

PELÍCULA BIOCAMPATÍVEL PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDASLetícia C. Duarte^{1*}, Jaqueline C. Rinaldi², Nelson L. C. Domingues³, Susana E. Moreno⁴

1. Docente do Centro Universitário da Grande Dourados - UNIGRAN

2. Pesquisadora da Universidade Estadual de Maringá - UEM

3. Docente e Pesquisador da Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD

4. Docente e Pesquisadora da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB

Resumo

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

Autorização legal: CEUA/UCDB nº005/11**Palavras-chave:** biomaterial, pele, ferida, selênio, bocaiúva.**Apoio financeiro:** Fundect.**Introdução**

Podemos dividir os curativos utilizados atualmente em biológicos, sintéticos e biológico-sintéticos. Os curativos biológicos, heteroenxertos de pele de porco e de embrião bovino, possuem como desvantagem matéria prima limitada, alta antigenicidade, baixa adesividade, risco de contaminação cruzada e em média devem ser trocados a cada três dias. Dentre os curativos biológicos, estudos tem demonstrado que um produto promissor com aplicabilidade clínica é a pele de tilápia. Os sintéticos, compostos de uma variedade de materiais incluindo películas elásticas aderentes, materiais hidroativos e suspensões coloidais permeáveis ao ar, líquidos e vapores, tem vida útil longa, produzem baixa reação inflamatória e baixo risco de transmissão de patógenos. Os biológico-sintéticos, como exemplo podemos citar o Biobrane – membrana de náilon-silicone flexível ligada a peptídeos colagenosos da pele de porco, são formados por camadas de polímeros e materiais biológicos.

Neste sentido é relevante propor-se novos materiais e compostos sintéticos para o tratamento de

feridas com características como alta flexibilidade, transparência, resistência mecânica, baixa solubilidade, capacidade de controlar o perfil de liberação de fármacos e não tóxico.⁹

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

A quitosana é um polímero natural que apresenta propriedades intrínsecas importantes para o desenvolvimento de materiais na área de saúde humana como, por exemplo, atóxica, biocompatível, biodegradável, aceleração na recuperação de lesões, diminuição do colesterol no sangue, hemostática, além de suas características bacteriostáticas e fungistáticas.

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

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

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

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

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

Metodologia

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

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

As nanopartículas (NP-Se) de selênio foram sintetizadas via procedimento descrito por Luo *et al* (2012) utilizando-se um meio de ácido ascórbico e óxido de selênio.

Preparou-se as películas utilizando-se uma solução de 25:75 p/p (PVA/quitosana), 10% de óleo de bocaiúva, 1% de reticulante (solução de glutaraldeído 25%P.S.) e nanopartícula de selênio. Verteu-se a solução final em uma forma de silicone e secou-se por 72h a temperatura ambiente. Foi realizada caracterização da películas por infravermelho, ultravioleta-visível e microscopia eletrônica de varredura.

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

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

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

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

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

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

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

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

Foram realizadas duas excisões cirúrgicas na pele de camundongos Swiss com o emprego de um punch histológico, atingindo todas as camadas da pele. Os grupos experimentais consistiram de animais com

as feridas sem tratamento e animais com as feridas tratadas com as películas. Os animais foram tratados nos tempos de dois, sete e quatorze dias. Após o tratamento os animais foram eutanasiados e realizou-se a biópsia do tecido para realização de testes posteriormente.

As feridas foram fotografadas com câmera digital Sony DSCW320A e o cálculo da área de cicatrização das feridas foi realizada com o auxílio do programa ImageJ.

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

Foram avaliados os marcadores inflamatórios pela dosagem de óxido nítrico e determinação do infiltrado de neutrófilos através da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

A análise de colágeno total e subtipos de col-I e col-III foi realizada pela técnica de picrossírius seguida da quantificação usando software Image-J ProPlus.

Resultados e Discussão

Os dados analisados indicaram que a matriz polimérica foi sintetizada através do arranjo de ligações cruzadas ente a quitosana e o glutaraldeído conforme descrito por Hu *et al* (2013) no qual o autor descreve que a blenda obtida através da condensação entre os grupamentos amino livres da quitosana com a carbonila do aldeído presente no glutaraldeído conferem uma estrutura em novelo.

A análise de microscopia eletrônica de varredura para os polímeros película PVA/quitosana e película com quitosana/nanopartícula de selênio indica uma grande semelhança estrutural. Para ambos pôde-se observar a presença de reticulados formados através da ligação cruzada entre o glutaraldeído e a quitosana. Esta mesma estrutura foi descrita por Hu *et al.*(2013).

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

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

As feridas tratadas com a película que contém nanopartículas de selênio apresentaram menor infiltração de células inflamatórias no tecido. Na pele, o selênio está presente como parte da redutase da tioredoxina e da peroxidase da glutathione, que partilham o papel principal na defesa celular contra o estresse oxidativo. Estudos mostraram que a redutase da tioredoxina está localizada na membrana celular dos queratinócitos, fato que assume especial importância na proteção contra a formação de lesões por radicais livres. Segundo Aguiar *et al.* (2014) em qualquer condição associada ao aumento do estresse oxidativo ou inflamatório, deve-se esperar uma influência dos níveis de selênio.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima considerada um marcador de neutrófilos ativados. Observamos que embora tenha ocorrido uma diminuição do infiltrado inflamatório com a película que contém nanopartículas de selênio na dosagem da MPO não houve diferença estatística entre os grupos, o que pode significar que as nanopartículas de selênio não interferem diretamente na migração de neutrófilos.

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

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

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

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

Na análise quantitativa de colágeno observou-se que a película OPB+Se apresenta maior quantidade de colágeno total, quando analisados colágeno tipo I, a película Se apresenta maior quantidade e com relação ao colágeno tipo III, a película OPB+Se apresenta maior quantidade. Estudos semelhantes demonstraram aceleração do processo de cicatrização, Hamilton *et al.* (2006) relataram aumento da proliferação de fibroblastos. Esse achado pode explicar o efeito benéfico da quitosana na cicatrização de feridas, porque os fibroblastos estão envolvidos na fibroplasia e formação de tecido de granulação. Além disso, o aumento na matriz extracelular (colágeno e fibronectina) desempenha um papel importante na adesão celular à matriz extracelular para guiar a migração de células. Da mesma forma, Mori *et al.* (2004) relataram que a quitosana ativa macrófagos e vários receptores celulares associados com proliferação celular. Kojima *et al.* (2004) relataram um aumento na síntese de colágeno e atividade da enzima prolil hidroxilase na presença de ácido ascórbico (vitamina C, envolvido na síntese de proteínas da matriz extracelular).

Conclusões

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

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

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

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

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

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

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

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

Referências bibliográficas

- Aguiar, A. de O., Oliveira, B. B. R. de & Carnib, L. P. de A. Efeito dos antioxidantes vitamina C e selênio em pacientes queimados: uma revisão bibliográfica. *Rev. bras. queimaduras* **13**, 62–66 (2014).
- Hamilton, V. *et al.* Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **17**, 1373–1381 (2006).
- Hu, H., Xin, J. H., Hu, H., Chan, A. & He, L. Glutaraldehyde – chitosan and poly (vinyl alcohol) blends , and fluorescence of their nano-silica composite films. **91**, 305–313 (2013).
- Kojima, K., Okamoto, Y., Kojima, K., Miyatake, K. & Fujise, H. Effects of Chitin and Chitosan on Collagen Synthesis in Wound Healing. 0–3 (2004).
- Luo, H., Wang, F., Bai, Y., Chen, T. & Zheng, W. Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **94**, 304–308 (2012).
- Lutz, A. Óleos E Gorduras. *Métodos físicos-químicos para análise Aliment.* 589–625 (2008). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Mori, T., Murakami, M., Okumura, M., Kadosawa, T. & Uede, T. Mechanism of Macrophage Activation by Chitin Derivatives. **1**, (2004).
- Patrícia, A., Prof, O., Susana, D. & Moreno, E. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA Atividade Cicatrizante do Óleo da Polpa da Bocaiúva (*Acrocomia aculeata*). PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA Atividade Cicatrizante do Óleo da Polpa da Bocaiúva (*Acrocomia aculeata*). Autora : Patrícia. (2014).
- Shaw, T. J. & Martin, P. Wound repair at a glance. *J. Cell Sci.* **122**, 3209–3213 (2009).
- Thangavel, P. *et al.* Accelerated Healing of Diabetic Wounds Treated with L-Glutamic acid Loaded Hydrogels Through Enhanced Collagen Deposition and Angiogenesis: An in Vivo Study. *Sci. Rep.* **7**, 1–15 (2017).
- Tuji, F. M., Almeida, S. M., Bóscolo, F. N. & Manzi, F. R. Avaliação Do Efeito Radioprotetor Do Selenito De Sódio No Processo De Reparação Tecidual Em Ratos *. *Radiol Bras* **38**, 359–364 (2005).