



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA - PGFAR  
FÁRMACO MEDICAMENTOS E ANÁLISES CLÍNICAS**

Sandra Joseane Fernandes Garcia

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DO HIDROGEL DE  
QUITOSANA A 2% NO TRATAMENTO DE LESÕES  
CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia – FÁRMACO Medicamentos e Análises Clínicas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rozangela Curi Pedrosa

Florianópolis - Santa Catarina – Brasil

2011



**Sandra Joseane Fernandes Garcia**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DO HIDROGEL DE  
QUITOSANA A 2% NO TRATAMENTO DE LESÕES  
CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Farmácia.

Florianópolis, 02 de Maio de 2011.

---

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Rozangela Curi Pedrosa  
Orientadora

---

Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Elenara lemos Senna  
(UFSC)

---

Prof., Dr. Danilo Wilhelm Filho  
(UFSC)

---

Prof., Dr. Eduardo Cargnim Ferreira  
(IFSC- Lages)





## **DEDICATÓRIA**

Este trabalho é dedicado aos pacientes amputados em decorrência de feridas crônicas. Com ele espero contribuir para que possamos pesquisar e encontrar mais tratamentos que reduzam este quadro de sofrimento e abandono na saúde brasileira.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao Criador pela inspiração da luta pela vida.

À minha família, em especial minha mãe e irmãs, pelos exemplos de sabedoria, e que nos momentos de dificuldade me ampararam com carinho e cuidado.

À professora Dra Rozagela Pedrosa pelo conhecimento, generosidade, e por aceitar o desafio em pesquisar o tema.

À enfermeira Roseli Barboza Roza e toda equipe de enfermagem do Ambulatório de Referência PAM Boa Vista Joinville/SC pelo apoio e incentivo durante esta jornada.

Ao Prof. Dr. Mauro Laranjeiras e à sua orientanda Luciana Valgas, pela criação e produção dos compostos desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Hercílio Fronza e à Dra Arlete Souza do Serviço Integrado de Patologia - Joinville/SC, que contribuíram na execução das análises histológicas e imunohistoquímicas.

Ao professor Dr. Danilo Wilhelm Filho por ceder gentilmente seu laboratório para a realização das análises desse trabalho.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Farmácia e ao secretário Bruno pelo conhecimento e dedicação.

À minha querida Beatriz Belli, pela paciência, compreensão e as palavras de conforto, Meu obrigada de coração!

Aos amigos especiais, Fernando S. L. Cantanhede, Mano Ci, Karina Bettega Felipe, Eduardo Antonio Ferreira, Juliana Strapazzom e Valdelúcia Grinevicius, pelo aprendizado e apoio nas horas difíceis. Aprendi muito com vocês.

Aos colegas de laboratório, Aline Pereira, Ana Claudia Vieira, Carla Baron, Eduardo Benedetti Parisotto, Fernanda Biscaro, João Francisco Gomes Correia, Maicon Kwiecinski, Mirele Sifroni Farias, Nádia Bücker e Tânia M. Fischer Günther: obrigada por poder conviver com vocês durante esta trajetória, aprendi muito.





## RESUMO

As feridas crônicas apresentam elevada incidência 1 a 2% na população acima de cinquenta anos. Este problema de saúde pública, exige manejo clínico adequado devido ao aparecimento de neoplasias associadas à inflamação crônica. Neste sentido, a pesquisa por fármacos com propriedades cicatrizantes tem sido intensa. A quitosana(CQ)(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose) é um biopolímero com propriedades químicas e biológicas úteis para atuarem diretamente no processo cicatricial. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos cicatrizante e antioxidante do hidrogel de quitosana a 2% no tratamento de lesões cutâneas. Para tanto, foram utilizados camundongos isogênicos Balb/c (peso  $20 \pm 2g$ ,  $n = 6$ ), submetidos à excisão tecidual, e tratamento durante 3, 6, 9, 12 e 15 dias,divididos em grupo controle negativo (CN), que receberam topicamente água destilada, grupo controle positivo (CP), que receberam topicamente solução de alantoína (50 mg/kg/dia) e grupo(CQ), tratado com hidrogel de quitosana a 2% (20 mg/ kg /dia). O potencial cicatrizante foi avaliado de acordo com parâmetros morfométricos, bioquímicos, histológicos e imuno-histoquímicos. Os resultados foram estatisticamente significativos quando comparados com os grupos controle negativo e controle positivo. O hidrogel de quitosana a 2% acelerou a cicatrização das lesões, promovendo-as no décimo segundo dia. O grupo CQ promoveu aumento estatisticamente significativo do conteúdo de hidroxiprolina (37,4%), bem como, a diminuição do dano oxidativo às proteínas teciduais (98,9%) e de lipídios (50,0%). Os níveis da enzima superóxido dismutase mantiveram-se diminuídos (50,0%) provavelmente pela pouca formação de radicais ânion superóxido. Como consequência, possivelmente, a geração de peróxido de hidrogênio esteve controlada e a atividade da catalase (79,1%) e glutathiona peroxidase (76,1%) foram diminuídos. O conteúdo de GSH foi reduzido à níveis basais, sendo que a partir do nono dia de tratamento, observou-se uma redução de 97,1%. Os achados histológicos confirmaram a deposição e substituição do colágeno imaturo por colágeno maduro.Esta deposição foi mais acelerada durante a fase proliferativa.Na revelação imuno-histoquímica do anticorpo monoclonal alfa-actina muscular lisa, foi possível visualizar a neovascularização e a presença de miofibroblastos na remodelação tecidual pós tratamento farmacológico com hidrogel de quitosana.Diante dos resultados obtidos, é possível inferir que o hidrogel de quitosana a 2% tem atividade cicatrizante, uma vez que acelerou a proliferação

celular e a angiogênese. Este efeito poderia ser parcialmente atribuído à ação antioxidante do hidrogel que diminuiu a geração de espécies reativas de oxigênio modulando a resposta inflamatória e, conseqüentemente, o tempo de cicatrização.

**Palavras chaves:** Pele. Quitosana. Cicatrização. Antioxidante. Espécies reativas de oxigênio.

## ABSTRACT

### **Evaluation of the healing effect of chitosan hydrogel at 2% in the treatment of skin injuries in mice**

Chronic wounds have high incidence in the population over fifty years (1-2%). This public health problem requires appropriate clinical management due to the appearance of neoplasms associated with chronic inflammation. In this sense, the search for drugs with healing properties has been intense. Chitosan (1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose) is a biopolymer with biological and chemical properties useful to work directly in the healing process. The aim of this study was to evaluate the healing and antioxidant effects of chitosan hydrogel (2%) in the treatment of skin lesions. To this, we used mice Balb / c (weight  $20 \pm 2$ g, n = 6) underwent excision of tissue, treated for 3, 6, 9, 12 and 15 days and divided into a negative control group (CN) which received only topical distilled water, a positive control group (CP) which received topical solution of allantoin (50 mg / kg / day) and a CQ treated group of chitosan hydrogel 2% (20 mg/ kg /day). The potential healing was assessed according to morphometric, biochemical, histological and immunohistochemical parameters. The results were statistically significant when compared negative and positive control groups. The hydrogel of 2% chitosan accelerated wound healing by accomplish them at the 12th day. The QC group promoted a statistically significant increase of hydroxyproline content (37.4%) and the reduction of oxidative damage to tissue proteins (98.9%) and lipids (50%). The levels of superoxide dismutase remained low (50%) probably due to low formation of superoxide anion radicals. As a consequence, the generation of hydrogen peroxide was controlled and catalase activity (79.1%) and glutathione peroxidase (76.1%) were decreased GSH content was decreasead to baseline levels, and from the 9th day of treatment, a decresion of 97.1%. Histological findings confirmed the deposition and replacement of immature collagen by mature collagen, this deposition was faster during the proliferative phase and in the case of immunohistochemical revelation of monoclonal alpha-smooth muscle actin, it was possible to visualize the presence of neovascularization and most prominent myofibroblasts during tissue remodeling, especially after the pharmacological treatment with chitosan hydrogel. Based on these results is possible to infer that the hydrogel of chitosan 2%

possesses healing activity since it accelerated cell proliferation and angiogenesis. This effect could be partially attributed to the antioxidant action of the hydrogel would reduce the generation reactive oxygen species (ROS) that modulates the inflammatory response and therefore the healing time.

**Keywords:** Skin. Healing chitosan. Antioxidant. Reactive oxygen species.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Camadas da pele e anexos.....	26
Figura 2- Representação de cicatrização da ferida por primeira, segunda e de terceira intenção, na sequência de cima para baixo.....	33
Figura 3- EROS produzidas em tecidos inflamados e enzimas detoxificadoras.....	43
Figura 4- Estrutura química da quitosana.....	48
Figura 5- Porcentagem de redução da lesão de camundongos Balb/C observada a cada 3 dias, durante 15 dias de tratamento com hidrogel de quitosana a 2% (CQ) (20 mg/kg/dia), alantoína (CP)(50 mg/kg/dia) e controle negativo tratado com água destilada (CN).....	67
Figura 6- Conteúdo de hidroxiprolina.....	68
Figura 7- Nível de lipoperoxidação.....	69
Figura 8- Conteúdo de carbonilação proteica.....	70
Figura 9- Atividade da superóxido dismutase.....	71
Figura 10- Atividade da catalase.....	72
Figura 11- Atividade da glutathione peroxidase.....	73
Figura 12- Conteúdo de glutathione reduzida.....	74
Figura 13- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos.....	75
Figura 14- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos.....	76
Figura 15- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos.....	77
Figura 16- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos.....	78
Figura 17- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos.....	79
Figura 18- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos.....	80
Figura 19- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos.....	81
Figura 20- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos.....	83

Figura 21- Imagem do grupo CQ .....	84
Figura 22- Comparação entre os achados histológicos .....	85
Figura 23- Comparação entre os achados histológicos da pele .....	85

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Camadas, tecidos e células encontradas na pele. ....	27
Tabela 2- Principais atividades mediadas via EROS formadas <i>in vivo</i> . ....	40





## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CAT	Catalase
CI <sub>50</sub>	Concentração Inibitória 50 %
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
DPTA	Ácido Dietilenotriaminopentacético
DTNB	Ácido Ditionitrobenzóico
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FGF2 ou bFGF	Fator 2 de Crescimento de Fibroblastos
GMPc	Guanozina Monofosfato Cíclico
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
GST	Glutathione S-transferase
LABIOEX	Laboratório de Bioquímica Experimental
MDA	Malondialdeído
MTT	Sal de Tetrazólio
NADPH	Nicotinamida Adenina Difosfato Reduzida
NAD(P)H oxidase	Enzima NAD(P)H Oxidase
PAE	<i>Plagiochasma appendiculatum</i>
PAF	<i>Fator de ativação de plaquetas</i>
PAL	Percentual de Aumento da Longevidade
PMN's	Leucócitos Polimorfonucleares
RL	Radical Livre
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	<i>Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico.</i>
TCA	Ácido Tricloroacético
TNB	Ânion Tiolato
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VEGFA	Fator A de Crescimento do Endotélio Vascular
WHO	<i>Organização Mundial de Saúde.</i>



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>26</b>
2.1 CARACTERÍSTICAS DO TECIDO EPITELIAL .....	26
2.2 PROCESSOS DE REPARAÇÃO TECIDUAL .....	28
2.2.1 Fase inflamatória.....	28
2.2.2 Fase proliferativa .....	32
2.2.3 Fase de remodelação .....	35
2.3 RESPOSTAS CELULARES E BIOQUÍMICAS À LESÃO .....	38
2.3.1 Espécies reativas de oxigênio e as células do sistema imune.....	38
2.3.2 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes no processo cicatricial de lesões .....	42
2.3.3 Mecanismos de defesas antioxidantes.....	44
2.4 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS PARA LESÕES CUTÂNEAS .....	46
2.5 BIOPOLÍMEROS QUITINA E QUITOSANA .....	48
2.5.1 Características químicas e atividades biológicas da quitina e quitosana.....	48
2.5.2 Propriedades químicas e farmacêuticas da quitosana .....	51
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>54</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	54
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>56</b>
4.1 MATERIAIS.....	56
4.1.1 Quitosana .....	56
4.2 METODOLOGIA .....	56
4.2.1 Preparo e caracterização do hidrogel de quitosana.....	56
4.2.2 Animais .....	56
4.2.3 Grupos experimentais .....	57
4.2.4 Procedimentos do modelo de excisão de pele .....	58
4.2.4.1 Procedimentos anestésico e analgésico.....	58

4.2.4.2 Procedimento Cirúrgico e pós-operatório .....	58
<b>4.2.5 Potencial cicatrizante do hidrogel de quitosana a 2% .....</b>	<b>59</b>
4.2.5.1 Morfometria da lesão .....	59
4.2.5.2 Conteúdo de hidroxiprolina .....	59
<b>4.2.6 Marcadores de estresse oxidativo no processo cicatricial: .....</b>	<b>60</b>
4.2.6.1 Nível de peroxidação lipídica (TBARS) .....	60
4.2.6.2 Dano oxidativo às proteínas (Carbonilação proteica) .....	60
<b>4.2.7 Defesas antioxidantes enzimáticas .....</b>	<b>60</b>
4.2.7.1 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) .....	60
4.2.7.2 Atividade da enzima catalase (CAT) .....	61
4.2.7.3 Atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx).....	61
<b>4.2.8 Defesas antioxidantes não enzimáticas .....</b>	<b>62</b>
4.2.8.1 Conteúdo de glutaciona reduzida (GSH) .....	62
<b>4.2.9 Estudos histológicos e imuno-histoquímico da lesão .....</b>	<b>62</b>
4.2.9.1 Avaliação qualitativa através das colorações hematoxilina- eosina e picro-sirius .....	62
4.2.9.2 Avaliação imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal anti-alfa-actina miosina muscular lisa.....	64
<b>4.2.10 Análise estatística .....</b>	<b>65</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
5.1 POTENCIAL CICATRIZANTE DO HIDROGEL DE QUITOSANA A 2% .....	66
<b>5.1.1 Morfometria da lesão .....</b>	<b>66</b>
<b>5.1.2 Conteúdo de Hidroxiprolina.....</b>	<b>67</b>
5.2 MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO NO PROCESSO CICATRICAL .....	68
<b>5.2.1 Nível de peroxidação lipídica (TBARS).....</b>	<b>68</b>
<b>5.2.2 Dano oxidativo às proteínas (Carbonilação protéica) .....</b>	<b>69</b>
5.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS .....	70
<b>5.3.1 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) .....</b>	<b>70</b>
<b>5.3.2 Atividade da enzima catalase (CAT) .....</b>	<b>71</b>
<b>5.3.3 Atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx) .....</b>	<b>72</b>
5.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS.....	73
<b>5.4.1 Conteúdo de glutaciona reduzida (GSH) .....</b>	<b>73</b>
5.5 ESTUDOS HISTOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICO DA LESÃO .....	74

5.5.1 Avaliação qualitativa através das colorações Hematoxilina-Eosina e Picro-sírius.....	74
5.5.2 Avaliação qualitativa de colagenização através da coloração Picro-sírius.....	79
5.5.3 Avaliação imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal anti-alfa-actina miosina muscular lisa.....	83
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>98</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>102</b>



# 1 INTRODUÇÃO

---

De acordo com a Organização Mundial de Saúde(OMS), a expectativa de vida do ser humano nas diferentes partes de nosso planeta aumentou e o envelhecimento da população promoveu o aparecimento de diversas patologias, entre elas as úlceras crônicas decorrentes de lesões epiteliais e conjuntivas. Segundo Seco e Puig (2004), em torno de 1 a 2% desta população desenvolverá, em algum momento da vida, uma úlcera em membros inferiores, o que representa um problema de saúde pública. Entre estes indivíduos, o diabetes está associado às maiores taxas de hospitalizações, maiores incidências de acometimentos neurológicos, renais, distúrbios vasculares e formação de úlceras nos membros inferiores que comumente levam a amputações (SATORELLI; FRANCO, 2003).

As feridas crônicas como úlceras venosas, arteriais, diabéticas e neuropáticas, somadas às úlceras de pressão representam um alto custo socioeconômico para um país, visto que, além dos gastos referentes ao tratamento, somam-se os prejuízos decorrentes dos afastamentos do trabalho (BRANDEN, 2000; MARGOLIS et al., 2002; BRIENZA et al., 2005). No Reino Unido, o custo estimado com o tratamento das úlceras de estase (úlceras de perna e de pressão) foi estimado entre 294 e 650 milhões de libras anuais e nos Estados Unidos o custo do tratamento anual foi de 2,5 a 3 bilhões de dólares e com a perda de dois milhões de dias de trabalho anuais (MCGUCKIN et al., 2001). No Brasil, um estudo realizado por Maffei e colaboradores (1986), encontrou uma prevalência de 35,5% de varizes e formas graves de insuficiência venosa crônica, sendo que 1,5% apresentavam úlceras de estase em membros inferiores abertas ou cicatrizadas (SANTOS et al., 2009).

Considerando as formas de tratamento das feridas empregadas nas últimas décadas, pode-se destacar o primeiro relato de pesquisas com a quitina e a quitosana e seus derivados. Sua importância econômica é devido a estes compostos serem subproduto da indústria pesqueira e o estado de Santa Catarina é grande um grande produtor nesta área. A quitina e a quitosana foram inicialmente estudadas sob a ótica da medicina e da bioengenharia por Prudden e colaboradores (1970). Outros trabalhos descrevem o efeito estimulante da quitina ou quitosana no processo de cicatrização, na formação de tecido de



granulação, na angiogênese, na formação de fibras de colágeno e na ativação da resposta imune (MUZZARELLI, 1997; UENO et al., 1999; 2001a,b).

Também neste mesmo período, surgiram várias pesquisas objetivando esclarecer o papel de espécies reativas de oxigênio (EROS) em processos fisiopatológicos como a inflamação. O processo inflamatório é mediado por diferentes células imunes que invadem os tecidos lesados. Os neutrófilos chegam primeiramente na lesão devido à sua abundância no sangue em circulação, seguidos pelos monócitos que se diferenciam em macrófagos teciduais maduros. Além disso, as células do sistema imune produzem e secretam grandes quantidades de EROS, que são essenciais para proteger o organismo contra as bactérias e outros micro-organismos invasores (SCHÄFER; WERNER, 2008). Após a ação das células da defesa imune, as bactérias e os restos celulares são removidos da ferida pelo processo de fagocitose (SCHÄFER; WERNER, 2008).

A oxidação de substâncias é parte fundamental dos processos aeróbicos. Desta forma, os agentes oxidantes, como EROS, podem ser produzidos naturalmente ou como resposta a uma alteração fisiológica ou patológica, como no caso do processo inflamatório. Neste processo, os neutrófilos ativados produzem ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, que podem causar degradação de componentes do tecido conjuntivo, particularmente o colágeno (DARR; FRIDOVICH, 1994).

As células do sistema imune produzem e secretam uma grande quantidade de EROS e também as espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Estudos recentes revelam que o óxido nítrico é um regulador no processo cicatricial, atuando na quimiotaxia das células do sistema imune como citocinas e na adesão de monócitos na fase inflamatória (SEN; ROY, 2008).

EROS em níveis fisiológicos promoveriam a sinalização intracelular, como em um estudo onde se verificou que níveis realmente baixos de peróxido de hidrogênio são necessários para a angiogênese eficiente no local da ferida (ROY et al., 2006).

No presente estudo buscou-se caracterizar o efeito do hidrogel de quitosana a 2% no processo de cicatrização de lesão aguda de pele em camundongos isogênicos Balb/c. Ao mesmo tempo, procurou-se caracterizar o papel do estresse oxidativo neste processo, bem como a defesa antioxidante do tecido lesado frente ao tratamento da lesão com quitosana, um possível agente antioxidante.

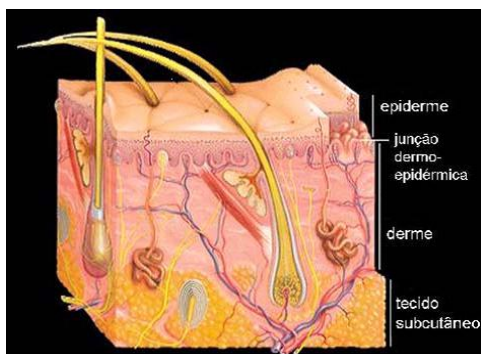
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DO TECIDO EPITELIAL

A pele é o maior órgão do corpo, atingindo 16% do peso corporal e com função de proteção do organismo contra a perda de água e contra atrito, recebendo constantemente informações sobre o ambiente através de suas terminações nervosas e enviando-as para o sistema nervoso central. A pele tem importante papel também na termorregulação do corpo e protege os tecidos adjacentes contra moderada exposição às radiações ultravioletas A e B, capazes de causar queimaduras e diversos tipos de câncer de pele, especialmente em populações do sul do Brasil que possuem pele clara (CORRÊA et al., 2003; DIFFEY, 1991; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A pele recobre toda a superfície do corpo e apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Dependendo da espessura da epiderme, distingue-se em fina e espessa. A pele espessa é encontrada na palma das mãos e na planta dos pés, o restante do corpo é protegido por pele fina. Abaixo da derme há a hipoderme, que não faz parte da derme, mas lhe serve de união com os órgãos subjacentes. Já os pelos, as unhas e as glândulas sudoríparas e sebáceas são estruturas anexas da pele (Figura 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).



**Figura 1- Camadas da pele e anexos.**

Fonte: (BARANOSKI; NURSING, 2001).

A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado composto por quatro tipos de células: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as de Merkel. As células de Langerhans têm papel importante nas reações imunitárias cutâneas, as células de Merkel são mecanorreceptores de sensibilidade e tato, enquanto os melanócitos produzem pigmento chamado melanina. A epiderme apresenta cinco camadas denominadas como basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea com funções e células específicas. As camadas, os tecidos e as células encontradas na pele e suas características são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1- Camadas, tecidos e células encontradas na pele.**

Característica	Camada da Pele		
	Epiderme	Derme	Hipoderme
Tecido	Tecido Epitelial Estratificado Pavimentoso Queratinizado	Tecido conjuntivo frouxo e denso	Tecido Conjuntivo Frouxo
Células Especializadas	Queratinócitos, Melanócitos, Células de Langerhans e Merkel.	Folículos Pilosos, Glândulas sebáceas e sudoríparas.	Adipócitos
Composição	Basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea.	Papilar e reticular	Tecido Adiposo

Fonte: (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004, p. 359).

A derme é o tecido conjuntivo que se apoia na epiderme e que une a pele ao tecido celular subcutâneo ou hipoderme, apresentando espessura variável, atingindo o máximo de três milímetros, apresenta superfície externa irregular com saliências denominadas papilas dérmicas as quais aumentam a área de contato entre a derme e epiderme. As papilas são muito mais frequentes nas zonas sujeitas pressões e atritos. A derme é constituída por duas camadas: a papilar e a reticular.

Formada por tecido conjuntivo frouxo, a hipoderme se une de maneira pouco firme à derme e aos órgãos subjacentes, sendo a camada responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apoia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Ressalta-se ainda como sendo fundamental a compreensão da estrutura das camadas que constituem a pele, para tornar possíveis os estudos histológicos e imuno-histológicos baseados na observação da ação de substâncias utilizadas com o objetivo de acelerar o processo de cicatrização.

## 2.2 PROCESSOS DE REPARAÇÃO TECIDUAL

No decorrer do fechamento de lesões a reparação tecidual é realizada por diferentes mecanismos. Diante disso, os processos de reparo de lesões têm sido estudados a partir dos mecanismos que envolvem fases distintas da cicatrização e eventos celulares associados. Destacam-se, nestes processos, o papel dos mediadores químicos de natureza lipídica (eicosanoides) e o dos de natureza peptídica (citocinas, fatores de crescimento e neuropeptídios).

Os processos envolvidos na reparação do tecido lesado visam o restabelecimento da homeostasia dos tecidos e a regeneração com a reestruturação da atividade funcional da pele (BALBINO et al., 2005). Ao nível histológico o processo cicatricial em humanos está descrito em três fases distintas, denominadas como fase inflamatória, fase proliferativa onde se forma o tecido de granulação e fase de remodelação do tecido (CLARK, 1993; GURTNER et al., 2008).

### 2.2.1 Fase inflamatória

Para Cotran e colaboradores (2000), a inflamação pode ser definida como sendo uma reação local do tecido vascularizado frente às diferentes agressões. A palavra inflamação ou flogose deriva de flogístico que, em grego, significa queimar, estando relacionada com os sinais clínicos de calor, rubor, edema, dor e perda da função. Lembrando que a resposta inflamatória é constituída de duas fases, ou seja, a inflamação propriamente dita e o reparo. Porém, estas duas fases têm estreita ligação, resultando em um único processo.

A finalidade da fase inflamatória consiste em livrar a área lesada de detritos e de tecido morto, além de ocorrer destruição, diluição ou isolamento dos agentes lesivos. A resposta inflamatória desencadeia uma série complexa de eventos que reconstitui o tecido lesado (RUBIN; FARBER, 2002).

No processo inflamatório são constatados sinais clínicos locais tais como calor, rubor, edema e dor, além da diminuição da função de barreira protetora da pele. O calor e rubor estão relacionados com a

microcirculação em volta da lesão; o edema ao extravasamento de líquido do plasma para os tecidos; e a dor com a liberação de bradicinina e serotonina e também com aumento da tensão tissular. Já a perda de função ocorre como uma consequência de todos os fatores citados (COTRAN et al., 2000).

O extravasamento de líquidos, proteínas e células do sistema vascular, geralmente é denominado exsudato e transudato. O exsudato corresponde a um fluido inflamatório extra vascular com alta concentração de proteínas e detritos com densidade de acima de 1,02. Esta exsudação altera a permeabilidade da microcirculação na área da lesão. O transudato, por sua vez, corresponde a um fluido de baixo conteúdo protéico e densidade menor de 1,012 sendo um ultrafiltrado do plasma sanguíneo (COTRAN et al., 2000).

Na fase inflamatória, os maiores componentes da resposta inflamatória são as alterações hemodinâmicas (vasoconstrição transitória, vasodilatação, diminuição da velocidade circulatória, marginação leucocitária e emigração), as alterações da permeabilidade vascular, e a exsudação leucocitária (COTRAN et al., 2000).

Nesta fase, inicialmente ocorrem hemorragia e perda de líquido devido à destruição dos vasos sanguíneos. Em seguida, as plaquetas realizam a hemostasia, ativando a cascata de coagulação e liberando citocinas que ativam os macrófagos, de forma que, do ponto de vista fisiológico, esta ativação pode ser considerada o ponto inicial do processo de reparo, marcando o final da hemostasia e o início da fase inflamatória (DIPIETRO, 1995).

As plaquetas atuam liberando protrombina, fibronectina, fibrinogênio, trombospondina e fator de von Willebrand. Estas substâncias são mediadores químicos necessários para a agregação plaquetária e para a ligação destes fragmentos celulares à estrutura do tecido (COTRAN et al., 2000).

Para que ocorra a constrição dos vasos sanguíneos ou vasoconstrição, evitando a hemorragia, deve haver a liberação de serotonina, adenosina difosfato (ADP), cálcio e tromboxina (ABLA; ISHIZUKA, 1995). A vasoconstrição divide-se em primária e secundária, estando a vasoconstrição primária associada à coagulação sanguínea para evitar maior perda de sangue. A vasoconstrição secundária é consequência da liberação de norepinefrina, que se propaga de alguns segundos até poucos minutos após a lesão (RUBIN; FABER, 2002).

Para garantir a hemostasia, inicialmente ocorre resposta vascular que envolve um período transitório de 5 a 10 minutos de intensa

vasoconstrição, propiciando o fechamento dos vasos lesados. Após o período de vasoconstrição, há uma vasodilatação que tem seu pico em 20 minutos, sendo acompanhada pelo aumento da permeabilidade capilar (COTRAN et al., 2000).

Devido à ação da histamina e das prostaglandinas na lesão, inicialmente há vasodilatação das arteríolas, resultando na abertura de novos capilares e aumento do fluxo sanguíneo, permitindo a passagem de plasma e dos elementos sanguíneos tais como os leucócitos. Entre as células endoteliais este fenômeno denominado diapedese, causa calor e rubor seguidos da diminuição da velocidade circulatória, resultando no aumento da permeabilidade da microvasculatura. Em seguida, a bradicinina e as anafilatoxinas iniciam um mecanismo de aumento da permeabilidade dos vasos não lesados, havendo liberação de proteínas plasmáticas, contribuindo assim, para a coagulação extra-vascular (COTRAN et al., 2000).

Acompanhando o aumento da permeabilidade vascular no local do trauma, observa-se a afluência de várias células, incluindo leucócitos chamados de polimorfonucleares ou PMNs (neutrófilos, eosinófilos e os basófilos) e os mononucleares (os linfócitos e os monócitos). Assim, o aumento da permeabilidade capilar permite que os fluidos ricos em proteínas entrem no espaço intersticial. Adicionalmente à deposição de fibronectina, cria-se um arcabouço que permite a migração dos fibroblastos para a ferida, sendo que a produção da fibronectina se ocorre principalmente entre as 24 e 48 horas após a lesão (STADELMANN et al., 1998).

Os PMNs são os primeiros a chegar ao local da ferida, seguidos pelos leucócitos mononucleares. Os monócitos são considerados componentes celulares vitais nas fases iniciais do processo de cicatrização e os PMNs desempenham o importante papel de proteção da ferida contra a entrada de agentes patogênicos, além de atuarem na remoção de fragmentos de tecidos alterados (STADELMANN et al., 1998).

Os monócitos migram do interior dos vasos até o espaço tecidual, diferenciando-se rapidamente em macrófagos (STADELMANN et al., 1998). Dielgemann e colaboradores (1981), por outro lado, destacam que os macrófagos compõem a população de leucócitos predominantes em uma ferida, apresentando função reguladora central na quimiotaxia dos fibroblastos, na proliferação e na subsequente síntese e degradação de colágeno.

O termo colágeno abrange uma série de glicoproteínas que se encontram na matriz extracelular. Os tipos e a quantidade de colágeno

que estão dentro da ferida são modificados com o tempo, ou seja, o colágeno embrionário (tipo III) é gradualmente absorvido e substituído pelo colágeno fibrilar maduro (tipo I) (KITCHEN; BAZIN, 1998).

Quando ocorre uma lesão cutânea, podem ser produzidos tanto o colágeno tipo IV como colágeno tipo V, que são depositados em torno das células, formando uma sustentação estrutural, como parte da matriz extracelular. No entanto, a produção de colágeno pode ser afetada pela natureza da matriz extracelular e por algumas substâncias presentes nos macrófagos. Entre estas substâncias, as citocinas são fatores que garantem um ótimo nível de cicatrização, devido ao equilíbrio entre o efeito estimulante e inibitório conferido por elas (KITCHEN; BAZIN, 1998).

Os fatores de crescimento derivados dos macrófagos, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor* - PDGF), o fator de crescimento transformador beta (*Tumor Growth Factor* - TGF-beta), as interleucinas (IL-1 e 2) e o fator de necrose tumoral (*Tumor Necrose Factor* - TNF) têm papel-chave na migração e ativação dos fibroblastos em uma ferida, assim como as lisozimas. Sabe-se que, além da função de reparo exercida pelos macrófagos, eles podem apresentar algumas das funções dos neutrófilos, pois além de realizarem fagocitose, também liberam colagenase, proteoglicanas e enzimas que atuam na degradação do material necrosado (WAHL; WAHL; MCCARTHY, 1978).

Após a introdução de PMNs nas feridas agudas, ocorre um aumento no número de linfócitos. Ainda que o papel dessas células no processo de cura não esteja bem definido, sabe-se que secretam citocinas além de substâncias estimulantes da quimiotaxia pelos fibroblastos (COTRAN et al., 2000; (WAHL; WAHL; MCCARTHY, 1978).

Os neutrófilos também têm ação vital na cicatrização por atuarem limpando a ferida (WAHL; MCCARTHY, 1978). Estas células quando ativadas liberam as EROS e as enzimas dos lisossomos que agem contra a infecção e ajudam na limpeza da ferida. A passagem dos neutrófilos no interior das estruturas vasculares para os tecidos extra-vasculares lesionados ocorre através de uma ação ameboide. Através da lise neutrofílica é que se consegue a fagocitose, resultando na liberação de proteases e de colagenases, iniciando a lise de proteínas e do colágeno necrosado. O final da fase aguda da inflamação dura cerca de dois dias, que é o tempo suficiente para infiltração dos neutrófilos até o tecido extra vascular (COTRAN et al., 2000).

É comum dividir a inflamação em fase aguda e fase crônica. A fase aguda é uma resposta fisiológica a todas as formas de agressões, sua resposta é basicamente a mesma, qualquer que seja o local ou o agente lesivo. Sua intensidade de reação é determinada pela gravidade da lesão, pela ação do agressor e pela capacidade de resposta imune do organismo, com duração de minutos, horas ou até dias, havendo presença de leucócitos e edema. Logo após a inflamação aguda, algumas reações desaparecem e outras originam um processo chamado de reparo tecidual (COTRAN et al., 2000).

### **2.2.2 Fase proliferativa**

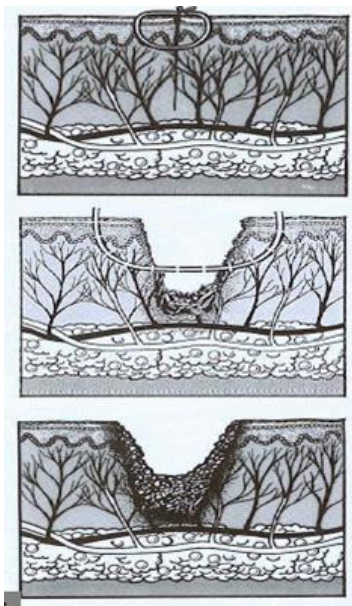
A fase proliferativa ocorre imediatamente após a fase inflamatória e consiste em intensa proliferação celular na lesão envolvendo, em geral, mecanismos de contração, reparação e regeneração tecidual (RUBIN; FARBER, 2002).

A fase proliferativa tem início cerca de 48 horas após a lesão e tem duração de aproximadamente de três semanas, sendo caracterizada pela granulação, epitelização e síntese de colágeno (COTRAN et al., 2000).

O reparo envolve dois processos distintos, a regeneração, que é a substituição do tecido lesado por células do mesmo tipo, e substituição por um estroma de tecido conjuntivo tentando constituir uma cicatriz (COTRAN et al., 2000).

A cicatrização pode ocorrer através de união por primeira, segunda ou terceira intenção (Figura 2). A cicatrização por união primária ou cicatrização por primeira intenção ocorre quando a cicatrização ocorre sem contaminação e com mínima perda de tecidos, com morte de pequenos números de células epiteliais, bem como de células dos anexos da derme e das células do tecido conjuntivo, além de não ser possível a visualização do tecido de granulação, e a formação da cicatriz ser mínima. A união secundária ou cicatrização de segunda intenção, ocorre quando há perda mais extensa de células e de tecido, com um processo reparador mais demorado, onde o tecido de reparo compõe-se de finos capilares e redes que posteriormente formam o tecido conectivo. Há ainda a cicatrização de terceira intenção, termo utilizado para feridas profundas que não foram suturadas inicialmente ou que se romperam e foram suturadas novamente, aproximando as duas superfícies de granulação opostas, resultando em cicatriz mais larga e profunda (SMELTZER; BARE, 2002).





**Figura 2- Representação de cicatrização da ferida por primeira, segunda e de terceira intenção, na sequência de cima para baixo.**

Fonte: (AFB, 2007).

Alguns órgãos, como o coração e rins, não têm capacidade regenerativa e, em função desta limitação, durante o reparo do tecido lesado geralmente ocorre uma cicatrização por tecido conjuntivo que substitui células especializadas afetando a capacidade funcional do órgão ou tecido (COTRAN et al., 2000).

Uma proliferação vascular inicia-se entre 2 a 3 dias após uma lesão, podendo durar vários dias. Neste processo as células endoteliais próximas da ferida dividem-se e formam brotos sólidos que se estendem a partir de vasos preexistentes. Os brotos vasculares arborizam, formam anastomoses, constituindo um novo leito capilar de tal maneira que, ao atingir seu ponto máximo, o tecido de granulação apresenta mais capilares por unidade de volume do que qualquer outro tipo de tecido (RUBIN; FARBER, 2002).

Para ocorrer a angiogênese são necessários vários estímulos. Inicialmente, há o brotamento capilar, onde as células endoteliais migram na direção do estímulo, na forma de um cordão de células circundadas por uma matriz provisória. Através de novos brotos

capilares e de seus lumens é no interior dos cordões arqueados que um novo fluxo sanguíneo é estabelecido. Ocorre também a anastomose dos vasos no interior do espaço da ferida, constituindo uma irrigação bem desenvolvida no tecido de granulação. Este tecido, após ser remodelado, é transformado em tecido cicatricial, ocorrendo diminuição capilar, uma vez que os estímulos angiogênicos cessam, caracterizando mudanças nas mitocôndrias das células endoteliais, degeneração, necrose e ingestão final por macrófagos (KITCHEN; BAZIN, 1998).

A estimulação e o controle da angiogênese podem ser diretos ou indiretos, e originam-se de estímulos gerados, tanto por ocasião da lesão quanto durante os estágios iniciais de reparo. Muitos dos novos capilares não desenvolvem um fluxo sanguíneo definitivo e são reabsorvidos (KITCHEN; BAZIN, 1998).

Os fibroblastos são a única fonte de colágeno e matriz da ferida. O sinal que estimula a produção de colágeno parece ser uma combinação de fatores de crescimento estimulado pela hipóxia e subprodutos de metabolismo anaeróbico, como o ácido láctico (COTRAN et al., 2000).

A cicatriz inicial da ferida não exhibe apenas células inflamatórias e capilares, mas também muitos fibroblastos. Após o influxo de células inflamatórias do sangue para a ferida, os fibroblastos se movem para a área lesada, e secretam componentes da matriz extracelular. A fibronectina e o ácido hialurônico são os primeiros produtos de fibroblastos a serem depositados na ferida em cicatrização, seguidos de proteoglicanas. As concentrações de proteoglicanas e fibronectina na ferida alcançam seu máximo entre o quarto e sexto dia após a lesão, e então diminuem até os níveis normais em torno do 12º dia (RUBIN; FARBER, 2002).

No processo de cicatrização ocorre a contração do local da ferida, uma redução do tamanho de uma ferida mediada principalmente por miofibroblastos (RUBIN; FARBER, 2002). Na pele humana, a contração ocorre de maneiras distintas. No caso de ocorrência de uma contração pequena, seu fechamento será lento, o que permite um sangramento em excesso, levando a possíveis infecções, porém uma contração extensa pode levar a contraturas teciduais, consequentemente causando deformidades e disfunções (MONTADON et al., 1977).

A diminuição do tamanho das feridas é atingida pela migração interna de células mesenquimatosas circundantes. Sob algumas circunstâncias, a contração reduz o tamanho da lesão aberta em até 70%. Se a contração for impedida, resultará em cicatrizes grandes e disformes (FARBER; RUBIN, 2002).

O início da contração da ferida ocorre logo após a lesão, por um período de duas semanas, aproximadamente. Existem teorias que abordam os mecanismos envolvidos, entre elas destacam-se a teoria da contração celular, que se baseia nas ações dos miofibroblastos e a teoria da tração celular que se baseia na ação dos fibroblastos que realizam a tração celular (KITCHEN; BAZIN, 1998).

A teoria da contração celular refere-se à função que os miofibroblastos exercem na atividade contrátil, fazendo com que as bordas da ferida sejam unidas.

Em contrapartida, a teoria da tração celular considera os fibroblastos como agentes da oclusão, por exercerem as forças de tração sobre as fibras da matriz extracelular, processo análogo à tração exercida pelas rodas sobre uma superfície. Durante a atividade celular são geradas as forças de tração, que são forças tangenciais. Os miofibroblastos migram dois ou três dias após a lesão, e sua contração ativa diminui o tamanho da lesão. Essas células apresentam características intermediárias entre aquelas de fibroblastos e das células que formam a musculatura lisa (SKALLI; GABBIANI, 1988).

Na fase proliferativa, pode-se visualizar o tecido de granulação. Este tecido é a resposta inicial a uma ferida e consiste em tecido conjuntivo ricamente vascularizado, contendo capilares novos, fibroblastos abundantes e números variáveis de células inflamatórias. A formação de tecido de granulação, como um processo regulado, envolve muitos eventos que incluem o crescimento de novos capilares, fibrinogênese e involução vascular durante a maturação da cicatriz. O tecido de granulação é produzido e organizado através dos fibroblastos que se diferenciam dos fibrócitos que estão localizados nas margens da ferida. A migração dos fibroblastos constitui uma resposta aos agentes de atração químicos e físicos (RUBIN; FARBER, 2002).

Após terem transcorrido alguns dias, o tecido de granulação evolui, compondo uma nova matriz com nova vascularização, na presença de macrófagos e fibroblastos. Este tecido precede o tecido cicatricial (RUBIN; FARBER, 2002).

### **2.2.3 Fase de remodelação**

A remodelação tecidual está diretamente relacionada com a deposição do colágeno. Entretanto, a significativa deposição de colágeno na ferida não é aparente até o quarto dia. Inicialmente, predomina o colágeno tipo III. Mas, após uma semana, o colágeno do

tipo I é abundante e, por fim, torna-se o principal colágeno do tecido cicatricial maduro (RUBIN; FARBER, 2002).

O conteúdo líquido de colágeno de uma ferida é controlado pela atividade de degradação desta proteína pela collagenase, e depende de um equilíbrio entre a produção e degradação de colágeno. A atividade da collagenase, por sua vez, depende da ação de vários fatores, incluindo o hormônio da paratireóide e os esteróides adrenocorticóides da glândula adrenal (SALDIVA; CARVALHO, 1985).

Por outro lado, a inibição de síntese de colágeno promove como efeito secundário, um aumento dos níveis de alfa-2 macroglobulina, cisteína, e progesterona. Portanto, a compreensão e o controle desses processos podem oferecer oportunidades terapêuticas no tratamento de feridas com cicatrização anormal (ROBINSON, 2002).

Depois de três semanas de lesão, há equilíbrio entre a síntese e a degradação de colágeno, começando a remodelação da ferida. A resolução deste processo em lesões crônicas pode estender-se por anos. Ainda que não haja nenhum aumento dos níveis de colágeno, percebe-se no local lesado uma reorganização de fibras de colágeno, em função dos fatores mecânicos que agem localmente. Durante essa fase ocorre um aumento progressivo das propriedades elásticas da ferida, sendo que na continuidade da maturação da ferida a maioria do colágeno tipo III, depositado no início da cicatrização, vai sendo substituído pelas fibras do tipo I até que a relação entre os tipos I e III de colágeno alcance a taxa de cerca de 4:1, na cicatrização da lesão (COTRAN et al., 2000).

Com a progressão da cicatrização da ferida, o índice de síntese de colágeno excede o de sua degradação, portanto ocorre um acúmulo de colágeno durante a cicatrização, alcançando o máximo em dois a três meses, ao mesmo tempo a involução vascular prossegue, transformando assim, o tecido de granulação ricamente vascularizado em uma cicatriz pálida e avascular (COTRAN et al., 2000).

A remodelagem do tecido imaturo inicia-se na mesma ocasião em que se forma o novo tecido, embora seja considerada como a terceira fase do reparo. A matriz extracelular presente vai sendo substituída gradualmente ao longo dos meses e anos, enquanto acontece a maturação do tecido cicatricial (STADELMANN et al., 1998).

Deve-se ressaltar ainda que a matriz extracelular inicial é formada quando os fibroblastos chegam ao local da ferida e sintetizam ácido hialurônico, fibronectina e colágenos do tipo I e II (BALBINO et al., 2005).

Durante o período de maturação da matriz há certas alterações, tais como a redução gradual da presença de ácido hialurônico, do

fibrinogênio, e do colágeno tipo I, que se torna o componente predominante. E, finalmente, ocorre uma deposição de proteoglicanas que contribuem para a elasticidade dos tecidos e ajudam na regulação da motilidade e crescimento celular e na deposição de colágeno (KITCHEN; BAZIN, 1998).

Na fase inicial da ferida a presença do ácido hialurônico pode ser um agente importante na proliferação dos fibroblastos e parece facilitar a motilidade celular. No interior da ferida encontra-se a fibronectina que atua como agente de quimioatração de células como os fibroblastos e as células endoteliais; na ampliação da fixação dos fibroblastos à fibrina e, possivelmente, no fornecimento de um gabarito para a deposição do colágeno (KITCHEN; BAZIN, 1998).

Entre os vários fatores que influenciam a cicatrização da ferida estão os fatores sistêmicos relativos às condições metabólicas, circulatórias, nutricionais e hormonais e os fatores locais relacionados ao tipo, tamanho e localização da ferida, pois pequenas feridas cicatrizam mais rápido do que as grandes, enquanto as lesões em áreas vascularizadas cicatrizam mais rapidamente (COTRAN et al., 2000).

Paralelamente ao reparo da derme, ocorre a formação de um novo tecido que inicialmente substitui a derme perdida, chamado tecido de granulação. Este nome devido ao aparecimento granular de numerosos capilares apresenta fibroblastos, células endoteliais e células inflamatórias. Os fibroblastos são atraídos a partir da borda da ferida, e se proliferam de maneira a construir uma nova matriz extracelular. Além disso, as células mesenquimais da medula óssea são atraídas para a ferida e contribuem para o aumento da população de fibroblastos no tecido de granulação.

Os fibroblastos em seguida estimulam a migração e proliferação de queratinócitos na borda da ferida, resultando em uma cobertura completa da ferida com uma nova epiderme. No tecido de granulação os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, que são responsáveis pela contração da ferida e realizam a produção de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular. Para nutrir o novo tecido, com oxigênio e nutrientes, formam-se novos vasos sanguíneos na borda da ferida, de maneira que o tecido de granulação seja continuamente nutrido pelos novos vasos sanguíneos. Além disso, ocorre a linfangiogênese com objetivo de restaurar os vasos linfáticos (MARTIN, 1997; GURTNER et al., 2008).

O processo de cicatrização termina com uma longa fase de remodelação: a epiderme retorna à sua espessura normal através da

diferenciação dos queratinócitos, resultando na restauração da barreira epidérmica e formação de cicatriz com força tênsil.

## 2.3 RESPOSTAS CELULARES E BIOQUÍMICAS À LESÃO

### 2.3.1 Espécies reativas de oxigênio e as células do sistema imune

A fonte de energia em essencialmente todas as plantas, animais, fungos e micro-organismos aeróbios é o oxigênio molecular ( $O_2$ ) (WILHELM FILHO et al., 2000), que atua comoceptor final de elétrons, o que permite elevada produção de energia na respiração celular, em consequência de seu alto potencial termodinâmico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Ainda que o oxigênio seja indispensável para a vida, os processos metabólicos oxidativos também causam danos reversíveis ou irreversíveis, mesmo nos organismos aeróbios que possuem várias defesas antioxidantes enzimáticas ou não enzimáticas contra as EROS (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; MARKS et al., 2007). No organismo aeróbio, as EROS encontram-se envolvidas na produção de energia, na fagocitose, na regulação do crescimento celular, na sinalização intercelular e na síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS, 2006).

Devido à sua configuração eletrônica, a molécula de oxigênio ( $O_2$ ) pode sofrer reduções parciais e levar à formação de radicais livres (FRIDOVICH, 1986). Em torno de 98% do oxigênio consumido em organismos aeróbios é reduzido de forma tetravalente até  $H_2O$  (CHANCE et al., 1979), principalmente, através de reações enzimáticas na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons. No entanto, cerca de 2% “escapam” desta redução completa, e ligam-se de forma monovalente e seqüencial, levando à formação de EROS.

As espécies químicas na forma de radicais livres centradas no oxigênio são de grande interesse na área biológica, porque a partir delas podem ser geradas espécies reativas, envolvendo outros átomos e moléculas. A evolução do conhecimento sobre as EROS no meio biológico foi gradativa, iniciando-se com publicação de Gershman et al. (1954), demonstrando que a sua importância em sistemas biológicos, posteriormente identificação de enzimas como a SOD (1969) cujos substratos são radicais livres, e progredindo para a identificação de vias metabólicas geradoras de tais espécies. Adicionalmente, se estudou a detecção de efeitos celulares e teciduais deletérios, quando as EROS alcançam concentrações elevadas no meio fisiológico, a associação do seu envolvimento com várias condições patológicas e, por último, a sua

participação de espécies reativas em vias de sinalização celular (GERSHMAN et al., 1954; McCORD; FRIDOVICH, 1969; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; MARKS et al., 2007).

Existem vários conceitos para o termo “radical livre”. Alguns autores adotam uma definição abrangente e definem radical livre como “espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados, e que são capazes de existência independente” (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

Já a terminologia para as EROS inclui as espécies radicalares e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são reativas em decorrência de sua instabilidade, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio *singlete* ou simpleto ( $^1O_2$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

Pela sua configuração eletrônica, o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos. O ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é o primeiro intermediário da redução monovalente do oxigênio até água, enquanto a redução de mais um elétron, ou a ação enzimática da superóxido dismutase (SOD), produz peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Através de adição de um elétron ao  $H_2O_2$ , ou catalizado pelo sistema  $Fe^{+2}/Fe^{+3}$  ou  $Cu^{+2}/Cu^{+3}$ , caracterizando a Reação de Fenton onde se forma o radical hidroxila (HO $\cdot$ ). Outra ERO importante é o oxigênio molecular simpleto ( $^1O_2$ ), uma espécie do oxigênio molecular excitada na presença de luz, igualmente importante promotora de danos em sistemas biológicos (PRYOR, 1986; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006) (Tabela 2).

Existem outras EROS formadas em reações de propagação, como os radicais peroxil (ROO $\cdot$ ) e alcoxil (RO $\cdot$ ), além de espécies reativas derivadas do óxido nítrico (NO $\cdot$ ), como o peroxinitrito (ONOO $\cdot$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). A caracterização das principais EROS formadas *in vivo* encontram-se resumidas na Tabela 2.

**Tabela 2- Principais atividades mediadas via EROS formadas *in vivo* (SIES, 1985; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).**

Intermediário	Característica	Tempo de meia-vida	Sítios de formação
Radical Superóxido ( $O_2^-$ )	Formado através da redução parcial do oxigênio molecular por um elétron.	Velocidade aproximada de $5 \cdot 10^5 M^{-1} s^{-1}$	Reações de autooxidação envolvendo ciclos redox e flavoproteínas.
Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )	Formado através da redução parcial do oxigênio molecular, por dois elétrons.	Decomposição Enzimática. Velocidade aproximada de $10^2 - 10^3 M^{-1} s^{-1}$ .	Oxidases e SOD como catalizadores das vias.
Radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ )	Formado através da redução do oxigênio molecular, por três elétrons nas reações de Fenton e Haber-Weiss, tendo metais de transição como catalizadores.	Velocidade aproximada $10^{-9} s^{-1}$ .	Locais adjacentes à formação de ânion superóxido/peróxido de hidrogênio na presença de metais (Fe), produto da reação entre o óxido nítrico e o radical superóxido.
Radical alcóxil ( $RO^{\cdot}$ )	Radical orgânico centrado no oxigênio.	Velocidade aproximada $10^{-6} s^{-1}$ .	Intermediário na peroxidação de lipídios da membrana.
Radical peróxil ( $ROO^{\cdot}$ )	Formado através de hidroxiperóxidos orgânicos.	$7 s^{-1}$ .	Intermediário na peroxidação de lipídios da membrana.
Oxigênio molecular simpleto ( $^1O_2$ )	Primeiro estado excitado do oxigênio molecular (nível de energia 22 kcal/mol) acima do estado fundamental ou oxigênio tripleto.	$10^{-5} seg^{-1}$ .	Sítios metabólicos cristalino, musculatura esquelética.



Quanto ao potencial de reatividade das EROS no meio biológico, o HO<sup>•</sup> é o mais reativo, apesar de apresentar concentrações intracelulares extremamente baixas ( $10^{-18}$ M) e reduzidíssimo tempo de vida-média ( $10^{-9}$ s) (CHANCE et al., 1979). Isto faz com que este radical reaja muito rapidamente com quase todos os tipos de moléculas, tais como açúcares, aminoácidos, proteínas, lipídios e bases de DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006), proporcionando as principais reações de iniciação e propagação envolvendo EROS, como a peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e dano ao DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; BERRA; MENCK, 2006; GATÉ; PAUL; NGUYEN, 1999). O radical HO<sup>•</sup> dificilmente pode ser sequestrado *in vivo*, mas em experimentos de laboratório o HO<sup>•</sup> pode facilmente ser sequestrado *in vitro* por inúmeras moléculas, devido à sua alta reatividade. No entanto, para que os resultados *in vitro* se reproduzam *in vivo*, é necessário administrar alta concentração do antioxidante para que este alcance o local onde o radical HO<sup>•</sup> está presente em concentração suficiente para suprimi-lo. Existem duas maneiras de controlar a presença do radical HO<sup>•</sup>, ou seja, através do reparo dos danos causados por ele ou através da inibição da sua formação (BARREIROS, 2006).

As EROS podem ser originadas tanto exógena quanto endogenamente. As fontes exógenas de EROS incluem principalmente luz ultravioleta, nos comprimentos de onda maiores que 280 nm, as radiações ionizantes, como os raios X e alguns agentes químicos.(GERSHMAN et al.1954)

Já as EROS formadas intracelularmente são originadas principalmente como consequência do próprio metabolismo celular, na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, entre os complexos I e III, e também nas vias da xantina oxidase, da síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso e no sistema citocromo P-450 redutase microsomal (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; BERRA; MENCK, 2006).

Outra fonte endógena de EROS são os fagócitos que destroem células infectadas por bactérias ou vírus pela via da NADPH oxidase essas células que realizam fagocitose (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Deste modo, as EROS também possuem um papel benéfico nos organismos aeróbios, fazendo parte da defesa imune primária (VALKO et al., 2006).

Outro aspecto relevante é que a geração intracelular de EROS, considerada normal em níveis fisiológicos, tem um importante papel

vital, uma vez que essas espécies, nos casos onde são produzidas de forma controlada, atuam na regulação da sinalização celular e da expressão gênica que são determinantes de mecanismos apoptóticos e da diferenciação celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

### **2.3.2 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes no processo cicatricial de lesões**

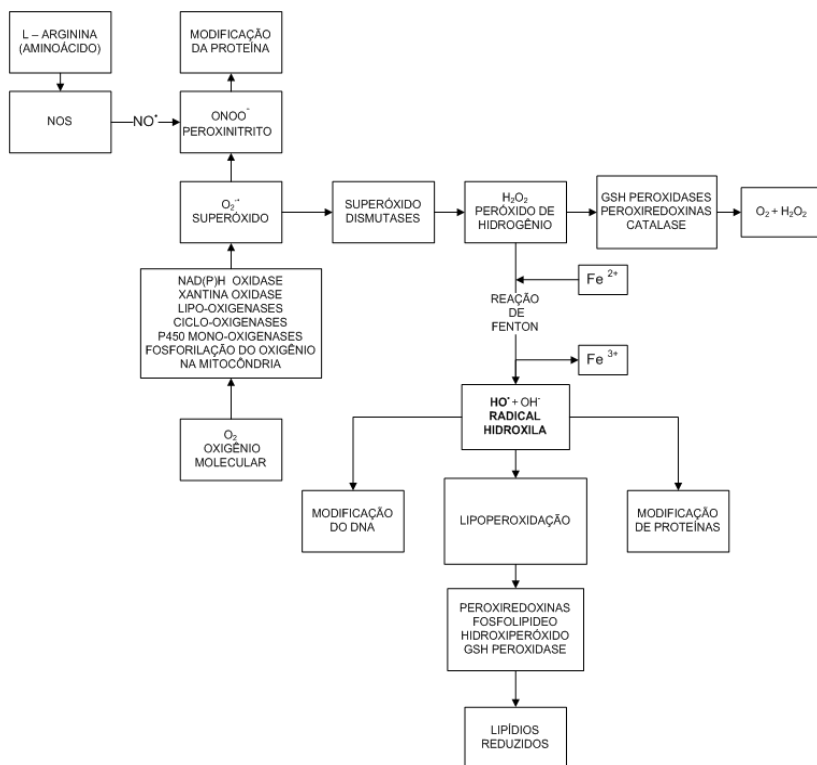
Existem inúmeros estudos sobre o envolvimento de EROS em processos tanto fisiológicos quanto patológicos como no caso da inflamação crônica, em doenças cardiovasculares, neurológicas e pulmonares, ou até mesmo em casos de câncer e diabetes, além de pesquisas referentes à presença de EROS no processo de reparo normal ou alterado de feridas (SCHÄFER; WERNER, 2008; REUTER et al., 2010).

Estudos recentes revelaram que as EROS e o óxido nítrico regulam o processo de cicatrização (SCHÄFER; WERNER, 2007; WLASCHEK; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, 2005; SEN; ROY, 2008). Essas espécies são necessárias para a defesa contra patógenos invasores além de que níveis relativamente baixos de EROS também são mediadores essenciais da sinalização intracelular (CLARK, 1996; D'AUTREAU; TOLEDANO, 2007).

As EROS são produzidas por todas as células durante o curso normal de processos metabólicos, por exemplo, na cadeia respiratória. Grandes quantidades dessas espécies reativas são produzidas em tecido lesados e inflamados, na presença da enzima NADPH oxidase, um complexo enzimático que se expressa particularmente em casos de altos níveis de células inflamatórias (DARR; FRIDOVICH, 1994; BEDARD; KRAUSE, 2007). Esse fenômeno tem sido descrito como o *burst* "respiratório", no qual ocorre a ativação da NADPH oxidase e as células produzem o ânion superóxido, um radical fracamente reativo, o qual é rapidamente dismutado em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e água.

O  $H_2O_2$  pode causar graves danos celulares devido à geração do radical hidroxil na presença de íons de ferro ou de cobre (reação de Fenton). O radical hidroxil é altamente agressivo promovendo a oxidação de qualquer molécula na sua adjacência. Portanto, deve ser rapidamente detoxificada pelas enzimas catalase, peroxidases e também por várias peroxirredoxinas antioxidantes. Estas últimas também são capazes de detoxificar os peróxidos lipídicos (figura 3) (MARKS et al., 2007).

Além das enzimas detoxificadoras de EROS, a defesa é obtida através de uma variedade de antioxidantes de baixo peso molecular. Quando a taxa de produção de EROS ultrapassa a taxa de remoção pelos antioxidantes detoxificadores do sistema de defesa celular, há desequilíbrio e ocorre o estresse oxidativo (SIES, 1985), como resultado são gerados danos celulares graves, diversas doenças, envelhecimento precoce ou neoplasias. A ativação destes mecanismos de proteção é conhecida como defesas antioxidantes (SIES, 1991; CERUTTI; TRUMP, 1991).



**Figura 3- EROS produzidas em tecidos inflamados e enzimas detoxificadoras**

Fonte: (MARKS, 2006).

### 2.3.3 Mecanismos de defesas antioxidantes

A produção contínua de EROS durante os processos metabólicos nos organismos aeróbios levam ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para proteção, como também sistemas de reparo, que previnem o acúmulo de moléculas alteradas pela oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; MARKS et al., 2007; REUTER et al., 2010). Como antioxidante, entende-se qualquer substância capaz de, mesmo em concentrações relativamente baixas, retardar ou prevenir a oxidação de substratos oxidáveis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas básicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997):

- 1) detoxificadora do agente antes que ele cause a lesão, constituída principalmente pela glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e vitamina E;
- 2) reparadora de moléculas modificadas por EROS, constituída principalmente pelo ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona redutase (GR) e pela glutathiona peroxidase (GPx).

Os antioxidantes também podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos, conforme a estrutura e o mecanismo de ação do agente antioxidante. As enzimas envolvidas na proteção antioxidante primária do organismo humano constituem uma proteção intrínseca e incluem principalmente a SOD, CAT e GPx (CHANCE et al., 1979).

Através da ação das enzimas antioxidantes, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical hidroxila, que é extremamente reativo e deletério às células (BOVERIS; CADENAS, 1997). A SOD converte o  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  (DARR; FRIDOVICH, 1994); a catalase, por sua vez, converte o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ ; enquanto que a GPx converte o  $H_2O_2$ , ou outros hidroperóxidos, até  $H_2O$ , com oxidação da glutathiona reduzida (GSH) para formar a glutathiona oxidada (GSSG) (CHANCE et al., 1979).

Ainda há enzimas detoxificadoras (Fase II do processo de biotransformação), como a glutathiona-S-tranferase (GST), as quais agem detoxificando agentes alquilantes, incluindo herbicidas, pesticidas e outros xenobióticos, através da catalização da reação de conjugação da glutathiona em sua forma reduzida (GSH) a estes compostos, aumentando

a sua solubilidade e, assim, facilitando a sua excreção (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). A glutatona redutase (GR) catalisa a redução da glutatona oxidada (GSSG) para formar GSH, mantendo elevada a razão GSH/GSSG nas células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

A glutatona é o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos e demais organismos aeróbios, sendo encontrado em diferentes tecidos, compartimentos celulares e sub-celulares (WILHELM FILHO et al., 2000). A GSH protege contra o dano oxidativo por meio de distintos mecanismos, ou seja, reagindo com as EROS; restaurando moléculas lesadas, cedendo-lhes hidrogênio; estabilizando as estruturas das membranas, assim como pela eliminação dos peróxidos formados, e pela manutenção dos grupos tióis das proteínas em sua forma reduzida (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

A GSH também atua como substrato ou cofator de diversas enzimas protetoras como a GPx e a GST. Além disso, a GSH atua como agente redutor, reciclando o ácido ascórbico de sua forma oxidada à sua forma reduzida, reação essa mediada pela enzima desidroascorbato redutase (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

Outros compostos de baixo peso molecular e que possuem importante ação antioxidante são o ácido úrico, a bilirrubina, a albumina, o estradiol e a coenzima Q ou ubiquinol (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

Dos componentes não enzimáticos da defesa antioxidante, destacam-se alguns minerais (cobre, manganês, zinco, selênio e ferro), vitaminas (ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A, riboflavina), carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína, entre outros) e bioflavonóides (genisteína, quercetina, etc.), além de outros componentes antioxidantes presentes em diversas espécies de plantas (PAPAS, 1999; LEITE; SARNI, 2003).

Considerando que a injúria a um tecido leva ao estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), existe uma razoável preocupação quanto ao entendimento de novos mecanismos na tentativa de prevenir e/ou de tratar os possíveis danos que essas espécies químicas venham causar à saúde humana.

O papel de substâncias com potencial antioxidante tem sido estudado nos processos fisiológicos, como no caso da quitosana. Nos estudos de Xie e colaboradores (1998) e de Xue e colaboradores (2001), demonstrou-se que a quitosana teve efeito protetor na formação de grupos carbonil nas proteínas plasmáticas expostas aos radicais peróxil (TOMIDA et al., 2009).

## 2.4 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS PARA LESÕES CUTÂNEAS

Os estudos de Winter (1962) determinaram um avanço significativo no tratamento de feridas, a ação de ocluir e impedir a perda de umidade no leito da lesão, curava mais rapidamente as feridas, concluindo que o ambiente úmido otimizava os índices de cura. O modelo experimental proposto baseava-se em lesões produzidas em suínos que foram mantidas úmidas e sua epitelização foi promovida duas vezes mais rápido que as feridas deixadas secar por exposição ao ar. Posteriormente, foram realizados experimentos com humanos, e mais uma vez observou-se que, quando uma ferida era mantida aberta e diretamente exposta ao ar, desidratava-se e formava uma crosta. Isto forma uma barreira mecânica à migração de células da epiderme que são forçadas a mover-se num nível mais profundo do tecido, o que prolonga o processo de cicatrização. A umidade do leito impede a formação de crosta e o curativo absorve o exsudato secretado, retirando parcialmente a umidade da lesão (HINMAN; MAIBACH, 1963).

Tradicionalmente, os curativos convencionais são realizados com soro fisiológico e ocluídos com gaze e fita adesiva. A aplicação de soluções antissépticas como o PVPI (Polivinilpirrolidona iodo, a 10%) e pomadas à base de antimicrobianos como a neomicina, a sulfadiazina de prata a 1%, mupirocina a 2% também foram sendo amplamente utilizadas. Um fármaco que também sido aplicado no tratamento de lesões é a alantoína, composto químico extraído a partir da raiz do confrei (*Symphium officinale* Linn), e que apresenta propriedades queratolítica, hidratante e epitelizante (PEREIRA, 2003). A alantoína tem atividade antiinflamatória, analgésica e imunoestimulante, sendo utilizada na cicatrização de lesões (SHESTOPALOV et al., 2006; DRAELOS, 2001; MARTINDALE, 1993; JOANNE, 1988).

A agência norte-americana FDA (*Food and Drug Administration*), em 1999, reclassificou os curativos farmacológicos por categorias. A primeira categoria é composta de curativos não reabsorvíveis gaze/ esponjas de uso externo; a segunda, por curativos hidrofílicos; em terceiro, os curativos oclusivos, hidrogéis para feridas e queimaduras; e finalmente, os curativos interativos, tanto para feridas, quanto para queimaduras (PAUL; SHARMA, 2004).

Os curativos ou coberturas que promovem a reepitelização e fechamento das lesões e foram desenvolvidos para feridas crônicas e agudas, têm entre outros objetivos: reduzir o tempo de cicatrização, diminuir a dor, aumentar a absorção de sangue ou fluidos do tecido

lesado. Os principais curativos oclusivos são de hidrocolóides, alginatos, hidrogéis, curativos de espuma, curativos de parafina, curativos com gaze e não aderentes (VALENCIA et al., 2001).

No início da fase inflamatória, os tecidos lesados podem estar excessivamente úmidos e perdem líquidos através da evaporação e pela produção de exsudato. Sendo que, o excesso de exudação, impede o curso normal do processo de cura, e os curativos que promovem a absorção do exsudato são as fibras de alginato de cálcio e sódio, as fibras de carboximetilcelulose e espumas de poliuretano. Os hidrocolóides são compostos de carboximetilcelulose e pectina. Os filmes de poliuretano ou polietileno são curativos utilizados quando os tecidos estão suficientemente úmidos com produção mínima de exsudato. Já os hidrogéis à base de carboximetilcelulose e alginato de cálcio são necessários quando os tecidos estão secos, pois eles doam umidade, restabelecendo a hidratação ideal do tecido (VACHON; YAGER, 2006).

Atualmente, há inúmeros curativos que são compostos com material biológico ao invés de sintético, sendo que estes biomateriais têm com objetivo causar impacto no ambiente da ferida e não apenas gerir a umidade. São reabsorvíveis e provocam respostas mais eficazes que os agentes químicos normais. Exemplo disto são os curativos à base de colágeno e celulose, que são utilizados em inúmeras lesões cutâneas, principalmente, em feridas crônicas e que tem mostrado maior eficácia terapêutica que os fármacos clássicos (CHABY et al., 2007).

Curativos à base de ácido hialurônico, que é um componente da matriz extracelular e tem um papel importante no processo de cura, conforme já mencionado, também estão disponíveis no mercado, e são utilizados no tratamento de feridas crônicas, como as úlceras venosas. A matriz extracelular foi incorporada recentemente aos curativos na forma de alginatos, com o objetivo de exercer uma fixação temporária as células. (VACHON; YAGER, 2006;).

Todo esse arsenal terapêutico aumenta a possibilidade da cura de lesões, entretanto seu custo é muito elevado uma vez que se trata de produtos importados de alta tecnologia. Existe a necessidade de produção de fármacos nacionais que possam atender as necessidades terapêuticas do paciente e que sejam acessíveis à população. Desta forma, o laboratório de pesquisas sobre quitina e quitosana da Universidade Federal de Santa Catarina, tem desenvolvido pesquisas sobre compostos com quitosana, primeiramente pelo seu baixo custo, por ser obtida a partir do aproveitamento dos dejetos da indústria pesqueira, na qual o estado de Santa Catarina é referência. E, pelas

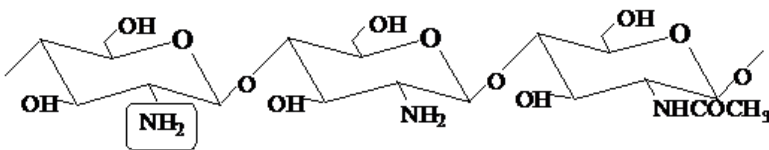
propriedades biológicas citadas por inúmeros autores, demonstrando potencial interferência na reparação tecidual.

## 2.5 BIOPOLÍMEROS QUITINA E QUITOSANA

A quitosana (Figura 4), denominada como beta (1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose, é um biopolímero obtido a partir da desacetilação da quitina em solução alcalina concentrada, que apresenta várias propriedades químicas e biológicas (VARMA et al., 2004; BAILEY et al., 1999).

### 2.5.1 Características químicas e atividades biológicas da quitina e quitosana

A quitina e quitosana são copolímeros constituídos por unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina em proporções variáveis, sendo que o primeiro tipo dessas unidades predomina no caso de quitina, enquanto a quitosana é composta predominantemente, por unidades *D*-glicosamina (Figura 4). A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza depois da celulose, sendo o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e insetos, sendo sub-produto da indústria pesqueira, presente também, na parede celular de fungos,. A quitosana pode ser obtida a partir da quitina por meio da desacetilação com álcalis, podendo também estar naturalmente presente em alguns fungos (SILVA et al., 2006; VINSOVA; VAVRIKOVA, 2008).



**Figura 4- Estrutura química da quitosana**

Fonte: (SILVA et al., 2006).

Dentre as inúmeras características que distinguem quitina e quitosana dos demais polissacarídeos, destaca-se a atividade antimicrobiana contra bacilos Gram positivos, em especial contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermis*, *Bacillus subtilis*, e bactérias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*



*pneumoniae* e *Proteus vulgaris*. Estes são agentes presentes nas lesões criticamente colonizadas, que retardam a cicatrização, degradando o tecido em processo de epiteliação por liberação de toxinas da lise dessas bactérias (KIM et al.,1997).

Com relação às atividades biológicas, tanto a quitina quanto a quitosana provocam inibição do crescimento de micro-organismos, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, ligam-se aos micro-organismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento. O mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às suas propriedades físico-químicas e às características da membrana do micro-organismo (SILVA et al., 2006).

Segundo alguns autores, a atividade antimicrobiana da quitosana também ocorre pelo fato dela provocar a inibição do crescimento de microrganismos, como ocorre com *E. coli*, *Fusarium* sp, *Alternaria* sp, *Helminthosporium* sp, entre outros (KOIDE, 1998; RAVI KUMAR, 2000). Alguns pesquisadores justificam essa atividade antimicrobiana da quitosana pelo fato de seus grupos amínicos em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente são protonados, e ligam-se a grupos aniônicos desses microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (KOIDE,1998).

Qi e colaboradores (2004) mostraram através de micrografias eletrônicas que a membrana da bactéria *S. aureus* (Gram-positiva) na presença de quitosana foi enfraquecida, e algumas vezes fragmentada, enquanto a bactéria *E. coli* (Gram-negativa) apresentou seu citoplasma concentrado.

A quitosana apresenta capacidade de quelar oligo-elementos essenciais ou nutrientes inibindo o crescimento bacteriano (MUSSARELLI et al., 1990), além de constituir uma camada impermeável ao redor da célula, impedindo o transporte de solutos essenciais para a mesma (ROLLER; COVILL, 1999)

Segundo Zheng e Zhu (2003), o efeito bactericida da quitosana com diferentes pesos moleculares é distinto nos dois tipos de bactérias, ou seja, no caso das Gram-positivas estes autores verificaram que a quitosana com alto peso molecular forma películas ao redor da célula, que acabam por inibir a absorção de nutrientes, enquanto que quitosana com baixo peso molecular penetra mais facilmente em bactérias Gram-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses micro-organismos.

Por outro lado, com relação ao processo de coagulação, a quitosana e a quitina desempenham ainda importante papel na

hemostase, porém de maneira independente do sistema clássico da cascata de coagulação. Ambos os polímeros reduzem o tempo de coagulação sanguínea, sendo a quitosana, com tempo de coagulação sanguínea de 3,7 minutos, mais eficaz que a quitina, com tempo de coagulação sanguínea de 4,7 minutos. Portanto, na coagulação sanguínea, embora a quitina tenha maior capacidade em agregar plaquetas que a quitosana, esta última demonstra ser mais eficaz (OKAMOTO et al., 2003).

Rao e Sharma (1997) mostraram que a quitina e quitosana desempenham um papel importante na homeostase, através de um efeito coagulante, porém de maneira independente ao sistema clássico da cascata de coagulação.

A ação destes biopolímeros sobre as plaquetas causa a liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-AB) e TGF- $\beta$ , provavelmente devido ao dano causado às membranas plaquetárias pela forte agregação induzida, principalmente pela quitosana (OKAMOTO et al., 2003).

Adicionalmente, estudos realizados por Okamoto e colaboradores (2002) sugerem que a quitosana possui efeito analgésico tópico que seria decorrente da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico ( $\text{NH}_2$ ) para a forma de amônia ( $\text{NH}_3^+$ ).

A bradicinina, mediador químico liberado pelo cininogênio plasmático, e outras citocinas como as IL 1 e 8, parece ser particularmente importante para a produção da dor no local inflamado. A quitosana teria a propriedade de absorver a bradicinina liberada no sítio da inflamação, enquanto a quitina teria a capacidade de absorção quase três vezes maior, comparativamente à quitosana (OKAMOTO et al., 2002).

A atividade imunomoduladora da quitosana é devida à sua capacidade de ativar, quase que exclusivamente, os macrófagos e explica não somente seu papel na aceleração da cicatrização de lesões, mas também a biodegradabilidade desse polímero no organismo. As lisozimas produzidas por macrófagos hidrolisam e modificam a quitosana, formando oligômeros de quitosana de baixa massa molecular. Esta ativação faz com que os macrófagos liberem óxido nítrico, ativando as EROs, produzindo interleucina-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influência na organização e deposição do colágeno. Os macrófagos liberam, também, N-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana formando monômeros de N-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias à biossíntese do ácido hialurônico e

outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos (MUZZARELLI,1997).

A quitina e a quitosana promovem a migração de neutrófilos, facilitando a resolução da resposta inflamatória. Além disso, as atividades bactericidas e bacteriostáticas sugerem que estes polímeros podem prevenir infecções quando aplicados diretamente no local da lesão (KOIDE, 1998). Adicionalmente, a quitosana é excelente umectante e apresenta melhor aderência que ácido hialurônico, além de ser economicamente mais viável (MUZZARELLI,1997).

A ação da quitosana como agente cicatrizante ocorre na aceleração da infiltração das células polimorfonucleares na área lesada, no aumento da retirada dos feixes de fibrina, no aumento da migração de fibroblastos para a área lesada, no estímulo da migração de macrófagos, no estímulo da proliferação de fibroblastos, na ativação de células inflamatórias e na produção de colágeno (UENO et al., 1999).

A quitosana apresenta propriedades favoráveis de biocompatibilidade e bioatividade, além de ser atóxica, bactericida, fungicida e biodegradável e agir como composto cicatrizante, apresentando vantagem em relação aos polímeros sintéticos que, na sua grande maioria, são tóxicos (RAVI KUMAR, 2000; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; TOMIDA et al., 2009).

Segundo Lee e colaboradores (2000), a quitosana na forma de membranas ou gel, é um excelente veículo para fármacos no tratamento de lesões cutâneas, acelerando o processo de cicatrização.

### **2.5.2 Propriedades químicas e farmacêuticas da quitosana**

Uma importante característica química da quitosana é a de possuir grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) parcialmente protonados, sendo o ponto de partida para muitas modificações químicas, como no caso da amidação da quitosana com ácido malônico, resultando no derivado malonilquitosana. A presença de grupos carboxilatos na estrutura da cadeia polimérica da malonilquitosana é responsável pelo elevado grau de intumescimento na faixa pH neutro (VALGAS et al., 2005).

Alguns parâmetros são importantes para caracterizar a qualidade da quitosana, tais como o grau de desacetilação (GD), solubilidade em solução 1% de ácido acético, pH, viscosidade, turbidez, tamanho das partículas, fonte ou origem, massa molecular, conteúdo residual de proteínas e aminoácidos (RAVI KUMAR et al., 2004).

O grau de desacetilação é também considerado como um dos principais parâmetros na caracterização da quitosana, e é determinado

por inúmeros métodos propostos na literatura, tais como espectroscopia de infravermelho e de ultravioleta, ressonância magnética nuclear (RMN), análises térmicas, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e titulometria. Em grande parte dos métodos publicados, a técnica de espectroscopia de infravermelho é a mais utilizada, onde os dados são ajustados em equações relacionadas às bandas associadas aos grupos N-acetil e hidroxila presentes na quitina.

Propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e perfil atóxico fazem da quitosana excelente material a ser explorado como veículo de preparações cosméticas e farmacêuticas. As propriedades biológicas da quitosana abrem grande leque de aplicações, que vão desde veículo até a exploração farmacológica de suas atividades antimicrobiana, coagulante, hipocolesterolêmica, dentre outras (SILVA et al., 2006).

Devido às propriedades favoráveis de biocompatibilidade (atóxica, biodegradável e de origem natural) e de bioatividade, a quitosana tem sido usada na área médica e farmacêutica. Assim, a quitosana, sendo um biopolímero natural hidrofílico, biocompatível e biodegradável de baixa toxicidade (DL<sub>50</sub> em camundongos de 16g/kg), vem sendo usada no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos e de "*scaffolds*" (arcabouços poliméricos reabsorvíveis), para a regeneração tecidual na forma de filmes, fibras, blocos, membranas, géis e microesferas (RAVI KUMAR, 2000; VALGAS et al., 2005)

A quitosana é um excelente complexante de metais pesados e essa importante propriedade pode ser aplicada nas áreas farmacêutica, de saúde, de purificação de água e alimentícia (CHOI et al, 2004). Os grupos amino livres presentes no polímero podem adquirir carga positiva, em presença de soluções ácidas diluídas, formando um sal solúvel que confere à quitosana suas propriedades específicas. A quitosana pode ligar-se seletivamente ao colesterol, a gorduras, a proteínas e a células tumorais, como também a outros materiais como polissacarídeos aniônicos, ácidos nucleicos, ácidos graxos entre outros, os quais, por sua superfície negativa interagem fortemente com a quitosana, em razão da carga positiva. (MUZZARELLI,1997). Este biopolímero é um excelente agente coagulante ou floculante, devido à alta densidade de grupos amino que podem interagir com colóides, proteínas, corantes e polímeros carregados negativamente. Por exemplo, a quitosana adere facilmente a polímeros naturais, tais como os encontrados em cabelo e pele, constituídos por proteínas e

mucopolissacarídeos com cargas negativas (RAVI KUMAR, 2000; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; TOMIDA et al., 2009).

A quitosana é um material funcional de aplicação potencial em vários campos do conhecimento, como nas áreas biomédica, ambiental e industrial. Na área de produção de medicamentos, a quitosana pode ser conformada em várias formas (membranas ou filmes, gel, nano e micropartículas, esferas e esponjas), com propriedades que estão sendo exploradas no desenvolvimento de biomateriais comercializáveis para tratamento de feridas (MUZZARELLI, 1997; RAVI KUMAR, 2000).

### 3 OBJETIVOS

---

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos cicatrizante e antioxidante do hidrogel de quitosana a 2% no tratamento de lesões cutâneas induzidas em modelo experimental de excisão de pele utilizando camundongos isogênicos Balb/c.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o possível efeito cicatrizante do hidrogel de quitosana a 2% através da morfometria da lesão cutânea.
- Avaliar o possível efeito cicatrizante do hidrogel de quitosana a 2% através do conteúdo do marcador bioquímico hidroxiprolina.
- Avaliar os marcadores de estresse oxidativo em lesões cutâneas tratadas ou não com hidrogel de quitosana a 2%.
- Avaliar o possível efeito antioxidante do hidrogel de quitosana a 2%.
- Correlacionar o possível potencial cicatricial do hidrogel de quitosana a 2% com os marcadores de estresse oxidativo e com as propriedades antioxidantes da quitosana.
- Verificar o possível efeito cicatrizante do hidrogel de quitosana a 2% através de parâmetros histológicos e imuno-histoquímicos.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **4.1 MATERIAIS**

#### **4.1.1 Quitosana**

Os experimentos para a preparação e caracterização química do hidrogel de quitosana a 2% foram realizados no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Quitina e Quitosana e Aplicações Tecnológicas (QUITECH), do Departamento de Química da UFSC, coordenado pelos professores Mauro Cesar Marghetti Laranjeira e Valfredo Tadeu Fávere.

A quitosana com grau de desacetilação de 90% e massa molar média de 122.740 KD empregada na produção do hidrogel de quitosana 2% utilizada no presente estudo, foi obtida junto à Empresa Purifarma (São Paulo, Brasil). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Previamente foram testadas várias concentrações do hidrogel de quitosana, porém a concentração proposta no estudo obteve melhor resposta cicatricial.

### **4.2 METODOLOGIA**

#### **4.2.1 Preparo e caracterização do hidrogel de quitosana**

A quitosana (2,0 g) foi dissolvida em 50 mL de solução aquosa de ácido láctico (5%) até completa homogeneização, em seguida foi adicionado álcool (50 mL, 90%) e homogeneizado com o auxílio de um agitador magnético, durante 30 minutos. Previamente foi testado várias concentrações do hidrogel de quitosana

#### **4.2.2 Animais**

Para execução desta pesquisa o projeto foi submetido ao Comitê de Ética na Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina e aprovado pelo mesmo sob o número PP00292.

Os ensaios de atividade cicatrizante, estresse oxidativo e efeito antioxidante foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX) do Departamento de Bioquímica da mesma Universidade. Os experimentos foram realizados com camundongos de



linhagem isogênica Balb/c (*Mus musculus*), machos ( $20 \pm 2$  g de peso), com aproximadamente 60 dias, obtidos a partir de reprodução controlada realizada no biotério setorial do LABIOEX/UFSC.

Os animais foram mantidos conforme recomendações de *Guidelines* reconhecidos internacionalmente e destinados para a criação e o manejo de animais para a pesquisa. Assim, os camundongos foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro - escuro de 12 horas, à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e 60% de umidade do ar), recebendo ração comercial Nuvital, composição (milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos) autoclavada e água *ad libitum* (BUITRAGO et al., 2008).

### 4.2.3 Grupos experimentais

**Grupo controle positivo** – animais tratados com aplicação tópica de solução de alantoína (fármaco cicatrizante padrão), foram subdivididos em cinco grupos ( $n=6$ , por grupo) que receberam uma aplicação tópica durante 3, 6, 9, 12 e 15 dias, com início imediatamente após o procedimento cirúrgico. A aplicação tópica da solução de tratamento de alantoína foi realizada através do gotejamento tópico de  $100 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  deste fármaco, correspondendo à dose de  $50 \text{ mg}/\text{kg}/\text{dia}$ , quantidade suficiente para cobrir a área da lesão inicial de  $1 \text{ cm}^2$ , enquanto que a aplicação do gel de quitosana a 2% foi efetuada com espátula descartável de madeira.

**Grupo controle negativo** – animais tratados com aplicação tópica de água destilada foram subdivididos em cinco grupos ( $n=6$ , por grupo) que receberam aplicação tópica durante 3, 6, 9, 12 e 15 dias, com início imediatamente após o procedimento cirúrgico. A aplicação tópica da água destilada ocorreu através do gotejamento de  $100 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  deste veículo, quantidade suficiente para cobrir a área da lesão inicial de  $1 \text{ cm}^2$ .

**Grupo hidrogel de quitosana a 2%** - animais tratados com hidrogel de quitosana a 2%, foram subdivididos em cinco grupos ( $n=6$ , por grupo), receberam diariamente uma aplicação tópica do hidrogel de quitosana a 2% durante 3, 6, 9, 12 e 15 dias, respectivamente, com início imediatamente após o procedimento cirúrgico. A aplicação tópica foi realizada com espátula de madeira estéril usando uma camada de hidrogel  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para cobrir a área da lesão inicial de  $1 \text{ cm}^2$ , correspondendo a uma dose diária de  $20 \text{ mg}/\text{kg}$ .

#### 4.2.4 Procedimentos do modelo de excisão de pele

Os procedimentos realizados para a remoção ou excisão da pele foram baseados em modelo experimental padronizado previamente no biotério setorial do LABIOEX/ BQA (OLIVEIRA et al., 2000/2001; PEREIRA, 2010).

##### 4.2.4.1 Procedimentos anestésico e analgésico

Todos os animais foram submetidos a procedimento anestésico prévio, com administração por via intraperitoneal de cetamina 10% (100mg/kg), xilazina 1% (10mg/kg) e maleato de acepromazina 1% (3mg/kg).

O dorso foi escolhido para serem feitas as feridas, pois evita irritação por contato e autocanibalismo. Após o procedimento cirúrgico, transferiu-se os animais para gaiolas individuais. Durante todo o período pós-operatório foi administrada diariamente duas doses de 20 mg/kg de analgésico (dipirona sódica), via oral por gavagem, para minimizar a dor causada pelo procedimento cirúrgico. O analgésico utilizado, bem como a dose e a via de administração foram selecionados tendo como base sugestões estabelecidas por Mezadri e colaboradores (2004) e Buitrago e colaboradores (2008). A cada três dias de tratamento, num período total de 15 dias, os camundongos foram sacrificados através de aplicação dos anestésicos já mencionados no triplo da dose terapêutica (superdosagem), para coleta do tecido cicatricial e análise dos parâmetros bioquímicos, histológicos e morfométricos.

##### 4.2.4.2 Procedimento Cirúrgico e pós-operatório

Após a anestesia foi realizada a tricotomia da região dorsal com lâmina de barbear e assepsia da pele com álcool 70 % e delimitação da área de 1 cm<sup>2</sup>, procedendo a excisão de 1 cm<sup>2</sup> de tecido epitelial dorsal com bisturi de lâmina dezenove (OLIVEIRA et al., 2000/2001). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e sem maravalha. A maravalha foi substituída por folhas de papel toalha, no intuito de não interferir no processo cicatricial, evitando o contato com a área da lesão e possível contaminação. Diariamente as gaiolas foram higienizadas para redução de contaminação nas lesões e na tentativa de manter um ambiente limpo e adequado durante o período experimental.

## 4.2.5 Potencial cicatrizante do hidrogel de quitosana a 2%

### 4.2.5.1 Morfometria da lesão

Esse parâmetro inclui a porcentagem de redução da lesão (comparação da área lesionada no dia do procedimento cirúrgico e a área cicatrizada a cada três dias, através de fotografia da ferida), e o período de epitelização. Para determinar a porcentagem de redução da lesão, as feridas foram fotografadas (Câmera Digital Kodak Easy Share CX7430), com distância padronizada, imediatamente após a cirurgia para retirada de tecido epitelial e em intervalos de três dias, até a cicatrização total da lesão (OLIVEIRA et al., 2000/2001). As áreas das lesões foram mensuradas com auxílio do software Mocha 1.2, a partir das fotografias obtidas. A porcentagem de redução da lesão (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $\% = [(área\ cicatrizada) \times 100] / \text{área da lesão realizada no procedimento cirúrgico}$ .

As feridas no dorso dos animais foram observadas diariamente, após o procedimento cirúrgico, para a determinação do período de epitelização. Esse período corresponde ao número de dias necessários para a completa cicatrização da lesão, ou seja, ausência de indícios do processo cicatricial (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2007).

### 4.2.5.2 Conteúdo de hidroxiprolina

A hidroxiprolina é um marcador bioquímico da cicatrização de feridas. Para essa determinação, alíquotas de padrão de hidroxiprolina e de amostras de tecido epitelial cicatricial foram retiradas nos dias 3, 6, 9, 12 e 15, foram misturados com hidróxido de sódio. As amostras foram hidrolisadas em solução básica (NaOH, 2N) e submetidas à autoclave a 120°C, durante 20 minutos. Em seguida, o reagente cloramina T foi adicionado e a reação de oxidação ocorreu por um período de 25 minutos à temperatura ambiente. Após a adição do reagente de Ehrlich, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, por 20 minutos. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis (TECHCOMP, modelo 8500 II), no comprimento de onda de 550 nm. Para quantificação da hidroxiprolina foi construída uma curva-padrão compreendendo concentrações entre 0,5 - 18,0 µg/mL. Foi utilizada como padrão N-acetil-L-hidroxiprolina > 99 % (Sigma 01192). Os resultados obtidos correspondem à média de amostras de tecido a partir de análises realizadas em triplicata (REDDY; ENWEMEKA, 1996).

## **4.2.6 Marcadores de estresse oxidativo no processo cicatricial:**

### **4.2.6.1 Nível de peroxidação lipídica (TBARS)**

As amostras de tecido cicatricial foram precipitadas com ácido fosfórico 1,1% e homogeneizadas com cerca de 20 impactos. A lipoperoxidação foi determinada pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Esta se baseia na reação de uma molécula de malonildialdeído (MDA) com duas moléculas de TBA com a eliminação de duas moléculas de água, formando um pigmento cor-de-rosa com absorção máxima entre 532 – 535nm. As análises foram realizadas em triplicata e a leitura das amostras foi efetuada em dois comprimentos de onda distintos, 532 e 600nm em espectrofotômetro UV-Vis (TECHCOMP, modelo 8500 II) (HERMES-LIMA; WILLMORE; STOREY, 1995). A concentração final de TBARS foi calculada da seguinte maneira: TBARS (nmol.mg de proteína-1)={ [Absorbância da amostra (A532 – A600) . 103 . 340]/156 }/mg de proteína.

### **4.2.6.2 Dano oxidativo às proteínas (Carbonilação proteica)**

O dano oxidativo às proteínas por carbonilação foi determinado a partir do homogenato ácido do tecido cicatricial, submetendo-se o precipitado à reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) e posterior dissolução em guanidina. As absorbâncias máximas no intervalo de 360 – 370 nm foram medidas em espectrofotômetro UV-Vis (TECHCOMP, modelo 8500 II), e os valores finais das proteínas carboniladas determinados, utilizando o coeficiente de extinção molar de 22 mM<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em nmol por miligramas de proteína (LEVINE et al., 1990).

## **4.2.7 Defesas antioxidantes enzimáticas**

### **4.2.7.1 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)**

A análise da enzima superóxido dismutase foi realizada por meio da oxidação da adrenalina com a formação do adenocromo. A formação desses compostos foi retardada pela enzima SOD presente na amostra. Em uma cubeta de plástico (3 mL) foram adicionados o tampão glicina (50mM) à temperatura ambiente e pH 10 e 50µL da solução de adrenalina (60 mM) pH 2, mantida em gelo durante o ensaio. Em seguida, observou-se o gráfico com a oxidação da adrenalina expressa

pela formação de uma curva ascendente. Agregou-se alíquota de amostra antes que a reação de oxidação terminasse, ou seja, antes do início do decaimento da curva expressa no gráfico. Repetiu-se o ensaio com mais 2 ou 3 alíquotas distintas. A porcentagem de inibição foi calculada da seguinte maneira: % inibição =  $[(k_2/k_1) - 1].100$ , onde  $k_1$  à porção ascendente da curva de oxidação da adrenalina e  $k_2$  corresponde a porção de inibição, expressa no gráfico, provocada pela SOD presente na amostra. Para o cálculo seguinte, graficou-se log da porcentagem de inibição (% , eixo y) X alíquota de amostra ( $\mu$ l, eixo x), e extrapolando 50% de inibição determinou-se o volume de alíquota correspondente. A curva teve no mínimo 3 pontos. Então, 1 U SOD.mg de proteína<sup>-1</sup> =  $[1/(x \mu$ l . 1000. diluição)].mg de proteína<sup>-1</sup> (MISRA; FRIDOVICH, 1972).

#### 4.2.7.2 Atividade da enzima catalase (CAT)

Para análise da atividade desta enzima foi verificada a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em um comprimento de onda de 240 nm, em espectrofotômetro UV-Vis (TECHCOMP, modelo 8500 II). Uma solução fresca de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) foi preparada e titulada. Em uma cubeta de quartzo, foram adicionados 2  $\mu$ L da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 L de amostra. Após homogeneização, a velocidade de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medida durante 20 segundos. As amostras foram analisadas em triplicata, sendo os valores expressos em mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por min por mg de proteína (AEBI, 1984).

#### 4.2.7.3 Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a redução de peróxido de hidrogênio, bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a GSH como substrato para esta reação e produzindo glutationa oxidada (GSSG) (JONES et al., 1981; EPP; LANDENSTEIN; WENDEL, 1983). Para a determinação da atividade dessa enzima foi utilizado o método de Flohé e Gunzler (1984), usando 10  $\mu$ L de amostra e 10  $\mu$ L de tert-butilhidroperóxido (t-BuOOH) colocados em 1 mL de meio de reação, que continha 25 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0); 8,6 mg de NADPH; 10 mL de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) (5 mM, pH 7,0); 15 mL de água destilada, 24 mg de GSH, e 5 U de glutationa redutase (GR).

Então, avaliou-se a oxidação através da observação da diminuição da absorbância do NADPH medido em 340 nm, já que o

NADPH é utilizado na regeneração de GSH pela enzima GR. Todas as amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-Vis (TECHCOMP, modelo 8500 II), em triplicata e os valores foram expressos em  $\mu\text{mol}$  por minuto e por miligrama de proteína (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984).

#### **4.2.8 Defesas antioxidantes não enzimáticas**

##### **4.2.8.1 Conteúdo de glutatona reduzida (GSH)**

A concentração de pequenos tióis (SH) foi avaliada imediatamente após a obtenção dos extratos ácidos, no sentido de evitar uma rápida oxidação. A glutatona reage com o DTNB (ácido ditionitrobenzóico) e forma o ânion tiolato (TNB) de cor amarela, mensurável em 412 nm. A intensidade de coloração é proporcional à quantidade de GSH presente na amostra. A partir de uma amostra de homogenato de tecido cicatricial, foi precipitado imediatamente em TCA 20%. Utilizando o sobrenadante límpido, obtido após centrifugação (12000 rpm), a uma temperatura de 4°C, por 5 minutos. As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos em  $\text{nmol.mg}^{-1}$ . Para os cálculos, utilizou-se a equação da reta proveniente da curva padrão (BEUTLER et al., 1963).

Cálculo  $\text{nmol GSH}^{-1} = A_{412} \times \text{diluições} / 14,1$  (coeficiente de extinção molar ânion tiolato) (BEUTLER et al., 1963).

#### **4.2.9 Estudos histológicos e imuno-histoquímico da lesão**

Os estudos histológicos e imuno-histoquímico foram realizados no Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia/SIP, Joinville/S.C., e no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFSC.

##### **4.2.9.1 Avaliação qualitativa através das colorações hematoxilina-eosina e picro-sírius**

As montagens das lâminas e as análises histológicas foram realizadas no laboratório de Serviços Integrados de Patologia (SIP), acreditado pelo Colégio Americano de Patologistas e localizado na cidade de Joinville/SC, Brasil, sob a responsabilidade técnica da patologista Arlete de Souza. As lâminas que foram analisadas

continham apenas um código de cadastro da amostra, sem a identificação dos grupos dos animais.

Para o processamento histológico, os tecidos retirados foram fixados em frascos contendo formalina a 10% por vinte quatro horas. Este processamento incluiu desidratação, diafanização e emblocamento em parafina histológica. Após microtomia a 3 µm de espessura, os cortes histológicos foram corados pela técnica de coloração de hematoxilina-eosina. Os cortes histológicos foram avaliados através de microscópio óptico da marca Nikon®, modelo E-200, em aumento de 100 vezes. As imagens foram obtidas com um microscópio Leica DM 500, empregando software de aquisição de imagens Leica® *Microsystems Application Suite* (versão 1.70, Switzerland), através de câmara digital Sony (DXC – 970 MD) acoplada a um microcomputador da linha Pentium®.

Estas imagens foram utilizadas na avaliação histológica qualitativa das fases cicatriciais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Nesta caracterização qualitativa do processo de cicatrização ocorrido nos grupos experimentais tratados com água destilada (CN) (100µL/kg/dia), com alantoína (CP) (100µL/50mg/kg/dia) e com hidrogel de quitosana a 2% (CQ) (20mg/kg/dia), nos dias 3, 6, 9, 12 e 15, os parâmetros histológicos foram classificados de acordo com a escala arbitrária de expressão de 0 a 3 (0=ausente; 1=discreto; 2=moderado; 3=acentuado). Para tanto, foram considerados os parâmetros relacionados com os tecidos formados no local da lesão durante o processo de cicatrização, ou seja, a crosta fibrino-leucocitária, os infiltrados polimorfonucleares, o tecido de granulação, a deposição de colágeno, a formação de vasos sanguíneos e a reepitelização (ARAÚJO et. al., 2010; CORRÊA NETO, 2008).

Também foi realizada a coloração de picro-sírius (*picrosirius-red F3BA*). Esta técnica possibilita a identificação dos tipos de colágeno I e III, que são os mais utilizados para verificação do desenvolvimento do processo de cicatrização na fase de remodelação, por serem o tipo maduro e o imaturo, respectivamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO; 2004). Para tanto, foram analisados os cortes histológicos através de microscópio óptico da marca Nikon®, modelo E-200, em aumento de 100 e 200 vezes, utilizando-se luz polarizada, no laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da UFSC, as imagens digitais foram capturadas e identificadas de acordo com os códigos presentes nas lâminas. As lâminas que foram analisadas continham apenas um código de cadastro da amostra, sem a identificação dos grupos dos animais.

Nesta avaliação qualitativa, utilizou-se como critério a diferenciação do tipo de colágeno presente, ou seja, comparou-se o conteúdo de colágeno do tipo I, com fibras colágenas mais espessas, fortemente birrefringentes e que apresentam coloração em vermelho a amarelo; com o conteúdo das fibras de colágeno tipo III com fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes e que apresentam coloração esverdeada (CORRÊA NETO, 2008), entre os achados histológicos dos grupos experimentais. Para tanto, foi efetuado o tratamento das imagens dos achados histológicos obtendo novas imagens com nitidez em 50 %, brilho (+0%) e contraste (+0%) através do software Microsoft Word 2010. Em seguida, uma determinada área delimitada com um quadrado branco foi ampliada, e a imagem foi novamente tratada empregando o recurso extremidades brilhantes do mesmo software, de maneira a facilitar a observação das fibras coloridas.

#### 4.2.9.2 Avaliação imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal anti-alfa-actina miosina muscular lisa

Este ensaio teve como objetivo visualizar a formação de novos vasos sanguíneos e a presença de miofibroblatos, que estão presentes na fase de remodelação tecidual. A análise imuno-histoquímica foi realizada pelos Serviços Integrados de Patologia (SIP), Joinville, S.C., sob a responsabilidade técnica do patologista Dr. Hercílio Fronza Júnior. As lâminas que foram analisadas continham apenas um código de cadastro da amostra, sem a identificação dos grupos dos animais.

Para o estudo imuno-histoquímico utilizou-se a técnica descrita por Hsu e Raine (1981) e Hsu, Raine e Fanger (1981). A presença de miofibroblastos foi realizada observando a ocorrência das células coradas positivamente pelo anticorpo monoclonal anti-alfa-actina muscular lisa em campo de grande aumento (objetiva de 40 X).

O uso de anticorpo monoclonal garante a especificidade da reação, pois este tipo de anticorpo reconhece um único epítipo em um antígeno (CAMPBELL, 1991).

Para o preparo dos cortes, foram utilizadas lâminas silanizadas para se evitar o descolamento dos cortes histológicos durante a coloração. Os cortes foram submetidos à desparafinização e hidratação, sendo então imersos em tampão citrato (pH 6,1) para recuperação antigênica em banho-maria a 98°C, sob pressão. Em seguida, os cortes foram imersos em tampão fosfato (pH 7,2) e submetidos a bloqueio da peroxidase endógena em metanol com peróxido de hidrogênio a 5%, seguido de bloqueio de biotina endógena utilizando leite em pó. Na



sequência, aplicou-se o anticorpo primário anti-alfa-actina muscular lisa na diluição de 1:300 (anticorpo monoclonal de rato, Código BSB 5032, Bio-SB; Santa Barbara, EUA), incubando-se o conjunto por 2 horas à temperatura ambiente. Após banho em tampão fosfato (pH 7,2), seguiu-se à aplicação de anticorpo biotilado por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após novo banho em tampão fosfato (pH 7,2), seguiu-se à aplicação do conjugado estreptavidina – peroxidase por 30 minutos, ainda à temperatura ambiente. Foi então realizado mais um banho em tampão fosfato (pH 7,2) e procedeu-se à revelação da reação imune com diaminobenzina, seguido de contra coloração com hematoxilina de Gill. Na sequência, os cortes foram desidratados e montados com ENTELAN® e recobertos por lamínulas de vidro. A positividade da coloração imuno-histoquímica foi identificada nas áreas de pigmentação acastanhada.

A biotinilação é uma estratégia usada para aumentar a sensibilidade de ensaios imunoquímicos e moleculares (ZHOU et al., 2001; KITTIGUL et al., 1998) devido ao fato de que a estreptavidina possui quatro sítios de ligação com alta afinidade pela biotina e esta molécula pode ser facilmente conjugada à proteínas para atuar como marcador (BURNS, 2005).

#### **4.2.10 Análise estatística**

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através da análise de variância ANOVA, complementada por Teste *t*, quando necessário, admitindo-se um nível de significância de, no mínimo,  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média e em média  $\pm$  desvio padrão para avaliação morfométrica e os marcadores de estresse oxidativo.

## 5 RESULTADOS

---

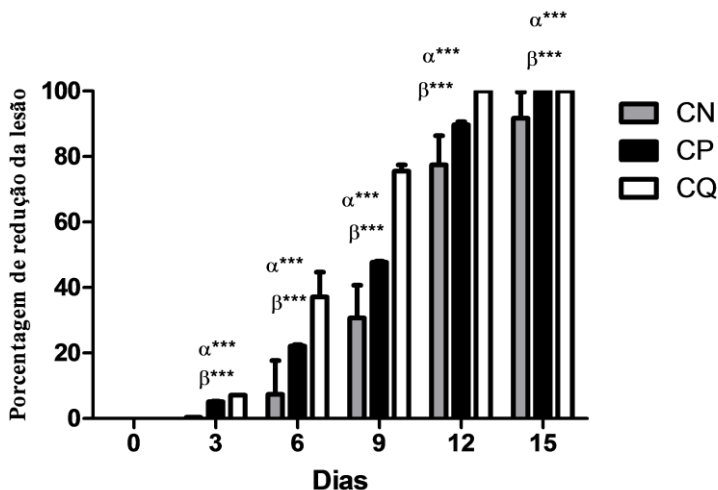
### 5.1 POTENCIAL CICATRIZANTE DO HIDROGEL DE QUITOSANA A 2%

#### 5.1.1 Morfometria da lesão

A porcentagem de redução ou contração da lesão foi determinada a partir das fotografias obtidas em intervalos de tempo de 3 dias até total cicatrização da lesão inicial. O tempo de cicatrização dos animais do controle positivo estendeu-se por um período de 15 dias. Portanto, esse foi o período de tempo máximo padronizado para determinar os parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante da alantoína no grupo de controle positivo (CP), e do hidrogel de quitosana a 2% no grupo experimental (CQ).

O grupo CQ causou uma importante contração da lesão, apresentando diferença estatística quando comparado ao grupo CN e, surpreendentemente, ao grupo CP, demonstrando um importante potencial cicatrizante do hidrogel (Figura 5). A contração da lesão efetuada pelo tratamento com CQ pôde ser melhor observada no 9º dia de tratamento, quando o grupo CQ apresentou um percentual de redução de 78%, enquanto os grupos CP e CN apresentaram uma redução de 45% e 30%, respectivamente. A figura 5 demonstra ainda, que o tratamento com CQ foi capaz de regenerar totalmente a lesão no 12º dia de tratamento, enquanto que o tratamento com alantoína conseguiu tal regeneração apenas no 15º dia de tratamento.

Em relação ao grupo CN (Figura 5), não foi possível observar a cicatrização total no período de tempo avaliado. Os resultados obtidos sugerem que o grupo CQ foi o tratamento mais resolutivo, evitando os riscos de infecção local pela exposição da lesão. Foi possível constatar que no 15º dia os grupos terapêuticos CP e CQ obtiveram a cicatrização total, possibilitando visualizar a interferência dos fármacos na proliferação celular e evidenciando uma regeneração mais acelerada (Figura 5).



**Figura 5- Morfometria da lesão. Porcentagem de redução da lesão de camundongos Balb/C observada a cada 3 dias, durante 15 dias de tratamento com hidrogel de quitosana a 2% (CQ) (20 mg/kg/dia), alantofina (CP)(50 mg/kg/dia) e controle negativo tratado com água destilada (CN). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão. (\*\*\*) denota diferença estatística significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ); onde  $\alpha$ : relação entre CQ e CN, e  $\beta$ : relação entre CQ e CP, para  $n = 6$ .**

### 5.1.2 Conteúdo de Hidroxiprolina

Na Figura 6, constata-se que o tratamento das lesões com o hidrogel de quitosana a 2 %, promoveu um aumento estatisticamente significativo do conteúdo de hidroxiprolina ao longo de todo o período experimental, quando comparado aos grupos CP e CN. Além disso, pode-se observar que o aumento do conteúdo de hidroxiprolina apresentado por CQ ocorreu de maneira progressiva, tendência também adotada pelos grupos CP e CN. Desta forma, os grupos CQ, CP e CN apresentaram respectivamente 191; 158 e 139 microgramas de tecido de hidroxiprolina no 15º dia de tratamento, quantidade esta que se refere ao valor máximo do conteúdo de hidroxiprolina produzida pelos referentes tratamentos.

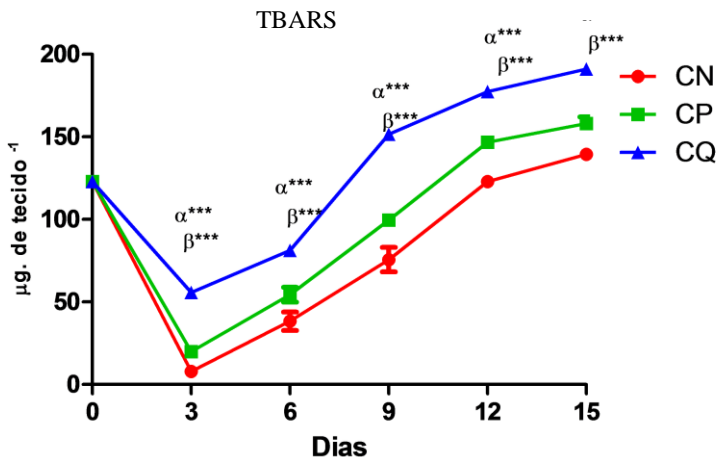


Figura 6- Conteúdo de hidroxiprolina ( $\mu\text{g}$  por grama de tecido) determinado na lesão de camundongos Balb/C observada a cada 3 dias, durante 15 dias de tratamento com hidrogel de quitosana a 2% (CQ)(20 mg/kg/dia), alantoína (CP)(50 mg/kg/dia) e controle negativo tratado com água destilada (CN). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão. (\*\*\*) denota diferença estatística significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ). Onde  $\alpha$ : relação entre CQ e CN, e  $\beta$ : relação entre CQ e CP, para  $n=6$ .

## 5.2 MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO NO PROCESSO CICATRICAL

### 5.2.1 Nível de peroxidação lipídica (TBARS)

A Figura 7 demonstra que o grupo tratado com quitosana apresentou um decréscimo significativo nas concentrações de lipoperóxidos quando comparado com o grupo CN, particularmente durante o processo cicatricial, onde tal tratamento foi capaz de induzir uma redução de 50% nos níveis de peroxidação lipídica. Cabe ressaltar ainda que os animais pertencentes ao grupo CN apresentaram os mais altos níveis de peroxidação lipídica durante o período avaliado, sobretudo no terceiro dia de tratamento, o qual é caracterizado pela ocorrência de processo inflamatório. Por fim, o tratamento realizado com alantoína mostrou níveis de peroxidação lipídica praticamente constantes ao longo do período avaliado.

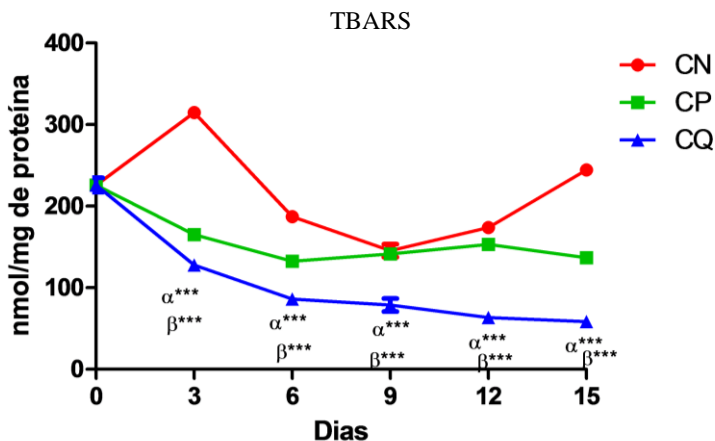
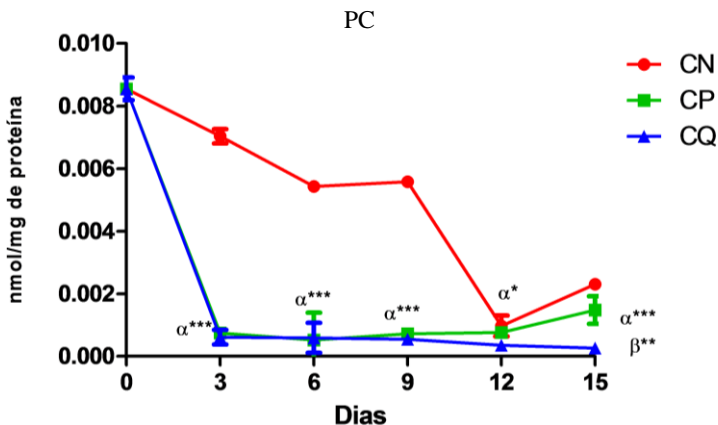


Figura 7- Nível de lipoperoxidação (nmol por mg proteína) determinado na lesão de camundongos Balb/c observada a cada 3 dias, durante 15 dias de tratamento com hidrogel de quitosana a 2% (CQ) (20 mg/kg/dia), alantoína (CP)(50 mg/kg/dia) e controle negativo tratados com água destilada (CN). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão. (\*\*\*) denota diferença estatística significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ). Onde  $\alpha$ : relação entre CQ e CN, e  $\beta$ : relação entre CQ e CP, para  $n = 6$ .

### 5.2.2 Dano oxidativo às proteínas (Carbonilação protéica)

O dano oxidativo às proteínas demonstrou-se elevado durante as fases inflamatória e proliferativa (particularmente até o nono dia) nos animais pertencentes ao grupo CN (Figura 8). Já na fase de remodelação tecidual (considerada aqui a partir do nono dia), houve um decréscimo significativo na carbonilação protéica. Comparando-se os grupos CQ e CN, observa-se que o grupo CQ apresentou um perfil inverso ao do grupo CN, uma vez que durante as fases cicatriciais denominadas como inflamatória e proliferativa, houve inibição de 98,9% e 98,1%, respectivamente, na carbonilação de proteínas. Cabe-se ressaltar que o perfil de carbonilação protéica apresentado pelo grupo CQ, apresentou-se bastante semelhante ao do grupo CP durante todo reparo tecidual. Ambos os tratamentos reduziram os níveis de oxidação protéica, normalizando a oxidação dessas proteínas em nível basal, o que promoveu a aceleração da cicatrização (Figura 8).



**Figura 8-** Conteúdo de carbonilação proteica (nmol por mg proteína) determinado na lesão de camundongos Balb/c observada a cada 3 dias, durante 15 dias de tratamento com hidrogel de quitosana a 2% (CQ) (20 mg/kg/dia), alantoína (CP)(50 mg/kg/dia) e controle negativo tratado com água destilada (CN). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão. (\*\*\*) (\*\* e \*) denotam diferença estatística significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Onde  $\alpha$ : relação entre CQ e CN, e  $\beta$ : relação entre CQ e CP, para  $n = 6$ .

### 5.3 DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS

#### 5.3.1 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase esteve elevada nos tratamentos realizados com água destilada e alantoína. Já o tratamento realizado com quitosana foi capaz de reduzir a atividade desta enzima durante todo período de cicatrização, chegando a promover uma redução da atividade enzimática em torno de 50% (Figura 9).

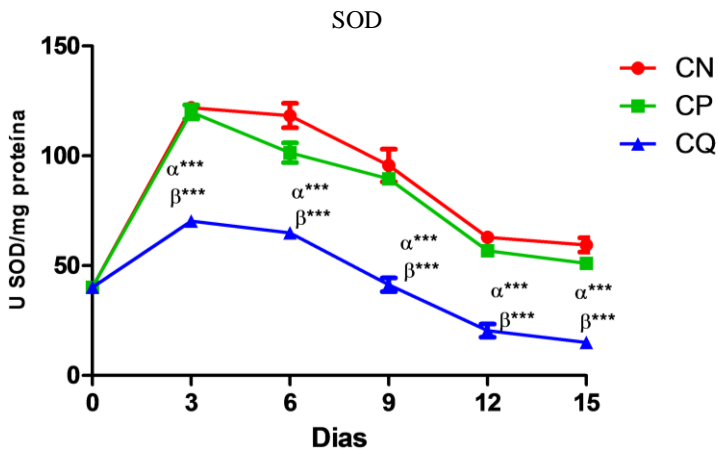


Figura 9- Atividade da superóxido dismutase (U SOD por mg de proteína) determinado na lesão de camundongos Balb/c observada a cada 3 dias, durante 15 dias de tratamento com hidrogel de quitosana a 2% (CQ) (20 mg/kg/dia), alantoína (CP)(50 mg/kg/dia) e controle negativo tratado com água destilada (CN). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão. (\*\*\*) denota diferença estatística significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ). Onde  $\alpha$ : relação entre CQ e CN, e  $\beta$ : relação entre CQ e CP, para  $n = 6$ .

### 5.3.2 Atividade da enzima catalase (CAT)

Analisando-se os resultados apresentados na Figura 10, pode-se observar uma elevada atividade da enzima nos grupo CN. Já os grupos tratados com hidrogel de quitosana a 2% e alantoína, promoveram uma redução na atividade enzimática ao longo de todo processo, especialmente no décimo segundo dia de tratamento, quando reduziam a atividade da catalase em torno de 79,1 e 56,3%, respectivamente em comparação ao CN. Por fim, cabe ressaltar que o tratamento com quitosana demonstrou-se mais eficaz neste parâmetro que o tratamento realizado com alantoína, uma vez que este tratamento foi capaz de reestabelecer os níveis basais da atividade desta enzima.

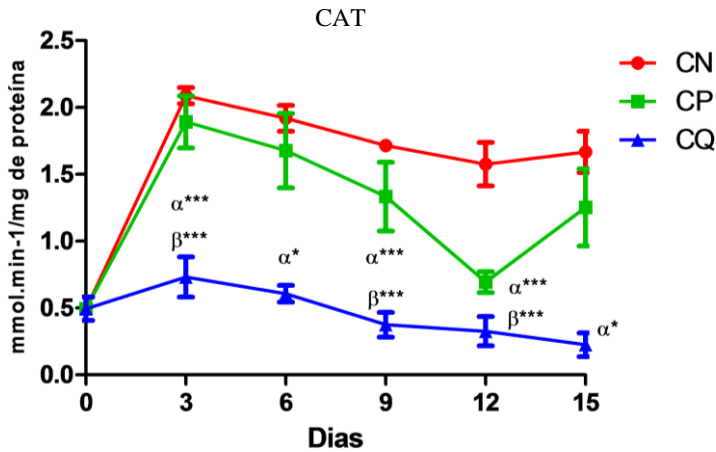


Figura 10- Atividade da catalase (mmol por min por mg de proteína) determinado na lesão de camundongos Balb/c observada a cada 3 dias, durante 15 dias de tratamento com hidrogel de quitosana a 2% (CQ) (20 mg/kg/dia), alantoína (CP)(50 mg/kg/dia) e controle negativo tratado com água destilada (CN). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão. (\*\*\*) e (\*) denotam diferença estatística significativa entre os grupos ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Onde  $\alpha$ : relação entre CQ e CN, e  $\beta$ : relação entre CQ e CP, para  $n = 6$ .

### 5.3.3 Atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx)

Observou-se uma elevada atividade da enzima glutatona peroxidase dos animais tratados com água destilada (CN), durante todas as fases do processo cicatricial (Figura 11). Já o tratamento realizado com hidrogel de quitosana a 2% reduziu a atividade desta enzima durante todo o processo em torno de 76,1% apresentando um perfil de redução semelhante ao apresentado pelo grupo CP e praticamente restabelecendo os níveis basais de atividade da GPx.



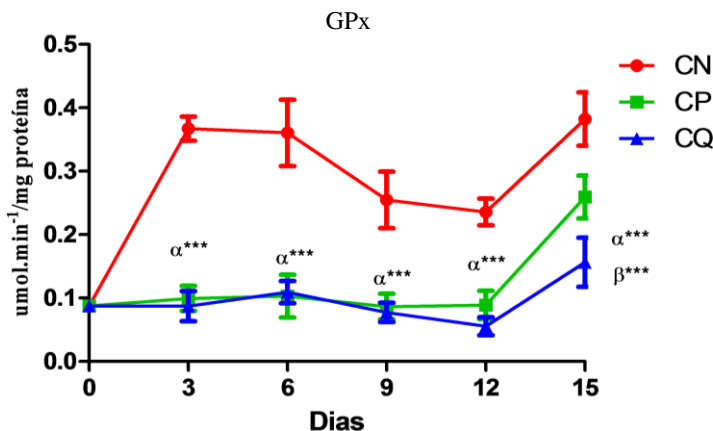


Figura 11- Atividade da glutatona peroxidase (mmol por min por mg de proteína) determinado na lesão de camundongos Balb/c observada a cada 3 dias, durante 15 dias de tratamento com hidrogel de quitosana a 2% (CQ) (20 mg/kg/dia), alantoína (CP)(50 mg/kg/dia) e controle negativo tratado com água destilada (CN). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão. (\*\*\*) denota diferença estatística significativa entre os grupos  $p < 0,001$ ; onde  $\alpha$ : relação entre CQ e CN, e  $\beta$ : relação entre CQ e CP, para  $n = 6$ .

## 5.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS

### 5.4.1 Conteúdo de glutatona reduzida (GSH)

Analisando a Figura 12, pode-se observar que os animais pertencentes ao grupo CN apresentaram uma concentração elevada de GSH nas três fases da cicatrização. Além disso, pode-se observar que o tratamento realizado com alantoína foi capaz de reduzir a concentração de GSH apenas a partir do nono dia de tratamento. Do mesmo modo, o tratamento realizado com hidrogel de quitosana foi capaz de promover uma redução significativa na concentração do tiol, principalmente a partir do nono dia de tratamento, onde se observou uma redução de 97,1%, normalizando os níveis basais desse tiol, durante todo o período cicatricial.

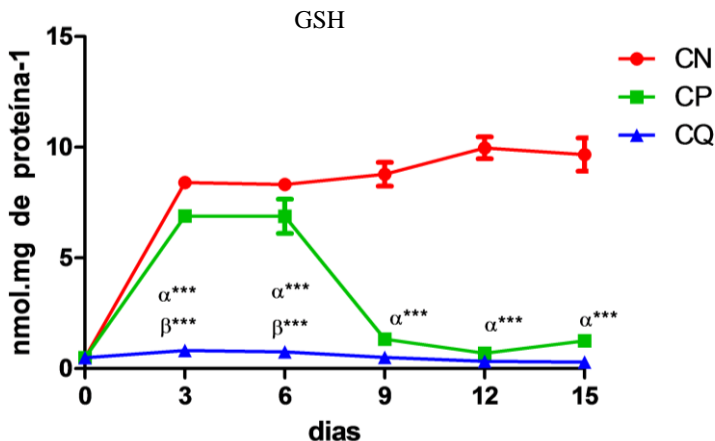


Figura 12- Conteúdo de glutatona reduzida (nmol por min por mg de proteína) determinado na lesão de camundongos Balb/c observada a cada 3 dias, durante 15 dias de tratamento com hidrogel de quitosana a 2% (CQ) (20 mg/kg/dia), alantoína (CP)(50 mg/kg/dia) e controle negativo tratado com água destilada (CN). Os resultados foram expressos como Média  $\pm$  Desvio Padrão. (\*\*\*) denota diferença estatística significativa entre os grupos ( $p < 0,001$ ). Onde  $\alpha$ : relação entre CQ e CN, e  $\beta$ : relação entre CQ e CP, para  $n = 6$ .

## 5.5 ESTUDOS HISTOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICO DA LESÃO

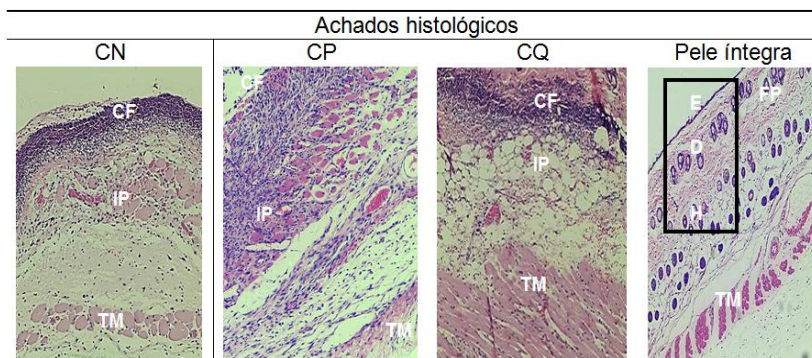
### 5.5.1 Avaliação qualitativa através das colorações Hematoxilina-Eosina e Picro-sirius

Na Figura 13, os achados histológicos referentes aos grupos experimentais (CN, CP, CQ) no terceiro dia de tratamento de lesões cutâneas efetuadas são correspondentes à fase inflamatória tecidual do processo de cicatrização.

No grupo CN no terceiro dia, com ausência de epiderme, derme e hipoderme, que foram removidas no modelo de excisão cutânea, visualiza-se a área lesionada recoberta por crosta fibrino-leucocitária (CF), apresentando um moderado infiltrado inflamatório polimorfonuclear (PMN's) (IP) e ausência de tecido de granulação.

Nos grupos CP e CQ, para o terceiro dia, se observa também a ausência de epiderme, derme e hipoderme, sendo a área lesionada recoberta por crosta fibrino-leucocitária (CF) e apresentando um

acentuado infiltrado inflamatório (IP), com ausência de tecido de granulação.



**Figura 13- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos da linhagem Balb/c corados em hematoxilina-eosina (H&E), fotomicrografia em aumento de 100x. Resultados para o terceiro dia de cicatrização dos grupos CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo) e CQ (Controle Quitosana) e para a pele íntegra.**

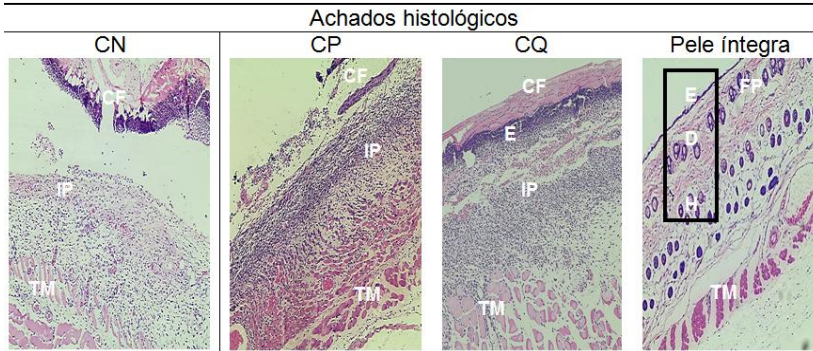
Legenda: CF (crosta fibrino-leucocitária), E (Epiderme), D (Derme), FP (Folículos pilosos), H (Hipoderme), IP (infiltrado de polimorfonucleares), TM (Tecido Muscular). A área delimitada pelo retângulo foi removida nos animais (CN, CP e CQ) durante o procedimento cirúrgico.

Na Figura 14 os achados histológicos referentes aos grupos experimentais (CN, CP, CQ) no sexto dia de tratamento de lesões cutâneas efetuadas são correspondentes a fase inflamatória tecidual do processo de cicatrização

No grupo CN no sexto dia, visualiza-se a presença de moderada crosta fibrino-leucocitária (CF), moderado infiltrado de leucócitos polimorfonucleares (PMN's) (IP), moderada quantidade de tecido de granulação, moderado número de vasos sanguíneos e com discreta reepitelização.

No grupo CP observa-se a presença de acentuada crosta fibrino-leucocitária (CF), moderado infiltrado de leucócitos (PMN's) (IP), moderada quantidade de tecido de granulação, discreto número de vasos sanguíneos e com discreta reepitelização.

No grupo CQ visualiza-se presença de moderada crosta fibrino-leucocitária (CF), moderado infiltrado de leucócitos (PMN's) (IP), discreta quantidade de tecido de granulação, moderado número de vasos sanguíneos e moderada reepitelização.



**Figura 14-** Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos da linhagem Balb/c corados em hematoxilina-eosina (H&E), fotomicrografia em aumento de 100x. Resultados para o sexto dia de cicatrização dos grupos CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo) e CQ (Controle Quitosana) e para a pele íntegra.

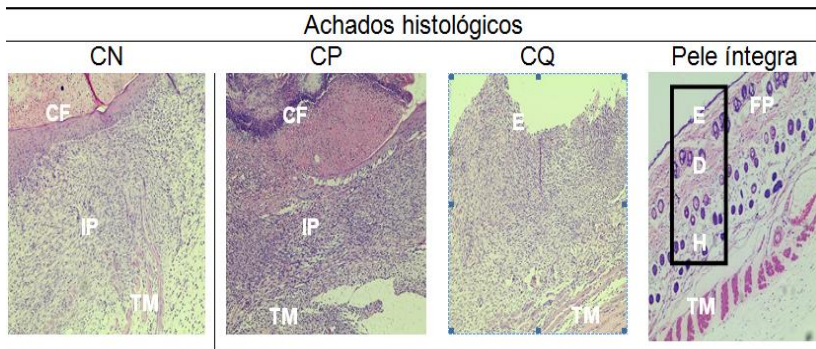
Legenda: CF (crosta fibrino-leucocitária), E (Epiderme), D (Derme), FP (Folículos pilosos), H (Hipoderme), IP (infiltrado de polimorfonucleares), TM (Tecido Muscular). A área delimitada pelo retângulo foi removida nos animais (CN, CP e CQ) durante o procedimento cirúrgico.

Na Figura 15 os achados histológicos referentes aos grupos experimentais (CN, CP, CQ) no nono dia de tratamento de lesões cutâneas efetuadas são correspondentes à fase proliferativa tecidual do processo de cicatrização.

No grupo CN observa-se a presença de discreta crosta fibrino-leucocitária (CF), discreto infiltrado de leucócitos polimorfonucleares (PMN's) (IP), acentuada quantidade de tecido de granulação, discreto número de vasos sanguíneos e acentuada reepitelização.

No grupo CP visualiza-se acentuada crosta fibrino-leucocitária (CF), discreto infiltrado de leucócitos polimorfonucleares (PMN's) (IP), moderada quantidade de tecido de granulação, moderado número de vasos sanguíneos e com discreta reepitelização.

No grupo CQ apresenta presença de discreta crosta fibrino-leucocitária (CF), moderado infiltrado de leucócitos (PMN's) (IP), acentuada quantidade de tecido de granulação, moderado número de vasos sanguíneos e reepitelização ausente.



**Figura 15- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos da linhagem Balb/c corados em hematoxilina-eosina (H&E), fotomicrografia em aumento de 100x. Resultados para o nono dia de cicatrização dos grupos CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo) e CQ (Controle Quitosana) e para a pele íntegra.**

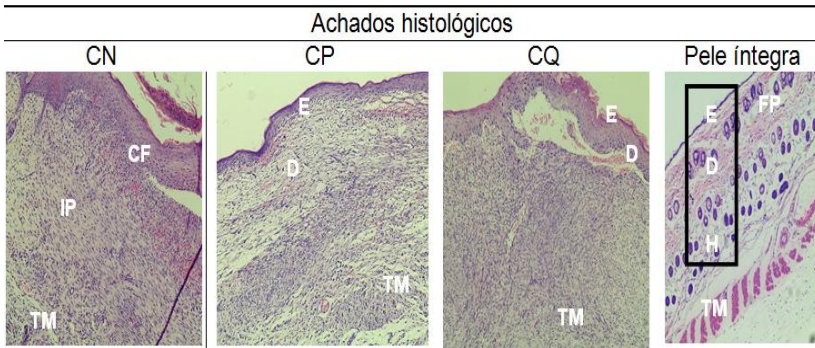
Legenda: CF (crosta fibrino-leucocitária), E (Epiderme), D (Derme), FP (Folículos pilosos), H (Hipoderme), IP (infiltrado de polimorfonucleares), TM (Tecido Muscular). A área delimitada pelo retângulo foi removida nos animais (CN, CP e CQ) durante o procedimento cirúrgico.

Na Figura 16 os achados histológicos referentes aos grupos experimentais (CN, CP, CQ) no décimo segundo dia de tratamento de lesões cutâneas efetuadas são correspondentes à fase proliferativa tecidual do processo de cicatrização.

No grupo CN visualiza-se presença de discreta crosta fibrino-leucocitária (CF), discreto infiltrado de leucócitos polimorfonucleares (PMN's) (IP), moderada quantidade de tecido de granulação, discreto número de vasos sanguíneos e acentuada reepitelização.

No grupo CP observa-se ausência de crosta fibrino-leucocitária (CF) e infiltrado de leucócitos polimorfonucleares (PMN's) (IP), moderada quantidade de tecido de granulação, moderada quantidade de colágeno, moderado número de vasos sanguíneos e acentuada reepitelização.

No grupo CQ observa-se ausência de crosta fibrino-leucocitária (CF) e discreto infiltrado leucócitos polimorfonucleares (PMN's) (IP), acentuada quantidade de tecido de granulação, discreto número de vasos sanguíneos e acentuada reepitelização.



**Figura 16-** Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos da linhagem Balb/c corados em hematoxilina-eosina (H&E), fotomicrografia em aumento de 100x. Resultados para o décimo segundo dia de cicatrização dos grupos CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo) e CQ (Controle Quitosana) e para a pele íntegra.

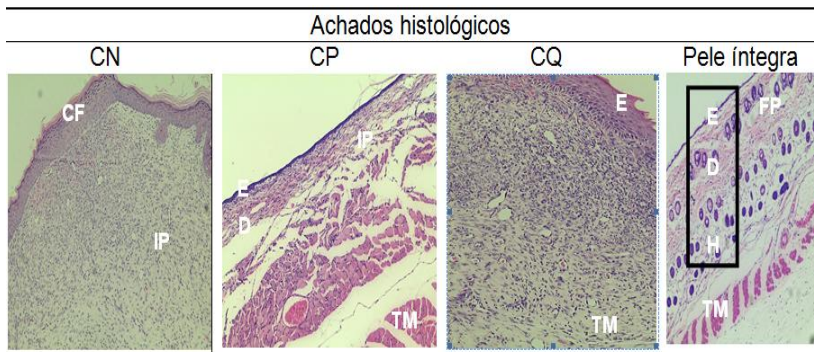
Legenda: CF (crosta fibrino-leucocitária), E (Epiderme), D (Derme), FP (Folículos pilosos), H (Hipoderme), IP (infiltrado de polimorfonucleares), TM (Tecido Muscular). A área delimitada pelo retângulo foi removida nos animais (CN, CP e CQ) durante o procedimento cirúrgico.

Na Figura 17 os achados histológicos referentes aos grupos experimentais (CN, CP, CQ) no décimo quinto dia de tratamento de lesões cutâneas efetuadas são correspondentes a fase de remodelação tecidual do processo de cicatrização

No grupo CN visualiza-se presença de acentuada crosta fibrino-leucocitária (CF), moderado infiltrado de leucócitos polimorfonucleares (PMN's) (IP), discreta quantidade de tecido de granulação, moderado número de vasos sanguíneos e moderada reepitelização.

No grupo CP observa-se ausência de crosta fibrino-leucocitária (CF) e infiltrado de leucócitos polimorfonucleares (PMN's) (IP), moderada quantidade de tecido de granulação, moderado número de vasos sanguíneos e acentuada reepitelização.

No grupo CQ observa-se ausência de crosta fibrino-leucocitária e discreto infiltrado leucócitos polimorfonucleares (PMN), moderada quantidade de tecido de granulação, colágeno em moderada quantidade, discreto número de vasos sanguíneos e acentuada reepitelização.



**Figura 17- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos da linhagem Balb/c corados em hematoxilina-eosina (H&E), fotomicrografia em aumento de 100x. Resultados para o décimo quinto dia de cicatrização dos grupos CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo) e CQ (Controle Quitosana) e para a pele íntegra.**

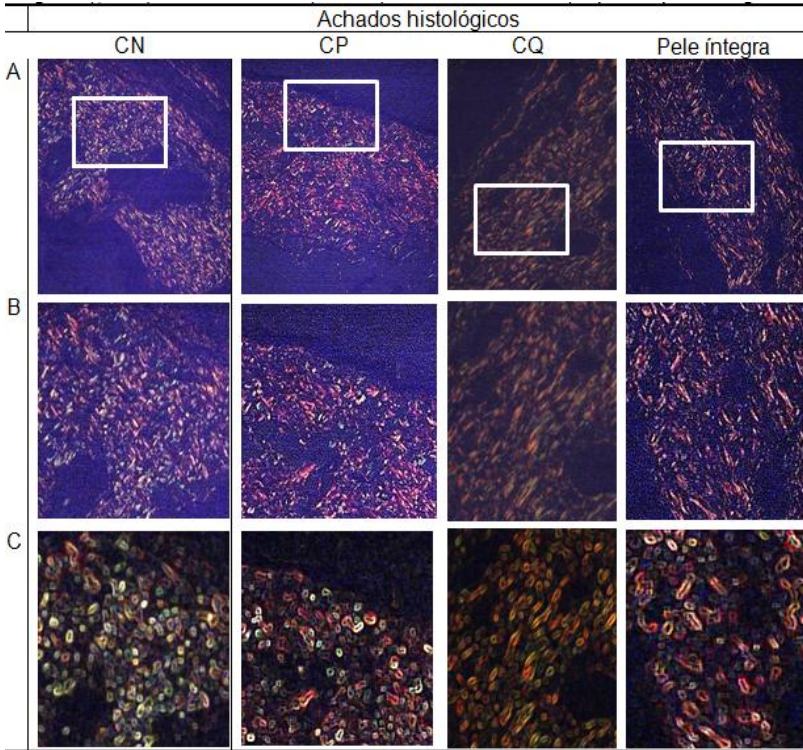
Legenda: CF (crosta fibrino-leucocitária), E (Epiderme), D (Derme), FP (Folículos pilosos), H (Hipoderme), IP (infiltrado de polimorfonucleares), TM (Tecido muscular). A área delimitada pelo retângulo foi removida nos animais (CN, CP e CQ) durante o procedimento cirúrgico.

### **5.5.2 Avaliação qualitativa de colagenização através da coloração Picro-sirius**

Na Figura 18 são apresentados os achados histológicos referentes aos grupos experimentais (CN, CP, CQ) para o nono dia de tratamento de lesões cutâneas efetuadas e são correspondentes à fase de proliferação tecidual do processo de cicatrização, para avaliação da colagenização.

No grupo CN visualiza-se a presença mais frequente de fibras do Tipo III imaturo (coradas em verde) e nos grupos CP e CN observam-se fibras de Colágeno Tipo I maduro coradas em tonalidades de vermelho a amarelo e poucas fibras do Tipo III coradas de verde (Figura 18).

Para a pele íntegra observa-se a predominância de fibras de Colágeno Tipo I maduro, coradas em tonalidades de vermelho a amarelo (Figura 18).



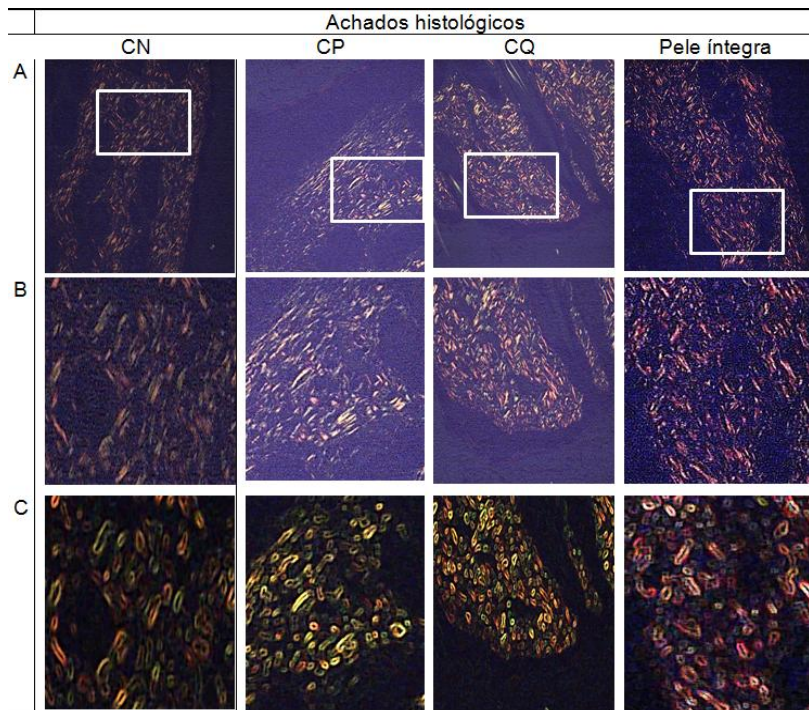
**Figura 18-** Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos da linhagem Balb-c corados em Picro-sirius red, fotomicrografia em aumento de 200x. Resultados para o nono dia de cicatrização dos grupos CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo) e CQ (Controle Quitosana) e para a pele íntegra.

Legenda: Fibras de Colágeno Tipo I maduro (coradas em tonalidades de vermelho a amarelo); Fibras de Colágeno Tipo III imaturo (coradas em verde). (A) Imagens obtidas com nitidez em 50 %, brilho (+0%) e contraste (+0%) através do software Microsoft Word 2010; (B) A área delimitada com um quadrado branco foi ampliada; e (C) Imagem foi novamente tratada empregando o recurso extremidades brilhantes do mesmo software.

Na figura 19 os achados histológicos referentes aos grupos experimentais (CN, CP, CQ) para o décimo segundo dia de tratamento de lesões cutâneas efetuadas são correspondentes à fase de proliferação tecidual do processo de cicatrização, para avaliação da colagenização.



No grupo CN visualiza-se a presença de fibras do Tipo III imaturo (coradas em verde) com maior intensidade, nos grupos CP e CQ observa-se a presença de fibras tipo III e maior quantidade de fibras do Tipo I coradas em tonalidades de vermelho a amarelo (Figura 19).



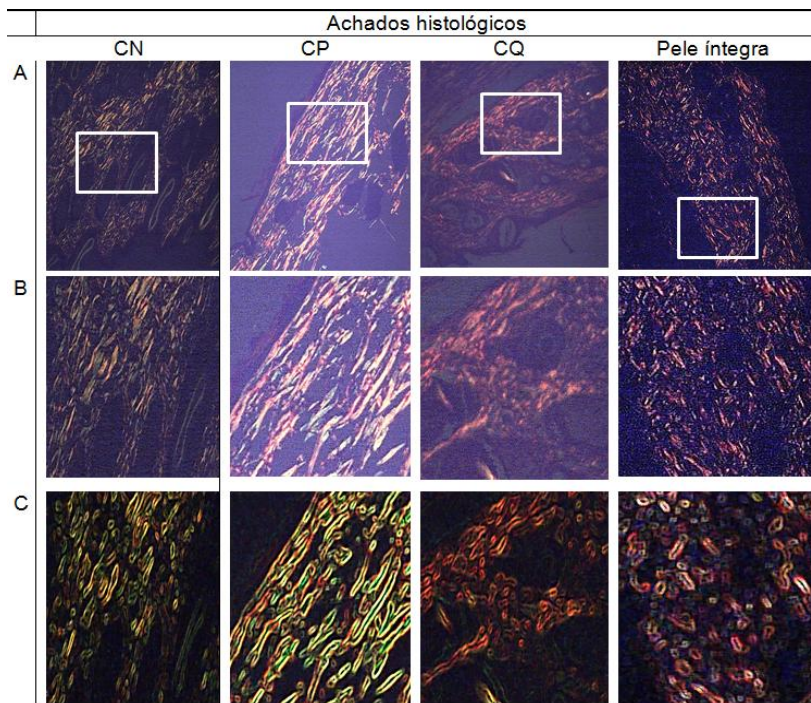
**Figura 19- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos da linhagem Balb-c corados em Picro-sirius red, fotomicrografia em aumento de 200x. Resultados para o décimo segundo dia de cicatrização dos grupos CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo) e CQ (Controle Quitosana) e para a pele íntegra.**

Legenda: Fibras de Colágeno Tipo I maduro (coradas em tonalidades de vermelho a amarelo); Fibras de Colágeno Tipo III imaturo (coradas em verde). (A) Imagens obtidas com nitidez em 50 %, brilho (+0%) e contraste (+0%) através do software Microsoft Word 2010; (B) A área delimitada com um quadrado branco foi ampliada; e (C) Imagem foi novamente tratada empregando o recurso extremidades brilhantes do mesmo software.

Na figura 20 os achados histológicos referentes aos grupos experimentais (CN, CP, CQ) para o décimo quinto dia de tratamento de lesões cutâneas efetuadas são correspondentes a fase de remodelação tecidual do processo de cicatrização, para avaliação da colagenização.

No grupo CN visualiza-se a presença de fibras do Tipo III imaturo (coradas em verde) com maior intensidade e nos grupos CP e CN contendo fibras de Colágeno Tipo I maduro coradas em tonalidades de vermelho a amarelo (Figura 20).

No grupo CN visualiza-se a presença de fibras do Tipo III imaturo (coradas em verde) com maior intensidade, no grupo CP observa-se a presença de fibras tipo III e do Tipo I coradas em tonalidades de vermelho a amarelo e no grupo CQ observa-se a predominância de fibras de Colágeno Tipo I maduro coradas em vermelho (Figura 20).



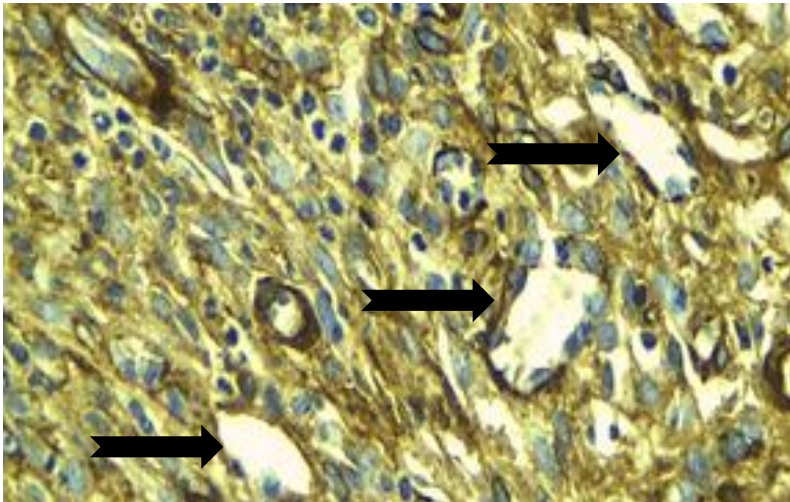
**Figura 20- Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos da linhagem Balb-c corados em Picro-sirius red, fotomicrografia em aumento de 200x. Resultados para o décimo quinto dia de cicatrização dos grupos CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo) e CQ (Controle Quitosana) e para a pele íntegra.**

Legenda: Fibras de Colágeno Tipo I maduro (coradas em tonalidades de vermelho a amarelo); Fibras de Colágeno Tipo III imaturo (coradas em verde). (A) Imagens obtidas com nitidez em 50 %, brilho (+0%) e contraste (+0%) através do software Microsoft Word 2010; (B) A área delimitada com um quadrado branco foi ampliada; e (C) Imagem foi novamente tratada empregando o recurso extremidades brilhantes do mesmo software.

### **5.5.3 Avaliação imuno-histoquímica com o anticorpo monoclonal anti-alfa-actina miosina muscular lisa**

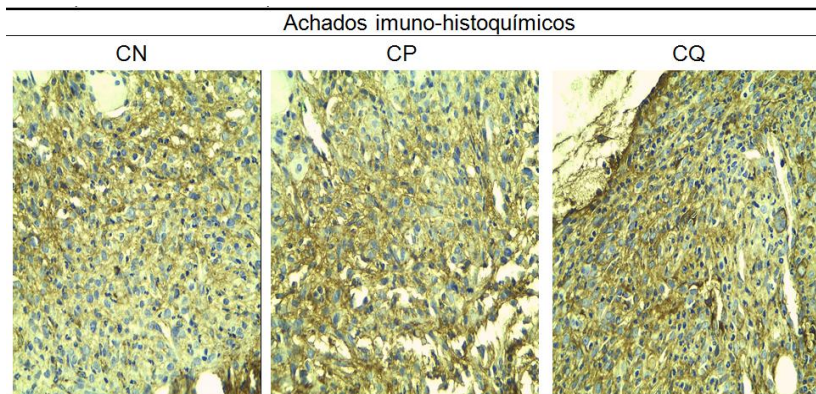
Os miofibroblastos corados de marrom (Figura 21) aparecem nos achados histológicos do sexto e nono dias de cicatrização (Figuras 22 e 23, respectivamente), de todos os grupos experimentais.

Para o grupo CQ no sexto dia observa-se uma discreta quantidade de tecido de granulação e moderado número de vasos sanguíneos recém-formados (Figura 22) enquanto que no nono dia de cicatrização observa-se acentuada quantidade de tecido de granulação e moderado número de vasos recém-formados (Figuras 21 e 23).



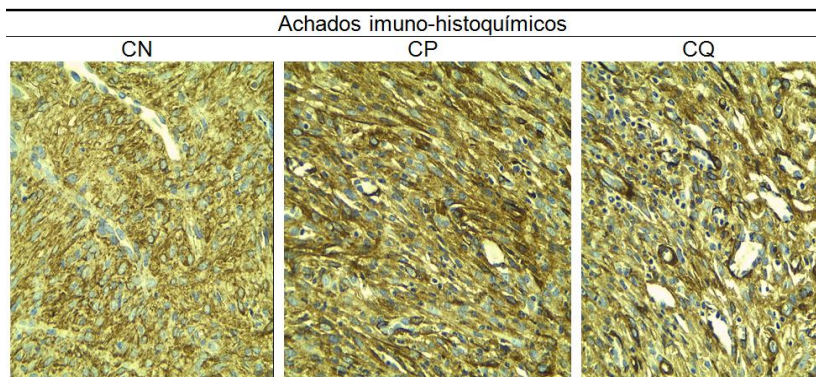
**Figura 21-** Imagem do grupo CQ para o nono dia de cicatrização. Em evidência os miofibroblastos, corados de marrom pela técnica avidina-estreptavidina peroxidase- diaminobenzidina. Os miofibroblastos apresentam formato poligonal, com projeções citoplasmáticas e núcleos vesiculosos. As setas apontam vasos sanguíneos recém-formados, onde se podem ver as células musculares lisas que formam a parede do mesmo. Ampliação original 400 vezes.

Na figura 22, contendo os achados histológicos referentes aos grupos experimentais (CN, CP, CQ) para o sexto dia de cicatrização, podem ser observados, no tecido de granulação, inúmeros miofibroblastos corados pela coloração imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti- $\alpha$ -actina muscular lisa. Estes achados permitem confirmar a ocorrência de moderada angiogênese e de moderada fibroplastia no grupo CN e nos grupos CP e CQ moderada angiogênese e acentuada fibroplastia, com maior quantidade de tecido de granulação, confirmados da ocorrência dos miofibroblastos acumulados nas proximidades dos novos vasos sanguíneos, corados positivamente pelo anticorpo monoclonal anti- $\alpha$ -actina muscular lisa.



**Figura 22-** Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos da linhagem Balb-c pela coloração imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-alfa-actina muscular lisa, fotomicrografia em aumento de 400x. Resultados para o sexto dia de cicatrização dos grupos CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo) e CQ (Controle Quitosana).

Legenda: Miofibroblastos corados em marrom pela técnica avidina-estreptavidina peroxidase- diaminobenzidina.



**Figura 23-** Comparação entre os achados histológicos da pele de camundongos da linhagem Balb-c pela coloração imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-alfa-actina muscular lisa, fotomicrografia em aumento de 400x. Resultados para o nono dia de cicatrização dos grupos CN (Controle Negativo), CP (Controle Positivo), CQ (Controle Quitosana)

## 6 DISCUSSÃO

---

O tratamento farmacológico de lesões cutâneas em membros inferiores sido estudado com objetivo de reduzir o tempo de cicatrização e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos. Geralmente estas lesões podem causar o afastamento da atividade laboral e perda da mobilidade, ainda, em casos extremos levar a amputação (SECO; PUIG, 2004). O tratamento medicamentoso consiste na utilização de fármacos incorporados nas formulações de géis, filmes e placas. Estes produtos são, em sua maioria, importados pela indústria farmacêutica a custos elevados, o que torna difícil o acesso para população de baixa renda.

No ano 2006, somente neste seguimento, foram gastos ao nível mundial em torno de U\$ 25,000 de dólares e, a cada ano, a previsão é de aumento progressivo dos gastos (PAUL; SHARMA 2004; SECO; PUIG, 2004). Neste sentido, a busca por novos tratamentos com bases farmacológicas, que sejam acessíveis a população, e o desenvolvimento de pesquisas com fármacos que acelerem o processo cicatricial tem sido alvo de pesquisadores no mundo inteiro.

No presente estudo foi avaliado a nível macroscópico, bioquímico, histológico e imuno-histoquímico o processo de reparação tecidual de lesões cutâneas agudas, experimentalmente induzidas em camundongos isogênicos Balb/c, tratados com hidrogel de quitosana 2%, bem como o envolvimento do potencial antioxidante deste polímero no processo de reparação tecidual.

Os hidrogéis à base de polímeros hidrofílicos como a quitosana podem absorver parcialmente líquidos como água e linfa, sendo em geral biocompatíveis e promovem a adesão celular (CHIUMIENTO et al., 2006). Esta característica possivelmente acelera a cicatrização de lesões agudas, devido à manutenção da umidade do leito da ferida melhorando a sinalização intracelular.

Os dados obtidos com o presente estudo demonstraram (Figura 5) que durante todo o período de tratamento os grupos de animais tratados tanto com a alantóina quanto hidrogel de quitosana a 2% apresentaram uma redução maior no tempo de cicatrização que os animais do grupo controle. Além disto, é importante notar que o tratamento com o hidrogel foi mais eficiente na aceleração do processo de reparação tecidual, uma vez que a cicatrização total das lesões ocorreu no 12<sup>o</sup> dia

enquanto com a alantoína isto somente ocorreu no 15º dia, e para o grupo não tratado não houve cicatrização total até o final do período de estudo.

Ueno e colaboradores, em 1999, testaram em cães um tecido à base de algodão e quitosana com o objetivo de avaliar a eficácia da quitosana como acelerador da cicatrização de feridas. No 3º dia as feridas tratadas com quitosana apresentaram acentuada infiltração de células polimorfonucleares (PMN's), maior granulação entre o 9º e o 15º dia pós-lesão, e maior produção de colágeno do tipo III quando comparadas as lesões controles.

Kojima e colaboradores (2004) utilizaram um compósito de poliéster embebido em quitosana. Estes autores observaram que, após este compósito ter sido aplicado em lesões cutâneas agudas em cães, no período de 9 a 15 dias de pós-operatório ocorreu um aumento na síntese de colágeno III nas lesões tratadas com quitosana. Tendo sido a quitosana, que possui propriedade imunomoduladora, que seria associada à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente os macrófagos.

Os macrófagos, ativados pela quitina e quitosana de baixo peso molecular, liberam IL-1 que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Estas células liberam, também, *N*-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana formando monômeros de *N*-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias a biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos (MUZZARELLI, 1997).

Quanto aos resultados referentes ao grupo CP, Araújo e colaboradores (2010), demonstraram que a alantoína 5% incorporada a uma emulsão óleo/água foi eficaz no tratamento de lesões cutâneas em ratos wistar, ocorrendo cicatrização em 14 dias.

Exceção dos primatas, a alantoína é o produto final do metabolismo das purinas em vários organismos, inclusive em camundongos (KEGG PATHWAY DATA BASE, 2011). A forma sintética deste composto tem sido utilizada clinicamente em função de suas atividades promotora da proliferação celular e cicatrizante (PEREIRA, 2003). Em função destas características este composto foi utilizado como controle positivo, na presente pesquisa.

Um importante marcador bioquímico de cicatrização, a hidroxiprolina é um aminoácido essencial para a síntese das fibras de colágeno, as quais são produzidas, principalmente, em processos cicatriciais. Por essa razão, o conteúdo de hidroxiprolina é utilizado normalmente como um indicador indireto para determinar o teor de

colágeno (REDDY; ENWEMEKA, 1996). Uma concentração elevada de hidroxiprolina indica que a síntese de colágeno é abundante e que o reparo da lesão ocorreu de maneira mais rápida (NAYAK; UDUPA; UDUPA, 1999).

O tratamento das lesões com o hidrogel de quitosana a 2% promoveu um aumento estatisticamente significativo do conteúdo de hidroxiprolina, portanto maior síntese de colágeno, ao longo de todo o período experimental (Figura 6), quando comparado aos grupos tratados com alantoína (CP) e tratado com água destilada (CN). Da mesma forma, estudos realizados por Muzzarelli, (1997) comprovaram uma acentuada produção de colágeno quando a lesão é tratada com quitosana.

Estudo realizado por Ueno e colaboradores (2001b), sobre a ação da quitosana em cultura de fibroblastos, demonstraram uma maior produção de matriz extracelular, de colágeno tipo I e III, e fatores de crescimento.

Pode-se observar, no presente trabalho, que o aumento do conteúdo de hidroxiprolina apresentado pelo grupo tratado com o hidrogel de quitosana a 2% ocorreu de maneira progressiva, tendência também adotada pelos grupos tratados com alantoína e tratados com água destilada. De acordo com Araújo e colaboradores (2010), o mecanismo de ação cicatrizante induzido pela alantoína ocorre via regulação da resposta inflamatória e estímulo à proliferação de fibroblastos e produção da matriz extracelular.

A peroxidação lipídica desencadeia alterações estruturais na permeabilidade de membranas celulares, levando à perda da seletividade na troca iônica e liberação de enzimas hidrolíticas dos lisossomas e à formação de produtos citotóxicos como malonaldeído, culminado com a morte celular. Por outro lado, a formação de EROS e os processos de lipoperoxidação nem sempre são prejudiciais, pois seus produtos fazem parte da formação de prostaglandinas na resposta inflamatória, contudo o excesso desses produtos pode ser letal, causando danos celulares irreversíveis (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Como é possível observar na Figura 7, o grupo tratado com hidrogel de quitosana a 2% apresentou um decréscimo significativo nas concentrações de lipoperoxídidos quando comparado com o grupo controle negativo, particularmente durante o processo cicatricial, onde tal tratamento foi capaz de induzir uma redução de 50% nos níveis de peroxidação lipídica, sugerindo que a ação de fármacos sobre o controle lipoperoxidação pode reduzir o tempo de lesão pela atenuação do dano celular. O aumento dos níveis de TBARS foi observado em lesões



cutâneas agudas produzidas experimentalmente em ratos diabéticos (RASIK; SHUKLA, 2000) sugerindo que neste momento existe uma intensa produção de EROS. Isto não ocorreu nos grupos tratados com hidrogel de quitosana a 2% ou alantofina, que mantiveram níveis basais de liperoxidação e, provavelmente, modularam as concentrações de EROS e, assim, reduziram o dano oxidativo ao tecido.

Os estudos de Xie e colaboradores (1998) e Xue e colaboradores (2001) mostraram que a quitosana atua no sequestro de radical hidroxila, inibindo a liperoxidação em lipossomas de fosfatidilcolina e linoato.

Os níveis de liperoxidação semelhantes nos grupos CN e CP no nono dia poderiam estar relacionados à resolução incompleta da fase inflamatória, e intenso processo fagocitário, enquanto que o processo inflamatório já haveria cessado no grupo de animais tratados com quitosana e a lesão nestes animais estaria na fase proliferativa intensa.

Cabe ressaltar ainda que os animais pertencentes ao grupo CN apresentaram os mais altos níveis de peroxidação lipídica durante o período avaliado, sobretudo no terceiro dia de tratamento, o qual é caracterizado pela ocorrência de processo inflamatório.

Estudos comprovam que a quitosana estimula as células do sistema imunológico e reduz a geração de EROS, devido à atenuação do *burst* respiratório durante o processo inflamatório. O tratamento com hidrogel de quitosana reduziu o tempo da fase inflamatória além de promover a diminuição nos níveis de liperoxidação associados ao estresse oxidativo.

Como pode-se observar na Figura 8, o dano oxidativo às proteínas mostrou-se elevado durante as fases inflamatória e proliferativa (particularmente até o nono dia) nos animais pertencentes ao grupo de animais tratados com água destilada (CN).

Anraku e colaboradores (2008) mostraram que a quitosana de baixo peso molecular no plasma sanguíneo impede a formação de grupos carbonil protéico, agindo como agente antioxidante (*scavenger*) sobre peróxido de hidrogênio.

O  $H_2O_2$  tem um papel regulador no controle tanto pró-inflamatório, eliminando patógenos, como antiinflamatório, evitando uma resposta inflamatória exacerbada (OLIVEIRA-MARQUES et al., 2007); age na migração celular; modula a expressão das moléculas de adesão dos leucócitos (FRATICELLI et al., 1996); regula a função dos monócitos e sua adesão na matriz extracelular, induz a quimiotaxia (KLYUBIN et al., 1996), além de agir sobre a expressão de citocinas que dão suporte vital aos monócitos e macrófagos no local da ferida (HONG et al., 1997).

Já na fase de remodelação tecidual (considerada aqui a partir do nono dia), houve um decréscimo significativo na carbonilação protéica. Comparando-se os grupos tratados com hidrogel de quitosana a 2 % e grupo não tratado, observa-se que o grupo tratado apresentou um perfil inverso ao do grupo não tratado, uma vez que durante a fase cicatricial inflamatória e a proliferativa, houve redução, respectivamente, de 98,9%, 98,1% e 56,4% na concentração de proteínas oxidadas. Ambos os tratamentos diminuíram os níveis de oxidação protéica, normalizando a concentração dessas proteínas a nível basal, o que provavelmente promoveu a aceleração da cicatrização.

É importante ressaltar também que os dados obtidos com a carbonilação protéica corroboram aqueles obtidos com a lipoperoxidação, uma vez que em ambos os casos os tratamentos com o hidrogel de quitosana a 2% e com alantoína diminuíram o dano oxidativo às biomoléculas.

Diversos processos patológicos e fisiológicos apresentam reações oxidativas catalisadas por metais que agem nas modificações covalentes de proteínas. Uma característica desta modificação oxidativa é a introdução de grupos carbonil em resíduos de aminoácidos de proteínas. A reação destes grupos com reagentes carbonil-específicos fornece um método de detecção e quantificação da oxidação de proteínas catalisadas por metais (REZNICK; PACKER, 1994). Assim, a presença de níveis elevados de proteínas oxidadas no leito da lesão em relação à pele normal, caracterizadas pela presença de grupos carbonil, indica um estado de estresse oxidativo ou dano celular importante. Além disto, o nível elevado de proteínas oxidadas correlaciona-se diretamente com processos inflamatórios e com a diminuição da taxa de cicatrização da lesão (KUMIN et al., 2007).

Em geral, o ânion superóxido produzido pelas células é rapidamente dismutado em peróxido de hidrogênio e água (DARR; FRIDOVICH, 1994; MOSELEY et al., 2004; CHIUMENTO et al., 2006). A produção dessa espécie reativa é observada em tecidos inflamados mediada por células inflamatórias, em especial neutrófilos e macrófagos, via complexo enzimático da NADPH (SCHÄFER; WERNER, 2008).

A atividade da enzima superóxido dismutase (Figura 9) se manteve elevada nos tratamentos realizados com água destilada e alantoína. Já o tratamento realizado com hidrogel de quitosana a 2% foi capaz de reduzir a atividade desta enzima durante todo período de cicatrização, em torno de 50%. O perfil observado sugere que as lesões tratadas com alantoína e água destilada prolongaram o período

inflamatório, enquanto que o hidrogel de quitosana a 2% teve acelerada a infiltração de células do sistema imune, conseqüentemente, acelerou a limpeza da ferida, conduzindo mais rapidamente para o próximo estágio que seria a fibroplastia (UENO et al., 1999). É importante notar que os neutrófilos também têm ação vital na cicatrização por atuarem limpando a ferida (WAHL; WAHL; MCCARTHY, 1978).

Células como fibroblastos estimulam a produção de citocinas inflamatórias que dão origem ao ânion superóxido com objetivo de sinalizar para células do sistema imunológico a necessidade da limpeza de resíduos e a invasão bacteriana na lesão (KELLER et al., 2006). É importante observar que no presente trabalho, o aumento da atividade da enzima SOD ocorreu em todos os grupos experimentais do primeiro ao sexto dia.

De maneira similar os estudos de Steiling e colaboradores (1999), em lesões de camundongos Balb/c, verificaram uma maior atividade da SOD relacionando essa alteração ao “*burst* respiratório” (YASUFUKU et al., 2010). Segundo Valko et al. (2007), o aumento da atividade desta enzima provoca uma diminuição na concentração de ânion superóxido nas células, o que reduz a estimulação da proliferação celular através dos mecanismos de sinalização mediados por EROs. A partir desses estudos, explica-se a normalização dos níveis basais da enzima SOD nos grupos tratados com quitosana.

O peróxido de hidrogênio gerado pela atividade da SOD sobre o aniôn superóxido, apesar de não ser um radical livre, e em presença de metais de transição, produz o radical hidroxil pela reação de Fenton, causando dano oxidativo ao DNA, proteínas e lipídeos. Por esta razão, o peróxido de hidrogênio deve ser mantido em níveis fisiológicos, aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  (KELLER et al., 2006). Analisando-se os resultados apresentados na Figura 10, pode-se observar uma elevada atividade da catalase no grupo de animais tratados com água destilada (CN). Já os grupos tratados com hidrogel de quitosana a 2% e alantoína, promoveram uma redução na atividade enzimática ao longo de todo processo, especialmente no décimo segundo dia de tratamento, quando diminuíram a atividade da catalase em torno de 79,1 e 56,3% respectivamente, em comparação ao tratado com água destilada (Figura 10).

Após a lesão tecidual a hemostasia ativa a cascata de coagulação através da agregação plaquetária. Um dos componentes da cascata é a ativação da trombina via NADPH oxidase vascular. Este ciclo é sustentado pela produção de EROS. A quitosana é um potente hemostático que atua diretamente, reduzindo o tempo de coagulação

sanguínea, e por conseqüência, a produção de EROS. Essa propriedade é decorrente da quitosana apresentar grupos amínicos livres (cargas positivas) e interagir com os eritrócitos que apresentam nos seus receptores cargas negativas associada aos ácidos neuramínico e murâmico (SILVA et al., 2006).

Possivelmente, a redução no tempo de sangramento nas lesões no grupo CQ diminuiu a atividade da catalase, e é provável que a produção de hidroperóxidos tenha sido atenuada pela quitosana durante a hemostasia. No grupo CN, houve elevação desta atividade enzimática, semelhante ao observado em estudo sobre lesões cutâneas não tratadas em ratos, que mostrou aumento na atividade da catalase durante as fases inflamatória e proliferativa (RASIK; SHUKLA, 2000).

A cicatrização promovida pelo grupo de animais tratados com quitosana em relação aos outros grupos foi mais rápida possivelmente devido à ativação dos macrófagos pelos oligômeros de quitosana. Estas células liberam interleucina-1, e são sinalizadoras da fibroplastia e também influenciam na organização estrutural do colágeno (MUZZARELI, 1997). O tratamento com quitosana mostrou ser mais eficaz neste parâmetro que o tratamento realizado com alantoína, uma vez que foi capaz de restabelecer os níveis basais da atividade da catalase. Em estudos do tecido cicatricial de ratos foi observado um decréscimo na atividade desta enzima relacionando esse perfil à ação de substâncias antioxidantes que são capazes de neutralizar as EROS (SCHÄFER; WERNER, 2008).

A enzima glutationa peroxidase tem a função de reduzir os hidroperóxidos, incluindo os lipohidroperóxidos, usando a GSH como substrato (REUTER et al., 2010). A Figura 11 mostra a elevada atividade da GPX nos animais do grupo não tratado (CN) durante todas as fases do processo cicatricial. A enzima GPx possui ação muito semelhante à CAT, detoxificando o  $H_2O_2$ , e outros hidroperóxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois, à custa da conversão da GSH a GSSG. Tal fato explica a expressiva atividade da GPX entre o 3<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dia, ou seja, com um excesso de EROS na fase inflamatória no grupo CN, e um subsequente e constante decréscimo no início da fase de fibroplastia.

Já o tratamento realizado com quitosana diminuiu a atividade desta enzima durante todo processo em torno de 76,1%, apresentando um perfil de redução semelhante ao grupo de animais tratados com alantoína praticamente restabelecendo os níveis basais de atividade desta enzima. A baixa atividade da GPx nos grupos CP e CQ até o 12<sup>o</sup> dia, sugere indiretamente a diminuição na concentração de EROS, refletindo

a ação antiinflamatória, tanto para alantóina como para o hidrogel de quitosana 2%. Embora a GPx tenha ação fundamentalmente citosólica, estudos realizados *in vitro* revelaram que ela é capaz de reduzir também hidroperóxidos de membrana (PASTORE et al., 2003).

A GSH é um importante antioxidante endógeno e um dos primeiros e principais mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo, pois atua direta ou indiretamente via GPx, para eliminar de hidroperóxidos (SIES, 1999). O conteúdo intracelular de GSH e GSSG normalmente é mantido elevado, através da redução da GSSG à GSH pela enzima glutationa redutase, permitindo a manutenção de uma enorme quantidade de GSH como agente antioxidante para o organismo. A homeostase intracelular da GSH é realizada pelo grupo tiol nas reações de oxirredução (PARIHAR et al., 2008; BARBOZA et al., 2009).

O quociente 2GSH/GSSG r é um indicador do *status* oxidativo da célula (SCHÄFER; BUETTNER, 2001; DRÖGE, 2002). Portanto, a proporção entre GSH/GSSG é uma boa medida de estresse oxidativo de um organismo (JONES et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2004). Sob condições de maior estresse oxidativo ocorre o aumento do conteúdo de GSSG, aumentando o conteúdo de proteínas com grupos dissulfetos (PASTORE et al., 2003).

Analisando a Figura 12, é possível observar que os animais pertencentes ao grupo não tratado (CN) apresentaram uma concentração elevada de GSH nas três fases da cicatrização. Além disso, verificou-se que o tratamento realizado com alantóina foi capaz de diminuir a concentração de GSH apenas a partir do nono dia de tratamento. Por fim, o tratamento realizado com hidrogel de quitosana a 2% foi capaz de promover uma queda ainda maior (97,1%) na concentração deste tiol, principalmente a partir do nono dia de tratamento, normalizando os níveis basais de GSH durante todo o período cicatricial.

Portanto, foi possível observar o papel fisiológico da GSH, que se manteve elevada principalmente nos grupos tratado com água destilada como agente do sistema de defesa antioxidante celular, enquanto que os fármacos quitosana e alantóina atenuaram o estresse oxidativo mantendo a GSH em níveis baixos.

A GSH é abundante no citoplasma, no núcleo, e nas mitocôndrias e, igualmente, nos líquidos extra-celulares. Isso permite que haja uma grande quantidade de GSH para atuar como uma substância antioxidante no organismo. Segundo Parihar e colaboradores (2008), na isquemia tecidual após uma lesão por queimadura esgotam-se os níveis intracelulares de GSH e, provavelmente, isso estaria relacionado ao consumo excessivo de GSH durante o estresse oxidativo.

A partir destas informações, pode-se inferir que nos animais não tratados (CN) houve um aumento na resposta inflamatória, induzido pelo infiltrado de células polimorfonucleares, que, além de secretarem enzimas proteolíticas e enzimas pró-inflamatórias, também produzem e secretam EROS, elevando simultaneamente os níveis de GSH, em termos de compensação antioxidante.

A ação antiinflamatória da alantoína é visível pela diminuição do infiltrado de polimorfonucleares e redução de citocinas pró-inflamatórias (ARAÚJO et al., 2010). No presente estudo, durante todos os dias de tratamento, a ação da quitosana como agente cicatrizante promoveu a aceleração do infiltrado de leucócitos polimorfonucleares para área lesada, permitindo o aumento da migração e proliferação de fibroblastos para ferida, além de estimular a migração de macrófagos e produção de colágeno (UENO et al., 1999) (Figuras 18 a 20). Desta forma, a quitosana foi o fármaco que promoveu a cicatrização total das lesões mais rapidamente do que os demais tratamentos.

Histologicamente os processos envolvidos na reparação do tecido lesado visam o restabelecimento da homeostasia dos tecidos e a regeneração com a reestruturação da atividade funcional da pele (BALBINO et al., 2005). Histologicamente, o processo cicatricial está descrito em três fases distintas: inflamatória, proliferativa e de remodelação. Na Figura 13, correspondente ao terceiro dia após o procedimento de excisão da pele, é possível observar a perda tecidual de todas as camadas da pele em todos os grupos experimentais. Neste período, a resposta inflamatória é mediada por células do sistema imune, principalmente pelo infiltrado de leucócitos. O grupo controle negativo apresentou moderado infiltrado inflamatório em relação aos grupos tratados com quitosana e alantoína. Ueno e colaboradores (2001b) mostraram, no terceiro dia após a injúria tecidual produzida experimentalmente em cães, que o tratamento com quitosana aumentou severamente o infiltrado inflamatório e a migração de macrófagos, acelerando a fase inflamatória.

Os maiores componentes da resposta inflamatória são as alterações hemodinâmicas, ou seja, vasoconstrição transitória, vasodilatação, diminuição da velocidade circulatória, marginação leucocitária e emigração. O aumento da permeabilidade capilar permite que os fluidos ricos em proteínas entrem no espaço intersticial, facilitando a deposição de fibronectina, o que cria um arcabouço que permite a migração dos fibroblastos para a ferida. A fibronectina é produzida principalmente entre as 24 e 48 horas após a lesão (STADELMANN et al., 1998), portanto, quanto mais rápida for a

resposta inflamatória, mais acelerada será a produção de mediadores químicos.

Na presença de quitinases, a quitosana avaliada em estudo *in vitro*, sofreu degradação e seus produtos promoveram um mecanismo de diferenciação de monócitos em macrófagos devido à estimulação das células que passaram a produzir fatores de crescimento (ESCOTT; ADAMS, 1995). Nas análises histológicas do presente trabalho foi possível observar o infiltrado de polimorfonucleares no grupo CN até no 15º dia pós-operatório, enquanto que para os grupos CP e CQ isto não ocorreu (Figuras 13 até 17). Nos achados histológicos, corados com H&E, pode-se perceber que este infiltrado, composto por neutrófilos e macrófagos migraram para o local em que estaria ocorrendo o processo inflamatório (DARR; FRIDOVICH, 1994) e onde os neutrófilos atuavam limpando o local da ferida (WAHL; WAHL; MCCARTHY, 1978). No caso do grupo tratado com hidrogel de quitosana a 2% estes macrófagos, após terem englobado partículas de quitosana, tornaram-se ativos, de maneira a promover respostas imunes sistêmicas (UENO et al., 1999).

O processo de cicatrização levou ao preenchimento do espaço vazio, que resultou da remoção da pele dos camundongos no presente estudo, porém apenas no caso dos grupos CP e CQ observou-se a formação de nova pele com as principais estruturas típicas, inclusive sendo formados anexos de pele, que são visíveis nos achados histológicos corados com picro-sirius (Figuras 19 e 20). A remodelagem tecidual está intimamente relacionada com a deposição de colágeno embrionário (Tipo III) que vai sendo gradualmente substituído por colágeno maduro (Tipo I) (KITCHEN; BAZIN, 1998). Esta substituição pode ser facilmente observada ao serem comparados os achados histológicos para os dias 9, 12 e 15 nos grupos de tratamentos realizados (Figuras 18 até 20), ressaltando-se o fato de que no décimo quinto dia para os animais tratados com hidrogel de quitosana 2% observou-se a predominância de fibras de colágeno maduro, coradas em vermelho (Figura 20), conforme ressaltado por Rubin e Farber (2002), onde mencionam que o colágeno Tipo I, tornou-se o principal colágeno no tecido cicatricial.

No caso dos estudos imuno-histoquímicos realizados na presente pesquisa, o anticorpo utilizado propiciou a clara observação dos novos vasos sanguíneos na área em processo de cicatrização, pois o tecido de granulação apresenta grande quantidade de novos vasos sanguíneos (RUBIN; FARBER, 2002), como é possível perceber nas Figuras 21 a 23, em especial no caso do Grupo CQ.

A coloração imuno-histoquímica possibilitou a observação da morfologia dos miofibroblastos (Figura 21), sendo possível verificar o formato poligonal destas células. Morfologicamente, os miofibroblastos são caracterizados pela presença de miofibrilas de actina, associado à proteínas como miosina e fibras do estresse (DESMOULIÉRE et al., 2005). O anticorpo empregado na presente estudo revelou a presença das fibras de actina, tanto nos miofibroblastos quanto nas células da parede muscular dos vasos sanguíneos neoformados. Portanto, os dados histológicos obtidos sugerem que os tratamentos das lesões cutâneas com hidrogel de quitosana a 2%, além de acelerarem o processo de cicatrização melhorou a qualidade do tecido cicatricial produzido uma vez que elevou a síntese de colágeno, a produção de fibras de actina e a vascularização tecidual.

Resumindo, a quitosana tem a propriedade de regenerar tecidos, atuando com mecanismos distintos nas três fases cicatriciais. Na fase inflamatória, diminuiu o *burst* respiratório, atenuando o estresse oxidativo, conforme observado nos parâmetros bioquímicos. Na fase proliferativa, promoveu a deposição e organização do colágeno e no processo de remodelação a fibroplastia estimulou a migração e proliferação de queratinócitos na borda da ferida, resultando em uma cobertura completa da ferida com uma nova epiderme. Diante de todos os achados, é possível inferir que a quitosana apresenta elevado potencial cicatrizante, pois atuou como agente antioxidante inibindo o estresse oxidativo, facilitou o processo regenerativo, diminuindo o tempo de cicatrização e previniu o risco de infecções, sendo um fármaco potencial para o tratamento tópico de lesões cutâneas.





## 7 CONCLUSÕES

---

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O hidrogel de quitosana a 2% pode ser considerado um importante agente cicatrizante, uma vez que foi capaz de proporcionar a resolução de lesão cutânea nos animais submetidos ao modelo de excisão, em um período menor de tratamento, comparativamente aos animais dos grupos controles positivo e negativo.
- A análise de marcadores de estresse oxidativo sugere que um dos possíveis mecanismos de ação pelo qual ocorre o potencial cicatrizante do hidrogel de quitosana a 2% seria através da capacidade antioxidante.
- O potencial cicatrizante verificado na quitosana ocorreria pela correlação observada nas fases cicatriciais. Na fase inflamatória, a redução do *burst* respiratório impediria a formação de EROS passando rapidamente à fase proliferativa e à fase de remodelação, evitando o estresse oxidativo, promovendo um processo cicatricial mais acelerado e mantendo as defesas antioxidantes em níveis basais.
- O estudo histológico e imuno-histoquímico das lesões confirmou o potencial cicatrizante do hidrogel de quitosana a 2%, uma vez que evidenciou a ocorrência de fibroplastia no tecido de granulação, a proliferação de miofibroblastos e a formação de novos vasos sanguíneos no local da lesão.



## 8 PERSPECTIVAS

---

Como perspectivas para continuidade desta pesquisa, consideram-se:

- Verificar a atividade da COX 1 e COX 2 no tecido cicatricial de camundongos tratados com o hidrogel de quitosana.
- Verificar a expressão da COX 2 na fase inflamatória, através de técnicas imuno-histoquímicas.
- Avaliar a atividade de metaloproteinases no tecido cicatricial nos diferentes tempos do processo de cicatrização.
- Verificar a expressão do VEGF no tecido cicatricial através de técnicas imuno-histoquímicas.
- Avaliar a atividade bacteriostática e bactericida do hidrogel de quitosana frente cepas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*), e cepas isoladas a partir de úlceras crônicas.
- Avaliar *in vitro* a proliferação de fibroblastos, de células endoteliais e de outras células do tecido epitelial, acrescentando diferentes concentrações do hidrogel de quitosana ao meio de cultivo celular.
- Propor a aplicação tópica em testes clínicos com humanos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABLA, L.E.F.; ISHIZUKA, M.M.A. Fisiopatologia das Feridas. **In:** FERREIRA, L.M. Manual de Cirurgia Plástica. São Paulo: Atheneu. 1995. p. 5-11.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126,1984.

ANRAKU, M.; KABASHIMA, M; NAMURA, H.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M.; GEBICKI, J.M.; FURUTANI, N.; TOMIDA, H. Antioxidant protection of human serum albumin by chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 2, p.159-164, 2008.

ARAÚJO, L.A.; GRABE-GUIMARÃES, A.; MOSQUEIRA, V.C.F.; CARNEIRO, C.M.; SILVA-BARCELLOS, N.M. Profile of wound healing process induced by allantoin. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, n.5, p.460-466, 2010.

BAILEY, S.E.; OLIN, T.J.; BRICKA, R.M. and ADRIAN, D.D. A review of potentially low costs sorbents for heavy metals. **Water Research**, v. 33, n. 11, p. 2469-2479, 1999.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)**, v. 41, n. 1, p. 27 – 51, 2005.

BARANOSKI, S. Skin tears: guard against this enemy of frail skin. **Nursing Management**, v. 32, n. 8, p. 25 - 32, 2001.

BARBOZA, E. ; MOREIRA, E.A.M. ; SILVA, V.R.G.; PEREIRA, M.J.L. ; FILHO, D. W. Supplementation of vitamin E, vitamin C, and zinc attenuates oxidative stress in burned children: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study.**Journal of Burn Care Research**, v. 30, n. 5, p 859 – 866, 2009.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J.M.; DAVID; J.P. Estresse oxidativo: relação entre a geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX Family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. **Physiology Review**, v. 87, n. 1, p. 245 – 313, 2007.

BELAIBA, R.S.; DJORDJEVIC, T.; BONELLO, S.; ARTUNC, F.; LANG, F.; HESS, J.; GORLACH, A. The serum- and glucocorticoid-inducible kinase Sgk-1 is involved in pulmonary vascular remodeling: role in redox-sensitive regulation of tissue factor by thrombin. **Circulation Research**, v. 98, p. 828–836, 2006.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BEUTLER, E.; DURAN, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. **In**: CLERCK, L.; MASSARO, D. Oxygen, gene expression and cellular function. New York: Marcel Dekker, v.105, p. 1-25, 1997.

BRANDEN, R.L. **Physical Medicine and Rehabilitation**. 2 ed., Philadelphia: W. B. Saunders Company, cap. 31, p. 645-661, 2000.

BRIENZA, D.M.; GEYER, M.J.; JAN, Y-K. A Comparison of changes in Rhythms of Sacral Skin Blood Flow in Response to Heating and Indentation. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, v.86, pp.1245 - 1251, 2005.

BUITRAGO, S.; MARTIN, T.E.; TETENS-WOODRING, J.; BELICHA-VILLANUEVA, A.; WILDING, G.E. Safety and Efficacy of Various Combinations of Injectable Anesthetics in BALB/c Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 11-17, 2008.

BURNS, R. **Immunochemical protocols**, Totowa, New Jersey: Humana Press, 2005, 317p.

CAMPBELL, A. M. **Monoclonal and Immunosensor Technology**. Amsterdam: Elsevier, 1991, 427p.

CERUTTI, P.A.; TRUMP, B.F. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. **Cancer cells**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 1991.

CHABY, G.; SENET, P.; VANEAU, M.; MARTEL, P.; GUILLAUME, J.-C.; MEAUME, S.; TÉOT, L.; DEBURE, C.; DOMPMARTIN, A.; BACHELET, H.; CARVIN, H.; MATZ, V.; RICHARD, J.L.; ROCHET, J.M.; SALES-AUSSIAS, N.; ZAGNOLI, A.; DENIS, C.; GUILLOT, B.; CHOSIDOW, O. Dressings for Acute and Chronic Wounds. A systematic review. **Archives of Dermatology**, v. 143, n. 10, p. 1297 – 1304, 2007.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, p. 527-602, 1979.

CHIUMIENTO, A.; LAMPONI, S.; BARBUCCI, R.; DOMINGUES, A.; PEREZ, Y.; VILLALONGA, R. Immobilizing Cu, Zn-superoxide dismutase in hydrogels of carboxymethylcellulose improves its stability and wound healing properties. **Biochemistry (Moscow)**, v. 71, n. 12, p. 1324 – 1328, 2006.

CLARK. R. A. F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 11, p. 647 - 666, 1993.

CLARK, R.A.F. Wound repair: overview and general considerations. **In: CLARK, R.A.F. (ed.). The molecular and cellular biology of wound repair**. 2 ed. New York, NY: Plenum Press, p. 3 -50, 1996.

CHOI, H.;M., Bide; M., PHANEUF; M. QUIST, W.; LOGERFO, F., **J. Applied. Polymer Science**.v.92, p.3343– 3354,2004.

CORRÊA, M.P.; DUBUISSON, P.; PLANA-FATTORI, A. An overview about the ultraviolet index and the skin cancer cases in Brazil. **Photochemistry and Photobiology**, v. 78, n. 1, p. 49 - 54, 2003.



CORRÊA NETO, M. P. **Efeito da suplementação dietética de arginina na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos.** Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008. 82f.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia Estrutural e funcional.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DARR, D.; FRIDOVICH, I. Free Radicals in Cutaneous Biology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 5, p. 671 -675, 1994.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signaling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 813 – 824, 2007.

DESMOULIÈRE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANI, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblasts. **Wound Repair and Regeneration**, v. 13, n.1, p. 7-12, 2005.

DIEGELMANN, R. F.; COHEN, I. K.; KAPLAN, A. M. The role of macrophages in wound repair: a review, **Plastic Reconstruction Surgery**, v. 68, p. 107-113, 1981.

DIFFEY, B.L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. **Physics in Medicine and Biology**, v. 36, n. 3, p. 299-328, 1991.

DIPIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. **Shock**, v.4, n.4, p. 233 – 240, 1995.

DRAELOS, Z. D. Botanicals as topical agents. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 474 – 477, 2001.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47 – 95, 2002.

EPP, O.; LADENSTEIN, R.; WENDEL, A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0,2 nm resolution. **European Journal of Biochemistry**, v.133, n.1, p. 51-69, 1983.

ESCOTT, G. M.; ADAMS, D. J. Chitinase activity in human serum and leucocytes. **Infection and Immunity**, v. 63, n.12, p. 4770 – 4773, 1995.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n.1, p. 61 – 68, 1997.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FRATICELLI, A.; SERRANO JR., C.V.; BOCHNER, B.S.; CAPOGROSSI, M.C.; ZWEIER, J.L. Hydrogen peroxide and superoxide modulate leukocyte adhesion molecule expression and leukocyte endothelial adhesion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research**, v. 1310, n. 3, p. 251–259, 1996.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the Superoxide radical. **Archives of Biochemistry Biophysics** v. 246, p. 245–256, 1986.

GATÉ, L.; PAUL, J.; BA, G.N.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. . Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, n.4, p. 169-180, 1999.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v.453, n. 7193, p. 314 - 321, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford: Clarendon Press, 2006.

HERKERT, O.; DJORDJEVIC, T.; BELAIBA, R.S.; GORLACH, A. Insights into the redox control of blood coagulation: role of vascular NADPH oxidase derived reactive oxygen species in the thrombogenic cycle. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 6, p. 765 – 776, 2004.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylene orange complex formation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 3, p. 271 - 280, 1995.

HINMAN C.D.; MAIBACH H. *Nature*, 200, 377-378, 1963

HOBER, S.; LJUNG, J.L.; UHLEN, M.; NILSSON, B. Insulin-like growth factors I and II are unable to form and maintain their native disulfides under in vivo redox conditions, **FEBS Letters**, v. 443, n. 3, p. 271-276, 1999.

HONG, Y.H.; PENG, H.B.; La Fata, V.; Liao, J.K. Hydrogen peroxide-mediated transcriptional induction of macrophage colony-stimulating factor by TGF-beta1, **Journal of Immunology**, v. 159, n. 5, p. 2418-2423, 1997.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 29, n. 11, p. 1349 -1353,1981.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577 - 580, 1981.

JOANNE, M. M. **Cosmetic ingredient handbook**. Washington, 1988. 522 p.

JONES, D. P. et al. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 210, p. 505-516, 1981.

JONES, D.P.; CARLSON, J.L.; MODY JR., V.C.; CAI, J.; LYNN, M. J.; STERNBERG JR., P. Redox state of glutathione in human plasma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 4, p. 625 - 635, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1974. p. 86-112.

KEGG PATHWAY DATA BASE. **Purine Metabolism – Reference pathway**. Disponível em: <[http://www.genome.jp/kegg-bin/highlight\\_pathway?scale=1.0&map=map00230&keyword=purine](http://www.genome.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map00230&keyword=purine)>. Acesso em fev. 2011.

KELLER, U. auf dem; KÜMIN, A.; BRAUN, S.; WERNER, S. Reactive Oxygen Species and Their Detoxification in Healing Skin Wounds. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 11, p. 106 – 111, 2006.

KIM, C.H.; CHOI, J.W.; CHUN, H.J.; CHOI, K.S. Synthesis of chitosan derivatives with quaternary ammonium salt and their antibacterial activity. **Polymer Bulletin**, v. 38, n. 4, p. 387 - 393, 1997.

KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. 10 ed. São Paulo: Manole, 1998.

KITTIGUL, L.; SUTHACHANA, S.; KITTIGUL, C.; PENGUANGROJANACHAI, V. Immunoglobulin M-capture Biotin-Streptavidin Enzyme-Linked Immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue viruses. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 3, p. 352 - 356, 1998.

KLYUBIN, I.V.; KIRPICHNIKOVA, K.M.; GAMALEY, I.A. Hydrogen peroxide induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. **European Journal of Cell Biology**, v. 70, p. 347 – 351, 1996.

KOIDE, S. S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutrition Research**, n. 18, n. 6, p. 1091 - 1101, 1998.

KOJIMA, K.; OKAMOTO, Y.; KOJIMA, K.; MIYTAKE, K.; FUHISE, H.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 12, p. 1595 - 1598, 2004.

KÜMIN, A.; SCHÄFER, M.; EPP, N.; BUGNON, P.; BORNBERCLAZ, C.; OXENIUS, A.; KLIPPEL, A.; BLOCH, W.; WERNER, S. Peroxiredoxin 6 is required for blood vessel integrity in wounded skin. **Journal of Cell Biology**, v. 179, n. 4, p. 747 - 760, 2007.

LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672 - 678, 2009.

LEE, Y.M.; KIM,S.S.; PARK, M.H.; SONG, K.W.; SUNG, Y.K., KANG, I.K.  $\beta$ - Chitin-based wound dressing containing sulfurdiazine. **Journal of Material Science: Material in Medicine**, v. 11, n. 12, p. 817 - 823, 2000.

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v. 18, n. 2, p. 60-65, 2003

LEVINE, R.L.; GARLAND, D.; OLIVER, C.N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A.G. AHN, B.W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 464 - 478, 1990.

MAFFEI, F.H.A.; MAGALDI, C.; PINHO, S.Z.; LASTORIA, S.; PINHO, W.; YOSHIDA, W.B. Varicose veins and chronic venous insufficiency in Brazil: Prevalence among 1755 inhabitants of a country town. **International Journal of Epidemiology**, v. 15, n. 2, p. 210 - 217, 1986.

MARGOLIS, D.J.; BILKER, W.; KNAUSS, J.; BAUMGARTEN, M.; STROM, B.L. The incidence and prevalence of pressure ulcers among elderly patients in general practice. New York: AEP, v.12, n.5, p.321-325, 2002.

MARKS, A D; LIEBERMAN M; SMITH, C. **Bioquímica médica básica de Marks**. Porto Alegre: Arte Médica , 2007.

MARTINDALE: James, E. F.; Reynolds, E. (Ed), **Martindale: The Extra Pharmacopoeia**. 33. ed. London: Pharmaceutical Press. Electronic version In: Micromedex® Healthcare Series, Greenwood Village, Colorado (Edition expires [date]), 2009. MERCK SHARP & DOHME. Disponível em: <<http://www.msdonline.com.br>>. Acesso em 16 nov. 2009.

MARTIN, P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75 - 81, 1997.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 5723, 1969.

MCGUCKIN, M. Validation of Venous Leg Ulcer Guidelines in the United States and United Kingdom. **The American Journal of Surgery**, Philadelphia, Caderno 183, p. 132-137. 2001.

MEZADRI, T. J.; TOMÁZ, V. A.; AMARAL, V. L.L. **Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170 - 3175, 1972.

MONTADON, D., D'ANDIRAN, G.; GABBIANI, G.. The mechanism of wound contraction and epithelization: clinical and experimental studies. **Clinical Plastic Surgery**, v. 103, p. 367-375, 1977.

MOSELEY, R.; HILTON, J.R.; WADDINGTON, R.J.; HARDING, K.G.; STEPHENS, P.; THOMAS, D.W. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 4, p. 419 – 429, 2004.

MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 53, n. 2, p. 131 - 140, 1997.

NAYAK, B. S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. **eCAM**, p. 1-6, 2007

NAYAK, B. S.; UDUPA, A. L.; UDUPA, S. L. Effect of *Ixora coccinea* flowerson dead space wound healing in rats. **Fitoterapia**, v. 70, p. 233 – 236, 1999.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6255 - 6285, 2004.

OKAMOTO, Y.; KAWAKAMI, K.; MIYATAKE, K.; MORIMOTO, M.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 3, p. 249 - 252, 2002.

OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYATAKE, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 3, p. 337 - 342, 2003.

OLIVEIRA-MARQUES, V. de; CYRNE, L.; MARINHO, H.S.; ANTUNES, F. A quantitative study of NF-kappa B activation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Relevance in inflammation and synergy with TNF-alpha. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 6, p. 3893 – 3902, 2007.

OLIVEIRA, S. T.; LEME, M. C.; PIPPI, N. L.; RAISER, A.G.; MANFRON, M.P. Formulações de Confrey (*Symphytum officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 7/8, n. 1, p. 65 - 74, 2000/2001.

PAPAS, A. M. Diet and antioxidant status. **Food and Chemical Toxicology**. v. 37, n. 9-10, p. 999-1007, 1999.

PARIHAR, A; PARIHAR, M.S.; MILNER, S.; SATYANARAYAN, B. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**, v. 3, n. 4, p. 6 -17, 2008.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, n. 1, p.19 – 39, 2003.

PAUL, W.; SHARMA, C.P. Chitosan and alginate wund dressings: A Short Review. **Trends in Biomaterial and Artificial Organs**, v. 18, n. 1, p. 18 – 23, 2004.

PEREIRA, A. **Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa spp*)**. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 155 p.

PEREIRA, J.R.C. Tratamento de cicatrizes patológicas com a associação de cepalin, heparina e alantoina. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n. 8, p. 603 - 608, 2003.

PRUDDEN, J.F.; MIGEL, P.; HANSON, P.; FRIEDRICH, I.; BALASSA, L. The discovery of a potent pure chemical wound-healing accelerator. **American Journal of Surgery**, v. 119, n. 5, p. 560 – 564, 1970.

PRYOR, W. A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annual Review of Physiology**, v. 48, p. 657-667, 1986

QI, L.; XU, Z.; JIANG, X.; HU, C.; ZOU, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 16, p. 2693-2700, 2004.

RAO, S. B.; SHARMA, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 34, n. 1, p. 21 - 28, 1997.

RASIK, A. M.; SHUKLA, A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 81, n. 4, p. 257-263, 2000.

RAVI KUMAR, M.N.V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, n. 46, n. 1, p.1 - 27, 2000.

REDDY, G.K.; ENWEMEKA, C.S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 225-229, 1996.

REUTER, S.; GUPTA, S.C.; CHATURVEDI, M.M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603 – 1616, 2010.

REZNICK, A.Z.; PACKER, L. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified protein. **Methods in Enzymology**, n. 233, p. 357 - 363, 1994.

ROBSON, M. Long-term outcome study of growth factor-treated pressure ulcer. New York: **The American Journal of Surgery**, n.181, p. 81-86, 2001.



ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. *et al.* Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

ROY, S.; KHANNA, S.; NALLU, K.; HUNT, T.K.; SEN, C.K. Dermal wound healing is subject to redox control. **Molecular Therapy**, v. 13, p. 211 – 220, 2006.

RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SALDIVA, P. H. N.; CARVALHO, C. R. R. de. Fibroses intersticiais pulmonares: o papel do estado de agregação do colágeno e dos receptores de glicocorticóides no prognóstico dos pacientes. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 11, n. 3, p. 152 - 161, 1985.

SANTOS, R.F.F.N. dos; PORFÍRIO, G.J.M.; PITTA, G.B.B. A diferença na qualidade de vida de pacientes com doença venosa crônica leve e grave. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 8, n. 2, p. 143 – 147, 2009.

SARTORELLI, D S.; FRANCO, L. J. Tendências do diabetes mellitus no Brasil: o papel da transição nutricional. Rio de Janeiro: **Cadernos Saúde Pública**, v.19, n.1, 2003.

SCHÄFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191 – 1212, 2001.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacology Research**, v. 58, n. 2, p. 165 – 171, 2008.

SECO, M.C.; PUIG, M.N. Qualidade de vida e cicatrização são possíveis. São Paulo: **Cuidado Clínico**, v. 4, 2004

SEN, C.K.; ROY, S. Redox signals in wound healing. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1348 – 1361, 2008.

SHESTOPALOV, A. V. et al. Biological functions of allantoin. **Biology Bulletin**, 2006, v. 33, n. 5, p. 437–440, 2006.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 27, n. 9 - 10, p. 916 – 921, 1999.

SIES, H. **Oxidative Stress**. London: Academic Press, 1985.

SIES, H. **Oxidative Stress: Oxidants and Anti-oxidants**. London: Academic Press, 1991.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K.S.C.R. dos; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

SKALLI, O.; GABBIANI, G. The biology of miofibroblast relationship to wound contraction and fibrocontractive disease. **In: CLARK, R.A.F.; HENSON, P.M. (eds.)**. The molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum Press, 1988, p. 373 - 402.

SMELTZER, S.C.; BARE, B.G. **Brunner & Suddarth**: Tratado de Enfermagem Médica Cirúrgica. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

STADELMANN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and Healing Dynamics of Chronic Cutaneous Wounds. **American Journal of Surgery**, v. 176, supplement 2A, 26S – 38S, 1998.

STEILING, H.; MUNZ, B.; WERNER, S.; BRAUCHLE, M. Different Types of ROS-Scavenging Enzymes are expressed during Cutaneous Wound Repair. **Experimental Cell Research**, v. 247, n. 2, p. 484 – 494, 1999.

TOMIDA, H.; FUJII, T.; FURUTANI, N.; MICHIHARA, A.; YASUFUKU, T.; AKASAKI, K.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M.; GEBICKI, J.M.; ANKARU, M. Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 13, p. 1690 – 1696, 2009.

UENO, H.; NAKAMURA, F.; MURAKAMI, M.; OKUMURA, M.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Evaluation effects of chitosan for the extracellular production by fibroblast and the growth factors production by macrophages. **Biomaterials**, v. 22, p. 2125-2130, 2001a.

UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, n. 2, p. 105 – 115, 2001b.

UENO, H.; YAMADA, H.; TANAKA, I.; KABA, N.; MATSUURA, M.; OKUMURA, M.; KADOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. **Biomaterials**, v. 20, n.15, p. 1407 – 1414, 1999.

VACHON DJ, YAGER DR. Novel sulfonated hydrogel composite with the ability to inhibit proteases and bacterial growth. **Journal of Biomedical Material Research Part A**, v. 76, p. 35 - 43, 2006.

VALENCIA, I.C.; FALABELLA, A.; KIRSNER, R.S.; EAGLSTEIN, W. H. Chronic venous insufficiency and venous leg ulceration. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 3; p. 401 - 421, 2001.

VALGAS, S.; GONÇALVES, V.L.; LARANJEIRA, M.C.; FÁVERE, V.T.; PEDROSA, R.C. Malonylchitosan Microspheres as a Matrix for Oral Enrofloxacin Delivery. **Macromolecular Symposia Special Issue: Advanced Polymeric Materials**, v. 229, n.1, p. 246 -252, 2005.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1 – 40, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44 – 84, 2007.

VARMA, A. J., DESHPANDE, S. V., KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and derivatives: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 77 - 93, 2004.

VINSOVA, J.; VAVRIKOVA, E. Recent Advances in Drugs and Prodrugs Design of Chitosan. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n.13, p. 1311 - 1326, 2008.

WAHL, S. M., WAHL, L. M.; MCCARTHY, J. B. Lymphocyte-Mediated Activation of Fibroblast Proliferation and Collagen Production. **Journal of Immunology**, v. 121, p. 942 – 946, 1978.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; MARCON, J. L. *et al.* Comparative antioxidant defenses in vertebrates - Emphasis on fish and mammals. **Trends in Comparative Biochemistry and Physiology** v. 7, p. 33 - 45, 2000.

WLASCHEK, M.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. **Wound Repair and Regeneration**, v. 13, n. 5, p. 452 – 461, 2005.

XIE, W.; XU, P.; LIU, Q. antioxidant activity od water-soluble chitosan derivatives. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 11; n. 13; p. 1699 – 1701, 2001.

XUE, C.; YU, G.; HIRATA, T; TERAQ, J.; LIN, H. Antioxidative Activities of Several Marine Polysaccharides Evaluated in a Phosphatidylcholine-liposomal Suspension and Organic Solvents. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 206 - 209, 1998.

YASUFUKU, T.; ANRAKU, M.; KONDO, Y.; HATA, T.; HIROSE, J.; NOBUYUKI KOBAYASHI, N.; TOMIDA, H. Useful Extend-release Chitosan Tablets with High Antioxidant Activity. **Pharmaceutics**, v. 2, n. 2, p. 245-257, 2010.

ZHENG, L.Y.; ZHU, J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polimers**, v. 54, n. 4, p. 527-530, 2003.

ZHOU, E. M.; RIDD, D.; RIVA, J.; FERNANDO, L.; CLAVIJO, A. Development and evaluation of an IgM-capture ELISA for detection of recent infection with bluetongue viruses in cattle. **Journal of Virological Methods**, v. 91, n. 2, p. 175 - 182, 2001.