



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FABIANA ANDRÉA SOARES FERREIRA

**Avaliação da atividade cicatrizante de derivados de tiossemicarbazonas no tratamento
de feridas em ratos**

MACEIÓ

2020

FABIANA ANDRÉA SOARES FERREIRA

Avaliação da atividade cicatrizante de derivados de tiossemicarbazonas no tratamento de feridas em ratos

Tese apresentada ao **Programa de Pós-Graduação Rede Nordeste de Biotecnologia** – **RENORBIO**, ponto focal Alagoas da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, para a obtenção do título de **Doutor em Biotecnologia**

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior

MACEIÓ

2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

F383a Ferreira, Fabiana Andréa Soares.

Avaliação da atividade cicatrizante de derivados de tiossemicarbazonas no tratamento de feridas em ratos / Fabiana Andréa Soares Ferreira. – 2020.
109 f. : il., figs. e tabs. color.

Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.

Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 98-106.

Apêndices: f. 107-108.

Anexo: f. 109.

1. Cicatrização de feridas. 2. Tiossemicarbazonas. 3. Cremes tópicos. I.
Título.

CDU: 616-001.4: 615.454.1

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese, aos meus pais queridos, Agremir Candido Soares e Lindalva Lopes Candido Soares, por ter crescido num ambiente equilibrado, de amor, de apoio, com exemplos diários de honestidade, educação, trabalho, e incentivo ao estudo.

Aos meus irmãos Flávio Soares e Fernanda Soares: como foi bom ter crescido junto a vocês!

À minha amada e maravilhosa avó, Ana Herrera. Meu exemplo de força, fé inabalável e persistência.

Ao meu esposo Yuri e à família que construímos. Exemplo de caráter, honestidade, inteligência e amor. Meu maior incentivador! Meu amor! Te admiro e sou muito feliz em caminhar na vida ao seu lado!

Aos nossos filhos Sara, Bruna e Yuri, nossas maiores riquezas, razão das nossas vidas, privilégio que Deus nos concedeu.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela proteção de minha vida e família, pela saúde, pelas orientações e oportunidades. Por ter por perto pessoas tão especiais!

Ao meu orientador Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior, meus sinceros agradecimentos por ter me orientado e pela oportunidade na pesquisa experimental.

À coordenadora do RENORBIO / Alagoas, Prof. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart e a todos os professores envolvidos no programa.

À minha sogra Maria José Almeida, meu muito obrigada! Há treze anos me orientando sobre o valor do casamento e sempre pronta a ajudar, apoiando nossa família, com amor incondicional!

À toda a família que herdei em Maceió, principalmente o carinho e convívio das tias Vera Almeida, Valdice Rosely Andrade e tios José Gonçalves e Néelson Almeida. Aos primos, primas, sobrinhos e afilhada Nicole.

À toda a família que deixei em São Paulo, tias, tios, primos, primas, sobrinhos, cunhado e cunhada, e Sofia Weber, sobrinha e futura enfermeira.

Ao meu sogro Dr. João Eudes Afonso Ferreira que, apesar da distância, ama muito seus netos.

À minha madrinha Márcia Herrera, agradeço seus conselhos, abraços e boas lembranças da infância.

À minha querida amiga Alexandra Spina, amizade que perdura apesar da distância.

Às amigas Gessilene Barbosa e Carolina Souto, pela amizade carinhosa, sincera e divertida desde minha formação, dos tempos no Hospital São Luiz e Albert Einstein.

Aos meus compadres Valéria Lages Resurreição e Fernando Resurreição, Martha Regina Cunha de Carvalho e Floriano da Rocha Júnior, Ana Claudia Magalhães e Agenor Antônio Barros, amigos carinhosos, presentes, queridos.

Ao meu amigo querido e professor Dr. Francisco José Passos Soares pela amizade despreziosa e carinhosa no dia a dia.

À minha querida e inspiradora amiga Prof. Dra. Maria Lysete de Assis Bastos, pelas valiosas contribuições e por ser o maior referencial da Enfermagem na Pesquisa Experimental em Alagoas. Grande admiração!

Às minhas parceiras de disciplina, Prof. Dra. Patrícia Sarmiento; Prof. Dra. Ivanise Bittencourt, grandes incentivadoras e exemplos de profissionalismo! Gratidão pela compreensão de minha ausência.

À Prof. Ms. Thayse Gomes, que um dia foi minha aluna e hoje, professora que me substituiu durante a realização do doutorado.

Ao amigo que ganhei no doutorado, Dr. Ednaldo de Almeida Gomes. Muito grata por seu empenho, práticas sugestões e contribuição inestimável nos experimentos.

À patologista, Dra. Juliana Arôxa, pela competente, experiente, valiosa análise histológica e também a sua equipe pelo preparo das lâminas.

Às queridas alunas de graduação Deborah Mara, Janine Martins, Juliana Nunes, e aos pós-graduandos Joyce Fragoso, Jorge Andres Garcia Suarez e Wanderley Barbosa pela determinante colaboração nos experimentos.

À Prof. Dra. Sabrina Reis pela experiente análise estatística, explicações com ótima didática e por sua contribuição à pesquisa na área da saúde.

Aos pós-graduandos da Farmácia Érica Erlanny, Igor, Edeildo, Mailde, Arthur pelas sínteses das substâncias, ensaio antioxidante e acolhida nos laboratórios.

À Prof^a. Dr^a Êurica Adélia Nogueira Ribeiro, Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo e Prof. Dr. Ticiano Nascimento pelas valiosas sugestões na participação como membros na banca de qualificação.

À coordenadora do Laboratório de Farmácia Cardiovascular da UFAL Prof^a. Dr^a Êurica Adélia Nogueira Ribeiro por disponibilizar o laboratório para a realização dos experimentos.

À técnica Elenita, responsável pelo biotério da nutrição, por auxiliar-me com as gaiolas individuais e todo aparato que envolve o condicionamento e cuidado com os animais.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

A cicatrização é um processo que visa a restauração da integridade tecidual, mas na presença de comorbidades como diabetes, obesidade, aterosclerose, infecção e feridas crônicas por exemplo, esse processo fisiológico pode ser retardado. Substâncias tópicas têm sido testadas com o interesse de otimizar o tempo, a qualidade da cicatriz e os custos inerentes ao processo. Esse estudo avaliou a atividade cicatrizante de dois derivados de tiossemicarbazonas em ratos *Wistar*. Essas substâncias sintéticas têm valor e interesse científico devido à versatilidade de suas propriedades químicas e biológicas e por serem bioisósteros da aminoguanidina, substância já conhecida por apresentar diversas propriedades (inclusive cicatrizante). Os dois derivados de tiossemicarbazonas que apresentaram melhor atividade antiglicante e não apresentaram toxicidade foram selecionados para o ensaio *in vivo*. Os experimentos *in vivo* foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Instituto de Ciências Farmacêuticas da UFAL, sob aprovação da CEUA / UFAL nº 06/2019. Os 36 animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos com 9 animais cada: CP (controle positivo), CN (controle negativo), LQM 9.1 (substância derivada 1) e LQM 11.1 (substância derivada 2). Foram submetidos à anestesia, às excisões circulares com *punch* na região dorsal e aplicados cremes por via tópica nas feridas contendo as substâncias. Os curativos e avaliação das feridas foram realizados diariamente por 21 dias. As eutanásias ocorreram em cada fase da cicatrização (no 7º dia, 14º dia e no 21º dia, com sacrifício de 12 animais em cada dia). Para a análise macroscópica foram consideradas as variáveis: repilação, hiperemia, coágulo, presença de sangramento, retração da ferida, exsudato, hiperplasia nas bordas da ferida, inflamação, tamanho da ferida. Para a análise histológica por microscopia das feridas tratadas, os retalhos foram corados com hematoxilina-eosina e os critérios avaliados foram: presença de coágulo (crosta), hiperplasia em bordas da ferida, presença de infecção, presença inflamação, componentes inflamatórios (neutrófilos e linfócitos), tecido de granulação, proliferação celular (macrófagos e fibroblastos) e depósito de colágeno (fibrose) ao centro e nas bordas da ferida. Após as análises, verificou-se que as substâncias testadas não apresentaram toxicidade de acordo com a concentração em que foram testadas (10µM). foram observadas características que demonstraram uma aceleração da cicatrização nas fases 1 e 2 (como presença de granulação, retração da ferida e pouco exsudato), com abreviação da fase proliferativa (fase 2) e características da fase de remodelação (fase 3). Constatou-se que microscopicamente, na fase 2, as feridas já não apresentavam hiperplasia na borda da ferida e macroscopicamente tinham

aspecto cicatrizado, demonstrando que os derivados de tiossemicarbazonas podem ser protótipos de baixo custo e promissores para uma rápida cicatrização.

Palavras-chave: Cicatrização. Feridas. Tiossemicarbazonas.

ABSTRACT

Healing is a process that aims to restore tissue integrity, but in the presence of comorbidities such as diabetes, obesity, atherosclerosis, infection and chronic wounds, for example, this physiological process can be delayed. Topical substances have been tested in the interest of optimizing the time, the quality of the scar and the costs inherent to the process. This study evaluated the healing activity of two thiosemicarbazone derivatives in Wistar rats. These synthetic substances have scientific value and interest due to the versatility of their chemical and biological properties and because they are bioisosteroids of aminoguanidine, a substance already known for having several properties (including healing). The two thiosemicarbazone derivatives that showed better anti-glycant activity and showed no toxicity were selected for the in vivo assay. The in vivo experiments were conducted at the Laboratory of Cardiovascular Pharmacology of the Institute of Pharmaceutical Sciences at UFAL, under the approval of CEUA / UFAL nº 06/2019. The 36 animals were randomly divided into 4 groups with 9 animals each: CP (positive control), CN (negative control), LQM 9.1 (derivative 1) and LQM 11.1 (derivative 2). They were submitted to anesthesia, to circular excisions with punch in the dorsal region and topical creams were applied to the wounds containing the substances. Dressings and wound assessment were performed daily for 21 days. Euthanasias occurred at each stage of healing (on the 7th, 14th and on the 21st day, with the sacrifice of 12 animals each day). For macroscopic analysis, the following variables were considered: repilation, hyperemia, clot, presence of bleeding, wound retraction, exudate, hyperplasia at the edges of the wound, inflammation, wound size. For histological analysis by microscopy of the treated wounds, the flaps were stained with hematoxylin-eosin and the evaluated criteria were: presence of clot (crust), hyperplasia at the edges of the wound, presence of infection, presence of inflammation, inflammatory components, granulation tissue, cell proliferation (macrophages and fibroblasts) and collagen deposition at the center and at the edges of the wound. After the analysis, it was found that the tested substances did not show toxicity according to the concentration at which they were tested (10µM). Characteristics were observed that demonstrated an acceleration of healing in phases 1 and 2 (granulation, wound retraction and little exudate), with abbreviation of the proliferative phase (phase 2) and characteristics of the remodeling phase (phase 3). It was found that microscopically, in phase 2, the wounds no longer had hyperplasia at the edge of the wound and macroscopically they had a scarred appearance, demonstrating that thiosemicarbazone derivatives can be low-cost and promising prototypes for rapid healing.

Keywords: Healing. Wounds. Thiosemicarbazone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estratos da derme..... | 27 |
| Figura 2 – Processo de cicatrização..... | 29 |
| Figura 3 – Fases do processo de cicatrização de feridas..... | 32 |
| Figura 4 – Reação de obtenção da tiossemicarbazona a partir da tiossemicarbazida..... | 46 |
| Figura 5 – Arranjo estrutural de tiossemicarbazonas..... | 46 |
| Figura 6 – Cálculo do tamanho amostral com 4 grupos de animais..... | 57 |
| Figura 7 – Etapas da metodologia da cicatrização in vivo..... | 60 |
| Figura 8 – Fase 1. Avaliação microscópica do tamanho residual das feridas..... | 65 |
| Figura 9 – Características clínicas macroscópicas na Fase 1..... | 68 |
| Figura 10 – Fase 1. Aspectos celulares microscópicos..... | 72 |
| Figuras 11 e 12 – Fase 1. Fotos das feridas com controle negativo CN1 e CN2..... | 74 |
| Figuras 13, 14 e 15 – Feridas na Fase 1: CP2, LQM 9.1 e LQM 11.1..... | 74 |
| Figuras 16 e 17 – Feridas na Fase 2: aspecto microscópico..... | 75 |
| Figura 18 – Fase 2. Características macroscópicas nas feridas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1..... | 76 |
| Figura 19 – Fase 2. Avaliação microscópica do tamanho residual das feridas | 79 |
| Figura 20 – Fase 2. Avaliação microscópica com ausência de hiperplasia nas bordas..... | 83 |
| Figuras 21 e 22 – Fase 2. Fotos das feridas dos controles negativos CN4 e CN5..... | 87 |
| Figuras 23 e 24 – Fase 2. Fotos das feridas dos controles positivos CP4 e CP5..... | 88 |
| Figuras 25 e 26 – Fase 2. Fotos das feridas com LQM 9.1.5 e LQM 11.1.4..... | 88 |
| Figuras 27 e 28 – Aspecto microscópico das feridas tratadas com substâncias CN5 e LQM 9.1.4..... | 89 |
| Figura 29 – Fase 3. Características macroscópicas com repilação acentuada e tamanho residual ou retração total nas feridas..... | 90 |
| Figuras 30 e 31 – Fotos dos controles negativos CN8 e CN9..... | 95 |
| Figuras 32 e 33 – Fase 3. Fotos dos controles positivos CP8 e CP9..... | 95 |
| Figuras 34 e 35 – Fase 3. Fotos das feridas tratadas com LQM 9.1.7 e LQM 11.1.7..... | 96 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Estrutura química dos derivados tiossemicarbazônicos..... | 51 |
| Tabela 2 – Efeito dos derivados tiossemicarbazônicos sobre a viabilidade celular em 10 µM.. | 54 |
| Tabela 3 – Avaliação macroscópica do tamanho residual da ferida na Fase 1 | 65 |
| Tabela 4 – Avaliação macroscópica do tamanho residual das feridas na Fase 1..... | 66 |
| Tabela 5 – Análise das variáveis microscópicas na Fase 1: retração da ferida com todos os grupos LQM..... | 69 |
| Tabela 6 – Análise das variáveis microscópicas na Fase 1..... | 70 |
| Tabela 7 – Análise das variáveis microscópicas na Fase 1: importante deposição de colágeno no centro da ferida..... | 73 |
| Tabela 8 – Análise post-hoc das variáveis macroscópicas na Fase 2..... | 77 |
| Tabela 9 – Fase 2. Avaliação do tamanho residual da ferida por teste qui-quadrado..... | 79 |
| Tabela 10 – Fase 2. Avaliação microscópica do tamanho residual das feridas com LQM 9.1 e LQM 11.1..... | 80 |
| Tabela 11 – Análise das variáveis microscópicas na Fase 2..... | 83 |
| Tabela 12 – Análise celular das variáveis microscópicas na Fase 2..... | 84 |
| Tabela 13 – Análise post-hoc das variáveis microscópicas na Fase 2..... | 86 |
| Tabela 14 – Fase 3. Avaliação macroscópica do tamanho residual das feridas..... | 90 |
| Tabela 15 – Análise das variáveis microscópicas na Fase 3: ausência de hiperemia e retração total das feridas..... | 91 |
| Tabela 16 – Análise das variáveis microscópicas na Fase 3..... | 92 |
| Tabela 17 – Análise post-hoc das variáveis microscópicas na Fase 3..... | 93 |

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AGEs - Produtos de Glicação Avançada (do inglês *Advanced Glycation End-products*)

ALEs – Produtos de Lipoxidação Avançada (do inglês *Advanced Lipoxidation Endproducts*)

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSA - Soro fetal bovino

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CML – Carboximetilisina

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COOH - Ácido carboxílico

DM - Diabetes *mellitus*

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

DMEN - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

d-P – Dexpantenol

ECRs - Espécies carbonílicas reativas

EGF – Fator de crescimento epidérmico

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

EPI - Equipamento de proteção individual

FGF – Fator de crescimento dos fibroblastos

GO - Glioxal

HbA1c - Hemoglobina glicada

HE - Hematoxilina eosina

ICBS – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

ICF - Instituto de Ciências Farmacêuticas

KGF – Fator de crescimento dos queratinócitos

LFC - Laboratório de Farmacologia Cardiovascular

LFI - Laboratório de Farmacologia e Imunidade

LQM – Laboratório de Química Medicinal

MEC – Matriz extracelular

MMPs – Metaloproteinases

MTT – Teste colorimétrico do Metiltetrazolium

NO - Óxido nítrico

PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas

RAGE – Receptores específicos para glicoproteínas hiperglicadas

RT – Responsável técnico

TIMPS – Inibidores teciduais das metaloproteinases

TGF- β – Fator de crescimento de transformação beta

UV - Ultravioleta

VEGF - Fator de crescimento endotelial

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 Objetivo Geral | 22 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 22 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 24 |
| 3.1 A pele | 24 |
| 3.1.1 A epiderme | 25 |
| 3.1.2 Derme | 26 |
| 3.2 Hipoderme | 27 |
| 3.3 Lesões na pele | 27 |
| 3.4 Processo de cicatrização | 28 |
| 3.4.1 Fases da cicatrização e os componentes envolvidos | 28 |
| 3.5 Tipos de cicatrização | 33 |
| 3.5.1 Cicatrização por primeira intenção | 33 |
| 3.5.2 Cicatrização por segunda intenção | 35 |
| 3.6 Fatores que influenciam na cicatrização | 36 |
| 3.7 Produtos finais da glicação avançada (AGEs) e diabetes: interferência na cicatrização | 38 |
| 3.8 Procedimentos e produtos promissores na cicatrização | 41 |
| 3.9 Substâncias tópicas com atividade cicatrizante | 42 |
| 3.10 Tiossemicarbazona: atividades biológicas e obtenção das sínteses dos derivados | 45 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 49 |
| 4.1 Tipo de estudo | 49 |
| 4.2 Local do Estudo | 49 |
| 4.3 Aspectos Éticos | 49 |
| 4.4 Síntese dos derivados a partir da tiossemicarbazida e teste de atividade antiglicante para seleção dos derivados | 50 |
| 4.5 Teste de citotoxicidade por viabilidade celular com derivados de tiossemicarbazona através do teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT) | 53 |
| 4.6 Formulação do produto tópico | 55 |
| 4.7 Cálculo do tamanho da amostra | 56 |
| 4.8 Testes de cicatrização <i>in vivo</i> | 57 |
| 4.8.1 Caracterização dos animais e condições de manutenção | 57 |
| 4.8.2 Delineamento experimental | 57 |

| | |
|--|------------|
| 4.8.3 Procedimento anestésico-cirúrgico | 58 |
| 4.8.4 Acompanhamento dos animais e análise macroscópica..... | 58 |
| 4.8.5 Eutanásia | 59 |
| 4.8.6 Análise histológica | 59 |
| 4.8.7 Análise Estatística | 61 |
| 5 RESULTADOS e DISCUSSÃO | 63 |
| 5.1 Fase de Hemostasia / Inflamatória (Fase 1)..... | 63 |
| 5.2 Fase Proliferativa (Fase 2) | 75 |
| 5.3 Fase Proliferativa (fase 3)..... | 89 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 98 |
| 8 REFERÊNCIAS | 99 |
| APÊNDICE A | 108 |
| APÊNDICE B..... | 109 |
| ANEXO A..... | 110 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As feridas crônicas são frequentemente descritas como uma epidemia, geram déficit à estrutura econômica da saúde do país, dos pacientes e seus familiares por ser um problema recorrente e incapacitante. Interferem diretamente na qualidade de vida por causarem dor, maior tempo de internação e até mesmo morte.

Com o aumento do envelhecimento, do diabetes e da obesidade na população, observa-se um ônus econômico ainda maior no tratamento das feridas. Além do impacto financeiro, o impacto social também é fato importante, pois há perda de produtividade dos indivíduos afetados com os cuidados prolongados requeridos pelo tratamento, contribuindo significativamente para o agravamento do problema (MORAES et al., 2017).

É expressiva na população a ocorrência de feridas complexas e crônicas em membros inferiores (úlceras venosas, úlceras do pé diabético) e lesões por pressão, as quais podem perdurar por meses ou anos. Nesse contexto, a avaliação e o cuidado tornam-se desafios frente às dificuldades no processo de cicatrização, cujos fatores locais e sistêmicos podem influenciar de maneira expressiva, modificando a evolução do processo. Isso pode significar aumento do tempo de cicatrização, interferindo na qualidade da cicatriz, sendo relevante na apresentação ou não de complicações (CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, 2007).

Os curativos realizados diariamente, na tentativa de restaurar a integridade da pele, requerem o desenvolvimento de produtos e substâncias de baixo custo, que acelerem a cicatrização e que tenham o mínimo de efeitos colaterais.

Substâncias têm sido testadas com essas finalidades. Dentre as substâncias tópicas estudadas para viabilizar a cicatrização estão as estatinas, conhecidos compostos para redução de lipídios com comprovada ação anti-inflamatória e antibacteriana. Elas têm sido usadas na cicatrização de feridas e outras condições inflamatórias (BITTO, MINUTOLI; ALTAVILLA, 2008).

O ácido hialurônico, outra substância tópica, tem sido estudado e empregado no tratamento local de feridas e utilizado sob a forma de creme, gel ou por meio de gaze impregnada para favorecer a cicatrização (DALMEDICO, 2016).

O gel à base de quitosana em queimaduras apresentou decréscimo no tempo de cicatrização e o gel de quitosana a 2% empregado em feridas cutâneas de ratas diabéticas otimizaram a reepitelização e contração da ferida (NASCIMENTO et al., 2009).

A própolis vermelha, produto nativo do nordeste brasileiro, tem demonstrado atividade cicatrizante em estudos sobre queimaduras e ulcerações (BASÍLIO, 2018).

Feridas são também tratadas por via tópica com vitaminas como o dexapantenol ou d-pantenol. Trata-se de uma pró-vitamina do complexo B capaz de acelerar a epitelização de feridas (EBNER et al., 2002).

As guanidinas e seus derivados, classe importante de compostos nitrogenados, também apresentam características que merecem destaque. A aminoguanidina, seu derivado de maior importância, possui um grupo hidrazina ligado ao átomo de carbono e apresenta atividade de inibição de produtos glicosados, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (HORI et al, 2012).

Estudos demonstram sua importância na redução de produtos finais da glicação avançada (AGEs) e da glicemia em pacientes diabéticos. Para Ferreira (2011), a aminoguanidina melhorou o perfil glicêmico dos animais diabéticos e preveniu a formação de AGEs. Sarmiento (2016) observou que os derivados da aminoguanidina apresentaram baixa citotoxicidade, potencial antiglicante, redução da glicemia, frutossamina e hemoglobina glicada em ratos diabéticos. Estudo de Gomes (2019) evidenciou que os derivados aminoguanidínicos reduziram a glicemia em animais em até 60% e obteve expressivos resultados da atividade antiglicante (entre 95 e 99%).

A aminoguanidina tem potencial antiglicante e anti-inflamatório e acredita-se que essas características possam contribuir no processo de cicatrização. Veríssimo (2014) destaca em seu estudo que a aminoguanidina é uma substância com atividade antimicrobiana e que não trouxe repercussões negativas ao tecido de granulação, além de reduzir o tempo de cicatrização.

Baseado nos estudos sobre a aminoguanidina, esse estudo foi realizado com derivados sintéticos da molécula original de tiossemicarbazona, que são bioisómeros da aminoguanidina e apresentam, portanto, semelhanças estruturais com a tiossemicarbazona. Acredita-se que esses derivados possam demonstrar atividade antiglicante e cicatrizante, minimizando o processo inflamatório nos pacientes portadores de feridas, culminando, possivelmente, na aceleração da cicatrização a partir dessas características.

O tratamento adequado das feridas é fundamental para a cicatrização e prevenção de recidiva. Por isso, a escolha da terapêutica deve levar em consideração a relação entre o custo e o benefício, pois em muitos casos os pacientes não seguem o tratamento por motivo financeiro.

Devido à alta demanda de portadores de feridas que necessitam de efetividade, menor tempo e baixo custo em seus tratamentos, esse estudo testou derivados da tiossemicarbazona com essas finalidades.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial cicatrizante de derivados tiossemicarbazonas no tratamento de feridas em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Verificar a citotoxicidade dos derivados de tiossemicarbazonas;
- ✓ Realizar teste para atividade antiglicante de derivados de tiossemicarbazonas;
- ✓ Realizar atividade cicatrizante *in vivo* de derivados de tiossemicarbazonas;
- ✓ Analisar histologicamente a pele dos animais e os efeitos dos derivados de tiossemicarbazonas após tratamento tópico.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano que reveste o organismo e reflete condições como saúde, idade, diferenças étnicas e culturais. Desempenha funções importantes como a proteção, excreção, termorregulação e as percepções sensoriais.

A barreira física gerada pela pele não só protege os órgãos e limita a passagem de substâncias, mas também estabiliza a temperatura e a pressão sanguínea através de seus sistemas de circulação e evaporação. A pele é capaz de sintetizar hormônios (ex. dehidrotestosterona) e vitaminas (ex. vitamina D) assim como metabolizar xenobióticos (CHUONG et al., 2002).

A pele também é responsável por sensações de toque, dor, calor e frio (através de suas terminações nervosas livres e encapsuladas como os corpúsculos de Vater, Pacini e Ruffini); expressa cor em situações de raiva, ansiedade, medo, além de servir como diferenciação pessoal por sua variação individual de cor, odor e textura (GOODWIN; WHEAT, 2004).

Segundo Pereira (2011), a pele constitui importante barreira contra a invasão de bactérias, visto que a mesma apresenta componentes mecânicos (queratina), químicos (secreção sebácea, secreções digestivas e muco), imunitários (IgA secretora e tecido linfático associado à pele) e biológicos (microbiota residente normal).

É composta por duas camadas distintas: a **epiderme**, a camada mais superficial, constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, e a **derme**, constituída por diversos tipos celulares, fibras colágenas e elásticas mergulhadas em uma matriz extracelular onde também se situam os vasos e nervos; e abaixo da pele, encontra-se a **hipoderme**, onde predomina o tecido adiposo, que une os órgãos subjacentes (RESENDE, BACHION, ARAÚJO, 2006; MORESKI, MELLO, BUENO, 2018).

O tecido epitelial é composto pelas células epiteliais e pela matriz extracelular, que consiste na lâmina basal (ROSS; PAWLINA, 2012). A lâmina basal é uma camada de glicoproteínas (laminina, colágeno do tipo IV e entactina) e proteoglicanas secretadas pelas células epiteliais, que, como o nome diz, se situa na base do tecido. Ela tem 40 a 120nm de espessura e é visível somente ao microscópio eletrônico (ALBERTS et.al, 2002).

3.1.1 A epiderme

A epiderme é um epitélio estratificado (mais de uma camada de células), pavimentoso (células achatadas), queratinizado e avascular. A espessura da epiderme varia de 0,4 a 1,5mm, enquanto a espessura completa da pele varia de 1,5 a 4,0mm.

A maioria das células (90%) deste estrato são os queratinócitos, os quais se organizam em quatro camadas (**basal, espinhosa, granulosa e córnea**) que durante seu processo de diferenciação formam células anucleadas, ricas em queratina e que se depositam na superfície da pele. Em diversos níveis, estão intercalados entre os queratinócitos: os melanócitos que produzem a melanina, as células de Langerhans com função imunológica e as células de Merkel integradas ao sistema nervoso (ELDER, 2011).

A epiderme não possui terminações nervosas e é avascular, pois é nutrida por vasos sanguíneos presentes na derme. Contém folículos pilosos, unhas, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas e age essencialmente contra lesões e a perda de líquidos. As células de Langherans são responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T ao passo que as células Merkel formam terminações nervosas a partir do contato com fibras amielínicas. Os melanócitos são responsáveis pela pigmentação da pele através da síntese de melanina (MASSON, 2011).

O estrato basal, conhecido também por estrato germinativo, é formado por células cilíndricas ou cúbicas, as quais se apoiam na membrana basal através de hemidesmossomos (GENESER, 2003). As células desta camada são pouco diferenciadas, entretanto possuem intensa atividade mitótica, originando as outras células dos demais estratos. Além disso, as células basais podem circundar as glândulas sebáceas e folículos pilosos presentes na derme (MASSON, 2011).

O estrato espinhoso é uma camada mais espessa e está acima da camada basal, geralmente formada por células poligonais, as quais são separadas por pontes intercalares. A denominação espinhosa advém da forma parecida aos espinhos dos prolongamentos citoplasmáticos, os quais estabelecem a junção entre as células (GENESER, 2003). A camada espinhosa possui células de Langherans (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2011) e as de Malphigi, mais resistentes aos atritos (ALMEIDA, 2009). O estrato granuloso é superior ao espinhoso e possui células repletas por grânulos citoplasmáticos bastante basófilos, de querato-hialina. Estes grânulos por conterem lorícina e filagrina auxiliam na organização da queratina no espaço intracelular (BRYANT; NIX, 2015).

O estrato lúcido, situado entre o estrato granuloso e córneo, está presente nas regiões das palmas dos pés e mãos, sendo ausente em sobrancelhas (BRYANT; NIX, 2015).

Histologicamente, essa camada apresenta-se translúcida e é formada por células que sofreram a degeneração dos seus núcleos (MASSON, 2011; BRYANT; NIX, 2015).

O estrato córneo é a camada mais superior da epiderme e apresenta aproximadamente 80% de células mortas (córneas) e outras proteínas insolúveis. Na superfície dessa camada, ocorre a separação de células como resultado da degradação proteolítica. Ademais, a mesma é enriquecida por uma matriz lipídica, a qual aumenta a proteção da pele (BRYANT; NIX, 2015).

3.1.2 Derme

A derme é um tipo de tecido conjuntivo caracterizado por reentrâncias conhecidas como papilas dérmicas, as quais possibilitam maior contato entre a derme e epiderme (ALMEIDA, 2009). Derivada da mesoderme, ela contém colágeno, fibras, vasos sanguíneos, fibroblastos, glândulas sebáceas, terminações nervosas e músculos eretores do pelo (MASSON, 2011).

Fibroblastos, células dendríticas dérmicas, mastócitos e macrófagos constituem os principais componentes celulares da derme. Dentre os componentes extracelulares estão as fibras colágenas e elásticas e a substância fundamental amorfa. O tecido conjuntivo é o componente mais abundante desta região (70%) e é constituído de fibras colágenas. Na derme papilar, estas são mais delicadas e finas quando comparadas às da derme reticular, onde se apresentam como feixes mais grossos (ROBBINS, 2010).

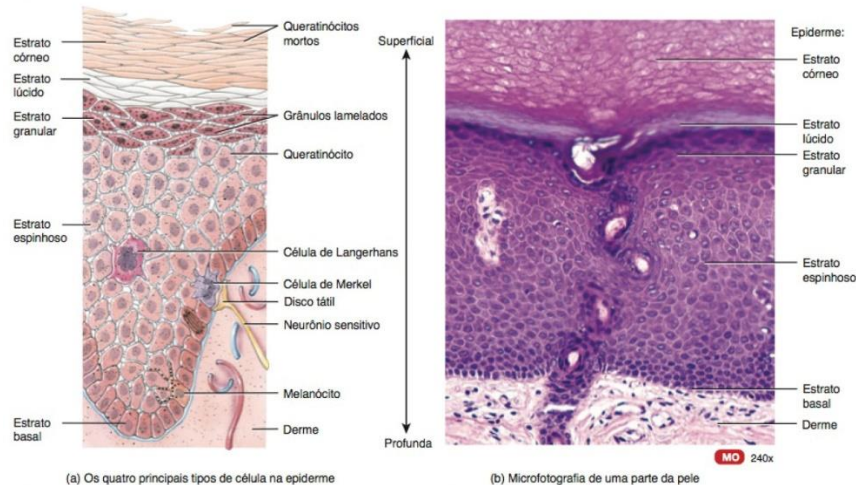
Os fibroblastos sintetizam e secretam o procolágeno e são as principais células presentes nesta camada, contudo a derme possui uma boa quantidade de mastócitos e macrófagos (GENESER, 2003; ALMEIDA, 2009).

Os fibroblastos e os queratinócitos parecem desempenhar um papel central durante a cicatrização, uma vez que suas interações participam na mudança do ambiente da ferida de um tecido de granulação inflamatório para um tecido de granulação. Além disso, durante a migração da margem da ferida e a proliferação de queratinócitos, envolvidos na reepitelização, os fibroblastos, diferenciados em miofibroblastos e envolvidos na contração da ferida e na remodelação da matriz extracelular (MEC), são responsáveis pela produção de componentes da MEC, incluindo proteoglicanos, glicosaminoglicanos, elastina e colágeno (WERNER; KRIE; SMOLA, 2007).

A derme possui predominantemente colágeno, entretanto as fibras elásticas conferem um grau de elasticidade a essa camada (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2011). Danos provocados na derme reticular (mais profunda), por exemplo, necessitam de enxertos a fim de serem reestruturados (GANTWERKER; HOM, 2011).

Entre a epiderme e a derme encontra-se a zona da membrana basal, uma rede que liga os queratinócitos da camada basal com as fibras colágenas da derme papilar (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2009).

Figura 1 – Estratos da derme



Fonte: TORTORA; NIELSEN, 2012.

3.2 Hipoderme

O tecido subcutâneo, conhecido também como hipoderme, funciona como isolante térmico e/ou reserva energética, pois é formado essencialmente por adipócitos. Os lóbulos de gordura são separados por septos fibrosos onde passam pequenos vasos (CHU, 2008).

3.3 Lesões na pele

A pele está sujeita a agressões constantes por ser a primeira barreira de proteção do organismo contra agentes externos, tais como: pressão, traumas mecânicos, físicos, químicos e biológicos, o que pode causar sua ruptura, causando lesões ou perda do tecido. Para que seja reestabelecida a integridade funcional, dá-se início a um processo complexo para a cicatrização da ferida, assim, a capacidade de reparação do indivíduo é muito importante (OLIVEIRA, DIAS, 2012; MORAIS et al., 2013). Elenca-se que as causas das lesões podem ser exógenas (meio ambiente) ou endógenas (biológicos).

Nesse contexto, as causas exógenas são representadas pelos agentes físicos, químicos, biológicos e alteração da nutrição. As causas endógenas relacionam-se com a genética, resposta imunitária e fatores emocionais.

Como agentes físicos, pode-se citar: força mecânica (traumas), radiações, variações de temperatura e pressão. Os agentes químicos: poluentes ambientais, substâncias químicas, como

medicamentos e drogas de uso abusivo. Os agentes biológicos são os micoplasmas, vírus, bactérias, protozoários. A alteração da nutrição envolve tanto a deficiência como o excesso de nutrientes (KUMAR et al., 2010).

Não se pode esquecer que as causas das lesões são estudadas separadamente por questão didática, porém, é inquestionável a interação entre as causas exógenas e endógenas como condição social, perfil genético e psíquico do indivíduo.

Entre os inúmeros mecanismos de produção de lesões, existem três muito importantes: (1) resposta imunitária inata ou adaptativa, ou seja, o mecanismo como o organismo reconhece e se defende de agressões; (2) redução na disponibilidade de O₂ às células (hipóxia); (3) geração de radicais livres (PEREIRA, 2011).

No mecanismo (1): a imunidade inata caracteriza-se pela rápida resposta à agressão, independentemente de estímulo prévio, sendo a primeira linha de defesa do organismo. Os mecanismos correspondem a barreiras físicas, químicas e biológicas, componentes celulares e moléculas solúveis. A resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas (CRUVINEL et al., 2010).

No mecanismo (2), a hipóxia e anóxia, diminuição ou interrupção do O₂ são causas importantes de lesões. As células, sem o fornecimento adequado de O₂ e nutrientes, degeneram ou morrem. Visto que, sofrem alterações progressivas que geram respostas adaptativas, lesões reversíveis ou lesões irreversíveis (PEREIRA, 2011).

No mecanismo (3), a geração de radicais livres ocorre não só no metabolismo normal das células, na cadeia respiratória, como também em processos de oxidação na síntese do colágeno, por exemplo. Os radicais livres são moléculas que apresentam um elétron não emparelhado no orbital externo, o que as torna muito reativas a qualquer outro tipo de molécula, inclusive lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Os radicais livres podem iniciar reações em cadeia, que levam à formação de outros radicais, aumentando sua capacidade de produzir lesões (STADTMAN, 2006).

3.4 Processo de cicatrização

3.4.1 Fases da cicatrização e os componentes envolvidos

A cicatrização é um processo de reconstituição do tecido e ocorre a partir de uma lesão e da instalação da ferida. É um processo regulado por mecanismos celulares, humorais e moleculares, que se iniciam após a lesão e podem durar anos, dependendo do grau de comprometimento do tecido cutâneo (REINKE; SORG, 2012).

Segundo Dealey (2008), a cicatrização em tecidos é um processo complexo, pois pode sofrer influência de fatores locais e sistêmicos, além de envolver várias células e enzimas. Ele exige do organismo a ativação, a produção e a inibição de grande número de componentes moleculares e celulares, os quais são responsáveis pelo processo de restauração tissular.

O processo cicatricial é comum a todas as feridas, independentemente do agente que a causou, é sistêmico e dinâmico e consiste em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que ocorra a reconstituição tecidual (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

No processo, um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, seja por trauma ou por necrose. Resumidamente, o primeiro passo é a instalação de reação inflamatória, com reabsorção do sangue extravasado e dos produtos de danos teciduais pelas células fagocitárias. Na sequência: proliferação fibroblástica e endotelial; formação do tecido conjuntivo cicatricial e remodelação do tecido cicatricial com diminuição do volume da cicatriz.

Figura 2 – Processo de cicatrização



Fonte: AUTORA, 2020.

Didaticamente, a cicatrização ocorre em três fases.

Fase inflamatória: a primeira fase do processo de cicatrização inclui uma etapa caracterizada por fenômenos vasculares, hemostasia e coagulação, e outra por mecanismos predominantemente celulares. A hemostasia pode ser considerada como uma fase distinta. A lesão inicial dos tecidos induz dano vascular com hemorragia local.

Imediatamente após a lesão, há liberação de substâncias vasoconstritoras, principalmente tromboxano A2 e prostaglandinas, pelas membranas celulares. O endotélio

lesado e as plaquetas estimulam a cascata da coagulação, tendo assim papel fundamental na cicatrização (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Visando a hemostasia, a cascata é iniciada e grânulos são liberados das plaquetas, os quais contêm fator de crescimento de transformação beta - TGF- β (e também fator de crescimento derivado das plaquetas - PDGF, fator de crescimento derivado dos fibroblastos - FGF, fator de crescimento epidérmico - EGF, prostaglandinas e tromboxanos), que atraem neutrófilos à ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

O coágulo formado por colágeno, plaquetas e trombina servirá de reservatório proteico para a síntese de citocinas e fatores de crescimento, o que aumenta seus efeitos, iniciando assim a resposta inflamatória com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Por meio da quimiotaxia, haverá a migração de neutrófilos para a ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Os neutrófilos e os monócitos são recrutados ao local da ferida por quimiocinas, liberadas durante a fase de hemostasia por mastócitos, desempenham funções de lise e de fagocitose de bactérias e proteínas presentes no leito da ferida (SIMPSON; ROSS, 1972).

A infiltração por neutrófilos pode durar alguns dias e prolonga-se caso ocorra a contaminação da ferida, por exemplo. São também responsáveis pela liberação de proteases, como colagenase e elastase, as quais permitem a sua passagem pela membrana dos vasos. Os receptores de integrina presentes na superfície destas células vão permitir a sua comunicação com a MEC (MERCURIO, 2002).

Os monócitos são recrutados pelas mesmas quimiocinas que os neutrófilos. Os produtos de degradação da MEC, como o colágeno, a fibronectina e a trombina, são específicos para os monócitos (SINGER; CLARK, 1999).

Os macrófagos são considerados as células mais importantes da fase inflamatória pois fazem a lise e a fagocitose, contribuindo para a progressão da cicatrização para a fase proliferativa, induzindo a angiogênese e a formação de tecido de granulação. São também responsáveis pela liberação de fatores de crescimento (PDGF, TGF- α , TGF- β), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). É importante distinguir que o TGF- β 1 e o TGF- β 3 têm funções distintas, o primeiro estimulando a cicatrização e o segundo inibindo-a (WERNER; GROSE, 2003).

Os macrófagos tem importante função na migração celular e síntese da MEC pois fazem a transição entre a fase inflamatória e a fase proliferativa. Como na etapa anterior, continua como destaque a ação dos mediadores químicos, que podem ser agrupados em aminas

vasoativas (histamina e serotonina), proteases plasmáticas (cininas e sistema complemento), proteínas da coagulação, derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), radicais livres, citocinas e fatores de crescimento (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

Na **fase proliferativa** haverá predomínio de mecanismos celulares com a produção de nova barreira permeável (reepitelização), formação de novos vasos (angiogênese) e reestruturação da integridade da derme (fibroplasia).

A migração dos queratinócitos ocorre nas primeiras 24 horas após a lesão cutânea inicial, a partir dos bordos da ferida e a proliferação dos queratinócitos entre 1 a 2 dias após a lesão inicial com a migração e formação do novo epitélio. Após a migração, há reestruturação da membrana basal com diferenciação do neo-epitélio (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994). A reestruturação da membrana ocorre entre 7 a 9 dias após o início da reepitelização, devolvendo a adesão aos queratinócitos da base e estabilização da derme. Os fatores de crescimento EGF, TGF- α e fator de crescimento dos queratinócitos (KGF) desempenham funções importantes na migração e proliferação dos queratinócitos (LAPLANTE et al., 2001).

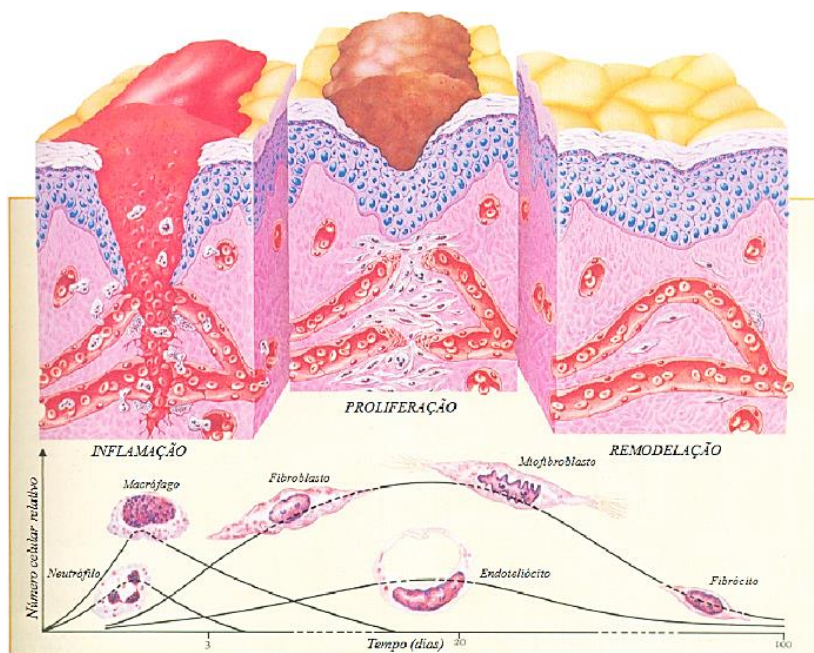
Angiogênese: a reconstrução da derme inicia-se 3 a 4 dias após a lesão inicial com a formação de tecido de granulação e o crescimento de novos vasos a partir de vasos já existentes, próximos às bordas da ferida. Há a proliferação das células endoteliais, formação da estrutura tubular do vaso e reconstrução de sua membrana basal. Os novos vasos vão estimular a síntese do tecido de granulação, gerando um melhor aporte de oxigênio, nutrientes e células inflamatórias, lembrando que os fatores de crescimento como VEGF (originados do macrófago) serão fundamentais para a migração de células endoteliais (MARX; PERLMUTTER; MADRI, 1994).

Na **fibroplasia** há síntese de colágeno e de outras proteínas da MEC, com a migração e proliferação dos fibroblastos para o coágulo de fibrina formado precocemente no processo de cicatrização. Após a migração, ocorrem modificações nos fibroblastos que facilitam a síntese de proteínas e, na contração da ferida, por meio da variação do fibroblasto em miofibroblasto (SINGER; CLARK, 1999).

A fibroplasia também depende da ação de vários fatores de crescimento. O PDGF e o TGF- β promovem a proliferação dos fibroblastos. O EGF e o FGF promovem não só a proliferação, como também a migração dos fibroblastos. A proliferação dos fibroblastos é estimulada pela baixa pressão parcial de oxigênio e pH ácido nos tecidos lesados (fatores que são atenuados pela progressão da angiogênese) e pelas proteínas da MEC, destacando-se a fibronectina que fornece uma base aderente para a migração (CLARK, 1993).

Fase de remodelação: nessa fase haverá deposição de novos elementos da MEC e sua alteração com o tempo, ao longo da cicatrização. O coágulo de fibrina vai sendo substituído por tecido de granulação. No início ocorre deposição de fibronectina, colágeno, ácido hialurônico e proteoglicanos. Nesta fase, o tecido de granulação é rico em colágeno tipo III e vasos e vai sendo substituído por uma cicatriz com predomínio de colágeno tipo I (WELCH; ODLAND; CLARK, 1990).

Figura 3 – Fases do processo de cicatrização de feridas



Fonte: ISAAC et al., 2010 adaptado de Gray et al.

As fibras de colágeno tipo III são produzidas entre 48 a 72 horas após a lesão, com secreção máxima após 5 a 7 dias. Ao longo do ano seguinte, ocorre então a substituição progressiva do colágeno tipo III por colágeno tipo I. A força de tensão da cicatriz aumenta, apresentando cerca de 40% em 1 mês, atingindo um valor máximo de 70% ao fim de 1 ano (DESMOULIERE et al., 1995).

A degradação do colágeno tipo III ocorre ao mesmo tempo que a síntese do colágeno tipo I e este equilíbrio resulta da atividade combinada de MMPs e de inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). A contração da ferida atinge o seu máximo após 2 semanas. O principal mediador deste processo é o miofibroblasto (VISSE; NAGASE, 2003).

As feridas crônicas não seguem o processo fisiológico normal tendo como resultado uma falta de coordenação das sequências da cicatrização, impedindo a recuperação da

integridade no intervalo de tempo normal, em média de 6 semanas (LAZARUS; COOPER; KNIGHTON, 1994).

As principais causas das feridas crônicas são a insuficiência venosa crônica dos membros inferiores, as alterações vasculares e neuropáticas periféricas associadas ao Diabetes *mellitus* (DM) e as úlceras relacionadas com mecanismos de pressão. Até o momento a fisiopatologia das feridas crônicas não se encontra totalmente esclarecida, mas pode-se citar alguns fatores, como uma menor atividade mitogênica, o envelhecimento precoce dos fibroblastos, maior atividade das MMPs, resultando em maior degradação da MEC e mecanismos inflamatórios persistentes (DIEGELMANN, 2003).

3.5 Tipos de cicatrização

3.5.1 Cicatrização por primeira intenção

Ocorre quando as bordas da ferida foram aproximadas por suturas e não tenha presença de infecção. Esse processo é mais rápido e forma cicatrizes menores, pois a destruição nas suas bordas é menor. Exemplo: feridas cirúrgicas. Nesse exemplo, o sangue extravasado pelo corte forma um coágulo, que fica entre as margens da ferida. A reação inflamatória se instala a partir da liberação de mediadores originados do coágulo de fibrina. IL-1 e TNF- α são liberados por macrófagos do coágulo e por queratinócitos da margem da lesão. Essas citocinas ativam células endoteliais, que expõem moléculas de adesão (ICAM, VCAM, selectinas), favorecendo a adesão de leucócitos (PEREIRA, 2011).

Nesse momento já ocorre vasodilatação arteriolar com capilares direcionados para o tecido conjuntivo das margens, e devido ao instrumental que produziu a lesão, já houve liberação de taquicinininas pelas terminações nervosas e histamina pelos mastócitos.

A migração de leucócitos para a área ocupada pelo coágulo e para a MEC nas bordas da ferida depende da liberação de diferentes agentes quimiotáticos. Nas primeiras horas: há uma migração maciça de neutrófilos gerados a partir da fibrina (fibrinopeptídeos) e do complemento. Com 18 horas, já ocorre grande produção de quimiocininas (CC) que atraem monócitos e quimiocinas (CXC) que recrutam linfócitos, os quais predominam no exsudato após 24h. A origem dessas quimiocininas são células da margem da ferida, monócitos e plaquetas presos no coágulo e células endoteliais de vasos nas bordas da lesão. Os fagócitos fagocitam os coágulos, dando início à produção do tecido conjuntivo cicatricial e a regeneração do epitélio. Essa fase também depende de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (KUMAR et al., 2010).

Os queratinócitos da borda, proliferados, prendem-se à matriz provisória de fibrina e em seguida sintetizam membrana basal, com a qual se ligam e estabelecem relação com a MEC por macrófagos e linfócitos exsudados. Após, ainda ocorre a proliferação de fibroblastos, seu deslocamento e depósito de componentes da matriz, como ácido hialurônico e colágeno tipo III, com fibras finas. Ao mesmo tempo, ocorre a formação de novos capilares a partir do endotélio de capilares na margem da ferida, estimulados pelos fatores de crescimento. Essas novas células endoteliais produzem metaloproteases (que digerem a membrana basal), deslocam-se (quimiotaxia) e formam um broto celular que cresce em direção ao coágulo, no qual está ocorrendo a deposição da MEC neoformada (PEREIRA, 2011).

Com a síntese da membrana basal pelas células endoteliais, o broto se organiza, forma a luz do novo capilar com o capilar de origem e uma rede capilar que acompanha a nova matriz que está sendo produzida por fibroblastos, dando origem a um tecido conjuntivo vascularizado, com leucócitos e matriz extracelular formada por fibras colágenas finas (colágeno tipo III), ácido hialurônico e quantidade moderada de proteoglicanos, que receberá o nome de tecido de granulação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Macroscopicamente, o tecido de granulação é róseo, tem aspecto granuloso e é edemaciado pois o endotélio capilar não apresenta estruturas juncionais completas, havendo passagem de líquidos para o interstício. Com cerca de 5 dias após a sutura, o tecido de granulação preenche todo o espaço da ferida e o epitélio da epiderme já adquire sua espessura normal, apresentando inclusive o início da queratinização. Começa então, a remodelação do tecido cicatricial. A quantidade de colágeno do tipo I começa a predominar em relação ao tipo III e as fibras colágenas tornam-se mais grossas e compactas, comprimindo os capilares e reduzindo o seu número (KUMAR et al., 2010).

As células fagocitárias desaparecem (por apoptose) e o tecido de granulação passa a ser substituído por um tecido conjuntivo mais denso e menos vascularizado, situado logo abaixo da epiderme agora já regenerada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Os miofibroblastos sintetizam actina que gera a contração da cicatriz, aproximando ainda mais as bordas da ferida. No caso das feridas por primeira intenção, a contração será pequena. Apesar de estar consolidada por volta de 10 dias, a cicatriz leva algumas semanas para completar a remodelação e alcançar resistência máxima (PEREIRA, 2011).

A substituição de colágeno tipo III por colágeno tipo I e as modificações de proteínas não colágenas da parte amorfa vai sendo controlada pela síntese e degradação desses componentes por metaloproteases, garantindo que haja substituição por outros componentes.

Um dos importantes estímulos para o controle do volume de tecido cicatricial é a oxigenação de células responsáveis pela síntese da MEC. Visto que, o oxigênio é indispensável pela síntese de colágeno (PEREIRA, 2011).

Com deposição rápida de MEC, há compressão dos capilares neoformados, diminuindo sua luz e reduzindo a perfusão do tecido cicatricial. Com a ação proteolítica da remodelação (ação das metaloproteases), há liberação de peptídeos antiproliferativos que dificultam a migração e induzem a apoptose, o que limitará a neoformação vascular e proliferação fibroblástica (KUMAR et al., 2010).

Na remodelação, citocinas, quimiocinas e produtos da degradação da MEC atuam em receptores dos fibroblastos, induzindo modificação na expressão gênica, induzindo a síntese de proteínas contráteis. Dessa maneira, os fibroblastos adquirem o fenótipo de miofibroblastos e ocorre a redução da síntese de MEC, atuando também no processo de retração da cicatriz (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

A resistência da cicatriz na segunda semana corresponderá a cerca de 10 a 20% da resistência da pele não lesada, aumentando progressivamente até atingir cerca de 80% da resistência original. Esse aumento da resistência é decorrente de maior quantidade de colágeno tipo I (PEREIRA, 2011).

Portanto, conclui-se que o processo de cicatrização é controlado por diversos fatores de crescimento, citocinas, sintetizados por macrófagos, plaquetas, células endoteliais e linfócitos T, além daqueles liberados pela MEC ou produzidos após proteases nessa matriz (KUMAR, 2010).

Características como maior ou menor velocidade da cicatrização, o tamanho da cicatriz e sua maior ou menor retração dependem da quantidade e da qualidade de citocinas e fatores de crescimento produzidos durante o processo. O equilíbrio entre síntese e degradação da MEC é fundamental para uma cicatrização normal. A degradação depende da produção de metaloproteases e de seus inibidores - TIMP (PEREIRA, 2011).

3.5.2 Cicatrização por segunda intenção

Na cicatrização por segunda intenção, a ferida é extensa e tem margens afastadas, com formação de um grande coágulo. Se houver infecção associada, há reação inflamatória intensa. Nos dois casos a exsudação de fagócitos é muito intensa e forma-se um abundante tecido de granulação. Como as bordas são distantes, a regeneração da epiderme é mais lenta e demora mais tempo pra se completar. As células da epiderme proliferam nas margens, onde ocorre hiperplasia devido à grande quantidade de fatores de crescimento liberadas a partir das células

exsudadas. Nas fases iniciais, o tecido de granulação faz saliência na superfície da ferida (PEREIRA, 2011).

Com o passar do tempo, o tecido vai sofrendo as mesmas transformações descritas na cicatrização por primeira intenção, sendo muito mais intensa a retração da cicatriz por miofibroblastos (a transformação de fibroblastos em miofibroblastos é muito mais frequente nesse tipo de cicatrização). A retração é tão intensa que pode em alguns meses reduzir a superfície da cicatriz em 90% com relação ao tamanho inicial (KUMAR et al., 2010).

Todas as lesões destrutivas de qualquer órgão ou estrutura podem ter cicatrização pelos mesmos mecanismos descritos para a pele. Se a lesão for extensa, ou em caso de infecção, o processo é mais intenso e maior é a quantidade de tecido de granulação produzido. As cicatrizes formadas podem sofrer retração e remodelamento em graus variáveis, podendo inclusive diminuir de volume ou mesmo desaparecer (PEREIRA, 2011).

3.6 Fatores que influenciam na cicatrização

Fatores locais ou sistêmicos podem influenciar a cicatrização, reduzindo, retardando ou impedindo o processo.

Dentre os fatores locais, a isquemia, por lesões vasculares ou compressão, diminui o aporte de nutrientes para a produção de matriz extracelular, diminui a síntese de colágeno, reduz o pH e aumenta catabólicos, como ADP e adenosina, que têm efeitos anti-inflamatórios e por isso aumentam a liberação de metaloproteases. Isso desequilibra a relação entre a síntese e lise de componentes da MEC, retardando a cicatrização. A temperatura local pode interferir na cicatrização por modificar o fluxo sanguíneo (KUMAR et al., 2010).

Baixa perfusão tecidual, baixo fluxo de O₂, retardam ou até impedem a cicatrização. É o caso das lesões vasculares como aterosclerose, estase venosa, úlceras crônicas em membros inferiores, úlceras por pressão em pacientes acamados (regiões com proeminência óssea), quando a cicatrização pode ser prejudicada pela compressão e pelo mau estado nutricional (DEALEY, 2008).

Quanto aos fatores sistêmicos, indivíduos diabéticos têm cicatrização deficiente devido à hipóxia gerada por lesões vasculares e alterações de células fagocitárias que favorecem infecções. A neuropatia diabética também prejudica a cicatrização devido à redução de estímulos (mediadores) inflamatório liberados por terminações nervosas (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001).

Também no diabetes há aumento da glicação de proteínas, originando os produtos finais da glicação avançada (AGE). Células endoteliais, fibroblastos e macrófagos com receptores específicos (RAGE) tornam-se modificados com a hiperglicemia (hiperglicados). Quando ativados, tais receptores induzem citocinas pró-inflamatórias e proteases que diminuem a expressão de moléculas anti-inflamatórias e anti-proteases naturais favorecendo a ampliação da lesão inflamatória nos processos cicatriciais, o que dificulta a cicatrização (AHMED, 2005).

No hipotireoidismo, há alteração da síntese de componentes da matriz, o que dificulta a cicatrização. Além disso, a desnutrição é outra condição que retarda a cicatrização, com ênfase na deficiência de vitamina C ou zinco, pois interfere diretamente nos processos de síntese de colágeno. O zinco é componente de muitas enzimas (metaloenzimas), inclusive as que participam da síntese de DNA. Neutropenia, neutropatias (defeitos intrínsecos em neutrófilos) e deficiência na síntese de moléculas de adesão do endotélio ou em fagócitos também apresentam retardo na cicatrização, especialmente porque facilitam infecções (PEREIRA, 2011).

Os idosos, por apresentarem comorbidades associadas ao envelhecimento, também têm difícil cicatrização, no entanto não há diferença significativa em relação a um idoso saudável (BIONDO-SIMÕES et al., 2005).

Alguns medicamentos podem interferir na cicatrização de feridas, produzindo efeitos negativos sobre a pele, tornando-a mais suscetível ao surgimento de lesões e outras patologias cutâneas. Os corticosteroides são inibidores da cicatrização porque interferem em todas as fases do processo, reduzindo a resposta inflamatória e a síntese de remodelação da matriz extracelular. No entanto, em cicatrizes cirúrgicas seu efeito em retardar a cicatrização é controverso. Os anti-inflamatórios não-esteroidais, inibidores da COX-1 ou 2, influenciam pouco no processo cicatricial (FREITAS et al., 2011).

Quimioterápicos citostáticos e citocidas prejudicam a cicatrização porque reduzem a fase inflamatória, a proliferação de fibroblastos e a síntese de MEC. Ferreira (2004), em estudo experimental, concluiu que radioterapia pré-operatória e pós-operatória diminui a força necessária à ruptura total das anastomoses e a área percentual ocupada pelo colágeno tipo I (maduro) no 4º e 8º dia de pós-operatório.

Estudos experimentais comprovaram que a nicotina compromete o processo cicatricial, devido à vasoconstrição e geração de monóxido de carbono. Ela gera vasoconstrição e o monóxido de carbono, ocasionando efeitos anti-inflamatórios. Skinovsky (2005) estudou, em 2000 e 2005, a influência a injeção de nicotina subcutânea na cicatrização das anastomoses de

intestino delgado em ratos e concluiu que os animais que receberam nicotina apresentaram cicatrização deficiente quando comparados ao grupo controle.

Confirmando esses dados, Alves (2006) mostrou a cicatrização tecidual deficiente em ratos lactentes de mães que receberam nicotina subcutânea durante a gestação. Houve redução da força de tração, da deposição de colágeno tipo III, da angiogênese e dos miofibroblastos.

Nos casos de traumas extensos, infecções e queimaduras, ocorre baixa perfusão do tecido cicatricial, o que aumenta os metabólitos anti-inflamatórios no local. As falhas na cicatrização em queimados, por exemplo, ocorrem em estágios iniciais, levando à diminuição dos elementos celulares e alterações na síntese de colágeno (CARVALHO et al., 2003).

3.7 Produtos finais da glicação avançada (AGEs) e diabetes: interferência na cicatrização

A formação dos AGEs pode ser considerada uma das principais causas de danos e de comprometimentos vasculares causados pela hiperglicemia constante no DM, os quais causam elevada morbimortalidade (ZIMMET, 2001; ALBERTS et al.; 2002), por isso esse ponto merece atenção.

No processamento dos alimentos, a reação pode conferir aspectos positivos, como a formação do odor e sabor atrativos, mas acarreta consequências nutricionais negativas, como a perda de aminoácidos essenciais e a formação de substâncias potencialmente nocivas à saúde humana. A formação de AGEs e ALEs nos alimentos apresentam efeitos pró-oxidativos e pró-inflamatórios envolvidos nas alterações metabólicas inerentes ao processo de envelhecimento, e também estão envolvidos com a patogênese e a progressão de inúmeras doenças crônicas degenerativas, como o diabetes, o mal de Alzheimer, a insuficiência renal e a aterosclerose. (URIBARRI et al., 2015; VLASSARA, 2005).

Os AGEs são representados por proteínas modificadas por processos oxidativos e não-oxidativos, envolvendo açúcares ou seus produtos de degradação, enquanto os ALEs incluem produtos gerados através da reação entre espécies carbonílicas reativas (ECRs), produzidas a partir de peroxidação lipídica e do metabolismo dos lipídeos, e resíduos nucleofílicos de macromoléculas (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

Uma das principais justificativas para importantes e irreversíveis danos celulares está na reação não enzimática entre açúcares redutores e aminoácidos chamada “Reação de Maillard”, também denominada glicação, que gera compostos presentes no processo de envelhecimento, na progressão de doenças crônico-degenerativas como o diabetes, mal de Alzheimer, insuficiência renal e aterosclerose. Os compostos resultantes são conhecidos como

AGEs, do inglês, *Advanced Glycation Endproducts* e ALEs, do inglês, *Advanced Lipoxidation Endproducts* (HELLWIG; HENLE, 2014).

O estresse oxidativo está frequentemente envolvido nos mecanismos de formação de AGEs e ALEs. Alguns AGEs e ALEs podem apresentar a mesma estrutura, desde que sejam originados de precursores comuns, como é o caso da carboximetilisina (CML), gerada a partir do glioxal (GO), o qual, por sua vez, pode ser formado por meio de ambas as vias oxidativas dos lipídeos ou dos açúcares (VISTOLI et al., 2013).

O mecanismo dos efeitos patológicos dos AGEs no organismo ocorre de quatro formas:

- (1) Modificação da proteína, com alteração de sua função (AHMED, 2005).
- (2) Formação de ligações cruzadas com proteínas, causando enrijecimento tecidual. Uma vez formados, os AGEs fazem ligações cruzadas com proteínas que geralmente são estáveis e de meia vida longa, como o colágeno e as proteínas do cristalino. O colágeno na matriz celular é exposto a altos níveis de glicose. Assim, o colágeno glicado torna-se mais resistente à degradação por metaloproteases, acumula-se e gera disfunção vascular em decorrência da diminuição da flexibilidade e permeabilidade das artérias e do comprometimento cardíaco (BADENHORST et al., 2003).
- (3) A interação entre AGEs e seu receptor induz resposta inflamatória. A interação AGE-RAGE (receptor de AGE) aumenta a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6), TNF- α e moléculas de adesão como endotelina -1, VCAM-1 e selectina, promovendo assim o stress oxidativo, trombogênese, inflamação vascular e angiogênese, eventos estes envolvidos diretamente com as complicações macro e microvasculares do diabetes (SEMBA et al., 2010).
- (4) Aumento do stress oxidativo com a formação de espécies reativas de oxigênio por meio da ligação dos AGEs com seu receptor. Quando há altos níveis de LDL, modificada por AGEs, em pacientes com diabetes, associa-se o stress oxidativo com a oxidação da LDL e formação de placas de ateroma. Dessa maneira, ocorrem tais eventos que geram a progressão de doenças cardiovasculares e representam a maior causa de mortalidade em pacientes diabéticos (NEGRE-SALVAYRE et al., 2008).

Os AGEs podem causar prejuízos ao metabolismo por meio de dois mecanismos básicos. O primeiro é a modificação da estrutura original de biomoléculas, destacadamente a alteração conformacional de proteínas intra e extracelulares e o segundo via a interação desses produtos com receptores sensíveis a AGEs, presentes em uma grande variedade de células, tais como as endoteliais, os monócitos, macrófagos, adipócitos e podócitos, induzindo ao estresse oxidativo, à produção de citocinas inflamatórias e de fatores de crescimento, contribuindo assim

para o surgimento e a progressão de diversas patologias (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

Em indivíduos adultos saudáveis (normoglicêmicos), cerca de 2% das proteínas corporais possuem modificações por AGEs / ALEs, enquanto indivíduos diabéticos possuem cerca de 3 vezes essa média. Efeitos observados no diabetes correspondem a alterações fisiológicas características do envelhecimento, como o escurecimento do cristalino dos olhos (catarata), o que gerou a teoria da glicação como processo diretamente responsável pelo envelhecimento humano (CERAMI, 1985).

Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Por meio da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares, os AGEs promovem, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (JAKUS; RIETBROCK, 2004).

A formação de AGEs ocorre vagarosamente sob condições fisiológicas e afeta predominantemente moléculas de meia-vida longa, como o colágeno, exercendo importante função no processo de envelhecimento (FORBES; SOLDATOS; THOMAS, 2005). No entanto, sob condições de hiperglicemia ou estresse oxidativo, a geração de AGEs aumenta intensamente. Os portadores de diabetes apresentam concentrações séricas de AGEs significativamente mais altas que os indivíduos não-diabéticos (SHARP; RAINBOW; MURKHER, 2003).

A mensuração da hemoglobina glicosilada (HbA1C), tão importante para acompanhamento da glicemia nos indivíduos diabéticos, reflete a ocorrência de hiperglicemias nos últimos três meses e, indiretamente, de glicação avançada. Segundo Rahbar (2005), a HbA1C é importante marcador biomolecular e a sua determinação é considerada, até o presente, o indicador mais confiável de progressão do diabetes.

Da mesma forma, é possível a mensuração de AGEs sérico e também AGEs por autofluorescência da pele. Esse é um método não invasivo para quantificação do acúmulo tecidual de AGEs, validado em pacientes portadores de doença renal crônica em estudo de França et al., (2017), que pode ser útil na quantificação de AGEs nos pacientes portadores de feridas.

Os pacientes diabéticos são muito acometidos pelos efeitos nocivos dos AGEs, por isso faz-se necessária uma avaliação de como isso afeta a circulação sanguínea, principalmente de membros inferiores, sendo esses locais de ocorrência de feridas de difícil cicatrização.

A utilização de agentes antiglicantes pode ter efeito benéfico na diminuição desses compostos e possivelmente minimizar os impactos do processo inflamatório e obstrutivo causados pelos AGEs, colaborando para melhorar a qualidade de vida nesses pacientes. É possível que os AGEs possam diminuir os efeitos deletérios do estresse oxidativo de maneira tópica, haja vista que já existem produtos na dermocosmética que utilizam esta via.

3.8 Procedimentos e produtos promissores na cicatrização

Existe na literatura uma gama de procedimentos descritos que podem, de alguma maneira, beneficiar, acelerar ou melhorar a qualidade da cicatriz ou o processo de cicatrização, especialmente das feridas crônicas. Esses procedimentos podem ser associados ao tratamento com produtos tópicos, por exemplo, para que haja uma potencialização dos benefícios.

Estão sendo testados equivalentes biológicos de pele, formado por queratinócitos cultivados *in vitro*, os quais, quando associados a componentes da MEC, parecem acelerar a reparação de feridas extensas. O efeito acelerador está no fato do enxerto possuir células vivas que produzem fator de crescimento, favorecendo a proliferação fibroblástica e vascular (PEREIRA, 2011).

A capacidade de utilizar uma cultura de células de queratinócitos reduz o tempo de cicatrização de forma relevante (mais de 45% de redução). A técnica minimiza o tempo de internação, de reconstrução da pele, a diminuição do número de procedimentos médicos dos pacientes queimados e um melhor resultado estético. Porém, pode-se citar dificuldades nessa técnica, pelas diferentes etapas na produção e o custo desse procedimento (HENG-YU; SHI-CHU; SHI-HUI, 2011; CHRAPUSTA et al., 2014; HORCH et al., 2005).

A eletroestimulação direta, com corrente alternada de baixa frequência ou de alta voltagem, é outro método utilizado em modelo animal, mas com resultados incipientes em humanos. Observou-se que há o aumento da exsudação de leucócitos e síntese mais rápida de matriz, com maior fluxo de sangue no tecido cicatricial. Os experimentos indicam efeito benéfico da técnica para a cicatrização e a forma de aplicação, relativamente fácil, econômica e aparentemente eficaz (BEHEREGARAY et al., 2014).

A utilização de oxigênio hiperbárico é considerada útil no tratamento de feridas infectadas por microorganismos anaeróbicos ou com necrose óssea. Esse método aumenta a

oxigenação do sangue e a síntese do óxido nítrico (NO), que parece estimular a formação de tecido cicatricial. Segundo Andrade e Santos (2016), as feridas mais frequentemente encontradas com indicação para terapia por oxigênio hiperbárico foram: úlcera venosa, lesão traumática e pé diabético. Os pacientes com feridas crônicas realizaram menor número de sessões e tiveram feridas cicatrizadas ou reduzidas quando comparados com aqueles com feridas agudas.

Os raios *laser* de baixa energia e ultrassom também têm sido considerados benéficos para a cicatrização, já que ocorre proliferação dos linfócitos, aumento da fagocitose pelos macrófagos, maior secreção de fatores de crescimento e fibroblastos, e intensifica-se a reabsorção de fibrina e colágeno. Também contribuem para aumentar a motilidade de células epiteliais, elevar a quantidade de tecido de granulação e diminuir a síntese de mediadores inflamatórios (BOURGUIGNON FILHO et al., 2005; CHANNUAL et al., 2008).

Uma membrana biopolimérica enriquecida com extrato etanólico da própolis vermelha (EEPV) testada por Basílio (2018), apresentou boa atividade cicatrizante *in vitro* com fibroblastos, com fechamento de 20% da ferida, sendo uma opção para a reparação de feridas, principalmente por ser um produto nativo do Estado de Alagoas e que possui baixo custo.

Um estudo experimental em modelo animal trouxe resultados benéficos da ozonioterapia na cicatrização de feridas. Observou-se que a técnica auxiliou o processo cicatricial com diminuição do processo inflamatório, aceleração do crescimento tecidual e ausência de bordas necróticas. O estudo refere que o tratamento com as técnicas descritas é indolor e de rápida execução (CHAGAS et al., 2019).

Essas técnicas utilizadas no intuito de estimular ou acelerar a cicatrização, em alguns estudos, têm sido associadas a substâncias que têm atividade cicatrizante, o que pode vir a potencializar os efeitos de um ou de outrem.

3.9 Substâncias tópicas com atividade cicatrizante

Dentre substâncias estudadas para viabilizar a cicatrização estão as estatinas. A atorvastatina é uma estatina sintética, classificada como estatina de segunda geração, bastante lipofílica, de alta ligação com proteína, meia-vida longa de até 36h e com metabólitos ativos. Algumas destas propriedades permitem o uso da atorvastatina para o tratamento de afecções dermatológicas e de feridas. Elas atuam de modo proangiogênico, porém em altas doses podem ser antiangiogênica. O efeito anti-inflamatório está entre seus efeitos mais promissores para a

cicatrização, com a inibição da produção de células T, indução de apoptose e de proliferação celular (VAN LINTHOUT et al., 2007).

A estatina foi observada de maneira benéfica na redução da carga bacteriana, melhorando a epitelização e a cicatrização de feridas, bem como exercendo efeito sobre microrganismos patogênicos e fungos (BITTO; MINUTOLI; ALTAVILLA, 2008).

Rego et al. (2007), conduziram um estudo em animais que relata um efeito favorável da estatina na cicatrização de feridas. Eles concluíram que a sinvastatina tópica reduziu a inflamação da ferida e a carga bacteriana em feridas cutâneas contaminadas.

Bitto, Minutoli e Altavilla (2008), observaram que a administração sistêmica diária de sinvastatina (5 mg/kg) em camundongos diabéticos aumentou a produção de fator de crescimento endotelial (VEGF) e melhorou a cicatrização de feridas. Estatinas orais semelhantes a outros medicamentos podem causar efeitos adversos quando usadas por tempo prolongado ou em doses elevadas, mas a aplicação tópica de estatinas preventivamente, em baixas doses, pode ser útil para cicatrização de feridas, cujos efeitos prolongam-se, diminuindo assim os efeitos adversos.

Asai, Hirakawa e Sakabe (2012), descobriram que a aplicação tópica de sinvastatina promove linfangiogênese e angiogênese durante a cicatrização de feridas em camundongos diabéticos.

Petrovski et al. (2012) fizeram uma revisão das principais publicações sobre o uso das estatinas no processo cicatricial. Até 2011, havia sete publicações de estudos pré-clínicos e dois estudos clínicos com a finalidade de cicatrização no paciente diabético e todos apresentaram melhora significativa da cicatrização.

O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano linear, hidrofílico e de alto peso molecular, encontrado naturalmente no líquido sinovial e na matriz extracelular da pele no ser humano (ABATE; SCHIAVONE; SALINI, 2014; RAMOS-TORRECILLAS et al., 2014). É secretado naturalmente durante a cicatrização de feridas na fase proliferativa para estimular a migração e mitose de fibroblastos e células epiteliais (MACKAY; MILLER, 2003; VOIGT; DRIVER, 2012).

O ácido hialurônico foi utilizado em pesquisas para reduzir os níveis de mediadores inflamatórios e, portanto, pode ser utilizado com segurança como agente anti-inflamatório. Sendo um fator de crescimento e tendo propriedades lubrificantes, o ácido hialurônico é biocompatível natural, biodegradável e biomaterial não imunogênico em formulações biológicas de curativos (GENCER et al., 2014; BOATENG et al., 2008).

O efeito positivo do uso de ácido hialurônico também se fez presente no alívio da dor e cicatrização de feridas no tratamento de úlceras por pressão (RAMOS-TORRECILLAS, 2014), manejo da osteoartrite, no tratamento de distúrbios tendinosos (ABATE; SCHIAVONE; SALINI, 2014), em tratamento de feridas profundas (ONESTI et al., 2014), em queimaduras, feridas cirúrgicas epiteliais e feridas crônicas (VOIGT; DRIVER, 2012) e na cicatrização de feridas nas pregas vocais em modelos animais (MAGDY et al., 2008).

Com relação à cicatrização no paciente queimado, é importante que haja velocidade da restauração tecidual, redução da dor e da infecção e bom aspecto estético da ferida. Feridas tratadas com o gel de quitosana contendo Sulfadiazina de prata a 1% apresentaram aumento na produção de fibroblastos e angiogênese (NASCIMENTO et al., 2009).

Em outro estudo, em que o objetivo foi analisar características morfológicas e organização das fibras colágenas nas queimaduras de terceiro grau, realizou-se a comparação da terapia com laser e a sulfadiazina de prata. Verificou-se que a sulfadiazina gerou a deposição das fibras colágenas de maneira mais eficiente e estruturada que o laser (GOMES et al., 2017).

Em uma revisão sistemática, não houve evidência suficiente na literatura para a utilização de ácido hialurônico como tratamento tópico de queimaduras, porém, a ação tópica da combinação entre ácido hialurônico e sulfadiazina de prata apresentou resposta favorável quanto ao tempo médio de cicatrização de queimaduras (DALMEDICO et al., 2016).

Em um ensaio clínico randomizado realizado por Humbert et al. (2013), investigou-se a efetividade do ácido hialurônico no tratamento de úlceras venosas comparando-se com um veículo neutro, a porcentagem de redução do tamanho da ferida, em 45 dias. Verificou-se que a redução da superfície da úlcera foi maior no grupo intervenção (31% versus 9%, respectivamente).

Algumas feridas são tratadas por vitaminas como o dexapantenol ou d-pantenol (d-P), uma pró-vitamina do complexo B que, se aplicada topicamente, converte-se em ácido pantotênico, componente natural da pele. Observou-se *in vitro* e *in vivo* que a ativação de fibroblastos com d-P leva a uma epitelização de feridas mais rápida (EBNER et al., 2002).

A aminoguanidina, composto de hidrazina, previne a formação de AGEs ao reagir com produtos iniciais da glicação e demonstrou ser eficaz na melhora da proteinúria, da elasticidade dos vasos e na prevenção da retinopatia diabética, além de apresentar atividade antioxidante, antibiótica, anti-inflamatória e cicatrizante (BARBOSA, 2012).

Os AGEs contribuem de maneira clara e relevante para o surgimento e a progressão das complicações do diabetes, representando alvo promissor para intervenções terapêuticas. Uma

variedade de agentes que apresentam propriedades anti-AGE está sendo atualmente investigada e pode atuar de diversas maneiras, incluindo a diminuição da absorção de AGEs, a inibição da formação de produtos de Amadori, a prevenção da progressão dos produtos de Amadori a AGEs, a diminuição do estresse oxidativo, a ligação e detoxificação de intermediários dicarbonílicos e a interrupção de vias bioquímicas capazes de causar impacto nos níveis de AGEs (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

A utilização de AGEs e substâncias antioxidantes de maneira tópica pode ser uma estratégia para diminuir os processos inflamatórios crônicos causados pelo estresse oxidativo também nos portadores de feridas, de modo possam acelerar as fases que ocorrem na cicatrização.

3.10 Tiossemicarbazona: atividades biológicas e obtenção das sínteses dos derivados

A química medicinal dispõe de ferramentas para a síntese e o planejamento de novos fármacos na busca de produtos bioativos por meio de reações orgânicas de substâncias planejadas com potenciais atividades biológicas. O desafio maior consiste na busca de efeitos colaterais ou tóxicos mínimos, menos agressivos.

As tiossemicarbazonas são moléculas versáteis, de fácil obtenção e chamam a atenção dos pesquisadores devido a gama de atividades biológicas que possuem: antiprotozoária, antitumoral, antiviral, antibacteriana entre outras (HUSAIN; ABID; AZAM, 2007).

Tiossemicarbazonas e semicarbazonas apresentam um amplo perfil farmacológico e constituem uma importante classe de compostos cujas propriedades têm sido estudadas na Química Medicinal (BERALDO; 2004).

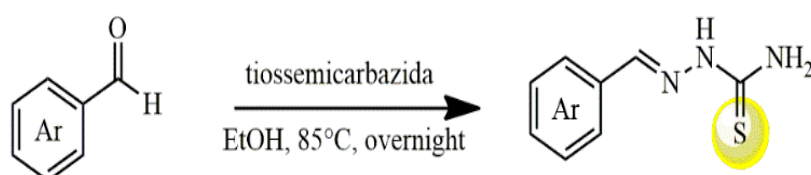
Podem ser adquiridas comercialmente e sua síntese ocorre pela condensação equimolar de um derivado carbonilado – aldeído ou cetona – com tiossemicarbazidas em meio alcoólico sob refluxo e quantidades catalíticas de ácido (HOLLA et al, 2003). São reações conhecidas pela quimiosseletividade, versatilidade, rapidez e altos rendimentos. Também podem ser obtidas a partir da preparação das tiossemicarbazidas, utilizando hidrazinas, e posterior condensação com compostos que contêm carbonila (HANG; BERTOZZI, 2001; RODRIGUEZ; MARCAURELLE; BERTOZZI, 1998).

Essas substâncias apresentam-se como sistemas com extrema deslocalização eletrônica, principalmente quando há grupos aromáticos ligados ao carbono da imina. Devido a este fenômeno, esses compostos podem coexistir na forma tiona ou tiol em equilíbrio tautomérico (TENÓRIO et al., 2005).

Lobana et al. (2010) destacam que uma característica de grande importância das tiossemicarbazonas é a presença de átomos de enxofre e nitrogênio na estrutura, o que confere a capacidade de formar complexos com diversos metais. Tanto as tiossemicarbazonas como os seus complexos podem formar ligações de hidrogênio, tanto inter como intramoleculares.

Recentemente em estudo de SEM (2018) alguns derivados de tiossemicarbazonas foram testados e revelaram excelente atividade como inibidores da Acetilcolinesterase (AChE) e apresentaram boa atividade antioxidante, o que enfatiza a importância dessa molécula com vasta propriedade biológica.

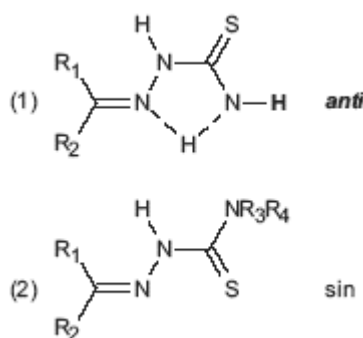
Figura 4 – Reação de obtenção da tiossemicarbazona a partir da tiossemicarbazida.



Fonte: AUTORA, 2019.

Segundo Casas, Tasende e Sordo (2000), as tiossemicarbazonas não substituídas na posição N-4 apresentam estrutura básica, $C=N-NH-CS-NH_2$, aproximadamente planar, com o átomo de enxofre em posição *anti* em relação ao átomo de nitrogênio da função imina. Possivelmente o fator mais importante é que o átomo de enxofre em posição *anti* possibilita a ocorrência de ligação de hidrogênio intramolecular entre o nitrogênio da imina e os hidrogênios da tioamida. Por outro lado, este arranjo estrutural muda significativamente se forem adicionados grupos substituintes na posição N-4, favorecendo a conformação *sin* entre o átomo de nitrogênio da imina e o átomo de enxofre.

Figura 5 - Arranjo estrutural de tiossemicarbazonas.



$R_1, R_2, R_3, R_4 = H, \text{ alquil e aril}$

Fonte: TENÓRIO, 2005.

De maneira geral, as tiossemicarbazonas atuam como inibidores de enzimas por meio da complexação de metais endógenos ou através de reações redox, por meio de interações ou inibição do DNA. No entanto, as atividades biológicas das tiossemicarbazonas estão mais relacionadas ao potencial de inibir a enzima ribonucleotídeo redutase - RR, que é uma enzima citoplasmática, importante para a síntese e reparo do DNA (TENÓRIO, 2005).

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental randomizado com ratos *Wistar*, que testou substâncias sintéticas derivadas das tiossemicarbazonas.

O estudo dividiu-se em três momentos: 1) ensaio antiglicante e de citotoxicidade por viabilidade celular *in vitro* pelo método do MTT para seleção das substâncias; 2) ensaio para atividade cicatrizante *in vivo* e 3) estudo histológico da pele dos animais, tratada por via tópica pelas substâncias selecionadas.

4.2 Local do Estudo

O estudo ocorreu na Universidade Federal de Alagoas, nos seguintes laboratórios:

Os derivados de tiossemicarbazonas foram recebidos do laboratório de Química Medicinal do Instituto de Ciências Farmacêuticas – LQM/ICF, coordenado pelo Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior, onde foram sintetizados pelos farmacêuticos Dr. Edeildo Ferreira e Dra. Érica Erlanny.

O teste de citotoxicidade por viabilidade celular foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Imunidade – LFI/ICBS, coordenado pela Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira.

O experimento *in vivo* foi realizado no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Instituto de Ciências Farmacêuticas - LFC/ICF, coordenado pela Profa. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro.

O preparo das fórmulas foi realizado na farmácia de manipulação *Ao Pharmaceutico* coordenado pela Profa. Dra. Círia Vieira Barbosa.

4.3 Aspectos Éticos

O experimento com animais foi realizado após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFAL), sob o protocolo nº 06/2019, respeitando os Princípios Éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O princípio dos 3 Rs (do inglês: *Replacement, Reduction and Refinement*) foi considerado, na tentativa de minimizar a quantidade de animais utilizados e / ou os desconfortos causados.

Após aprovação, o projeto foi encaminhado também ao responsável técnico (RT) pelo laboratório, para o acompanhamento das atividades desenvolvidas no experimento.

4.4 Síntese dos derivados a partir da tiossemicarbazida e teste de atividade antiglicante para seleção dos derivados

O planejamento dos derivados das tiossemicarbazonas realizados pelos farmacêuticos do laboratório sofreu variações na região do esqueleto base das tiossemicarbazonas aromáticas, partindo de quantidades equimolares de aldeídos aromáticos e tiossemicarbazida, para a obtenção dos derivados.

A seleção dos derivados para o estudo *in vivo* se deu a partir dos testes de citotoxicidade e da melhor atividade antiglicante dentre os 21 derivados da tiossemicarbazida, cujas amostras foram codificadas como LQM, seguidos de um número.

Os testes de atividade antiglicante seguiram o protocolo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Foram realizados em capela de fluxo laminar, com uso de Equipamento de Proteção Individual (EPIs) e seguindo as boas práticas de laboratório recomendadas pela ANVISA.

A atividade antiglicante é detectada pela análise espectrofluorimétrica da inibição da formação de produtos de glicação avançada. Para isso foram preparadas as soluções conforme protocolo descrito por pesquisadores do Laboratório de Química Medicinal, a partir da solução de albumina sérica bovina (BSA), glicose, azida sódica, tampão fosfato de sódio, tiossemicarbazida, quercetina e a amostra analisada.

Antes de iniciar o preparo das placas procedeu-se à esterilização em fluxo laminar. Todas as soluções, incluindo tampão e amostras foram expostas à luz ultra violeta (UV) por 15 minutos. Após esse período, o preparo das placas foi iniciado. As placas prontas foram levadas, imediatamente, para a estufa a 37°C de onde só foram retiradas nos momentos de leitura da placa.

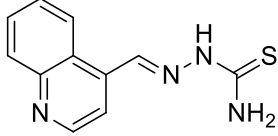
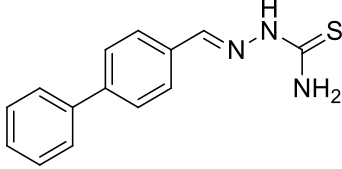
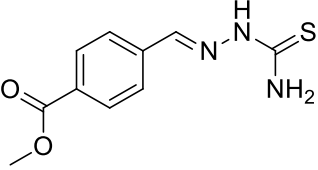
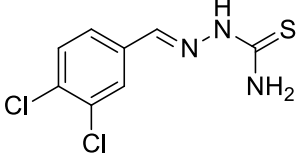
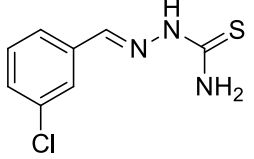
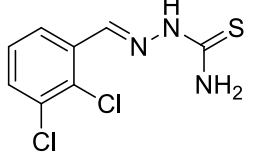
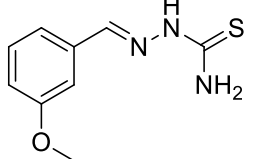
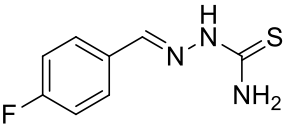
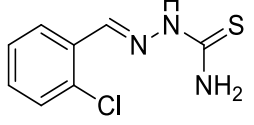
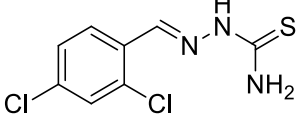
As amostras testadas (21 derivados) foram então incubadas a 37°C durante 24h, 48h, 72h, 7 e 14 dias. A formação de AGEs foi medida por fluorimetria, com excitação em 350 nm e emissão em 450 nm.

Dos 21 (vinte e um) derivados de tiossemicarbazona, 5 (cinco) apresentaram os melhores perfis antiglicante, considerando o percentual de inibição acima de 60%: LQM 8.1 (61%); LQM 9.1 (70%); LQM 10.1 (66%); LQM 11.1 (90%); LQM 18.1 (62%).

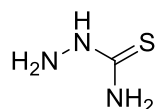
Na tabela abaixo (Tabela 1), a descrição e estrutura química das 21 amostras testadas.

Tabela 1 – Estrutura química dos derivados de tiossemicarbazonas.

| CÓDIGO | ESTRUTURA | NOME |
|---------------|------------------|--|
| LQM 2.1 | | 2- (4-clorobenzilideno) hidrazinacarbotoamida |
| LQM 3.1 | | 2- (4-cianobenzilideno) hidrazinacarbotoamida |
| LQM 4.1 | | 2- (4-hidroxi-3- metoxibenzilideno) hidrazinacarbotoamida |
| LQM 5.1 | | 2- (3,4- dimetoxibenzilideno) hidrazinacarbotoamida |
| LQM 7.1 | | 2- (4-hidroxibenzilideno) hidrazinacarbotoamida |
| LQM 8.1 | | 2- (4-bromobenzilideno) hidrazinacarbotoamida |
| LQM 9.1 | | 2- (benzo [d] [1,3] dioxol- 5-ilmetileno) hidrazinacarbotoamida |
| LQM 10.1 | | 2- (3,5-di-terc-butil-4- hidroxibenzilideno) hidrazinacarbotoamida |
| LQM 11.1 | | Ácido 4 - ((2- carbamotioil-hidrazono) metil) benzoico |
| LQM 12.1 | | 2- (2,6-diclorobenzilideno) hidrazinacarbotoamida |

| | | |
|----------|---|--|
| LQM 13.1 |  | 2- (quinolin-4-ilmetileno) hidrazinacarbotioamida |
| LQM 14.1 |  | 2 - ([1,1'-bifenil] -4- ilmetileno) hidrazinacarbotioamida |
| LQM 16.1 |  | metil 4 - ((2-carbamotioil- hidrazono) metil) benzoato |
| LQM 17.1 |  | 2- (3,4-diclorobenzilideno) hidrazinacarbotioamida |
| LQM 18.1 |  | 2-(3- chlorobenzilideno)hydrazinecarb othioamide |
| LQM 55.1 |  | 2- (2,3-diclorobenzilideno) hidrazinacarbotioamida |
| LQM 96.1 |  | 2- (3-metoxibenzilideno) hidrazinacarbotioamida |
| LQM 97.1 |  | 2- (4-fluorobenzilideno) hidrazinacarbotioamida |
| LQM 98.1 |  | 2- (2-clorobenzilideno) hidrazinacarbotioamida |
| LQM 99.1 |  | 2- (2,4-diclorobenzilideno) hidrazinacarbotioamida |

Tiossemicarbazida



Fonte: AUTORA, 2019.

Com base nesses resultados, pode-se observar que o LQM 9.1 e LQM 11.1 apresentaram percentual de inibição maior que o controle tiossemicarbazida, com diferença estatística quando comparadas a este controle, inferindo que este derivado é um potente antiglicante. Essas duas substâncias identificadas apresentaram melhor atividade antiglicante (LQM 9.1 e LQM 11.1) e após os testes de citotoxicidade, foram selecionadas para o teste de cicatrização *in vivo*.

4.5 Teste de citotoxicidade por viabilidade celular com derivados de tiossemicarbazona através do teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)

Essa técnica é capaz de avaliar o estado metabólico da célula e a viabilidade celular a partir da redução do sal tetrazólio (coloração amarela) a formazan (coloração azul escuro).

O teste baseia-se na atividade mitocondrial das células pela redução do sal MTT, essa redução acontece através da clivagem do sal de tetrazólio, de coloração amarelada, em cristais de formazan que possuem uma coloração azul escuro, pela enzima succinato desidrogenase, que se encontra nas mitocôndrias ativas. A densidade óptica da reação resultante é determinada pelo espectrofotômetro. Quanto mais escura a coloração ao fim da reação, maior a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Para início do teste, os macrófagos da linhagem J774 foram colocados em placas de 96 poços com a densidade de 2×10^5 , por poços cultivados com o meio Dulbecco Mem (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, onde cada cavidade foi preenchida com 200 μL do meio das células.

Como controle positivo foram utilizados poços com células lisadas e para controle negativo células cultivadas e adicionadas a DMSO (Dimetilsulfóxido). Após incubação total de 48 horas, o sobrenadante foi descartado e em cada cavidade adicionado 100 μL de uma solução de MTT (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sendo reincubadas por mais 1 hora em estufa a 37°C à 5% de CO_2 . Passado o período, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso com 100 μL de DMSO.

Para a leitura das placas e quantificação do sal tetrazólio reduzido a formazan, foi necessário o auxílio de um leitor de microplacas – espectrofotômetro ELISA - no comprimento de onda de 550 nm.

Para obtenção dos resultados, realizou-se análise por meio da média das absorbâncias mais erro padrão da média (SEM) e diferenças estatísticas entre os grupos tratados e os de controle que foram avaliados pelo teste Dunnett e ANOVA onde foram identificados ($p < 0,05$) os níveis de significância em comparação com os grupos controle.

Quanto ao teste de viabilidade celular (MTT), os derivados tiossemicarbazônicos apresentaram atividade citotóxica homogênea de acordo com a concentração em que foram testados (10 μ M).

Tabela 2 - Efeito dos derivados tiossemicarbazônicos sobre a viabilidade celular em 10 μ M

| LQM | Citotoxicidade MTT 24 horas (10 μ M) |
|------|--|
| 2.1 | NT |
| 3.1 | NT |
| 4.1 | NT |
| 5.1 | NT |
| 7.1 | NT |
| 8.1 | NT |
| 9.1 | NT |
| 10.1 | NT |
| 11.1 | NT |
| 12.1 | NT |
| 14.1 | 30.6 \pm 6*** |
| 16.1 | NT |
| 17.1 | NT |
| 18.1 | NT |
| 55.1 | NT |
| 96.1 | NT |
| 97.1 | NT |
| 98.1 | NT |
| 99.1 | NT |

NT= não tóxico.

Citotoxicidade - média da citotoxicidade máxima \pm erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 μ M. Os valores de citotoxicidade foram considerados significativos quando $p < 0,001$ em relação ao grupo DMSO

0,1%. NT não tóxica - substância não apresentou atividade letal significativa para macrófagos da linhagem J774.A1 na concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO.

Fonte: AUTORA, 2019.

Dos derivados de tiossemicarbazonas testados, dezoito (18) demonstraram não serem tóxicos: LQM 2.1, LQM 3.1, LQM 4.1, LQM 5.1, LQM 7.1, LQM 8.1, LQM 9.1, LQM 10.1, LQM 11.1, LQM 12.1, LQM 16.1, LQM 17.1, LQM 18.1, LQM 55.1, LQM 96.1, LQM 97.1, LQM 98.1, LQM 99.1.

Todos os derivados mantiveram a viabilidade celular em torno de 100%, exceto o LQM 14.1, que apresentou uma viabilidade celular de 30,6%, demonstrando seu potencial citotóxico nessa concentração.

Assim, foi possível dar sequência ao ensaio *in vivo* com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1. Além de não apresentarem citotoxicidade, essas substâncias foram escolhidas por apresentarem maiores percentuais de inibição na formação dos produtos finais de glicação avançada – AGEs.

4.6 Formulação do produto tópico

A partir da identificação de duas substâncias derivadas da tiossemicarbazona que apresentaram melhor atividade antiglicante e não foram tóxicas, foram formulados os produtos tópicos com as respectivas substâncias, (LQM 9.1 e LQM 11.1) que foram testadas no experimento *in vivo*.

Foram aplicados cremes nas feridas no dorso dos animais para veicular o princípio ativo. O creme de aplicação tópica foi a apresentação escolhida devido à facilidade de aplicação e remoção (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007). Essa escolha também se deu devido ao creme apresentar menor perda de tecido de granulação da ferida durante o curativo e redução de episódios de sangramento.

Para o preparo dos cremes, levou-se em consideração a quantidade de animais (36 ratos *Wistar*) em que foram aplicados os cremes durante 21 dias de tratamento em 03 feridas confeccionadas no dorso de cada animal. Foram preparados cremes para serem aplicados nesses grupos, sendo: 02 cremes com as substâncias que foram testadas (derivados da tiossemicarbazona, caracterizados como LQM 9.1 e 11.1), 01 creme Lanette (controle negativo - CN), 01 creme à base de Dexpantenol (controle positivo - CP), substância já utilizada no mercado, com ação cicatrizante.

Portanto, foram formulados 4 cremes:

- 1) Creme com LQM 9.1 50 mg/g;
- 2) Creme com LQM 11.1 50 mg/g;
- 3) Creme Dexpanthenol 50 mg/g;
- 4) Creme Lanette 50 mg/g;

Em seguida os cremes foram embalados em bisnagas metálicas.

O Dexpanthenol (d-P) foi a substância escolhida para ser o controle positivo, por se tratar de uma pró-vitamina do complexo B que, ao ser aplicada topicamente, é convertida em ácido pantotênico, um constituinte natural da pele (IDSON, 1993) e já observado por Ebner et al. (2002) que "*in vitro*" e "*in vivo*" há ativação de fibroblastos com d-P, o que leva a uma aceleração da epitelização de feridas, formando um epitélio com elevado nível organizacional das estruturas formadoras da epiderme.

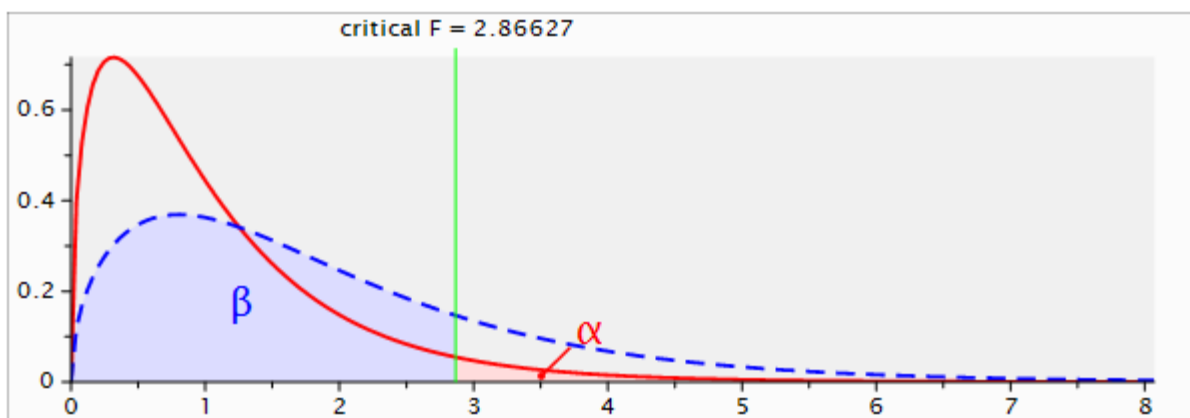
4.7 Cálculo do tamanho da amostra

Para realizar o cálculo do tamanho da amostra, utilizou-se o *software G*Power 3.1.9.2* (Figura 6). Como o plano de análise dos dados e o desenho da pesquisa prevê a comparação entre 4 amostras independentes (grupos de animais), utilizou-se como referência para o cálculo o teste ANOVA *one-way*.

Para determinar o tamanho da amostra, adotou-se três critérios: nível de significância de 0,05, tamanho do efeito de aproximadamente 0,25 e poder do teste a ser alcançado de 0,21 [Power (1- β err prob) = 0.21]. Diretrizes convencionais recomendam o nível de significância de 0,05. Isto é, interpretar inferências estatísticas demanda que o pesquisador especifique o nível de erro aceitável devido ao uso de uma amostra; ao especificar um nível alfa – aqui de 0,05, determina-se a probabilidade de se ultimar que a significância existe quando, na verdade, esta não ocorre.

Portanto, para atingir o tamanho de poder de 21%, é demandado um nível de significância de 0,05, com tamanho de efeito moderado ($\approx 0,25$) e uma amostra de 36 animais. Sendo 9 animais por grupo.

Figura 6 – Cálculo do tamanho amostral com 4 grupos de animais.



Fonte: AUTORA, 2019

4.8 Testes de cicatrização *in vivo*

4.8.1 Caracterização dos animais e condições de manutenção

O experimento foi realizado com 36 ratos machos da espécie *Ratus norvegicus albinus*, linhagem *Wistar*, que tinham 70 dias e peso médio de 270g. Foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas e mantidos durante a pesquisa no biotério do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Instituto de Ciências Farmacêuticas da UFAL, onde ocorreu o experimento.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, forradas com maravalha e alimentados com ração comercial Labina® (Purina). Foi preservado o fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro, ruídos mínimos, temperatura ambiente 21°C, mantida por ar condicionado e controlada por termostato.

4.8.2 Delineamento experimental

Nesse experimento foram utilizados 4 (quatro) grupos com 09 (nove) animais cada, totalizando 36 animais, caracterizados como CN, CP, LQM 9.1 e LQM 11.1, sendo distribuídos da seguinte forma:

CN - grupo controle negativo, animais com ferida e tratamento tópico com veículo do Dexpantenol (09 animais);

CP - grupo controle positivo, animais com ferida e tratamento tópico com Dexpantenol (09 animais);

LQM 9.1 - grupo de animais com ferida e tratamento tópico com substância experimental identificada como LQM 9.1 (09 animais).

LQM 11.1 - grupo de animais com ferida e com tratamento tópico com substância experimental identificada como LQM 11.1 (09 animais).

Foram considerados neste trabalho os princípios éticos relacionados à pesquisa envolvendo animais e buscou-se reduzir ao máximo o número de animais para o experimento.

Os derivados LQM 9.1 e LQM 11.1 foram selecionados por terem apresentado os melhores perfis antiglicantes e não apresentarem toxicidade.

4.8.3 Procedimento anestésico-cirúrgico

Para a confecção das feridas, os 36 animais foram submetidos à anestesia intraperitoneal realizada com cloridrato de xilazina (10mg/Kg) e cloridrato de cetamina (90mg/Kg), conforme recomendação do CONCEA (2013) para confecção de três excisões na região dorsal em forma de circunferência, medindo 0,6 mm cada.

Após a anestesia os animais foram epilados manualmente na região dorsal. Antes de realizar excisões no dorso do animal, foi feita a antissepsia com clorexidina alcoólica, afim de inibir crescimento bacteriano na pele do animal. A excisão em circunferência no dorso do animal foi realizada com *punches*, incluindo a hipoderme.

Após realização das excisões, foi aplicado sobre cada ferida uma quantidade do veículo formulado. Por fim, foram realizados os curativos oclusivos com gaze estéril, atadura de crepe e esparadrapo, impedindo assim contaminação e facilitando a absorção do produto aplicado.

4.8.4 Acompanhamento dos animais e análise macroscópica

Diariamente foram realizadas: troca da maravalha, ofertada ração e água *ad libitum*.

As características das feridas dos animais foram observadas, mensuradas com paquímetro, registradas em instrumento conforme critérios de avaliação macroscópica em três períodos (7º, 14º e 21º dia), de forma que cada período coincidissem com as fases da cicatrização: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelamento (fases 1, 2 e 3). Além disso as imagens foram registradas por meio do *smarthphone* iPhone 6S Plus de 12 *mega pixels* e resolução de 1920x1080 pixels a uma distância de 27 cm. Também foram realizados os curativos na região dorsal diariamente, aplicando-se os respectivos cremes para tratamento tópico de acordo com cada grupo (CN, CP, LQM 9.1 e LQM 11.1).

A avaliação macroscópica da ferida foi realizada utilizando-se um instrumento (APÊNDICE A) que contemplou os seguintes critérios:

- (1) repilação
- (2) hiperemia,
- (3) coágulo,
- (4) sangramento,
- (5) retração da ferida,
- (6) exsudato

As feridas foram registradas por meio de fotografia para fins de comparação e mensuradas com paquímetro para avaliação da retração da ferida.

4.8.5 Eutanásia

Após o período de tratamento e acompanhamento da cicatrização das feridas foi realizada a eutanásia. Para o procedimento os animais foram profundamente anestesiados, com injeção intraperitoneal de xilazina (10mg/Kg) e Cetamina (90mg/Kg) e eutanasiados por exsanguinação por meio de punção cardíaca.

Para que a pele dos animais fosse analisada em cada fase da cicatrização, a eutanásia para as biópsias ocorreram 3 vezes: no 7º, 14º e 21º. Em cada uma foram submetidos à anestesia para posterior eutanásia: 12 animais (03 do grupo CN, 03 do CP, 03 tratados com a substância LQM 9.1, 03 tratados com a substância LQM 11.1), totalizando os 36 animais e contemplando as biópsias nas fases 1, 2 e 3 da cicatrização.

As biópsias circulares foram realizadas com *punch* de 0,6 cm, incluindo a hipoderme e uma pequena margem a mais para melhor análise das bordas.

4.8.6 Análise histológica

Após a eutanásia e biópsias das áreas tratadas dos animais, as peças foram encaminhadas à patologia para análise histológica.

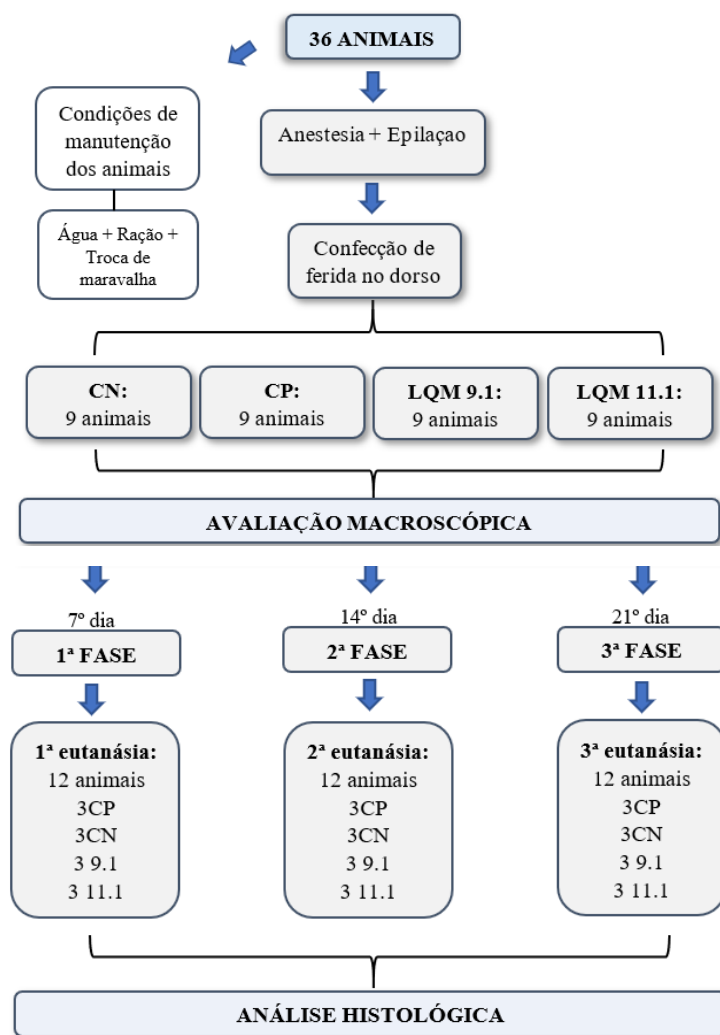
Para preparo das lâminas, essas peças biopsiadas foram limpas e armazenadas em solução de formol a 10%, desidratadas com gradiente crescente de etanol e embebidas em parafina. Após endurecimento, os blocos foram levados à microtomia e cortados com navalha de aço para obtenção das seções de 5µm. Os cortes foram distendidos em água previamente aquecida e coletados em lâminas histológicas untadas com albumina de Mayer e secas em chapa

quente a 30°C. Posteriormente, foram coradas com Hematoxilina e Eosina - HE. (GARTNER; HIATT, 2007).

O material foi analisado por meio de microscopia, identificando as seguintes variáveis:

- (1) formação de coágulos (crostas),
- (2) bordas da ferida (hiperplasia),
- (3) infecção - colônia de bactérias,
- (4) inflamação,
- (5) componente inflamatório: neutrófilos e linfócitos
- (6) tecido de granulação,
- (7) proliferação celular de macrófagos e fibroblastos,
- (8) deposição de colágeno (fibrose) no centro,
- (9) deposição de colágeno (fibrose) nas bordas.

Figura 7 – Etapas da metodologia da cicatrização in vivo



Fonte: AUTORA, 2020.

4.8.7 Análise Estatística

Os resultados foram descritos de forma quantitativa e analisados estatisticamente. As variáveis homogêneas analisadas pelo teste *One way* ANOVA e as variáveis não homogêneas pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste do qui quadrado. A análise estatística entre os diferentes grupos, com teste Post Hoc. Realizado teste de Levene para avaliar a homogeneidade da distribuição das variáveis. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa software SPSS 20, utilizando-se como nível de significância, $p < 0.05$. As médias e valores de erro padrão foram determinados para todos os parâmetros estudados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Em relação à avaliação microscópica e macroscópica, para facilitar a compreensão, foram listados abaixo os critérios utilizados. Microscopicamente, os critérios utilizados foram:

- (1) formação de coágulos (crostas),
- (2) bordas da ferida (hiperplasia),
- (3) infecção - colônia de bactérias,
- (4) inflamação,
- (5) componente inflamatório: neutrófilos e linfócitos
- (6) tecido de granulação,
- (7) proliferação celular de macrófagos e fibroblastos,
- (8) deposição de colágeno (fibrose) no centro da ferida
- (9) deposição de colágeno (fibrose) nas bordas da ferida.

Macroscopicamente, os critérios para avaliação foram:

- (1) repilação
- (2) hiperemia,
- (3) coágulo,
- (4) sangramento,
- (5) retração da ferida,
- (6) exsudato.

5.1 Fase de Hemostasia / Inflamatória (Fase 1)

A fase 1 é marcada preponderantemente pelo início da lesão e a cascata de eventos que vai se suceder para que ocorra o quanto antes seu fechamento.

Imediatamente após a lesão, há liberação de substâncias vasoconstritoras, principalmente tromboxana A₂ e prostaglandinas, pelas membranas celulares. A cascata de coagulação será estimulada pelas plaquetas a partir da lesão do endotélio tendo assim papel fundamental na cicatrização (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

A hemostasia é iniciada com a liberação de grânulos das plaquetas, os quais contêm fator de crescimento de transformação beta - TGF- β (e também fator de crescimento derivado das plaquetas - PDGF, fator de crescimento derivado dos fibroblastos - FGF, fator de

crescimento epidérmico - EGF, prostaglandinas e tromboxanas), que atraem neutrófilos à ferida. (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Uma das características que demonstram o fechamento da ferida é a medição de seu tamanho e analisar o quanto houve de retração, diminuição. Quanto ao tamanho da ferida, observou-se diminuição quando usadas as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 para o tratamento tópico das feridas.

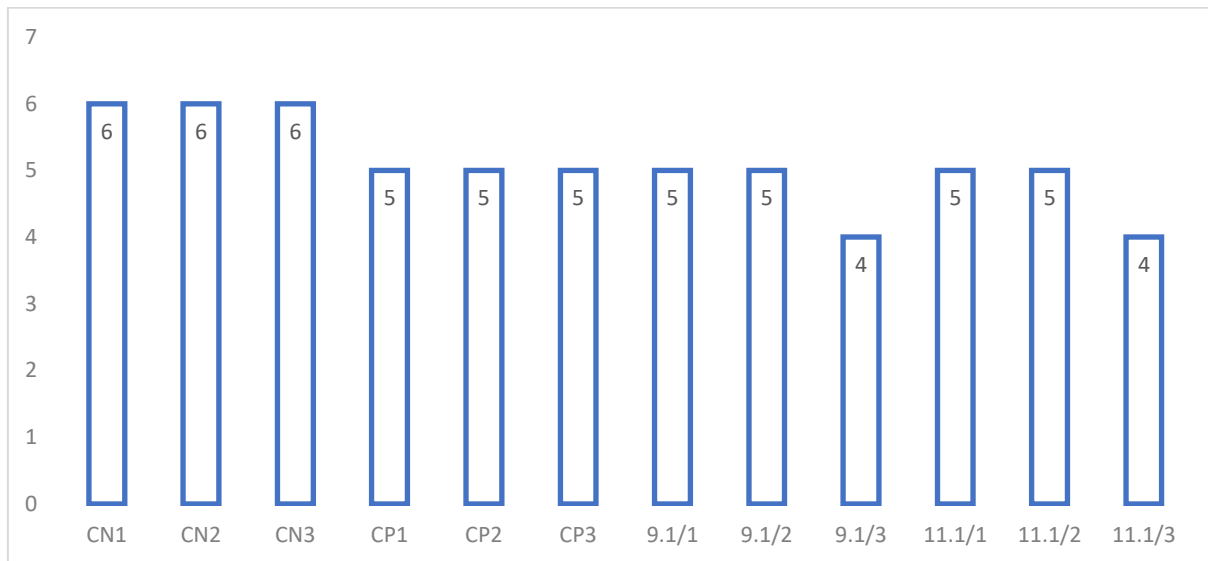
No gráfico da Figura 8 é possível verificar 50 % de retração da ferida em dois grupos (LQM 9.1 e LQM11.1), que mediam inicialmente 0,6 mm e após, apresentaram 0,4 mm, enquanto que nos grupos controle negativo (CN) e positivo (CP), nenhum caso teve essa considerável diminuição, demonstrando significância estatística com $p=0,033$ (Tabela 3 e Figura 8).

É possível confirmar a significância do tamanho residual das feridas na avaliação macroscópica na Fase I por meio do teste do qui-quadrado (Tabela 4).

A redução do tamanho das feridas nos grupos das substâncias testadas (LQM 9.1 e LQM 11.1) também foi consideravelmente maior quando comparada aos grupos controle CP e CN (Figura 8). A substância dexapantenol, já utilizada com a finalidade cicatrizante no mercado, apresentou retração no grupo CP, porém a redução do tamanho das feridas foi maior no grupo das substâncias testadas LQM 9.1 e LQM 11.1. Ebner et al. (2002) observaram "*in vitro*" e "*in vivo*" que a ativação de fibroblastos com dexapantenol acelera a epitelização de feridas, formando um epitélio organizado.

Existem estudos que empregam modalidades terapêuticas associadas a tratamentos tópicos para feridas cutâneas, com a finalidade de acelerar o processo de cicatrização. O ultrassom (US) é um desses métodos (BAYAT et al., 2001; ALTOMARE et al., 2009), que apontam um aumento na síntese de colágeno, na proliferação de fibroblastos e na microcirculação local (DEMIR et al., 2004), o que pode ser positivo e viável para testar substâncias tópicas que já possuem atividade cicatrizante, anti-inflamatória, antioxidante ou antiglicante por exemplo.

Figura 8 - Fase 1. Avaliação microscópica do tamanho residual das feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1.



Os valores em cada coluna representam a média. ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis. Valores significativos considerando: $p < 0,05$ variáveis microscópicas da Fase 1 – Tamanho residual da ferida.

Fonte: AUTORA, 2020.

Os dados apresentados na Figura 8 são corroborados pelos dados apresentados na Tabela 3, onde é possível confirmar, por meio do teste de Kruskal Wallis, a significância dos dados quando se compara o tamanho residual das feridas (retração) entre todos os grupos (CN, CP, LQM 9.1 e LQM 11.1). Nesse teste, há significância demonstrada na retração das feridas tratadas pelas substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1.

Os dados mostram que as feridas iniciais, com o tamanho de 6 mm, mostram redução de seu tamanho ao serem tratadas pelas substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 logo na 1ª fase da cicatrização, podendo apresentar 5mm ou 4mm em seu tamanho.

Tabela 3 - Avaliação macroscópica do tamanho residual das feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 na Fase 1: significância estatística com tamanho de 4 mm.

| | | Tamanho_residual_ferida | | | Total |
|----|-------------|-------------------------|------|--------|--------|
| | | 4 | 5 | 6 | |
| ID | 1 | Count | 0 | 0 | 3 |
| | % within ID | 0,0% | 0,0% | 100,0% | 100,0% |

| | | | | | |
|-------|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| 2 | % within | 0,0% | 0,0% | 100,0% | 25,0% |
| | Tamanho_residual_ferida | | | | |
| | Count | 0 | 3 | 0 | 3 |
| 3 | % within ID | 0,0% | 100,0% | 0,0% | 100,0% |
| | % within | 0,0% | 42,9% | 0,0% | 25,0% |
| | Tamanho_residual_ferida | | | | |
| 4 | Count | 1 | 2 | 0 | 3 |
| | % within ID | 33,3% | 66,7% | 0,0% | 100,0% |
| | % within | 50,0% | 28,6% | 0,0% | 25,0% |
| Total | Tamanho_residual_ferida | | | | |
| | Count | 2 | 7 | 3 | 12 |
| | % within ID | 16,7% | 58,3% | 25,0% | 100,0% |
| | % within | 100,0% | 100,0% | 100,0% | 100,0% |
| | Tamanho_residual_ferida | | | | |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3/grupo). ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis. Valores significativos considerando: $p < 0,05$ (eixo vertical: 1- controle negativo, 2- controle positivo, 3- LQM 9.1, 4- LQM 11.1).

Fonte: AUTORA, 2020.

O teste do qui-quadrado também é capaz de mostrar significância demonstradas pelos grupos tratados LQM 9.1 e LQM 11.1 ao comparar os grupos quanto à retração das feridas (Tabela 4)

Tabela 4 - Avaliação macroscópica do tamanho residual das feridas na Fase 1.

| | Valor | Df | Grau de significância |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------|
| Pearson Chi-Square | | | |
| Razão de Verossimilhança | 13,714 ^a | 6 | 33 |
| Associação Linear por Linear | | | |
| N de casos válidos | | | |

| | | | |
|--|--------|---|------|
| | 15,393 | 6 | ,017 |
| | 6,302 | 1 | ,012 |
| | 12 | | |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3/grupo). Houve diferença entre si utilizando teste de qui-quadrado, considerando $p < 0.05$. (eixo vertical: 1- controle negativo, 2- controle positivo, 3- LQM 9.1, 4- LQM 11.1).

Fonte: AUTORA, 2020.

Um dos aspectos observados e avaliados durante a fase 1 da cicatrização foi a exsudação, que significa o extravasamento de líquido, proteínas e células sanguíneas do sistema vascular para o interstício é uma condição que se apresenta nos processos inflamatórios e que vai contribuir com os processos de resolução ou reparação da ferida posteriormente (PEREIRA, 2011). Inicialmente, após uma agressão ao tecido, a exsudação é um fenômeno frequente, devendo aos poucos diminuir, até desaparecer.

Observou-se nas feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 nessa fase inicial, uma diminuição significativa de exsudato (Figura 9). Nessas feridas, a diminuição do exsudato ocorreu de forma veloz, enquanto nos grupos CN e CP o exsudato ainda estava presente de maneira significativa. Pode-se sugerir que a cicatrização tende a formar o tecido de granulação com maior rapidez, avançando para as etapas subsequentes da cicatrização.

Outro critério avaliado microscopicamente refere-se à retração da borda da ferida, outro fenômeno que deve ocorrer para que haja a resolução da ferida. Essa retração ocorreu de forma acentuada em relação aos grupos controle negativo CN e positivo CP ($p = 0,019$), o que também parece ser benéfico numa cicatrização mais veloz (Figura 9).

A presença de coágulos é evidente na fase inicial após a agressão ao tecido. O coágulo é formado por colágeno, plaquetas e trombina, que servem de reservatório proteico para síntese de citocinas e fatores de crescimento, aumentando seus efeitos. Desta forma, a resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

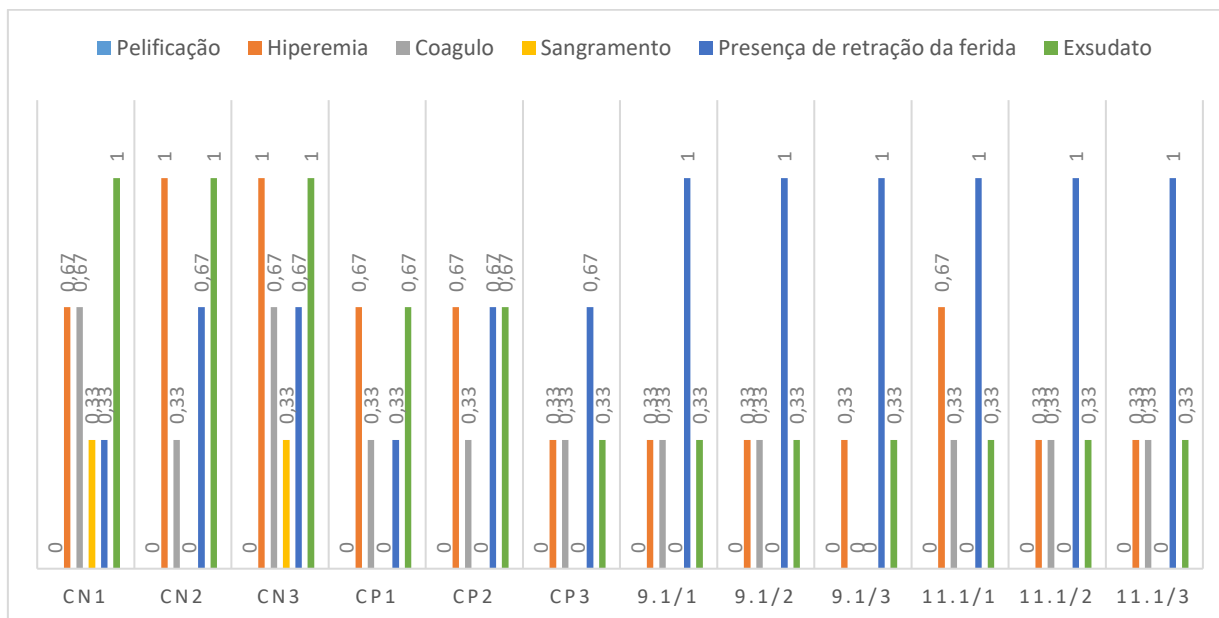
A Figura 9 mostra que a presença de coágulos se mantém estabilizada nos grupos das substâncias testadas, enquanto que nos grupos CN está elevada, apresentando características de não só estar na fase inflamatória, como também apresentar característica preponderante da fase anterior – hemostasia. Ou seja, no 7º dia pós lesão, essa fase já deveria ter sido ultrapassada e foi expressiva nos grupos CN.

Ainda sobre os critérios macroscópicos avaliados nas feridas e representados na Figura 9: a hiperemia, o sangramento e exsudato foram expressivos nos grupos controle CN e CP. As feridas desses grupos parecem estar sofrendo um impacto maior com os danos do processo inflamatório, enquanto nos grupos LQM 9.1 e LQM 11.1, esses sinais foram mais brandos, aparentando um processo inflamatório com menor intensidade ou menores danos ao tecido.

Na avaliação macroscópica durante a fase inflamatória (Figura 9), observou-se ainda ausência de exsudato e restos necróticos na substância LQM 9.1 e LQM 11.1, o que corrobora com o desempenho observado na avaliação microscópica, enfatizando que a substância testada reduziu o processo inflamatório característico e intenso dessa fase.

Na Figura 9, chama a atenção também a evidente retração da ferida nos grupos em que foram utilizadas as substâncias testadas (LQM 9.1 e LQM 11.1), diferentemente dos grupos controle (CN e CP). Pode-se deduzir que houve uma aceleração da fase inicial inflamatória, evoluindo com características próprias das fases seguintes e corroborando com os dados microscópicos apresentados que demonstram a diminuição do tamanho da ferida (Figura 8).

Figura 9 - Características clínicas macroscópicas das feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 na Fase 1: presença de retração máxima da ferida em todos os animais dos grupos (média de 1), com $p=0,019$.



Os valores em cada coluna representam a média. ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis. Valores significativos considerando: $p < 0,05$ variáveis macroscópicas da Fase 1 – presença de retração da ferida.

Fonte: AUTORA, 2020.

As análises pelo teste ANOVA seguido do teste Kruskal-Wallis confirmam que as variáveis microscópicas de retração e diminuição do exsudato têm significância estatística na

Fase 1 da cicatrização, apresentando média 1,0 (retração máxima) e média 0,33 para o critério diminuição do exsudato. (Tabela 5). Essa retração e diminuição do exsudato ocorreram nas feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1. Esse fato pode ser avaliado como muito positivo, haja vista que a retração das feridas ocorreu de maneira significativa e houve diminuição da exsudação, sendo possível avançar para outras fases da cicatrização.

Tabela 5 - Análise das variáveis microscópicas na Fase 1: retração da ferida e diminuição do exsudato nos grupos LQM 9.1 e LQM 11.1.

| | | N | Média | Desvio Padrão | Erro Padrão |
|---------------------------------|-------|----|--------|---------------|-------------|
| Hiperemia | 1 | 3 | ,8900 | ,19053 | ,11000 |
| | 2 | 3 | ,5567 | ,19630 | ,11333 |
| | 3 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | ,4433 | ,19630 | ,11333 |
| | Total | 12 | ,5550 | ,26159 | ,07551 |
| Coagulo | 1 | 3 | ,5567 | ,19630 | ,11333 |
| | 2 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | 3 | 3 | ,2200 | ,19053 | ,11000 |
| | 4 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,3592 | ,17318 | ,04999 |
| Sangramento | 1 | 3 | ,2200 | ,19053 | ,11000 |
| | 2 | 3 | ,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | 3 | 3 | ,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | ,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,0550 | ,12845 | ,03708 |
| Presença retração_ferida | 1 | 3 | ,5567 | ,19630 | ,11333 |
| | 2 | 3 | ,5567 | ,19630 | ,11333 |
| | 3 | 3 | 1,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | 1,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,7783 | ,26003 | ,07506 |

| | | | | | |
|----------------------------------|-------|----|--------|--------|--------|
| | 1 | 3 | 1,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | 2 | 3 | ,5567 | ,19630 | ,11333 |
| Exsudato | 3 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,5542 | ,29770 | ,08594 |
| | 1 | 3 | ,4433 | ,19630 | ,11333 |
| | 2 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| Hiperplasia_bordas_ferida | 3 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,3583 | ,09815 | ,02833 |
| | 1 | 3 | ,5567 | ,19630 | ,11333 |
| | 2 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| Inflamação | 3 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | ,2200 | ,19053 | ,11000 |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3/grupo). Houve diferença entre si utilizando ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis, considerando $p < 0.05$. (eixo vertical: 1- controle negativo CP, 2- controle positivo CN, 3- LQM 9.1, 4- LQM 11.1).

Fonte: AUTORA, 2020.

A análise das variáveis microscópicas *presença de retração da ferida e exsudato* na Fase 1 da cicatrização pelo teste qui-quadrado também mostra significância estatística quando a ferida é tratada com a substância testada LQM 9.1 (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise das variáveis microscópicas na Fase 1: significância estatística na presença de retração da ferida e exsudato nas feridas tratadas com LQM 9.1 e LQM 11.1.

| | Hiperemia | Coagulo | Sangramento | Presença_retração_ferida | Exsudato | Hiperplasia_borda_ferida |
|--------------|-----------|---------|-------------|--------------------------|----------|--------------------------|
| Qui-quadrado | 7,394 | 6,089 | 6,600 | 9,900 | 9,680 | 3,000 |
| Df | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Asymp. Sig. | ,060 | ,107 | ,086 | ,019 | ,021 | ,392 |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3/grupo). Houve diferença entre si utilizando teste de qui-quadrado, considerando $p < 0.05$. Comparando controle negativo, positivo, LQM 9.1 e LQM 11.1.

Fonte: AUTORA, 2020.

A deposição de colágeno, proteína mais abundante no corpo humano e também o principal componente da matriz extracelular dos tecidos foi outro critério avaliado. É importante avaliá-lo porque ele forma uma importante rede, densa e dinâmica, resultante da sua constante deposição e reabsorção, como reforçam CAMPOS; BORGES-BRANCO e GROTH (2007).

Nos grupos de feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1, LQM 11.1 e nos grupos CP houve uma maior deposição de colágeno no centro da ferida em relação ao controle negativo CN, apresentando significância de 0,054 (limite marginal), conforme a Figura 10. A deposição de colágeno no centro da ferida colabora para resolução do arcabouço da ferida, que vai sendo preenchido por esse colágeno e contribuindo para o fechamento da ferida.

Em nível celular, inicialmente, há presença dos leucócitos (com predomínio de neutrófilos e monócitos) para após haver redução de neutrófilos e predominar macrófagos. Os neutrófilos têm a finalidade de lise e fagocitose de bactérias e proteínas presentes no leito da ferida e podem perdurar por maior tempo caso haja contaminação (SIMPSON e ROSS, 1972), o que justifica a elevada exsudação, sangramento e hiperemia, como observados micro (Figura 10) e macroscopicamente (Figura 9).

Outras células de suma importância que desempenham papel primordial na lise e fagocitose da fase inflamatória são os macrófagos, presentes do terceiro ao quinto dia após a lesão, que permitem à cicatrização boa evolução, auxilia na progressão para a fase proliferativa por meio da angiogênese e formação do tecido de granulação e são responsáveis pela liberação de vários fatores de crescimento (LEWIS et al., 1999; FALANGA, 1993).

A presença de granulação como critério na macroscopia foi classificada como leve nos grupos CP. Mostrou-se moderada nos grupos das substâncias testadas LQM 9.1 e LQM 11.1 e moderada para elevada nos grupos CN. A granulação é um fator importante de oxigenação e nutrição da ferida, porém quando se mostra exuberante pode vir a prejudicar o fechamento da ferida. Microscopicamente, nas feridas dos grupos das substâncias testadas, principalmente a LQM 11.1 e no grupo CN ela parece ter ocorrido com maior rapidez que no grupo CP (Figura 10).

A deposição de colágeno nas bordas da ferida (fibrose) mostrou-se expressiva nas feridas com a substância LQM 11.1. A deposição das bordas da ferida é considerado fato importante para o fechamento da ferida, bem como a deposição de colágeno no centro da ferida (fibrose) e esta mostrou-se expressiva com a substância LQM 9.1 (Figura 10). Há que se destacar que essa deposição de colágeno ao centro da ferida foi mínima no grupo controle CN.

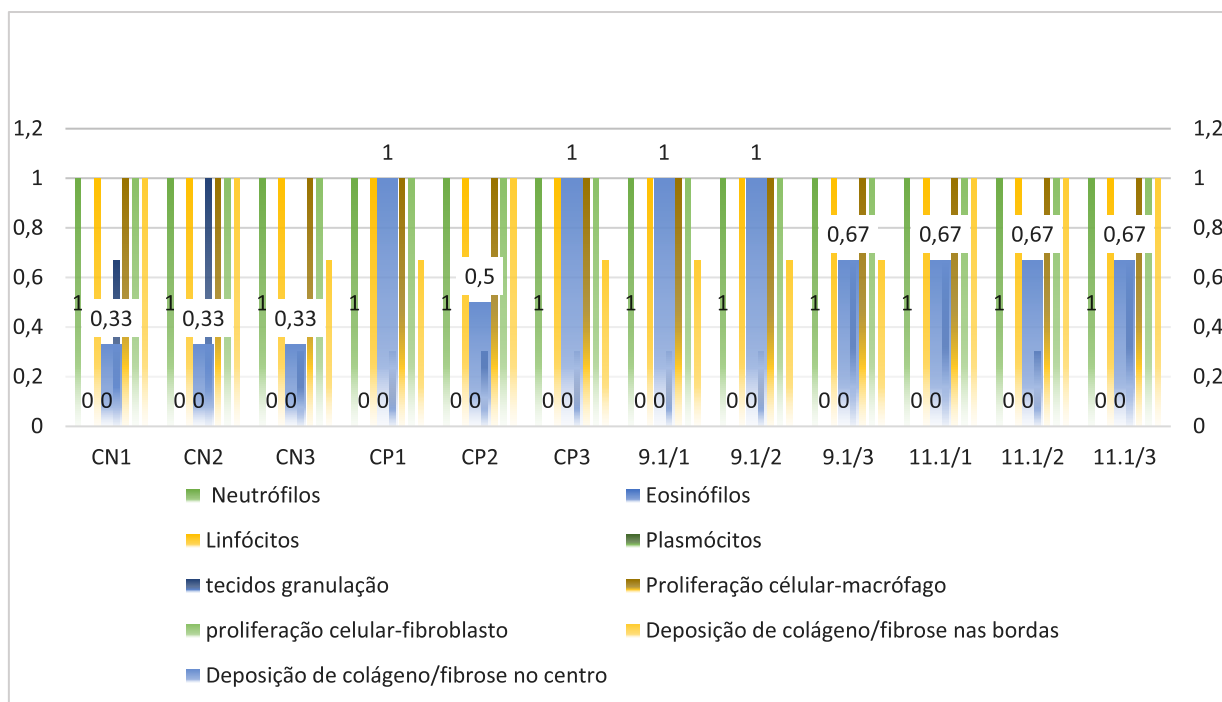
A presença do colágeno sempre é fator importante, pois sua presença está ligada à formação do epitélio, que com o tempo, vai adquirindo maior resistência. Mas já subentende-se que está ocorrendo o fechamento da ferida.

A migração dos queratinócitos a partir das bordas da ferida ocorre nas primeiras 24 horas após a lesão cutânea inicial. Dentro de 1 a 2 dias ocorre a formação do novo epitélio (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994).

A reestruturação da membrana basal ocorre entre 7 a 9 dias após o início da reepitelização, quando haverá a estabilização da derme com auxílio dos fatores de crescimento, desempenhando funções importantes na migração e proliferação dos queratinócitos (LAPLANTE et al., 2001).

O colágeno é uma proteína muito presente nos tecidos, rica em glicina e prolina. O tipo I (sintetizado pelos fibroblastos) é mais encontrado nos ossos e tendões e o tipo III em tecidos moles como vasos sanguíneos, derme e fásia. Normalmente 80% do colágeno tipo I está na derme e 20% do tipo III. O colágeno associado à proliferação e crescimento dos capilares (angiogênese) formarão o tecido conjuntivo, recebendo o tecido de granulação, por sua aparência granular. (ROBSON; STEED; FRANZ, 2001). Dar-se-à início à fase proliferativa.

Figura 10 - Fase 1. Aspectos celulares microscópicos: significância na deposição de colágeno no centro da ferida com substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 (p= 0,054).



Os valores em cada coluna representam a média. ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis. Não houve diferença estatística entre si. Valores significativos considerando: ***p< 0,05.

Fonte: AUTORA, 2020.

Vale ressaltar que muitos mediadores químicos estão envolvidos na inflamação e podem ter origem tissular, como os eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária, aminas vaso ativas (histamina e serotonina), citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8, TNF- α IFN- α), óxido nítrico e de origem plasmática (componentes do sistema complemento, sistema de coagulação, sistema fibrinolítico e pelas cininas (CARVALHO et al., 2004). São esses importantes mediadores que interferem diretamente nos sinais relatados acima, apresentados na fase 1 das feridas dos animais.

Eventos vasculares ocorrem com a participação prostaglandinas, como dilatação arteriolar, gerando maior fluxo de sangue seguido de estase, aumento da permeabilidade venular, exsudação plasmática, que carrega para os tecidos componentes do sistema complemento, da coagulação, fibrinolítico e das cininas. Paralelamente, os eventos celulares envolvem a participação de polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), mastócitos e seus respectivos mediadores pró-inflamatórios (TASAKA, 1999).

Quando se analisa as variáveis microscópicas de deposição de colágeno no centro da ferida pelo teste qui-quadrado, observou-se significância estatística (significância marginal, $p=0,52$) nas feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1, ou seja, nas feridas tratadas com essas substâncias, a deposição de colágeno no centro da ferida depositou-se de forma significativa comparando-se os quatro grupos (CN,CP, LQM 9.1 e LQM 11.1), conforme mostra a Tabela 7.

Tabela 7 - Análise das variáveis microscópicas na Fase 1: importante deposição de colágeno no centro da ferida, com índices na margem estatística de significância de $p=0,052$

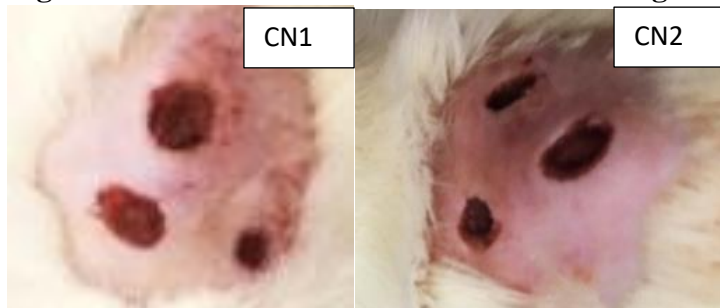
| | Inflamação | Plasmócitos | Tecido granulação | Deposição_de_coláge no_fibrose_centro | Deposição_coláge no_fibrose_bordas |
|--------------|------------|-------------|-------------------|--|---------------------------------------|
| Qui-quadrado | 6,089 | 3,000 | 3,617 | 7,739 | 6,111 |
| Df | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Asymp. Sig. | ,107 | ,392 | ,306 | ,052 | ,106 |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média ($n=3$ /grupo). Houve diferença entre si utilizando teste de qui-quadrado, considerando $p<0.05$. Comparando controle negativo CN, positivo CP, LQM 9.1 e LQM 11.1.

Fonte: AUTORA, 2020.

Nas fotos das feridas das figuras 11 e 12 que se encontram na Fase 1, os controles negativos apresentaram coágulo, hiperemia, sangramento e exsudato de maneira acentuada, não demonstrando ainda sinais de retração / diminuição no tamanho das feridas.

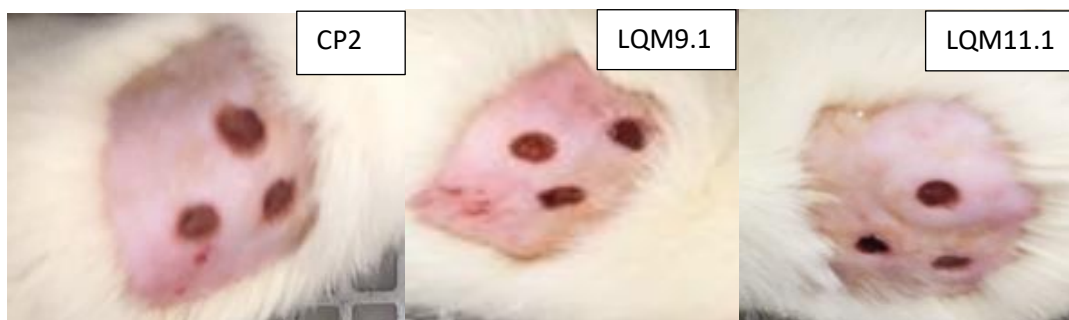
Figura 11 e 12 - Feridas na Fase 1: controles negativos CN1 e CN2



Figuras 11 e 12 (CN1 e CN2): apresentam coágulo acentuado nas feridas, com hiperemia e sangramento, sem retração das bordas ou do tamanho da lesão, e presença de exsudato. Fonte: AUTORA, 2020.

Nas feridas do controle positivo CP observou-se uma intensa hiperemia, presença de coágulo, retração leve no tamanho das feridas e exsudato moderado. Nas feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 observou-se retração da ferida mais evidente, coágulo e edema moderados e presença de exsudato de maneira leve.

Figuras 13, 14 e 15 – Feridas na Fase 1: Controle positivo CP2, substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1



Ferida CP2 com intensa hiperemia, coágulo, retração leve das bordas e exsudato moderado. Ferida LQM 9.1 e LQM 11.1 com retração da ferida mais evidente, coágulo moderado e leve e presença de exsudato leve. Fonte: AUTORA, (2020).

5.2 Fase Proliferativa (Fase 2)

A Fase 2 é responsável pelo fechamento da ferida por meio da epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno e tem início por volta do 4º dia após a lesão e prolonga-se em média até a segunda semana (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994).

Nas figuras 16 e 17 que encontram-se na fase 2 da cicatrização, a ferida tratada com a substância LQM 9.1 (figura 17) demonstrou ter características muito mais aproximadas da Fase 2 que a figura 16 (controle negativo CN), pois apresenta tecido de granulação, depósito de colágeno ao centro da ferida, exsudato e presença de coágulos de maneira leve. A figura 16, embora esteja na fase 2, não apresenta características da fase 2 e sim da fase anterior (fase1), pois ainda possui coágulos, exsudato e colágeno das bordas da ferida de maneira acentuada, características mais comumente presentes na fase 1.

Figuras 16 e 17 – Feridas na Fase 2: aspecto microscópico das feridas tratadas com as substâncias CN1 e LQM 9.1.2.

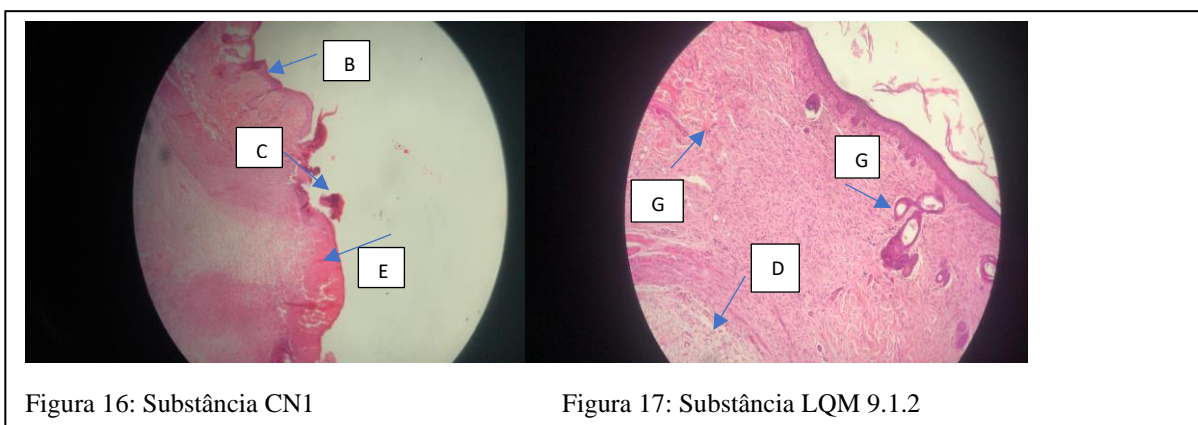


Fig.16: Observou-se, de forma acentuada, em ferida tratada com substância CN1: coágulo (C), exsudato(E) e borda acentuada. Fig.17: depósito de colágeno ao centro da ferida é acentuada (D), tecido de granulação (G), exsudato e coágulo leves. Microscopia ótica, corada por hematoxilina eosina.

Fonte: AUTORA, 2020.

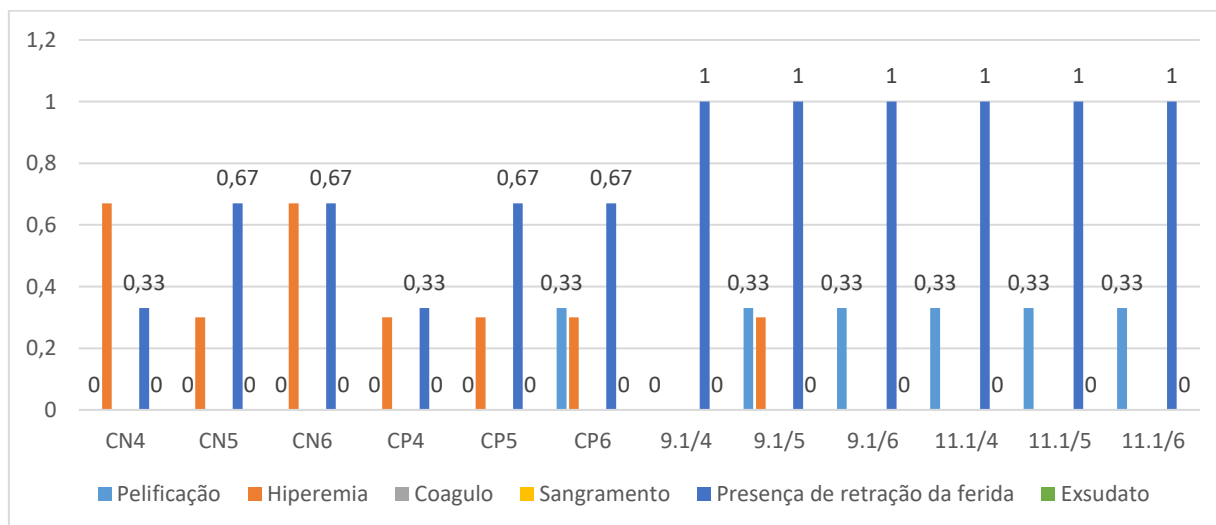
Na avaliação macroscópica (Figura 18), não se observou hiperemia nas feridas das substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 ($p= 0,033$). Houve retração total das feridas nos grupos com uso da substância LQM 9.1 e LQM 11.1, ($p= 0,019$). As características macroscópicas e microscópicas são visualizadas nas Figuras 18, 19 e 20.

A hiperemia refere-se ao fluxo sanguíneo aumentado devido à vasodilatação causada pela ação das substâncias vasoativas que foram liberadas após a lesão. Macroscopicamente observa-se o local avermelhado, presença de edema, temperatura elevada e microscopicamente há presença de células de defesa, ingurgitamento do vaso e hemácias (PEREIRA, 2011).

A presença de hiperemia nas feridas na fase 2 (Figura 18) foi considerada acentuada nos grupos CN, moderada nos grupos CP e ausente nas substâncias testadas. Esse fato denota que as feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 já ultrapassaram a fase inflamatória, sem demonstrar sinais de que ainda pudessem estar na fase 1, diferentemente do grupo controle CN e CP, que apresentaram características da fase anterior.

Quanto à retração da ferida (Figura 18), além do grupo tratado com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 não apresentarem hiperemia, tiveram uma retração acentuada da ferida, demonstrando sinais de fechamento da lesão já na fase 2. A presença ou surgimento de pêlos (repilação), só ocorreu em 01 de 06 dos animais dos controles (apenas 01 do CP) mas foi muito observada nos grupos tratados com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 (em 05 dos 06 animais), creditando esse evento também a uma maior velocidade para o fechamento das feridas nestes grupos.

Figura 18 - Fase 2. Características macroscópicas de ausência de hiperemia e retração total das feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1, com média 1 (100%) e significância estatística.



Os valores em cada coluna representam a média. ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis. Valores significativos considerando: $p < 0,05$ variáveis macroscópicas da Fase 2 – Hiperemia e presença de retração da ferida.

Fonte: AUTORA, 2020.

Tabela 8 - Análise post-hoc das variáveis macroscópicas na Fase 2 demonstrando significância estatística na presença de retração da ferida e ausência de hiperemia.

| Variável dependente | (I) ID | (J) ID | Diferença Média (I-J) | Desvio Padrão | Valor de p | 95% intervalo confiança Limite Inferior |
|---------------------|--------|--------|-----------------------|---------------|------------|--|
| Repilação | 1 | 2 | -,11000 | ,11000 | 1,000 | -,4927 |
| | | 3 | -,22000 | ,11000 | ,483 | -,6027 |
| | | 4 | -,33000 | ,11000 | ,102 | -,7127 |
| | 2 | 1 | ,11000 | ,11000 | 1,000 | -,2727 |
| | | 3 | -,11000 | ,11000 | 1,000 | -,4927 |
| | | 4 | -,22000 | ,11000 | ,483 | -,6027 |
| | 3 | 1 | ,22000 | ,11000 | ,483 | -,1627 |
| | | 2 | ,11000 | ,11000 | 1,000 | -,2727 |
| | | 4 | -,11000 | ,11000 | 1,000 | -,4927 |
| | 4 | 1 | ,33000 | ,11000 | ,102 | -,0527 |
| | | 2 | ,22000 | ,11000 | ,483 | -,1627 |
| | | 3 | ,11000 | ,11000 | 1,000 | -,2727 |
| Hiperemia | 1 | 2 | ,22667 | ,11168 | ,461 | -,1619 |
| | | 3 | ,44667* | ,11168 | ,024 | ,0581 |
| | | 4 | ,55667* | ,11168 | ,006 | ,1681 |
| | 2 | 1 | -,22667 | ,11168 | ,461 | -,6152 |
| | | 3 | ,22000 | ,11168 | ,506 | -,1685 |
| | | 4 | ,33000 | ,11168 | ,110 | -,0585 |
| | 3 | 1 | -,44667* | ,11168 | ,024 | -,8352 |
| | | 2 | -,22000 | ,11168 | ,506 | -,6085 |
| | | 4 | ,11000 | ,11168 | 1,000 | -,2785 |

| | | | | | | |
|---------------------------------|---|---|----------|--------|-------|--------|
| Presença_retração_ferida | 4 | 1 | -,55667* | ,11168 | ,006 | -,9452 |
| | | 2 | -,33000 | ,11168 | ,110 | -,7185 |
| | | 3 | -,11000 | ,11168 | 1,000 | -,4985 |
| | 1 | 2 | ,00000 | ,11333 | 1,000 | -,3943 |
| | | 3 | -,44333* | ,11333 | ,027 | -,8376 |
| | | 4 | -,44333* | ,11333 | ,027 | -,8376 |
| | 2 | 1 | ,00000 | ,11333 | 1,000 | -,3943 |
| | | 3 | -,44333* | ,11333 | ,027 | -,8376 |
| | | 4 | -,44333* | ,11333 | ,027 | -,8376 |
| | 3 | 1 | ,44333* | ,11333 | ,027 | ,0491 |
| | | 2 | ,44333* | ,11333 | ,027 | ,0491 |
| | | 4 | ,00000 | ,11333 | 1,000 | -,3943 |

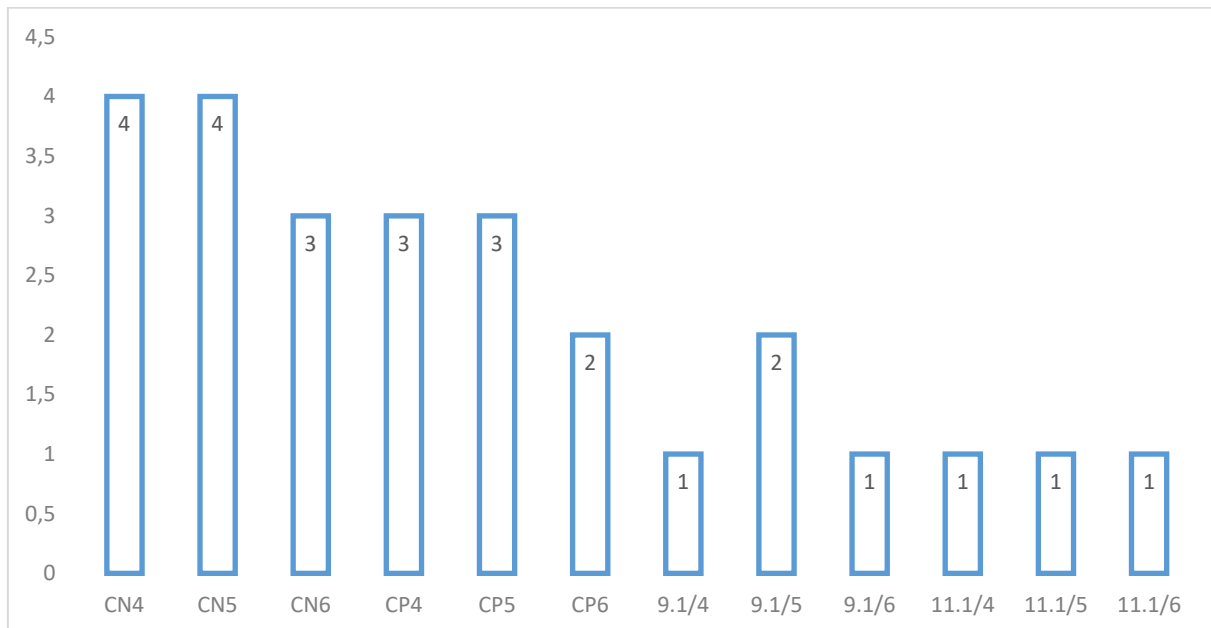
Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3/grupo). Houve significância estatística por ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis, utilizado como post hoc. Valores significativos considerando: $p < 0,05$ (eixo vertical: 1- controle negativo, 2- controle positivo, 3- LQM 9.1, 4- LQM 11.1).

Fonte: AUTORA, 2020.

O tamanho residual das feridas foi acompanhado diariamente mensurando-se com um paquímetro. Considerou-se o tamanho inicial do *punch* 6mm e a maior retração das feridas apresentou 1mm. O tamanho residual das feridas na fase 2 (Figura 19) com o tratamento das substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1, ficou com média de 1mm, com retração quase total quando esses grupos foram comparados ao controle CN, que ficou com média de 3mm em 100% dos animais e em 67 % nas feridas dos animais do grupo controle positivo CP ($p=0,048$).

Esse dado é de grande importância porque é possível comparar que as feridas dos grupos tratados com as substâncias derivadas LQM 9.1 e LQM 11.1 influenciaram na resolução das feridas (Figura 19).

Figura 19 - Fase 2. Avaliação microscópica do tamanho residual das feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1, com média de 1mm.



Os valores em cada coluna representam a média. ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis. Valores significativos considerando: $p < 0,05$ variáveis microscópicas da Fase 2 – Tamanho residual da ferida.

Fonte: AUTORA, 2020.

Os dados mostram significância estatística no critério de avaliação residual da ferida quando são submetidos ao teste do qui-quadrado, com $p=0,048$ (Tabela 9).

Tabela 9 - Fase 2. Avaliação do tamanho residual das feridas pelo teste qui-quadrado.

| | Valor | df | Valor de p. (2 lados) |
|------------------------------|---------------------|----|-----------------------|
| Pearson Chi-Square | 17,067 ^a | 9 | ,048 |
| Razão de Verossimilhança | 19,949 | 9 | ,018 |
| Associação Linear por Linear | | | |
| N de casos válidos | 9,174 | 1 | ,002 |
| | 12 | | |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média ($n=3$ /grupo), utilizado teste do qui quadrado. Valores significativos considerando: $p < 0,05$ variáveis microscópicas da Fase 2 – Tamanho residual da ferida.

Fonte: AUTORA, 2020.

No final da fase proliferativa ocorre a formação do tecido de granulação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados e quem realiza essa função é o fator de crescimento - PDGF. Há produção de fibroblastos, estimulados pelo TGF- β , que produzirão colágeno tipo I, e esses fibroblastos transformar-se-ão em miofibroblastos, células capazes de fazer a contração da ferida, principalmente através da aproximação das bordas (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Considerando que o tamanho residual das feridas se refere às características da fase proliferativa citadas acima, com a contração da ferida ocorrendo principalmente com a atuação dos miofibroblastos ao fim da fase 2, foi observado que nos grupos tratados com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 essa contração ocorreu de forma evidente.

Tabela 10 - Fase 2. Avaliação microscópica do tamanho residual das feridas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1, significância estatística com média de 1mm.

| | | Tamanho_residual_ferida | | | | Total | |
|----|---|----------------------------------|--------|-------|-------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | | |
| ID | 1 | Count | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| | | % within ID | 0,0% | 0,0% | 33,3% | 66,7% | 100,0% |
| | | % within Tamanho_residual_ferida | 0,0% | 0,0% | 33,3% | 100,0% | 25,0% |
| | 2 | Count | 0 | 1 | 2 | 0 | 3 |
| | | % within ID | 0,0% | 33,3% | 66,7% | 0,0% | 100,0% |
| | | % within Tamanho_residual_ferida | 0,0% | 50,0% | 66,7% | 0,0% | 25,0% |
| | 3 | Count | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| | | % within ID | 66,7% | 33,3% | 0,0% | 0,0% | 100,0% |
| | | % within Tamanho_residual_ferida | 40,0% | 50,0% | 0,0% | 0,0% | 25,0% |
| | 4 | Count | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| | | % within ID | 100,0% | 0,0% | 0,0% | 0,0% | 100,0% |

| | | | | | | |
|-------|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Total | % within | | | | | |
| | Tamanho_residual_ferida | 60,0% | 0,0% | 0,0% | 0,0% | 25,0% |
| | Count | 5 | 2 | 3 | 2 | 12 |
| | % within ID | 41,7% | 16,7% | 25,0% | 16,7% | 100,0% |
| | % within | | | | | |
| | Tamanho_residual_ferida | 100,0% | 100,0% | 100,0% | 100,0% | 100,0% |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3/grupo). ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis. Valores significativos considerando: $p < 0,05$ (eixo vertical: 1- controle negativo, 2- controle positivo, 3- LQM 9.1, 4- LQM 11.1).

Fonte: AUTORA, 2020.

Não se observou tecido de granulação nas feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1, com limite marginal de significância $p = 0,054$. Essa informação tem alto valor pois indica uma aceleração da fase proliferativa da cicatrização (fase 2), caminhando para a Fase 3, de remodelação. Pôde-se observar que nos grupos controle CN e CP houve ocorrência de exsudato, hiperplasia da borda e granulação. Esses eventos são próprios da Fase 2, proliferativa, no entanto, as feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e 11.1 aceleraram esse processo, não mais apresentando essas características.

Sobre o critério hiperplasia das bordas, é um fenômeno que ocorre de maneira mais frequente na fase 1. Nesse caso, em 100 % das feridas tratadas com a substância LQM 9.1 e LQM 11.1 não houve hiperplasia das bordas com $p = 0,037$, enquanto o grupo controle CN ainda tem hiperplasia com média $p = 0,22$ e o controle positivo CP com $p = 0,33$. Todos esses parâmetros tiveram significância estatística. Comparando-se assim os grupos, é possível dizer que as feridas tratadas demonstraram uma maior evolução na cicatriz, progredindo com características da fase 2 enquanto que os grupos controle CN e CP ainda demonstram características da fase 1.

No aspecto inflamatório tecidual microscópico, um componente inflamatório ainda encontrado foram os neutrófilos, nos grupos controle CN e CP, aparecendo de forma evidente enquanto no restante dos grupos não mais aparece. Tendo em vista que os neutrófilos fazem parte da fase 1 (inflamatória), conclui-se que há um atraso na permanência dessa célula neste momento, fase 2.

Neutrófilos são células que aparecem dentro de 24h após a lesão, sendo atraídos por substâncias quimiotáticas que foram liberadas por plaquetas; produzem radicais livres que

auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

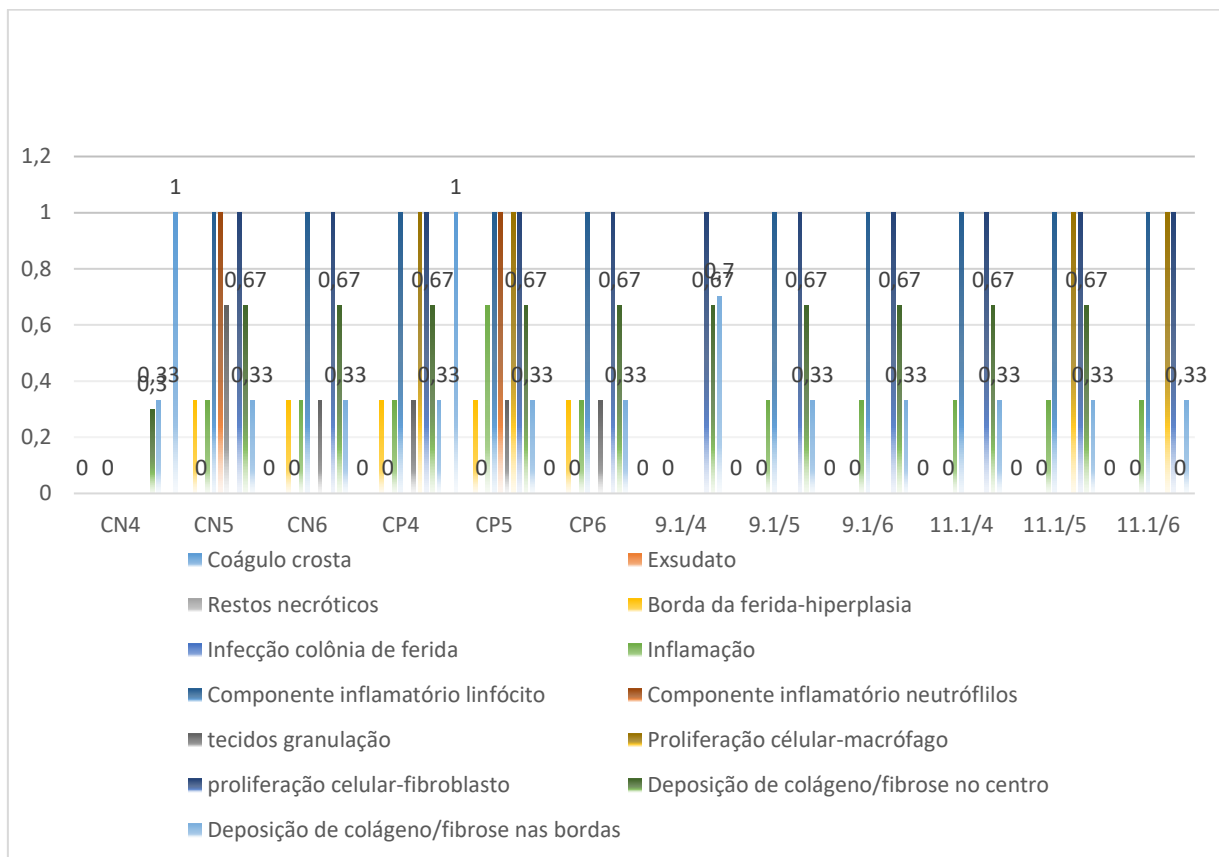
A presença de linfócitos nessa fase 2 (Figura 20) é comum a todas as feridas, porém, diante de todos os grupos, apresenta intensidade bem menor nas substâncias testadas (LQM 9.1) o que demonstra que esse grupo não está na mesma fase que os demais.

A presença de macrófagos é um critério muito importante para a transição da fase 1 para a fase 2, no entanto, ela está ausente no grupo das substâncias testadas LQM 9.1 (Figura 20) afirmando assim que a ferida não mais se encontra na fase inicial e sim progredindo para a próxima fase.

Os macrófagos migram para a ferida após 48 - 96 horas da lesão, e são as principais células antes dos fibroblastos migrarem e iniciarem a replicação. Têm papel fundamental no término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos e sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, fundamentais para a transição para a fase proliferativa (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Os macrófagos estão presentes na ferida dentro de 48 – 96 horas do início da lesão, participando primordialmente no desbridamento. Suas importantes funções estão ligadas à produção de citocinas e fatores de crescimento, colaborando com a angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, auxiliando na progressão para a fase proliferativa (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Figura 20 - Fase 2. Avaliação microscópica com ausência de hiperplasia nas bordas e ausência de tecido de granulação das feridas com uso das substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1, com significância estatística.



Os valores em cada coluna representam a média. ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis, utilizado com pós-teste. Valores significativos considerando: $p < 0,05$ variáveis microscópicas da Fase 2.

Fonte: AUTORA, 2020.

Tabela 11 - Análise das variáveis microscópicas na Fase 2 demonstrando significância estatística para a presença de retração da ferida e hiperplasia da borda das feridas que utilizaram substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1.

| | Repilação | Hiperemia | Presença_retração_ ferida | Hiperplasia_bordas _ferida | Inflamação |
|--------------|-----------|-----------|------------------------------|-------------------------------|------------|
| Qui-quadrado | 6,111 | 8,770 | 9,900 | 8,486 | 3,400 |
| DF | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Valor de p | ,106 | ,033 | ,019 | ,037 | ,334 |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média ($n=3$ /grupo). Houve significância estatística utilizado teste do qui quadrado. Valores significativos considerando: $p < 0,05$.

Fonte: AUTORA, 2020.

Tabela 12 - Análise celular das variáveis microscópicas na Fase 2: ausência de hiperplasia nas bordas das feridas que utilizaram substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1

| | | N | Media | Desvio padrão | Erro padrão |
|----------------------------------|-------|----|--------|---------------|-------------|
| Repilação | 1 | 3 | ,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | 2 | 3 | ,1100 | ,19053 | ,11000 |
| | 3 | 3 | ,2200 | ,19053 | ,11000 |
| | 4 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,1650 | ,17234 | ,04975 |
| Hiperemia | 1 | 3 | ,5567 | ,19630 | ,11333 |
| | 2 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | 3 | 3 | ,1100 | ,19053 | ,11000 |
| | 4 | 3 | ,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,2492 | ,25177 | ,07268 |
| Presença_retração_ferida | 1 | 3 | ,5567 | ,19630 | ,11333 |
| | 2 | 3 | ,5567 | ,19630 | ,11333 |
| | 3 | 3 | 1,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | 1,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,7783 | ,26003 | ,07506 |
| Hiperplasia_bordas_ferida | 1 | 3 | ,2200 | ,19053 | ,11000 |
| | 2 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | 3 | 3 | ,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | ,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,1375 | ,16993 | ,04905 |
| Inflamação | 1 | 3 | ,2200 | ,19053 | ,11000 |
| | 2 | 3 | ,4433 | ,19630 | ,11333 |
| | 3 | 3 | ,2200 | ,19053 | ,11000 |
| | 4 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |

| | | | | | |
|--|-------|----|-------|--------|--------|
| tecidos_granulação | Total | 12 | ,3033 | ,17185 | ,04961 |
| | 1 | 3 | ,3333 | ,33501 | ,19342 |
| | 2 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | 3 | 3 | ,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | ,0000 | ,00000 | ,00000 |
| Deposição_de_colágeno_fibro se_centro | Total | 12 | ,1658 | ,22452 | ,06481 |
| | 1 | 3 | ,5467 | ,21362 | ,12333 |
| | 2 | 3 | ,6700 | ,00000 | ,00000 |
| | 3 | 3 | ,6700 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | ,4467 | ,38682 | ,22333 |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3/grupo). Houve diferença entre si utilizando ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis, considerando $p < 0.05$. variáveis celulares microscópicas. (eixo vertical: 1- controle negativo CN, 2- controle positivo CP, 3- LQM 9.1, 4- LQM 11.1).

Fonte: AUTORA, 2020.

A análise pos hoc faz uma comparação entre os grupos LQM 9.1 e LQM 11.1 com os demais grupos para avaliar se houve significância dos critérios analisados.

Nessa análise multivariada (Tabela 13), observou-se nas variáveis microscópicas da Fase 2, significância estatística no critério presença de retração da ferida com o uso da substância LQM 11.1 e grupo controle negativo CN ($p=0,027$). Também houve significância estatística quando comparados os grupos LQM 9.1, grupo controle positivo CP e negativo CN ($p= 0,017$). Quanto à hiperplasia da borda, também foi observada significância estatística quando comparados os grupos da substância LQM 11.1 e grupo controle negativo CN ($p= 0,017$) e LQM 9.1 e grupo controle positivo CP e negativo CN ($p= 0,017$).

Essa análise confirma que o desempenho dos critérios analisados nas substâncias testadas LQM 9.1 e LQM 11.1 se sobrepõe ao desempenho das substâncias testadas nos grupos controle CN e CP, já submetidos também às análises estatísticas pelos testes qui-quadrado e Kruskal Wallis.

Tabela 13 - Análise post-hoc das variáveis microscópicas na Fase 2: significância estatística para presença de retração da ferida e hiperplasia da borda.

| Variável dependente | (I) ID | (J) ID | Média (I-J) | Desvio padrão | Valor de p | 95% intervalo de confiança | |
|---------------------------------|----------------------------------|--------|-------------|---------------|------------|----------------------------|--------|
| Presença_retração_ferida | 4 | 1 | ,44333 | ,11333 | ,027 | ,0491 | |
| | | 2 | ,44333 | ,11333 | ,027 | ,0491 | |
| | | 3 | ,00000 | ,11333 | 1,000 | -,3943 | |
| | 1 | 2 | -,11000 | ,07778 | 1,000 | -,3806 | |
| | | 3 | ,22000 | ,07778 | ,133 | -,0506 | |
| | | 4 | ,22000 | ,07778 | ,133 | -,0506 | |
| | Hiperplasia_bordas_ferida | 2 | 1 | ,11000 | ,07778 | 1,000 | -,1606 |
| | | | 3 | ,33000 | ,07778 | ,017 | ,0594 |
| | | | 4 | ,33000 | ,07778 | ,017 | ,0594 |
| | | 3 | 1 | -,22000 | ,07778 | ,133 | -,4906 |
| | | | 2 | -,33000 | ,07778 | ,017 | -,6006 |
| | | | 4 | ,00000 | ,07778 | 1,000 | -,2706 |
| Inflamação | 4 | 1 | -,22000 | ,07778 | ,133 | -,4906 | |
| | | 2 | -,33000* | ,07778 | ,017 | -,6006 | |
| | | 3 | ,00000* | ,07778 | 1,000 | -,2706 | |
| | 1 | 2 | -,22333 | ,13610 | ,837 | -,6968 | |
| | | 3 | ,00000 | ,13610 | 1,000 | -,4735 | |
| | | 4 | -,11000 | ,13610 | 1,000 | -,5835 | |
| | 2 | 1 | ,22333* | ,13610 | ,837 | -,2501 | |
| | | 3 | ,22333 | ,13610 | ,837 | -,2501 | |
| | | 4 | ,11333 | ,13610 | 1,000 | -,3601 | |
| | | 1 | ,00000* | ,13610 | 1,000 | -,4735 | |
| | | 3 | 2 | -,22333 | ,13610 | ,837 | -,6968 |
| | 3 | 4 | -,11000 | ,13610 | 1,000 | -,5835 | |

| | | | | | | |
|--------------------|---|---|----------|--------|-------|--------|
| tecidos_granulação | 4 | 1 | ,11000 | ,13610 | 1,000 | -,3635 |
| | | 2 | -,11333* | ,13610 | 1,000 | -,5868 |
| | | 3 | ,11000* | ,13610 | 1,000 | -,3635 |
| | | 2 | ,00333 | ,13677 | 1,000 | -,4725 |
| | 1 | 3 | ,33333* | ,13677 | ,244 | -,1425 |
| | | 4 | ,33333* | ,13677 | ,244 | -,1425 |
| | | 1 | -,00333* | ,13677 | 1,000 | -,4791 |
| | | 2 | ,33000* | ,13677 | ,254 | -,1458 |
| | 2 | 3 | ,33000* | ,13677 | ,254 | -,1458 |
| | | 4 | ,33000 | ,13677 | ,254 | -,1458 |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3/grupo). Houve significância estatística por ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis, utilizado como post hoc. Valores significativos considerando: $p < 0,05$ (eixo vertical: 1- controle negativo, 2- controle positivo, 3- LQM 9.1, 4- LQM 11.1).

Fonte: AUTORA, 2020.

É possível observar macroscopicamente a evolução da 2ª fase da cicatrização nos grupos CN, CP e LQM 9.1 e LQM 11.1. O grupo CN (Figuras 21 e 22) apesar de estar na 2ª fase da cicatrização, por volta de 14 dias após a confecção da ferida, apresenta leve retração da ferida comparando-se aos demais grupos, que este aspecto é mais pronunciado.

Figuras 21 e 22 - Fase 2. Fotos das Feridas Controles Negativos CN4 e CN5.

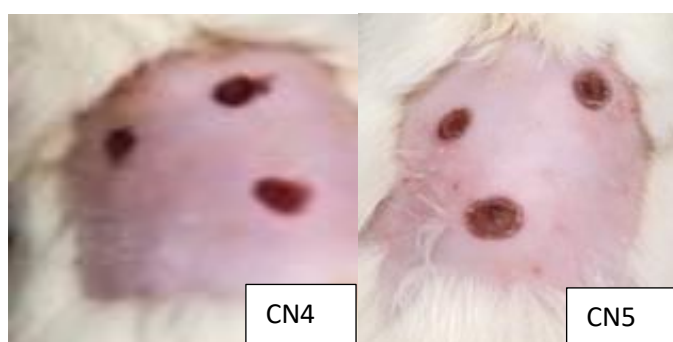


Fig. 21 - CN 4: hiperemia discreta e leve retração da ferida. Fig. 22 - CN5: hiperemia discreta com leve retração e ausência de repilação. Fonte: AUTORA, 2020.

Nas figuras 23 e 24, o grupo CP também se encontra na fase 2, porém com maior retração das feridas.

Figuras 23 e 24 - Fase 2. Fotos dos controles positivos CP4 e CP5.

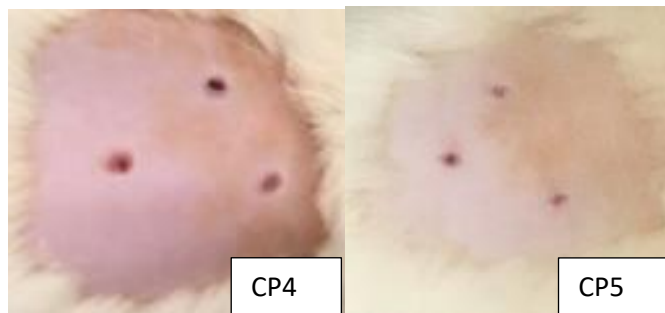


Fig.23.Ferida com hiperemia leve e moderada retração. Fig.24 Sem repilação, hiperemia leve com moderada retração. Fonte: AUTORA, 2020.

As figuras 25 e 26, das feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1, todas na fase 2, também mostram uma evolução mais rápida para a resolução das feridas, tanto comparadas ao grupo anterior CP quanto ao grupo CN.

Figuras 25 e 26 - Fase 2. Fotos das feridas tratadas com LQM 9.1.5 e LQM 11.1.4.



Apresenta acentuada retração sem exsudato, hiperemia leve e presença de leve repilação e acentuada retração da ferida. Fonte: AUTORA, 2020.

Figuras 27 e 28 - Aspecto microscópico das feridas tratadas com substâncias do controle negativo CN5 e LQM 9.1.4.

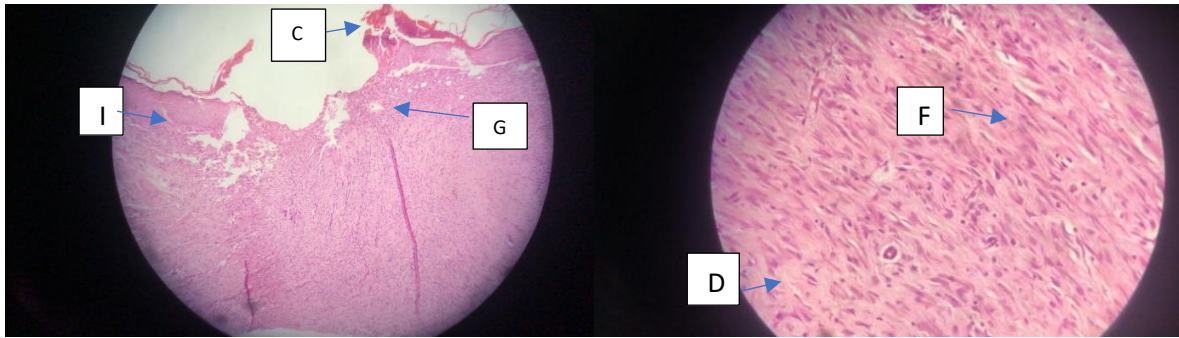


Figura 27. CN5

Figura 28. LQM 9.1.4

A figura 27 apresenta coágulo (C), inflamação (I), hiperplasia e granulação leves (G), e colágeno moderado no centro da ferida. Na figura 26: Inflamação ausente, granulação ausente, componente celular apenas fibroblastos (F) e deposição de colágeno moderada no centro da ferida (D). Figura 28: Lâmina microscopia ótica corada por hematoxilina eosina (HE).

Fonte: AUTORA, 2020.

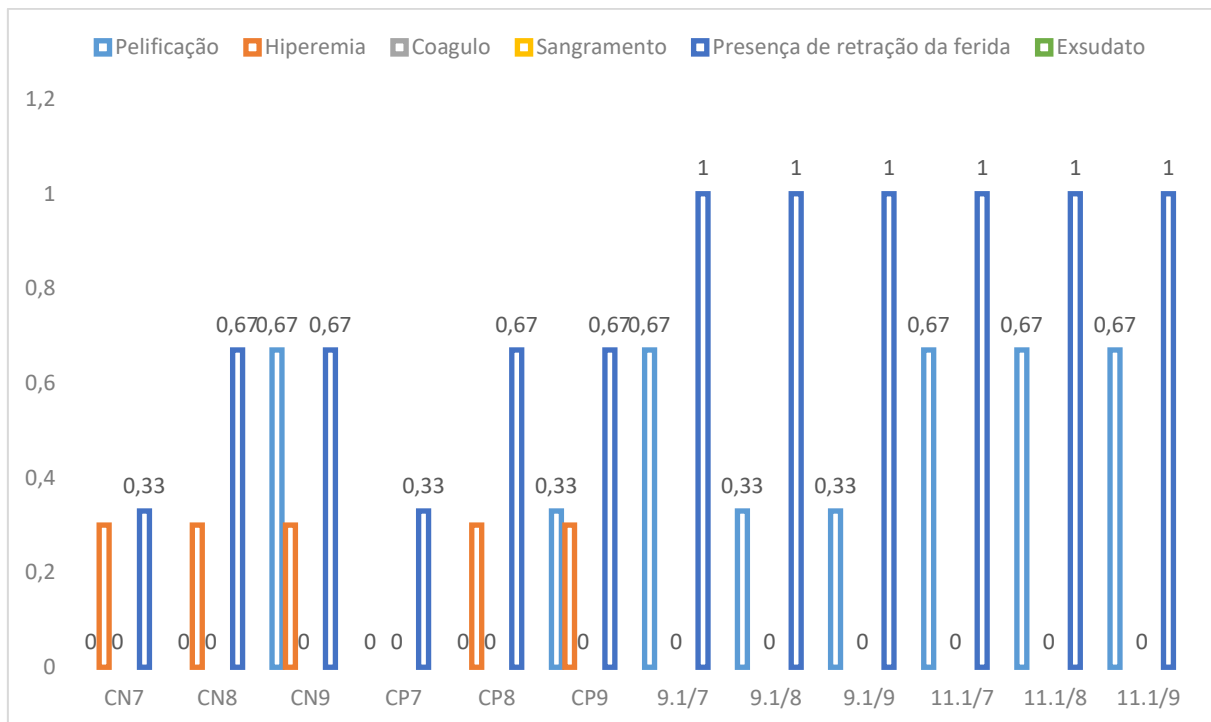
5.3 Fase Proliferativa (fase 3)

Nessa fase um colágeno mais espesso vai sendo produzido e se organizando, aumentando a força de tensão da ferida, com a reorganização de uma nova matriz. Fibroblastos e leucócitos ajudam na lise da matriz antiga trazendo equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da antiga. O ideal é que a deposição de colágeno seja maior que a lise. (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Algumas características macroscopicamente observadas foram a repilação e a resolução total da ferida, seu fechamento completo. A repilação ocorreu de maneira mais acentuada nos grupos LQM 9.1 e LQM 11.1, em relação ao grupo controle, porém sem significado estatístico. Quanto ao critério do tamanho residual das feridas, nos grupos em que foram utilizadas as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1, apresentaram resolução total. As feridas dos grupos controle positivo CP e negativo CN tinham em média 67% de resolução da cicatrização, faltando ainda 1 mm para retração total da ferida. As características macroscópicas nos diversos grupos, são apresentadas na Figura 29.

Na Figura 29 ainda é possível observar a presença de hiperemia nos grupos controle CN e CP, característica observada com evidência na 1ª fase, mostrando que os grupos tratados com essas substâncias apresentaram um ritmo mais lento nesse critério, não demonstrado pelos grupos tratados com as substâncias LQ< 9.1 e LQM 11.1.

Figura 29 - Fase 3. Características macroscópicas: repilação acentuada e tamanho residual ou retração total das feridas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.



Os valores em cada coluna representam a média ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis. Não houve significância considerando: $p < 0,05$ variáveis macroscópicas da Fase 3 – Repilação e presença de retração da ferida.

Fonte: AUTORA, 2020.

Na fase 3 observou-se uma melhora clínica das feridas tratadas pelas substâncias LQM 9.1 e 11.1, inclusive com repilação quase total do local onde foi realizada a epilação para a lesão experimental. Estatisticamente não fica tão evidente, principalmente na retração total da ferida. Mas o tamanho residual das feridas que utilizaram LQM 9.1 e LQM 11.1, foi de 0 mm, enquanto que nos grupos controles positivos CP e negativo CN ainda tinham em média 67%, faltando 1 mm para retração total da ferida (Figura 29).

A margem de significância é de $p=0,062$, representando alto valor biológico. Talvez um n maior possa demonstrar um grau de significância estatística mais elevado o que visualmente já é evidente (Tabela 14).

Tabela 14 - Fase 3. Avaliação macroscópica do tamanho residual das feridas.

| | Valor | DF | Valor de p (2 lados) |
|--------------|---------------------|----|----------------------|
| Qui quadrado | 12,000 ^a | 6 | ,062 |

| | | | |
|--------------------------|--------|---|------|
| Razão de Verossimilhança | 16,636 | 6 | ,011 |
| Associação linear | 7,040 | 1 | ,008 |
| N de casos válidos | 12 | | |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3/grupo). Não houve diferença estatística entre si utilizando pós teste do qui-quadrado, considerando $p < 0.05$.

Fonte: AUTORA, 2020.

Tabela 15 - Análise das variáveis microscópicas na Fase 3: ausência de hiperemia e retração total das feridas tratadas com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1.

| | | N | Média | Desvio padrão | Erro padrão |
|--|-------|----|--------|---------------|-------------|
| Deposição de colágeno_ fibrose_centro | 1 | 3 | ,6700 | ,00000 | ,00000 |
| | 2 | 3 | ,6700 | ,00000 | ,00000 |
| | 3 | 3 | ,6700 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | ,6700 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,6700 | ,00000 | ,00000 |
| Deposição colágeno_fibrose_ bordas | 1 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | 2 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | 3 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,3300 | ,00000 | ,00000 |
| Presença retração_ferida | 1 | 3 | ,5567 | ,19630 | ,11333 |
| | 2 | 3 | ,5567 | ,19630 | ,11333 |
| | 3 | 3 | 1,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | 1,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,7783 | ,26003 | ,07506 |
| Repilação | 1 | 3 | ,2233 | ,38682 | ,22333 |
| | 2 | 3 | ,1100 | ,19053 | ,11000 |
| | 3 | 3 | ,4433 | ,19630 | ,11333 |
| | 4 | 3 | ,6700 | ,00000 | ,00000 |

| | | | | | |
|------------------|-------|----|-------|--------|--------|
| Hiperemia | Total | 12 | ,3617 | ,30175 | ,08711 |
| | 1 | 3 | ,3200 | ,01732 | ,01000 |
| | 2 | 3 | ,2200 | ,19053 | ,11000 |
| | 3 | 3 | ,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | 4 | 3 | ,0000 | ,00000 | ,00000 |
| | Total | 12 | ,1350 | ,16703 | ,04822 |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3/grupo). Houve diferença estatística por ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis, considerando $p < 0.05$. variáveis microscópicas. (eixo vertical: 1- controle negativo CN, 2- controle positivo CP, 3- LQM 9.1, 4- LQM 11.1).

Fonte: AUTORA, 2020.

A avaliação microscópica demonstra o que clinicamente é evidente. As feridas tratadas com substância LQM 9.1 e 11.1 têm ausência da hiperemia (com $p=0,05$), assim como retração total das feridas em relação aos controles negativo CN e positivo CP, com $p= 0,019$ (Tabela 16), demonstrando epitelização total com as substâncias testadas.

Tabela 16 - Análise das variáveis microscópicas na Fase 3.

| | Deposição_de_colágeno_fibrose_centro | Deposição_colágeno_fibrose_bordas | Presença_retração_ferida | Hiperemia | Repilação |
|--------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------|-----------|
| Qui quadrado | ,000 | ,000 | 9,900 | 7,767 | 6,082 |
| DF | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Valor de p | 1,000 | 1,000 | ,019 | ,051 | ,108 |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3/grupo). Houve diferença estatística entre si utilizando pós teste do qui-quadrado, considerando $p < 0.05$. Presença de retração da ferida e hiperemia.

Fonte: AUTORA, 2020.

As demais variáveis microscópicas na fase 3 não tiveram significância estatística, pois entende-se que o fechamento da ferida já ocorreu e que os sinais inflamatórios por exemplo, não estão mais presentes. Entende-se também, que nesse momento, a deposição de colágeno e contração da ferida já tenham atingido seu ponto máximo.

Os fibroblastos são as células que passam por mudanças mais acentuadas. De células imaturas migratórias e replicativas no início do processo, passam a ter características de células ativamente engajadas na síntese proteica. O seu citoplasma torna-se volumoso e apresenta um retículo endoplasmático rugoso abundante. Com isto, eles passam a secretar grandes

quantidades de colágeno, que aos poucos torne-se o principal componente da cicatriz em formação (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Conforme a evolução do processo, aumenta a deposição de colágeno e a maioria das células sofrem apoptose (fibroblastos e células endoteliais) formando enfim uma cicatriz com resolução completa. Após conclusão da maturação e remodelagem da matriz extracelular (o que pode durar meses ou até anos) é que uma cicatriz cutânea adquire 70% da resistência da pele normal (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Na análise estatística pelo ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis utilizados como post hoc (análise multivariada, entre todos os grupos), houve significância para os critérios retração da ferida e hiperemia, durante a fase 3, das feridas tratadas pelas substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1 (Tabela 17).

Tabela 17 - Análise post-hoc das variáveis microscópicas na Fase 3: significância estatística para a presença de retração da ferida e hiperemia.

| Variável dependente | (I) ID | (J) ID | Média de diferença (I-J) | Desvio padrão | p | 95% intervalo de confiança |
|---------------------------------|--------|--------|--------------------------|---------------|-------|----------------------------|
| | | | | | | Limite inferior |
| Presença_retração_ferida | 1 | 2 | ,00000 | ,11333 | 1,000 | -,3943 |
| | | 3 | -,44333* | ,11333 | ,027 | -,8376 |
| | | 4 | -,44333* | ,11333 | ,027 | -,8376 |
| | 2 | 1 | ,00000 | ,11333 | 1,000 | -,3943 |
| | | 3 | -,44333* | ,11333 | ,027 | -,8376 |
| | | 4 | -,44333* | ,11333 | ,027 | -,8376 |
| | 3 | 1 | ,44333* | ,11333 | ,027 | ,0491 |
| | | 2 | ,44333* | ,11333 | ,027 | ,0491 |
| | | 4 | ,00000 | ,11333 | 1,000 | -,3943 |
| | 4 | 1 | ,44333* | ,11333 | ,027 | ,0491 |
| | | 2 | ,44333* | ,11333 | ,027 | ,0491 |

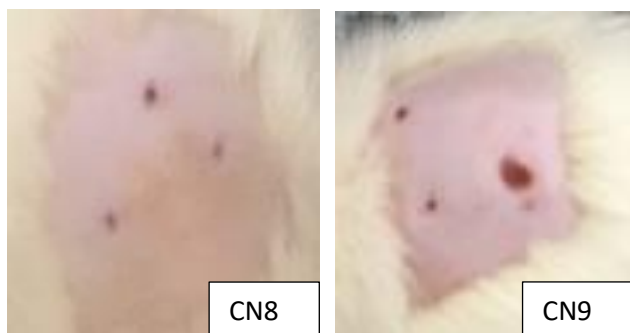
| | | | | | | |
|------------------|---|---------|----------|--------|--------|---------|
| Repilação | 1 | 3 | ,00000 | ,11333 | 1,000 | -,3943 |
| | | 2 | ,11333 | ,19342 | 1,000 | -,5595 |
| | | 3 | -,22000 | ,19342 | 1,000 | -,8929 |
| | | 4 | -,44667 | ,19342 | ,298 | -1,1195 |
| | 2 | 1 | -,11333 | ,19342 | 1,000 | -,7862 |
| | | 3 | -,33333 | ,19342 | ,739 | -1,0062 |
| | | 4 | -,56000 | ,19342 | ,120 | -1,2329 |
| | | 1 | ,22000 | ,19342 | 1,000 | -,4529 |
| | 3 | 2 | ,33333 | ,19342 | ,739 | -,3395 |
| | | 4 | -,22667 | ,19342 | 1,000 | -,8995 |
| | | 1 | ,44667 | ,19342 | ,298 | -,2262 |
| | | 2 | ,56000 | ,19342 | ,120 | -,1129 |
| 4 | 3 | ,22667 | ,19342 | 1,000 | -,4462 | |
| | 2 | ,10000 | ,07810 | 1,000 | -,1717 | |
| | 3 | ,32000* | ,07810 | ,021 | ,0483 | |
| | 4 | ,32000* | ,07810 | ,021 | ,0483 | |
| Hiperemia | 1 | 1 | -,10000 | ,07810 | 1,000 | -,3717 |
| | | 3 | ,22000 | ,07810 | ,136 | -,0517 |
| | | 4 | ,22000 | ,07810 | ,136 | -,0517 |
| | | 1 | -,32000* | ,07810 | ,021 | -,5917 |
| | 2 | 2 | -,22000 | ,07810 | ,136 | -,4917 |
| | | 4 | ,00000 | ,07810 | 1,000 | -,2717 |

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (n=3/grupo). Houve significância estatística por ANOVA, seguida pelo teste de Kruskal Wallis, utilizado como post hoc. Valores significativos considerando: $p < 0,05$. (eixo vertical: 1- controle negativo, 2- controle positivo, 3- LQM 9.1, 4- LQM 11.1).

Fonte: AUTORA, 2020.

Nas fotos das feridas dos grupos CN8 e CN9, o aspecto macroscópico mostra que houve retração da ferida, porém ainda de forma incompleta. E a repilação, outro fenômeno que deveria ocorrer nessa fase, não ocorreu.

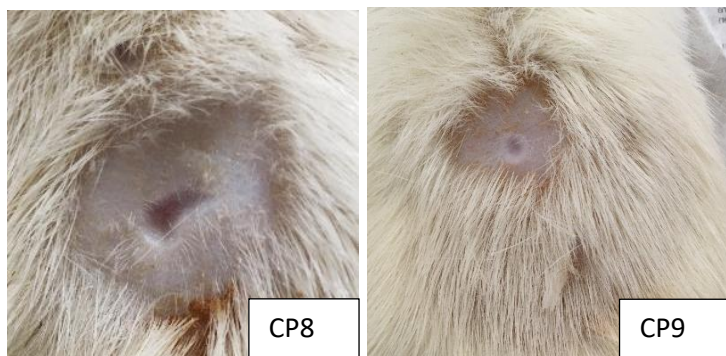
Figuras 30 e 31 - Fase 3. Fotos dos controles negativos CN8 e CN9



As fotos das feridas dos animais CN8 e CN9 apresentam retração ainda incompleta e ausência de repilação. Fonte: AUTORA, 2020.

Na figura 32 e 33, do grupo controle CP, as feridas apresentam-se menos profundas, mas ainda não atingiram sua resolução. Apresentam menos hiperemia e repilação moderada a intensa.

Figura 32 e 33 - Fase 3. Foto dos controles positivos CP8 e CP9.



As feridas dos animais CP8 e CP9 apresentam moderada repilação e retração da ferida moderada. Fonte: AUTORA, 2020.

Nas figuras 33 e 34 as feridas na fase 3 mostram repilação moderada e a resolução total das feridas após o tratamento com as substâncias LQM 9.1 e LQM 11.1, apresentando aspecto cicatrizado.

Figuras 34 e 35 - Fase 3. Fotos das feridas tratadas com LQM 9.1.7 e LQM 11.1.7.



Figuras 34 e 35: as feridas dos animais apresentam repilação moderada e retração total da ferida, ficando com aspecto macroscópico cicatrizado.

Fonte: AUTORA, 2020.

O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras de colágeno, que, em princípio é feita de maneira aleatória. De acordo com as tensões aplicadas do tecido, as fibras serão resintetizadas e reorganizadas de maneira repetida, formando fibras maiores de colágeno e resultando numa cicatriz mais regular e resistente (CLARK, 1993).

Num processo normal de cicatrização, as feridas seguem o curso de suas fases. Porém, nas feridas crônicas e em indivíduos com co-morbidades associadas elas prolongam-se por meses ou anos. Segundo Ladeira et al. (2011), as feridas tornam-se crônicas devido a uma série de eventos moleculares e celulares do processo de cicatrização, como a alta concentração de metaloproteinases (MMPs), neuropatia, infecção e resposta inflamatória não fisiológica, estresse oxidativo, formação excessiva de AGEs, neoangiogênese deficiente, desbalanço entre metabolismo e entrega de nutrientes, diferentes concentrações de fatores de crescimento e reguladores de expressão gênica, e anormalidades celulares.

É possível que as substâncias pesquisadas, por apresentarem potencial antiglicante sejam capazes de diminuir os impactos resultantes da formação excessiva de AGEs e do estresse oxidativo nesses indivíduos e serem eficazes principalmente nessas situações, em que a dificuldade de cicatrização ocorre de maneira crônica e afeta sobremaneira a vida desses indivíduos.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Características macro e microscópicas das feridas tratadas com as substâncias derivadas das tiossemicarbazonas LQM 9.1 e LQM 11.1 demonstraram que aos 21 dias de tratamento houve fechamento total das feridas, com aceleração principalmente das fases 1 e 2 da cicatrização quando comparadas aos grupos controle.

Os derivados de tiossemicarbazonas LQM 9.1 e LQM 11.1 que apresentaram potencial antiglicante (com 70 e 90% de inibição) foram selecionados para o ensaio de cicatrização *in vivo* e demonstraram não serem tóxicos após o teste de citotoxicidade, não sendo observadas quaisquer complicações clínicas durante a utilização tópica em animais.

As substâncias testadas são promissoras para acelerar a cicatrização e podem ser uma alternativa para um tratamento eficaz e de baixo custo, visando auxiliar principalmente os pacientes com feridas crônicas. Outros estudos são necessários para corroborar os dados dessa pesquisa.

PERSPECTIVAS

Dar continuidade com outros estudos que colaborem para que as substâncias possam vir a ser utilizadas.

Patentear o creme para ser utilizado em pacientes com dificuldade de cicatrização, como portadores de feridas crônicas, de origem vascular, úlceras por pressão e em pacientes diabéticos.

Explorar e investigar o potencial dessas substâncias tópicas, associando-as a outras formas de tratamento como ultrassonografia, laser e câmara hiperbárica.

8 REFERÊNCIAS

- ABATE, M.; SCHIAVONE, C.; SALINI, V. The use of hyaluronic acid after tendon surgery and in tendinopathies. *Biomed Res Int.*, 2014.
- AHMED, N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.*, v. 67, n.1, p.3-21, 2005.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the cell*. 4.ed., p. 1106-1107. New York: Garland Science, 2002.
- ALLEN, J.R.; L.V., POPOVICH N.G.; ANSEL, H.C. Pomadas, cremes e géis. In: *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ALMEIDA, P. C. C. Estudo da transição dermoepidérmica dos enxertos de pele e sua relação com o surgimento de vesículas. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2009.
- ALVES, M. R. Influência da nicotina, durante a gestação e lactação, na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes: estudo tensiométrico, morfológico e imunoistoquímico. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. orgs. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. p. 388. ISBN: 85-7541-015-6. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002.
- ANDRADE, S. M. de; SANTOS, I. C. R. V. Oxigenoterapia hiperbárica para tratamento de feridas. *Rev. Gaúcha Enferm.* Porto Alegre, v. 37, n. 2, e59257, 2016.
- ASAI, J. T. H.; HIRAKAWA, S.; SAKABE, J., et al. Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. *Am J Pathol.*, v. 181, p. 2217–2224, 2012.
- BADENHORST, D. et al. Ligações cruzadas influenciam o impacto de mudanças quantitativas no colágeno miocárdico na rigidez cardíaca e remodelação da hipertensão em ratos, *Cardiovascular Research*, v. 57, 3. ed., p. 632–641, 2003.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 41, n. 1, 2005.
- BARBOSA, D.P. Aminoguanidina: uma revisão de literatura. Trabalho de Conclusão de Curso, Escola de Enfermagem e Farmácia – Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2012.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. e. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab*, São Paulo, v. 52, n. 6, p. 940-950, Aug. 2008.
- BASÍLIO, J. A. D. Desenvolvimento e avaliação in vitro da atividade cicatrizante de membranas poliméricas incorporadas com própolis vermelha. 2018. 103 f. Tese (Doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia: Biotecnologia na Saúde) – Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste em Biotecnologia - RENORBIO, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

BEHEREGARAY, W. K. et al. Eletroestimulação na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em coelhos. *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 44, n. 5, p. 878-883, May 2014.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Quím. Nova*, São Paulo, v.27, n.3, p.461-471, 2004.

BIONDO-SIMÕES, M. de L. P. et al. O processo de cicatrização influenciado pelo hipotireoidismo e pelo envelhecimento: estudo da cicatrização da parede abdominal, em ratos. *Acta Cir. Bras.*, São Paulo, v. 20, supl. 1, p. 120-128, 2005.

BITTO, A.; MINUTOLI, L.; ALTAVILLA, D. et al. Simvastatin enhances VEGF production and ameliorates impaired wound healing in experimental diabetes. *Pharmacol Res.*, v. 57, p.159–169, 2008

BOATENG, J. S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci.*, v. 97, p. 2892-2923, 2008.

BOURGUIGNON FILHO, A. M.; FEITOSA, A. C. F; BELTRÃO, G. C.; PAGNONCELLI, G. C. Utilização do laser de baixa intensidade no processo de cicatrização tecidual. Revisão de literatura. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac.* v. 46, n. 1, p. 37-43, 2005.

BRASILEIRO FILHO, G. 8 ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg.*; v. 117, n. 7, p.12-34, 2006.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, v. 414, p. 813-20, 2001.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes.* v. 54, n. 6, p. 1615-25, 2005.

BRYANT, R.; NIX D. *Acute and Chronic Wounds: Current Management Concepts*, 5th Edition, 2015.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. *ABCD, arq. bras. cir. digestiva São Paulo*, v. 20, n. 1, p. 51-58, março de 2007.

CARVALHO, P. T. C.; SIQUEIRA, J. F. R.; FERREIRA, J. V. L.; SILVA, I. S. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos a irradiação do laser HeNe. *Fisioter Bras.*, v. 4, n. 4, p. 253-8, 2003.

CASAS, J. S.; TASENDE, M. S. G.; SORDO, J. Main group metal complexes of semicarbazones and thiosemicarbazones. A structural review. *Coord. Chem. Rev.* v. 209, p. 197-261, 2000.

CERAMI, A. *J. Am. Geriatr. Soc.*, Hypothesis. Glucose as a mediator of aging. v. 33, n. 9, p. 626-34, 1985.

CHAGAS, N. T. C. et al. Tratamento de ferida em *Coendou prehensilis* (Rodentia: Erethizontidae) com laserterapia e ozonioterapia: relato de caso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 71, n. 3, p. 953-958, June 2019.

CHANNUAL, J. et al. Vascular effects of photodynamic and pulsed dye laser therapy protocols. *Lasers Surg Med.*, v. 40, n. 9, p. 644-50, 2008.

CHRAPUSTA, A. et al. A comparative analysis of advanced techniques for skin reconstruction with autologous keratinocyte culture in severely burned children: own experience. *Postepy dermatologii i alergologii, Postepy Dermatologii i Alergologii*, v. 31, n. 3, p. 164–169, 2014.

CHUONG, C. M. et al. What is the 'true' function of skin? *Exp. Dermatol.*, 11: p. 159- 187, 2002.

CHU, D. H. Development and Structure of Skin. In: Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest BA, Gilchrest B, Paller A, et al. Editors. *Fitzpatrick,s Dermatology in General Medicine*, 7th ed. New York: The MacGraw-Hill Companies. Inc., p. 57-72, 2008.

CLARK, R. A. Basics of cutaneous wound repair. *J Dermatol Surg Oncol.*, v. 19, p. 693-706, 1993.

COSTA, A.; FUCHS, S. J; ROSULA, P. M.; PRIGOL, M.; MARCAL, L.M.; CARDOSO, B. V. Avaliação da atividade antioxidante do composto pirazolilbenzenosulfonamida pelos métodos DPPH e ABTS. *Anais do Salão Internacional de ensino, pesquisa e extensão*, v. 8, n. 2, 28 fev. 2020.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunológico. I. Fundamentos da imunidade inata, com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Brasil J Rheumatol.* 50, p. 434 – 46, 2010.

DALMEDICO, M. M. et al. Coberturas de ácido hialurônico no tratamento de queimaduras: revisão sistemática. *Rev Esc Enferm USP.*, v. 50, n. 3, p. 519-24, 2016.

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

DESMOULIERE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.*, p. 146-66, 1995.

DIEGELMANN, R. F. Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen.*, p. 490-5, 2003.

Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA), Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (2013).

DWIERZBICKI, A. S.; POSTON, R.; FERRO, A. The lipid and non-lipid effects of statins. *Pharmacol Ther.*, v. 99, n. 1, p. 95-112, 2003.

EBNER, F. et al. Topical use of dexpanthenol in skin disorders. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 3, p. 427-33, 2002.

ELDER, D. E. *Histopatologia da pele*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

FERREIRA, C. S. O sistema NADPH oxidase de neutrófilos e a formação de AGES (produtos finais de glicação avançada) em ratos diabéticos. *Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas*. Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL, 2011.

FERREIRA, M. Radioterapia pré e pós-operatória na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos avaliada mediante estudo tensiométrico, histológico e da morfometria do colágeno. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2004.

FORBES, J. M., SOLDATOS, G., THOMAS, M. C. Below the radar: advanced glycation end products that detour “around the side”. Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycemic control in diabetes? *Clin Biochem Rev.*, v.26, n 4, p. 123-34, 2005.

FRANÇA, R. A. et al. Acúmulo dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) na pele: relações com o distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica. *Brazilian Journal of Nephrology*, v. 39, n. 3, p. 253-260, 2017.

FREITAS, M. C. et al. Úlcera por pressão em idosos institucionalizados: Análise da prevalência e fatores de risco. *Rev Gaúcha Enferm.*, v. 32, n. 1, p. 143-150, 2011.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial plastic surgery clinics of North America*, v. 19, n. 3, p. 441-453, 2011.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Atlas Colorido de Histologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

GENCER, Z.K. et al. A comparative study on the impact of intra-articular injections of hyaluronic acid, tenoxicam and betametazon on the relief of temporomandibular joint disorder complaints. *J Craniomaxillofac Surg*; v.42, p.1117 -112, 2014.

GENESER, F. Histologia: com bases moleculares. 3.ed. Rio de Janeiro: Médica Panamericana, Guanabara Koogan, 2003.

GEOVANINI, T.; JÚNIOR, A. G. O. Manual de Curativos. 2ª ed. São Paulo/SP: Corpus, 2008.

GOODWIN, A.W.; WHEAT, H.E. Sensory signals in neural populations underlying tactile perception and manipulation. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 27, p. 53-77, 2004.

GOMES, E. A. Avaliação do potencial antiglicante e atividade antidiabética de novas aminoguanidinas e derivados planejados no modelo de diabetes induzida pela estreptozotocina. Tese de doutorado, Instituto de Química e Biotecnologia – PPGQB, Universidade Federal de Alagoas – UFAL, 2019.

GOMES, M. T. et al. Experimental burns: Comparison between silver sulfadiazine and photobiomodulation. *Rev Assoc Med Bras.*, v. 63, n. 1, p. 29-34, 2017.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W.C. Análise multivariada de dados. 5ªed. Porto Alegre: Bookman, 2007, p.593.

HANG, H. C.; BERTOZZI, C. R. Chemoselective approaches to glycoprotein assembly. *Acc. Chem Res.* v. 34, p. 727-736, 2001.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. Biologia e Clínica de Coelhos e Roedores, 3 ed. São Paulo, Roca., p. 238, 1993.

HENG-YU, L.; SHI-CHU, X.; SHI-HUI, Z. et al. Successful treatment of a patient with an extraordinarily large deep burn. *Med SciMonit*, v. 17, p. 47-51, 2011.

HELLWIG, M.; HENLE, T. Baking, aging, diabetes: a short history of the Maillard reaction. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, v.53, n.39, p.10316-29, 2014.

HOLLA, B. S. et al. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and driti-inflammatory agents. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 38, p. 313-318, 2003.

HORCH, et. al. Tissue engeneering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med*, v. 9, p. 592-608, 2005.

HORI, M. et al. Experimental models for advanced glycation end products formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. *Anti-agin Medicine*. v.9, n.6, p. 125-134, 2012.

HUMBERT, P.; MIKOSINKI, J.; BENCHIKHI, H.; ALLAERT, F.A. Efficacy and safety of a gauze pad containing hyaluronic acid in treatment of leg ulcers of venous or mixed origin: a double-blind, randomised, controlled trial. *Int Wound J.*, v. 10, n. 2, p.159-66, 2013.

HUSAIN, K.; ABID, M.; AZAM, A. Synthesis, characterization and antiamebic activity of new indole-3-carboxaldehydethiosemicarbazones and their Pd(II) complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, p. 1300-1308, 2007.

IDSON, B. Vitamins and the skin. *Cosm Toil.*, v. 108, p. 79-94., 1993.

ISAAC, C. et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Rev. Med. (São Paulo)*, v. 89, p. 3-4, 2010.

JAKUS, V., RIETBROCK, N. Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res.*, v. 53, n. 2, p. 131-42. 2004.

JHAUMEER-LAULLOO, S. et al. *In vitro* anti-glycation and anti-oxidant properties of synthesized Schiff bases. *Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 409-414, 2012.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. *Robbins & Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KIRSNER, R.S.; EAGLSTEIN WH. The wound healing process. *Dermatol Clin*. v. 11, p. 629-40, 1993.

LADEIRA, P.; ISAAC, C.; PAGGIARO, A.; HOSAKA, E.; FERREIRA, M. Úlceras nos membros inferiores de pacientes diabéticos: mecanismos moleculares e celulares. *Revista de Medicina*, v. 90, n. 3, p. 122-127, 2011.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*. v. 37, p. 223-6, 2009.

LAPLANTE, A. F. et al. Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long- -standing questions. *FASEB J.*, v. 15, p. 2377-89, 2001.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de Feridas. *Revista da SPDV*, v. 69, n. 3, 2011.

- LAWRENCE, W. T.; DIEGELMANN, R. F. Growth factors in wound healing. *Clin Dermatol*, v. 12, n. 1, p. 157-6, 1994.
- LAZARUS, G. S.; COOPER, D. M.; KNIGHTON, D.R. Definitions and guidelines for assessment and evaluation of healing. *Arch Dermatol.*, v. 130, p. 489-93, 1994.
- LOBANA, T. S.; SHARMA, R.; BAWA, G.; KHANNA, S. Metal derivatives of N1-substituted thiosemicarbazones with divalent metal ions (Ni, Cu): Synthesis and structures. *Polyhedron*, v. 29, p. 1130-1136, 2010.
- MACKAY, D.; MILLER, A.L. Nutritional support for wound healing. *Altern Med Rev.*, v. 8, p. 359-377; 2003.
- MAGDY, E. A. et al. Coblation tonsillectomy: a prospective, double-blind, randomised, clinical and histopathological comparison with dissection-ligation, monopolar electrocautery and laser tonsillectomies. *J Laryngol Otol.*; v. 122, n. 3, p. 282-90, 2008.
- MASSON, D. S. Atividades cicatrizante e antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em úlceras cutâneas. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2011.
- MARX, M.; PERLMUTTER, R. A.; MADRI, J. A. Modulation of platelet-derived growth factor receptor expression in microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J Clin Invest.*, v. 93, p. 131-9, 1994.
- MENDES, R. F. Avaliação do potencial terapêutico do extrato metanólico dos frutos de *Xylopia sericea* A. St. – Hil. Frente a eventos relacionados ao processo inflamatório e ao estresse oxidativo. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2019.
- MERCURIO, A. M. Lessons from the alpha 2 integrin knockout mouse. *Am J Pathology.*, v. 161, p. 3-6, 2002.
- MERINO, F. J. Z. et al. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 17, n. 4, 2015.
- MORAES, C.D. et al. As ações de enfermagem refletindo na qualidade de vida de indivíduos com úlcera da perna. *Rev Enferm UFPE on line*, v.11, 2017.
- MORAIS, D. C. M. et al. Ação cicatrizante de substâncias ativas: d-pantenol, óleo de girassol, papaína, própolis e fator de crescimento de fibroblastos. *Foco*, v. 4, n. 4, p. 83-97, 2013.
- MORESKI, D. A. B.; LEITE-MELLO, E. V.; BUENO, F.G. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. *Arq. Cienc. Saúde UNIPAR*, v. 22, n. 1, p. 63-69, 2018.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- NASCIMENTO, E. G. et al. Evaluation of chitosan gel with 1% silver sulfadiazine as an alternative for burn wound treatment in rats. *Acta Cir Bras.*, v. 24, n. 6, p. 460-5., 2009.
- NEGRE-SALVAYRE, A. et al. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology*, v. 153, n. 1, p. 6-20, 2008.

NEUMAN, M. G. et al. Hyaluronic acid and wound healing. *J Pharm Pharm Sci.*, v. 18, n. 1, p. 53-60, 2015.

OLIVEIRA, I.V.P.M.; DIAS, R.V.C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. *Acta Vet. Bras.*, v.6, n.4, p. 267-271, 2012.

ONESTI, M. G. et al. Non-surgical treatment of deep wounds triggered by harmful physical and chemical agents: a successful combined use of collagenase and hyaluronic acid. *Int Wound J.*, v. 13, n. 1, p. 22-26, 2014.

PEREIRA, F. E. L. Etiopatogênese Geral das Lesões. Cap. 3-4, in: Bogliolo, patologia, 2011.

PIETROVSKI, E. F. et al. Úlceras do pé diabético podem ser tratadas com estatinas? *Rev Bras de Farm.*, v. 93, n. 3, p. 279-82, 2012.

RAHBAR, S. The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. *Ann N Y Acad Sci.*, p. 1043:9-19, 2005.

RAMOS-TORRECILLAS, J. et al. Effectiveness of platelet-rich plasma and hyaluronic acid for the treatment and care of pressure ulcers. *Biol Res Nurs.*, v. 17, n. 2, p. 152-8, 2015.

REGO, A. C.; ARAUJO, F. I.; DAMASCENO, B. P., et al. Simvastatin improves the healing of infected skin wounds of rats. *Acta Cir Bras.*, v. 22, p. 57-63, 2007.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res [Internet]*. [cited 2018 Dec 31]; v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

RESENDE, D. M.; BACHION, M. M.; ARAUJO, L. A.O. Integridade da pele prejudicada em idosos: estudo de ocorrência numa comunidade atendida pelo Programa Saúde da Família. *Acta Paul.Enferm.*, v.19, n. 2, p. 168-173, 2006.

ROBBINS; COTRAN. *Patologia: Bases patológicas das doenças*. 8 Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 79-107, 2010.

RODRIGUEZ, E. C.; MARCAURELLE, L. A.; BERTOZZI, C. R. Aminoxy-, hydrazide-, and thiosemicarbazide-functionalized saccharides; versatile reagents for glycoconjugate synthesis. *J.Org. Chem.* v. 63, p.7134, 1998.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. *Histologia: texto e atlas, em correlação com Biologia celular e molecular*. 6.ed. pp. 24, 104. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SANTOS, A. F. dos et al. Estudo do potencial antioxidante da *Anacardium occidentale* L. e determinação de seus compostos fenólicos. *Diversitas Journal*. v. 3, n. 2, p: 455-474, 2018.

SANTOS, F. O. Atividades biológicas de *Anacardium occidentale* (Linn). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Campina Grande para obtenção do título de mestre. Patos, 2011.

SARMENTO, P. A. Avaliação da atividade antidiabética e/ou inibidora sobre os produtos finais de glicação avançada de derivados aminoguanidínicos em ratos diabéticos. Tese de doutorado, Instituto de Química e Biotecnologia, RENORBIO, Universidade Federal de Alagoas, 2016.

SEMBA, R. D. et al. Produtos finais de glicação avançada sérica elevados estão associados com insuficiência renal: o Estudo Longitudinal do Envelhecimento de Baltimore, *J Ren Nutr*, v.20, p. 74-81, 2010.

SENS, L. Síntese, caracterização e análises farmacológicas de novos derivados de tiossemicarbazonas e amidas: um estudo de correlação estrutura-atividade. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.

SHARP, P. S.; RAINBOW, S.; MUKHER, G. E. E. S. Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects. *Diabet Med.*, v. 20, n.7, p. 575-9, 2003.

SIMPSON, D. M.; ROSS, R. The neutrophilic leucocyte in wound repair: a study with antineutrophil serum. *J Clin Invest.*, v. 51, p. 2009-23, 1972.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.*, v. 341, p. 738-46, 1999.

SKINOVSKY, J. A. A influência da nicotina na cicatrização de anastomoses do intestino delgado em ratos: angiogênese e miofibroblastos. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*, v. 40, n. 12, p. 1250-1258, 2006.

SUN, Z. et al. Inhibitory effects of microalgal extracts on the formation of advanced glycation products (AGEs). *Food Chemistry*, v. 120, p. 261-267, 2010.

TENORIO, R. P. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Quím. Nova*, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

TORTORA, G. J.; NIELSEN, M. T. Princípios de anatomia humana. 12ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2012.

URIBARRI, J. et al. *Adv. Nutr.*, Dietary advanced glycation end products and their role in health and disease. v. 6, p. 461, 2015.

VAN LINTHOUT, S. et al. Anti-inflammatory effects of atorvastatin improve left ventricular function in experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetologia.*, v. 50, n. 9, p. 1977-86, 2007.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*, v. 29, n. 10, p. 471-474, 2011.

VERÍSSIMO, R. S. S. Avaliação de derivados aminoguanidínicos como agentes cicatrizantes de feridas infectadas. Tese doutorado. Instituto de Química e Biotecnologia, RENORBIO, Universidade Federal de Alagoas, 2014.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Cir Res.*, v. 92, p. 827-39, 2003.

VISTOLI, G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation *Free Radical Res.*, v. 47, n. 3. 2013

VLISSARA, H. et al. Advanced glycation in health and disease. Role of the modern environment. *Ann N Y Acad Sci.*, v. 1043, p. 452-60, 2005.

VOIGT, J.; DRIVER, V. R. Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Wound Repair Regen*, v. 20, p. 317-331, 2012.

WELCH, M. P.; ODLAND, G. F.; CLARK, R. A. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibroectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression in wound contraction. *J Cell Biol.*, v. 110, p. 133-45, 1990.

WEN, Y; SKIDMORE, J.C; PORTER-TURNER, M.M.; REA, C.A.; KHOKHER, M.A.; SINGH, B.M. Relationship of glycation, antioxidant status and oxidative stress to vascular endothelial damage in diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2002; v.4, p.305-8.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.*, v. 83, p. 835-70, 2003.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. "Interações queratinócitos-fibroblastos na cicatrização de feridas", *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, n. 5, p. 998–1008, 2007.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.*, v. 77, n. 3, p. 509-28, 1997.

ZHANG, Y. et al. New Antiglycative Compunds from Cumin (*Cuminum cyminum*) Spice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 46, p. 10097-10102, 2015.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.*, v. 414, p. 782-7, 2001.

APÊNDICE A

Instrumento para a avaliação macroscópica da ferida

| Critérios Animal: _____ | Avaliação | D 7 () FASE 1 1ª eutanásia | D 14 () FASE 2 2ª eutanásia | D 21 () FASE 3 3ª eutanásia |
|----------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Repilação | (P)Presente (A) ausente | | | |
| Coágulo | (P) Presente / ausente | | | |
| Hiperemia | (L) Leve (M) moderada (A) acentuada | | | |
| Sangramento | (P) Presente (A) ausente | | | |
| Exsudato | (P) Presente (A) ausente (L) Leve (M) moderado (A) acentuado | | | |
| Retração da ferida | mensuração (mm) | | | |

APÊNDICE B

Instrumento para a avaliação microscópica da ferida

| Critérios | Avaliação | D 7 () FASE 1 D14 () FASE 2 D 21() FASE 3 |
|--|--|--|
| Animal: | | Observações |
| Formação de coágulos (crostas) | () Ausente/ se presente: () crostas () restos necróticos () fibrina | |
| Bordas da ferida (hiperplasia) | () leve () moderada () acentuada | |
| Infecção | () Ausente () Presente / | |
| Inflamação | Ausente / Presente () leve () moderada () acentuada | |
| Componente inflamatório (neutrófilos e linfócitos) | () Neutrófilos () Linfócitos () Eosinófilos () Plasmócitos | |
| Tecido de granulação | () Ausente () Presente () leve () moderada () acentuada | |
| Proliferação celular de macrófagos e fibroblastos | () macrófagos () fibroblastos | |
| Deposição de colágeno (fibrose) no centro da ferida | () leve () moderada () acentuada | |
| Deposição de colágeno (fibrose) nas bordas da ferida | () leve () moderada () acentuada | |

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “*Avaliação da atividade antiglicante e cicatrizante de derivado de tiossemicarbazona no tratamento de feridas em ratos diabéticos*”, registrada com o nº **06/2019**, sob a responsabilidade do pesquisador **Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **para fins de pesquisa científica**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 23 de agosto de 2018.

| | |
|----------------------------|---|
| Vigência da autorização | 09.09.2019 a 09.05.2020 |
| Espécie/linhagem/raça | Rato heterogênico / Wistar |
| Nº de animais | 40 |
| Peso/idade | 60 g / 45 dias |
| Sexo | Macho |
| Origem/Local de manutenção | Biotério Central da UFAL / Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas – LpTF-ESENFAR-UFAL |
| Colaboradores | Fabiana Andréa Soares Ferreira |

Maceió, 02 de setembro de 2019.

Elvan Nascimento dos Santos Filho
Coordenador da CEUA
SIAPE 1756479