



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM

DÉBORA COSTA GOMES

**MEMBRANA BIOATIVA DE GELATINA CONTENDO NARINGENINA EM
LIPOSSOMAS NO REPARO TECIDUAL**

ARACAJU-SE
2018

DÉBORA COSTA GOMES

**MEMBRANA BIOATIVA DE GELATINA CONTENDO NARINGENINA EM
LIPOSSOMAS NO REPARO TECIDUAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito obrigatório para obtenção do grau
de Bacharel em Enfermagem da Universidade
Federal de Sergipe, sob orientação da Profa. Dra.
Rosana de Souza Siqueira Barreto.

ARACAJU-SE
2018

DÉBORA COSTA GOMES

**MEMBRANA BIOATIVA DE GELATINA CONTENDO NARINGENINA EM
LIPOSSOMAS NO REPARO TECIDUAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito obrigatório para obtenção do grau
de Bacharel em Enfermagem da Universidade
Federal de Sergipe, sob orientação da Profa. Dra.
Rosana de Souza Siqueira Barreto.

BANCA EXAMINADORA

Profª Dra. Rosana de Souza Siqueira Barreto
Orientadora (DESL – UFS)

Esp. Débora Silva Araújo Mota
1ª Examinadora (DFS- UFS)

Profª Esp. Nadyege Pereira Cardoso
2ª Examinadora (DEN – UFS)

Aprovado em ____/____/____

Dedico a Deus por ter me ungido e surpreendido com toda sorte de bênçãos para que eu pudesse alcançar meus sonhos e tudo o qual foi prometido. É com Deus que eu tenho a certeza que ainda que eu passe por dificuldades e provações não temerei mal algum porque Ele está sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a DEUS. Eu dedico ao Deus que nunca me desamparou, que sempre me consolou nos momentos difíceis e que me agraciou com toda sorte de bênçãos. A Ele toda honra, glória e louvor.

À minha orientadora Profa. Dra. Rosana que foi fundamental para a realização desta etapa, a quem tenho total admiração.

Às meninas da cicatrização que me abraçaram e seguimos juntas nos momentos de lutas e vitórias: Ruthy, Débora Mota, Edla, Tainá.

À família LANEF por todo conhecimento adquirido: Profa Dra. Jullyana, Prof. Dr. Lucindo, Lícia, Marlange, Erik, Marília, Luana.

Aos componentes da banca examinadora pela valiosa presença e disponibilidade.

Aos meus pais, Ivone e Edivan, por todo amor, dedicação, apoio, por todas as mensagens diárias de preocupação, recepção calorosa e por iluminar meus dias ainda que distantes. Tudo que sou devo a vocês. Obrigada por ter formado uma aliança forte na nossa família.

Ao meu irmão Junior que tanto amo.

Aos meus avôs paternos, Neilde (in memoriam) e Galego, e maternos, Edina e Valmiro, por toda alegria e amor que tem comigo.

Aos meus tios, em especial a minha segunda mãe, Ana, que foi mais que um abrigo quando precisei, foi fortaleza e símbolo de união e aos meus pais da fé, Meire e João Vitor, que sempre intercederam por mim.

Aos meus primos, por compartilharmos bons momentos; Murilo e Murielle, eu nunca esquecerei o quanto vocês foram anjos na minha jornada.

Aos meus amigos que sempre me trouxeram alegria: Kevin, Jonathan, Gabriel, Andresa, Yvo, Gabi, Mirele, Larissa, Maicon, Erick, Bruno, Milena, Henrique.

Aos companheiros que fizeram parte dessa jornada: Lemmerson, Charles, Rute, Bia, Francy, Cleiton, Kelly, Marcelo, Evelyn e tantos outros.

À PIB em Glória, por todas as orações que me sustentam até hoje.

Muito obrigada a todos!!!

RESUMO

Introdução: A Naringenina (NAR) é um flavonoide abundante em frutas cítricas e representa um composto promissor para fins terapêuticos. Tem sido muito utilizada diante da sua atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. **Objetivo:** Avaliar os possíveis efeitos da naringenina incorporada a membrana de gelatina contendo lipossoma (GEL/NAR) sobre a cicatrização em um modelo de feridas cutâneas abertas em roedores. **Material e Métodos:** Para realização dos protocolos experimentais foram utilizados ratos machos *Wistar*, pesando entre 250 - 300g. Esses foram anestesiados por via intraperitoneal (Ketamina-80 mg/kg e Xilazina-10 mg/kg) e com punch metálico de 8 mm realizou-se a confecção de ferida cutânea excisional na região dorsal do animal. Após o procedimento, os animais foram tratados por 7 dias, dose única, com membrana de gelatina contendo lipossoma (BR), membrana de gelatina contendo lipossoma e NAR a 1% (GEL/NAR 1%) e a 2,5% (GEL/NAR 2,5%) ou não tratados (LP). A avaliação consistiu na mensuração das áreas das feridas e no aspecto histológico quanto às características morfológicas teciduais após coloração em hematoxilina-eosina (HE). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animal (CEPA/UFS - 71/2015). **Resultados:** GEL/NAR 1% ($56,16075 \pm 3,653587$; $p < 0,001$) e GEL/NAR 2,5% ($58,21967 \pm 1,651126$; $p < 0,001$) reduziram a área da ferida quando comparado ao grupo controle ($37,41523 \pm 6,276465$). Quanto à intensidade da resposta inflamatória, LP, BR e NAR 1% foram classificadas como moderada e GEL/NAR 2,5% como leve. De acordo com o fenótipo inflamatório, observou-se inflamação subaguda nos grupos LP e BR em virtude do equilíbrio entre neutrófilos e linfócitos e inflamação crônica inespecífica nos grupos NAR 1% e 2,5% diante do predomínio de linfócitos. GEL/NAR 1% ($80,000 \pm 15,3188$; $p < 0,01$) e GEL/NAR 2,5% ($75,2857 \pm 17,3754$; $p < 0,05$) apresentou valores significativos quanto à epitelização em comparação com os grupos LP ($58,6571 \pm 6,3892$) e BR ($51,5714 \pm 11,0432$), além disso demonstraram uma maior vascularização e deposição de fibroblastos. **Conclusão:** Neste sentido, GEL/NAR proporcionou melhoria no reparo tecidual evidenciada pela redução da área da ferida e regulação da reação inflamatória através da redução de neutrófilos. **Apoio Financeiro:** CNPq, COPES/POSGRAP/UFS.

Palavras-chave: Cicatrização de Feridas; Flavonoides; Gelatina; Lipossomas; Naringenina.

ABSTRACT

Introduction: Naringenin (NAR) is an abundant flavonoid in citrus fruits and represents a promising compound for therapeutic purposes. It has been widely used in the face of its antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activity. **Objective:** To evaluate the possible effects of naringenin incorporated into the membrane of gelatin containing liposome (GEL/NAR) on wound healing in a model of open cutaneous wounds in rodents. **Material and Methods:** Wistar male rats weighing 250-300 g were used to perform the experimental protocols. These were anesthetized intraperitoneally (Ketamine-80 mg / kg and Xylazine-10 mg / kg) and with an 8 mm metallic punch the excisional cutaneous wound was made in the dorsal region of the animal. After the procedure, the animals were treated for 7 days, single dose, with gelatine membrane containing liposome (BR), gelatine membrane containing liposome and 1% NAR (GEL/NAR 1%) and 2.5% (GEL/NAR 2.5%) or untreated (LP). The evaluation consisted of the measurement of the wound areas and the histological aspect regarding the tissue morphological characteristics after hematoxylin-eosin (HE) staining. The experimental protocols were approved by the Animal Research Ethics Committee (CEPA/UFS - 71/2015). **Results:** GEL/NAR 1% ($56,16075 \pm 3,653587$; $p < 0,001$) and GEL/NAR 2,5% ($58,21967 \pm 1,651126$; $p < 0,001$) reduced the area of the wound, when compared to the control group ($37,41523 \pm 6,276465$). Regarding the intensity of the inflammatory response, LP, BR and NAR 1% were classified as moderate and GEL/NAR 2.5% as mild. According to the inflammatory phenotype, subacute inflammation was observed in the LP and BR groups due to the balance between neutrophils and lymphocytes and chronic nonspecific inflammation in the 1% and 2.5% NAR groups due to the predominance of lymphocytes. GEL / NAR 1% ($80,000 \pm 15,3188$; $p < 0,01$) and GEL / NAR 2.5% ($75,2857 \pm 17,3754$; $p < 0,05$) presented significant values regarding epithelization compared to LP ($58,6571 \pm 6,3892$) and BR ($51,5714 \pm 11,0432$), in addition demonstrated a greater vascularization and deposition of fibroblasts. **Conclusion:** In this sense, GEL/NAR provided improvement in the tissue repair evidenced by reduction of the wound area and regulation of the inflammatory reaction through the reduction of neutrophils and lymphocytes. **Financial Support:** CNPq, COPES/POSGRAP/UFS.

Keywords: Healing Wound; Flavonoid; Gelatine; Liposomes; Naringenin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Pele e suas estruturas	16
FIGURA 2- Mecanismos de Cicatrização das feridas.....	18
FIGURA 3- Eventos celulares e moleculares no dano tecidual a pele.	21
FIGURA 4- Tipos de curativos disponíveis	23
FIGURA 5- Grupos experimentais.....	29
FIGURA 6- Delineamento experimental.....	31
FIGURA 7- Foto paquímetro digital.	32
FIGURA 8- Processamento histológico.	33
FIGURA 9- Efeito da naringenina (GEL/NAR) na área das feridas nos ratos.....	36
FIGURA 10- Efeito da naringenina (GEL/NAR) sobre a mensuração da redução da área da ferida residual (mm ²) por 7 dias..	37
FIGURA 11- Efeito da naringenina (GEL/NAR) na análise histológica das secções de feridas coradas em HE.....	38
FIGURA 12- Efeito da naringenina (GEL/NAR) sobre o índice de epitelização em feridas cutâneas abertas.	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Avaliação do infiltrado inflamatório a partir da análise histológica das secções de feridas coradas em HE.	39
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BR	Branco
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
GEL	Gelatina
LANEF	Laboratório de Neurociências e Ensaios Farmacológicos
LEFT	Laboratório de Ensaios Farmacêuticos e Toxicidade
HE	Hematoxilina-Eosina
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IL-1	<i>Interleukin-1</i>
IL-2	<i>Interleucina-2</i>
IL-8	<i>Interleucina-8</i>
INSS	Instituto Nacional de Seguro Social
NAR	Naringenina
NrF2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2</i>
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
TGF- α	<i>Transforming Growth Factor-α</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor- β</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor- α</i>
UFS	Universidade Federal de Sergipe
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 PELE.....	15
2.2 FERIDAS	17
2.3 FASES DA CICATRIZAÇÃO.....	19
2.4 CURATIVOS	21
2.5 MEMBRANA.....	23
2.6 LIPOSSOMAS	24
2.7 PRODUTOS NATURAIS.....	24
2.8 NARINGENINA	25
3 JUSTIFICATIVA	26
4 OBJETIVOS	27
4.1 OBJETIVO GERAL.....	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5 MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA.....	28
5.2 OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS DE GELATINA	28
5.3 ANIMAIS	28
5.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	29
5.4.1 Delineamento Experimental	29
5.4.2 Modelo de Ferida Cutânea Excisional.....	30
5.3.3 Avaliação Macroscópica.....	31
5.3.4 Análise Histológica	32
5.3.4.1 Análise Histomorfológica da Reação Inflamatória	33

5.3.4.2 Determinação do Índice de Percentual de Epitelização da Superfície da Ferida	34
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
6 RESULTADOS	36
6.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	36
6.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	37
7 DISCUSSÃO	41
8 CONCLUSÃO.....	43
9 PERSPECTIVAS.....	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO A - DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS DA UFS.	51

1 INTRODUÇÃO

A pele é a principal barreira de proteção do organismo e tem como funções básicas sintetizar vitamina D com a exposição aos raios solares; impedir a perda excessiva de líquidos; manter a temperatura corpórea; proteger da ação de agentes externos e participar na termorregulação (ALVES, 2015).

As feridas são resultantes de um trauma que provoca a descontinuidade da pele. As feridas crônicas, principalmente, constituem um grave problema de saúde pública que acarreta um grande impacto econômico e social, consequentemente, afetando a qualidade de vida. Sabe-se que o estado nutricional, diabetes, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, aterosclerose, disfunção renal e quadros infecciosos sistêmicos estão intrinsecamente ligados à dificuldade do processo cicatricial (OCHOA; RAHIMI; ZIAIE, 2014; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; MANDELBAUM; DI SANTIS; SANT'ANNA MANDELBAUM, 2003b).

A cicatrização é um processo dinâmico e complexo em resposta ao dano resultante, envolvendo coagulação, inflamação, proliferação e remodelação (KUMAR et al., 2007).

A partir da década de 1960, delineou-se que a aplicação de um ambiente úmido na ferida trazia consigo diversos efeitos benéficos para o processo cicatricial (MANDELBAUM; DI SANTIS; SANT'ANNA MANDELBAUM, 2003a). Com base nesse princípio, considerou-se a utilização de recursos para acelerar a cicatrização e reparação tecidual, como filmes, emulsões, membranas, hidrogéis (MOHANTY et al., 2012).

Nos últimos anos, as membranas à base de gelatina têm sido alvo de vários estudos e identificou-se que são um biomaterial eficaz, tendo em vista a capacidade de promover e acelerar a granulação e epitelização (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009). Além disso permite uma liberação gradual de fármaco dentro dos tecidos alvo (NUNES et al., 2016).

O uso dessas membranas tem mostrado efeitos satisfatórios, pois são biodegradáveis. Apresentam vantagens quanto à reconstrução tecidual prevenindo desidratação, acelerando a formação de novos vasos, age como barreira contra microrganismos e é um método prático na manutenção dos cuidados, ao passo que evita perdas de compostos no momento da troca do curativo (GINDL et al., 2006; FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Durante séculos, os produtos naturais, tais como plantas medicinais e seus metabólitos secundários, têm sido utilizados para tratar várias doenças em todo o mundo, despertando interesses comerciais e científicos (LI; VEDERAS, 2009; SÜNTAR et al., 2012).

Dentre os produtos naturais, os flavonoides constituem uma família de compostos polifenólicos naturais e são constituintes normais da dieta humana devido a sua abundância em frutas cítricas, legumes, sementes e bebidas como o café, chá e vinho tinto, bem como em ervas medicinais (PEDRAZZA et al., 2017).

Os flavonoides atuam como antioxidantes, pois são capazes de combater os radicais livres, apresentam atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune, apresentam ainda atividade anti-inflamatória, analgésica e capacidade de promover a regeneração de cartilagens e ossos, além de produzir vasodilatação (PEDRAZZA et al., 2017; KUMAR; PANDEY, 2013; MIRA et al., 2002).

Essa classe de compostos constituem um potencial farmacêutico promissor para a prevenção de doenças crônicas (CHEN et al., 2007; DIXON; STEELE, 1999; LE MARCHAND et al., 2000; STADELMANN, 2011; SZEJTLI; SZENTE, 2005).

A naringenina (NAR) é um flavonoide encontrado naturalmente nas frutas cítricas. Um dos benefícios da naringenina se deve ao fato dela ser encontrada em maior concentração na casca de frutas cítricas (ALAM et al., 2014). Atividade anti-inflamatória, antioxidante, antifibrinogênica, entre outras, já foram descritas da NAR e sugerem que esta substância pode atuar modulando mediadores pró-inflamatórios do processo de cicatrização. Além disso, a incorporação da naringenina a um veículo bioativo, como as membranas de gelatina, pode potencializar os efeitos cicatrizantes. (MOGOȘANU; GRUMEZESCU, 2014; VATANKHAH et al., 2014; GALATI et al., 2001; GALLUZZO et al., 2008; JAYARAMAN et al., 2012; VAN MEEUWEN et al., 2007).

Diante disso, surge então uma necessidade de busca de novas alternativas para a aceleração do processo cicatricial. A Naringenina trata-se de um composto promissor para ser estudado na cicatrização de feridas cutâneas. Nessa perspectiva, é essencial avaliar o efeito de novos tipos de coberturas associados à NAR em lipossomas para o tratamento de feridas cutâneas abertas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PELE

A pele um órgão complexo composto por diversos tecidos, tipos celulares e estruturas especializadas, uma das principais funções é a proteção ao organismo, em virtude que constitui uma barreira essencial contra a penetração de agentes nocivos. Além disso, possui termorreceptores nervosos que levam informação ao centro de regulação térmica do hipotálamo e promove a termorregulação, exerce atividade metabólica por meio da secreção, promove a percepção e síntese de vitamina D (ALVES, 2015; SAMPAIO; RIVITTI, 2014; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; FOLDVARI, 2000).

Essas funções têm a finalidade de promover e manter harmonia no corpo humano. Além disso, é considerada o maior órgão do corpo humano, sendo composta por três camadas: a epiderme, derme e hipoderme (SAMPALIO; RIVITTI, 2014) (Figura 1).

A epiderme, é a camada mais externa, avascular e está disposta em quatro camadas que estão unidas entre si: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea (BERNE; LEVY, 2010).

A camada basal é a mais profunda da epiderme, as suas células estão unidas entre si por desmossomos, contêm feixes de microfibrilas e é constituída pelos queratinócitos, melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans. Com exceção das células de Langerhans, as células da epiderme sofrem mitose para substituir aquelas que foram mortas (BERNE; LEVY, 2010; SAMPAIO; RIVITTI, 2014; VAN DE GRAAFF, 2003).

A camada espinhosa localiza-se acima da camada basal, apresenta células de Malpighi, queratinócitos histologicamente diferenciados e unidos por pequenos processos citoplasmáticos, por abundantes desmossomos e por glicoproteínas e lipoproteínas que contribui para a resistência da epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; BARBOSA, 2011; BERNE; LEVY, 2010).

A camada granulosa apresenta células achatadas, seu nome é derivado devido a presença de grânulos de querato-hialina, percussora da queratina, e grânulos lamelares que evitam a perda de água (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012; BERNE; LEVY, 2010; VAN DE GRAAFF, 2003).

A camada córnea é a mais superficial da epiderme, formada por células achatadas e queratinizadas. Frequentemente as células dessa camada são perdidas devido ao atrito, mas são

renovadas constantemente por células provenientes da camada mais profunda da epiderme (SAMPAIO; RIVITTI, 2014; JARVIS, 2012; JUNQUEIRA, 2012).

A derme, camada de tecido conjuntivo fibroso, localizada abaixo da epiderme é suprida por estruturas vasculares, nervosas e linfáticas, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, é um tecido constituído de 95% de fibras de colágeno, fibras elásticas e fibroblasto. Além disso, apresentam diferentes células em sua estrutura, como mastócitos, macrófagos, melanófagos, fibroblasto, fibrócitos, eosinófilos, monócitos, linfócitos, neutrófilos e plasmócitos. Todos esses são importantes para a homeostase e reparação da pele (BERNE; LEVY, 2010; RIVITTI, 2014; MENDONÇA; RODRIGUES, 2011).

A hipoderme composta do tecido adiposo é a camada mais profunda, está envolvida no processo de reserva, isolamento térmico e proteção do corpo. Este tecido é referido também como tecido subcutâneo ou fáscia superficial (RIVITTI, 2014; BERNE; LEVY, 2010).

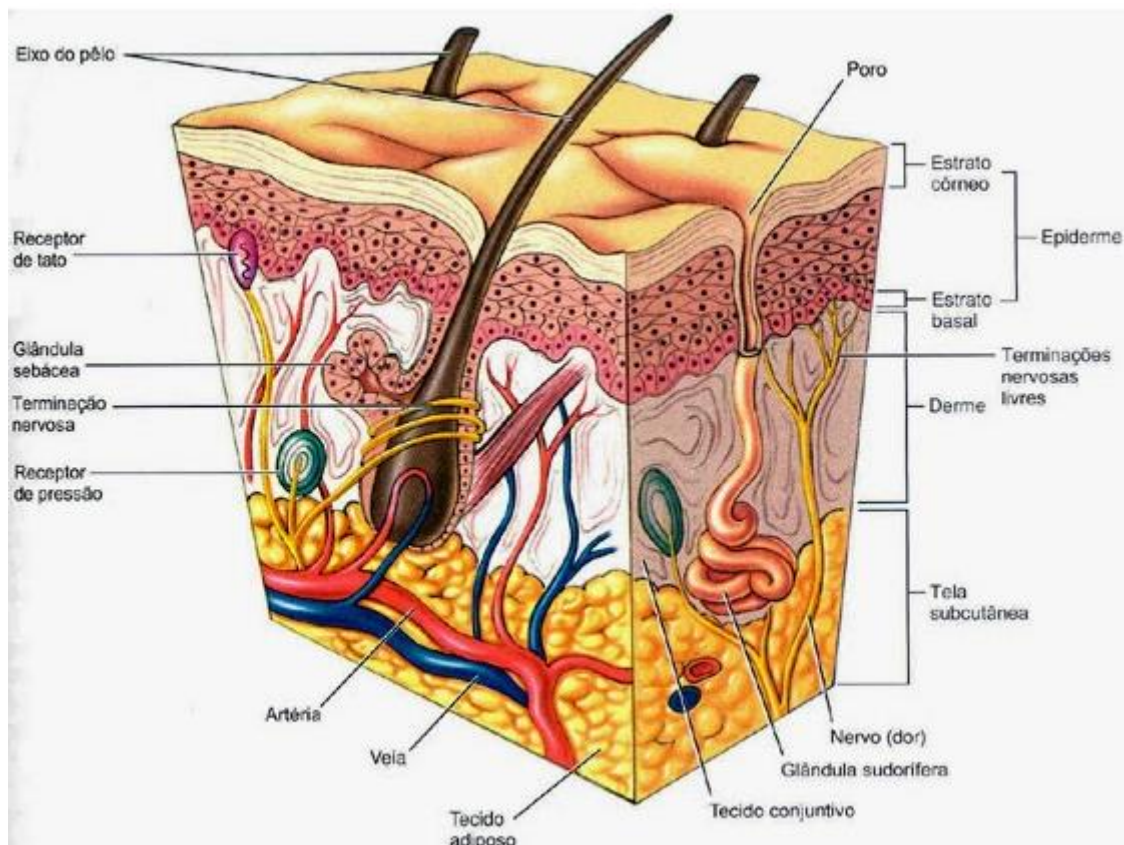


FIGURA 1- Pele e suas estruturas (BERNE; LEVY, 2010).

2.2 FERIDAS

As feridas constituem um dano à pele, o qual pode ocorrer de uma simples quebra da integridade da pele a um maior comprometimento no tecido subcutâneo, ossos, tendões, músculos, vasos e nervos (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009). Podem ser desencadeadas através de processos patológicos, cirurgias, traumas (mecânico, químico ou físico), isquemias e queimaduras (ARAÚJO, 2010; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009; BLANES et al., 2004).

Há diversas formas para a classificação das feridas, essas podem ser definidas quanto à causa como as feridas cirúrgicas que ocorrem em resultado de uma intervenção, as traumáticas que são mediante a ação de um agente através da perfuração, do corte, do frio, do calor e de agentes químicos, e ulcerativas em virtude da cessação de suprimento sanguíneo em determinada região (EBERHARDT et al, 2015).

Quanto ao tempo de duração podem ser agudas ou crônicas, as primeiras são feridas recentes, já as segundas têm um tempo de duração superior a seis meses. É importante frisar que as feridas crônicas causam grande impacto e modificação no estilo de vida dos pacientes, pois afetam o bem-estar psicológico, causam distúrbios de auto-imagem e negação do estado de saúde (SILVA et al, 2017).

As feridas têm se tornado uma complicação importante e um fato preocupante. Tendo em vista que constitui um grave problema de saúde pública e causa impacto econômico e social. Os pacientes portadores de feridas crônicas precisam do uso de curativos em períodos prolongados, provocando um gasto financeiro relevante para a saúde. Nos Estados Unidos, o gasto anual para cuidado das lesões no Sistema de Saúde é de \$ 50 bilhões, já para o reparo da ferida o custo está em torno de US \$ 3.349-9.358 (LIMA et al., 2016; OCHOA; RAHIMI; ZIAIE, 2014; DORAI, 2012; POSNETT et al., 2009).

No Brasil, alguns dados ratificam que a maior parte da população acometida por feridas são aposentados, com idade maior que 60 anos e contém feridas crônicas, o que reflete na oneração de gastos públicos e consequentemente afetando a qualidade de vida, de forma que provoca alteração no bem-estar psicológico, negação do estado de saúde e distúrbios de auto-imagem (LIMA et al., 2016; OCHOA; RAHIMI; ZIAIE, 2014; MENDONÇA; WAIDMAN et al., 2011; COUTINHO-NETTO, 2009).

Segundo o INSS (Instituto Nacional do Seguro Social), o problema com feridas crônicas impactam na produtividade do Brasil, já que é a segunda causa de afastamento no trabalho. O Ministério da saúde estimativa que cerca de 5 milhões de brasileiros sofrem com feridas

crônicas (ACIDADE ON, 2018). Com a implantação de produtos tradicionais, naturais, no tratamento de feridas, o custo financeiro pode ser diminuído, objetivando a cicatrização precoce dessas lesões (DORAI, 2012; POSNETT et al., 2009).

Quanto ao tipo de cicatrização, subdividem-se em feridas de primeira intenção como as feridas cirúrgicas que cicatrizam através da justaposição das bordas, em feridas de segunda intenção que as bordas ficam distantes em virtude da grande perda tecidual, o que acarreta em um processo cicatricial mais lento. E em feridas de terceira intenção que são feridas as quais se romperam ou que são serão suturadas posteriormente (SILVA et al, 2017; BRUNNER & SUDDARRTH, 2014) (Figura 2).

Existem diversos fatores que estão interligados com a cicatrização, de modo que podem retardar esse processo, tais como hemorragias, hipovolemia, edema, corpos estranhos, déficit de oxigênio, acúmulo de secreção, sepse, imunossupressão, diabetes mellitus e desnutrição. Com isso requer uma maior gama de tecnologias e recursos, a fim de proporcionar uma melhor assistência ao paciente (SILVA et al, 2017; BRUNNER & SUDDARRTH, 2014).

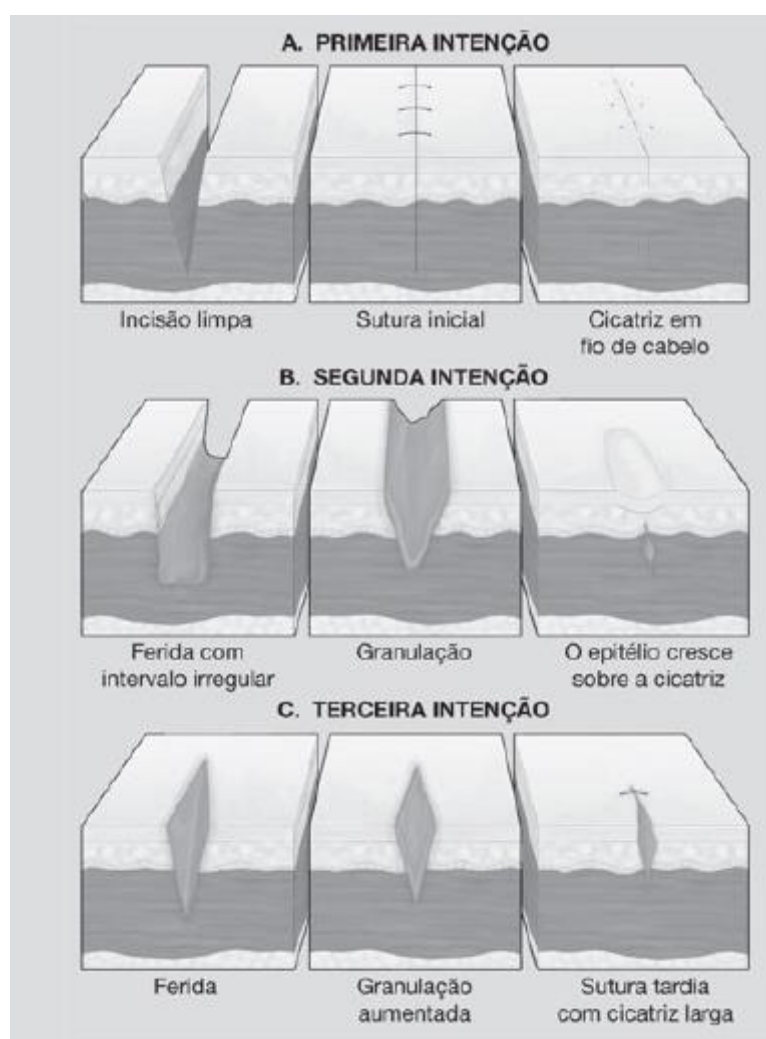


FIGURA 2- Mecanismos de Cicatrização das feridas (BRUNNER & SUDDARRTH, 2014).

2.3 FASES DA CICATRIZAÇÃO

O processo cicatricial envolve uma série de eventos que estão dispostos na fase de coagulação, inflamatória, proliferativa e de remodelação. À medida que é provocada uma lesão, o organismo atua envolvendo células extracelulares e ação de mediadores a fim de obter a reparação tecidual (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2016) (Figura 3).

Imediatamente, após ocorrer a lesão, é desencadeado o processo de hemostasia e coagulação com o propósito de evitar exsanguinação. De forma subsequente, a cascata de coagulação é ativada, resultando na agregação de plaquetas e formação de coágulos, formando um tampão rico em fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondina que além de causar hemostasia evita a invasão de microorganismos (OLIVEIRA; DIAS, 2012; VELNAR, BAILEY, SMRKOLJ, 2009; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

Com a ativação da cascata de coagulação, as plaquetas liberam fatores de crescimento, como *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Transforming Growth Factor- α* (TGF- α) e *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009). O VEGF atua na angiogênese e na granulação de tecidos na fase inicial da cicatrização, enquanto o PDGF é imprescindível para a inflamação, granulação, reepitelização e remodelação durante as três fases do processo de cicatrização (XIE et al., 2013).

Desse modo, os mecanismos inflamatórios iniciam-se com a vasodilatação intensificando sinais flogísticos, o aumento da permeabilidade vascular estimulado por prostaglandinas e histamina e atração de neutrófilos e macrófagos para a ferida em resposta celular os fatores de crescimento (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2017; MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2016; VELNAR, BAILEY, SMRKOLJ, 2009).

Os neutrófilos são atraídos ao leito da ferida após 24h de lesão têm como finalidade a destruição bacteriana, remoção de tecidos e excreção de citocinas como *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), a qual estimula macrófagos, queratinócitos, fibroblastos e expressão de fatores de crescimento para a angiogênese e síntese de colágeno. Subsequente os neutrófilos são substituídos por macrófagos (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2017).

Os macrófagos, por sua vez, chegam à ferida entre 48h a 96h, são imprescindíveis no processo de fagocitose de tecidos danificados, na atração de fatores quimiotáticos e produção de vários fatores de crescimento importantes para a estimulação da produção de tecido de

granulação. Além disso, estimulam a formação de fibroblastos (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2017; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

À medida que a concentração local dos fatores de crescimento e citocinas se elevam, os processos de regeneração vascular e fibroplasia se intensificam, formando um tecido rico em elementos vasculares e celulares, denominado tecido de granulação que, gradativamente, vai se alastrando e preenchendo o vazio resultante dos tecidos eliminados (CARLUCCI et al., 2007; McDOUGALL et al., 2006; NARINE et al., 2006; TENIUS et al., 2007).

A partir do 7º dia, têm a predominância de linfócitos no leito da ferida, os quais são atraídos pela *Interleukin-2* (IL-2), que agem secretando linfocinas, estimulando os macrófagos e fibroblastos (OLIVEIRA; DIAS, 2012; MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2016).

Em resposta, *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1) e fator de crescimento epitelial começam a atrair os fibroblastos, esses por sua vez vão liberar citocinas, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Interleukin-1* (IL-1), *Interleukin-2* (IL-2), *Interleukin-8* (IL-8), *Transforming Growth Factor- α* e β (TGF- α , TGF- β) e TNF- α . Dentre esses, o PDGF e TGF- α agem estimulando os fibroblastos e miofibroblastos para produção de nova matriz extracelular à base de proteínas de hialuronano, fibronectina, proteoglicanos e colágeno tipo I e tipo III (MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2016; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

No processo cicatricial, a angiogênese, formação de novos vasos, é fundamental para a cicatrização. É estimulada pelo *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) e impulsiona a migração de células endoteliais para a formação de capilares. Sabe-se que VEGF, TGF- β e angiogenina são moléculas essenciais no processo da angiogênese (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2017; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

A matriz de colágeno tipo III, que foi inicialmente produzida é reabsorvida em colágeno tipo I, sofre deposição no processo de remodelação que confere força de tensão à ferida. Além disso, a partir das collagenases e proteinases as fibras que estavam dispostas paralelamente são degradadas e os fibroblastos começam a depositar um novo colágeno com fibras mais espessas e resistentes (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2017; MARQUES, 2016; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

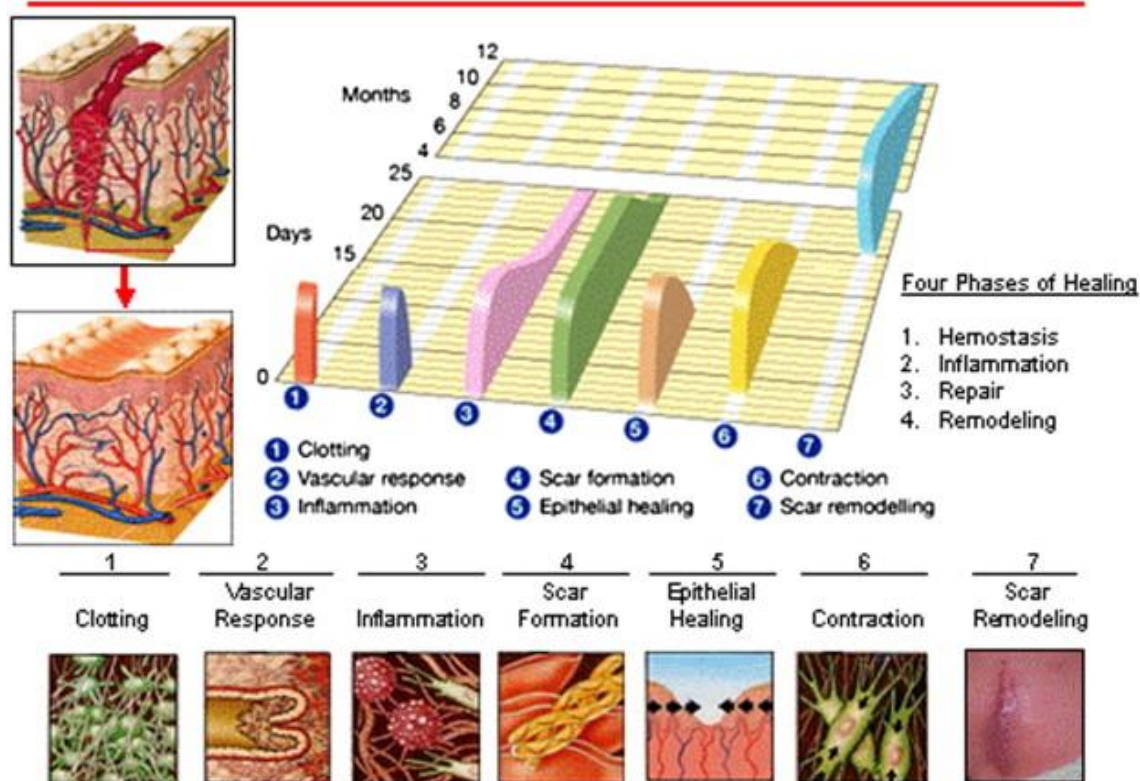


FIGURA 3- Eventos celulares e moleculares no dano tecidual a pele (OCHOA et al., 2014).

2.4 CURATIVOS

Desde a antiguidade existe a tentativa de encontrar procedimentos e meios, a fim de acelerar o reparo tecidual. O cenário, no que diz respeito aos curativos empregados, tem avançado e trazido consigo bons resultados, no entanto o elevado custo dos recursos, a cronicidade da lesão, comorbidades associadas e a diversidade de produtos com diferentes mecanismos são barreiras no processo de cicatrização (SILVA et al., 2017; SILVA; ALMEIDA; ROCHA, 2014; MANDELBAUM; DI SANTIS; SANT'ANA MANDELBAUM, 2003b).

A partir da década de 70 e com o avanço da tecnologia, as pesquisas intensificaram e comprovaram diversas vertentes que perduram até hoje. Dentre as diversas características comprovadas, sabe-se que a manutenção do ambiente úmido na ferida, a facilidade de remoção e a diminuição da troca do curativo, boa relação custo/benefício, manutenção das áreas periféricas secas e protegidas e a facilidade de aplicação contribuem para o sucesso cicatricial (SILVA et al., 2017; MANDELBAUM; DI SANTIS; SANT'ANA MANDELBAUM, 2003b).

O curativo é um recurso com a finalidade de favorecer proteção, umidade, preservação da pele e ação no processo tecidual. Existe atualmente uma ampla variedade de curativos

(Figura 4) que têm o objetivo de proteger as feridas de agentes flogísticos e ressecamento na fase de cicatrização, além de manter as células viáveis e facilitar a liberação de fatores estimulantes da proliferação (SMANIOTTO et al., 2012).

	Mecanismo de ação	Indicações	Desvantagem
Alginato de cálcio	Hemostasia, absorção de exsudatos e desbridamento autolítico.	Feridas exsudativas ou com sangramento, agudas ou crônicas	Não deve ser usado em feridas simples e secas.
Hidrogel	Quimiotático para leucócitos, favorece a angiogênese, promove desbridamento autolítico e mantém o meio úmido ideal.	Queimaduras e feridas com tecidos desvitalizados.	Não deve ser usado na presença de infecção.
Hidrocolóide	Absorve pequeno volume de exsudato e mantém o meio úmido.	Proteção de proeminência óssea e feridas com lesão parcial de pele.	Não deve ser usado na presença de infecção e de grande quantidade de exsudato e necessita de trocas frequentes.
Filme transparente	Mantém a umidade e o pH natural da pele.	Feridas secas ou com dano parcial de tecido e queimaduras.	Descolam gradativamente nas áreas já epitelizadas e podem provocar hipersensibilidade.
Acetato de celulose	Mantém o meio úmido e tem permeabilidade seletiva.	Queimaduras e áreas doadoras de enxerto.	Ruptura do curativo em regiões de articulação e baixo poder de absorção.

Gaze não aderente	Evitam aderência do curativo à ferida e evitam a dor durante a troca.	Queimaduras superficiais, pós-traumas e feridas com formação de tecido de granulação.	Alguns tipos de gaze não aderentes são impregnados com antimicrobianos, que podem ser tóxicos aos fibroblastos.
--------------------------	---	---	---

FIGURA 4- Tipos de curativos disponíveis. Adaptado de SMANIOTTO et al., 2012 e MANDELBAUM; DI SANTIS; SANT'ANA MANDELBAUM, 2003b.

Além desses, existem curativos derivados de biomateriais que apresentam diversas vantagens, dentre elas, compõem a matriz natural do tecido, ou seja, são biocompatíveis no que se refere à toxicidade, biodegradáveis e capazes de incorporar compostos ativos como, por exemplo, agentes antimicrobianos e fatores de crescimento, possibilitando o contato direto no local da injúria e tem um custo menor do que esses já preconizados no mercado (BOATENG et al., 2012).

Existe no mercado produtos utilizados para a aceleração do processo cicatricial, como os derivados de *Aloe vera* que representa atividade anti-inflamatória e cicatrizante, através do aumento de fibroblastos, estímulo na secreção do VEGF (FREITAS; RODRIGUES; GASPI, 2014).

Diante disso, polímeros naturais têm sido cada vez mais estudados para o manejo de feridas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, ausência de toxicidade e baixa antigenicidade (BAYER et al., 2012; CEN et al., 2008; CHENG et al., 2004; PATI et al., 2012).

2.5 MEMBRANA

Membranas de polímeros naturais apresentam como características a capacidade de reabsorção, biocompatibilidade e ausência de toxidade, esses aspectos benéficos contribuem significativamente no tratamento de feridas, pois como apresenta facilidade na aplicação não será necessária uma intervenção cirúrgica para sua remoção, evitando complicações pós-operatórias e desconforto do paciente (DIAS et al., 2011; NUNES et al., 2016; OH et al., 2013).

Diante da sua pluralidade de benefícios, existem alguns estudos que vêm explorando a associação de polímeros com compostos bioativos no processo de reparação tecidual, como a

eficácia da gelatina em traumas físicos quando associado com ácido hialurônico (THANUSHA; DINDA; KOUL, 2018) na cicatrização de feridas em diabéticos quando incluído com íons bioativos (LV et al., 2017) e em queimaduras quando incorporado com lipossomas e ácido usnico (NUNES et al., 2016).

A gelatina é um polímero natural formada a partir do colágeno que tem como característica a porosidade e liberação controlada de compostos ativos nos tecidos (THANUSHA; DINDA; KOUL, 2018; DANTAS et al., 2011). Além disso, estudos reportam sua eficácia na aceleração da granulação e epitelização (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al., 2009).

Diante dessas características, a gelatina é uma alternativa promissora, tendo em vista que apresenta aspectos positivos e não tem problemas relacionados à baixa estabilidade e resistência na forma como a membrana de colágeno (NUNES et al., 2016).

2.6 LIPOSSOMAS

Mediante a limitação da biodisponibilidade de fármacos no organismo, houve um estímulo na inovação da pesquisa. Estudos com lipossomas, micelas e dendrímeros têm sido amplamente abordados na descoberta para aplicação clínica e eficácia no tratamento (LAMICHHANE, et al., 2018).

Os lipossomas são vesículas membranosas com uma bicamada de fosfolipídios naturais e colesterol, biodegradáveis, biocompatíveis e que fornece uma liberação controlada do fármaco, permitindo a redução da toxicidade e melhorando consequentemente a biodisponibilidade (AKBARZADEH et al., 2013; NUNES et al., 2016).

Além disso, tem como propriedade a hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade, ou seja, tem a afinidade e é solúvel em água e lipídeos, por isso pode ser usado como veículo em drogas insolúveis em água, como é o caso da Naringenina (NUNES et al., 2016).

2.7 PRODUTOS NATURAIS

O uso de produtos naturais para tratamento é uma prática utilizada desde a antiguidade. Com a grande diversidade da fauna e da flora brasileiras, a partir da colonização do Brasil intensificou-se a busca científica no manejo das plantas para tratamento de diversas doenças (ALMEIDA; MARTINEZ; PINTO, 2017).

Os produtos naturais são fontes ricas de componentes bioativos que vêm demonstrando eficácia no tratamento de algumas doenças (GEORGE; DELLAIRES; RUPASONGHE, 2016). A sua obtenção ocorre a partir da extração de plantas para possível utilização de fins terapêuticos (OKODUWA et al., 2016).

Os extratos obtidos apresentam diversos compostos bioativos como alcalóides, glicosídeos, fenólicos, terpenóides e flavonóides (OKODUWA et al., 2016).

Dentre os compostos bioativos, é possível destacar os flavonóides, eles são compostos polifenólicos que têm sido alvo de muitas pesquisas, estão presentes em frutas, vegetais, chás e vinho (GEORGE; DELLAIRES; RUPASONGHE, 2016). Esses compostos apresentam diversas atividades como anti-inflamatória (NAPIMOGA et al., 2013), antitumoral (QINGLIN, et al., 2017), antioxidantes e antimicrobiana (OLIVEIRA, et al., 2012).

2.8 NARINGENINA

Dentre os flavonóides promissores para a indústria farmacêutica, a Naringenina (NAR) é um flavonóide abundante em frutas cítricas e que representa um composto promissor para fins terapêuticos. Estudos reportam seus efeitos anticancerígenos, antimutagênicos, anti-inflamatórios, antifibrinogênicos e antioxidantes (DOU et al., 2013; VAN MEEUWEN et al., 2007; GALLUZZO et al., 2008).

Entretanto, alguns compostos naturais apresentam uma limitada aplicabilidade por conta de sua característica hidrofóbica, como é o caso da Naringenina. Os lipossomas aparecem como novo advento para melhorar as propriedades farmacológicas de tais compostos (AKBARZADEH et al., 2013). A utilização da NAR em lipossomas tem sido usada para melhorar a resposta terapêutica do fármaco, promovendo melhorias na solubilidade, biodisponibilidade, estabilidade e permitindo uma redução de efeitos colaterais (NUNES et al., 2016).

Diante disso, a Naringenina quando incorporada em lipossomas apresenta um grande potencial terapêutico, o que a torna candidata a fármaco para o tratamento de feridas cutâneas abertas.

3 JUSTIFICATIVA

A pele tem como função promover e manter harmonia no corpo humano, quando lesionada desencadeia respostas em virtude do comprometimento da sua função básica. As feridas crônicas, por sua vez, têm como característica um processo cicatricial demorado, o que provoca desconforto físico e psicológico ao paciente. Além disso, o elevado custo, internações prolongadas, amputações, absenteísmo no trabalho e alteração no bem-estar fazem parte da realidade de pessoas com feridas crônicas, sendo esse um grave problema de saúde pública.

O uso de produtos naturais como agentes terapêuticos têm despertado o interesse de pesquisadores em identificar e desenvolver compostos que apresentem baixo custo, menor número de efeitos colaterais e maior biodisponibilidade. As plantas medicinais são fontes ricas de componentes bioativos que vêm se demonstrando eficácia no tratamento de algumas doenças.

O Nordeste é um grande fornecedor de produtos primários resultantes da agricultura. Sergipe ocupa a quarta posição de produtor de laranja, destacando-se na exportação. Por sua vez, a Naringenina é encontrada na casca da laranja. Fator esse que possibilita, viabiliza e reduz custos para a realização do estudo.

Tomando como base as características farmacológicas já descritas na literatura da NAR associada com a necessidade de novas alternativas para a aceleração do processo cicatricial o presente trabalho tem como proposta avaliar a possível ação cicatrizante da NAR em lipossomas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da naringenina em lipossomas incorporada a membranas bioativas de gelatina (GEL/NAR) sobre a cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal de ferida excisional aberta.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de GEL/NAR sobre o processo cicatricial de feridas cutâneas excisionais em modelo animal;
- Determinar as alterações morfológicas do processo de cicatrização de feridas cutâneas excisionais induzidas pelo tratamento com GEL/NAR;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA

Esse estudo é de caráter experimental que segue um planejamento rigoroso para realização de todos protocolos experimentais, os quais foram realizados no Laboratório de Neurociências e Ensaio Farmacológicos (LANEF).

5.2 OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS DE GELATINA

As membranas contendo gelatina e lipossomas ou gelatina contendo lipossoma e naringenina (GEL/NAR) nas concentrações de 1% e 2,5% foram obtidas e caracterizadas em parceria com o Laboratório de Ensaio Farmacêuticos e Toxicidade (LEFT), localizado na Universidade Federal de Sergipe (UFS), sob coordenação do Prof. Dr. Adriano Antunes de Sousa Araújo.

O desenvolvimento do processo envolveu a preparação das formulações farmacêuticas e a caracterização das mesmas.

5.3 ANIMAIS

Foram utilizados 80 ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem Wistar (250-300 g) oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe (DFS/UFS). Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12:00h/12:00h (claro: 6 às 18 h; escuro: 18 às 6 h), à temperatura de $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com dieta balanceada com ração do tipo “pallet”, acesso livre a água e em gaiolas com dimensões 41 x 34 x 16 cm, no Biotério do Laboratório de Neurociências e Ensaio Farmacológicos, localizado no Departamento de Fisiologia (LANEF/DFS). Todos os protocolos experimentais propostos respeitaram os critérios éticos de experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFS (CEPA/UFS: 71/2015).

5.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

5.4.1 Delineamento Experimental

Neste estudo, utilizou-se o modelo animal de feridas cutâneas abertas. Os animais utilizados para a realização dos protocolos experimentais foram distribuídos, ao acaso, em 4 grupos constituído cada um por 8 animais (Figura 5).

- GEL/BR: Constituído por animais submetidos à confecção da ferida e tratados com membrana de gelatina com lipossomas;
- GEL/NAR 1%: Constituído por animais submetidos à confecção da ferida e tratados com membranas bioativas de gelatina contendo lipossomas e naringenina à 1%;
- GEL/NAR 2,5%: Constituído por animais submetidos à confecção da ferida e tratados com membranas bioativas de gelatina contendo lipossomas e naringenina à 2,5%;
- LP: Constituído por animais submetidos à confecção da ferida e sem tratamento.

No dia da confecção das feridas foram aplicadas as membranas de acordo com cada grupo, as quais permaneceram por sete dias consecutivos até a retirada da ferida.

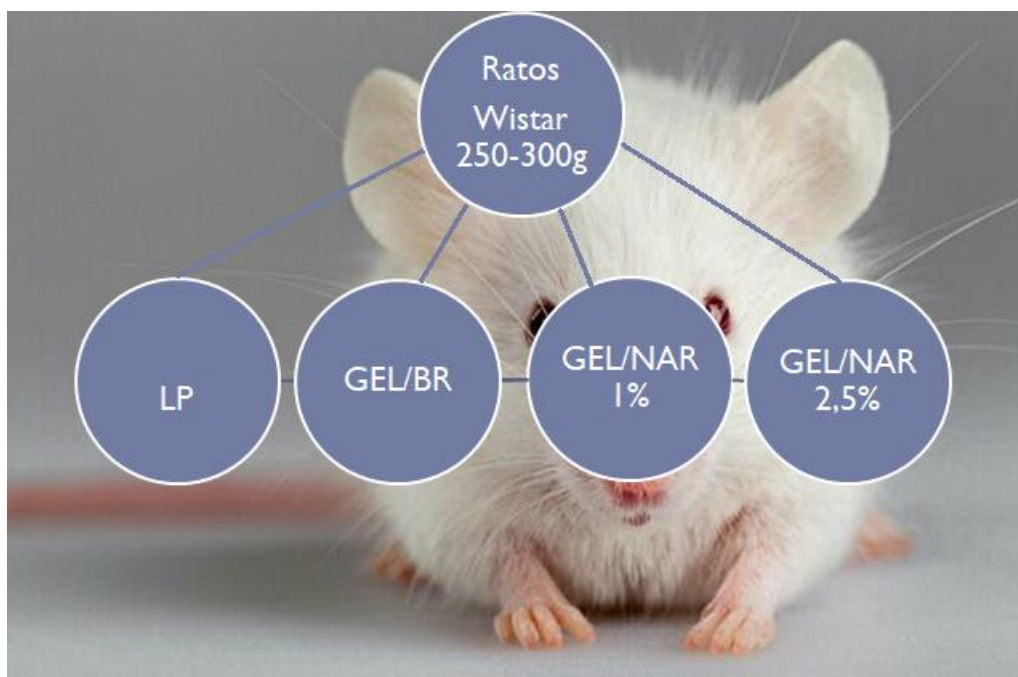


FIGURA 5- Grupos experimentais Fonte: Acervo Pessoal.

5.4.2 Modelo De Ferida Cutânea Excisional

Para a realização do procedimento cirúrgico, todos os animais foram pesados e anestesiados (Ratos: ketamina na dose de 80 mg/kg e xilazina na dose de 10 mg/kg), por via intraperitoneal. Após atingir o plano anestésico, os animais foram tricotomizados na região dorsal e foi realizada a antisepsia com iodo-povidona tópico a 10% (POVIDONE) (Figura 6).

O modelo de ferida cutânea excisional, que mimetiza uma ferida cutânea aberta, consiste na confecção de um ferimento do tegumento da região dorso-costal do animal que envolve a remoção completa da epiderme e da derme com a profundidade dos planos fasciais ou gordura subcutânea o qual permanece aberto para que possa ocorrer uma cicatrização por segunda intenção. A técnica operatória foi padronizada para todos os animais de cada grupo e consistiu na excisão total da pele e hipoderme realizada com um *punch* metálico para biópsia com 8 mm de diâmetro (*Richter*) no centro da área tricotomizada. Não foi realizada sutura nas feridas. A hemostasia foi feita por compressão digital com compressa de gaze. A cicatrização ocorre a partir das margens e na base da ferida pela formação de um coágulo de fibrina que é invadida por tecido de granulação e pela migração de uma língua epidérmica ao longo da interface entre o tecido de granulação e coágulo. Isso proporciona grande quantidade de tecido de granulação, fundamental para a contagem dos elementos do mesmo (BARRETO et al., 2013; FREITAS et al., 2010).

Ao final do procedimento cirúrgico, foi realizada a fotografia, mensuração da ferida com paquímetro digital para posterior análise e imediatamente foi realizado o tratamento tópico em dose única que permaneceu por 7 dias (Figura 6).

Os animais foram realocados (2 a 2) nas suas respectivas gaiolas com ração e água *ad libitum* e foram examinados diariamente, durante 7 dias, quanto à mobilidade e às condições da ferida e suas complicações, com registro em fichas individuais. Após 7 dias realizou-se novas fotografias, mensurações e retirou-se o tecido necessário da ferida para ser direcionado ao processamento histológico após eutanásica (Figura 6).

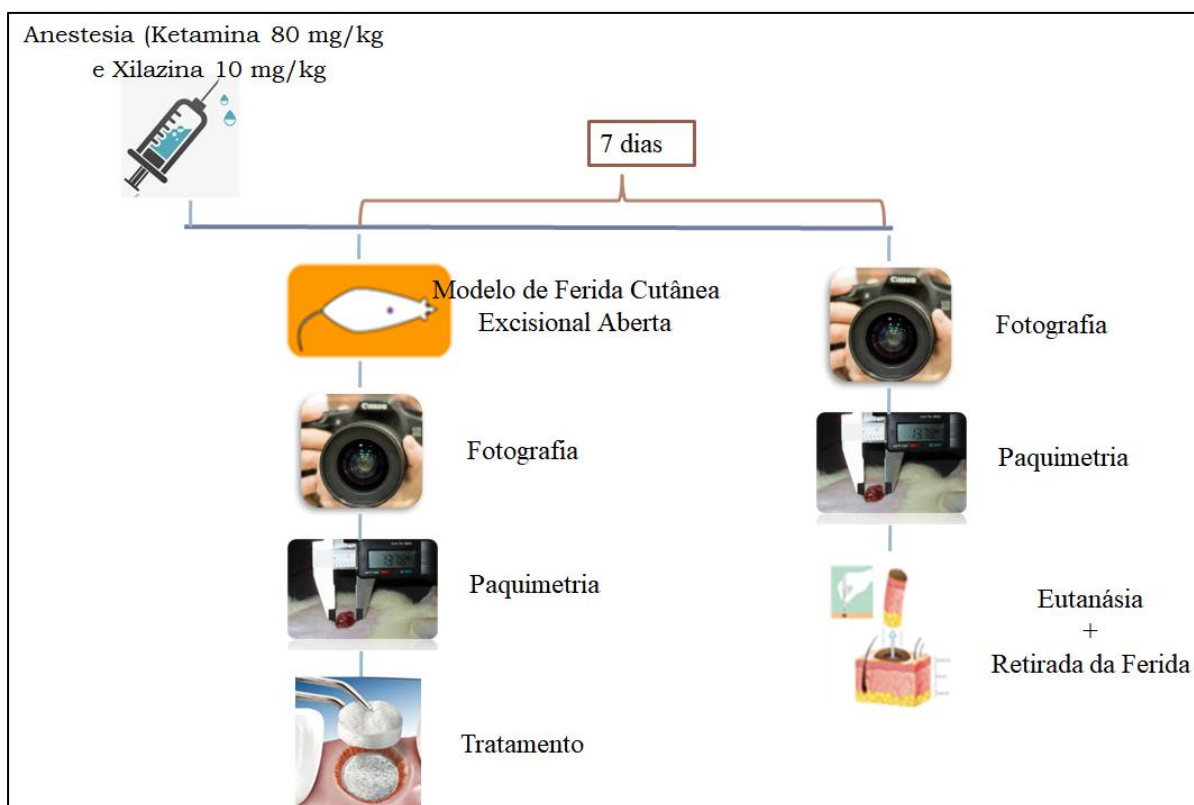


FIGURA 6- Delineamento experimental. Fonte: Acervo pessoal.

5.3.3 Avaliação Macroscópica

A avaliação macroscópica ocorreu no 7º dia após a confecção da ferida, posteriormente, os animais foram pesados e então sacrificados com dose letal de anestésico. Após a eutanásia, os ratos foram colocados em mesa cirúrgica e tiveram suas feridas fotografadas com câmera de celular iphone 5S 8.0 mega pixels, com resolução 3264 x 2448 pixels, à distância constante de 10 cm da mesa cirúrgica. Foi realizada a medida do diâmetro da ferida residual no eixo crânio-caudal e latero-lateral com paquímetro digital (MessenÒ) (Figura 7). Para a determinação das áreas das feridas, utilizou-se uma variação da fórmula $A = \pi \cdot R \cdot r$, 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 corresponderão 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., 2013). Para a determinação da área resultante (AR), utilizou-se a fórmula $[(A0 - At) / A0] \times 100 = AR$, onde: A0 – Área inicial após confecção; At – Área final medida antes da retirada da ferida e AR = Área resultante (AGRA et al., 2013).



FIGURA 7- Foto paquímetro digital. Fonte: Acervo pessoal.

5.3.4 Análise Histológica

Após os protocolos de avaliação macroscópica, os ratos foram eutanasiados no 7º dia pós-operatório e a área residual da ferida foi retirada com margem de 1 cm 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 em estereomicroscópio com 2x de aumento para verificação de crostas, secreções, necroses e cicatrizes hipertróficas. Cada peça foi fixada por alfinetes em EVA e colocada em recipiente plástico com solução de formol tamponado (10%) por 48h para a fixação.

Decorrido o período de 48h, as peças foram seccionadas transversalmente, clivagem, e tratadas convenientemente para a inclusão em parafina, seguiu-se com secção em micrótomo (5 µm) e coloração em Hematoxilina-Eosina (HE) para análise histopatológica (Figura 8).

Após coloração, as lâminas foram avaliadas quanto à proliferação vascular, presença de células mononucleares e polimorfonucleares, proliferação de fibroblastos e epitelização na área de cicatrização.

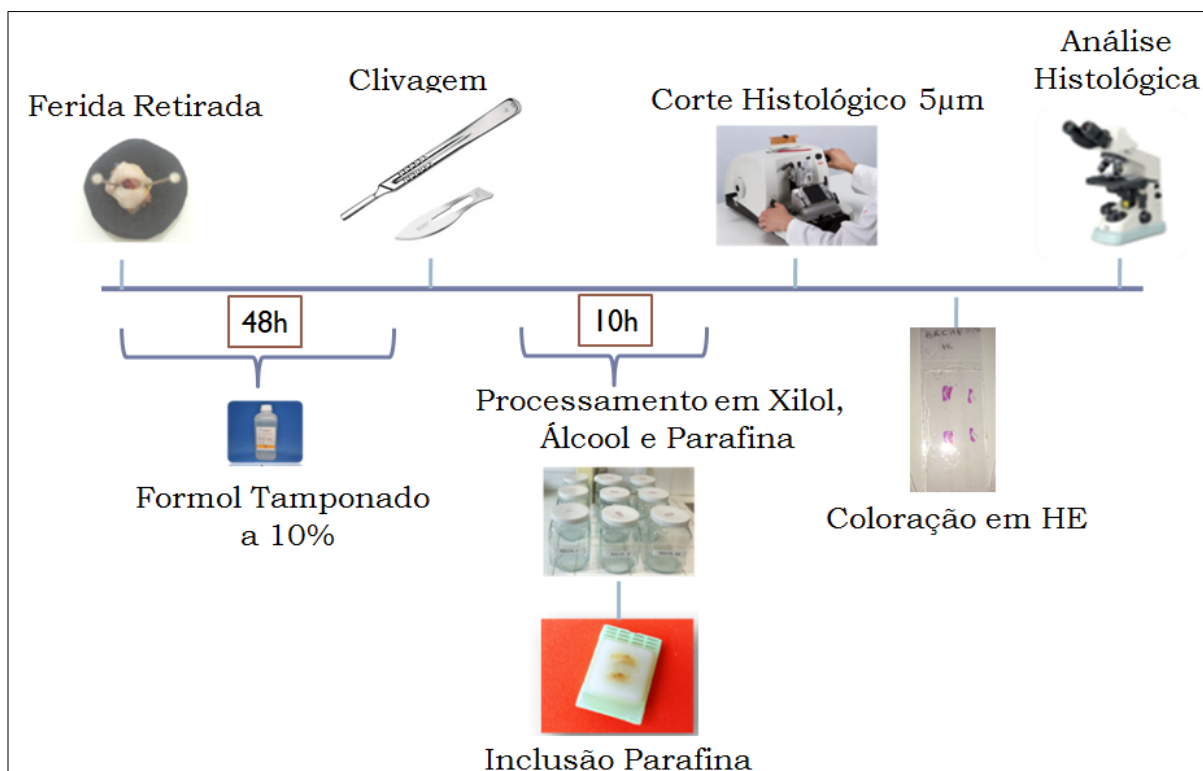


FIGURA 8- Processamento histológico. Fonte: Acervo pessoal.

5.3.4.1 Análise Histomorfológica da Reação Inflamatória

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

A intensidade do processo inflamatório foi observada e determinada de acordo com os seguintes critérios:

- 1: Quando as células inflamatórias, independentemente de seu fenótipo, constituíram menos de 10% da população celular observada na área da ferida cirúrgica (leve ou ausente);
- 2: Quando as células inflamatórias, independentemente de seu fenótipo, constituíram entre 10% e 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica (moderada) e;
- 3: Quando as células inflamatórias, independentemente de seu fenótipo, constituíram mais de 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica (severa) (BARRETO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2009).

A tipagem da reação inflamatória foi determinada considerando-se a análise quantitativa das diferentes células inflamatórias individualmente, a saber: neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos, identificadas pela sua morfologia específica. Desta forma, esta análise obedeceu aos mesmos critérios de classificação descritos acima (1, 2 ou 3).

Após a semi-quantificação, a reação inflamatória foi categorizada de acordo com o fenótipo inflamatório predominante em:

- Inflamação aguda: Predominação de neutrófilos e/ou eosinófilos;
- Inflamação subaguda: Equilíbrio entre neutrófilos/eosinófilos e linfócitos/plasmócitos;
- Inflamação crônica inespecífica: Predomínio de linfócitos e/ou plasmócitos;
- Inflamação crônica granulomatosa: Predominação de macrófagos e/ou gigantócitos (BARRETO et al., 2013; RIBEIRO et al., 2009).

5.3.4.2 Determinação do Índice de Percentual de Epitelização da Superfície da Ferida

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

Ep – Percentual de epitelização;

Eex – Extensão superficial ocupada pelo epitélio neoformado;

Et – Extensão total do ferimento

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente utilizando-se GraphPad Prism versão 5.0, através do teste de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

No presente estudo, as lesões cutâneas foram analisadas macroscopicamente, por meio de mensuração da área reducional da ferida. Histologicamente, quanto ao tipo e à intensidade de infiltrado inflamatório, ao índice de epitelização, bem como, na observação de elementos que compõe a reestruturação tecidual, como proliferação de vasos, presença de fibroblasto, o surgimento folicular e glandular na composição do tecido neoformado.

6.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

No 7º dia de experimentação, os dados obtidos na redução da área da ferida residual foi significativa para o grupo BR ($61,83992 \pm 1,825863$; $p < 0,001$), GEL/NAR 1% ($56,16075 \pm 3,653587$; $p < 0,001$) e GEL/NAR 2,5% ($58,21967 \pm 1,651126$; $p < 0,001$) quando comparado ao LP ($37,41523 \pm 6,276465$) e não apresentaram diferença estatística entre eles (Figura 9 e 10).

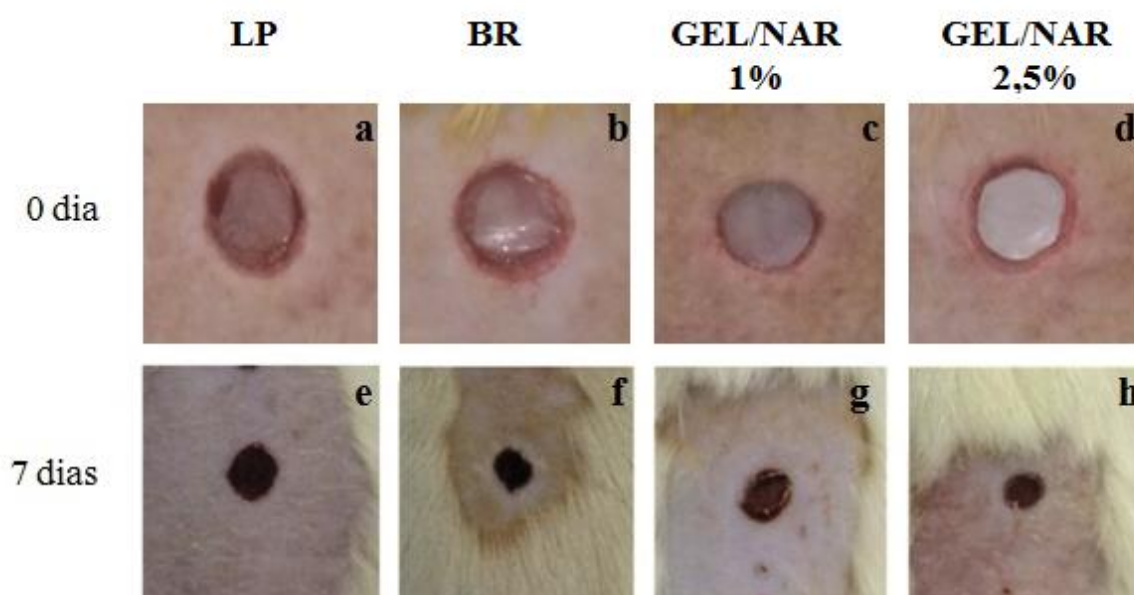


FIGURA 9- Efeito da naringenina (GEL/NAR) na área das feridas nos ratos. Grupos de ratos foram tratados por 7 dias com membrana de gelatina contendo lipossomas (BR) (b,f); membrana de gelatina contendo lipossomas e NAR 1% (c,g); membrana de gelatina contendo lipossomas e NAR 2,5% (d,h) ou sem tratamento (LP) (a,e). Correspondendo ao dia 0 (a,b,c,d), momento da confecção da ferida, e ao dia 7 (e,f,g,h), momento da retirada da ferida.

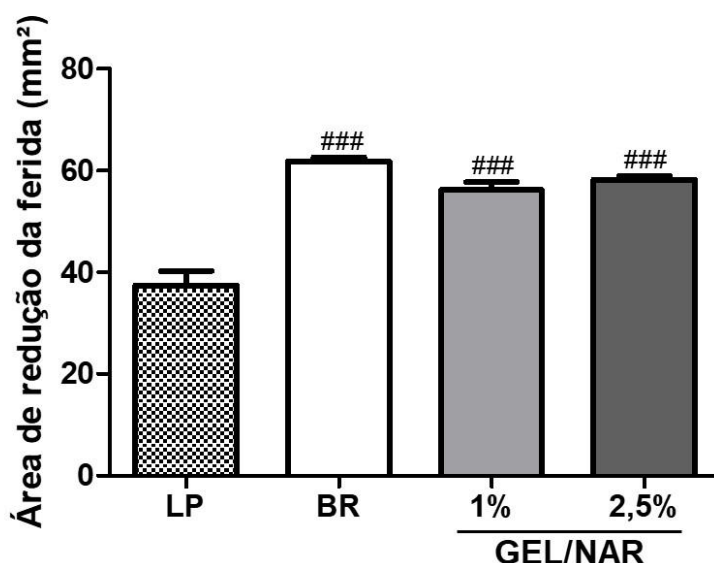


FIGURA 10- Efeito da naringenina (GEL/NAR) sobre a mensuração da redução da área da ferida residual (mm²) por 7 dias. Grupos de ratos foram tratados com membrana de gelatina contendo lipossomas (BR); membrana de gelatina contendo lipossomas e NAR 1%; membrana de gelatina contendo lipossomas e NAR 2,5% ou sem tratamento (LP). Os valores estão representados pela média e com ^{###}p < 0,001 quando comparado ao grupo LP. ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey (n= 8/grupo).

6.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

A avaliação microscópica foi constituída de análise das lâminas coradas em HE quanto às características histológicas associadas ao processo inflamatório/reparativo, observando-se os critérios de intensidade, tipo de infiltrado inflamatório e índice de epitelização após o 7º dia pós-cirúrgico.

A intensidade da resposta inflamatória foi classificada como moderada nos grupos LP (a) e BR (b) e leve no grupo GEL/NAR 2,5 % (d). Além disso, de acordo com o fenótipo inflamatório observou-se inflamação subaguda nos grupos LP (a) e BR (b) em virtude do equilíbrio entre neutrófilos e linfócitos e inflamação crônica inespecífica nos grupos GEL/NAR 1% (c) e 2,5% (d) diante do predomínio de linfócitos (Figura 11 e Tabela 1).

Os grupos GEL/NAR 1% e GEL/NAR 2,5% (c e d) demonstraram uma maior vascularização e deposição de fibroblastos em comparação com os grupos LP e BR (a, b).

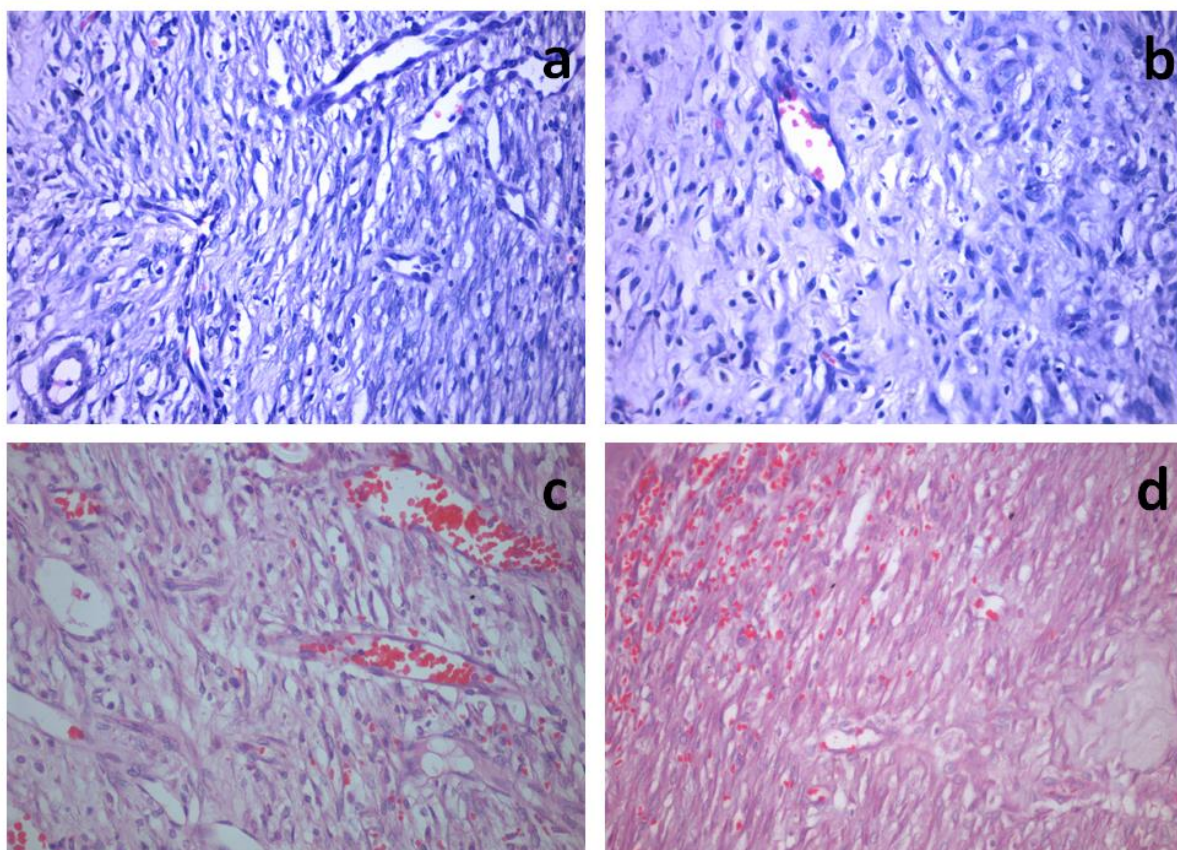


FIGURA 11- Efeito da naringenina (GEL/NAR) na análise histológica das secções de feridas coradas em HE. Grupos de ratos foram tratados por 7 dias com membrana de gelatina contendo lipossomas (BR) (b); membrana de gelatina contendo lipossomas e NAR 1% (c); membrana de gelatina contendo lipossomas e NAR 2,5 % (d) ou sem tratamento (LP) (a). Foi observada reação inflamatória do tipo moderada nos grupos LP (a) e BR (b) e NA 1% (c) e inflamação leve no grupo NA 2,5 % (d). Inflamação subaguda nos grupos LP (a) e BR (b) e crônica inespecífica nos grupos GEL/NAR 1% (c) e 2,5% (d).

TABELA 1- Avaliação do infiltrado inflamatório a partir da análise histológica das secções de feridas coradas em HE. Grupos de ratos foram tratados por 7 dias com membrana de gelatina contendo lipossomas (BR); membrana de gelatina contendo lipossomas e NAR 1%; membrana de gelatina contendo lipossomas e NAR 2,5 % ou sem tratamento (LP).

Grupo	Animais	Intensidade da Reação Inflamatória	Leucócitos					
			Neut.	Eosin.	Linf.	Plasm.	Macr.	Gig.
LP	R1	2	2	1	1	1	1	1
	R2	2	2	1	2	1	2	1
	R3	2	1	1	2	1	2	1
	R4	2	1	1	2	1	2	1
	R5	2	2	1	1	1	2	1
	R6	2	1	1	1	1	1	1
	R7	2	1	1	1	1	2	1
BR	R1	2	2	1	1	1	1	2
	R2	2	2	1	2	1	2	1
	R3	2	1	1	2	1	2	2
	R4	3	2	1	1	1	2	1
	R5	2	1	1	1	1	2	1
	R6	2	1	1	2	1	2	1
GEL/NAR 1,0%	R1	2	2	1	1	1	2	1
	R2	2	1	1	2	2	1	1
	R3	2	2	1	1	1	2	1
	R4	2	1	1	2	1	1	1
	R5	1	1	1	1	1	1	1
	R6	1	1	1	1	1	1	1
	R7	2	1	1	2	2	2	1
GEL/NAR 2,5%	R1	1	2	1	1	1	1	1
	R2	1	1	1	2	1	1	1
	R3	2	1	1	1	1	2	1
	R4	1	1	1	2	1	1	1
	R5	2	1	1	2	1	1	1
	R6	1	1	1	2	1	1	1
	R7	2	1	1	1	1	1	1

1: Representação menor que 10%; 2: Representação entre 10% a 50%; Representação maior que 50%. Neut.: Neutrófilos, Eosin.: Eosinófilos, Linf.: Linfócitos, Plasm.: Plasmócitos, Macro.: Macrófagos, Gig.: Gigantócitos.

Em relação à resposta inflamatória, foi possível observar uma resposta inflamatória do tipo moderada a severa nos grupos LP e BR, haja vista apresentaram uma quantidade considerável de células inflamatórias (entre 10 e 50% ou > 50%), enquanto que a intensidade inflamatória foi menor nos grupos GEL/NAR 1% (predomínio de amostras de tecido com leucócitos entre 10 e 50%) e GEL/NAR 2,5% (predomínio de amostras de tecido com leucócitos < 10%), sendo classificada de leve a moderada), enquanto que a intensidade inflamatória foi menor nos grupos GEL/NAR 1% (predomínio de amostras de tecido com leucócitos entre 10 e 50%) e GEL/NAR 2,5% (predomínio de amostras de tecido com leucócitos < 10%), sendo classificada de leve a moderada (Tabela 1).

Embora no 7º dia pós-cirúrgico não houve diferença significativa na análise macroscópica da área da ferida entre GEL/NAR 1% e 2,5% e BR, pode-se observar que histologicamente o processo de cicatrização encontrou-se mais adiantado nos grupos tratados com GEL/NAR 1% e 2,5% quando comparado aos grupos LP e BR.

Em relação ao índice de epitelação, observou-se que o grupo GEL/NAR 1,0% ($80,000 \pm 15,3188$; $p < 0,01$) registrou valores significativos comparado ao LP ($58,6571 \pm 6,3892$), enquanto o grupo GEL/NAR 2,5% ($75,2857 \pm 17,3754$; $p < 0,05$) foi significativo quando comparado aos grupos LP ($58,6571 \pm 6,3892$) e BR ($51,5714 \pm 11,0432$) (Figura 12). Dessa forma, o resultado da epitelação no 7º dia corrobora com a análise histológica realizada nos diferentes grupos, onde foi observado uma maior deposição de fibroblastos nos grupos GEL/NAR 1,0% e GEL/NAR 2,5% (Figura 11).

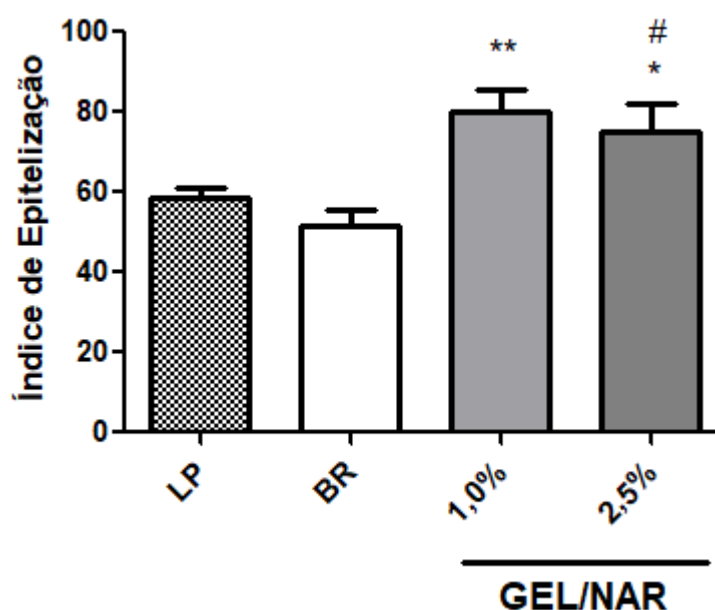


FIGURA 12- Efeito da naringenina (GEL/NAR) sobre o índice de epitelação em feridas cutâneas abertas. Grupos de ratos foram tratados por 7 dias com membrana de gelatina contendo lipossomas (BR); membrana de gelatina contendo lipossomas e NAR 1%; membrana de gelatina contendo lipossomas e NAR 2,5 % ou sem tratamento (LP). Os valores estão representados pela média e com * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo LP e # $p < 0,05$ quando comparado com o grupo BR. ANOVA uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey ($n = 8/\text{grupo}$).

7 DISCUSSÃO

A cicatrização é um processo dinâmico com uma sequência de fases sobrepostas que envolve a atuação de citocinas, células sangüíneas, fatores de crescimento e matriz extracelular (WANG et al., 2018; MASI et al., 2016).

No início da fase da inflamação os neutrófilos são as primeiras células a serem atraídas por agentes quimiotáticos como TGF- β para o leito da ferida. Esses são responsáveis por fagocitar e destruir todo material estranho, liberar enzimas proteolítica e espécies de radicais livres derivados do oxigênio. Após isso, macrófagos chegam ao local da injúria (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009). Os grupos LP e BR foram classificados como inflamação subaguda, tendo em vista que expressaram uma grande quantidade de neutrófilos, o que pode inferir que esses grupos mesmo após 7 dias de tratamento ainda estava na fase inicial da inflamação.

Posteriormente os macrófagos são atraídos ao leito da ferida e continuam com o processo de fagocitose e na ativação de células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009). No processo da fase inflamatória tardia, os linfócitos são as últimas células a atuarem no processo cicatricial, são atraídos pela IL-1, a qual tem papel fundamental na organização da collagenase.

A fase proliferativa é caracterizada pela migração e deposição de fibroblastos e atuação de agentes quimiotáticos como VEGF e TGF- α que são essenciais para a formação de novos vasos (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009) O VEGF pode agir sobre a quimiotaxia e vasodilatação, conferindo nutrição necessária para o reparo tecidual (MASI et al., 2016; BAO et al., 2009).

Os grupos tratados com GEL/NAR 1% e GEL/NAR 2,5% foram classificados com inflamação crônica inespecífica, pois apresentaram predomínio de linfócitos. Demonstraram uma maior vascularização e deposição de fibroblastos quando comparado aos outros grupos. A partir desses dados é possível entender que as membranas bioativas com NAR foram fundamentais no processo cicatricial, visto que houve aceleração nas fases da cicatrização.

Além disso, sugere-se que o tratamento com GEL/NAR 2,5% aumentou concentração de VEGF, o que favoreceu a cicatrização, acelerou a fase inflamatória, induziu a formação de novos vasos e promoveu a nutrição tecidual. Tendo em vista que quanto à intensidade da resposta inflamatória a GEL/NAR 2,5% foi classificada como leve, enquanto os grupos LP, BR, GEL/NAR 1% foram classificados como moderado.

O efeito positivo da GEL/NAR na resposta inflamatória pode estar relacionado com a capacidade de reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, inibir a síntese de ânion superóxido e o recrutamento leucocitário, agir nos macrófagos e induzir a ativação do *Nuclear Factor Erythroid 2* (NrF2) (MANCHOPE; CASAGRANDE; VERRI, 2016).

A epitelização é descrita pela migração de células epiteliais das margens da ferida ao centro (OLIVEIRA; DIAS, 2012; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Os fibroblastos deslocam-se para a ferida e são estimulados pelo PDGF para serem ativados e proliferar-se, posteriormente, o TGF- β impulsiona os fibroblastos a sintetizar colágeno tipo 1 e a se transformarem em miofibroblastos, ricos em actina e miosina, que estão envolvidos no processo da contração da ferida (MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2016; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). O tratamento com membranas bioativas contendo NAR favoreceu a epitelização através da maior deposição de fibroblastos (Figura 12) durante o período experimental de 7 dias, demonstrando evolução significativa no processo cicatricial.

A formação do tecido de granulação envolve a atuação dos miofibroblastos na sobreposição e entrelaçamento das fibras de colágeno (OLIVEIRA; DIAS, 2012; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009). As fibras de colágeno atuam restaurando as superfícies das feridas e reparando a lesão através da multiplicação de células e do surgimento do colágeno para a cicatrização (BURLANDO; CORNARA, 2013). Sendo assim, sugere-se que o tratamento com membranas bioativas contendo GEL/NAR 2,5% acelerou a formação do tecido de granulação através de uma possível deposição de colágeno e atividade dos miofibroblastos, o que reflete na redução da área resultante.

8 CONCLUSÃO

Diante dos dados observados acerca do efeito de GEL/NAR sobre a cicatrização de feridas cutâneas excisionais em roedores, pode-se concluir que o GEL/NAR 2,5% acelerou o processo de cicatrização evidenciado pela redução da área residual da ferida, classificação como inflamação leve e redução de neutrófilos. Sugere-se que o tratamento com GEL/NAR 1% e 2,5% foi capaz de proporcionar a quimiotaxia, vasodilatação e formação de novos vasos, garantindo uma melhor cicatrização. Com isso, GEL/NAR representa uma alternativa biotecnológica promissora para o tratamento de feridas.

9 PERSPECTIVAS

Diante da necessidade de elucidar todos os mecanismos de ação da Naringenina, há pretensão na continuidade do estudo para executar análise histomorfológica da produção de colágeno, avaliação da atividade antioxidante e realização de ensaios imunoenzimáticos como *Western Blot* para determinação dos níveis de VEGF e Imunoensaio ELISA para quantificação das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

REFERÊNCIAS

- AGRA, I. K.R. et al. Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of aqueous extract from *Bowdichia virgilioides* stem barks in mice. **An Acad Bras Cienc**, v. 85, n. 3, p. 945- 954, set. 2013.
- AKBARZADEH, A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Res Lett**, v. 8, n. 1, p. 102- 132, fev. 2013.
- ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C. Effect of bovine type-i collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. **Int J Morphol**, v. 27, n. 4, p. 1105-1110, mar. 2009.
- ALAM, M. A. et al. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. **Adv Nutr**, v. 5, n. 4, p. 404–417, jul. 2014.
- ALMEIDA, M. R.; MARTINEZ, S. T.; PINTO, A. C. Química de produtos naturais: plantas que testemunham histórias. **Rev Virt Qui**, v. 9, n. 3, p. 1117- 1153, 2017.
- ALVES, N. C. Penetration of actives on the skin: a literature review. **Rev Amaz Scie Health**, v. 3, n. 4, p. 36-43, nov. 2015.
- ARAÚJO, D.R. et al. Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. **Res Bras Anestes**, v. 53, n. 5, p. 663 – 671, out. 2003
- BARBOSA, F. S. **Modelo de Impedância de Ordem Fracional para a Resposta Inflamatória Cutânea**. 2011. 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- BAYER, M. L. et al. No donor age effect of human serum on collagen synthesis signaling and cell proliferation of human tendon fibroblasts. **Mech Ag Dev**, v. 133, n. 5, p. 246–254, maio 2012.
- BAO, P. et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. **J Surg Res**, v. 153, n. 2, p. 347–358, maio 2009.
- BARRETO, R. S. S. et al. Evaluation of wound healing activity of atranorin, a lichen secondary metabolite, on rodents. **Rev Bras Farmacogn**, v. 23, n. 2, p. 310–319, fev. 2013.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- BLANES, L. et al. Avaliação aliação clínica clínica e epidemiológica epidemiológica das úlceras úlceras por pressão pressão em pacientes acientes internados internados no hospital são paulo. **Rev Assoc Med Bras**, v. 50, n. 2, mar. p. 182-187, 2004.
- BOATENG, J. S. et al. Wound healing dressing ad drugs delivery sytems: a review. **J Pharm Sci**, v. 97, n. 8. p. 2892-2823, out. 2012.

BRUNNER & SUDDARRTH. **Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 12 ed., 2014.

BURLANDO, B.; CORNARA, L. Mel na dermatologia e cuidados com a pele: uma revisão . **J Cosmet Dermatol** , v. 12, p. 306-313, abr. 2013.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de Feridas. **Arq Bras Cir Dig**, v. 20, n.1, p. 51-58, 2007.

CARLUCCI, V. D. S. et al. A experiência da queimadura na perspectiva do paciente. **Rev Esc Enferm USP**, v. 41, n. 1, p. 21-8, mar. 2007.

CEN, L. et al. Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials and applications. **Ped Resear**, v. 63, n. 5, p. 492–496, maio. 2008.

CHENG, C. W.; SOLORIO, L. D.; ALSBERG, E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. **Biotechnol Adv**, v. 32, n. 2, p. 462–84, jan. 2014.

CHEN, D. et al. Structure-proteasome-inhibitory activity relationships of dietary flavonoids in human cancer cells. **Front Biosci**, v. 12, p. 1935–1945, jan. 2007.

ACIDADE ON. **Curativos de empresa campineira aceleram cura de feridas crônicas**. Disponível em:

<https://www.acidadeon.com/campinas/cotidiano/NOT,0,0,1318866,curativos+de+empresa+campineira+aceleram+cura+de+feridas+cronicas.aspx>. Acesso em: 20 Set. 2018

DANTAS, M. D. M et al. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. **Journal Photochem Photobiol B**, v. 105, p. 51-59, jul. 2011.

DIAS, A. M. A. et al. Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide. **Int J Pharm**, v. 408, p. 9-19, fev. 2011.

DIXON, R. A.; STEELE, C. L. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. **Trends Plant Sci**, v. 4, n. 10, p. 394–400, out. 1999.

DORAI, A. Wound care with traditional, complementary and alternative medicine. **Indian J Plast Surg**, v. 45, n. 2, p. 418-439, maio 2012.

DOU, W. et al. Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. **Br J Nutr**, v.110, n. 4, p- 599-608, mar. 2013.

EBERHARDT, T. D. et al. Wounds healing – Analysis of tendencies in thesis and dissertations from Brazil. **Rev Enferm UFSM**. v. 5, n. 2, p. 397-395, jul. 2015.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Skin wounds: adequate dressing choice. **Rev Col Bras Cir**, v. 35, n. 3, p. 203- 206, jun. 2008

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

FREITAS, V. S.; RODRIGUES, R. A. F.; GASPI, F. O. G. Propriedades farmacológicas da Aloe vera (L.) Burm. f. **Rev Bras Pl Med**, v. 16, n. 2, p. 299-307, 2014.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharm Sci Technolo Today**, v. 3, n. 12, 417-425, dez. 2010.

GALATI, G. et al. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. **Free Radic Bio Med**, v. 30, n. 4, p. 370–382, fev. 2001.

GALLUZZO, P. et al. The nutritional flavanone naringenin triggers antiestrogenic effects by regulating estrogen receptor alpha-palmitoylation. **Endocrinology**, v. 149, n. 5, p. 2567–2675, maio 2008.

GEORGE, V.C., DELLAIRE, G., RUPASONGHE, H.P.V. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. **J Nutr Biochem**, v. 45, p. 1–14, nov. 2016.

GINDL, W. et al. Changes in the molecular orientation and tensile properties of uniaxially drawn cellulose films. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3146- 3150, nov. 2006.

JAYARAMAN, J. et al. Anti-inflammatory role of naringenin in rats with ethanol induced liver injury. **Toxicol Mech Methods**, v. 22, n. 7, p. 568–576, set. 2012.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2012.

KUMAR, B. et al. Ethnopharmacological approaches to wound healing--exploring medicinal plants of India. **J Ethnopharmacol**, v. 114, n. 2, p. 103–113, nov. 2007.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scie World J**, v. 2013, p. 1627-50, out. 2013.

LAMICHHANE, N. et al. Liposomes: clinical applications and potential for image-guided drug delivery. **Molecules**, v. 23, n. 288, p. 1-17, jan. 2018.

LE MARCHAND, L. et al. Intake of flavonoids and lung cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 2, p. 154–160, jan. 2000.

LI, J. W.-H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161–165, jul. 2009.

LIMA, N.B.A. et al. Perfil sociodemográfico, clínico e terapêutico de pacientes com feridas agudas e crônicas. **Rev Enf UFPE**, v. 10, n. 6, p. 2005-2017, jun. 2016.

- LV, F. et al. A conductive bioceramic/polymer composite biomaterial for diabetic woundhealing. **Acta Biomateri**, v. 60, p. 128-143, jul. 2017.
- MANCHOPE, M. F.; CASAGRANDE, R.; VERRI, JR., W. A. Naringenin: an analgesic and anti-inflammatory citrus flavanone. **Oncotarget**, v. 8, n. 3, p. 3766–3767, jan. 2017.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte I, **An Bras Dermatol**, v. 78, n. 4, p. 393- 410, jun. 2003a.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte II, **An Bras Dermatol**, v. 78, n. 5, p. 525- 542, out. 2003b.
- MARQUES, I. C. S. **Óleo de Semente de Maracujá no Reparo de Férias Cutâneas em Equinos e Ratos Wistar**. 2016. 77f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho, Jaboticabal, 2016.
- MASI, E. C. D. J. et al. The influence of growth factors on skin wound healing in rats. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v. 82, n.5, p. 512-521, jan. 2016.
- MCDUGALL, S. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modeling and clinical implications. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci**. v. 364, n.1843, p.1385-1385, jun. 2006.
- MEDEIROS, A. C.; DANTAS FILHO, A. M. Cicatrização de feridas cirúrgicas. **J Surg Cl Res**, v. 7, n. 2, p. 87-102, jul. 2016.
- MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol**, v. 84, n. 3, p. 257-262, jul. 2009.
- MENDONÇA, R. S. C.; RODRIGUES, G. B. O. As principais alterações dermatológicas em pacientes obesos. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 24, n.1, p. 68-73, jan. 2011.
- MIRA, L. et al. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. **Free Radic Res**, v. 36, n. 11, p. 1199–1208, nov. 2002.
- MOGOȘANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **Int J Pharm**, v. 463, n. 2, p. 127–136, mar. 2014.
- MOHANTY, C. et al. Emerging role of nanocarriers to increase the solubility and bioavailability of curcumin. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 9, p. 1347–1364, nov. 2012.
- NAPIMOGA, M.H. et al. Quercetin inhibits inflammatory bone resorption in a mouse periodontitis model. **J Nat Prod**, v. 76, n. 12, p. 2316-2321, dez. 2013.
- NARINE, K. et al. Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering. **Tissue Eng**, v. 12, n. 10, p. 2707-2716, out. 2006.

NUNES, P. S. et al. Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. **Int J Pharm**, v. 513, n. 1, p. 473- 482, nov. 2016.

OCHOA, M.; RAHIMI, R.; ZIAAIE, B. Flexible sensors for chronic wound management. **IEEE Rev Biomed Eng**, v.7, p. 73-86, 2014.

OH, T. J. et al. Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. **Clin Oral Impl Res**, v. 14, n. 1, p. 80–90, fev. 2003.

OKODUWA, S. I. R. Evaluation of extraction protocols for anti-diabetic phytochemical substances from medicinal plants. **World J Diabet**, v. 15, n. 7, p. 605-614, dez. 2016.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Wound healing: stages and influencing factors. **Act Veterin Bras**, v.6, n.4, p.267-271, mar. 2012.

OLIVEIRA, K. A. M. et al. Atividade antimicrobiana e quantificação de flavonoides e fenóis totais em diferentes extratos de própolis. **Semin Cien Bio Saud**, v. 33, n. 2, p. 211-222, 2012.

PATI, F. et al. Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. **J Biomed Mater Res A**, v. 100, n. 4, p. 1068–1079, fev. 2012.

PEDRAZZA, G. P. R. et al. Anti-inflammatory activity and chemical analysis of extracts from *Trifolium rio-grandense*. **Rev Bras Farmacogn**, v. 27, n. 3, p. 334- 338, jun. 2017

PRATA, M. B. et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em rato. **Acta Cir Bras**, v. 3, n. 2, p. 43–48, abril. 1988.

POSNETT, J. et al. The resource impact of wounds on health-care providers in Europe. **J Wound Care**, v. 18, n. 4, p. 154-161, abril. 2009.

QINGLIN, L. et al. A study on the anti-tumor mechanism of total flavonoids from radix tetragynae against additional cell line based on COX-2-mediated Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 33, p. 54303- 54319, abr. 2017.

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. **Photomed Laser Surg**, v. 27, n. 1, p. 49–55, fev. 2009.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Manual de Dermatologia Clínica de Sampaio e Rivitti**. São Paulo: Artes Médicas, 2014.

SILVA, M. M. P. et al. The use of nanoparticles in wound treatment: a systematic review. **Rev Esc Enferm USP**. v. 8, n. 51, p. 1-9, jan. 2017.

SILVA, P. N.; ALMEIDA, O.E.A.; ROCHA, I.C. Terapia tópica no tratamento de feridas. **Enfermeria Globla**. n. 33, p. 46-58, jan. 2014.

SMANIOTTO, P. H. S. et al. Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Rev Bras Cir Plást**. v. 27, n. 4, p. 623-626, 2012.

STADELMANN, C. Multiple sclerosis as a neurodegenerative disease: pathology, mechanisms and therapeutic implications. **Curr Opin Neurol**, v. 24, n. 3, p. 224–229, dez. 2011.

SZEJTLI, J.; SZENTE, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 61, n. 3, p. 115–125, out. 2005.

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, abr. 2012.

TENIUS, F.P.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; IOSHII, S.O. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **An Bras Dermatol**, v. 82, n. 2, p. 141-149, mar. 2007.

THANUSHA, A. V.; DINDA, A. K.; KOUL, V. Evaluation of nano hydrogel composite based on gelatin/HA/CS suffused with Asiatic acid/ZnO and CuO nanoparticles for second degree burns. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 89, p. 378-386, ago. 2018.

VAN GRAFF, K. M. **Anatomia Humana**. Barueri: Manole, 2003.

VAN MEEUWEN, J. A. et al. (Anti)estrogenic effects of phytochemicals on human primary mammary fibroblasts, MCF-7 cells and their co-culture. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 221, n. 3, p. 372–383, jun. 2007.

VATANKHAH, E. et al. Development of nanofibrous cellulose acetate/gelatin skin substitutes for variety wound treatment applications. **J Biomater Appl**, v. 28, n. 6, p. 909–921, fev. 2014.

VELNAR, T. et al. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **J Int Med Res**, v. 37, n.5, p. 1528–1542, set. 2009.

XIE, Z. et al. Dual growth factor releasing multi-functional nanofibers for wound healing. **Acta Biomater**, v. 9, n. 12, p. 9351- 9359, dez. 2013.

WANG, P. H. et al. Wound healing. **J Chin Med Assoc**, v. 81, n. 2, p. 94-101, fev. 2018.

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 “**Efeito da naringenina nanoencapsulada incorporada à filmes bioativos de colágeno sobre a cicatrização de feridas cutâneas**”, registrada com o nº 71/2015, sob a responsabilidade da **Profª. Drª. 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 **10/08/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 08/2016, Término : 08/2018
Espécie/linhagem/raca	Camundongo heterogênico/Swiss/Rato heterogênico/Swiss
Nº de animais	160 / 160 / total: 320
Peso/Idade	02-03 meses
Sexo	M
Origem	Biotério DFS/UFS

Josemar Senna Batista

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

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