio ativo na formulação, as membranas contendo crisina apresentaram uma EE de 87,82%, demonstrando que a mesma foi praticamente toda incorporada nas membranas contendo colágeno e lipossomas. Esse resultado corrobora com vários estudos que avaliaram a incorporação de fármacos em lipossomas e demonstraram ótimos resultados quanto à EE, estando esse percentual entre 70%-98% (BOZZUTO; MOLINARI, 2015; LI et al., 2016; LUO et al., 2016).

Após a análise da EE, o colágeno e a crisina incorporada em lipossomas mostraram-se substâncias adequadas para a produção de membranas biodegradáveis, uma vez que, o colágeno é um biopolímero natural, dinâmico e flexível, sendo altamente biodegradável e biocompatível com a adição de agentes plastificantes e a fosfatidilcolina, fosfolípido utilizado para a produção dos lipossomas (MANO et al., 2007). Nesse contexto, são considerados versáteis para pesquisa e práticas terapêuticas (BATISTA; CARVALHO; MAGALHÃES, 2007; ZUBER et al., 2015). Diante disso, as membranas COL/CRI apresentaram características macroscópicas homogêneas e deposição aparentemente uniforme

do fármaco na formulação. Nunes *et al.* (2011), demonstraram que membranas de colágeno contendo lipossoma e ácido úsnico foram eficazes no processo de cicatrização de feridas, evidenciando o efeito dessa formulação farmacêutica na modulação de alguns eventos biológicos, tais como redução da reposta inflamatória e o aumento das taxas de epitelização observados nos animais tratados (NUNES *et al.*, 2011).

O modelo adotado para esse estudo é utilizado para diversos propósitos, principalmente os que envolvem regeneração tecidual. O mesmo atendeu as necessidades propostas e os animais utilizados por serem de pequeno porte permitiram o fácil manejo e manipulação (GUIMARÃES; MÁZARO, 2004). É importante observar que nosso conhecimento atual sobre o reparo da pele e a arquitetura celular, os estudos envolvendo cicatrização de feridas foi amplamente derivado do uso de modelos construídos cirurgicamente de lesões na pele de roedores (ARUL *et al.*, 2012; BARRETO *et al.*, 2013b).

Primeiramente, avaliou-se a capacidade da crisina em acelerar o processo de contração da lesão. A contração da ferida é um componente importante do processo de reparo cutâneo que acontece através do movimento centrípeto da cicatrização das bordas lesionadas, junto com a ação dos filamentos de actina e do remodelamento das fibras de colágeno e dos miofibroblastos, podendo ser avaliado periodicamente pela mensuração da área da lesão (UPADHYAY *et al.*, 2013).

Nesse estudo, as lesões foram realizadas no dorso do animal por ser considerada uma região que evita o autocanibalismo e a irritação por contato com as fezes e saliva do animal (FERREIRA *et al.*, 2008; KASHYAP *et al.*, 1995). Ao avaliarmos a área de redução das lesões, pôde-se observar que o tratamento com COL/CRI acelerou o processo de contração da ferida quando comparado ao grupo SI no 3º dia de tratamento. Entre o 2º e o 3º dia, é esperada uma queda acentuada na área das feridas, sendo essa diminuição associada a um encolhimento visível da ferida, com a presença de uma fina crosta sobre o leito que tende a engrossar durante o decorrer do tratamento (CROSS *et al.*, 1995). No entanto, surpreendentemente o grupo COL/CRI mostrou uma redução significativa na área residual das feridas, dado que pode ser atribuído a redução do edema e da migração leucocitária apresentados nesse grupo, além dos efeitos anti-inflamatórios da crisina já descritos na literatura (BAE; LEE; KIM, 2011; MANI; NATESAN, 2018; YANG *et al.*, 2014).

Nas primeiras horas após a lesão, a resposta inflamatória inicial sinaliza respostas de defesa locais e sistêmicas no local da ferida, levando à ativação imediata da cascata de coagulação, que, através da montagem de um coágulo de fibrina, assegura a hemostasia e

fornece a arquitetura básica da matriz para iniciar a invasão e o recrutamento de células inflamatórias (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

Com base na composição histológica das feridas, as fotomicrografias representativas de cada grupo, evidenciaram a composição celular e a reestruturação da pele lesionada. No 3º dia, a resposta inflamatória aguda observada nos três grupos foi absolutamente esperada, visto que, imediatamente após uma lesão, há uma abundante migração de neutrófilos e macrófagos para a área lesada no intuito de prevenir a entrada e propagação de microorganismos (UPADHYAY et al., 2013).

Em todos os grupos foi possível observar um infiltrado expressivo de células polimorfonucleares como neutrófilos e mononucleares como macrófagos, além de um epitélio em processo de cicatrização com início de uma neovascularização e intensa migração de adipócitos, principalmente no grupo SI. Os adipócitos são conhecidos por produzirem citocinas, quimiocinas e fatores hormonais relacionados com a inflamação, principalmente na sua fase aguda. Fonte imediata de marcadores inflamatórios, a produção aumentada da massa adiposa branca (adipócitos) está intimamente relacionada com o aumento circulante desses marcadores, o que corrobora com os achados histológicos do grupo SI no 3º dia pós- cirúrgico (CALABRO; YEH, 2007; JUGE-AUBRY; HENRICHOT; MEIER, 2005). À medida que a cicatrização continua, as células polimorfonucleares são gradualmente substituídas por células mononucleares em um processo ascendente (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

No 7º dia pós-lesão, os animais tratados com COL/CRI demonstraram taxas de contração maiores quando comparado aos grupos SI e COL. Esse dado é relevante, pois sugere que o tratamento com crisina acelerou o processo de cicatrização favorecendo a diferenciação de miofibroblastos e conseqüentemente uma maior aproximação das bordas da ferida.

Na avaliação da reação inflamatória, no 7º dia pós-cirúrgico, as células polimorfonucleares e mononucleares na camada superficial da derme nos grupos SI e COL ainda estavam acentuadas, enquanto que no grupo COL/CRI se apresentaram moderadas, facilitando a instalação da fase inflamatória crônica com a sobreposição da fase inflamatória com a fase proliferativa. Estudos envolvendo a crisina mostraram efeitos antibacterianos, antimicrobianos, antioxidantes e anti-inflamatórios em modelos experimentais de lesões cutâneas. Esses achados podem estar relacionados aos efeitos imunomoduladores da crisina, como redução da sinalização quimiotática e eliminação de patógenos associada à fagocitose das células neutrofílicas na área lesada, que conseqüentemente melhoram o processo de

cicatrização (BAE; LEE; KIM, 2011; PUSHPAVALLI et al., 2010; SURESH BABU et al., 2006; ZHU et al., 2016).

No grupo COL/CRI foi possível observar um tecido de granulação exuberante com a presença de células fusiformes, rede de vasos sanguíneos e consequente deposição de fibras colágenas mais espessas quando comparado aos grupos SI e COL. Esses dados demonstram uma aceleração do processo cicatricial, pois a vascularização local permite a nutrição, oxigenação e proliferação celular dos tecidos em crescimento, tornando-os essenciais para uma adequada cicatrização (BROEKMAN et al., 2016). Nesse mesmo grupo, o avanço da reparação tecidual e o índice de epitelização foram maiores quando comparado aos grupos SI e COL, sugerindo que a crisina apresenta capacidade de reparação gradual do tecido epitelial estimulando a migração de queratinócitos. Essa hipótese é reforçada com a pesquisa de Panobianco *et al.* (2010), na qual demonstrou que a diminuição da área da lesão aliada ao aumento das taxas de epitelização são capazes de estimular a proliferação de queratinócitos epidérmicos presentes no local da lesão, fato que caracteriza a cicatrização adequada por segunda intenção (PANOBIANCO et al., 2010).

Entre o 14º e 21º dia pós-lesão, verificou-se que os animais do grupo COL/CRI apresentaram índices de contração das feridas similares quando comparado aos grupos SI e COL, o que já era esperado, visto que, após esse período a área da ferida se aproxima de zero, ficando difícil de mensurar, uma vez que esse é o estágio final da cicatrização (CROSS et al., 1995). Uma limitação encontrada ao final dos experimentos foi a falta de mensuração no tempo exato de fechamento das feridas de cada grupo, que poderia mostrar a diferença no tempo necessário para cicatrização pelos diferentes tratamentos.

Na análise histológica, ao 14º dia pós-cirúrgico, notou-se uma redução da reação inflamatória das células polimorfonucleares em todos os grupos, principalmente nos animais tratados com COL/CRI que apresentaram um perfil inflamatório crônico inespecífico. Surpreendentemente, esses resultados mostraram que o grupo tratado com crisina já encontrava-se no final da fase proliferativa com consequente avanço para a fase de remodelação, fato não observado nos grupos SI e COL.

Quando comparado aos grupos SI e COL, no 14º dia, o grupo tratado com crisina apresentou um processo de cicatrização mais evoluído, devido à presença de fibroblastos fusiformes e uma derme mais espessa. No grupo SI, a presença de uma intensa neovascularização pode ser explicada pela permanência desses animais na fase de proliferação quando comparado aos demais grupos. Finalmente, no 21º dia, a resposta inflamatória foi leve

ou ausente em todos os grupos. Especialmente nos animais tratados com crisina, notou-se a presença de folículos pilosos bem formados, glândulas sebáceas na cicatriz, proliferação fibroblástica bem acentuada, além de fibras colágenas bem entrelaçadas com aspecto da derme não lesada, indicando um avanço da fase de proliferação.

No processo de epitelização, os anexos epiteliais estimulados pela liberação dos fatores de crescimento e a migração dos queratinócitos da ferida são os principais responsáveis pelo reparo tecidual. Nesta etapa, os fibroblastos migram para a matriz provisória para degradá-la, proliferando e produzindo MMPs, posteriormente, o colágeno e a fibronectina também são produzidos para formar tecido de granulação, que têm como objetivo preencher o espaço da ferida e fornecer um suporte para adesão, migração, crescimento e diferenciação celular durante o reparo da lesão (PASTAR et al., 2014; TAKEO; LEE; ITO, 2015).

Durante todo período experimental, todos os grupos demonstraram uma melhora na taxa de epitelização, embora no 3º e 7º dia os animais tratados com crisina mostraram uma melhora bastante significativa, sugerindo que o tratamento com COL/CRI foi capaz de acelerar a migração de queratinócitos a partir das bordas das feridas. Esse resultado pode estar relacionado ao efeito da crisina sobre os níveis do TNF – α , uma importante citocina pró-inflamatória que é produzida pela ativação de vários tipos de células, como macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas. A produção dessa citocina ocorre rapidamente após o trauma, sendo importante na expressão de moléculas de adesão, o que contribui para o recrutamento de fagócitos na área da lesão. Portanto, esse achado está de acordo com relatos da literatura que mostram o acentuado potencial anti-inflamatório da crisina, como por exemplo, pela redução dos níveis de TNF – α , o que pode corroborar com os resultados do índice de epitelização no 3º e 7º dia pós-lesão (MANI; NATESAN, 2018; ZEINALI; REZAAE; HOSSEINZADEH, 2017).

Já no 14º e 21º dias, as taxas do índice de epitelização se mantiveram estabilizadas entre os diferentes grupos, o que já era esperado, pois nessa fase as feridas encontram-se no fim da fase proliferativa e início da fase de remodelação onde também observam-se macroscopicamente uma redução total na área de redução e contração das feridas.

Para avaliar o efeito da membrana de COL/CRI sobre o desenvolvimento vascular tecidual, mensuramos os níveis do fator de crescimento endotelial (VEGF) no 7º dia e os resultados mostraram um aumento significativo no imunoconteúdo de VEGF no tecido de granulação da ferida residual quando comparado aos grupos SI e COL. Reconhecida como

uma glicoproteína dimérica e extremamente importante na angiogênese (formação de novos vasos a partir de preexistentes), o VEGF pode ser expresso por vários tipos celulares, como tecido endotelial, músculos lisos e esqueléticos, plaquetas e fibroblastos (SEITZ et al., 2012).

Na cicatrização, a expressão desta glicoproteína têm o seu pico expresso em torno do 2º ao 3º dia nas bordas das feridas, mantendo sua expressão até o 7º dia após o procedimento cirúrgico (JOHNSON; WILGUS, 2014). Estudos realizados em modelos animais de feridas cutâneas mostraram que a aceleração do processo de cicatrização de feridas crônicas, está ligada com a ativação da via relacionada ao VEGF (BREM et al., 2009; CHEN et al., 2019; GALEANO et al., 2003). Nesse contexto, podemos inferir que o aumento da concentração de VEGF produzido pelo tratamento com COL/CRI desempenhou um papel importante no processo de cicatrização, induzindo o processo de angiogênese, ao aumentar a permeabilidade vascular proporcionando um maior aporte de nutrientes e oxigênio para o tecido em crescimento.

O processo de cicatrização é regulado por um grande número de citocinas e fatores de crescimento, que atuam como importantes mediadores da diferenciação, proliferação e manutenção de células envolvidas no processo de reparo através de vários mecanismos como a via do NFkB (FENG et al., 2016). Formado por subunidades citoplasmáticas que se encontram na forma inativa, o NFkB está envolvido no controle de um grande número de processos biológicos, como respostas inflamatórias, imunológicas e doenças fibróticas (ISHISE et al., 2015). Quando ativado, transloca (forma fosforilada) para o núcleo e liga-se a região dos genes que expressam citocinas (TNF- α e IL-1 β) e enzimas oxidantes (gene ARE) (MESSADI et al., 2004; TABARY et al., 2006).

A produção dos mediadores inflamatórios é finamente regulada por várias vias, para avaliar se a ativação/inibição de fatores de transcrição como o NFkB está relacionado com essa regulação, medimos seus níveis e os resultados mostraram uma diminuição significativa da ativação do NFkB, representada por uma diminuição da sua razão fosforilada total quando comparado ao grupo SI. De fato, esse achado corrobora com outro estudo que avaliou o efeito da atividade anti-inflamatória da crisina na supressão do NFkB em modelo experimental de lesão cutânea crônica, o que possivelmente pode ter contribuído para o processo de proliferação de fibroblastos, migração de queratinócitos e deposição das fibras colágenas, confirmando os resultados obtidos no presente estudo e demonstrando, mais uma vez, a participação da crisina no processo de cicatrização (CHEN et al., 2019).

Posteriormente, visando estabelecer se a melhora da cicatrização das feridas estava relacionada com uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, foram analisados os níveis de IL-1 β e IL-6 no tecido de granulação no 7º dia após o procedimento cirúrgico. Os resultados do presente trabalho mostraram que tratamento com COL/CRI atenuou os níveis dessas citocinas no sítio da lesão quando comparado ao grupo SI. No grupo COL, uma das hipóteses para a manutenção do perfil inflamatório das citocinas nesses animais tratados sem a crisina, talvez esteja no fato que embora o colágeno não apresente uma atividade anti-inflamatória, biomateriais à base de colágeno possuem várias atividades biológicas, tais como antibacteriana, anti-fibrótica e cicatrizante (ARUL et al., 2012; MANIZATE et al., 2012; WISE et al., 2016).

A IL-1 β e IL-6 são citocinas pró-inflamatórias produzidas pela ativação de vários tipos de células, como macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas. Sua produção ocorre rapidamente após o trauma, sendo importantes na expressão de moléculas de adesão, fato que contribui para o recrutamento de fagócitos na área da lesão, entretanto, a produção em excesso de citocinas inflamatórias pode inibir a resolução da inflamação, induzindo danos indesejados ao tecido (SERRA et al., 2017; YIN et al., 2018).

Um estudo realizado por Mohammadi *et al.* (2017) em modelo animal de lesão cutânea aberta, avaliou as características biológicas do tratamento tópico com crisina nas concentrações de 5%, 10% e 20% no processo de reparação tecidual. Os resultados demonstraram que o grupo tratado com crisina a 20% foi capaz de atenuar os níveis da IL-6 quando comparado aos grupos tratados com as doses de 5% e 10%, sugerindo que a crisina apresenta um efeito anti-inflamatório no processo de cicatrização de feridas (MOHAMMADI et al., 2017). Esses achados estão de acordo com outros estudos na literatura que mostram um potencial elevado da crisina como um potente anti-inflamatório ao reduzir os níveis dessa citocina (MANI; NATESAN, 2018; XUE et al., 2016; ZEINALI; REZAEI; HOSSEINZADEH, 2017).

Nesse estudo os animais tratados com COL/CRI apresentaram uma diminuição significativa na expressão dos níveis de IL-1 β e IL-6, o que refletiu no efeito anti-inflamatório da crisina realizado no modelo de lesão cutânea aberta em roedores. Então, pode-se inferir que as alterações nos níveis dessas citocinas observado nos animais tratados com COL/CRI podem estar envolvidas com o reparo tecidual, auxiliando e promovendo a instalação das fases subsequentes.

Romier *et al.* (2008) por meio de estudos *in vitro* utilizando células intestinais humanas Caco-2, provaram a eficácia da crisina na diminuição nos níveis de NFkB. O tratamento com a crisina foi capaz de inibir a atividade de NFkB como também atenuou fortemente a fosforilação de Ikb-a induzida por IL-1 β . Logo, os resultados indicam que o NFkB desempenha um papel central no desenvolvimento da inflamação através de genes que codificam IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 (ROMIER *et al.*, 2008). Dessa forma, podemos sugerir que o efeito inibitório da crisina nas citocinas pró-inflamatórias mensuradas nesse estudo pode ter sido mediado pela via do NFkB, que também demonstrou uma diminuição significativa nos animais tratados com COL/CRI.

O processo de cicatrização de feridas também é regulado por várias enzimas antioxidantes que estão envolvidas no reparo tecidual através de vários mecanismos. O equilíbrio homeostático entre as enzimas antioxidantes e as EROS é crucial nos mecanismos de defesa da pele para o avanço no processo de cicatrização de feridas (BICKERS; ATHAR, 2006; SOUZA *et al.*, 2015). Dentre as diversas enzimas antioxidantes, SOD e CAT são importantes na defesa antioxidante, sendo capazes de manter um equilíbrio nos níveis das EROS (ASONG *et al.*, 2019). Para avaliar o efeito da COL/CRI sobre a manutenção do perfil redox, mensuramos os níveis de SOD e CAT no 7º dia pós-lesão e os resultados mostraram que o tratamento com a crisina foi capaz de elevar significativamente os seus níveis o que pode estar relacionada com a diminuição da geração de EROS e conseqüentemente dos danos oxidativos sobre a ferida excisional desses animais.

Esses achados corroboram com outro estudo que avaliou o efeito da crisina na atenuação do perfil redox em modelo de hepatite induzida por D-galactosamina. Nesse estudo, o tratamento com a crisina foi capaz de elevar os níveis da SOD e CAT, o que possivelmente pode estar relacionado com uma notável ação antioxidante desse flavonoide (PUSHPAVALLI *et al.*, 2010). Outro estudo realizado por Souza *et al.* (2015), avaliaram o efeito antioxidante da crisina nos marcadores de estresse oxidativo em modelo de envelhecimento utilizando ratos machos e os resultados mostraram que o tratamento por via oral com a crisina foi capaz de aumentar os níveis da SOD e CAT atenuando o estresse oxidativo no cérebro dos animais (SOUZA *et al.*, 2015). Dessa forma, podemos inferir que o aumento dessas enzimas no nosso estudo pode estar relacionado com o avanço do processo cicatricial nos animais tratados com crisina através dos resultados da análise macroscópica e histológica no 7º dia pós-cirúrgico.

Diante de todos os resultados apresentados e discutidos, o tratamento com COL/CRI se destacou como um biomaterial que pode ser utilizado como uma alternativa tecnológica através de coberturas na cicatrização de feridas por segunda intenção. Seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, angiogênicos e cicatrizantes somados as propriedades terapêuticas do colágeno, tornam essas membranas um produto viável para o tratamento de lesões, entretanto, estudos posteriores ainda são necessários para assegurar a eficácia e segurança deste produto para tratamento de feridas em humanos

7 CONCLUSÃO

Diante dos dados observados na nossa pesquisa acerca do efeito da membrana COL/CRI sobre a cicatrização de feridas cutâneas excisionais em roedores, pode-se concluir:

- É um produto obtido a partir de biomateriais e com base nanotecnológica promissora para o tratamento de feridas;
- A crisina foi incorporada de maneira efetiva nas membranas, com EE de 87,82%, confirmando que o método de obtenção das membranas é eficaz;
- Acelerou a redução da área residual das feridas em 3 e 7 dias;
- Melhorou a evolução do processo inflamatório evidenciado pelo predomínio de células mononucleares, como os linfócitos, maturação do tecido de granulação, proliferação de fibroblastos, migração de queratinócitos e deposição de fibras colágenas já no 7º dia pós-excisão;
- Elevou os níveis de VEGF, garantindo uma melhor cicatrização através de eventos como a quimiotaxia de células inflamatórias, vasodilatação e angiogênese;
- Diminuiu os níveis de NFkB fosforilado, sugerindo uma potente atividade anti-inflamatória;
- Diminuiu os níveis das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-6 na ferida residual no 7º dia pós-excisão;
- Elevou os níveis de SOD e CAT no 7º dia pós-lesão, sugerindo um efeito antioxidante;
- Promoveu de forma eficaz uma melhora da cicatrização de feridas cutâneas abertas em modelo animal.

Através dos resultados descritos neste estudo para a crisina, como seu efeito anti-inflamatório, antioxidante e cicatrizante, podemos inferir que o tratamento com COL/CRI foi capaz de diminuir a reação inflamatória no local da lesão e aumentar a vascularização, além de acelerar a reepitelização das bordas para o centro da ferida, otimizando o processo de cicatrização no modelo de lesão cutânea aberta em roedores.

Diante disso, esses achados sugerem a eficiência das COL/CRI como um produto inovador e com grande potencial para o tratamento de feridas, através do seu papel em acelerar eventos biológicos essenciais para um adequado reparo cicatricial.

PERSPECTIVA

Outros estudos são necessários visando elucidar os mecanismos farmacológicos envolvidos nos efeitos da crisina. Diante disso as próximas etapas devem realizar a caracterização físico-química das membranas e investigar a ação das COL/CRI na expressão das mieloperoxidases, atividade das ERK, p38 e MAPK. Ademais, avaliar o estresse oxidativo, a participação de miofibroblastos, mediadores pró-inflamatórios (TNF- α e COX-2), fibras de colágeno (coloração em picrossirius) envolvidas no reparo tecidual, como também realizar novos testes em animais de maior porte (suínos) para que seja possível translacionar esse estudo para a etapa clínica, seguindo todos os parâmetros descritos na RDC-17 de 24/02/00 e RDC-48 de 16/03/04 da ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária).

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, T.; NEWTON, H. Wound dressings: principles and practice. **Surgery (Oxford)**, Wound Management. v. 29, n. 10, p. 491–495, 1 out. 2011.
- ABDEL-SAYED, P. et al. Evolution of Biological Bandages as First Cover for Burn Patients. **Advances in Wound Care**, v. 8, n. 11, p. 555–564, 1 nov. 2019.
- ADAIR, J. H. et al. Nanoparticulate Alternatives for Drug Delivery. **ACS Nano**, v. 4, n. 9, p. 4967–4970, 28 set. 2010.
- AGRA, I. K. R. et al. Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of aqueous extract from *Bowdichia virgilioides* stem barks in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 3, p. 945–954, set. 2013.
- ALBUQUERQUE, E. R.; ALVES, E. F. Análise da Produção Bibliográfica sobre Qualidade de Vida de Portadores de Feridas Crônicas. **Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, 22 set. 2010.
- 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.
- AL-HADA, N. M. et al. The Impact of Polyvinylpyrrolidone on Properties of Cadmium Oxide Semiconductor Nanoparticles Manufactured by Heat Treatment Technique. **Polymers**, v. 8, n. 4, 8 abr. 2016.
- ALIASL, J. et al. Effect of *Arnebia euchroma* ointment on post-laser wound healing in rats. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy: Official Publication of the European Society for Laser Dermatology**, v. 17, n. 1, p. 41–45, fev. 2015.
- AMAWI, H.; ASHBY, C. R.; TIWARI, A. K. Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what's limiting? **Chinese Journal of Cancer**, v. 36, 19 jun. 2017.
- AMINZADEH, M. A. et al. Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy. **Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 28, n. 8, p. 2038–2045, ago. 2013.
- AMORIM, E. et al. Efeito do uso tópico do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu) na cicatrização de feridas cutâneas: estudo controlado em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, p. 67–76, 2006.
- ANAND, K. V. et al. Protective role of chrysin against oxidative stress in d-galactose-induced aging in an experimental rat model. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 12, n. 4, p. 741–750, out. 2012.
- ANOWER, A. K. M. M. et al. The role of classical and alternative macrophages in the immunopathogenesis of herpes simplex virus-induced inflammation in a mouse model. **Journal of Dermatological Science**, v. 73, n. 3, p. 198–208, mar. 2014.

ARASTEH, S. et al. Efficient Wound Healing Using a Synthetic Nanofibrous Bilayer Skin Substitute in Murine Model. **Journal of Surgical Research**, v. 245, p. 31–44, jul. 2019.

ARAÚJO-FILHO, H. G. et al. Phytochemical screening and analgesic profile of the lyophilized aqueous extract obtained from *Chrysobalanus icaco* leaves in experimental protocols. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3055–3062, dez. 2016.

ARAVINTHAN, A. et al. Collagen-based sponge hastens wound healing via decrease of inflammatory cytokines. **3 Biotech**, v. 8, n. 12, p. 487, dez. 2018.

ARKHIPOV, S. A. et al. In vitro study of phenotypical characteristics of BCG granuloma macrophages over the course of granuloma development. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 155, n. 5, p. 655–658, set. 2013.

ARUL, V. et al. Glucose oxidase incorporated collagen matrices for dermal wound repair in diabetic rat models: a biochemical study. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 26, n. 8, p. 917–938, maio 2012.

ARWERT, E. N.; HOSTE, E.; WATT, F. M. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 12, n. 3, p. 170–180, 24 fev. 2012.

ASONG, J. A. et al. Antimicrobial Activity, Antioxidant Potential, Cytotoxicity and Phytochemical Profiling of Four Plants Locally Used against Skin Diseases. **Plants**, v. 8, n. 9, 15 set. 2019.

ATKIN, L. Chronic wounds: the challenges of appropriate management. **British Journal of Community Nursing**, v. 24, n. Sup9, p. S26–S32, 1 set. 2019.

ATTINGER, C. E. et al. Clinical approach to wounds: débridement and wound bed preparation including the use of dressings and wound-healing adjuvants. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7 Suppl, p. 72S-109S, jun. 2006.

BAE, Y.; LEE, S.; KIM, S.-H. Chrysin Suppresses Mast Cell-Mediated Allergic Inflammation: Involvement of Calcium, Caspase-1 and Nuclear Factor-Kb. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, n. 1, p. 56–64, 1 jul. 2011.

BAKER, P. J.; NUMATA, K. Polymerization of Peptide Polymers for Biomaterial Applications. **Polymer Science**, 23 jan. 2013.

BALSA, I. M.; CUSI, W. T. N. Wound Care. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 45, n. 5, p. 1049–1065, set. 2015.

BARRETO, R. S. et al. Improvement of wound tissue repair by chitosan films containing (-)-borneol, a bicyclic monoterpene alcohol, in rats: Improvement of wound tissue repair by chitosan films containing (-)-borneol. **International Wound Journal**, v. 13, n. 5, p. 799–808, out. 2016.

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. 2013a.

- 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, abr. 2013b.
- BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B. DE; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167–179, jun. 2007.
- 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, maio 2012.
- BEN DJEMAA, F. G. et al. Antioxidant and wound healing activity of *Lavandula aspic* L. ointment. **Journal of Tissue Viability**, v. 25, n. 4, p. 193–200, 1 nov. 2016.
- BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.-L. Macrophage polarization in bacterial infections. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 181, n. 6, p. 3733–3739, 15 set. 2008.
- BERGMEIER, V. et al. Identification of a myofibroblast-specific expression signature in skin wounds. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 65, p. 59–74, 2018.
- BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 12, p. 2565–2575, dez. 2006.
- BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet α IIb β 3-granules: basic biology and clinical correlates. **Blood Reviews**, v. 23, n. 4, p. 177–189, jul. 2009.
- BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Stem cell plasticity. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. **Science (New York, N.Y.)**, v. 344, n. 6189, p. 1242281, 13 jun. 2014.
- BORGES, E. L. **Feridas: úlceras de membros inferiores**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2012. v. 1
- BORGES, E. L.; CALIRI, M. H. L.; HAAS, V. J. Revisão sistemática do tratamento tópico da úlcera venosa. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 15, n. 6, p. 1163–1170, dez. 2007.
- BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975–999, 2015.
- 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.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 60 p.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 92 p.

- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, nov. 1998.
- BREM, H. et al. Mechanism of sustained release of vascular endothelial growth factor in accelerating experimental diabetic healing. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 9, p. 2275–2287, set. 2009.
- BROEKMAN, W. et al. TNF- α and IL-1 β -activated human mesenchymal stromal cells increase airway epithelial wound healing in vitro via activation of the epidermal growth factor receptor. **Respiratory Research**, v. 17, 2016.
- CALABRO, P.; YEH, E. T. Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 42, p. 63–91, 2007.
- ÇALAMAK, S. et al. Silk fibroin based antibacterial bionanotextiles as wound dressing materials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 43, p. 11–20, 1 out. 2014.
- CALEY, M. P.; MARTINS, V. L. C.; O'TOOLE, E. A. Metalloproteinases and Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 4, p. 225–234, 1 abr. 2015.
- CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L. C. U. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 1
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99–105, fev. 1998.
- CHADHA, R. et al. Chrysin cocrystals: Characterization and evaluation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 134, p. 361–371, 5 fev. 2017.
- CHEN, D. et al. Structure-proteasome-inhibitory activity relationships of dietary flavonoids in human cancer cells. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v. 12, p. 1935–1945, 1 jan. 2007.
- CHEN, R.-F. et al. Modulation of vascular endothelial growth factor and mitogen-activated protein kinase-related pathway involved in extracorporeal shockwave therapy accelerate diabetic wound healing. **Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 27, n. 1, p. 69–79, 2019.
- CHEN, Z. et al. Metabolism of flavonoids in human: a comprehensive review. **Current Drug Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 48–61, jan. 2014.
- CHHABRA, S. et al. Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS. **Journal of Maxillofacial & Oral Surgery**, v. 16, n. 4, p. 403–423, dez. 2017.
- CHOI, J. K. et al. Chrysin attenuates atopic dermatitis by suppressing inflammation of keratinocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, p. 142–150, dez. 2017.
- CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, n. 6, p. 749–762, 15 mar. 2010.

- CLARK, R. The molecular and cellular biology of wound healing. In: **New York: Premium**. [s.l: s.n.]. p. 611.
- COSTA, V. P.; MAYWORM, M. A. S. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes - município de Extrema, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 3, p. 282–292, 2011.
- COUTURAUD, V. Biophysical Characteristics of the Skin in Relation to Race, Sex, Age and Site. In: **Handbook of Cosmetic Science and Technology, Third Edition**. [s.l: s.n.]. p. 5–24.
- CROSS, S. E. et al. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 48, n. 4, p. 189–197, 1995.
- DAL-PIZZOL, F. et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in retinol treated Sertoli cells. **Free Radical Research**, v. 35, n. 6, p. 749–755, dez. 2001.
- DAS, S.; BAKER, A. B. Biomaterials and Nanotherapeutics for Enhancing Skin Wound Healing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, 31 out. 2016.
- DAS, U.; BEHERA, S. S.; PRAMANIK, K. Ethno-Herbal-Medico in Wound Repair: An Incisive Review. **Phytotherapy research: PTR**, v. 31, n. 4, p. 579–590, abr. 2017.
- DATTA, H. S.; MITRA, S. K.; PATWARDHAN, B. Wound healing activity of topical application forms based on ayurveda. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2011, p. 134378, 2011.
- DAVATGARAN-TAGHIPOUR, Y. et al. Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: experimental evidence and clinical perspective. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2689–2702, 4 abr. 2017.
- DE ALENCAR FONSECA SANTOS, J. et al. Effects of Low-Power Light Therapy on the Tissue Repair Process of Chronic Wounds in Diabetic Feet. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 36, n. 6, p. 298–304, jun. 2018.
- DE SOUZA, D. M. S. T.; DE GOUVEIA SANTOS, V. L. C. Incidence of pressure ulcers in the institutionalized elderly. **Journal of Wound, Ostomy, and Continence Nursing: Official Publication of The Wound, Ostomy and Continence Nurses Society**, v. 37, n. 3, p. 272–276, jun. 2010.
- DEMIDOVA-RICE, T. N.; HAMBLIN, M. R.; HERMAN, I. M. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. **Advances in skin & wound care**, v. 25, n. 7, p. 304–314, jul. 2012.
- DEVERAJ, C. **Efficacy Of Growth Factor Supplemented Fish (Catla Catla) Collagen For Augmenting Wound Healing In Cattle**. [s.l.] Tamil Nadu Veterinary and Animal Sciences University., 2014.
- DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. Wound dressings – a review. **BioMedicine**, v. 5, n. 4, 28 nov. 2015.

- DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337–353, 1999.
- DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v. 9, p. 283–289, 1 jan. 2004.
- DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013.
- DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, out. 2016.
- EDWARDS, R.; HARDING, K. G. Bacteria and wound healing. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 91–96, abr. 2004.
- ELSANA, H. et al. Evaluation of novel cationic gene based liposomes with cyclodextrin prepared by thin film hydration and microfluidic systems. **Scientific Reports**, v. 9, 22 out. 2019.
- EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 3, p. 514–525, mar. 2007.
- EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 265, p. 265sr6, 3 dez. 2014.
- FENG, Y. et al. Potential roles of suppressor of cytokine signaling in wound healing. **Regenerative Medicine**, v. 11, n. 2, p. 193–209, mar. 2016.
- FERREIRA, A. S. et al. Mensuração de área de cicatrização por planimetria após aplicação do ultra-som de baixa intensidade em pele de rato. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 12, n. 5, p. 351–358, out. 2008.
- FONDER, M. A. et al. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 2, p. 185–206, 1 fev. 2008.
- FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, p. 24, 1998.
- FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 9, p. 560–582, 17 jul. 2015.
- GALEANO, M. et al. Adeno-associated viral vector-mediated human vascular endothelial growth factor gene transfer stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. **Diabetologia**, v. 46, n. 4, p. 546–555, abr. 2003.
- GANESHKUMAR, M. et al. Topical application of *Acalypha indica* accelerates rat cutaneous wound healing by up-regulating the expression of Type I and III collagen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 14–22, 26 jun. 2012.

- GARTNER, L. P. **Tratado de Histologia Em Cores**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2007.
- GELAIN, D. P. et al. Extracellular inosine is modulated by H₂O₂ and protects sertoli cells against lipoperoxidation and cellular injury. **Free Radical Research**, v. 38, n. 1, p. 37–47, jan. 2004.
- GHICA, M. V. et al. Design and optimization of some collagen-minocycline based hydrogels potentially applicable for the treatment of cutaneous wound infections. **Pharmazie**, v. 66, n. 11, p. 853–861, 2011.
- GIRARDI, R. C. G. **Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato**. Mestrado em Bioengenharia—São Carlos: Universidade de São Paulo, 8 ago. 2005.
- GOES, A. T. R. et al. Protective role of chrysin on 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration a mouse model of Parkinson's disease: Involvement of neuroinflammation and neurotrophins. **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 111–120, 5 jan. 2018.
- GRESA-ARRIBAS, N. et al. Inhibition of CCAAT/enhancer binding protein δ expression by chrysin in microglial cells results in anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, n. 2, p. 526–536, out. 2010.
- GROEBER, F. et al. Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 4–5, p. 352–366, abr. 2011.
- GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS, J. S. S.; QUINTANS, L. J. Monoterpenes with analgesic activity--a systematic review. **Phytotherapy research: PTR**, v. 27, n. 1, p. 1–15, jan. 2013.
- GUIMARÃES, M.A; MÁZARO, R. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: Unifesp – Universidade Federal de São Paulo, 2004.
- GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219–229, mar. 2010.
- HA, S. K.; MOON, E.; KIM, S. Y. Chrysin suppresses SIS-stimulated proinflammatory responses by blocking NF- κ B and JNK activations in microglia cells. **Neuroscience Letters**, v. 485, n. 3, p. 143–147, nov. 2010.
- HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Advances in Therapy**, v. 34, n. 3, p. 599–610, 2017.
- HENDRIKS, F. M. Mechanical behaviour of human epidermal and dermal layers in vivo. p. 1, 2005.
- HEYER, K. et al. Epidemiology of chronic wounds in Germany: Analysis of statutory health insurance data. **Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 24, n. 2, p. 434–442, 2016.
- HOLZAPFEL, B. M. et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 4, p. 581–603, abr. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios – PNAD**. Brasília: IBGE, 2010a. (Suplemento Saúde).

ISHISE, H. et al. Hypertrophic scar contracture is mediated by the TRPC3 mechanical force transducer via NFκB activation. **Scientific Reports**, v. 5, 25 jun. 2015.

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, 8 set. 2016.

JOHNSON, K. E.; WILGUS, T. A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 10, p. 647–661, 1 out. 2014.

JUGE-AUBRY, C. E.; HENRICHOT, E.; MEIER, C. A. Adipose tissue: a regulator of inflammation. **Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 547–566, dez. 2005.

KALLIS, P. J.; FRIEDMAN, A. J. Collagen Powder in Wound Healing. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 17, n. 4, p. 403–408, 1 abr. 2018.

KANJ, L. F.; WILKING, S. V. B.; PHILLIPS, T. J. CONTINUING MEDICAL EDUCATION. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 38, n. 4, p. 22, 1998.

KASALA, E. R.; BODDULURU, L. N.; BARUA, C. C. Chrysin and its emerging antineoplastic effects. **Cancer Gene Therapy**, v. 23, n. 1, p. 43–43, jan. 2016.

KASHYAP, A. et al. Effect of povidone iodine dermatologic ointment on wound healing. **The American Surgeon**, v. 61, n. 6, p. 486–491, jun. 1995.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. **Medicine**, v. 37, n. 5, p. 223–226, maio 2009.

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÄHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 20, p. 3861–3885, 2016.

LAZARUS, G. S. et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. **Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 2, n. 3, p. 165–170, jul. 1994.

LEONE, A. M. et al. From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. **European Heart Journal**, v. 30, n. 8, p. 890–899, abr. 2009.

LEVINSON, H. A Paradigm of Fibroblast Activation and Dermal Wound Contraction to Guide the Development of Therapies for Chronic Wounds and Pathologic Scars. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 4, p. 149–159, maio 2013.

LI, J. et al. Vitamin E TPGS modified liposomes enhance cellular uptake and targeted delivery of luteolin: An in vivo/in vitro evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 512, n. 1, p. 262–272, 15 out. 2016.

- LI, X. et al. Preparation and characterization of novel eggshell membrane-chitosan blend films for potential wound-care dressing: From waste to medicinal products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 477–484, fev. 2019.
- LIRA, M. C. B. et al. Inclusion complex of usnic acid with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macroscopic Chemistry**, v. 64, n. 3–4, p. 215–224, ago. 2009.
- LORENCINI, M. et al. Active ingredients against human epidermal aging. **Ageing Research Reviews**, v. 15, p. 100–115, maio 2014.
- ŁUKASIEWICZ, S. et al. Encapsulation of clozapine in polymeric nanocapsules and its biological effects. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 140, p. 342–352, abr. 2016.
- LUO, Y. et al. Effect of a controlled-release drug delivery system made of oleanolic acid formulated into multivesicular liposomes on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3111–3129, 12 jul. 2016.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525–542, out. 2003.
- MANI, R.; NATESAN, V. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. **Phytochemistry**, v. 145, p. 187–196, jan. 2018.
- MANIZATE, F. et al. A prospective, single-center, nonblinded, comparative, postmarket clinical evaluation of a bovine-derived collagen with ionic silver dressing versus a carboxymethylcellulose and ionic silver dressing for the reduction of bioburden in variable-etiology, bilateral lower-extremity wounds. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 25, n. 5, p. 220–225, maio 2012.
- MANNE, B. K.; XIANG, S. C.; RONDINA, M. T. Platelet secretion in inflammatory and infectious diseases. **Platelets**, v. 28, n. 2, p. 155–164, mar. 2017.
- MANO, J. F. et al. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. **Journal of the Royal Society, Interface**, v. 4, n. 17, p. 999–1030, 22 dez. 2007.
- MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **The Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 176–185, jan. 2013.
- MARCONDES SARI, M. H. et al. p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide-loaded polymeric nanocapsules are chemically stable and do not induce toxicity in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 117, p. 39–48, ago. 2017.
- MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The Multifaceted Functions of Neutrophils. **Annual review of pathology**, v. 9, p. 181–218, 2014.
- MEDINA, J. H. et al. Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, n. 10, p. 2227–2231, 15 nov. 1990.

MENDES, G. M.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; CAMPIDELI, L. C. Avaliação do teor de antioxidantes, flavonoides e compostos fenólicos em preparações condimentares. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 2, p. 297–304, jun. 2015.

MENEZES, P. DOS P. et al. Hesperetin-loaded lipid-core nanocapsules in polyamide: a new textile formulation for topical drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2069–2079, 15 mar. 2017.

MESCHER, A. **Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition**. [s.l.] McGraw Hill Professional, 2009.

MESSADI, D. V. et al. Activation of NFkappaB signal pathways in keloid fibroblasts. **Archives of Dermatological Research**, v. 296, n. 3, p. 125–133, ago. 2004.

MOGOŞANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, n. 2, p. 127–136, mar. 2014.

MOHAMMADI, Z. et al. The effect of chrysin-loaded nanofiber on wound healing process in male rat. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 90, n. 6, p. 1106–1114, dez. 2017.

MONTENEGRO, L. et al. In vitro skin permeation of sunscreen agents from O/W emulsions. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 30, n. 1, p. 57–65, fev. 2008.

MORESKI, D.; BUENO, F.; LEITE-MELLO, E. AÇÃO CICATRIZANTE DE PLANTAS MEDICINAIS: UM ESTUDO DE REVISÃO. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 22, 28 mar. 2018.

MORRELL, C. N. et al. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. **Blood**, v. 123, n. 18, p. 2759–2767, 1 maio 2014.

MOTTA, Y. P. et al. Quantificação de citocinas no soro e homogenato da pata na intoxicação experimental com veneno de *Bothropoides jararaca* em ratos Wistar tratados com soroterapia e *Mikania glomerata*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1413–1418, out. 2014.

MOURA, L. I. F. et al. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 7, p. 7093–7114, jul. 2013.

MRUE, F. et al. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, v. 7, n. 2, p. 277–283, jun. 2004.

MULDER, R.; BANETE, A.; BASTA, S. Spleen-derived macrophages are readily polarized into classically activated (M1) or alternatively activated (M2) states. **Immunobiology**, v. 219, n. 10, p. 737–745, out. 2014.

MURA, P. et al. Development of liposomal and microemulsion formulations for transdermal delivery of clonazepam: effect of randomly methylated β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 475, n. 1–2, p. 306–314, 20 nov. 2014.

NETO, R.; MELQUIADES, J. A. R. **Caracterização de membranas de colágeno modificado com extrato de frutos de *Genipa americana* L. e avaliação histomorfológica do efeito sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.** 2011

NUNES, P. S. et al. Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

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, 20 nov. 2016.

OLIVEIRA, A. F. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 302–310, set. 2010.

ORÉFICE, R. L. O.; PEREIRA, M. DE M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações.** 1ª ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2012. v. 1

OTANG, W. M.; AFOLAYAN, A. J. Antimicrobial and antioxidant efficacy of *Citrus limon* L. peel extracts used for skin diseases by Xhosa tribe of Amathole District, Eastern Cape, South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 46–49, 1 jan. 2016.

PANOBIANCO, M. S. et al. Comparação da cicatrização pós-mastectomia entre mulheres portadoras e não-portadoras de diabetes mellitus. **Rev Rene**, v. 11, 20 dez. 2010.

PARK, J.-U. et al. Chitosan-Based Dressing Materials for Problematic Wound Management. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1077, p. 527–537, 2018.

PASTAR, I. et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 7, p. 445–464, 1 jul. 2014.

PATINO, M. G. et al. Collagen as an implantable material in medicine and dentistry. **The Journal of oral implantology**, v. 28, n. 5, p. 220–225, 2002.

PEI, Y. et al. Fabrication, properties and bioapplications of cellulose/collagen hydrolysate composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1752–1760, 15 fev. 2013.

PENHAVEL, M. V. C. et al. Efeito do gel da seiva do látex da *Hevea brasiliensis* na cicatrização de lesões cutâneas agudas induzidas no dorso de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 1, p. 48–53, fev. 2016.

PENN, J. W.; GROBBELAAR, A. O.; ROLFE, K. J. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. **International Journal of Burns and Trauma**, v. 2, n. 1, p. 18–28, 2012.

PICHICHERO, E. et al. Chrysin-induced apoptosis is mediated through p38 and Bax activation in B16-F1 and A375 melanoma cells. **International Journal of Oncology**, v. 38, n. 2, p. 473–483, fev. 2011.

POSNETT, J.; FRANKS, P. J. The burden of chronic wounds in the UK. **Nursing Times**, v. 104, n. 3, p. 44–45, 22 jan. 2008.

PRATA, M. B. et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em rato. **Acta cir. bras**, v. 3, n. 2, p. 43–8, jun. 1988.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J.-M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063–1072, dez. 2008.

PUSHPAVALLI, G. et al. Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatitis in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 631, n. 1–3, p. 36–41, 10 abr. 2010.

QUINTANS, J. S. S. et al. Natural products evaluated in neuropathic pain models - a systematic review. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, n. 6, p. 442–450, jun. 2014.

RABE, J. et al. Photoaging: mechanisms and repair. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 1, p. 1–19, 2006.

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. 2009a.

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. 2009b.

RODRIGUES, M. et al. Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 665–706, 1 jan. 2019.

ROMIER, B. et al. Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. **The British Journal of Nutrition**, v. 100, n. 3, p. 542–551, set. 2008.

ROUSSILLE, G.; BARTHET, B. Evaluation of a collagen-glycosaminoglycan complex as a dressing for gingival wounds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 2, n. 4, p. 208–211, 1991.

SABOKTAKIN, M. R. et al. Synthesis and in vitro evaluation of carboxymethyl starch–chitosan nanoparticles as drug delivery system to the colon. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 3, p. 381–385, 1 abr. 2011.

SAK, K. Intake of Individual Flavonoids and Risk of Carcinogenesis: Overview of Epidemiological Evidence. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 8, p. 1119–1150, dez. 2017.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 11, p. 1666–1691, 3 nov. 2005.

SAMPAIO, W. C. AVANÇOS NO DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAIS VISANDO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS. p. 35, 2018.

SANTOS, V. L. C. DE G. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. **Atendimento domiciliar : um enfoque gerontológico**, 2000.

SAREILA, O. et al. NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 8, p. 2197–2208, 15 out. 2011.

SEDLARIK, K. M. et al. The wound healing of a full thickness wound in guinea pigs by the use of collagen sponge as a wound dressing. **Aktuelle Traumatologie**, v. 22, n. 5, p. 219–228, 1992.

SEITZ, O. et al. Identification of the Fra-1 transcription factor in healing skin flaps transplants: a potential role as a negative regulator of VEGF release from keratinocytes. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 40, n. 4, p. 379–386, jun. 2012.

SERRA, M. B. et al. From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing. **International Journal of Inflammation**, v. 2017, 2017.

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.

SORG, H. et al. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017.

SOUZA, L. C. et al. Flavonoid Chrysin prevents age-related cognitive decline via attenuation of oxidative stress and modulation of BDNF levels in aged mouse brain. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 134, p. 22–30, jul. 2015.

SPOONER, R.; YILMAZ, Ö. The Role of Reactive-Oxygen-Species in Microbial Persistence and Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 334–352, 13 jan. 2011.

SUN, B. K.; SIPRASHVILI, Z.; KHAVARI, P. A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science (New York, N.Y.)**, v. 346, n. 6212, p. 941–945, 21 nov. 2014.

SÜNTAR, I. et al. Wound healing and antioxidant properties: do they coexist in plants? **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 2, p. 1–7, 1 abr. 2012.

SURESH BABU, K. et al. Synthesis and biological evaluation of novel C (7) modified chrysin analogues as antibacterial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 1, p. 221–224, jan. 2006.

TABARY, O. et al. Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. **Cellular Signalling**, v. 18, n. 5, p. 652–660, maio 2006.

TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound Healing and Skin Regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 1, jan. 2015.

THAKUR, R. et al. Practices in Wound Healing Studies of Plants. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2011, 2011.

THOMAS, S. Alginate dressings in surgery and wound management--Part 1. **Journal of Wound Care**, v. 9, n. 2, p. 56–60, fev. 2000.

- TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 14, p. 1532–1555, 1 dez. 2006.
- TRICCO, A. C. et al. A systematic review of cost-effectiveness analyses of complex wound interventions reveals optimal treatments for specific wound types. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 90, 22 abr. 2015.
- TSAI, M.-J. et al. Preparation and Characterization of Naringenin-Loaded Elastic Liposomes for Topical Application. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, 9 jul. 2015.
- UPADHYAY, A. et al. Eleutherine indica L. accelerates in vivo cutaneous wound healing by stimulating Smad-mediated collagen production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 2, p. 490–494, 27 mar. 2013.
- VIEIRA, C. P. DE B.; ARAÚJO, T. M. E. DE. Prevalence and factors associated with chronic wounds in older adults in primary care. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 52, n. 0, 20 dez. 2018.
- VOINESKOS, S. H. et al. Systematic review of skin graft donor-site dressings. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 124, n. 1, p. 298–306, jul. 2009.
- VULCANI, V. A. S. **Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona**. Mestrado em Bioengenharia—São Carlos: Universidade de São Paulo, 23 jan. 2004.
- WELLER, C.; SUSSMAN, G. Wound Dressings Update. **Journal of Pharmacy Practice and Research**, v. 36, n. 4, p. 318–324, 2006.
- WIEGAND, C.; HIPLER, U.-C. Polymer-based Biomaterials as Dressings for Chronic Stagnating Wounds. **Macromolecular Symposia**, v. 294, n. 2, p. 1–13, 2010.
- WILGUS, T. A.; ROY, S.; MCDANIEL, J. C. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 7, p. 379–388, set. 2013.
- WISE, J. K. et al. Synergistic enhancement of ectopic bone formation by supplementation of freshly isolated marrow cells with purified MSC in collagen-chitosan hydrogel microbeads. **Connective Tissue Research**, v. 57, n. 6, p. 516–525, 2016.
- WOLF, S. E.; ARNOLDO, B. D. The year in burns 2011. **Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 38, n. 8, p. 1096–1108, dez. 2012.
- XUE, C. et al. Chrysin induces cell apoptosis in human uveal melanoma cells via intrinsic apoptosis. **Oncology Letters**, v. 12, n. 6, p. 4813–4820, dez. 2016.
- YAN, T. et al. Biodegradable collagen sponge reinforced with chitosan/calcium pyrophosphate nanoflowers for rapid hemostasis. **Carbohydrate Polymers**, v. 170, p. 271–280, ago. 2017.
- YANG, B. et al. Chrysin inhibits metastatic potential of human triple-negative breast cancer cells by modulating matrix metalloproteinase-10, epithelial to mesenchymal transition, and PI3K/Akt signaling pathway. **Journal of applied toxicology: JAT**, v. 34, n. 1, p. 105–112, jan. 2014.

YIN, G. et al. Topical application of quercetin improves wound healing in pressure ulcer lesions. **Experimental Dermatology**, v. 27, n. 7, p. 779–786, jul. 2018.

ZAHEDI, P. et al. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 21, n. 2, p. 77–95, 2010.

ZEINALI, M.; REZAEI, S. A.; HOSSEINZADEH, H. An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 92, p. 998–1009, ago. 2017.

ZHANG, S. et al. Polydopamine/Puerarin Nanoparticle-Incorporated Hybrid Hydrogels for Enhanced Wound Healing. **Biomaterials Science**, 8 ago. 2019.

ZHAO, B. et al. Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. **Journal of Molecular Histology**, v. 48, n. 2, p. 121–132, abr. 2017.

ZHAO, R. et al. Inflammation in Chronic Wounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 11 dez. 2016.

ZHU, Z.-Y. et al. Preparation and activity evaluation of chrysin- β -d-galactopyranoside. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 10, p. 1433–1440, out. 2016.

ZUBER, M. et al. Collagen based polyurethanes—A review of recent advances and perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 366–374, set. 2015.

ANEXOS

ANEXO A - Declaração de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFS.

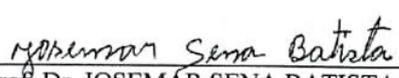


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “EFEITOS DA CRISINA NANOENCAPSULADA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS”, registrada com o nº 55/2018, sob a responsabilidade da Prof. Dr^a. Rosana de Souza Siqueira Barreto 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 20/11/2018.

| | |
|-------------------------|---|
| Finalidade | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | Início: 15/01/2019, Término: 01/02/2020 |
| Espécie/linhagem/raca | Camundongo Heterogênico/Swiss/ |
| Nº de animais | 40 |
| Peso/Idade | 25-35g / 2-3 meses |
| Sexo | M |
| Espécie/linhagem/raca | Rato heterogênico/Wistar |
| Nº de animais | 160 |
| Peso/Idade | 250-300g /2-3 meses |
| Sexo | M |
| Total geral de animais | 200 |
| Origem | Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS. |



Prof. Dr. JOSEMÁR SENA BATISTA
 Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária “Prof. Aloísio de Campos”
 Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
 49100-000
 Fones: 3212 6661/6606

ANEXO B - Patente de Invenção (PI): Bioprodutos contendo crisina com atividade cicatrizante.



03/09/2019 870190086581
23:54



29409161908340184

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 018341 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 13031547000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária, "Prof. José Aloísio de Campos", Bairro Rosa Elze

Cidade: São Cristóvão

Estado: SE

CEP: 49100000

País: Brasil

Telefone: (79) 3194-6865

Fax:

Email: cinttec.ufs@gmail.com

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 03/09/2019 às 23:54, Petição 870190086581

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): BIOPRODUTOS CONTENDO CRISINA COM ATIVIDADE

Utilidade (54): CICATRIZANTE

Resumo: A presente patente de invenção refere-se a bioprodutos contendo atividade cicatrizante, cujo princípio ativo é a crisina, 5,7-Dihydroxyflavone (CAS No. 480-40-0). Trata-se de bioprodutos obtidos através da incorporação de lipossomas, contendo crisina como princípio ativo, em membranas de colágeno. Esta formulação farmacêutica apresenta vantagens quanto a melhorias da solubilidade, estabilidade e efeito farmacológico. As membranas de colágeno contendo lipossomas de crisina facilitam a cicatrização e reconstrução dos tecidos celulares envolvidos nas lesões epiteliais ou mucosas em geral (lesões cirúrgicas, queimaduras, ulcerações, escoriações, fissuras etc. ou qualquer outra lesão que seja reparada por cicatrização) e em qualquer espécie de feridas.

Figura a publicar: 01

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 03/09/2019 às 23:54, Petição 870190086581

Nome: MIKAELLA TUANNY BEZERRA CARVALHO

CPF: 05480076400

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Avenida Maria Pastora, 260, bloco 09, ap. 302, Farolândia

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49030-210

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 8 de 17

Nome: ANDRÉ SALES BARRETO

CPF: 96322896504

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida Murilo Dantas, 1409, Condomínio Aquarela, Edifício Joel Dantas, apartamento 004.,Farolândia

Cidade: Aracaju

Estado: SE

CEP: 49032-490

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 9 de 17

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 03/09/2019 às 23:54, Petição 870190086581

ANEXO C - Certificado da apresentação do trabalho no VII Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco. Setembro/2019.

VII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO

CERTIFICADO

Certificamos que
o trabalho intitulado

MELHORIA DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E CONTRAÇÃO DE FERIDAS POR MEMBRANAS DE COLÁGENO CONTENDO CRISINA

de autoria de

CLEVERTON NASCIMENTO SANTANA¹; MIKAELLA TUANNY BEZERRA CARVALHO¹;; RUTHY KELLEN LIMA AMARANTE¹; LUCINDO JOSÉ QUINTANS JÚNIOR¹; JULLYANA DE SOUZA SIQUEIRA QUINTANS¹; NATÁLIA TELES LIMA¹; MÁRCIO ROBERTO VIANA DOS SANTOS¹; MARIM RUSSO SERAFINI¹; ANA MARIA SANTOS OLIVEIRA¹; ROSANA DE SOUZA SIQUEIRA BARRETO¹

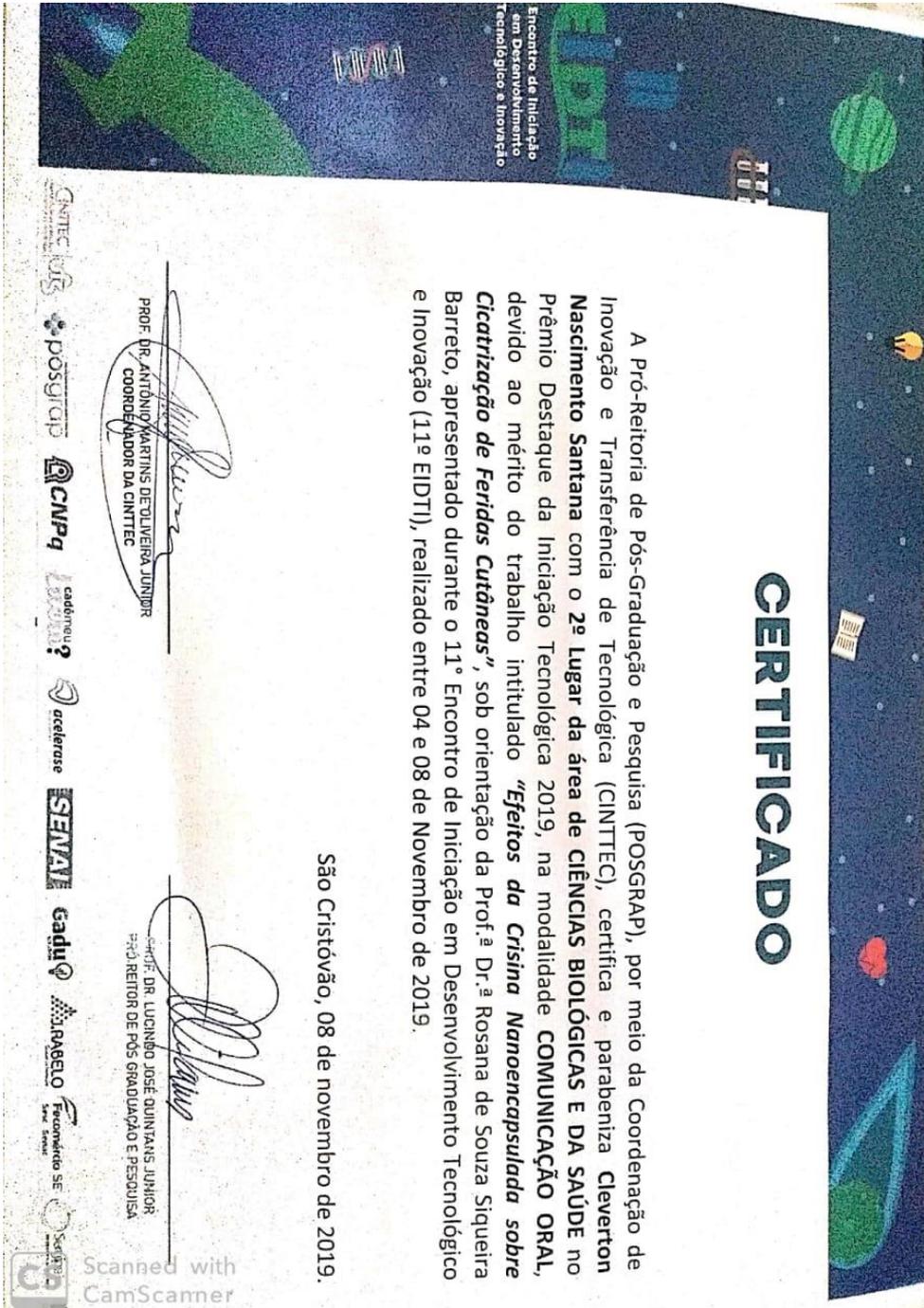
foi apresentado na modalidade pôster no VII Simpósio Plantas Mediciniais do Vale do São Francisco e 1st France-Brazil Meeting on Natural Products realizado no Complexo Multieventos da UNIVASF, Juazeiro-BA, no período de 04 a 07 de setembro de 2019

Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida
Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida
Presidente do Comitê Organizador

REALIZAÇÃO

APOIO

ANEXO D - Certificado de premiação de trabalho em 2º lugar na área de ciências biológicas e da saúde no 11º Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (11º EIDTI).



ANEXO E – SUBMISSÃO DE ARTIGO

Inflammation Research
MEMBRANES COLLAGEN CONTAINING CHRYSIN IN LIPOSOMES REDUCES
INFLAMMATION AND PROMOTES IMPROVEMENT IN ANGIOGENESIS AND
WOUND HEALING CUTANEOUS
 --Manuscript Draft--

| | | |
|--|--|---------------------------------------|
| Manuscript Number: | INRE-D-20-00056 | |
| Full Title: | MEMBRANES COLLAGEN CONTAINING CHRYSIN IN LIPOSOMES REDUCES INFLAMMATION AND PROMOTES IMPROVEMENT IN ANGIOGENESIS AND WOUND HEALING CUTANEOUS | |
| Article Type: | Original Article | |
| Corresponding Author: | Rosana de Souza Siqueira Barreto Universidade Federal de Sergipe Lagarto SE BR São Cristóvão, SE BRAZIL | |
| Corresponding Author Secondary Information: | | |
| Corresponding Author's Institution: | Universidade Federal de Sergipe Lagarto SE BR | |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | | |
| First Author: | Mikaella Tuanny Bezerra Carvalho | |
| First Author Secondary Information: | | |
| Order of Authors: | Mikaella Tuanny Bezerra Carvalho Ruthy Kellen Silva Amarante Luana Heimfarth Danillo Menezes Santos Ana Maria Santos Oliveira Mairim Russo Serafini Pollyana Siqueira Lima Rose Nely Pereira Filho Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior Márcio Roberto Viana Santos André Sales Barreto Lucindo Quintans Junior Jullyana Quintans Rosana de Souza Siqueira Barreto | |
| Order of Authors Secondary Information: | | |
| Funding Information: | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq_ba5d25aa05) | PhD. Rosana de Souza Siqueira Barreto |
| Abstract: | p.p1 {margin: 0.0px 0.0px 10.0px 0.0px; text-align: justify; font: 12.0px 'Times New Roman'; color: #000000; -webkit-text-stroke: #000000} span.s1 {font-kerning: none} span.s2 {font: 12.0px Symbol; font-kerning: none} Purpose: To evaluate the healing effect of chrysin containing collagen membranes, as well as their action on possible morphological alterations in the healing process of open skin wounds in rodents. Methods: Sixty-six rats and eighteen mice were submitted to skin excision and randomized in the groups according to treatment: clean - untreated (LP); control - pure collagen membrane (COL) and chrysin containing | |

30/01/2020

Gmail - INRE-D-20-00056 - Submission Confirmation



Rosana S S Barreto <rosanasbarreto@gmail.com>

INRE-D-20-00056 - Submission Confirmation

1 mensagem

Inflammation Research (INRE)

30 de janeiro de 2020

<em@editorialmanager.com>

22:42

Responder a: "Inflammation Research (INRE)"

<prathiba.ramalingam@springernature.com>

Para: Rosana de Souza Siqueira Barreto <rosanasbarreto@gmail.com>

Dear Dr. Barreto,

Thank you for submitting your manuscript, MEMBRANES COLLAGEN CONTAINING CHRYSIN IN LIPOSOMES REDUCES INFLAMMATION AND PROMOTES IMPROVEMENT IN ANGIOGENESIS AND WOUND HEALING CUTANEOUS, to Inflammation Research.

The submission id is: INRE-D-20-00056

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal's website.

Your username is: rosanasbarreto@gmail.comIf you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/inre/>

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Inflammation Research

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding.

30/01/2020

Gmail - INRE-D-20-00056 - Submission Confirmation

Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/inre/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.