



Laboratório de Catálise Orgânica e Biocatálise – LACOB
Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade
Rede em Associação Ampla

LETÍCIA CASTELLANI DUARTE

DESENVOLVIMENTO DE PELÍCULA BIOCOMPATÍVEL PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Dourados - MS
2018



Laboratório de Catálise Orgânica e Biocatálise – LACOB
Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade
Rede em Associação Ampla

DESENVOLVIMENTO DE PELÍCULA BIOCOMPATÍVEL PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

LETÍCIA CASTELLANI DUARTE

Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade
e-mail: leticia.farmacia@hotmail.com

Telefone: (67) 9971-6878

Orientador: Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues

Co-Orientadora: Profa. Dra. Susana Elisa Moreno

Dourados – MS
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

D812d Duarte, Leticia Castellani

Desenvolvimento de película biocompatível para cicatrização de feridas [recurso eletrônico] /
Leticia Castellani Duarte. -- 2018.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Nelson Luis de Campos Domingues.

Coorientadora: Susana Elisa Moreno.

Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade)-Universidade Federal da Grande
Dourados, 2018.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

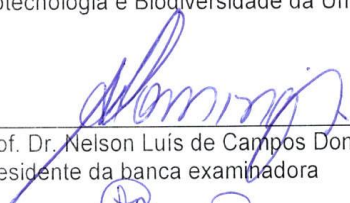
1. biomaterial. 2. pele. 3. ferida. 4. selênio. 5. bocaiúva. I. Domingues, Nelson Luis De Campos.
II. Moreno, Susana Elisa. III. Título.



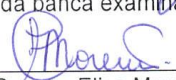
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE

Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer **APROVADO**, para a tese intitulada: "*Desenvolvimento de película biocompatível para cicatrização de feridas*", de autoria de Letícia Castellani Duarte, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Nelson Luís de Campos Domingues
Presidente da banca examinadora



Profª. Drª. Susana Elisa Moreno
Membro Examinador (UCDB)



Profª. Drª. Jaqueline de Carvalho Rinaldi
Membro Examinador (UEM)



Drª. Joyce Alencar Santos Radai
Membro Examinador (UFGD)



Profª. Drª. Kílça Tanaka Botelho
Membro Examinador (UNIGRAN)

Dourados/MS, 14 de novembro de 2018.

*Dedico esta tese a todos aqueles que privei de
atenção nestes quatro anos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me capacitar para realizar esta pesquisa.

Agradeço aos meus pais, Marielena e Marcus, por serem incentivadores incondicionais.

Agradeço ao meu esposo, Antonio Eugênio, pelo apoio e paciência.

Agradeço aos meus filhos, Caio Eduardo e Marco Antonio, por suportar meu mau humor e minhas ausências.

Agradeço aos meus orientadores, Susana e Nelson (a dupla mais fantástica!), que com sabedoria me conduziu na realização desta pesquisa.

Agradeço aos meus colegas do Lacob-UFGD, a juventude e alegria deste grupo não me fez desanimar!

Agradeço aos colegas do laboratório de inflamação da UCDB, por me dar suporte na realização dos experimentos.

Agradeço as minhas amigas, Claudia, Tatiana, Kelly, Gislaine, Taline, Karimi, Kilça e Carline, por me ouvir nas horas difíceis.

Agradeço a FUNDECT pelos recursos necessários.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

O processo de cicatrização é complexo e tem despertado o interesse de pesquisadores para o desenvolvimento de materiais para curativo. O prolongamento do tempo de cura de uma ferida implica diretamente no custo do tratamento que envolve tanto o valor financeiro do tratamento quanto a incapacidade do paciente em realizar suas tarefas diárias. Busca-se, portanto, alternativas para o tratamento de feridas que possam ser de baixo custo e que apresentem alta efetividade. Objetivou-se neste estudo o desenvolvimento de biomaterial à base de quitosana e polivinilálcool contendo nanopartículas de selênio, óleo de bocaiúva e glutaraldeído como reticulante para tratamento de feridas por apresentarem todas essas características anteriormente citadas. O óleo utilizado foi extraído da polpa dos frutos da bocaiúva colhidos no período de janeiro a março da safra de 2015. Foi realizado caracterização da polpa e do óleo por análises físico-químicas e infravermelho, estas análises demonstraram que o óleo obtido está dentro dos parâmetros preconizados pela legislação vigente e condiz com dados da literatura. Preparou-se 4 tipos de películas, uma contendo os polímeros quitosana e polivinilálcool, uma contendo os polímeros e óleo de bocaiúva, uma contendo os polímeros e nanopartículas de selênio e uma contendo os polímeros, óleo de bocaiúva e nanopartícula de selênio. Realizou-se a caracterização das películas por infravermelho, ultravioleta-visível e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados indicaram que a matriz polimérica foi sintetizada através de ligações cruzadas entre a quitosana e o glutaraldeído, apresentando reticulados que indicam a permeabilidade da película. Para avaliação da cicatrização foram realizadas duas excisões cirúrgicas na pele de camundongos Swiss com o emprego de um punch histológico, atingindo todas as camadas da pele. Os grupos experimentais consistiram de animais com as feridas sem tratamento e animais com as feridas tratadas com as películas. Os animais foram tratados nos tempos de dois, sete e quatorze dias. Após o tratamento os animais foram eutanasiados e realizou-se a biópsia do tecido para realização de testes posteriormente. Os resultados apontaram diminuição da contração da ferida nos grupos tratados com película contendo óleo e na película contendo selênio quando comparadas ao grupo que recebeu película controle, no mesmo período houve diminuição de infiltrado inflamatório para a película com nanopartícula de selênio. A avaliação quantitativa de colágeno apontou maior quantidade de colágeno na película com óleo de bocaiúva e nanopartícula de Selênio (POB+Se) sendo que com relação a colágeno tipo I a maior quantidade observada foi na película que contem nanopartícula de selênio (PSe) e colágeno tipo III na película com óleo e nanopartícula de Se (POB+Se). A propriedade antioxidante do selênio pode estar relacionada a produção de colágeno que depende de co-fatores (ferro ferroso, oxigênio molecular, α -cetoglutaraldeído e vitamina C) necessários para a hidroxilação enzimática do colágeno. Concluimos que a película desenvolvida contendo selênio e óleo de bocaiúva acelerara o processo de reparo celular com qualidade de fibras de colágeno.

Palavras-chave: biomaterial, pele, ferida, selênio, bocaiúva.

ABSTRACT

The healing process is complex and has aroused the interest of researchers in the development of curative materials. Extending the healing time of a wound directly implies the cost of treatment involving both the financial value of the treatment and the inability of the patient to perform their daily tasks. Therefore, it is sought alternatives for the treatment of wounds that may be of low cost and that present high effectiveness. The aim of this study was the development of biomaterial based on chitosan and polyvinylalcohol containing selenium nanoparticles, bocaiúva oil and glutaraldehyde as crosslinking agent for the treatment of wounds because they present all these characteristics previously mentioned. The oil used was extracted from the pulp of the fruits of the bocaiúva harvested from January to March of the harvest of 2015. The pulp and oil characterization was carried out by physicochemical and infrared analyzes, these analyzes demonstrated that the oil obtained is within the parameters recommended by the current legislation and consistent with data from the literature. Four types of films were prepared, one containing the polymers chitosan and polyvinylalcohol, one containing the polymers and bocaiva oil, one containing the polymers and nanoparticles of selenium and one containing the polymers, bocaiva oil and selenium nanoparticle. The films were characterized by infrared, ultraviolet-visible and scanning electron microscopy. The results indicated that the polymer matrix was synthesized by crosslinking between chitosan and glutaraldehyde, showing crosslinks indicating the permeability of the film. In order to evaluate healing, two surgical excisions were performed on the skin of Swiss mice using a histological punch, reaching all layers of the skin. The experimental groups consisted of animals with untreated wounds and animals with wounds treated with the films. The animals were treated at two, seven and fourteen days. After the treatment the animals were euthanized and tissue biopsy was performed for testing later. The results indicated a decrease in wound contraction in the groups treated with oil-containing film and in the selenium-containing film when compared to the group that received control film, in the same period there was decrease of inflammatory infiltrate for the film with selenium nanoparticle. The quantitative evaluation of collagen showed a higher amount of collagen in the film with bocaiúva oil and Selenium nanoparticle (POB + Se). In relation to type I collagen, the highest amount observed was the film containing selenium nanoparticle (PSe) and collagen type III on film with oil and Se nanoparticle (POB + Se). The antioxidant property of selenium may be related to the production of collagen that depends on cofactors (ferrous iron, molecular oxygen, α -ketoglutaraldehyde and vitamin C) required for the enzymatic hydroxylation of collagen. We conclude that the developed film containing selenium and bocaiúva oil will accelerate the cell repair process with collagen fiber quality.

Key-words: biomaterial, skin, wound, selenium, bocaiúva,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Camadas e apêndices da pele.....	15
Figura 2: Camadas (estratos) da epiderme.	17
Figura 3: Camadas da pele, profundidade e graus das feridas.	19
Figura 4: As fases celular, bioquímica e mecânica da cicatrização de feridas.....	21
Figura 5: Estrutura química da quitosana.....	26
Figura 6: Palmeira da Bocaiúva com frutos.	28
Figura 7: Película elaborada com quitosa e PVA.....	36
Figura 8: Película elaborada com quitosana, PVA e óleo de bocaiúva.	36
Figura 9: Película elaborada com quitosana, PVA e nanopartícula de selênio.	37
Figura 10: Película elaborada com quitosana, PVA, óleo de Bocaiúva e nanopartícula de selênio.....	38
Figura 11: Confecção de ferida cutânea.	40
Figura 12: Tecido retirado para análise histológica.	41
Figura 13: Espectro de infravermelho para a amostra de óleo de bocaiúva em pastilha de KBr.	47
Figura 14: Estudo das propriedades mecânicas da película de PVA/quitosana.	47
Figura 15: Espectro de Ultravioleta-visível para película de PVA/quitosana (preto), PVA/quitosana/Óleo de bocaiúva (vermelho) e PVA/quitosana/nanopartícula de selênio (azul).	48
Figura 16: Espectro de infravermelho para a película contendo PVA/quitosana.....	48
Figura 17: Espectro de infravermelho para a película contendo PVA/quitosana/óleo de bocaiúva.....	49
Figura 18: Espectro de infravermelho para a película contendo PVA/quitosana /óleo de bocaiúva/nanopartícula de selênio.	49
Figura 19: Imagem de microscopia eletrônica de varredura para a película contendo (a-b) PVA/quitosana e (c-d) PVA/quitosana/nanopartícula de selênio.....	50
Figura 20: Estudo da ÁREA DE CICATRIZAÇÃO em camundongos por período de tempo.	52
Figura 21: Avaliação microscópica do infiltrado inflamatório.	53
Figura 22: Contagem morfométrica de vasos sanguíneos em cortes histológicos.	54
Figura 23: Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase.....	54
Figura 24: Quantificação indireta de óxido nítrico no tecido.....	55
Figura 25: Avaliação da neovascularização pelo modelo de implante de esponja.....	56
Figura 26: Fotomicrografias ilustrativas das amostras coradas com picosírius red após observação em microscópio de luz polarizada.....	57
Figura 27: Gráficos da análise quantitativa do colágeno total (A) e dos subtipos de colágeno I (B) e III (C)..	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios dos teores de lipídeos, cinzas, umidade e acidez da polpa de bocaiúva.	46
Tabela 2: Caracterização físico-química do óleo de bocaiúva	46
Tabela 3: Comparação dos índices de acidez e iodo entre o presente estudo e o estudo realizado por Ciconini (2012).	46
Tabela 4: Dados obtidos da análise de sistema de energia dispersiva (EDS) obtido da película contendo PVA/quitosana.....	50
Tabela 5: Dados obtidos da análise de sistema de energia dispersiva (EDS) obtido da película contendo PVA/quitosana/nanopartícula de selênio.....	50
Tabela 6: Fotos da evolução da cicatrização das feridas em diferentes tratamentos.....	51

LISTA DE SÍMBOLOS

APCs	Células apresentadoras de antígenos
C3a	Peptídeo componente do sistema do complemento; fator quimiotático; anafilotoxina
C5a	Peptídeo componente do sistema do complemento; fator quimiotático; anafilotoxina
CO ₂	Dióxido de carbono
Col- III	Colágeno tipo III
Col-I	Colágeno tipo I
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
GA	Glutaraldeído
IL-1	Interleucina 1
MPO	Mieloperoxidase
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
PB	Película polimérica
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PO	Película contendo polímeros e óleo de baciúva
POSe	Película contendo polímeros, óleo de baciúva e nanopartícula de Selênio
PSe	Película contendo polímeros e nanopartícula de selênio
PVA	Álcool polivinílico
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Ultra violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Sistema Tegumentar.....	15
2.2. Feridas	18
2.3 Cicatrização.....	20
2.4. Tratamento de feridas.....	24
2.5. Biomateriais	25
2.6. Bocaiuva (<i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd.).....	27
3.OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICO	30
3.1. Objetivo Geral.....	30
3.2. Objetivo(s) Específico(s).....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Obtenção do óleo da polpa da bocaiúva.....	31
4.2. Caracterização do óleo	31
4.3. Caracterização centesimal da polpa	32
4.4. Nanopartículas de selênio.....	34
4.5. Confecção das películas	34
4.6. Animais para ensaio de cicatrização	38
4.7 Avaliação macroscópica da cicatrização das úlceras	41
4.8 Avaliação microscópica das úlceras.....	41
4.9 Avaliação de marcadores inflamatórios	42
4.10 Avaliação da angiogênese pela técnica de implante de esponja.....	43
4.11 Análise de Colágeno total e subtipos de col-I e col-III pela técnica de picrossírius seguida da quantificação usando software Image-J ProPlus	44
5. RESULTADOS.....	46
5.1. Caracterização da polpa de bocaiúva	46

5.2. Caracterização do óleo de bocaiúva	46
5.3. Estudo da propriedade mecânica da película PVA/quitosana	47
5.4. Caracterização das películas.....	48
5.5. Avaliação macroscópica da cicatrização	51
5.6 Avaliação Microscópica da cicatrização	53
5.7 Avaliação de marcadores inflamatórios	54
5.8 Avaliação de marcador angiogênico	56
5.9 Análise de Colágeno total e subtipos de col-I e col-III pela técnica de picrossírius seguida da quantificação usando software Image-J ProPlus	56
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÃO	65
8. BIBLIOGRAFIA.....	66
ANEXO.....	72

1. INTRODUÇÃO

A alteração da integridade anatômica da pele por qualquer tipo de trauma é chamado de ferida.¹ A lesão tecidual desencadeia eventos bioquímicos e celulares com a finalidade de reparar o dano causado, promovendo a cura por meio de regeneração ou cicatrização. A regeneração promove a restituição completa do tecido; já na cicatrização algumas estruturas originais são restauradas, mas desarranjos estruturais podem ocorrer.²

O processo de cicatrização é complexo e fatores como avaliação correta da ferida, técnicas assépticas, escolha do tratamento e doenças associadas (diabetes, doenças cardiovasculares, estado imunológico do paciente) dentre outros fatores podem afetar o tempo e a qualidade de cicatrização. Se este tempo for prolongado haverá um aumento do custo do tratamento. Este envolve o valor financeiro do tratamento e a incapacidade do paciente em realizar suas tarefas diárias.³

Existem três formas pela qual uma ferida pode cicatrizar-se, dependendo da quantidade de tecido perdido ou danificado, e da presença ou não de infecção. A cicatrização de primeira intenção ocorre quando as bordas da ferida são apostas ou aproximadas, havendo perda mínima de tecido, ausência de infecção e edema mínimo e a formação de tecido de granulação não é visível. A cicatrização por segunda intenção é uma das grandes dificuldades médicas, nestas há uma perda grande de tecidos e as bordas da lesão não podem mais ser aproximadas. Este tipo de ferida deixa o paciente vulnerável a infecções e outras complicações. A cicatrização de terceira intenção é aquela onde as bordas da ferida são aproximadas com sutura.⁴

Na cicatrização de segunda intenção, onde não há possibilidade de sutura, o médico pode lançar mão do uso de curativos. Podemos dividir os curativos utilizados atualmente em biológicos, sintéticos e biológico-sintéticos. Os curativos biológicos, heteroenxertos de pele de porco e de embrião bovino, possuem como desvantagem matéria prima limitada, alta antigenicidade, baixa adesividade, risco de contaminação cruzada e em média devem ser trocados a cada três dias. Dentre os curativos biológicos, estudos tem demonstrado que um produto promissor com aplicabilidade clínica é a pele de tilápia.^{5, 6, 7} Os sintéticos, compostos de uma variedade de materiais incluindo películas elásticas aderentes, materiais hidroativos e suspensões coloidais permeáveis ao ar, líquidos e vapores, tem vida útil longa, produzem baixa reação inflamatória e baixo risco de transmissão de patógenos. Os biológico-sintéticos, como exemplo podemos citar o Biobrane – membrana de náilon-silicone flexível ligada a

peptídeos colagenosos da pele de porco, são formados por camadas de polímeros e materiais biológicos.⁸

Neste sentido é relevante propor-se novos materiais e compostos sintéticos para o tratamento de feridas com características como alta flexibilidade, transparência, resistência mecânica, baixa solubilidade, capacidade de controlar o perfil de liberação de fármacos e não tóxico.⁹

Para a obtenção destes materiais, portanto, utiliza-se um polímero convencional biocompatível juntamente com um polímero natural os quais servirão de suporte. Dentre os materiais mais utilizados estão o PVA (polivinilalcool) e a quitosana.

A quitosana é uma polímero natural (1,4) 2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosose derivada da quitina, um dos mais abundantes polímeros naturais. Apresenta propriedades intrínsecas importantes para o desenvolvimento de materiais na área de saúde humana como, por exemplo, atóxica, biocompatível, biodegradável, aceleração na recuperação de lesões, diminuição do colesterol no sangue, hemostática, além de suas características bacteriostáticas e fungistáticas.¹⁰

O hidrogel de PVA possui excelente transparência, consistência macia, quando na forma de uma membrana, é biocompatível e biologicamente inerte, não é mutagênico, nem citotóxico e não tem atividade carcinogênica.¹¹

Estudos apontam que a quitosana auxilia a cicatrização por ativação de macrófagos e por ajudar na deposição ordenada de colágeno. Somando as características da quitosana e do PVA obtemos uma membrana com estrutura assimétrica de importância industrial. A incorporação a estes polímeros de substâncias que possam acelerar o processo de cura, evitando a contaminação microbiana e uma cicatrização de melhor qualidade tem sido o objetivo de muitas pesquisas.^{12, 13}

Antioxidantes como o selênio são benéficos para o tratamento de pacientes queimados reduzindo a taxa de infecção, o tamanho da ferida e o tempo de cicatrização.^{14,15} Pesquisa realizada por Tuji (2005) evidenciou o efeito radioprotetor do selênio frente a reparação tecidual.¹⁶

Por outro lado, cada vez mais tem se investido na busca de produtos naturais com potencial anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano dentre outras propriedades. No Brasil, os biomas Cerrado e Pantanal possuem inúmeras espécies nativas com alto potencial para exploração econômica nos setores alimentício, farmacêutico e oleoquímico. Neste estudo enfocou-se o fruto do cerrado bocaiuva (*Acrocomia aculeata*). Pesquisas tem demonstrado o

potencial uso do óleo de bociuva para produção de biodiesel e para suplementação alimentar.^{17, 18, 19, 20, 21} É conhecida também a atividade antioxidante do óleo bem como seu potencial como fator de proteção solar.^{22, 23, 24}

Diante do exposto, objetiva-se o desenvolvimento de biomaterial a base de quitosana e PVA contendo nanopartículas de selênio e óleo de bociuva para tratamento de feridas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sistema Tegumentar

A pele é o maior órgão do corpo humano, tipicamente responsável por 15% -20% do peso corporal total e, em adultos, apresentando 1,5-2 m² de superfície para o ambiente externo. Também conhecida como tegumento (*L. integumentum*, cobertura) ou camada cutânea, a pele é composta pela epiderme, uma camada epitelial de origem ectodérmica e a derme, uma camada de tecido conjuntivo mesodérmico (Figura 1). Na junção irregular entre a derme e a epiderme, projeções denominadas papilas dérmicas interdigitam com as cristas epidérmicas invaginantes para fortalecer a adesão das duas camadas. Derivados epidérmicos incluem cabelos, unhas e glândulas sebáceas e sudoríparas. Abaixo da derme, encontra-se o tecido subcutâneo ou a hipoderme uma camada de tecido conjuntivo frouxo, geralmente contendo almofadas de adipócitos. O tecido subcutâneo liga a pele vagamente aos tecidos subjacentes e corresponde à fáscia superficial da anatomia macroscópica.²⁵

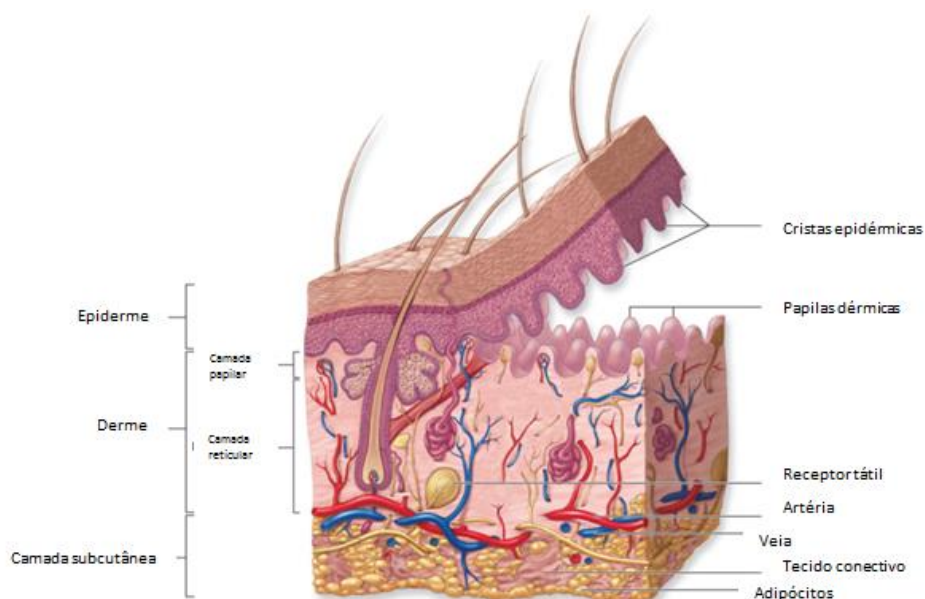


Figura 1: Camadas e apêndices da pele. Visão geral diagramática da pele, mostrando as principais camadas e apêndices epidérmicos (folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas), a vasculatura e os principais receptores sensoriais

Fonte: Adaptado de Skin, Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 15e*; 2018. Disponível em: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx/sectionid=190285972&bookid=2430&Resultclick=2>
Acesso: Outubro, 2018.

Muitos processos complexos e dinâmicos acontecem na pele. Esses processos incluem funções imunológicas e de barreira, produção de melanina, síntese de vitamina D,

sensação, regulação de temperatura, proteção contra trauma, dentre outros. Pode-se elencar estas funções específicas da pele em várias categorias amplas:²⁶

- **Proteção:** Fornece uma barreira física contra insultos térmicos e mecânicos, como atrito e contra a maioria dos patógenos potenciais e outros materiais. Os microrganismos que penetram na pele alertam linfócitos residentes e células apresentadoras de antígenos (APCs) na pele e uma resposta imune é iniciada. O pigmento escuro melanina na epiderme protege os núcleos das células da radiação ultravioleta (UV). A pele é também uma barreira de permeabilidade contra a perda excessiva ou absorção de água, o que permitiu a vida terrestre. A permeabilidade seletiva da pele permite que algumas drogas lipofílicas, como certos hormônios esteroides e medicamentos, sejam administrados por meio de adesivos cutâneos.
- **Sensorial:** Muitos tipos de receptores sensoriais permitem que a pele monitore constantemente o ambiente, e vários mecanorreceptores da pele ajudam a regular as interações do corpo com objetos físicos.
- **Termorreguladora:** A temperatura constante do corpo é normalmente mantida facilmente graças aos componentes isolantes da pele (por exemplo, a camada de gordura e o cabelo na cabeça) e seus mecanismos para acelerar a perda de calor (produção de suor e uma microcirculação superficial densa).
- **Metabólicas:** As células da pele sintetizam a vitamina D₃, necessária no metabolismo do cálcio e na formação óssea adequada, através da ação local da luz UV no precursor da vitamina. O excesso de eletrólitos pode ser removido no suor, e a camada subcutânea armazena uma quantidade significativa de energia na forma de gordura.
- **Sinalização sexual:** muitas características da pele, como pigmentação e cabelo, são indicadores visuais de saúde envolvidos na atração entre os sexos em todas as espécies de vertebrados, incluindo humanos. Os efeitos dos feromônios sexuais produzidos pelas glândulas sudoríparas apócrinas e outras glândulas da pele também são importantes para essa atração.

A epiderme consiste principalmente de um epitélio estratificado queratinizado escamoso composto de células chamadas queratinócitos. Existem também três tipos de células epidérmicas muito menos abundantes: melanócitos produtores de pigmentos, células de Langerhans apresentadoras de antígenos e células epiteliais táteis chamadas células de Merkel (Figura 2).²⁵

Os queratinócitos migram da camada basal para o epitélio, onde formam uma rede celular muito dinâmica e fisicamente resistente, o que está associado, de maneira íntima, à remodelação do citoesqueleto celular e formação da estrutura supracelular de filamentos interconectados, como hemidesmossomos e desmossomos. Essas estruturas conferem força e rigidez ao epitélio. Adicionalmente, o processo de migração dos queratinócitos é acompanhado pela gradual diferenciação celular associada à produção crescente de queratina, proteína de extrema importância para função final desse tipo celular. Ao final desse processo, que culmina na diferenciação terminal dos queratinócitos seguida por morte celular e esfoliação, os filamentos de actina permanecem intactos, formando o centro estrutural da camada morta da pele queratinizada, eficaz na proteção contra a abrasão, agressões químicas e físicas, dessecação, penetração de patógenos e proteção geral contra intempéries do ambiente. Quando formados, os queratinócitos são empurrados sucessivamente para as camadas mais superficiais da pele, dando lugar à produção de novas células. Para que um queratinócito da camada basal atinja a camada córnea, são necessários de 26 a 42 dias, e para que esta mesma célula se desprenda ou descame da camada córnea, são necessários mais 15 dias.²⁷

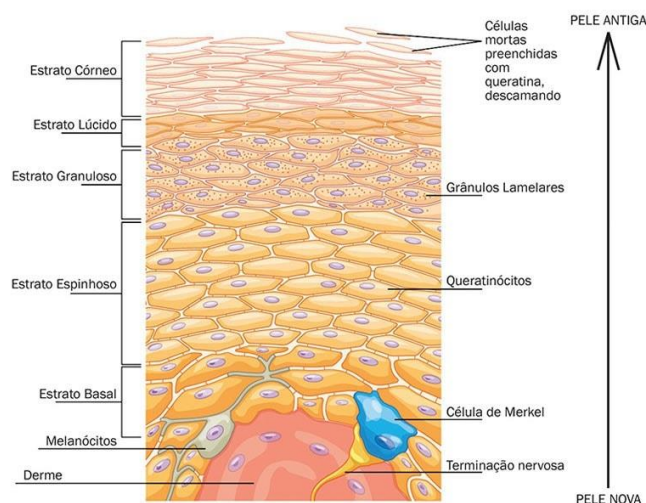


Figura 2: Camadas (estratos) da epiderme.

Fonte: <https://www.mundoestetica.com.br/esteticageral/epiderme-derme-camadas-pele/>

Como todos os epitélios, o epitélio estratificado escamoso não possui microvasculatura, suas células recebem nutrientes e O_2 por difusão a partir da derme.²⁵

A derme consiste em um gel de tecido composto em grande parte por proteínas e mucopolissacarídeos (a chamada substância fundamental). Esta matriz serve como um andaime que suporta as complexas redes neurovasculares, que atravessam a pele, e também suporta as estruturas anexas écrinas (glândulas sudoríparas) e foliculares (pêlos). A grande maioria das proteínas estruturais fibrosas da derme é composta de colágeno tipos I e III, e uma

rede de fibras elásticas composta por fibras oxitalânicas, elaunínicas e fibras elásticas maduras tecida em toda a espessura dérmica. É constituída por diferentes tipos celulares, dentre eles o mais abundante são os fibroblastos e fibrocitos responsáveis pela síntese e manutenção da MEC do tecido conjuntivo da derme.^{26, 28}

Uma membrana basal sempre ocorre entre o estrato basal e a derme e segue o contorno das interdigitações entre essas camadas. Nutrientes para queratinócitos se difundem na epiderme avascular da vasculatura dérmica através da membrana basal. O estrato basal contém as células-tronco da epiderme. Pela sua atividade mitótica, esse estrato também foi denominado estrato germinativo.²⁵

A camada subcutânea consiste em tecido conjuntivo frouxo que liga a pele frouxamente aos órgãos subjacentes, possibilitando que a pele deslize sobre eles. Esta camada, também chamada de hipoderme ou fáscia superficial, contém adipócitos uniloculares que variam em número em diferentes regiões do corpo e variam em tamanho de acordo com o estado nutricional. Esta camada é importante na absorção de impactos recebidos na superfície da pele, também atua como isolante térmico e armazena energia para períodos de escassez nutricional. O extenso suprimento vascular na camada subcutânea promove a rápida captação de insulina ou drogas injetadas nesse tecido.^{25, 29}

A pele apresenta diferenças segundo a sua localização. A palma das mãos e a planta dos pés, que sofrem um atrito maior, possuem uma epiderme com mais do que 5mm, constituída por várias camadas celulares e por uma camada superficial de queratina bastante espessa. Esse tipo de pele foi denominado pele grossa (ou espessa). Não possui pelos e glândulas sebáceas, mas as glândulas sudoríparas são abundantes. A pele do restante do corpo tem uma epiderme de 1 a 2mm, com poucas camadas celulares e uma camada de queratina delgada, e foi designada pele fina (ou delgada).^{25, 26}

2.2. Feridas

As feridas são eventos que afetam a fisiologia da pele, principalmente a camada dérmica, resultantes da quebra da integridade cutânea.³⁰ Classifica-se as feridas quanto à causa (cirúrgicas e não-cirúrgicas); quanto ao tempo de reparação (agudas e crônicas); e de acordo com a profundidade, em relação à extensão da parede tissular envolvida (epiderme, derme, subcutâneo e tecidos mais profundos, como músculos, tendões, ossos e outros). De

acordo com a profundidade as feridas podem ainda ser classificadas em graus, I, II, III e IV (Fig. 3).³¹

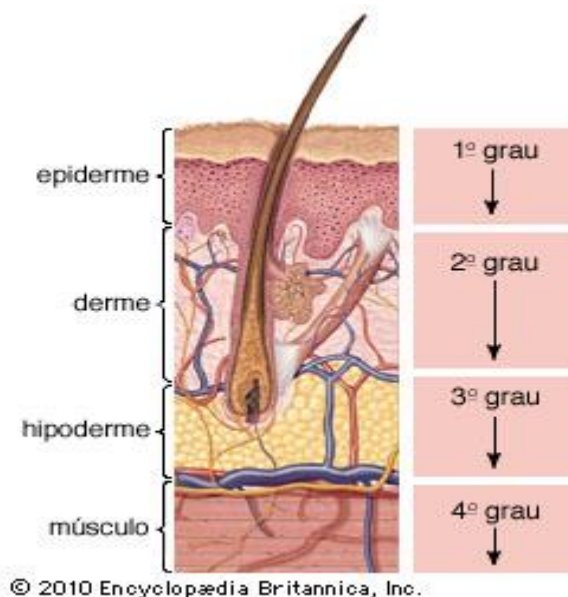


Figura 3: Camadas da pele, profundidade e graus das feridas.

Fonte: <https://escola.britannica.com.br/levels/fundamental/assembly/view/133779>

2.2.1. Feridas agudas

Feridas agudas geralmente são seguidas por trauma ou inflamação e curam-se dentro de seis semanas. São exemplos de feridas agudas as queimaduras, outras lesões traumáticas e feridas criadas cirurgicamente. O aparecimento de infecção e o tratamento inadequado podem levar a cronicidade da lesão. Assim, todas as feridas potencialmente podem torna-se crônicas.

32

2.2.2. Feridas crônicas

São definidas como aquelas onde o processo de reparação falhou e não restaurou a integridade anatômica e funcional durante um período de três meses.^{33, 34}

É preocupante quando estudos apontam que 2% da população dos países desenvolvidos irá desenvolver uma ferida crônica ao longo da vida e isto se torna mais alarmante quando observamos o aumento da população idosa, já que o fechamento da lesão está negativamente associado com a idade, quanto maior a idade mais difícil se torna a cicatrização.^{31, 35}

As feridas crônicas geralmente estão associadas a outras comorbidades como diabetes, insuficiência venosa, infecção e estado nutricional do paciente. As principais formas de feridas crônicas são: úlceras venosas, úlcera de pressão e úlcera do pé diabético.³⁶

2.3 Cicatrização

A cicatrização da ferida é um processo fisiológico no qual o organismo restabelece as funções dos tecidos que sofreram lesão. A profundidade do tecido envolvido é fator determinante neste processo. Em pequenas lesões que envolvem a epiderme, a regeneração é rápida com reepitelização entre 7 a 10 dias. Quando há perda de tecido e anexos (folículos pilosos e glândulas) a reepitelização não pode ocorrer, assim forma-se tecido conjuntivo para preencher o espaço na ferida.³⁷

Considera-se cicatrização de primeira intenção quando envolve a aproximação das bordas da lesão por sutura, clips ou adesivo dérmico, de segunda intenção quando as bordas da lesão não podem ser aproximadas e de terceira intenção, também chamada de primeira intenção tardia, quando por motivo de infecção ou tecido necrosado é necessário primeiramente remover o tecido não viável para depois aproximar as bordas da ferida.³⁷

2.3.1. O processo de cicatrização

Nos momentos após a ocorrência de uma lesão, várias vias intracelulares e intercelulares devem ser ativadas e coordenadas para a restauração da integridade do tecido e da homeostase.³⁸ A cicatrização normal de feridas é um processo interativo e dinâmico que segue um padrão previsível que pode ser dividido em fases sobrepostas definidas por populações celulares características e atividades bioquímicas: (a) hemostasia e inflamação, (b) proliferação e (c) maturação e remodelação. Uma linha de tempo aproximada desses eventos é mostrada na Figura 4. Essa sequência de eventos é fluida e se sobrepõe e, na maioria das circunstâncias, abrange o tempo de lesão até a resolução de feridas agudas. Todas as feridas precisam progredir através desta série de eventos celulares e bioquímicos que caracterizam as fases da cicatrização, a fim de restabelecer com sucesso a integridade do tecido.³⁹

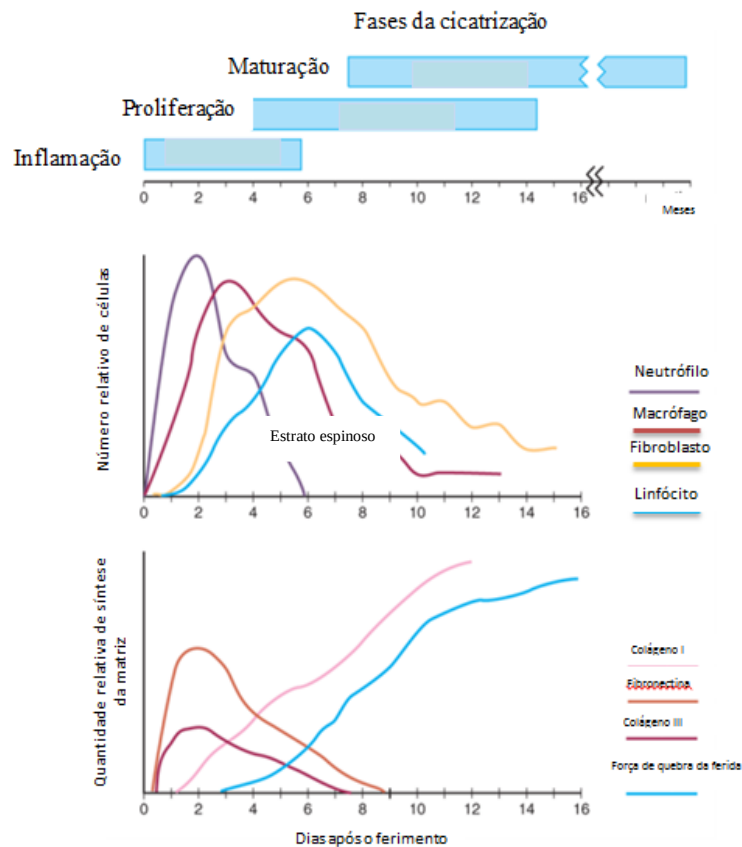


Figura 4: As fases celular, bioquímica e mecânica da cicatrização de feridas.

Fonte: Adaptado de Wound Healing, Brunicardi F, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, Pollock RE. *Schwartz's Principles of Surgery, 10e*; 2014. Disponível em:

<https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx/sectionid=59610850&bookid=980&Resultclick=2>

Accessed: October 11, 2018

2.3.1.1 Hemostasia

Normalmente a lesão no tecido provoca ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de seus constituintes, por esta razão os eventos iniciais do processo de reparo estão voltados para evitar perdas contínuas de sangue e fluidos, remover tecidos mortos e desvitalizados e prevenir infecções.³⁸

Como primeira resposta ao estímulo lesivo ocorre a vasoconstrição, esta ocorre devido a descargas adrenérgicas e ação de mediadores oriundos da desgranulação de mastócitos. A ruptura de vasos dispara uma sequência de eventos, iniciando-se com a deposição de plaquetas, seguida de sua ativação e posterior recrutamento de novas plaquetas, forma-se então um trombo rico em plaquetas que logo é infiltrado pela fibrina. Esta rede fibrinosa captura os eritrócitos e oclui o vaso rompido.⁴⁰

Fatores de crescimento produzidos pelas plaquetas ativadas iniciam a cascata de cura. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) inicia a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos, estimulando, ao mesmo tempo, a mitogênese de células musculares lisas e fibroblastos.⁴¹

Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) atrai macrófagos na área da ferida e estimula-os a produzir citocinas adicionais, incluindo fator de crescimento de fibroblastos (FGF), PDGF, fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina-1 (IL-1). Em adição TGF- β aumenta ainda mais o fibroblasto e suaviza quimiotaxia muscular e modula a expressão de colágeno e collagenase. O objetivo do PDGF e do TGF- β é estimular uma resposta, formação de células para produzir mais matriz células em preparação para o deposição rápida de novo tecido conjuntivo para reconstruir a matriz extracelular.³⁷

2.3.1.2 Fase inflamatória

Esta fase tem início após a interrupção da integridade da pele, eventos importantes ocorrem nesta fase: hemostasia, remoção de tecidos desvitalizados, o combate à colonização e à invasão por micro-organismos, principalmente bactérias. Esta tarefa é realizada pelos neutrófilos pela fagocitose e é crucial para os subsequentes processos, porque as feridas agudas infeccionadas não cicatrizam.^{38, 40, 42}

Os neutrófilos começam a ser atraídos para o local da ferida em 24 a 36 horas após a lesão por vários agentes quimioatrativos, incluindo TGF- β , componentes do complemento como C3a e C5a e peptídeos de formilmetionilo produzido por bactérias e produtos de plaquetas. Devido a alterações na regulação da superfície das moléculas de adesão, os neutrófilos se tornam pegajosos e, através de um processo de marginação, começam a aderir às células endoteliais nas vênulas pós-capilares em torno da ferida. Então, os neutrófilos rolam junto a superfície do endotélio sendo empurrada para a frente pelo fluxo sanguíneo.^{38,}

43

Entre 48 a 72 horas, monócitos aparecem na ferida e se diferenciam em macrófagos, com a função de auxiliar os neutrófilos na eliminação de micro-organismos, na eliminação de fragmentos teciduais inclusive removendo pela fagocitose os neutrófilos que perderam função. Ainda, por influência de ligantes a seus receptores de membrana, os macrófagos produzem e exportam mediadores lipídicos (eicosanoides), mediadores peptídicos (citocinas e fatores de crescimento), outras proteínas (tais como frações do complemento e fatores de

coagulação) e enzimas relacionadas ao reparo (tais como collagenases, matriz de metaloproteases). Além da ativação por ligantes, os macrófagos podem ser também ativados por alterações físico-químicas do microambiente. O influxo de neutrófilos e macrófagos ativados para esta região aumenta a demanda por oxigênio com consequente elevação das concentrações de ácido láctico e queda do pH. Esta combinação, hipóxia, pH baixo e alta concentração de ácido láctico, ativa o macrófago para a produção de fatores de crescimento.⁴⁰

42

2.3.1.3 Fase proliferativa

A fase proliferativa começa no terceiro dia após o ferimento e dura por cerca de 2 semanas. Há dois acontecimentos principais nesta fase que são a formação de novos vasos sanguíneos e a produção de matriz extracelular. Outros eventos adjuvantes são a epitelização e a contração da ferida.³⁸

Os macrófagos presentes liberam fatores de crescimento como PDGF, o TGF- β , o FGF e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) que estimulam a migração de fibroblastos. Formam-se também fibroblastos locais a partir das células-tronco mesenquimais autóctones. Ocorre então a fibroplasia, substituição da matriz extracelular por tecido conjuntivo mais denso e elástico. Para a eficiência deste processo é necessário que ocorra em paralelo a formação de novos vasos sanguíneos, a indução da angiogênese ocorre por ação direta de fatores de crescimento sobre as células vasculares e também devido à baixa tensão de oxigênio característica que ocorre no centro de uma ferida.⁴⁰

Por volta do 4º dia se inicia a formação do tecido de granulação composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que estão suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipos I e III. A pele sadia possui 80% de colágeno tipo I e 25% de colágeno tipo III, enquanto que no tecido de granulação o colágeno tipo III é de 40%.²⁹

A contração da ferida inicia-se com 4-5 dias e continua por 2-3 semanas, e ocorre pela alteração fenotípica dos fibroblastos para miofibroblastos. Uma ferida fechada por primeira intenção estará totalmente epitelizada em 24-48 horas, enquanto uma fechada por segunda intenção dependerá da distância existente entre as duas bordas.³⁰

Assim, os queratinócitos diferenciam-se morfológicamente e migram em direção a borda oposta através da matriz provisória, dividindo-se em uma porção superior (crosta) e outra inferior (transformada em tecido de granulação ao longo da fase proliferativa). Ao

encontrar a borda oposta há uma inibição por contato dos queratinócitos, voltando ao padrão de maturação e camadas, como na pele normal.²⁷

Ao final desta etapa, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida pela neovascularização e a rede linfática está passando por regeneração. Lentamente o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas o que começa a dar à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa.⁴⁰

2.3.1.4. Fase de remodelamento

Nesta fase, por volta do 10º dia, o excesso de colágeno produzido na fase proliferativa de forma desordenada é degradado e substituído por fibras de colágeno tipo I com maior número de ligações cruzadas e alinhadas de acordo com as forças de tensão da pele local. A resistência de uma cicatriz é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma com que as fibras estão organizadas. Quanto maior o número de ligações covalentes transversais, maior a resistência da cicatriz. Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparecem (observasse a apoptose de fibroblastos e células endoteliais) formando finalmente a cicatriz.²⁹

O tipo celular principal desta fase é o fibroblasto, que além de produzir as substâncias fundamentais da matriz extracelular cicatricial também é capaz de produzir metaloproteinases.⁴²

Os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação e presume-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento. Com o fechamento completo da ferida e a eliminação dos micro-organismos, os linfócitos se tornam abundantes. Os linfócitos não somente são efetores imunes, mas também, produtores de fatores de crescimento. De forma notável, nesta etapa, eles são atraídos para a região da ferida em igual número que os monócitos e, a partir do décimo quarto dia, são os leucócitos que predominam na região.⁴⁴

2.4. Tratamento de feridas

Ao longo da história o homem tem tentado desenvolver métodos para abreviar o tempo de cicatrização de feridas. Encontra-se no mercado diversos produtos disponíveis e

para se escolher corretamente o produto é preciso considerar fatores relacionados ao paciente, avaliação correta da ferida, oferta de produtos e custo do tratamento.²⁹

Um produto ideal para tratamento de feridas deve possuir características como facilidade de remoção, conforto, não necessitar ser trocado com frequência, manutenção da umidade, fácil aplicação e baixo custo.³⁷

Os produtos utilizados para o tratamento de feridas podem ser divididos em tópico (aplicados sobre o leito da ferida, utilizados para limpeza ou proteção da área ao redor) e curativos (cobrem a ferida com a finalidade de manutenção da umidade, proteção e favorecer o processo de cicatrização). Atualmente no Brasil as principais categorias de recursos disponíveis são ácidos graxos essenciais, alginato de cálcio, anti-sépticos e detergentes, bandagens para compressão, carvão ativado e prata, filmes semi-permeáveis, colágeno biológico, fator de crescimento celular, hidropolímeros, hidrogel, hidrocoloides, enzimas proteolíticas, sulfadiazina de prata, acetato de celulose permeável ao vapor, protetores cutâneos, membranas permeáveis ao vapor e curativos com gaze.⁴⁵

2.5. Biomateriais

Podemos definir biomaterial como qualquer substância natural ou sintética concebido para interagir com sistemas biológicos para auxiliar tratamentos médicos.³⁹ Para este propósito algumas características são importantes como a biocompatibilidade, flexibilidade e a biodegradabilidade.⁴⁶

Desde o início da década de 70 os polímeros biodegradáveis têm despertado o interesse dos pesquisadores e da indústria. Nos últimos anos muitos grupos de pesquisa trabalharam de forma colaborativa e houve um grande avanço nas pesquisas nesta área. Na escolha de materiais para serem utilizados na elaboração de um biomaterial biodegradável, os pesquisadores apontam algumas propriedades importantes como: (a) não induzir resposta inflamatória; (b) possuir um tempo de degradação e propriedades mecânicas compatíveis com sua função; (d) não produzir produtos de degradação tóxicos que possam ser rapidamente excretados ou absorvidos e (e) permeabilidade adequada para aplicação criada.^{23,37,47}

É importante ressaltar que os polímeros degradáveis vêm sendo vastamente utilizados na área de saúde, pois os mesmos podem ser reabsorvidos sem haver necessidade de remoção manual ou cirúrgica.²³ Além de polissacarídeos de origem humana, existe um grande número de moléculas a partir de outras fontes (naturais e sintéticas) que têm se mostrado promissoras

na elaboração de biomateriais poliméricos degradáveis sendo a quitosana e o álcool polivinílico (PVA) os dois polímeros que atualmente mais despertam o interesse da comunidade científica.⁴⁸

2.5.1. Quitosana

A quitosana (Figura 5) é um biopolímero catiônico obtido pela desacetilação da quitina presente em exoesqueletos especialmente de crustáceos, insetos e fungos. Apresenta estrutura básica molecular semelhante a do ácido hialurônico, possui atividade antibacteriana e é atóxica.^{49,50}

A presença de grupos amino protonados é responsável pela mucoadesividade, hemostasia e capacidade da quitosana de vincular-se a membranas biológicas.⁴¹ A quitosana é capaz de produzir camadas com poros interconectados e permite desenvolver formas tais como hidrogéis, esponjas, fibras tridimensionais e estruturas com poros em três dimensões que promovem a viabilidade celular por fornecer suplemento de oxigênio e nutrientes suficientes.^{51,52}

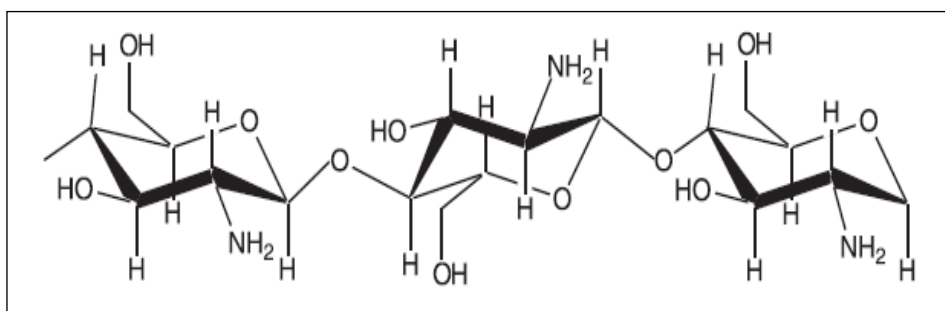


Figura 5: Estrutura química da quitosana.

Fonte: R. Jayakumar et al., *Biotechnology Advances* 29 (2011) 322–337

A quitosana possui atividade antibacteriana intrínseca, e concernente a sua bioatividade, esta apresenta maior bioatividade do que outros polímeros naturais ou sintéticos e contribui para a aceleração da cicatrização por (a) induzir a produção de interleucina-8, (b) estimular macrófagos e a quimioatração de neutrófilos além do fato de (c) que a degradação do polímero em N- acetilglucosamina (um componente importante do tecido conjuntivo da derme) também auxilia na rápida cicatrização da ferida.²³

2.5.2. Álcool Polivinílico

O álcool polivinílico é um polímero sintético produzido pela polimerização do acetato de vinila seguida de reação de hidrólise do poli(acetato de vinila) em álcool polivinílico, é hidrofílico, não tóxico, biodegradável, biocompatível, com boa capacidade na formação de filmes (propriedade mecânica). O álcool polivinílico também funciona como barreira ao oxigênio e aromas, sendo promissor também para uso na área alimentícia e de embalagens.^{53,54}

A relação entre o percentual de hidroxilas no polímero final, após a reação de hidrólise, e o número total inicial de radicais ácidos representa o grau de hidrólise do PVA. Esse parâmetro é importante na caracterização das propriedades deste polímero. Um aumento do grau de hidrólise implica na redução da solubilidade na água que provêm da estabilização energética decorrente das ligações de hidrogênio intra e intercadeias poliméricas. Além disso, decorrente desta estabilização observa-se um aumento da adesão do polímero em superfícies hidrofílicas, da viscosidade e da resistência à tração. Essas características, principalmente a polaridade, conferem versatilidade de uso e o torna adequado para ser inserido em blendas com polímeros naturais.^{11, 55, 56}

Dentre os polímeros empregados na síntese de hidrogeis, o álcool polivinílico é um dos biomateriais mais estudado e utilizado na produção de sistemas de liberação controlada, pois confere excelente transparência, consistência macia quando na forma de membrana, além de apresentar excelente resistência química e ser biocompatível.⁵⁷

2.6. Bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd.)

É uma palmeira do cerrado brasileiro, da família *Palmae*, espécie *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., conhecida popularmente no Brasil como bocaiúva, macacaúba, macaiba, macaibeira, macajuba, macaúba, macaúva, mucaia, mucajá, entre outros, cujo fruto tem polpa amarela que é consumido fresco ou processado com grande aceitação popular (Figura 6).⁵⁸



Figura 6: Palmeira da Bocaiúva com frutos.

Fonte:

http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/ceazinepdf/Macaba_Diretrizes_e_recomendacoes_para_ado_cao_de_boas_praticas_de_manejo_para_o_extrativismo_do_fruto_da_macaba_bocaiuva.pdf.⁵⁹

As porções comestíveis, polpa e amêndoa, representaram 48% do peso total do fruto. Os frutos amadurecem principalmente entre os meses de setembro a janeiro. A polpa produz óleo de cor laranja devido a presença de carotenoides, compostos orgânicos que apresentam propriedades antioxidantes responsáveis pela estabilidade oxidativa do óleo. Estudos descritos na literatura por Ramos (2007) e Bressan (2009) apontam que a atividade antioxidante destes componentes está intrinsecamente relacionada com a melhora da resposta imune e na redução no risco de doenças degenerativas (por exemplo, câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular). Além das atividades supracitadas, o estudo descrito por Lescano *et al* (2015) também indica atividade anti-inflamatória e diurética quando os autores fizeram o uso de microcápsulas do óleo de bocaiúva em ratos *Wistar*.^{24, 60, 61,}

O óleo da polpa é composto também por ácidos graxos saturados e insaturados sendo predominante os insaturados na proporção média entre 70 a 80%. Destes predomina o ácido oleico que tem sido associado a redução da pressão sanguínea.¹⁷ É importante ressaltar que os ácidos graxos insaturados desempenham também funções importantes tal como a manutenção do sistema imune em processos inflamatórios bem como a ação antimicrobiana.^{54, 55} Além disso, estudo recente pelos autores Costa & Moreno (2014) demonstrou que o óleo de bocaiúva apresentou atividade cicatrizante em experimento utilizando ratos *Wistar* em feridas tratadas com creme lanette contendo 20% de óleo de bocaiúva.⁶²

2.7. Nanopartículas de selênio

Podemos definir nanotecnologia como a ciência e engenharia envolvidos na concepção, síntese, caracterização e aplicação de materiais cuja menor organização funcional, em pelo menos uma dimensão, está na escala nanométrica. Nanopartículas são definidas como dispersões ou partículas sólidas com tamanho em escala de 10-1000nm.^{63, 64, 65}

As nanopartículas possuem área de superfície aumentada e tem muito mais facilidade de entrar nas células.⁶⁶

O selênio é um elemento de traço comum no organismo, importante nutricionalmente, especialmente na formação de selênio-proteínas as quais têm a função de proteger as células de danos oxidativos. A deficiência de selênio está relacionada a doenças degenerativas e distrofia muscular em seres humanos. A estimulação de resposta imune e a redução da mortalidade no câncer são vantagens apontadas em estudos recentes referentes a ingestão de selênio.¹⁵ Ademais, tem sido relatado na literatura efeitos antibacteriano e anticâncer pertinentes ao selênio.⁶⁷

No entanto, a dose e a forma química de derivados de selênio desempenham um papel importante na sua biodisponibilidade e atividade biológica.¹⁵ Estudo demonstrou que a atividade anticâncer de compostos de selênio é dependente da concentração, doses baixas demonstraram propriedade protetora anticancer enquanto que altas concentrações poderiam ser carcinogênicas.⁶⁸

Segundo Forootanfar (2014), as excelentes propriedades biológicas das nanopartículas de selênio em conjunto com sua menor toxicidade introduziram-las como um bom candidato para a substituição de outras formas de selênio.¹⁵

Considerando a atividade antioxidante do selênio e que a síntese e secreção de colágeno requerem hidroxilação de lisina e prolina sendo que os co-fatores necessários para a hidroxilação enzimática do colágeno são ferro ferroso, oxigênio molecular, α -cetoglutarato e vitamina C, o selênio potencialmente pode contribuir com o processo de cicatrização.⁶⁹

3.OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICO

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver e avaliar os efeitos biológicos de películas incorporadas com o óleo da polpa de bocaiúva e nanopartículas de selênio sobre a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos .

3.2. Objetivo(s) Específico(s)

- ✓ Realizar caracterização físico-química do óleo da polpa de bocaiúva;
- ✓ Sintetizar e caracterizar as nanopartículas por meio de técnicas espectroscópicas e microscópicas;
- ✓ Produzir e caracterizar a película;
- ✓ Incorporar óleo da polpa de bocaiuva e as nanopartículas de selênio nas películas;
- ✓ Implantar a película em feridas de camundongos;
- ✓ Avaliar *in vivo* macro e microscopicamente o processo de cicatrização.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada no Comitê de Ética para Utilização de Animais da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) com o número 005/11 obedecendo a Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 e demais legislações pertinentes e foi desenvolvida no Laboratório de Catálise Orgânica e Biocatálise – LACOB da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, no laboratório de Farmacologia e Inflamação Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) e no laboratório de bromatologia do Centro Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN).

4.1. Obtenção do óleo da polpa da bocaiúva

Os frutos maduros da bocaiúva foram coletados na região de Dourados – MS, na Fazenda São Nelson localizada próxima ao anel viário da perimetral norte (-22°12'07.9" sul, -54°47'40.6" oeste), durante os meses de janeiro a março da safra de 2015. Após a coleta, os frutos foram sanitizados e colocados em estufa com circulação de ar a 50 °C para secagem, sendo posteriormente descascados e congelados. A polpa seca foi colocada em um vidro âmbar contendo o solvente hexano para extração do óleo por 24h. Após, o solvente foi removido por rota evaporação (40 °C) e o óleo obtido foi armazenado sob congelamento até o momento da utilização.

4.2. Caracterização do óleo

Determinou-se o índice de acidez, peróxido e iodo no óleo de bocaiúva. A metodologia utilizada para as análises foram realizadas segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008)⁷⁰, capítulo XVI que trata dos procedimentos gerais para análises de óleos e gorduras. Todas as análises foram realizadas em triplicata no Laboratório de Bromatologia do Centro Universitário da Grande Dourados - UNIGRAN.

4.2.1. Índice de acidez

A determinação do índice de acidez permite avaliar o estado de conservação do óleo. O índice de acidez é definido como o número de mg de hidróxido de potássio necessário para neutralizar um grama da amostra.

4.2.2. Índice de Peróxidos

Os lipídios sofrem o processo de oxidação na presença de oxigênio, com formação inicial de peróxidos, que em meio ácido, liberam iodo a partir do iodeto de potássio. Esse iodo liberado é titulado pelo tiosulfato de sódio, em presença de amido como indicador. Desta forma, pode-se dosar a quantidade de peróxido formado no óleo e sua estabilidade química.

4.2.3. Índice de Iodo

É uma medida do grau de insaturação dos óleos. É determinado pela quantidade de halogênio absorvido e, convencionalmente, é expresso como o peso do iodo absorvido por 100 g de amostra. Os resultados obtidos por este método dependem de fatores tais como: o tempo de contato, a natureza de portadora do iodo (solução utilizada na determinação) e o excesso de iodo, sendo necessário cumprir estritamente as mesmas condições para cada análise. Para cada óleo existe um intervalo característico do valor do índice de iodo que também está relacionado com o método empregado na sua determinação. Geralmente, é determinado pelo método Wijs, que usa a solução de tricloreto de iodo.

4.3. Caracterização centesimal da polpa

A matéria prima foi caracterizada de acordo com suas características físico-químicas. Todas as análises foram efetuadas em triplicata e as determinações realizadas foram: teor de lipídios, teor de cinzas, teor de umidade e teor de acidez titulável, segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.3.1. Lipídios

Para a determinação de lipídios foi realizado a extração á quente utilizando o éter de petróleo e o aparelho soxhlet. Pesou-se 5g da amostra e em seguida esta foi introduzida no equipamento de soxlet e extraídos com éter. Em seguida transferiu-se as amostras para o aparelho onde se acoplou cada uma a um recipiente. Acrescentou-se o solvente mantendo aquecimento durante 16 horas. Após destilação do éter, o recipiente extraído foi transferido para uma estufa a 105°C por uma hora para evaporação do restante do solvente. Ao final, transferiu-se para um dessecador até temperatura ambiente, pesaram-se os recipientes para determinação da massa de lipídios extraída.

Através do calculo:

$$\% \text{Lipídios} = \frac{(\text{massa do balão} + \text{massa do óleo extraído}) - (\text{massa do balão vazio}) \times 100}{\text{massa da amostra pesada}}$$

4.3.2. Cinzas

As cinzas consistem no resíduo obtido de uma amostra quando a mesma é incinerada e refere-se à porção inorgânica (minerais) da amostra. Para isso, levou-se os cadinhos de porcelana para a mufla anteriormente para evitar reações violentas e perda da amostra, caso levada diretamente na mufla em alta temperatura, foram retirados e pesados. Então pesou-se neste cadinhos aproximadamente 5g da amostra e em seguida foram levadas à mufla pesando a cada duas horas após resfriamento em dessecador até peso constante. A massa final foi determinada, constituindo a massa de cinzas presente.

4.3.3. Umidade

A umidade consiste na determinação da quantidade de água na amostra através do aquecimento da mesma utilizando-se uma estufa. Pesou-se a massa de aproximadamente 5g gramas de amostra e levou a estufa com circulação de ar a 105°C por 24 horas. O teor de umidade foi calculado pela diferença de peso entre as amostras no início e ao final do processo, sendo esta diferença correspondente à quantidade de água retirada.

4.3.4. Acidez Titulável

A acidez titulável permite conhecer o estado de conservação de um dado produto alimentício, sendo que um processo de decomposição, seja por hidrólise ou oxidação geralmente altera a concentração dos íons de hidrogênio presentes na amostra. Os métodos que avaliam esta acidez funcionam através de titulações com soluções básicas padrão de soluções aquosas ou alcoólicas. Para esta análise, solubilizou-se 2,5g da amostra em 50 mL de álcool 96% deixando-a em erlenmeyer fechado por 24 horas em repouso. Após este tempo transferiu-se 20 mL do sobrenadante em outro erlenmeyer acrescentando, à este, três gotas de fenolftaleína e realizou-se a titulação com hidróxido de sódio 0,01 M. Realizou-se também a titulação do branco (apenas a solução alcoólica) para eliminar a interferência da análise. Os resultados foram obtidos através da seguinte equação:

$$\% \text{ Acidez Titulável} = \frac{(V - V1) \times f \times 100}{m \times c}$$

Sendo:

V = volume de NaOH 0,01 M gasto na titulação da amostra.

V1 = volume de NaOH 0,01 M gasto na titulação do branco.

f = fator de correção da solução de NaOH 0,01 M, f=0,9865.

m= massa da amostra pesada

c= fator que corrige a análise de acordo com a concentração de NaOH utilizada; para NaOH 0,01 M, utiliza-se o fator 100.

4.4. Nanopartículas de selênio

As nanopartículas (NP-Se) de selênio foram sintetizadas via procedimento descrito por Luo *et al* (2012) utilizando-se um meio de ácido ascórbico e óxido de selênio. A solução de NP-Se produzidas possuem uma concentração de 1 mmol/L.⁷¹

4.5. Confeção das películas

4.5.1. Estudo da propriedade mecânica da blenda PVA/quitosana

Primeiramente foi realizado um teste preliminar com a finalidade de determinar a melhor formulação para a blenda PVA/quitosana.

Preparou-se uma solução de quitosana 0,5g diluídos em 50 mL de ácido acético a 1% sob agitação magnética até obter-se uma solução límpida com pH aproximadamente a 6.

Preparou-se, em outro frasco, uma solução de PVA (polivinilálcool) dissolvendo-se 2,5g de PVA em 50 mL de água destilada a 70° C sob agitação magnética até obter-se uma solução límpida com pH 4.

Para obter uma película com adesividade, flexibilidade e resistência testaram-se diferentes proporções dos polímeros. A combinação das soluções de quitosana e PVA obedeceram as seguintes proporções: 20/80, 30/70, 25/75; 50/50 e 75/25 (em massa para as soluções PVA/quitosana) obtendo-se um de pH $4,0 \pm 0,05$ através do uso de uma solução de NaOH. A reticulação foi realizada pela adição, gota a gota, sob agitação, de glutaraldeído variando a proporção entre 1,0 e 5,0% (em massa de polímero). A solução final foi vertida em placas plásticas e secas a temperatura ambiente por 72h.¹¹

As observações visuais qualitativas foram realizadas levando-se em conta a solubilidade, miscibilidade e segregação de fase nas blends, além de avaliar a espessura dos filmes obtidos.

4.5.2. Película polimérica (PB)

Preparou-se uma solução de quitosana a partir de quitosana desacetilada de peso molecular médio, 0,5g de quitosana foram diluídos em 50 mL de ácido acético a 1% sob agitação magnética até obter-se uma solução límpida com pH 6.

Preparou-se, em outro frasco, uma solução de PVA (polivinilálcool) dissolvendo-se 2,5g de PVA em 50 mL de água destilada a 70° C sob agitação magnética até obter-se uma solução límpida cujo com pH 4.

Misturaram-se as soluções anteriores na proporção de 25:75 p/p (PVA/ quitosana) com subsequente adição de 1% de reticulante (solução de glutaraldeído 25% P.S.) sob agitação.¹¹

Verteu-se a solução final em uma forma de silicone e deixou-se secar a temperatura ambiente por 72 horas obtendo-se a película, figura 7.



Figura 7: Película elaborada com quitosa e PVA.

4.5.3. Película polímeros juntamente com óleo de bocaiúva (PO)

O preparo da película contendo óleo de bocaiúva (PO), Figura 8, seguiu o mesmo processo apresentado para a PB com a diferença de que no instante que é acrescentado o reticulante, para este caso, foi também acrescentado 10% do volume total de óleo de bocaiúva. Esta porcentagem baseou-se no estudo de Costa & Moreno (2014) e em testes realizados para verificar a quantidade de óleo que é possível incorporar na película. O período de descanso da película também foi o mesmo apresentado para a PB.



Figura 8: Película elaborada com quitosana PVA e óleo de bocaiúva.

4.5.4 Película contendo nanopartículas de Selênio (PSe)

O procedimento de obtenção da PSe (Figura 9) seguiu os mesmos passos do que fora apresentado para a PB. Não obstante, neste caso, à solução de PVA preparada foi acrescida 7,5 mL da solução de solução contendo nanopartículas de selênio. O restante do procedimento também foi executado seguindo o exposto para a PB



Figura 9: Película elaborada com quitosana, PVA e nanopartícula de selênio.

4.5.5. Película contendo óleo de bocaiúva e nanopartículas de Selênio (POSe)

Preparou-se uma solução de quitosana a partir de quitosana desacetilada de peso molecular médio. Diluiu-se 0,5g de quitosana em 50 mL de ácido acético a 1% sob agitação magnética até obter-se uma solução límpida. Verificou-se o pH da solução estava em 6.

Preparou-se uma solução de PVA (polivinilálcool) dissolvendo-se 2,5g de PVA em 50 mL de água destilada a 70°C, sob agitação magnética, até obter-se uma solução límpida. Nesta solução acrescentou-se a nanopartícula de selênio. Verificou-se o pH da solução estava em 4.

Misturaram-se as soluções anteriores na proporção de 25:75 p/p (PVA/quitosana).

Em seguida acrescentou-se 10% de óleo de bocaiúva⁶² e 1% de reticulante (solução de glutaraldeído 25%P.S.)

Verteu-se a solução final em uma forma de silicone e secou-se por 72h a temperatura ambiente obtendo-se a película. (Figura 10).

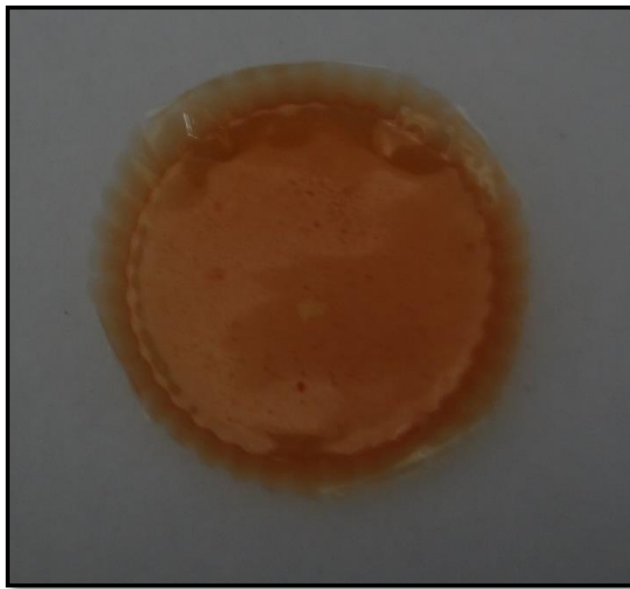


Figura 10: Película elaborada com quitosana, PVA, óleo de Bocaiúva e nanopartícula de selênio.

4.6. Animais para ensaio de cicatrização

Todos os animais envolvidos na pesquisa foram recebidos antecipadamente ao início dos experimentos para aclimação e mantidos em gaiolas coletivas até o dia do experimento. Foram utilizados 75 camundongos *Swiss* com peso médio de 20g, obtidos do Biotério Central da UCDB.

Os animais foram mantidos em condições de isolamento durante todo experimento em gaiolas individualizadas, com água e ração *ad libitum* e ciclos alternados de luminosidade a cada 12 horas no Biotério da UCDB.

4.6.1. Padronização dos grupos

A distinção dos grupos foi feita conforme o tratamento utilizado em ambas as úlceras de cada animal:

Grupo sem tratamento (**sem película**): 15 animais com feridas cutâneas sem tratamento e acompanhadas por 2, 7 e 14 dias (n=5 animais por tempo de tratamento);

Grupo controle: 15 animais cujas úlceras foram tratadas com a película contendo quitosana e PVA acompanhadas por 2, 7 e 14 dias (n=5 animais por tempo de tratamento).

Grupo óleo de bocaiúva (**OPB**): 15 animais cujas úlceras foram tratadas com a película contendo quitosana, PVA e óleo de bocaiúva e acompanhadas por 2, 7 e 14 dias (n=5 animais por tempo de tratamento).

Grupo nanopartícula (**Se**): 15 animais cujas úlceras foram tratadas com a película contendo quitosana, PVA e selênio acompanhadas por 3, 7 e 14 dias (n=5 animais por tempo de tratamento).

Grupo óleo de bocaiúva + nanopartícula (**OPB+Se**): 15 animais cujas úlceras serão tratadas com a película contendo quitosana, PVA, óleo de bocaiúva e nanopartículas e acompanhadas por 2, 7 e 14 dias (n=5 animais por tempo de tratamento).

4.6.2. Procedimento cirúrgico: feridas cutâneas dorsais

O procedimento seguiu protocolo padronizado no laboratório de inflamação da UCDB. Os camundongos foram pesados, anestesiados por via intraperitoneal com cetamina (150mg/Kg) e xylazina (10mg/Kg) de acordo com o peso do animal. Posteriormente, os animais foram tricotomizados, posicionados na mesa operatória em decúbito ventral e após assepsia do dorso com álcool 70%, duas excisões cirúrgicas circulares foram feitas com *punch* cirúrgico de 6 mm de diâmetro com o animal em decúbito lateral, atingindo a região dermo-epidérmica. Foram feitas duas feridas por animal (Figura 11).

A pele excisada para confecção das úlceras nos animais foi acondicionada em *ependorfs* para posteriores estudos histológicos e bioquímicos.

As películas foram colocadas nas feridas de cada animal de acordo com o respectivo grupo. Uma película para cada ferida do animal, sendo que para cada animal foi colocado o mesmo tipo de película. Após receberem o tratamento, os animais foram colocados em gaiolas individualizadas, onde permaneceram até o dia da eutanásia.



Figura 11: Confecção de ferida cutânea.

4.6.3. Coleta do material para estudo

Foram eutanasiados 5 animais por grupo e tempo de seguimento (n=10 úlceras), nos dias 2, 7 e 14 em câmara de CO₂.

Ambas as úlceras de cada animal foram fotografadas separadamente pela câmera digital Sony DSCW320, modo básico (sem flash, sem zoom, resolução de 2 Mega Pixels).

Na aquisição das imagens, foi utilizado um aparato de metal onde a câmera foi fixada numa base de alumínio distando 15 cm de uma régua perpendicular ao animal. Em seguida, foram coletadas amostras das úlceras/cicatrizes para estudos histológicos (n=5 amostras por tempo e por tratamento) dos animais de cada grupo nos dias 2, 7 e 14. A pele dorsal ao redor das úlceras foi recortada e com o auxílio do *punch* histológico de 6 mm de diâmetro foi feita uma biopsia cilíndrica da região de cada úlcera/cicatriz de cada animal (Figura 12).

Uma das amostras de cada animal foi acondicionada em eppendorf, contendo solução de formaldeído 10,0% para posteriormente ser seguido processamento habitual para estudo histológico. As demais amostras foram acondicionadas em *eppendorf* contendo tampão MPO e inibidor de protease e foram imediatamente congeladas a -80°C para posterior realização de ensaios bioquímicos para dosagem de mieloperoxidase (MPO).



Figura 12: Tecido retirado para análise histológica.

4.7 Avaliação macroscópica da cicatrização das úlceras

As feridas foram fotografadas com câmera digital Sony DSCW320A. A câmera foi posicionada perpendicularmente em relação a ferida em uma haste com altura padronizada de 15cm da base. A partir das fotografias, as áreas das úlceras foram calculadas com o auxílio do software ImageJ.^{72,73} A área inicial corresponde ao dia do procedimento cirúrgico (dia 0) e a área final corresponde ao dia da eutanásia (dias 2, 7 ou 14).

4.8 Avaliação microscópica das úlceras

Para evitar vieses, a avaliação histopatológica foi realizada por um único analista sem o conhecimento da identificação dos grupos pelo analista. As informações obtidas a partir da observação microscópica foram classificadas de acordo com a intensidade em que foram encontradas e transformadas em variáveis quantitativas para cada achado histológico, sendo assim classificados de acordo com a sua ocorrência/intensidade.

4.8.1 Proliferação vascular

Foi considerada ausente, quando não se evidenciou vasos no corte histológico; discreta, quando foram visíveis poucos vasos esparsamente situados, de forma isolada no contexto; moderada, quando apareceram com maior frequência e dispersos no campo óptico e acentuada, quando evidenciados com grande frequência, dispostos em todo o contexto.

4.8.2 Infiltrado inflamatório

Foram classificadas em ausente, quando estas células não foram visualizadas no campo óptico; discreta, quando evidenciadas de forma isolada, possibilitando distinguir áreas livres de infiltrado; moderada quando apareceram com maior frequência, constituindo agregados densos, mas possibilitando visualizar áreas livres de infiltrado; e acentuada, quando as células foram evidenciadas com grande frequência, constituindo agregados densos e justapostos, sem áreas livres de infiltrados.

4.9 Avaliação de marcadores inflamatórios

4.9.1 Dosagem de óxido nítrico

A dosagem de nitrito foi realizada conforme descrito por Miranda et. al (2001) com adaptações. Foi realizada a maceração do tecido e para desproteínizar, 250µL de soro mais 250 µL de álcool etílico absoluto, foram agitados no vórtex e centrifugados (15min, 3500rpm) a 4°C. Posteriormente, 100µL do sobrenadante foi adicionado a 150µL de cloreto de amônio (NH₄Cl) a 5% e 30 µL de hidróxido de sódio (NaOH) a 5%. Para dosagem foi utilizada a combinação da redução de nitrato em nitrito com a utilização de cloreto de vanádio (VCl₃) e detecção de nitrito pela reação de Griess (DING et. al, 1988). Para tanto 50µL de amostra juntamente com 50µL de Sulfanilamida a 2%, 50µL de naftiletilenodiamino dihidroclorídrico (NEED) a 0,1% e 60µL de VCl₃ foram incubados em placas de 96 poços por 60 minutos a 37°C. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm. A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão construída com nitrito de sódio nas concentrações de 0 - 100 µM. Os resultados foram expressos em µM.mL⁻¹ de soro sanguíneo.

4.9.2 Determinação do infiltrado de neutrófilos através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

O tecido retirado foi colocado em 200µL de tampão NaCl a 0,1M; NaPO₄ a 0,02M e NaEDTA a 0,012M gelado (pH 4,7) este foi triturado com auxílio de uma tesoura. O homogenato foi em seguida centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Foi realizado então um choque hipotônico no “pellet” de células com 600 µl de NaCl a 0,2%, seguido por 600 µl de uma solução de NaCl a 1,6% e glicose a 5%. Depois de nova centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o “pellet” foi ressuspensão em tampão NaPO₄ (pH 5,4) contendo

0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado. A seguir esse homogeneizado foi congelado e descongelado três vezes em nitrogênio líquido e novamente centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, 30µL do sobrenadante das amostras de tecido foram colocados em placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço foram adicionadas 25µL de TMB (“3, 3’, 3, 3’-tetramethylbenzidine” – 1,6 mM final na placa) e a placa foi incubada por 5min. Logo após, 100 µL de H₂O₂ (0,5 M final na placa) foram adicionados e a placa foi incubada por mais 5 min. A seguir a reação foi interrompida com ácido sulfúrico a 4M. A quantificação dos neutrófilos foi feita a partir de uma curva padrão de neutrófilos (obtidos da cavidade peritoneal de camundongos) após 6h do estímulo com carragenina, os quais foram diluídos em série em NaPO₄ a 0,08M (1x10⁵ neutrófilos/ poço/ 50µL). Foi determinada a absorbância em leitor automático de microplacas (Spectra Max 250; Molecular Devices) no comprimento de onda de 450nm. Resultados expressos como número de neutrófilos por 0,1g de tecido.

4.10 Avaliação da angiogênese pela técnica de implante de esponja

4.10.1. Preparação, implantação e remoção das esponjas

Discos de esponja de poliéster-poliuretano (espuma convencional) com 8 mm de diâmetro por 5 mm de espessura foram usados como matriz para o crescimento do tecido fibrovascular. As esponjas foram lavadas e fervidas em água destilada por aproximadamente 30 minutos, após foram secas em temperatura ambiente e mantidas em condições estéreis até momento do implante.⁷⁴

Inicialmente os animais foram divididos em cinco grupos com seis animais em cada grupo, como segue:

Grupo Controle: 6 animais com esponjas sem tratamento; Grupo branco: seis animais cujas esponjas foram tratadas com a película contendo quitosana e PVA; Grupo óleo de bocaiúva (**OPB**): 6 animais cujas esponjas foram tratadas com a película contendo quitosana, PVA e óleo de bocaiúva; Grupo nanopartícula (**Se**): 6 animais cujas úlceras foram tratadas com a película contendo quitosana, PVA, óleo de bocaiúva e selênio; Grupo óleo de bocaiúva + nanopartícula (**OPB+Se**): 6 animais cujas esponjas serão tratadas com a película contendo quitosana, PVA, óleo de bocaiúva e nanopartículas.

Para o implante, as esponjas foram colocadas individualmente em placa de 96 poços, contendo 300µl de salina ou da película em solução. Para o implante dos fragmentos das esponjas, os animais foram anestesiados com solução de cetamina (150mg/Kg) e xylazina (10mg/Kg) e submetidos a tricotomia e assepsia da região cervical. Foi realizada uma incisão de 1cm na pele, que foi em seguida divulsionada, formando uma cavidade onde foi implantada a esponja. A incisão foi suturada com fio de nylon 3.0. Após o término do experimento os animais receberam intraperitonealmente solução de dipirona (10mg/Kg), e ao retornarem da anestesia, os animais foram colocados em caixas individuais e receberam livre acesso a água e ração durante 7 dias.

Os animais implantados foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia no 7º dia após serem implantados e os discos de esponjas foram cuidadosamente removidos, dissecados do tecido aderente e pesados. Os fragmentos de cada grupo foram macerados em 0,5mL de solução salina para determinação dos níveis de hemoglobina com indicativo de neovascularização e armazenados em microtubos.

4.10.2 Dosagem de hemoglobina

Em uma placa de 96 poços adicionar 50 µL do macerado e acrescentar 50 µL do corante Veneno de Drabkin. Para o padrão foi utilizado 20 µL do Padrão de Hemoglobina e 30 µL de água destilada e em seguida o corante. O procedimento foi realizado em duplicata. Após isso a análise foi feita em Leitor de Microplaca em 540 nanômetros.

4.11 Análise de Colágeno total e subtipos de col-I e col-III pela técnica de picrossírius seguida da quantificação usando software Image-J ProPlus

As amostras de tecido foram coletadas e encaminhadas para processamento histológico no Laboratório da Universidade Estadual de Maringá. Todos os cortes foram corados com *picrossírius* e examinados ao microscópio óptico sob luz polarizada. A observação das fibras colágenas por meio desse método permitiu a diferenciação do colágeno tipo I (birrefringência laranja- amarelado a laranja e vermelha) e tipo III (birrefringência verde ou verde-amarela). De cada lâmina, foram selecionados e fotomicrografados 10 campos histológicos com câmera digital no aumento de 200x. As imagens foram analisadas com ajuda do *software* Image J ProPlus, obtendo-se o percentual de colágeno por meio da análise de partículas automatizadas de acordo com seleção e medida das áreas com base na cor. Os

valores para cada tipo de colágeno no *Threshold Colour* foram padronizados para todas as imagens do seguinte modo: matiz 0-40 para a cor vermelha (colágeno tipo I) e 45-120 para a cor verde (colágeno tipo III), saturação 0-255 e brilho 5-225 para ambos os tipos de colágeno.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da polpa de bocaiúva

A caracterização da polpa de bocaiúva foi realizada por análises físico-químicas envolvendo teores de proteínas, lipídeos, cinzas, umidade e acidez (Tabela 1) conforme descrito na literatura.⁷⁵

Tabela 1: Valores médios dos teores de lipídeos, cinzas, umidade e acidez da polpa de Bocaiúva.

Parâmetros	Teor (%)*
Proteínas	1,16 ± 0,05
Lipídios	28,95 ± 1,23
Cinzas	3,47 ± 0,02
Umidade	43,93 ± 0,14
Acidez	7,26 ± 0,54
Carboidratos	22,49 ± 0,5

*Média ± Desvio Padrão da média

5.2. Caracterização do óleo de bocaiúva

A caracterização do óleo de bocaiúva foi realizada por análises físico-químicas envolvendo índices de acidez, peróxido e iodo (Tabela 2) bem como por análise de infravermelho (Figura 13) conforme descrito na literatura.⁷⁶ Na tabela 3 apresenta-se uma comparação dos resultados obtidos com dados da pesquisa realizada por Ciconini (2012).

Tabela 2: Caracterização físico-química do óleo de bocaiúva

Parâmetros	Média ± Desvio Padrão da média
Índice de acidez (% ác. Oleico)	0,27±0,05
Índice de peróxido (meq/Kg)	ND*
Índice de iodo (gI ₂ /100g)	68,50±0,08

*ND: não detectável

Tabela 3: Comparação dos índices de acidez e iodo entre o presente estudo e o estudo realizado por Ciconini (2012).

Parâmetros	Presente estudo	Ciconini (2012)			
		Campo Grande	São Gabriel do Oeste	Corumbá	Aquidauana
Índice de acidez (% ác. Oleico)	0,27±0,05	0,27	0,17	0,07	0,22
Índice de iodo (gI ₂ /100g)	68,50±0,08	65,56	74,18	69,51	70,64

Média ± Desvio Padrão da média

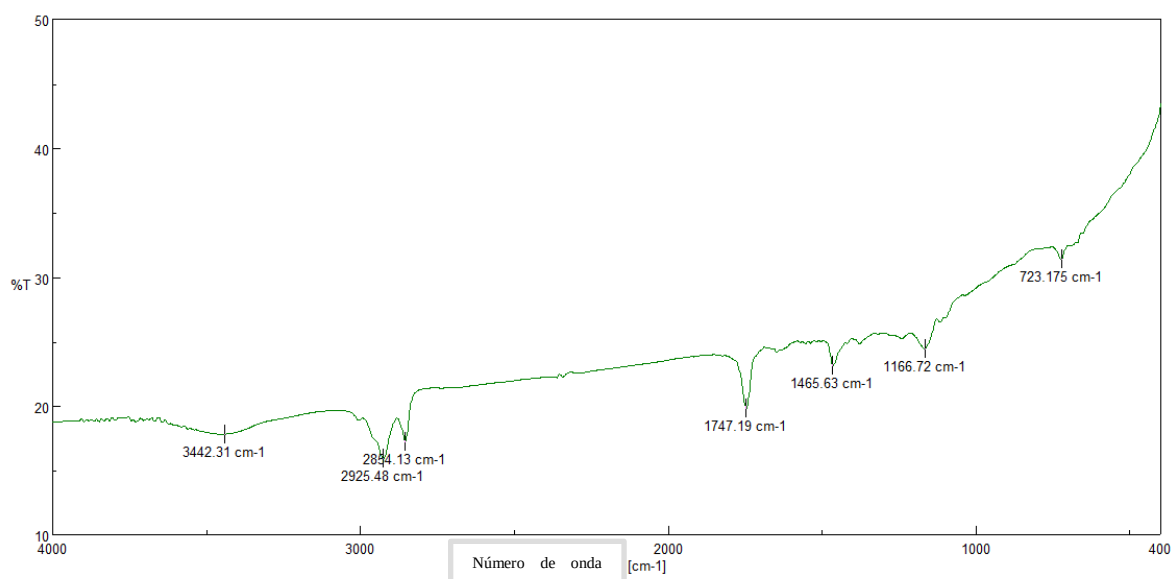


Figura 13: Espectro de infravermelho para a amostra de óleo de bocaiúva em pastilha de KBr.

5.3. Estudo da propriedade mecânica da película PVA/quitosana

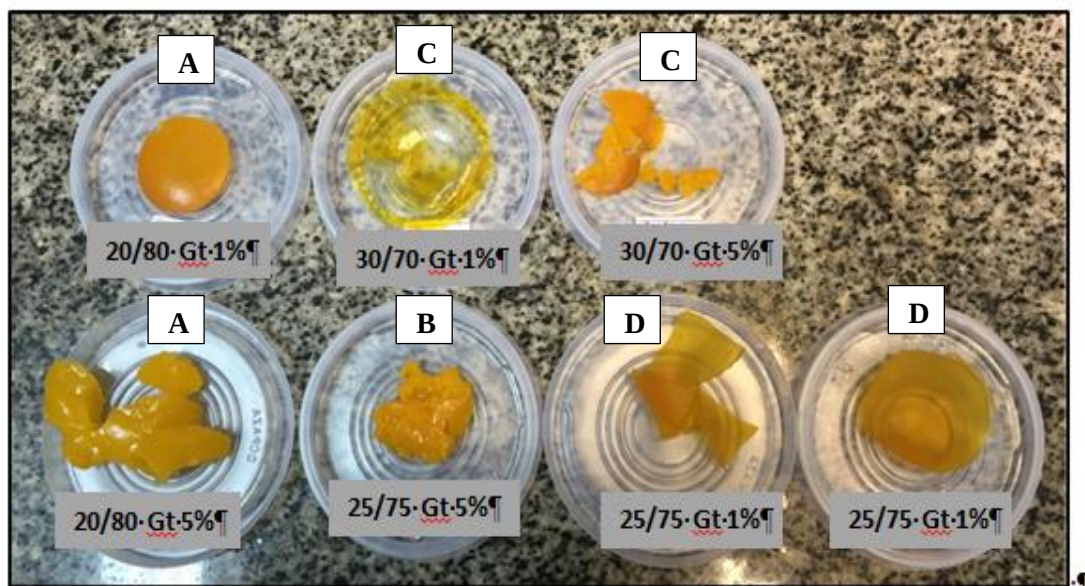


Figura 14: Estudo das propriedades mecânicas da película de PVA/quitosana.

A- Observou-se que quanto maior a proporção de quitosana nas blendas, o biopolímero final tornava-se mais frágil e mais elástico (forma gelatinosa). **B-** Quanto ao uso do de reticulante (glutaraldeído), observou-se que quanto maior a proporção de reticulante (5%), há uma piora na propriedade mecânica do biopolímero pois o produto final apresenta maior fragilidade. **C-** Proporções maiores de PVA diminuem adesividade às blendas mesmo conferindo maior elasticidade. **D-** A proporção ideal neste estudo foi de 75/25/1 de quitosana, PVA e GA(glutaraldeído) respectivamente.

5.4. Caracterização das películas

As películas foram caracterizadas por análises de Ultravioleta-visível (UV-vis) (Figura 15), espectroscopia de infravermelho (FTIR) (Figuras 16, 17 e 18), microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 19) e sistema de energia dispersiva (EDS) (Tabela 4 e 5).

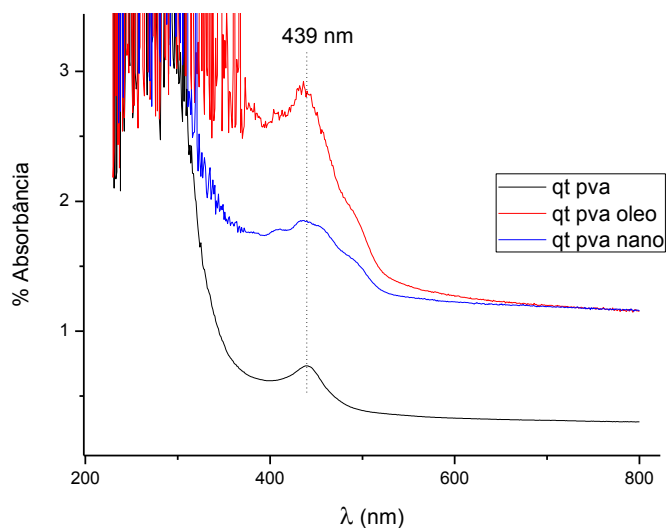


Figura 15: Espectro de Ultravioleta-visível para película de PVA/quitosana (preto), PVA/quitosana/Óleo de baciúva (vermelho) e PVA/quitosana/nanopartícula de selênio (azul).

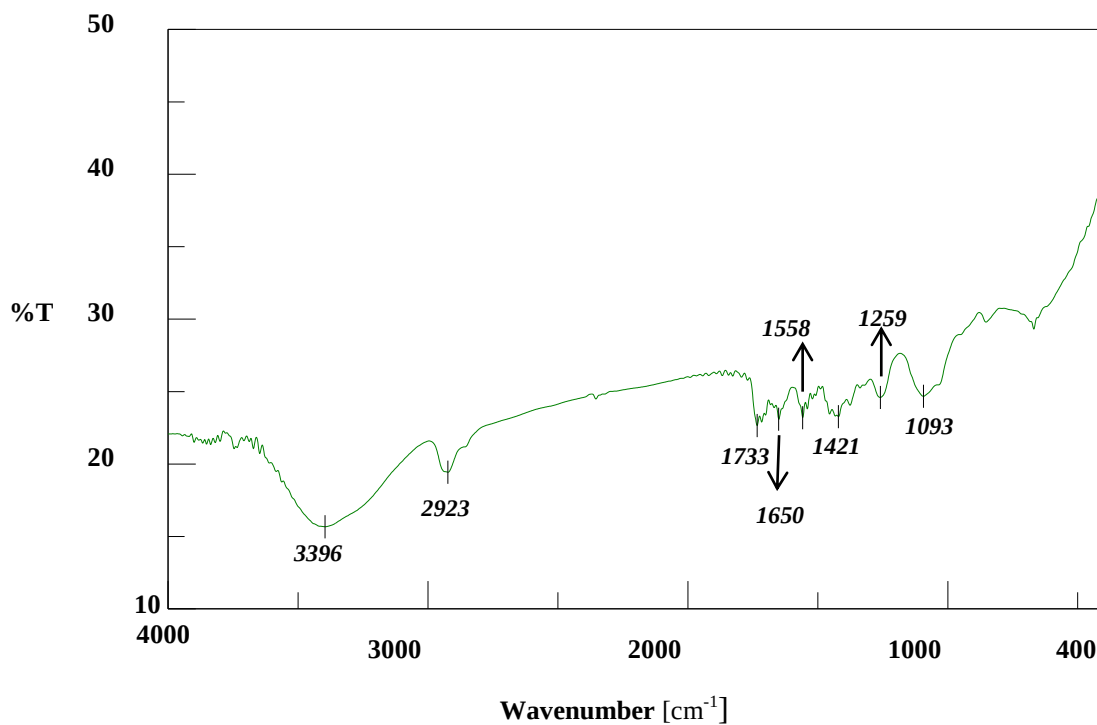


Figura 16: Espectro de infravermelho para a película contendo PVA/quitosana.

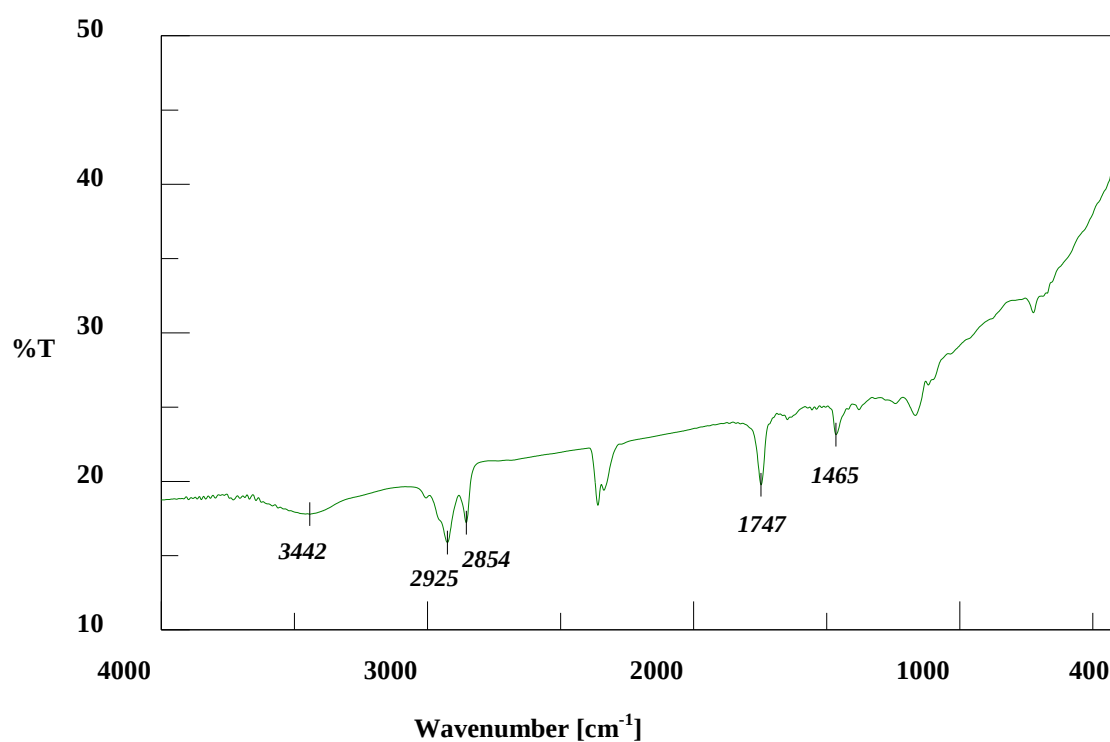


Figura 17: Espectro de infravermelho para a película contendo PVA/quitosana/óleo

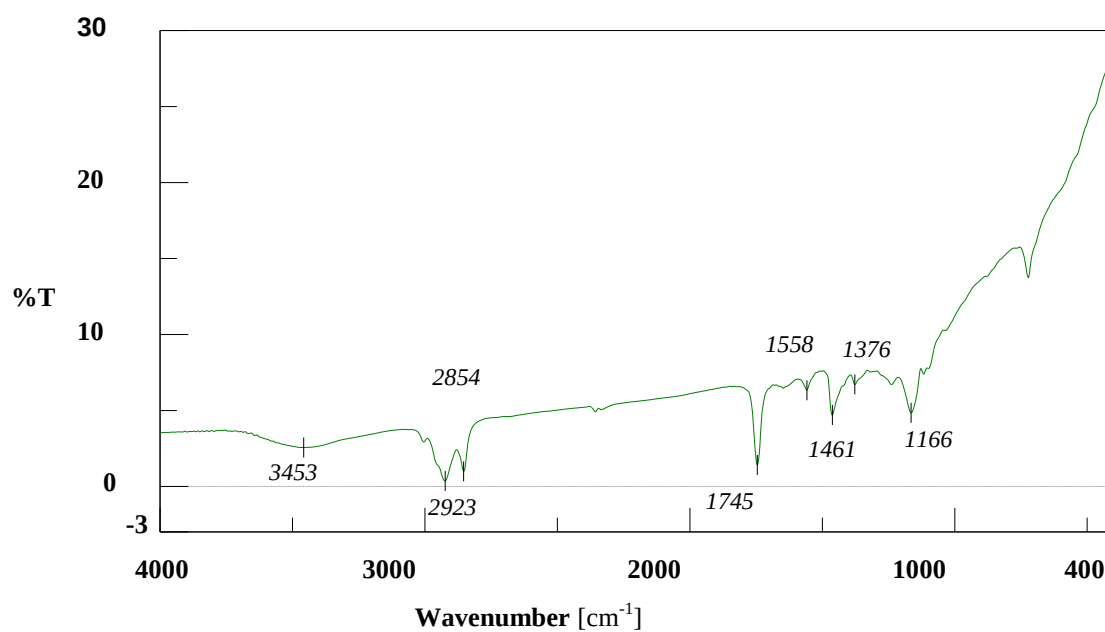


Figura 18: Espectro de infravermelho para a película contendo PVA/quitosana /óleo de bocaiúva/nanopartícula de selênio.

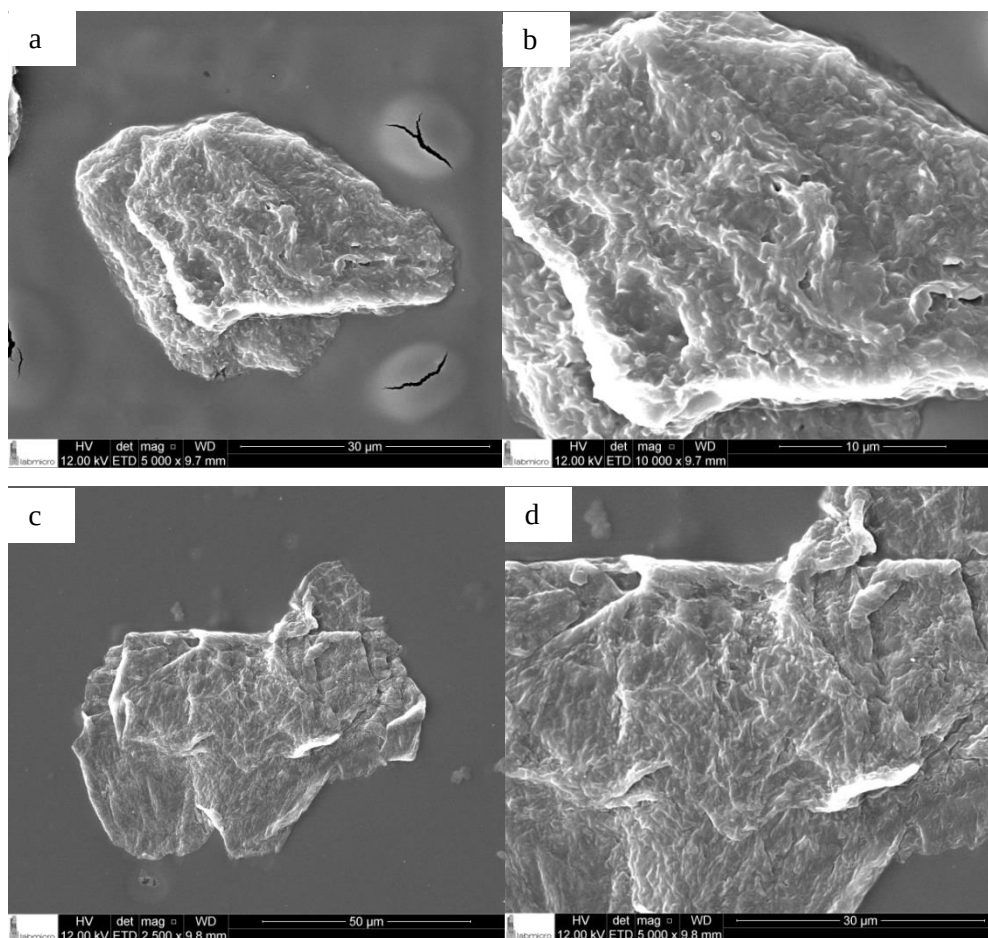


Figura 19: Imagem de microscopia eletrônica de varredura para a película contendo (a-b) PVA/quitosana e (c-d) PVA/quitosana/nanopartícula.

Tabela 4: Dados obtidos da análise de sistema de energia dispersiva (EDS) obtido da película contendo PVA/quitosana

ELEMENTO	% PESO	% ATOMICA	% ERRO	RAZÃO
C	50,76	59,70	9,20	0,1704
N	16,12	16,26	15,06	0,194
O	20,85	18,41	11,53	0,0353
Na	1,46	0,90	15,09	0,0072
SeL	0,20	0,04	53,45	0,0014
Al	0,35	0,18	17,02	0,0025
S	10,26	4,52	4,03	0,0881

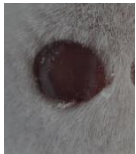
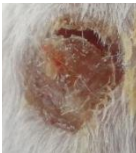
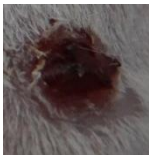
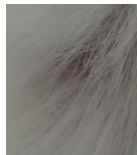
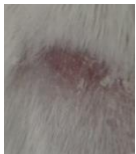
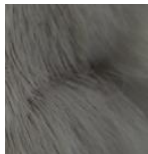
Tabela 5: Dados obtidos da análise de sistema de energia dispersiva (EDS) obtido da película contendo PVA/quitosana/nanopartícula de selênio

ELEMENTO	% PESO	% ATOMICA	% ERRO	RAZÃO
C	50,90	50,37	9,02	0,1925
N	16,19	16,20	16,01	0,0200
O	22,40	19,62	11,91	0,0386
Na	1,95	1,19	14,38	0,0095
SeL	0,43	0,08	55,04	0,0029
S	8,12	3,55	5,66	0,0695

5.5. Avaliação macroscópica da cicatrização

Realizou-se a avaliação macroscópica da cicatrização das feridas utilizando-se o programa ImageJ (Tabela 6), após obter-se as medidas procedeu-se a análise estatística, os resultados obtidos estão descritos na Figura 20.

Tabela 6: Fotos da evolução da cicatrização das feridas em diferentes tratamentos.

Tempo de tratamento	Ferida sem película	Ferida com PB	Ferida com PO	Ferida com PSe	Ferida com POSe
Início tratamento					
2 dias tratamento					
7 dias tratamento					
14 dias tratamento					

Conforme apresentado na tabela acima, observa-se qualitativamente a evolução da cicatrização ao longo do tempo de tratamento. Para 2 dias de tratamento a fase inflamatória (vermelha) foi observada no local da ferida. Para 7 dias de tratamento uma crosta formou-se para os grupos sem película e tratados com a película controle enquanto os grupos tratados com a película com selênio e óleo de bocaiúva já apresentaram contração da ferida. Não houve sinal de infecção durante o tratamento. Para 14 dias de tratamento todos os tratamentos apresentaram características semelhantes com discreta melhora para os grupos tratados com selênio e óleo de bocaiúva.

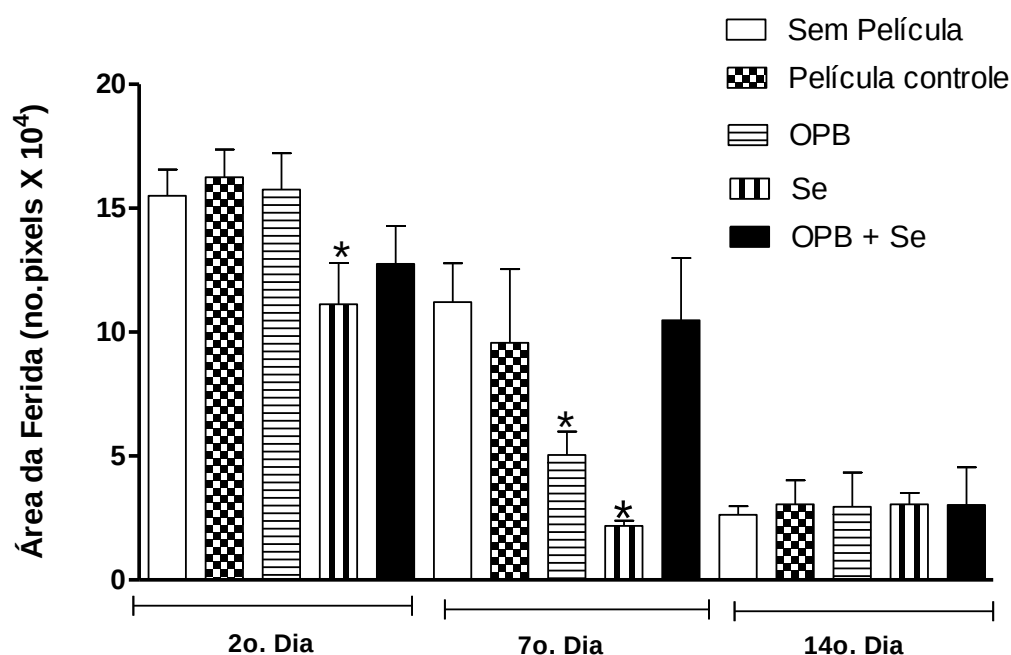


Figura 20: Estudo da ÁREA DE CICATRIZAÇÃO em camundongos por período de tempo.

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão da área de cicatrização em pixels. * grupo tratado com película contendo nanopartícula de selênio difere do grupo sem película, grupo controle e grupo óleo para dois dias de tratamento, $P < 0,05$; * grupo tratado com película com óleo difere do grupo que não recebeu tratamento para sete dias de tratamento; * grupo tratado com película com nanopartícula de selênio difere do grupo que recebeu película controle para sete dias de tratamento (ANOVA para medidas repetidas seguido do teste de Duncan, considerando $P < 0,05$).

Além da análise qualitativa (Tabela 6), executou-se a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA), apresentada na Figura 20. Proveniente dessa análise foi possível demonstrar que para dois dias de tratamento, o que condiz a fase inflamatória de cicatrização, o grupo que recebeu PSe apresentou aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) no processo de cicatrização quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento e com o grupo que recebeu a película controle (quitosana e PVA).

Após 7 dias de tratamento, o que corresponde a fase proliferativa de cicatrização, observou-se um aumento significativo na cicatrização para o grupo PSe quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento e também quando comparado ao grupo que recebeu a película controle ($P < 0,05$). O grupo que recebeu a película com óleo de bocaiúva apresentou aumento da cicatrização quando comparado ao grupo sem tratamento para este mesmo período ($P < 0,05$).

5.6 Avaliação Microscópica da cicatrização

Considerando os resultados obtidos na análise macroscópica procedeu-se as análises do tecido para o 7º dia de tratamento.

5.6.1 Infiltrado Inflamatório

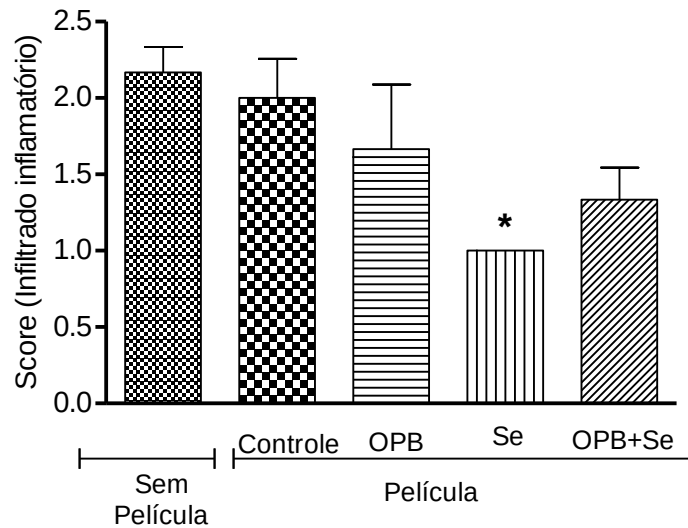


Figura 21: Avaliação microscópica do infiltrado inflamatório. O infiltrado inflamatório foi avaliado pela leitura das lâminas dos cortes histológicos coradas por hematoxilina-eosina, a presença de células inflamatórias foi classificada em discreta (1), moderado (2) e acentuado (3). Foram avaliados 5 grupos (n=5). O material foi coletado dos animais no 7º dia de tratamento. * $P < 0,05$ comparado ao grupo sem película e grupo controle. Os resultados foram analisados no programa Graphpad prism 5. (ANOVA seguido do teste Newman-Keuls; $P < 0,05$).

5.6.2 Proliferação Vascular

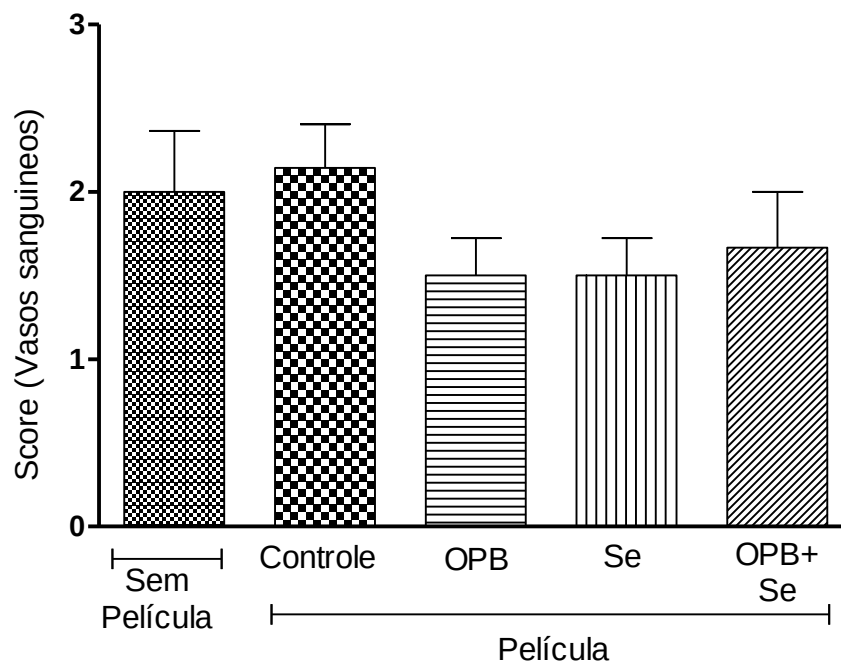


Figura 22: Contagem morfométrica de vasos sanguíneos em cortes histológicos. Foram avaliados 5 grupos (n=5). O tecido foi coletado dos animais no 7º dia de tratamento. Foi realizada a avaliação direta da neovascularização por contagem morfométrica de vasos sanguíneos em cortes histológicos do tecido em estudo corado com hematoxilina-eosina. (ANOVA seguido do teste Newman-Keuls; $p < 0,05$).

5.7 Avaliação de marcadores inflamatórios

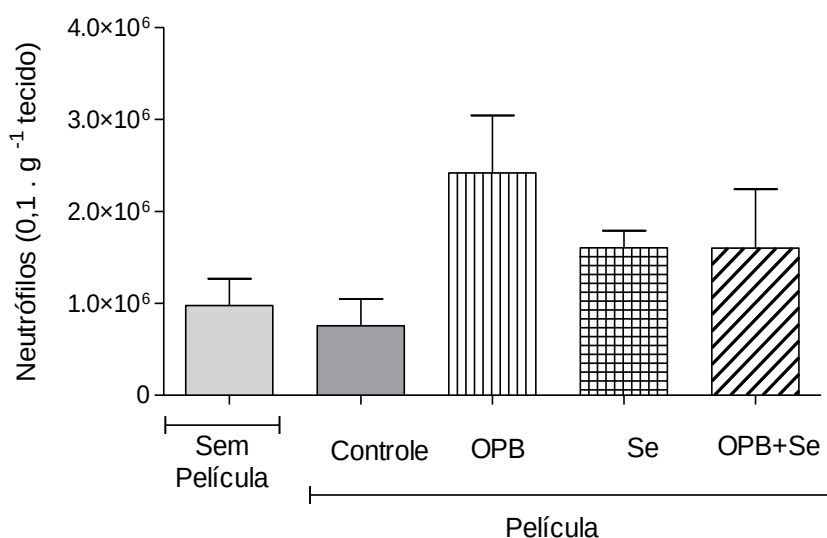


Figura 23: Determinação da atividade da enzima mieloperoxidase. Foram avaliados 5 grupos (n=5). Os resultados estão expressos em número de neutrófilos $\times 10^6$ (média $\pm$ EPM) (ANOVA seguido do teste Newman-Keuls). Para análise foi utilizado o programa Graphpad prism 5. (ANOVA seguido do teste Newman-Keuls; $p < 0,05$).

5.7.2 Quantificação Indireta de óxido nítrico no tecido

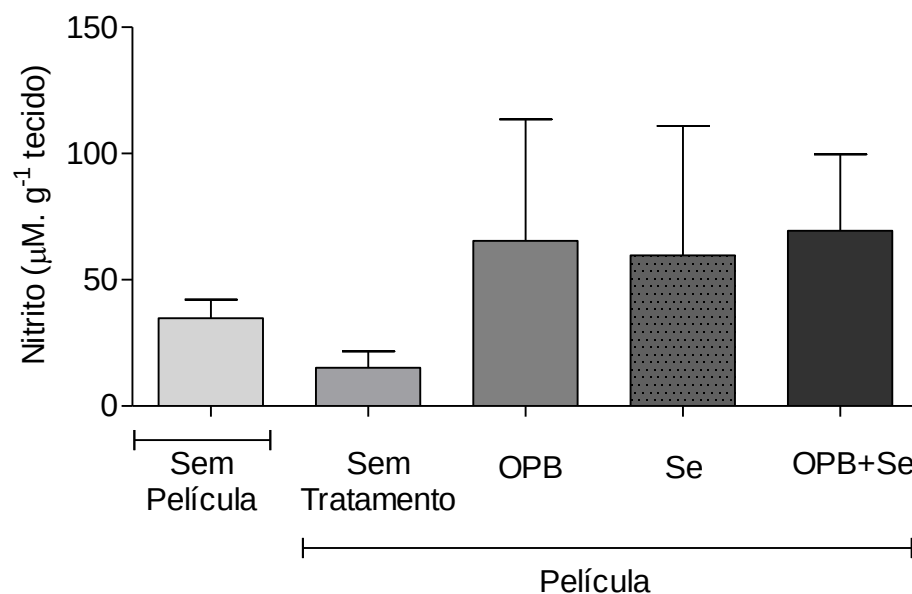


Figura 24: Quantificação indireta de óxido nítrico no tecido. Realizou-se a quantificação indireta de óxido nítrico no tecido pela dosagem de nitrito utilizando a reação de Griess. Foram avaliados 5 grupos (n=5). O material analisado foi coletado dos animais no 7º dia de tratamento. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M. mL}^{-1}$ de soro sanguíneo. Na dosagem de nitrito foram feitas duplicatas técnicas. Para análise foi utilizado o programa Graphpad prism 5. (ANOVA seguido do teste Newman-Keuls; $p < 0,05$).

5.8 Avaliação de marcador angiogênico

5.8.1 Dosagem de hemoglobina

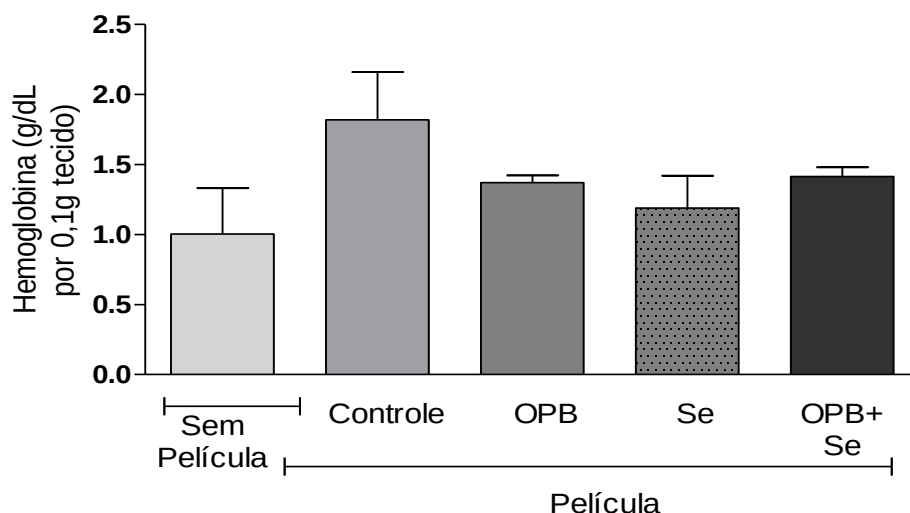


Figura 25: Avaliação da neovascularização pelo modelo de implante de esponja. Foram avaliados 5 grupos (n=6). O material analisado foi coletado dos animais no 7º dia de tratamento. Os resultados foram expressos em g/dL de hemoglobina em 0,1g de tecido. (ANOVA seguido do teste Newman-Keuls; $p < 0,05$).

5.9 Análise de Colágeno total e subtipos de col-I e col-III pela técnica de picrosírius seguida da quantificação usando software Image-J ProPlus

A técnica de coloração por picrosírius red foi empregada para avaliação do colágeno total. Esta técnica também permite quantificar, pela birrefringência do colágeno sob a luz polarizada, a deposição e reorganização dos colágenos subtipos I e III durante o processo cicatricial. Comparativamente foi observado que com relação a colágeno total o grupo POB+Se quando comparado ao grupo sem tratamento apresentou-se maior. Para colágeno tipo I o grupo PSe possui maior quantidade quando comparado ao grupo sem tratamento e para colágeno tipo III o grupo POB+Se apresentou maior quantidade de colágeno quando comparado ao grupo sem tratamento, ambos para sete dias de tratamento.

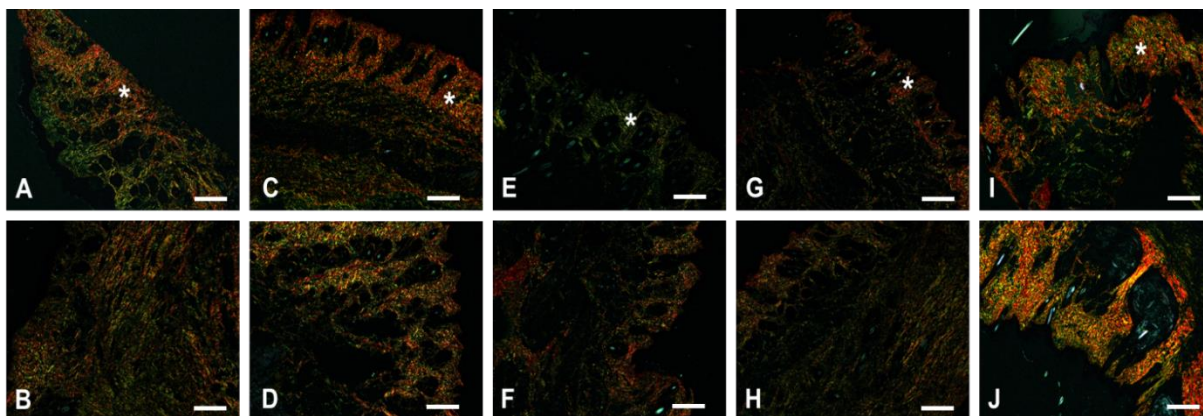


Figura 26: Fotomicrografias ilustrativas das amostras coradas com picrosírius red após observação em microscópio de luz polarizada. (A-B) Sem película; (C-D) com película; (E-F) película com óleo de bocaiúva (POB); (G-H) película com nanopartícula Se (PSe); (I-J) película com nano e óleo (POB+Se). Observe a birrefringência das fibras colágenas (*) evidenciadas em amarelo/vermelho (colágeno tipo-I) e verde (colágeno tipo-III). Imagens com aumento de 200X; barra = 100μm.

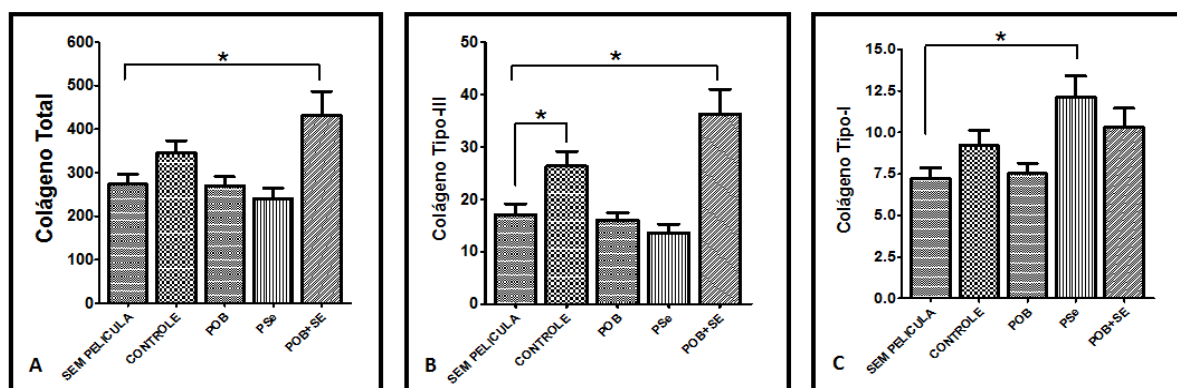


Figura 27: Gráficos da análise quantitativa do colágeno total (A) e dos subtipos de colágeno I (B) e III (C). Dados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. * indica $p < 0,05$ dos grupos experimentais em relação ao grupo controle.

6. DISCUSSÃO

Há uma infinidade de curativos para feridas no mercado, os quais funcionam para preservar a hidratação dentro da ferida, a fim de otimizar a regeneração, proteger contra infecções e evitar a ruptura da base da ferida.^{77, 78, 79} Os curativos para feridas mais disponíveis atualmente são feitos com quitosana, ácido hialurônico, colágeno e silicone.⁸⁰ Além disso, outros biomateriais estão sendo investigados atualmente para curativos de feridas a base de alginatos, heparina, celulose e gelatina^{81, 82}. Nesta pesquisa nos propusemos a desenvolver uma película cicatrizante a base de quitosana e polivinilálcool, produtos já utilizados em curativos com propriedades conhecidas, acrescido de óleo de bocaiúva e nanopartículas de selênio, substâncias com propriedades anti-inflamatória e antioxidante.^{60, 61, 83}

Primeiramente foi analisado a polpa da bocaiúva obtida de frutos colhidos entre os meses de janeiro a março da safra de 2015.

Os resultados da composição centesimal da polpa de bocaiúva foram apresentados na Tabela 1. Os valores encontrados para umidade (43,93%) são semelhantes aos resultados obtidos por Rocha et al. (2013), que reportaram valor de 44,1%. Com relação aos valores referentes a lipídeos (28,95%) e cinzas (3,47%) são superiores aos descritos por Galeano et al., (2015) (5,78% e 1,78%) e Rocha et al. (2013), (16,6% e 2,3%) respectivamente. Embora possua um teor considerável de lipídios, a polpa de bocaiúva apresentou menor valor de carboidratos (22,49%) quando comparamos com valores da literatura. Essa variação no teor de lipídios na bocaiúva pode ser explicada por diferenças nos tipos de solo, condições climáticas e período de coleta dos frutos.^{84, 85}

A extração forneceu amostra de óleo com coloração amarelo-alaranjada e com odor característico. A análise físico-química da amostra de óleo forneceu dados referentes ao índice de acidez, peróxido e iodo conforme apresentado anteriormente na Tabela 2. A Tabela 3 apresenta comparativamente os dados obtidos em nosso estudo para os parâmetros de acidez e iodo corroborando com os dados apresentados por Ciconini (2012) em estudo realizado no Estado de Mato Grosso do Sul.⁸⁶

Considerando que a elevada acidez indica o desenvolvimento de reações hidrolíticas, decorrente da presença de água, temperatura e enzimas, levando a produção de ácidos graxos livres, e conseqüentemente, de diglicerídeos, a legislação Brasileira permite o máx. de 5% de acidez para óleos brutos.⁸⁷

A acidez do óleo de bociúva é um fator importante para a aplicação a que se destinada. Isto porque o mesmo pode ser utilizado como fonte de biodiesel dentre outros. A acidez para a produção de biomateriais é importante, pois dependendo dos demais compostos que farão parte do produto final e, intrinsecamente dos grupos funcionais ácidos ou básicos presentes nos mesmos, pode-se obter ou não o material desejado. Os dados de acidez para a amostra estudada indicou uma baixa acidez o que foi semelhante ao encontrado por Ciconini (2012).⁸⁶,

A relativa acidez apresentada pela amostra foi transferida para o produto final tendo em vista que a solução final tanto para a película contendo óleo quanto para a película contendo nanopartículas de selênio juntamente com o óleo apresentaram pH aproximadamente igual a 4.

O teste realizado no presente estudo não apresentou índice de peróxido o que corrobora com o estudo de Ciconini (2012).

O índice de iodo é definido pela quantidade de insaturações presentes nos ácidos graxos e sua medida indica a estabilidade oxidativa do óleo, sendo portando um índice de qualidade do óleo. Observa-se que o índice de iodo do óleo de bociúva no presente estudo (68,50 gI²/100g) verifica-se que este se aproxima aos valores encontrados na literatura para o azeite de oliva.⁸⁸ Podemos considerar que este fato ocorra devido aos óleos de bociúva e oliva possuírem perfil de ácidos graxos similar.

É importante considerar ainda sobre a composição química do óleo da polpa da bociúva que estudos mostram quantidades consideráveis de carotenoides, principalmente beta-caroteno, que exibe ação antioxidante e impede a lipoperoxidação, além de conferir proteção à pele.^{14, 60} Além dos carotenoides, Amaral *et al.* (2011)⁷⁵ relataram altos teores de tocoferol no óleo da polpa da bociúva os quais também apresentam atividade antioxidante e representam uma importante fonte de vitamina E. Nos óleos vegetais, os tocoferóis atuam protegendo os ácidos graxos insaturados da oxidação lipídica.

Estudo realizado por Hiane (2006) determinou que óleo também apresenta quantidades importantes de ácidos graxos insaturados, dos quais os presentes em maiores concentrações são os ácidos oleico (65,87%) e linoleico, (5,1%), apresentando também uma quantidade discreta de ácido linolênico (2,52%).¹⁸

Segundo Gomes & Oliveira (2010), os ácidos graxos exercem importantes papéis na resposta imunológica e inflamatória.⁸⁹

Diante do exposto, conclui-se que o óleo extraído da polpa da bocaiúva para realização deste estudo é de boa qualidade para elaboração de película utilizada no presente estudo.

Procedeu-se um estudo da propriedade mecânica da blenda PVA/quitosana utilizando-se proporções diferentes dos compostos. As observações visuais qualitativas foram realizadas levando-se em conta a solubilidade, elasticidade e resistência das blendas. Observando a Figura 14, com relação à quitosana, observou-se que quanto maior a proporção de quitosana nas blendas, o biopolímero final tornava-se mais frágil e mais elástico (forma gelatinosa). Quanto ao uso do de reticulante (glutaraldeído), observou-se que o aumento da proporção de reticulante (5%) determina uma piora na propriedade mecânica do biopolímero, pois o produto final apresenta maior fragilidade. Já quanto ao estudo da porcentagem do PVA, concluiu-se que proporções maiores deste diminuem adesividade às blendas mesmo conferindo maior elasticidade. Portanto, a proporção ideal neste estudo foi de 75/25/5 de quitosana, PVA e GA(glutaraldeído) respectivamente. Este resultado corrobora com o estudo realizado por Costa Jr (2008).¹¹

As películas obtidas foram caracterizadas através de dados espectroscópicos de FTIR, UV-vis e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados de UV-vis para as películas contendo PVA e quitosana apresentaram absorção ao redor de 439 nm o que corresponde ao descrito na literatura por Vimala *et al.* (2011) que descreve a presença de uma banda de transição em 421 nm em solução de quitosana /PVA 3% (p/v).⁹⁰ O deslocamento da referida banda é atribuída pela mudança de estado físico da matéria da amostra estudada. Pôde-se observar para as demais películas (PO e PSe) um alargamento desta banda através da composição de bandas referentes tanto as transições referente à inserção do óleo (PO) quanto a inserção da nanopartícula. Cumpre salientar um efeito hipercrômico quando comparado as películas contendo óleo e nanopartículas de selênio. Isto decorre porque as moléculas orgânicas presentes no óleo apresentam transições que requerem menores gaps de energias, e portanto, conferem maiores coeficiente de extinção.

Os dados analisados indicaram que a matriz polimérica foi sintetizada através do arranjo de ligações cruzadas entre a quitosana e o glutaraldeído conforme descrito por Hu *et al* (2013) no qual o autor descreve que a blenda obtida através da condensação entre os grupamentos amino livres da quitosana com a carbonila do aldeído presente no glutaraldeído conferem uma estrutura em novelo.^{65, 83} Todavia a inserção do óleo de bocaiúva insere novos modos de vibração principalmente para o grupamento éster (1745 cm^{-1}) o que está em pleno acordo com o deslocamento geral observado para tal grupo. As vibrações referentes às

nanopartículas de selênio não foram observadas (1604 cm^{-1}), pois esse material encontra-se em uma quantidade infinitamente menor do que a matriz polimérica e o óleo de bocaiúva.

A análise de microscopia eletrônica de varredura para os polímeros película PVA/quitosana e película com quitosana/nanopartícula de selênio indica uma grande semelhança estrutural. Para ambos pôde-se observar a presença de reticulados formados através da ligação cruzada entre o glutaraldeído e a quitosana. Esta mesma estrutura foi descrita por Hu *et al.*(2013). Tal informação indica que a permeabilidade do presente polímero pode ser afetada. Em certas circunstâncias esse arranjo pode ser salutar para todo o desenvolvimento do produto, pois pode controlar a liberação de determinados compostos, que neste caso são as nanopartículas de selênio. Estes agregados também forma regiões denominadas clusters, regiões em que se encontra estabilizada as nanopartículas de selênio conforme descrito por Hu et al. (2013). Estes clusters também são responsáveis por estabilizarem as nanopartículas não permitindo sua agregação via ligações de hidrogênio, ligação esta muito importante decorrente não obstante da característica ácida do polímero.⁹¹

Após a caracterização das películas seguiu-se então com a avaliação *in vivo* da cicatrização das feridas conforme descrito na metodologia no item 4.7.

A evolução do progresso da cicatrização da ferida foi acompanhado macroscopicamente e a tabela 6 demonstra a diferença entre os grupos tratados e o grupo controle. Conforme descrito no item 4.8, cada ferida foi fotografada no dia da lesão e no 2º, 7º e 14º dias após a lesão. Após realizou-se avaliação da imagem no programa ImageJ. Para 2 dias de tratamento a fase inflamatória (vermelha), o grupo que recebeu PSe apresentou aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) no processo de cicatrização quando comparado com o grupo que não recebeu tratamento e com o grupo que recebeu a película controle (quitosana e PVA). Para 7 dias de tratamento uma crosta formou-se para os grupos sem película e tratados com a película controle enquanto os grupos tratados com a película com selênio e óleo de bocaiúva já apresentaram contração da ferida. Não houve sinal de infecção durante o tratamento. Para 14 dias de tratamento todos os tratamentos apresentavam características semelhantes com discreta melhora para os grupos tratados com selênio e óleo de bocaiúva. Este resultado pode estar relacionado à presença de ácidos graxos que atuam de forma positiva no processo de cicatrização, estimulando a neoangiogênese, a quimiotaxia para leucócitos e auxiliam no desbridamento autolítico bem como a presença do selênio que possui propriedade de estimular a cascata imune.^{48, 67} Resultados semelhantes foram encontrados por Verma *et al* (2017) utilizando hidrogel com quitosana, sericina e nanopartícula de prata.⁹²

Com relação a área da ferida a análise estatística, Figura 20, demonstrou que para dois dias de tratamento a presença do selênio acelerou o fechamento da ferida e para sete dias de tratamento o grupo que recebeu a película com óleo apresentou aumento da cicatrização quando comparado ao grupo sem tratamento e o grupo tratado com a película com selênio, para o mesmo período, apresentou aumento da cicatrização quando comparado com o grupo que recebeu a película controle. Estudo prévio realizado por Costa & Moreno (2014), descreve como resultado, com o uso de 20% de óleo de bocaiúva em creme lanette em experimento com ratos, que a presença do óleo favoreceu tanto a evolução da cicatrização quanto a reepitelização para sete dias de tratamento.⁶²

Com os resultados obtidos na avaliação macroscópica e para entendermos como se deu o processo avaliou-se microscopicamente o tecido retirado dos animais no 7º dia de tratamento. Este período corresponde a fase proliferativa do processo de cicatrização. A fase proliferativa é constituída por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Esta fase tem início ao redor do 4º dia após a lesão e se estende aproximadamente até o término da segunda semana.^{30, 38}

As feridas tratadas com a película que contém nanopartículas de selênio apresentaram menor infiltração de células inflamatórias no tecido (Figura 21). O selênio é um mineral que faz parte da enzima antioxidante, glutathionperoxidase, que atua no interior da célula convertendo compostos tóxicos, peróxido de hidrogênio, em atóxicos, água e O₂, resultando na redução de radicais livres.⁹³ A literatura científica tem demonstrado que várias categorias de antioxidantes da dieta, dentre eles o selênio, podem ser efetivos em suprimir a ativação de vias pró-inflamatórias, por meio da quelação das moléculas de radicais livres.^{94, 95, 96} Na pele, o selênio está presente como parte da redutase da tioredoxina e da peroxidase da glutathione, que partilham o papel principal na defesa celular contra o estresse oxidativo. Ambas as enzimas protegem a pele da formação de lesões oxidativas, ao eliminarem diretamente as EROs e radicais livres. Estudos mostraram que a redutase da tioredoxina está localizada na membrana celular dos queratinócitos, fato que assume especial importância na proteção contra a formação de lesões por radicais livres.^{93, 97} Segundo Aguiar *et al.* (2014) em qualquer condição associada ao aumento do estresse oxidativo ou inflamatório, deve-se esperar uma influência dos níveis de selênio.⁹³

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima considerada um marcador de neutrófilos ativados. Observamos que embora tenha ocorrido uma diminuição do infiltrado inflamatório com a película que contém nanopartículas de selênio na dosagem da MPO não houve

diferença estatística entre os grupos, conforme apresentado na Figura 23, o que pode significar que as nanopartículas de selênio não interferem diretamente na migração de neutrófilos.

Na fase proliferativa evidencia-se a presença local de macrófagos. A chegada de macrófagos no local da ferida desempenha um papel vital no reparo da pele. Estudos revelaram que os macrófagos desempenham variedade de papéis através de seus fenótipos funcionais durante o processo de reparo da ferida.⁹⁸ Estudos anteriores relatam que o recrutamento reduzido de macrófagos no estágio inflamatório inicial retarda a formação de tecido de granulação e prejudica a reepitelização e a contração da ferida.^{98, 99} por outro lado, segundo Thangavel *et. al.* (2017), a inflamação prolongada atrasa o recrutamento de macrófago e o número elevado de neutrófilos prejudica cicatrização na diabetes.⁹⁸

Os macrófagos constituem uma fonte de óxido nítrico (NO) no corpo e as funções por eles desempenhadas são devido à sua capacidade de formar NO, que por sua vez é convertido em nitratos.¹⁰⁰ Na análise realizada de dosagem indireta de óxido nítrico no tecido não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 24).

A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essencial para a cicatrização adequada.¹⁰¹ Para avaliação da neovascularização utilizamos modelo de implante de esponja. A dosagem da hemoglobina não apresentou diferença estatística entre os grupos (Figura 24). O mesmo foi observado na avaliação morfométrica de novos vasos sanguíneos no tecido (Figura 22).

Passamos então a avaliar a colagênese, segundo Shaw (2009) a síntese de colágeno inicia horas após o ferimento mas só se torna significativa aproximadamente uma semana após a lesão. Dois subtipos são importantes para a reparação da ferida, colágeno tipo I predomina na matriz extracelular da pele intacta e o colágeno tipo III, presente em menor quantidade na pele intacta, importante no processo de cicatrização de feridas, especialmente na fase inicial da cicatrização.⁴²

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular, essencial para o fechamento da ferida. A síntese, deposição, remodelação e maturação de colágeno são etapas críticas durante a reparação e regeneração tecidual⁴⁴. A síntese de colágeno depende principalmente da disponibilidade de prolina. A prolina é ativamente sintetizada nos tecidos de granulação a partir do ácido glutâmico e a quantidade de prolina sintetizada é aumentada pelo lactato.

As Figuras 26 e 27 apresentam a análise quantitativa de colágeno onde observa-se que a película OPB+Se apresenta maior quantidade de colágeno total, quando analisados colágeno tipo I, a película Se apresenta maior quantidade e com relação ao colágeno tipo III, a película OPB+Se apresenta maior quantidade. Estudos semelhantes demonstraram aceleração do processo de cicatrização, Hamilton *et al.* (2006) relataram aumento da proliferação de fibroblastos.¹⁰² Esse achado pode explicar o efeito benéfico da quitosana na cicatrização de feridas, porque os fibroblastos estão envolvidos na fibroplasia e formação de tecido de granulação. Além disso, o aumento na matriz extracelular (colágeno e fibronectina) desempenha um papel importante na adesão celular à matriz extracelular para guiar a migração de células.¹⁰³ Da mesma forma, Mori *et al.* (2004) relataram que a quitosana ativa macrófagos e vários receptores celulares associados com proliferação celular.¹⁰⁴ Da mesma forma, um experimento de raios X realizado em cães por Ueno *et al.* (2007) em que a quitosana foi aplicada à úlceras observaram um aumento na neovascularização.¹⁰⁵ Kojima *et al.* (2004) relataram um aumento na síntese de colágeno e atividade da enzima prolil hidroxilase na presença de ácido ascórbico (vitamina C, envolvido na síntese de proteínas da matriz extracelular).¹⁰⁶

7. CONCLUSÃO

Os testes de caracterização físico-química do óleo de bocaiúva demonstraram que o óleo extraído foi de boa qualidade e está dentro dos parâmetros preconizados pela legislação brasileira.

A metodologia utilizada para elaboração das películas mostrou-se adequada e as películas produzidas apresentaram características de adesividade, flexibilidade e resistência, com formação de reticulados que conferem permeabilidade as mesmas e tornam possível a liberação dos componentes (óleo de bocaiúva e nanopartícula de selênio).

O estudo da área de cicatrização demonstrou que para sete dias de tratamento obtêm-se os melhores resultados com as películas contendo óleo de bocaúva e com a película contendo selênio.

Na avaliação do infiltrado inflamatório o grupo tratado com a película contendo selênio apresentou diminuição de células inflamatórias, embora não se constatou significância estatística na dosagem de MPO e NO.

A avaliação da neovascularização pelo implante de esponja não apresentou diferença quanto à formação de novos vasos quando comparados os grupos nos diferentes tratamentos para sete dias de tratamento.

Para análise quantitativa de colágeno observou-se que a película contendo selênio e a película contendo óleo de bocaiúva e selênio estimulam a produção de colágeno tipo I e tipo III.

Muitos são os desafios quando se trata da elaboração de novas fórmulas para o tratamento de feridas e pesquisas tem sido desenvolvidas na busca por um curativo ideal.

Neste estudo desenvolveu-se uma película para tratamento de feridas como baixo custo, de fácil elaboração, que não necessita de troca do curativo e que acelera o processo de reparo celular com qualidade de fibras de colágeno.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Pereira, Â. L. & Bachion, M. M. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003. *Rev. Bras. Enferm.* **58**, 208–213 (2005).
2. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. & Mitchell, R. Fundamentos de Robbins & Cotran - Patologia: Bases Patológicas das Doenças. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* **41**, 899 (2006).
3. Baptista de Oliveira, B. G. R., de Abreu Castro, J. B. & Granjeiro, J. M. Panorama epidemiológico e clínico de pacientes com feridas crônicas tratados em ambulatório. *Rev. Enferm.* **21**, 612–617 (2013).
4. Cardoso, L., Usero, R. & Catani, S. Implante de Membranas de PLLA/Trietil-Citrato como Alternativa no Tratamento de Feridas Cutâneas. *Polímeros* **1**, 25–26 (2013).
5. Hu, Z., Yang, P., Zhou, C., Li, S. & Hong, P. Marine collagen peptides from the skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and wound healing evaluation. *Mar. Drugs* **15**, (2017).
6. Lima-junior, E. M. *et al.* Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo , no tratamento de queimaduras. *Rev Bras Queimaduras* **16**, 10–17 (2017).
7. Tang, J. & Saito, T. Biocompatibility of Novel Type I Collagen Purified from Tilapia Fish Scale:...: EBSCOhost. **2015**, (2015).
8. Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar, P. T., Nair, S. V. & Tamura, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol. Adv.* **29**, 322–337 (2011).
9. Oshiro Junior, J. A., Shiota, L. M. & Chiavacci, L. A. Desenvolvimento de formadores de filmes poliméricos orgânico-inorgânico para liberação controlada de fármacos e tratamento de feridas. *Rev. Mater.* **19**, 24–32 (2014).
10. Bispo, V. M. Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA. 206 (2009).
11. Costa, E. S. & Mansur, H. S. Preparação e Caracterização de Blendas de Quitosana/Poli (Álcool Vinílico) Reticuladas Quimicamente com Glutaraldeído para Aplicação em Engenharia de em engenharia de tecido. *Quim. Nova* **31**, 1460–1466 (2008).
12. Muzzarelli, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydr. Polym.* **76**, 167–182 (2009).
13. Sivashankari, P. R. & Prabakaran, M. Prospects of chitosan-based scaffolds for growth factor release in tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* (2016). doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.043
14. Adjepong, M., Agbenorku, P., Brown, P. & Oduro, I. The role of antioxidant micronutrients in the rate of recovery of burn patients: a systematic review. *Burn. Trauma* **4**, 18 (2016).
15. Forootanfar, H. *et al.* Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **28**, 75–79 (2014).
16. Tuji, F. M., Almeida, S. M., Bóscolo, F. N. & Manzi, F. R. Avaliação Do Efeito Radioprotetor Do Selenito De Sódio No Processo De Reparação Tecidual Em Ratos *. *Radiol Bras* **38**, 359–364 (2005).

17. César, A. D. S., Almeida, F. D. A., De Souza, R. P., Silva, G. C. & Atabani, A. E. The prospects of using *Acrocomia aculeata* (macaúba) a non-edible biodiesel feedstock in Brazil. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **49**, 1213–1220 (2015).
18. Hiane, P. a., Baldasso, P. A., Marangoni, S. & Macedo, M. L. R. Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciência e Tecnol. Aliment.* **26**, 683–689 (2006).
19. Lopes, A. P. *et al.* Purificação de glicerina residual obtida na produção de biodiesel a partir de óleos residuais. *Rev. Virtual Quim.* **6**, 1564–1582 (2014).
20. Alves, A. V., Sanjinez-Argandoña, E. J., Linzmeier, A. M., Cardoso, C. A. L. & Macedo, M. L. R. Food value of mealworm grown on *acrocomia aculeata* pulp flour. *PLoS One* **11**, 1–11 (2016).
21. Munhoz, C. L. *et al.* Elaboração de barra de cereal de bocaiuva: Avaliação física, nutricional, microbiológica e sensorial. *Acta Sci. - Technol.* **36**, 553–560 (2014).
22. Traesel, G. K. *et al.* Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food Chem. Toxicol.* **74**, 320–325 (2014).
23. Ulery, B. D., Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **49**, 832–864 (2011).
24. Lescano, C. H., Iwamoto, R. D., Sanjinez-Argandoña, E. J. & Kassuya, C. A. L. Diuretic and Anti-Inflammatory Activities of the Microencapsulated *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) Oil on Wistar Rats. *J. Med. Food* **18**, 656–62 (2015).
25. *Skin | Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 15e | AccessMedicine | McGraw-Hill Medical.*
26. Khan, Sajid A. ; Bank, Jonathan; Song, David H. ; Choi, E. A. Chapter 16: The Skin and Subcutaneous Tissue. 1–40 (2018).
27. Silva, rodrigo augusto; Zambuzzi, W. F. Queratinócitos e seus desafios : uma revisão da literatura sobre mecanismos intracelulares. *Saúde em Rev.* **13**, 3–14 (2013).
28. Case, I. & Pemphigoid, B. in 1–40 (2018).
29. Blanck, Mara; Giannini, T. *Úlceras e feridas - as feridas tem alma: uma abordagem interdisciplinar do plano de cuidados e da reconstrução estética.* (2014).
30. Isaac, C., Ladeira, P. R. S., Rêgo, F. M. P., Aldunate, J. C. B. & Ferreira, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Rev. Med.* **89**, 125 (2010).
31. BRASIL, M. da S. S. de P. de S. D. de A. B. *Manual de Condutas para Úlceras Neurotróficas e Traumáticas. Cadernos de Reabilitação em Hanseníase* (2002).
32. Kumar, S. & Leaper, D. J. Classification and management of acute wounds. *Surgery* **23**, 47–51 (2005).
33. Werdin, F., Tennenhaus, M., Schaller, H.-E. & Rennekampff, H.-O. Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. *J. Plast. Surg.* **9**, 169–179 (2009).
34. Järbrink, K. *et al.* Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Syst. Rev.* **5**, 152 (2016).
35. Macdonald, J. M. & Geyer, M. J. . WHO Wound and Lymphoedema Management. *Who* 123 (2010).
36. Stephens, P. (Cardiff U. Chapter 1: Dysfunctional wound healing in chronic wounds. *Adv. Wound Repair Ther.* 3–38 (2011). doi:10.1533/9780857093301.1.3
37. Beldon, P. Basic science of wound healing. *Surgery* **28**, 409–412 (2010).
38. T. Velnar, T. Bailey, V. S. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.* **37**, 1528–1542 (2009).
39. Barbul, A., Efron, D. T. & Kavalukas, S. L. in 1–69 (2018).
40. Balbino, C. A., Pereira, L. M. & Curi, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma

- revisão. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **41**, (2005).
41. Enoch, S. & Leaper, D. J. Basic science of wound healing. *Surg.* **23**, 37–42 (2005).
 42. Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314–321 (2008).
 43. Shaw, T. J. & Martin, P. Wound repair at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 3209–3213 (2009).
 44. Guo, S. & Dipietro, L. A. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* **89**, 219–229 (2010).
 45. Mandelbaum, S. H., Pampado di Santis, É. & Sant’Ana Mandelbaum, M. H. Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. *An. Bras. Dermatol.* **78**, 525–542 (2003).
 46. Cairns, S. Biofilms : Biomaterials and Chronic Wounds. (2012).
 47. Pires, A. L. R., Bierhalz, A. C. K. & Moraes, Â. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. *Quim. Nova* **38**, 957–971 (2015).
 48. Gurtner, G. C. *et al.* Wound repair at a glance. *J. Pharm. Sci.* **9**, 1–40 (2018).
 49. Daroz, L. R. D. *et al.* Prevention of postoperative pericardial adhesions using thermal sterile carboxymethyl chitosan. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* **23**, 480–7 (2008).
 50. Ferreira, M. O. G. *et al.* Chitosan Hydrogel in combination with Nerolidol for healing wounds. *Carbohydr. Polym.* **152**, 409–418 (2016).
 51. Kahraman, H. T. Development of an adsorbent via chitosan nano-organoclay assembly to remove hexavalent chromium from wastewater. *Int. J. Biol. Macromol.* **94**, 202–209 (2017).
 52. Jiang, L. & Zhang, J. *Biodegradable Polymers and Polymer Blends. Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications* (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-1-4557-2834-3.00006-9
 53. De Oliveira Faria, F., Vercelheze, A. E. S. & Mali, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. *Quim. Nova* **35**, 487–492 (2012).
 54. Moraes, I. & Silva, G. Influência do grau de hidrólise do poli (vinil álcool) nas propriedades físicas de filmes à base de blendas de gelatina e poli (vinil álcool) plastificados com. *Ciência e Tecnol. ...* **2008**, 738–745 (2008).
 55. Drury, J. L. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337–4351 (2003).
 56. Voronova, M. I., Surov, O. V., Guseinov, S. S., Barannikov, V. P. & Zakharov, A. G. Thermal stability of polyvinyl alcohol/nanocrystalline cellulose composites. *Carbohydr. Polym.* **130**, 440–447 (2015).
 57. Alcântara, M. T. S., Varca, G. H. C., Giannini, D. R., Riella, H. G. & Lugão, A. B. Obtenção E Caracterização De Hidrogéis À Base De Polivinil Álcool De Diferentes Propriedades. 7544–7551 (2010).
 58. Silva, M. R., Lacerda, D. B. C. L., Santos, G. G. & Martins, D. M. de O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. *Ciência Rural* **38**, 1790–1793 (2008).
 59. Agrário, M. do D., Agricultura, S. da, Valor, D. de G. de R. e A. de & Biocombustíveis, C. G. de. Diretrizes e recomendações técnicas para adoção de boas práticas de manejo para o extrativismo do fruto da macaúba/bocaiúva. 1–52 (2014).
 60. Ramos, M. I. L., Siqueira, E. M. A., Isomura, C. C., Barbosa, A. M. J. & Arruda, S. F. Bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd) improved vitamin A status in rats. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3186–3190 (2007).
 61. Bressan, J., Hermsdorff, H. H. M., Zulet, M. Á. & Martínez, J. A. Impacto hormonal e inflamatório de diferentes composições dietéticas: ênfase em padrões alimentares e fatores dietéticos específicos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **53**, 572–581 (2009).

62. Patrícia, A., Prof, O., Susana, D. & Moreno, E. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA Atividade Cicatrizante do Óleo da Polpa da Bocaiúva (*Acrocomia aculeata*). PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA Atividade Cicatrizante do Óleo da Polpa da Bocaiúva (*Acrocomia aculeata*). Autora : Patrícia. (2014).
63. Assis, L. M. De, Zavareze, E. D. R., Prentice-Hernández, C. & Souza-Soares, L. A. De. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Brazilian J. Food Technol.* **15**, 99–109 (2012).
64. Mohanraj, V., Chen, Y. & Chen, M. &. Nanoparticles – A Review. *Trop. J. Pharm. Res. Trop J Pharm Res* **5**, 561–573 (2006).
65. Sahoo, S. K., Parveen, S. & Panda, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **3**, 20–31 (2007).
66. Tran, P. A. & Webster, T. J. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 1553–1558 (2011).
67. Chung, S., Ercan, B., Roy, A. K. & Webster, T. J. Addition of selenium nanoparticles to electrospun silk scaffold improves the mammalian cell activity while reducing bacterial growth. *Front. Physiol.* **7**, 1–6 (2016).
68. Chen, J. J., Boylan, L. M., Wu, C. K. & Spallholz, J. E. Oxidation of glutathione and superoxide generation by inorganic and organic selenium compounds. *BioFactors* **31**, 55–66 (2007).
69. Valdés, F. Vitamina C. *Actas Dermosifiliogr.* **97**, 557–568 (2006).
70. Lutz, A. Óleos E Gorduras. *Métodos físicos-químicos para análise Aliment.* 589–625 (2008). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
71. Luo, H., Wang, F., Bai, Y., Chen, T. & Zheng, W. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **94**, 304–308 (2012).
72. Minatel, D. G., Frade, M. A. C., França, S. C. & Enwemeka, C. S. Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies. *Lasers Surg. Med.* **41**, 433–441 (2009).
73. Robson, M. C., Hill, D. P., Woodske, M. E. & Steed, D. L. Wound healing trajectories as predictors of effectiveness of therapeutic agents. *Arch. Surg.* **135**, 773–7 (2000).
74. Castro, P. R. *et al.* Kinetics of implant-induced inflammatory angiogenesis in abdominal muscle wall in mice. *Microvasc. Res.* **84**, 9–15 (2012).
75. Amaral, F., Broetto, F., Batistella, C. B. & Jorge, S. M. A. Extração e Caracterização Qualitativa do óleo da polpa e amendoas de frutos de Macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex Mart] coletada na região de Botucatu. *Energ. na Agric.* **26**, 12–20 (2011).
76. Sanjinez-Argandoña, E. J. . & Chuba, C. A. M. . Biometrical, physical and chemical characterization of bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) lodd. *Rev. Bras. Frutic.* **33**, 1023–1028 (2011).
77. Lawrence, W. T. Acute wound healing. **30**, 1–12 (2003).
78. Korting, H. C., Schöllmann, C. & White, R. J. Management of minor acute cutaneous wounds: Importance of wound healing in a moist environment. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* **25**, 130–137 (2011).
79. Sgonc, R. & Gruber, J. Age-related aspects of cutaneous wound healing: A mini-review. *Gerontology* **59**, 159–164 (2013).
80. Kirichenko, A. K., Bolshakov, I. N., Ali-Rizal, A. E. & Vlasov, A. A. Morphological study of burn wound healing with the use of collagen-chitosan wound dressing. *Bull. Exp. Biol. Med.* **154**, 692–696 (2013).
81. Uppal, R., Ramaswamy, G. N., Arnold, C., Goodband, R. & Wang, Y. Hyaluronic acid

- nanofiber wound dressing-production, characterization, and in vivo behavior. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **97 B**, 20–29 (2011).
82. Liakos, I. *et al.* All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *Int. J. Pharm.* **463**, 137–145 (2014).
 83. Chen, W. *et al.* Synthesis and antioxidant properties of chitosan and carboxymethyl chitosan-stabilized selenium nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **132**, 574–581 (2015).
 84. Mesquita, R. M. G. R. de. Caracterização do tratamento de feridas complexas em um hospital geral. *Diss. Mestr.* 96 (2013). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
 85. Galeano, G. & Bernal, R. *Acrocomia aculeata*. *Catálogo plantas y líquenes Colomb. Inst. Ciencias Nat. Univ. Nac. Colomb. Bogotá* 1–4 (2015).
 86. Dra, O., Palma, S. & Roscoe, C. R. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA Caracterização de frutos e óleo de polpa de macaúba dos biomas Cerrado e Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul , Brasil Autora : Gabrielly Ciconini PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA Caracterização de . (2012).
 87. Brasil. Guia Para a Condução De Toxicologia E Segurança. 1–48 (2013).
 88. Cardoso, L. G. V. *et al.* Características físico-químicas e perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas no Sul de Minas Gerais - Brasil. *Semin. Agrar.* **31**, 127–136 (2010).
 89. Gomes, T. K. de C. & Oliveira, S. L. de. O papel dos ácidos graxos essenciais no perfil de eicosanoides e sua repercussão na resposta imune The role of essential fatty acids on the eicosanoids profile and its impact on immune response. *Nutrire* **35**, 167–186 (2010).
 90. Vimala, K. *et al.* Fabrication of Curcumin Encapsulated Chitosan-PVA Silver Nanocomposite Films for Improved Antimicrobial Activity. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **02**, 55–64 (2011).
 91. Hu, H., Xin, J. H., Hu, H., Chan, A. & He, L. Glutaraldehyde – chitosan and poly (vinyl alcohol) blends , and fluorescence of their nano-silica composite films. **91**, 305–313 (2013).
 92. Verma, J., Kanoujia, J., Parashar, P., Tripathi, C. B. & Saraf, S. A. Wound healing applications of sericin/chitosan-capped silver nanoparticles incorporated hydrogel. *Drug Deliv. Transl. Res.* **7**, 77–88 (2017).
 93. Aguiar, A. de O., Oliveira, B. B. R. de & Carnib, L. P. de A. Efeito dos antioxidantes vitamina C e selênio em pacientes queimados: uma revisão bibliográfica. *Rev. bras. queimaduras* **13**, 62–66 (2014).
 94. Abdullah, R., Miyazaki, K., Nakazawa, M. & Koyama, H. Chemical forms of selenium for cancer prevention. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **19**, 141–150 (2005).
 95. Rayman, M. P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc. Nutr. Soc.* **64**, 527–542 (2005).
 96. Walston, J. *et al.* Serum antioxidants, inflammation, and total mortality in older women. *Am. J. Epidemiol.* **163**, 18–26 (2006).
 97. Lee, B. C. *et al.* Selenoprotein MsrB1 promotes anti-inflammatory cytokine gene expression in macrophages and controls immune response in vivo /631/45/612 /631/250 /38 /82 /82/80 article. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
 98. Thangavel, P. *et al.* Accelerated Healing of Diabetic Wounds Treated with L-Glutamic acid Loaded Hydrogels Through Enhanced Collagen Deposition and Angiogenesis: An in Vivo Study. *Sci. Rep.* **7**, 1–15 (2017).
 99. Lucas, T. *et al.* Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *J. Immunol.* **184**, 3964–3977 (2010).

100. Guo, Y. *et al.* AGEs Induced Autophagy Impairs Cutaneous Wound Healing via Stimulating Macrophage Polarization to M1 in Diabetes. *Sci. Rep.* **6**, 1–16 (2016).
101. Campos, A. C. L., Borges-branco, A. & Groth, A. K. Wound healing. *Arq. Bras. Cir. Dig.* **20**, 51–58 (2007).
102. Hamilton, V. *et al.* Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **17**, 1373–1381 (2006).
103. Midwood, K. S., Williams, L. V. & Schwarzbauer, J. E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1031–1037 (2004).
104. Mori, T., Murakami, M., Okumura, M., Kadosawa, T. & Uede, T. Mechanism of Macrophage Activation by Chitin Derivatives. **1**, (2004).
105. Ueno, H. *et al.* Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials* **20**, 1407–1414 (1999).
106. Kojima, K., Okamoto, Y., Kojima, K., Miyatake, K. & Fujise, H. Effects of Chitin and Chitosan on Collagen Synthesis in Wound Healing. 0–3 (2004).

ANEXO

PROTOCOLO DE DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE:

Número do Processo: BR 10 2018 010131 5

Título: PELÍCULA BIOCOMPATÍVEL PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Categoria: Patente de Invenção