

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO **Stricto sensu** EM
SAÚDE E AMBIENTE

CATHARINA GRACE SANTOS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DE
FILMES DE COLÁGENO CONTENDO ÁCIDOS
GRAXOS ESSENCIAIS**

ARACAJU
Fevereiro – 2013

CATHARINA GRACE SANTOS

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DE
FILMES DE COLÁGENO CONTENDO ÁCIDOS
GRAXOS ESSENCIAIS**

Dissertação submetida à banca examinadora
como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Saúde e Ambiente,
na área de concentração em Saúde e
Ambiente.

Orientador (es)

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, D.Sc.

Francine Ferreira Padilha, D.Sc.

ARACAJU

Fevereiro – 2013

O AUTOR PERMITE A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SOMENTE PARA PROPÓSITOS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA.

S237d Santos, Catharina Grace

Desenvolvimento, caracterização física e avaliação do potencial cicatrizante de filmes de colágeno contendo ácidos graxos essenciais. / Catharina Grace Santos; Orientadores: Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, Francine Ferreira Padilha. – Aracaju-Se, 2012.

100p. : il
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em saúde e Ambiente). – Universidade Tiradentes, 2013

1.Filme. 2. Ácido graxo. 3. Colágeno. 4. Cicatrização. I. Junior Albuquerque, Ricardo Luiz Cavalcanti (orient.) II. Padilha, Francine Ferreira (orient.) III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 614:504

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
CICATRIZANTE DE FILMES DE COLÁGENO CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS
ESSENCIAIS**

CATHARINA GRACE SANTOS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
SAÚDE E AMBIENTE

Aprovada por:

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.
Orientador

Francine Ferreira Padilha, D.Sc.
Orientadora

Margarete Zanardo Gomes, D.Sc.
Examinador

Patrícia Meira Bento, D.Sc.
Examinador

José Melkiades Rezendo Neto, D.Sc.
Suplente

ARACAJU
Fevereiro - 2013

*“Quando passares pelas águas,
eu serei contigo; quando, pelos rios,
eles não te submergirão; quando
passares pelo fogo, não te queimarás,
nem a chama arderá em ti. Porque eu
sou o Senhor, teu Deus, o Santo de
Israel, o teu Salvador; dei o Egito por teu
resgate e a Etiópia e Sebá, por ti.”*

(Isaías 43: 2-3)

DEDICATÓRIA

*A **Deus**, Criador e Redentor! Toda Honra e Toda Glória Seja dada a Ti Senhor! Obrigada por sua presença tão viva na minha vida, por iluminar os meus caminhos e pelo poder de transformar “tudo” em bênçãos para mim. “Tudo contribui para o bem daqueles que amam a Deus” (Romanos 8:28).*

*À **minha mãe Ana**, pelo apoio, pelas orações incansáveis, intercedendo sempre por mim. Por não poupar esforços para minha educação e para o meu bem estar geral.
Muito Obrigada! Te Amo!*

*À **minha fabulosa irmãzinha Hadassa**, por alegrar a minha vida e me ensinar muitas coisas através da sua inteligência e personalidade marcante. Você é um presente que a vida gentilmente nos deu. Agradeço a Deus pela sua existência!*

*Ao **meu amor Sérgio**, por estar ao meu lado enchendo-me de força, paz, amor e compreensão. Por me ensinar muito com sua calma e serenidade, por trazer muita alegria pra minha vida e pelas inúmeras risadas. A vida ficou mais leve e mais colorida com você. Obrigada por tudo! Te Amo!*

Este trabalho, dedico a vocês, pessoas essenciais na minha vida!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao meu querido orientador, **Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior**, por exercer seu ofício com verdadeira paixão e maestria, pela sua dedicação, paciência, disposição em ajudar, por minimizar as pedras do caminho, pelas boas conversas e inúmeras risadas, tornando este período mais agradável. Não é possível expressar o quanto lhe sou grata. Você é um dos exemplos de quem tem a bela oportunidade de ter a vocação como profissão!*

AGRADECIMENTOS

*À Profa. Dra. **Francine Ferreira Padilha**, por ter me recebido nesta Universidade, e por me proporcionar um grande aprendizado de vida durante este período.*

*À Profa. Dra. **Juliana Cordeiro Cardoso**, pela disposição em ajudar a todos, sem distinção, pelas essenciais, indispensáveis e inúmeras orientações durante a etapa de desenvolvimento dos filmes, sem as quais, teria sido muito mais difícil encontrar a formulação ideal dos filmes. Muito Obrigada!*

*À Profa. Dra. **Margarete Zanardo Gomes**, pelas observações essenciais e sugestões inteligentes, sempre com muita classe e educação, durante os seminários e qualificação, indispensáveis para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!*

*Ao Prof. Dr. **José Melkiades Rezendo Neto**, pela importantíssima e grandiosa contribuição durante a qualificação, com observações extraordinárias, sugestões formidáveis e indispensáveis, por ter realmente lido e corrigido todo o trabalho de forma admirável. Muito Obrigada!*

*À Profa. Dra. **Cláudia Moura de Melo**, pelas conversas, pela atenção, por ter trazido “uma luz”, no início do mestrado, quando tudo ainda estava “escuro”. Muito obrigada! Parabéns pelas aulas brilhantes e maravilhosas!*

*À minha querida amiga, **Rose**, irmã escolhida. Agradeço por tudo. Pelo carinho imenso que você tem por mim, desde a minha infância e adolescência, sempre me acolhendo de braços abertos em sua casa. Pelas nossas conversas e encontros, sempre me proporcionando grandes doses de alegria e conforto.*

*À minha querida amiga de infância **Ângela Cristina**, pelo carinho, pela amizade de tantos anos, pela atenção, otimismo e por sempre me fazer acreditar que tudo vai dar certo!*

*À **Cléa Brandão**, pelas orações, saber que você está orando por mim traz paz ao meu coração. Sempre confiei e continuarei confiando nas suas orações. Agradeço pelo entusiasmo e torcida, desde quando surgiu o interesse de fazer o mestrado.*

*À amiga **Silvana Valença**, pelas palavras de carinho, pela atenção, pela torcida constante e pelo entusiasmo demonstrado para que eu concluísse essa etapa da minha vida.*

*À ilustre **D. Ivone** (in memorian), minha querida amiga e respeitável Secretária de Saúde, agradeço pelos admiráveis ensinamentos de vida, pelo enorme carinho que sempre teve por mim. Foi um grande privilégio ter te conhecido. Nunca me esquecerei de sua imensa alegria e vontade de viver!*

*Aos amigos **Klebson e Andriele**, pela disponibilidade constante em ajudar, por me mostrarem “o caminho dos filmes” e por tornar o laboratório mais divertido. Desejo que vocês possam alçar grandes vôos!*

*À amiga **Naiane**, que me conquistou com seu jeito firme e ético de ser, agradeço pela disposição em ajudar, tanto no estágio docência, como no ensino na Universidade. Desejo muito sucesso na sua vida profissional!*

*Aos colegas de mestrado, por compartilharem essa experiência comigo e me ajudaram de diferentes formas, especialmente **Andréia Poschi, Antônio, Camila, Fani, Marismar, Nely e João Soares**.*

*Ao colega de laboratório **Cleveilton**, pela ajuda indispensável em desvendar os mistérios das formatações e regras da ABNT e do manual do aluno.*

*À **TECPON** Indústria e Comércio de Produtos Químicos (Cachoeirinha, RS), pela parceria para a criação e execução do trabalho e pelo apoio financeiro.*

*À **Newton Battastini**, pela disponibilidade em ajudar, pelos incentivos, esclarecimentos e confiança depositada.*

*Aos funcionários do Biotério da UNIT: **Gladston, Max e Marcos**, pelo excelente trabalho, pela boa vontade em socorrer os aflitos. Sem a ajuda de vocês teria sido muito mais difícil encarar os ratos.*

*Enfim, a **todos** que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.*

SUMÁRIO

CAPITULO I – INTRODUÇÃO e Objetivos	18
1.1 Introdução	19
1.2 Objetivos	21
 CAPITULO II – REVISÃO DE LITERATURA	 22
2.1 Pele	22
2.2 Feridas	24
2.3 Reparo de feridas	26
2.4 Curativos e coberturas	31
2.5 Filmes de colágeno	36
2.6 Ácidos Graxos Essenciais (AGE®-TECPON)	38
2.7 Métodos para caracterização dos filmes	41
2.7.1 Propriedades Mecânicas	41
2.7.2 Espessura	43
 CAPITULO III – MATERIAL E MÉTODOS	 45
3.1 Elaboração dos filmes	46
3.2 Caracterização dos filmes	47
3.2.1 Avaliação macroscópica dos filmes	47
3.2.2 Espessura	47
3.2.3 Análise das propriedades mecânicas: tensão/deformação	48
3.2.4 Análise microscópica: microscopia óptica	48
3.3 Ensaio biológico de cicatrização	49
3.3.1 Determinação do índice de retração clínica das feridas	49
3.3.2 Análise histomorfológica da reação inflamatória em HE	50
3.3.3 Análise da deposição colagênica em Picrossirius	50
3.4 Análise estatística	51
 CAPITULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	 52
4.1 Caracterizações dos Filmes	53

4.1.1 Avaliação macroscópica dos filmes	53
4.1.2 Espessura	54
4.1.3 Avaliação de Propriedades Mecânicas	54
4.1.4 Análise microscópica: microscopia óptica	55
4.2 Ensaio Biológico de Cicatrização	56
4.2.1 Índice de Retração da Ferida (IRF)	56
4.2.2 Análise Histológica	58
4.2.3 Análise morfológica de colagenização	62
 V – CONCLUSÕES	 64
 Vi – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 66
 VII – ANEXOS	 75
Anexo 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	76
Anexo 2 – ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	78
Anexo 3 – NORMAS PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO	96

LISTA DE TABELAS

		Pg.
Tabela 1	Análise macroscópica dos filmes contendo colágeno Hidrolisado, AGE50® e AGE100®	53
Tabela 2	Distribuição dos valores obtidos a partir da análise mecânica dos filmes de colágeno hidrolisado (FCOL) e filmes de colágeno contendo ácidos graxos essenciais (FAGE50 e FAGE100)	55

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1	Estrutura da pele, exemplificando suas camadas e alguns elementos. 24
Figura 2	Representação de uma cicatrização primária ou por primeira intenção. 28
Figura 3	Cicatrização secundária ou por segunda intenção 29
Figura 4	Estrutura do colágeno 38
Figura 5	Estrutura química do ácido oleico 40
Figura 6	Representação da molécula de ácido oleico em 3D 41
Figura 7	Estrutura química do ácido linoleico 41
Figura 8	Estrutura molecular do ácido linoleico 41
Figura 9	Filmes poliméricos produzidos a partir de colágeno hidrolisado e ácido graxo essencial. (a) FCOL, (b) FGAE50 e (c) FAGE100. 53
Figura 10	Fotomicrografias dos filmes de colágeno hidrolisado (FCOL), FAGE50 e FAGE100. Observar película contínua, homogênea e sem evidências de partículas insolúveis (400x). 56
Figura 11	Características macroscópicas das feridas dos diferentes grupos estudados ao longo do período experimental. 56
Figura 12	Avaliação das taxas de retração das feridas (IRF) ao longo do tempo em sequência. (a) FAGE50 é significativamente diferente do CTR ($p < 0,01$). (b) FAGE50 é significativamente diferente do CTR ($p < 0,001$) e FCOL ($P < 0,001$). (c) FAGE100 é significativamente diferente do CTR ($p < 0,001$) e FCOL ($P < 0,01$). 57
Figura 13	Secções histológicas coradas em HE dos grupos CTR (a/e/i/m/q), FCOL (b/f/j/n/r), FAGE50 (c/g/k/o/s) e FAGE100 (d/h/l/p/t). (a-d) fase inflamatória do reparo em 3 dias, (e-h) formação da reação de granulação em 7 dias, (i-l) desenvolvimento da cicatriz primária em 14 dias, (m-p) cicatriz fibrosa bem desenvolvida em 21 dias nos grupos experimentais (100x). (q-t) características do epitélio de revestimento dérmico, com formação de anexos cutâneos ora rudimentares ora bem diferenciados apenas em 59

FAGE50 e FAGE100 em 21 dias (400x).

- Figura 14** Análise semiquantitativa dos escores médios (média $\pm$ desvio padrão) da intensidade da reação inflamatória ao longo do período experimental nos grupos estudados. * Significativamente diferente de CTR ($p < 0,05$). ** Significativamente diferente de CTR ($p < 0,01$). **61**
- Figura 15** Deposição de colágeno nos grupos experimentais durante o tempo de curso do estudo. Em três e sete dias, houve uma predominância de finas e delicadas fibrilas de colágeno III (birrefringência esverdeada), enquanto que em 14 dias estas fibras foram substituídas por fibras mais grossas e fibras de colágeno do tipo I. Em 21 dias, todos os grupos apresentaram fibras de colágeno tipo I grosseiramente entrelaçadas (Sirius Red/ Luz Polarizada, aumento de 400x). **62**

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

AGE	Ácido graxo essencial
AGEs	Ácidos graxos essenciais
AGE100®	Formulação Comercial de Ácido Graxo Essencial da Tecpon (monoester do ácido oléico 50% + monoester do ácido linoléico 50%)
AGE50®	Formulação Comercial de Ácido Graxo Essencial da Tecpon (monoester do ácido oléico 50% + monoester do ácido linoléico 50% + óleo de girassol)
AGE®	Formulação comercial
AGEs®	Formulações comerciais
COL	Colágeno hidrolisado
FAGE100	Filme de colágeno hidrolisado contendo AGE100®
FAGE50	Filme de colágeno hidrolisado contendo AGE50®
FCOL	Filme de colágeno hidrolisado
IRF	Índice de Retração de Feridas
SF	Solução filmogênica
T20	Tween 20
T80	Tween 80
TGF-β	Fator de crescimento transformador - beta

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DE FILMES DE COLÁGENO CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS.

CATHARINA GRACE SANTOS

Diversos biomateriais têm sido utilizados na tentativa de incorporar substâncias que viabilizem o processo de reparo tecidual, destacando-se o colágeno por ser biocompatível, e não imunogênico. Os ácidos graxos essenciais (AGEs) vem sendo utilizados em diversos tipos de lesões e em diferentes estágios do processo de reparo cicatricial. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar fisicamente e avaliar o efeito de filmes de colágeno contendo AGEs sobre a cicatrização de feridas de segunda intenção. Os filmes foram produzidos com duas formulações comerciais de AGE® (AGE50® e AGE100®) e caracterizados macroscópica, mecanicamente, e por meio da microscopia óptica. Para o estudo de cicatrização, foram realizadas feridas cirúrgicas no dorso de 80 ratos, cobertas com filmes de colágeno (FCOL), filmes de colágeno contendo AGE50® (FAGE50) e filmes de colágeno contendo AGE100® (FAGE100). Feridas sem coberturas foram utilizadas como controle (CTR). Os animais foram eutanasiados após 3, 7, 14 e 21 dias. Foram obtidos os índices macroscópicos de retração das feridas (IRF) e realizada análise histológica da área cicatricial por meio de microscopia de luz convencional e polarizada. Os dados foram analisados por meio de análise de variância, considerando significativo $p < 0,05$. Os filmes FAGE50 e FAGE100 formaram películas transparentes, contínuas e homogêneas, e exibiram maior espessura ($p < 0,05$), maior alongamento ($p < 0,001$) e deformação ($p < 0,01$), e menores módulos de Young ($p < 0,001$). No ensaio de cicatrização, não foram observados sinais macroscópicos de abscessos ou de cicatrizes hipertróficas em nenhum dos grupos. Em 7 dias, o IRF observado em FAGE50 foi significativamente maior que em CTR ($p < 0,01$), enquanto que, em 14 dias, ambos FAGE50 a FAGE100 mostraram aumento significativo destes índices em relação a CTR ($p < 0,001$) e COL ($p < 0,01$). FAGE50 e FAGE100 promoveram aumento da infiltração neutrofílica em 3 dias ($p < 0,01$), mas reduziram significativamente o infiltrado linfocítica em 14 dias ($p < 0,05$). Também foi observado desenvolvimento precoce do tecido de granulação, da reepitelização de anexos dérmicos, bem como melhor organização colagênica. Este estudo sugere que os filmes de colágeno contendo ácidos graxos essenciais, particularmente FAGE50, constituem biomateriais promissores a serem utilizados como coberturas ou curativos de feridas dérmicas para aprimoramento do processo de reparo cicatricial.

Palavras-chave: filme. ácido graxo. colágeno. cicatrização.

DEVELOPMENT, PHYSICAL CHARACTERIZATION AND ASSESSMENT OF THE HEALING POTENTIAL OF ESSENTIAL FATTY ACIDS-INCORPORATED COLLAGEN-BASED FIMS

CATHARINA GRACE SANTOS

Many biomaterials have been used in attempt to incorporate active compounds in order to improve wound healing, and collagen matrices have been highlighted due to the biocompatibility, atoxicity and lack of immunogenicity. Essential fatty acids (EFAs) have been applied in a range of lesions and in different steps of wound healing. Thus, the aim of this study was to develop, physically characterize and assess the effects of EFAs-incorporated collagen-based films on second intention wound healing. The films were manufactures with two commercial formulations of EFAs (AGE50® and AGE100®), and characterized according to their macroscopic appearance and mechanical properties, as well as by light microscope. For the wound healing assay, surgical wounds were performed in the back of 80 Wistar rats, and dressed with collgane-based films (COL), and collagen-based films containing fatty acids (AGEF50 and AGEF100). Undressed wounds were regarded as controls (CTR). The animals were euthanized after 3, 7, 14 and 21 days. The macroscopic wound contraction rates (WRC) were assessed and the wounded areas were analyzed by conventional and polarized light microscope. Data were analyzed by variance analysis, regarding as significant $p < 0.05$. Both AGEF50 and AGEF100 formed transparent, continuous and homogeneous films, and exhibited increased thickness ($p < 0.05$), greater stretching ($p < 0.001$) and deformation ($p < 0.01$) rates, and lower Young module ($p < 0.001$). In the biological assay, no macroscopic sign of abscess or hypertrophic scar formation was observed in none of the groups. At 7 days, the WRR of AGEF50 was significantly higher than CTR ($p < 0.01$), whereas at 14 days, both AGE 50 and AGE100 showed a significant increase of the WRR compared to CTR ($p < 0.001$) and COL ($p < 0.01$). Both films promoted increased influx of neutrophils at 3 days ($p < 0.01$), but reduced significantly the mononuclear infiltrate at 14 days ($p < 0.05$). It was also observed earlier maturation of the granulation tissue, full epithelization and cutaneous appendages development, as well as better collagenization, in AGEF50 and AGEF100. These data suggest that EFA-incorporated collagen-based films, particularly AGEF50, represent promising biomaterials to be applied as wound dressings in order to provide improvement of wound healing.

Key-Words: wound dressing. fatty acids. collagen. wound healing.

Capítulo I – Introdução e Objetivos

1.1 INTRODUÇÃO

A pele é um órgão que corresponde à primeira linha de defesa contra as agressões externas, quando ocorre uma interrupção na sua continuidade surge a ferida. O grau de extensão e de comprometimento de tecido e órgãos vai depender da gravidade e intensidade do trauma. A regeneração e a cicatrização são os dois processos que compõem a restauração dos tecidos, o que determina se a reparação tecidual ocorrerá por regeneração ou cicatrização é a extensão da lesão ou qual tipo de órgão foi lesado (TOCCO et al, 2012). Na pele o mecanismo que mais comumente ocorre para fazer o reparo da lesão denomina-se cicatrização, o qual é um processo complexo e harmonioso e envolve um conjunto de eventos celulares e moleculares assim como fenômenos bioquímicos e fisiológicos (MANDELBAUM et al., 2003).

O processo de cicatrização por segunda intenção ocorre no reparo tecidual de feridas com maior grau de perda de tecido, ou seja, lesões que podem envolver o tecido subcutâneo, músculo ou osso. O reparo cicatricial é composto por vários estágios complexos, interdependentes e simultâneos, os quais podem ser descritos em cinco fases principais: fase de coagulação, inflamatória, proliferativa, de contração e de remodelação (RIBEIRO et al., 2009).

Existem diversos produtos utilizados como cobertura para feridas e, ainda assim, a temática da reparação tecidual continua impulsionando estudos, principalmente no que se refere à aceleração do processo cicatricial com relação ao melhor resultado de formação de cicatriz (RODRIGUES et al., 2010). Dentre estes produtos, os filmes poliméricos, têm obtido cada vez mais destaque e têm sido alvo de muitas pesquisas, objetivando sua utilização no processo cicatricial (RODAS, 2004).

O uso de filmes de colágeno tem promovido maior rapidez e eficácia no processo cicatricial, o colágeno possui características que o tornam um excelente biomaterial, capaz de interagir com tecidos naturais. Colágeno é a principal proteína estrutural dos tecidos dos animais vertebrados, sendo encontrado abundantemente no tecido conjuntivo. O colágeno tipo I é encontrado predominantemente em animais de grande porte, e esse tipo de colágeno tem papel fundamental no processo de cicatrização (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Uma classe de compostos que tem sido utilizada amplamente como coadjuvante no reparo cicatricial, são os ácidos graxos essenciais (AGE), os quais são originados de óleos vegetais e possuem diversas características que os tornam um dos principais produtos utilizados no processo de cicatrização. Características tais como: alta capacidade de hidratação local, grande poder de regeneração tissular, potente ação bactericida, aceleração do processo de granulação tecidual, entre outras (COLLINS e SULEWSKI, 2011). Eles aceleram o processo cicatricial por meio de vários mecanismos, como por exemplo, a atração de leucócitos para os locais de inflamação e a promoção da entrada de fatores de crescimento no leito da ferida, e possuem ainda a grande vantagem de poderem ser utilizados em diversos tipos de lesões de pele (HATANAKA e CURI, 2007).

Os AGEs interferem no reparo cicatricial de diversas formas, dentre elas: aumentam a permeabilidade do filme, promovem mitose e proliferação celular, estimulam a angiogênese e aceleram o processo de granulação tecidual (IBRAHIM et al., 2011). Os compostos utilizados no presente trabalho, com a finalidade de serem incorporados aos filmes de colágeno hidrolisado, foram fornecidos pela TECPON (Indústria e Comércio de Produtos Químicos- RS) na forma de formulações comerciais. As formulações comerciais de AGEs utilizadas foram: AGE50® e AGE100®.

Testes realizados com o AGE100® pelo Instituto GENOTOX-ROYAL em parceria com a TECPON, apresentaram resultados favoráveis ao uso do AGE100® no processo de reparo cicatricial (GENOTOX e ROYAL, 2007). A partir deste panorama, uma vez que, tanto os filmes de colágeno como os AGEs têm sido amplamente utilizados no tratamento de feridas, surgiu o interesse no desenvolvimento de filmes de colágeno com incorporação de AGE®.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar o potencial cicatrizante de filmes de colágeno hidrolisado contendo AGE® sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em modelo murino.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver filmes de colágeno hidrolisado contendo AGE100®
- Desenvolver filmes de colágeno hidrolisado contendo AGE50®
- Caracterizar os filmes obtidos através de avaliações macroscópicas, análises de propriedades mecânicas (tensão/deformação), espessura e microscópica óptica.
- Avaliar o efeito dos filmes em modelo experimental murino de cicatrização de feridas cirúrgicas por segunda intenção.

Capítulo II – Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e corresponde à primeira linha de defesa contra as agressões do meio externo, sendo responsável ainda pela termorregulação, pela percepção e pela defesa. Sua estrutura é formada por três camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme, as quais estão descritas na **figura 1**. A epiderme por ser a única a estar em contato com o meio ambiente tem como função principal a de proteção, sendo também um importante órgão sensorial. É uma camada com profundidade diferente de acordo com a região do corpo, pois regiões sujeitas a maior atrito como palmas das mãos e pés têm uma camada mais grossa (conhecida como pele glabra por não possuírem pelos), e têm espessura variável (KUHNEN e SILVA, 2010).

Esta camada é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, ou seja, possui células escamosas em várias camadas, e por anexos cutâneos. As células que a compõe são: queratinócitos, os quais são as células principais, melanócitos e células de Langerhans. A epiderme não possui vasos sanguíneos, os nutrientes e oxigênio chegam à epiderme por difusão a partir de vasos sanguíneos da derme. (SOUZA et al., 2009).

A derme é a camada intermediária da pele, constituída por tecido conjuntivo e formada por fibras colágenas e elastina, por isso uma de suas principais funções é servir de tecido de sustentação para a epiderme. Na derme encontram-se os fibroblastos, macrófagos, linfócitos e granulócitos. A derme subdivide-se em duas camadas: a camada papilar em contato com a epiderme que é formada por tecido conjuntivo frouxo e promove maior superfície de contato e maior resistência ao atrito da pele; A outra camada da derme chama-se camada reticular, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam as fibras colagenosas (GALDINO et al., 2010).

Na derme localizam-se os vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e órgãos sensoriais tais como: Corpúsculo de Vater-Pacini (sensibilidade à pressão); Corpúsculo de Meissner (detecta pressões de frequência diferente); Corpúsculo de Krause (sensíveis ao frio); Órgão de Ruffini (calor); Célula de Merckel (tato e

pressão) e o folículo piloso. A camada mais interna da pele, a hipoderme (tecido adiposo subcutâneo) é constituída por tecido conjuntivo frouxo sendo responsável pelo isolamento térmico, pelo reservatório nutricional da pele, modelagem da superfície corporal, absorção de choque, fixação de órgãos e por proteger as estruturas mais internas do corpo humano (LESSA et al., 2012).

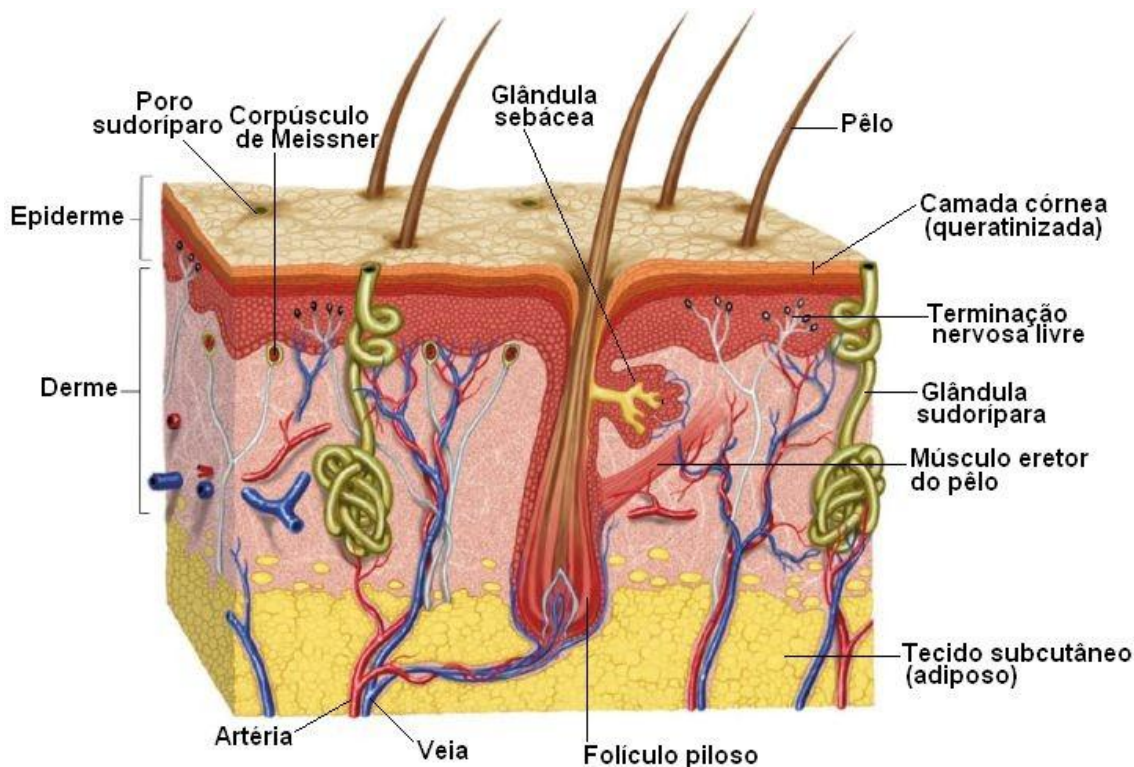


Figura 1. Estrutura da pele, exemplificando suas camadas e alguns elementos.
(fonte: www.betaneamartins.com.br)

2.2 Feridas

A interrupção na continuidade da pele denomina-se por ferida, as quais podem ser lesões no tecido epitelial, mucosa ou órgão com comprometimento de sua estrutura anatômica e sua função fisiológica. De acordo com a gravidade e a intensidade do trauma e da lesão, a ferida pode ser considerada superficial ou grave. Na primeira, apenas as estruturas superficiais são afetadas, entretanto a ferida grave pode lesionar vasos sanguíneos calibrosos, músculos, nervos, tendões, ligamentos ou ossos. Independente de sua etiologia, a cicatrização da ferida seguirá

um curso previsível e contínuo, o qual passará por várias etapas do processo cicatricial (ALBUQUERQUE et al., 2009).

No momento do trauma são interrompidas as conexões vasculares e nervosas, quanto mais extenso for o traumatismo, maior será o número de elementos lesados. Nas feridas podem ser encontrados tecidos desvitalizados, sangue extravasado, microorganismos ou corpos estranhos e o processo de cicatrização é desencadeado pelo organismo imediatamente após a lesão tecidual (MORAIS et al., 2008).

Existem diversos parâmetros para a classificação de feridas, elas podem ser classificadas quanto às causas, quanto ao conteúdo microbiano, quanto ao tipo de cicatrização, quanto ao grau de abertura e quanto ao tempo de duração. Quanto às causas elas podem ser: cirúrgicas, traumáticas e ulcerativas. Segundo GOMES et al (2005) as feridas cirúrgicas são aquelas provocadas intencionalmente e subdividem-se em: incisa, na qual não ocorre perda de tecido e as bordas no geral são fechadas por sutura; por excisão, onde há remoção de uma área de pele e por último as feridas causadas por cirurgia e procedimentos diagnósticos. Feridas traumáticas são aquelas provocadas acidentalmente por agentes mecânicos (contensão, perfuração, corte), químicos (produtos químicos e outros) e agentes físicos (frio, calor e radiação). As feridas são consideradas ulcerativas quando são lesões escavadas, circunscritas na pele, formadas pela morte e expulsão do tecido e resultam geralmente de traumatismo ou doenças relacionadas à diminuição do suprimento sanguíneo (GOMES et al., 2005).

Quanto ao conteúdo microbiano as feridas classificam-se em: limpas, limpas-contaminadas, contaminadas e infectadas. Limpas são aquelas que apresentam condições assépticas sem presença de microorganismos; limpas-contaminadas apresentam lesão inferior a seis horas entre o trauma e o atendimento, não apresentando uma contaminação significativa; contaminadas apresentam lesão com tempo superior a seis horas entre o momento do trauma e o atendimento, porém não apresentam sinais de infecção; as feridas infectadas apresentam evidência de intensa reação inflamatória com presença de agente infeccioso no local e destruição de tecidos (MAIA, 2006).

Quando a classificação envolve o tipo de cicatrização as feridas são denominadas de primeira, segunda e terceira intenção. Nas feridas de primeira intenção não há perda de tecido e as bordas ficam justapostas; as de segunda

intenção apresentam perda de tecido e suas bordas ficam distantes, estas feridas estão exemplificadas nas **figuras 2 e 3**; as feridas que cicatrizam por terceira intenção são aquelas que após cicatrizarem necessitam de uma correção cirúrgica. Feridas classificadas quanto ao grau de abertura podem ser classificadas em ferida aberta, as quais têm as bordas de pele afastadas e em ferida fechada, nas quais as bordas são justapostas. Por último, a classificação de acordo com o tempo de duração, na qual existem dois tipos de feridas, a aguda e a crônica; a primeira refere-se a feridas recentes e a segunda faz alusão a feridas com tempo de cicatrização maior que o esperado (SIMAS, 2010).

2.3 Reparo de Feridas

Na ocorrência de qualquer tipo de lesão na pele, independente de sua etiologia, o organismo irá produzir uma resposta com o objetivo de restaurar o tecido lesionado. O processo inflamatório é um mecanismo de defesa contra um agente agressor, seja ele qual for e simultaneamente ao início desse processo ocorrem os mecanismos que irão desencadear a regeneração ou cicatrização, os quais são os dois processos que compõe a restauração dos tecidos (GROAH et al., 2010).

Por exemplo, nos casos de pneumonia (inflamação) e corte na pele (trauma seguido de inflamação), o mecanismo de defesa é o mesmo para os dois casos, ou seja, a inflamação, embora os agentes agressores sejam diferentes. Após instalada a inflamação, esta poderá evoluir de forma distinta, seja para uma regeneração ou para uma cicatrização, o que define se a reparação tecidual ocorrerá por regeneração ou cicatrização é a extensão da lesão ou qual tipo de órgão foi lesado. O processo de regeneração tecidual vai depender de três fatores: o tipo do tecido lesionado, a intensidade da lesão e a manutenção da estrutura prévia do tecido (MELO et al., 2010).

O tecido exerce influência na regeneração de acordo com sua classificação, os mesmos são classificados de acordo com a capacidade de proliferação, ou seja, a capacidade que suas células (na vida adulta) têm em entrarem no ciclo celular. Com relação a essa capacidade, as células podem ser classificadas em estáveis, lábeis e permanentes. Uma célula é estável quando está em fase quiescente e ao sofrer estímulo é capaz de proliferar, exemplo: células endoteliais, fibroblastos,

músculo liso, parênquima do fígado, do rim e do pâncreas. Células lábeis são aquelas que estão sempre em replicação, ou seja, permanecem continuamente no ciclo celular, como exemplo: células da pele, mucosa e medula óssea. Por último as células permanentes, são as que dificilmente entram no ciclo celular e por isso não têm a capacidade de se dividir, como os neurônios e os miócitos (OLIVEIRA et al., 2010).

A regeneração é um processo que ocorre com reposição do tecido original, no qual as células mortas são substituídas pelas células do parênquima do mesmo órgão, ou seja, as células vizinhas da área lesada têm a capacidade de proliferar e substituir as células mortas da área lesionada. Portanto se o tecido for constituído por células lábeis ou estáveis vai haver regeneração, se sua constituição for de células permanentes o processo de reparação tecidual será por cicatrização, mesmo que a intensidade da lesão seja mínima. Por outro lado, em um tecido de células lábeis e estáveis se a lesão for extensa, a reparação pode ocorrer por cicatrização, é o que ocorre quando o tecido de granulação é formado. Outro fator que interfere é a matriz celular, que contribui para a sustentação e conexões da célula com o tecido conjuntivo, para que ocorra regeneração a matriz precisa se manter íntegra, se a lesão na matriz for extensa ocorrerá cicatrização (TODERKE et al., 2010).

Na cicatrização as células lesadas são substituídas por tecido fibroso (cicatriz), esses mecanismos não se excluem mutuamente, ou seja, após a lesão pode ocorrer no mesmo tecido regeneração e cicatrização. Danos tissulares de qualquer natureza (física, química ou biológica) desencadeiam de imediato uma série de eventos que podem ocasionar rubor, tumor, calor e dor. Na pele o reparo cicatricial normalmente ocorre por cicatrização. O processo de cicatrização de feridas consiste em um conjunto de eventos celulares e moleculares, os quais são constituídos por fenômenos bioquímicos e fisiológicos que interagem harmoniosamente visando à reparação tissular (RIBEIRO et al., 2009).

Este fenômeno fisiopatológico representa uma resposta defensiva do corpo humano para uma variedade de lesões. A cicatrização de feridas pode ocorrer de três maneiras distintas, dependendo da coaptação ou não de suas bordas, da perda de substância e da presença ou não de infecção secundária. Neste sentido, o processo de reparo cicatricial é comumente classificado em cicatrização por primeira intenção, segunda intenção e terceira intenção. A cicatrização por primeira intenção ocorre por reepitelização, processo no qual a mitose das células epiteliais ocasiona

o crescimento precoce do epitélio nas bordas das feridas (TAZIMA et al., 2008). As feridas que cicatrizam por primeira intenção são, mais comumente, feridas superficiais, agudas, em que a perda de tecido é mínima ou nenhuma e suas bordas são passíveis de aproximação, como representado na **figura 2** (MORE e ARRUDA, 2008).

O reparo cicatricial por segunda intenção ocorre numa ferida que envolve algum grau de perda de tecido e de acordo com MORE e ARRUDA (2008) são feridas que podem envolver o tecido subcutâneo, o músculo, e possivelmente, o osso. As bordas dessa ferida não podem ser aproximadas, e geralmente são feridas crônicas como as úlceras. O risco de infecção é maior, tornando lenta a cicatrização e esta ocorrerá de dentro pra fora, ao contrário da primária, conforme ilustrado na **figura 3**. Resultam em formação de cicatriz e têm maior índice de complicações do que as feridas que se cicatrizam por primeira intenção (DANTAS et al., 2011).

Cicatrização terciária ou por terceira intenção ocorre quando intencionalmente a ferida é mantida aberta por um determinado período, como se fosse uma cicatrização por segunda intenção, por diversas razões como para permitir a diminuição ou redução de edema ou infecção, ou para permitir a remoção de algum exsudato através de drenagem, como por exemplo, feridas cirúrgicas, abertas e infectadas com drenos. Posteriormente ocorrerá suturação, como no processo de cicatrização por primeira intenção, dessa forma, as feridas cicatrizam por 3ª intenção ou 1ª intenção tardia (VIEIRA, 2006).

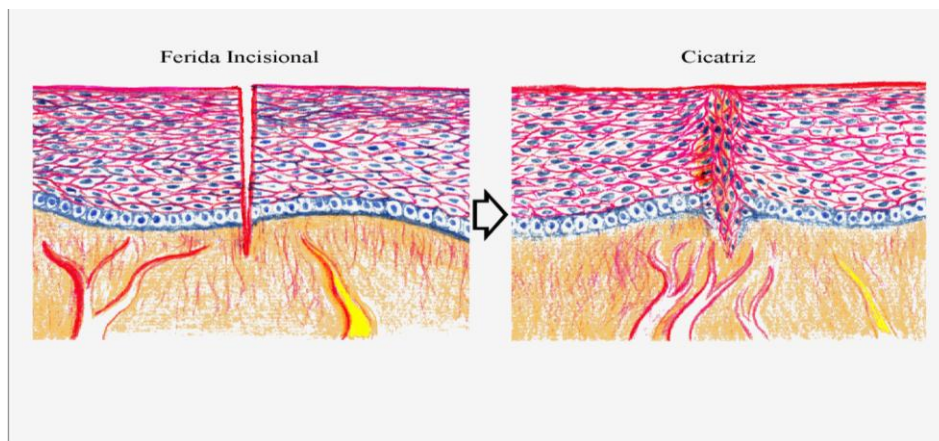


Figura 2. Representação de uma cicatrização primária ou por primeira intenção.
(Fonte: Pathology cliques)

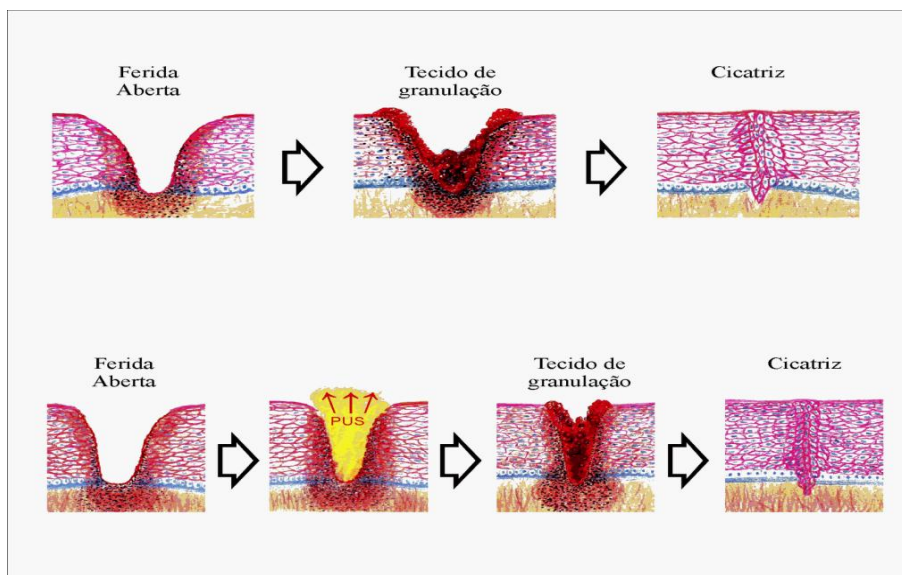


Figura 3. Cicatrização secundária ou por segunda intenção.

(Fonte: Pathology cliques)

O reparo cicatricial é composto por vários estágios complexos, interdependentes e simultâneos, os quais podem ser descritos em fases. Existem classificações que consideram três fases no processo cicatricial, a fase inflamatória, seguida pela fase de proliferação e finalizando com o estágio de remodelação. Para classificar o processo de forma mais completa MANDELBAUM et al (2003) dividem-no em cinco fases principais: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação. Em um determinado momento essas fases coincidem e ocorrem simultaneamente, promovendo o sucesso da cicatrização (WING e MIDWOOD, 2011).

A primeira fase é a de coagulação e seu início ocorre imediatamente após o surgimento da ferida e para ocorrer depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação. Nesse período ocorre uma complexa liberação de substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases, as quais desencadearão outras fases. A formação do coágulo não serve apenas para coaptar as bordas das feridas, mas também para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida (COTRAN e ROBBINS, 2010).

A segunda etapa é a inflamatória ou exsudativa, intimamente ligada à fase anterior, por promover a ativação do sistema de coagulação sanguínea e liberação

de vários mediadores químicos. Além destes, essa fase depende das células inflamatórias como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos. Os PMN chegam no momento da injúria tissular, sendo responsáveis pela fagocitose das bactérias e ficam por um período que varia de três a cinco dias. O macrófago é a célula inflamatória mais importante desse estágio, permanecendo por volta do terceiro ao décimo dia. A fibronectina também exerce importante papel nessa fase, sua utilidade é servir como aderente para consolidar o coágulo de fibrina, as células e o componente da matriz extracelular. Nesta fase a ferida pode apresentar edema, vermelhidão e dor (RIBEIRO et al., 2009).

A fase proliferativa ou regenerativa é a terceira e se caracteriza pela formação do tecido de granulação, na qual o colágeno é o principal componente do tecido conjuntivo reposto. É a etapa responsável pelo fechamento da lesão propriamente dita, podendo ser dividida em três subfases, nas quais ocorrem mecanismos essenciais para o processo cicatricial: reepitelização, na qual ocorre a migração de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais, é um processo que vai organizar a cicatriz. Angiogênese é o mecanismo responsável por estimular a formação de novos vasos sanguíneos, sendo essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização. E por último a fibroplasia, processo em que ocorre migração e proliferação dos fibroblastos no local da lesão, sendo extremamente importante na formação do tecido de granulação (TAZIMA et al., 2008).

O quarto estágio referencia a contração da ferida, onde ocorre movimento centrípeto das bordas da ferida. Os miofibroblastos são as células responsáveis por essa fase. Uma ferida tem contração mesmo quando há enxertos que diminuem razoavelmente o tamanho da ferida. Nas cicatrizes ocasionadas por feridas de segunda intenção a contração pode reduzir até cerca de 60% da área de superfície da lesão cutânea (MANDELBAUM et al., 2003).

Remodelação é a última das fases, ocorrendo quando o leito da ferida está totalmente coberto por tecido de granulação. Nessa fase o tecido de granulação será cada vez mais enriquecido por uma quantidade maior de colágeno, e o tecido começa a adquirir a aparência de massa fibrótica, característica da cicatriz. A remodelação é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema, este processo ocorre lentamente levando meses ou às vezes anos para sua conclusão (OKEN et al., 2009).

Por mais completo e eficiente que seja o processo sistêmico de reparação tecidual, é necessário, na maior parte dos casos, propiciar condições locais através de terapia tópica adequada para tornar viável e acelerar o processo fisiológico. A importância do tratamento tópico de feridas é fundamentada sobre o processo de reparação tecidual, sendo norteadas de acordo com CAMARGO (2006), pelos princípios de remoção de tecidos necróticos e corpos estranhos do leito da ferida, eliminação de processos infecciosos, invalidação de espaços mortos, absorção do excesso de exsudato, manutenção da umidade do leito da ferida, promoção do isolamento térmico e proteção da ferida contra traumas e invasão bacteriana. Os tratamentos tópicos são realizados, em sua maioria, por meio das coberturas e curativos, os quais existem em grande variedade na atualidade. Porém, numerosos estudos são realizados em busca de produtos que atuem no reparo de feridas a fim de promover uma cicatrização cada vez mais eficaz e em menor espaço de tempo, e na atualidade existe um imenso destaque para produtos naturais (FERREIRA et al., 2012).

2.4 Curativo e Coberturas

O curativo é a realização do procedimento que consiste na limpeza e aplicação de uma cobertura na ferida com a finalidade principal de promover rápida cicatrização e prevenir contaminação e infecção. É um processo com as seguintes etapas: limpeza, desbridamento e indicação da cobertura adequada. Cobertura é o material que se aplica sobre a ferida objetivando promover a cicatrização e proteger contra danos maiores (ADEWUMI e OGUNJINMI, 2011).

Os curativos têm inúmeros objetivos e finalidades, tais como: auxiliar o organismo a promover a cicatrização, eliminar os fatores desfavoráveis que retardam a cicatrização da lesão, diminuir infecções cruzadas, através de técnicas e procedimentos adequados, limpar a ferida, promover o processo cicatricial através da eliminação de fatores que possam retardá-la, tratar e prevenir infecções, prevenir contaminação exógena, remover corpos estranhos, proteger a ferida contra traumas mecânicos, promover hemostasia, fazer desbridamento mecânico e remover tecidos necróticos, reduzir edemas, drenar e absorver secreções e exsudatos inflamatórios, diminuir odor, manter a umidade da ferida, fornecer isolamento térmico, dar conforto

psicológico ao paciente, diminuir a intensidade da dor e limitar a movimentação em torno da ferida (GOMES et al., 2005).

A limpeza da ferida é um processo de fundamental importância para a reparação tecidual, pois o processo cicatricial não evoluirá de forma adequada enquanto todos os agentes externos não forem retirados do leito da ferida. Além de conferir proteção à ferida, a limpeza tem outros objetivos, tais como: a remoção de detritos e corpos estranhos, de microrganismos da superfície do tecido lesionado e de remover excesso de exsudatos e tecido necrótico. Outro benefício proporcionado pela limpeza é a promoção e preservação do tecido de granulação. Conforme o grau da lesão, o processo de limpeza envolverá a realização do desbridamento, que é a remoção do tecido desvitalizado ou necrosado. Os métodos utilizados para tal procedimento podem ser instrumental, mecânico, autolítico e químico. O desbridamento pode ser classificado em seletivo e não seletivo, o primeiro ocorre quando a remoção do tecido desvitalizado não afeta o tecido vivo e o segundo é quando há remoção também do tecido vivo subjacente (GORDON et al., 2010).

Além da limpeza e desbridamento, outro princípio que constitui a terapia tópica de feridas é a oclusão com as coberturas. Atualmente existem diversos tipos de coberturas disponíveis para auxiliar no processo de cicatrização. Algumas características que uma cobertura adequada deve possuir para manter o meio propício para a reparação tissular são: manutenção da umidade entre a ferida e a cobertura, remoção do excesso de exsudato, permissão da troca gasosa, promoção do isolamento térmico, proteção contra infecção e remoção sem causar traumas. Na realização do curativo deve-se manter o meio úmido no leito da ferida porque uma ferida seca exige maior atividade metabólica e necessita de mais tempo para a cura. Algumas vantagens da manutenção do meio úmido são: estimular a vascularização, a formação do tecido de granulação e a epitelização; facilitar a remoção do tecido necrótico; diminuir a dor e evitar traumas no momento da realização do procedimento (ROSSI et al., 2010).

O tipo de cobertura a ser utilizada será variável de acordo com o tamanho, local e natureza da ferida. Existem vários tipos de categorias para classificar as coberturas, podem ser classificadas quanto ao contato com o leito da ferida, sendo consideradas coberturas primárias quando colocadas diretamente sobre o leito da ferida, são secundárias quando são alocadas sobre a cobertura primária, por exemplo, o ácido graxo é uma cobertura primária e a gaze é secundária e são

classificadas como mistas quando o produto possui duas camadas, uma que permanece em contato com o leito da ferida e a outra que se comunica com o meio externo. Quanto ao desempenho as coberturas podem ser passivas, interativas ou bioativas: as coberturas que protegem e cobrem as feridas são consideradas passivas, as interativas mantêm um ambiente úmido e sua estrutura se altera à medida que reage com a ferida. Por sua vez, as bioativas são aquelas que fornecem elementos necessários à cicatrização estimulando a cura da ferida (PETROIANU, 2010).

Alguns dos principais produtos utilizados como coberturas disponíveis no mercado são: ácidos graxos essenciais, alginatos, coberturas com prata, coberturas com carvão e prata, cobertura hidrobalanceada, hidrocolóide, hidropolímero, hidrogel, colágeno, filme transparente, gaze de acetato de celulose, coberturas com silicone, compressa não aderente, entre outros. Os ácidos graxos essenciais (AGEs) possuem alta capacidade de hidratação, proporcionando nutrição celular e manutenção da função e integridade das membranas celulares. Os alginatos possuem íons de cálcio em sua constituição, dessa forma a terapia tópica ocorre através da troca iônica do cálcio pelo sódio do exsudato, e a partir dessa troca as fibras de alginato transformam-se em um gel, tornando úmido o leito da lesão. Apresentam indicações para feridas sangrantes, cavitárias, úlceras por pressão, feridas traumáticas e deiscências. Como contra indicação têm-se as feridas isquêmicas, feridas com pouca ou nenhuma exsudação e lesões por queimaduras (CARNEIRO et al., 2010).

As coberturas com prata têm como principal mecanismo de ação o controle das bactérias presentes no leito da lesão. Agindo pela liberação da prata em contato com o exsudato, pois a bactéria tem tropismo pela prata e ao entrar em contato com a mesma não ocorre a multiplicação bacteriana; são indicadas para redução da multiplicação bacteriana no leito da ferida e contra indicadas para feridas secas e em fase de granulação (fase proliferativa) e em casos de exposição óssea; as coberturas com pratas requerem coberturas secundárias. As coberturas de prata podem estar associadas a outros componentes, como por exemplo, o carvão, que irá reduzir o odor da ferida. As coberturas hidrobalanceadas são capazes de absorver e liberar umidade ao mesmo tempo, promovendo um hidrobalanceamento, são indicadas para feridas infectadas, criticamente colonizadas e com leve a moderada exsudação (SILVA et al, 2011).

Os hidrocolóides são coberturas interativas, ou seja, participam do controle ambiental da ferida através da promoção do meio úmido, que acontece através da interação da camada interna da cobertura com a lesão. Hidropolímeros são almofadas de espuma de poliuretano capazes de absorver os fluidos e impedir seu retorno ao leito da ferida, são recobertos por filmes semipermeável para manter a temperatura constante e o meio úmido no leito da ferida; são utilizados em feridas com pequena quantidade de exsudato. O hidrogel é uma cobertura hidroativa tendo como mecanismo de ação amolecer e remover o tecido desvitalizado por autólise, promovendo um desbridamento atraumático e mantendo a umidade do leito da ferida; são contra indicados para feridas com grande exsudação e feridas infectadas. A cobertura formada por colágeno e alginato de cálcio é indicada para feridas não infectadas e que não apresentem tecido desvitalizado e com pouco exsudato (LIMOVÁ, 2010).

Filme transparente é um filme de poliuretano, seu mecanismo de ação é através da permeabilidade seletiva favorecendo trocas gasosas e evaporação da água e impedindo a entrada de fluidos e microrganismos. Gaze de acetato de celulose impregnada com vaselina é indicada para queimaduras de primeiro grau, alguns tipos de enxertos e algumas úlceras podendo causar irritação; apresentam contra indicação para feridas exsudativas e com necrose de coagulação. Coberturas de silicone compõem-se de uma tela de poliamida elástica revestida com silicone suave, são indicadas para prevenir úlceras por pressão e para proteger a pele recém-cicatrizada. A compressa não aderente é pouco absorvente, sendo indicada para pós-operatório, feridas superficiais, abrasões e cortes (SANT'ANA, 2011).

A maioria dos produtos que foram citados acima apresenta contra indicação ou representa um custo econômico não satisfatório, não sendo acessível para a maior parte da população. Devido a estes fatores, diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de buscar novos materiais que auxiliem no processo de reparo de tecido, ou filmes que atuem como substitutos de modo a restaurar, manter e melhorar a função do tecido lesionado, com custo econômico reduzido e que possa ser acessível à maior parcela da população, senão a todos. Dentre os diversos tipos destacam-se os filmes de colágeno, os quais são filmes de recobrimento utilizados no processo de reparo, também denominados curativos (NUNES et al., 2011).

Os filmes servem para utilização como substituto de pele humana, proteção e reconstrução da epiderme, como barreira protetora contra infecções e como base para administração de medicamentos dermatológicos e cosméticos. Os filmes podem ser formados por diferentes tipos de polímeros, os quais são componentes macromoleculares, como por exemplo, proteínas, lipídios ou polissacarídeos (vegetais ou microbianos). Entretanto, independente do tipo do componente, as formulações destes filmes devem conter ao menos um componente que seja eficaz para formar uma matriz contínua, adequada, coesa e aderente. RIGO (2006) relata que tais formulações são constituídas de pelo menos um agente formador de filme (macromoléculas), solvente (água, etanol, água/etanol, entre outros), plastificante (glicerol, sorbitol, etc.) e agente ajustador de pH (ácido acético, NH_4OH , etc.) (RIGO, 2006).

Os polímeros estão presentes em todos os setores da economia como saúde, construção civil, embalagens, agricultura, entre outros e o petróleo sempre foi uma das suas principais fontes de matéria-prima. Porém os altos custos e aumento da poluição ambiental relacionada ao petróleo impulsionaram o desenvolvimento de novos tipos de polímeros, os biopolímeros, os quais são produzidos por organismos vivos (BORSCHIVER et al., 2008). A utilização de polímeros naturais proporcionando diferentes propriedades químicas, físicas e biológicas como curativos de feridas tem sido largamente estudada em virtude dos diversos benefícios destas macromoléculas, como por exemplo, potencializar de maneira geral o processo de reparação tissular. Terapias utilizando filmes de colágeno vêm demonstrando potencial na cicatrização, visto que seu uso promove uma predominância de colágeno tipo I (MACIEL et al., 2010).

Segundo RODAS (2004), um substituto dermo-epidérmico deve satisfazer algumas condições básicas como: propriedade adequada ao manuseio, resistência à fratura, resistência à tração, controle de sua estrutura, tamanho de poros, possuir degradação controlada com formação de produtos atóxicos, não produzir reações inflamatórias e propiciar a invasão de células endoteliais para a formação de novos vasos e outras células como fibroblastos (RODAS, 2004).

Diferentes tipos de biomateriais (materiais bioativos que têm a capacidade de interagir com tecidos naturais, podendo ser naturais ou sintéticos) têm sido utilizados como coadjuvantes no reparo cicatricial. O uso de membranas de colágeno e citocinas (grupo de glicoproteínas que atuam na resposta imune) vêm sendo

propostos há anos por promoverem mais rapidez e eficácia no processo cicatricial (MACIEL et al., 2010).

2.5 Filmes de Colágeno

O colágeno é um excelente biomaterial por possuir determinadas características, como por exemplo: ser biocompatível (não induzir respostas teciduais ou imunológicas adversas), possuir baixa toxicidade e imunogenicidade. Além disso, o colágeno é importante, por proporcionar uma matriz provisória para os granulócitos, macrófagos e fibroblastos e por ser quimiotático o colágeno contribui para que essas células possam ingressar no leito da ferida (na fase de coagulação). Outra vantagem de filmes à base de colágeno é a maturação célere do colágeno e seu alinhamento (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Colágeno é a principal proteína estrutural dos tecidos dos animais vertebrados, sendo encontrada abundantemente no tecido conjuntivo, mais especificamente, na pele, cartilagem, ossos, tendões e dentes, geralmente em locais que resistem a grandes tensões. Sua estrutura pode ser observada na **figura 4**. Essa proteína pode desempenhar diversas funções no corpo humano como: manter as células dos tecidos unidas e fortalecê-las, sendo responsável também pela cicatrização e/ou regeneração em caso de corte ou cirurgia, e também, acredita-se que é responsável pelo envelhecimento humano. O colágeno tipo I é o mais encontrado, este tipo forma fibras e feixes de colágeno, no corpo humano o colágeno representa 30% do total de proteínas (NUNES et al., 2011).

O colágeno tipo I é encontrado predominante em animais de grande porte, especialmente na pele, tendões e ossos, onde existe transmissão de forças extremas. As demais moléculas de colágeno podem ser encontradas, por exemplo, em cartilagens e humor vítreo, o do tipo II, vasos sanguíneos e trato gastrointestinal do tipo III (ALBUQUERQUE et al., 2009). O colágeno tipo I é capaz de nortear a gênese de tecidos em desenvolvimento, sendo mais um fator que o torna altamente favorável na sua utilização como biomaterial. Com o processo de fibrilogênese, as fibras de colágeno se tornam progressivamente mais espessas e mais numerosas, as células fagocitárias vão desaparecendo e o tecido de granulação passa a ser constituído por tecido conjuntivo com maior densidade e menos vascularização (E'GUES, 2005).

O colágeno utilizado para a formação de filmes poliméricos é uma proteína extraída da articulação e pele de bovinos. O colágeno possui oito dos nove aminoácidos essenciais, não contém triptofano, e possui uma concentração de glicina e prolina, cerca de vinte vezes superior, às demais proteínas (ZIEGLER e SGARBIERI, 2009). O colágeno tem sido utilizado para fins cosméticos, no combate ao envelhecimento e às rugas, no setor alimentício ele é utilizado para fabricação de iogurtes, embutidos e sobremesas de fácil preparo, como a gelatina por exemplo e na área de produtos fármacos é utilizado para a produção de cápsulas, entre outros. (WESTGATE e CUTTING, 2012).

A sua forma hidrolisada é o colágeno obtido por um processo de hidrólise seguido de liofilização para consumo humano, esse processo permite a obtenção de tamanho mínimo de fragmentos protéicos, o que permite uma rápida absorção pelo organismo chegando facilmente à corrente sanguínea. O colágeno hidrolisado pode ser encontrado na forma líquida, em cápsula ou pó. A gelatina é uma proteína derivada da hidrólise parcial do colágeno animal e a conversão do colágeno em gelatina pode ser obtida através do aquecimento do colágeno, em meio ácido ou meio alcalino (SILVA et al., 2011).

Os biomateriais criados a partir do colágeno representam uma alternativa terapêutica com aplicação variada na área médica e odontológica por apresentar excelente biocompatibilidade e acelerar o processo cicatricial (OLIVEIRA et al., 2010). O filme de colágeno não deve servir apenas para preencher espaços, mas principalmente deve estimular uma resposta biológica quando utilizado. Devido à sua propriedade desempenha um papel dominante em manter a integridade estrutural e a cura da ferida (UKONG et al., 2008).



Figura 4. Estrutura do colágeno.

(Fonte: Pathology cliques)

2.6 Ácidos Graxos Essenciais (AGEs)

Os AGEs são uma espécie de gordura especial, moléculas universais, delicadas e flexíveis que não podem ser sintetizadas pelo organismo, devem originar-se diretamente da dieta alimentar, sendo também denominados como ácidos graxos insaturados. Os AGEs, também denominados por triglicerídeos de cadeia média, são produtos originados de óleos vegetais poli-insaturados e encontram-se nos lipídios estruturais das células. São obtidos de fonte vegetal, não são sintetizados pelo organismo, pois não há enzimas para produzi-los. As principais fontes naturais são sementes e frutos de plantas (amêndoas, nozes, abacate, azeitona), peixes gordurosos e óleos vegetais (BATISTA et al., 2005).

As principais funções dos AGEs no organismo são: transporte de material pelas membranas celulares, o que garante a vida da célula através do fluxo equilibrado de nutrientes, resíduos e produtos da atividade biológica; são componentes estruturais importantes de todas as membranas, seja revestindo uma célula ou em seu interior; manutenção da impermeabilidade da pele; regulação da síntese e transporte do colesterol e síntese de prostaglandinas que atuam na ativação de determinadas células brancas do sangue, diminuição da pressão arterial e inibição da inflamação (RUSTAN e DREVON, 2005).

Os AGEs transportam e metabolizam gordura e mantêm a função e a integridade estrutural das membranas das células. Possuem excelente absorção para uso tópico ao formarem uma película que previne escoriações devido à grande

capacidade de hidratação e nutrição celular local e ainda possuem alto poder de regeneração tissular quando em lesões epidérmicas (YAMAMOTO, 2006). Os AGEs ainda possuem papel fundamental nos processos de inflamação e proliferação celular devido ao seu mecanismo de ação que se dá por meio da atração de leucócitos para os locais de inflamação, sendo assim potentes agentes quimiotáticos; agem também facilitando a entrada de fatores de crescimento e apesar de não serem agentes debridantes, são capazes de estimularem o desbridamento autolítico, acelerando o processo cicatricial através desses mecanismos (FRÉ, 2009).

Os AGEs além de protegerem a pele, prevenirem e tratarem infecções, por terem ação bactericida, interferem em diversas etapas do processo de cicatrização. Podendo assim, serem usados em todas as fases do reparo cicatricial. Eles agem como bactericida e interferem na cicatrização aumentando a permeabilidade da membrana celular, promovendo mitose e proliferação celular, estimulando a angiogênese, mantendo o leito da ferida úmido e acelerando o processo de granulação tecidual (HATANAKA e CURI, 2007).

As principais indicações do AGE são: hidratação da pele íntegra, aplicação em feridas de pele em geral, tratamento de feridas abertas, para prevenir e tratar úlceras de pressão, para tratar rachaduras de mamilos e para recuperação de queimados. Os AGEs possuem vantagens tais como não requererem dosagem específica, permitem tratamento domiciliar, possuem também versatilidade na combinação com outros produtos, podem ser usados em feridas infectadas ou não infectadas, são de fácil aplicação, seja por spray ou gotejamento, propiciam resposta cicatricial rápida e permitem o tratamento de lesões extensas (GOMES et al., 2008).

As formulações comerciais que foram utilizadas na pesquisa foram o AGE50® e o AGE100®. Diversos testes com o AGE100® foram realizados pelo Instituto GENOTOX-ROYAL em parceria com a TECPON Indústria e Comércio de Produtos. Os testes feitos para a composição acima apresentaram resultados negativos para: toxicidade dérmica doses repetidas em pele escarificada de ratos; toxicidade dérmica aguda em ratos; detecção de mutações cromossômicas pela análise de micronúcleos em células da medula óssea e em células da epiderme de camundongos tratados; avaliação da eficácia farmacológica de produtos para tratamento de úlcera de pressão e condições relacionadas a ratos. Todos os testes

apresentaram resultados favoráveis ao uso do AGE100® no processo cicatricial (GENOTOX-ROYAL, 2007).

Os filmes poliméricos também podem ser formados por AGE, sendo que as formulações comerciais utilizadas no trabalho continham ácido oléico e ácido linoléico na sua composição. O ácido oléico é um ácido carboxílico por possuir um grupo funcional COOH, é de cadeia longa por possuir 18 carbonos na sua estrutura e tem papel fundamental no metabolismo, principalmente na síntese dos hormônios. O ácido linoléico também possui 18 carbonos e é essencial na dieta humana, a estrutura e molécula destes ácidos graxos estão descritas nas **figuras 5, 6, 7 e 8**. BATISTA et al (2005) estudaram a adição de ácidos graxos em filmes de pectina e puderam observar que os ácidos promoveram aumento significativo da permeabilidade ao vapor de água dos filmes de pectina. Apesar dos AGEs apresentarem-se como hidrofóbicos, BATISTA et al (2005) justificaram o fato devido aos mesmos conterem grupos carboxílicos altamente polares que podem interagir com moléculas de água, e dessa forma facilitar a transferência de umidade através do filme.

O tipo de AGE utilizado no preparo dos filmes é um fator de mudança nas propriedades dos filmes, por exemplo, ácidos graxos com maior número de cadeias carbônicas são capazes de diminuir a permeabilidade do filme, enquanto ácidos com cadeias menores tornam-na maior. Com relação à solubilidade em água, em geral os ácidos graxos tem a tendência de diminuir a solubilidade do filme, porém se os mesmos não se incorporarem à matriz filmogênica, não serão capazes de diminuir a solubilização dos filmes em água (BATISTA et al., 2005).

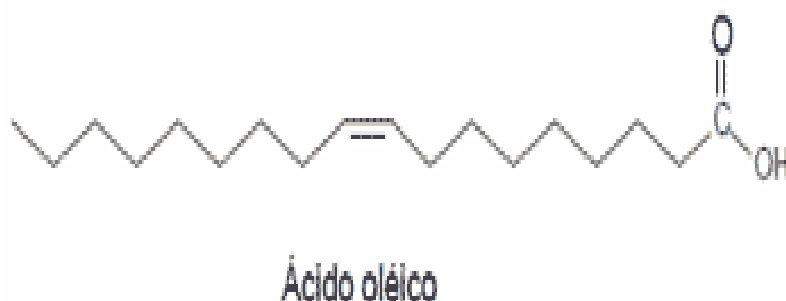


Figura 5. Estrutura química do ácido oléico
(fonte: www.3dchem.com)

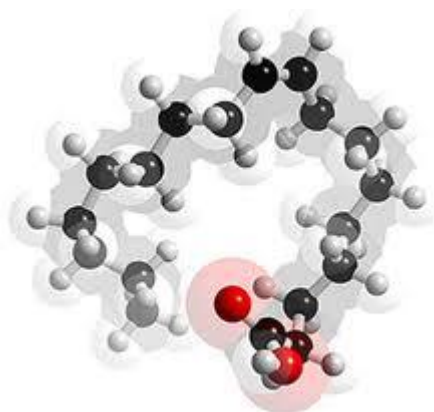


Figura 6. Representação da molécula de ácido oléico em 3D.
(fonte: www.3dchem.com)

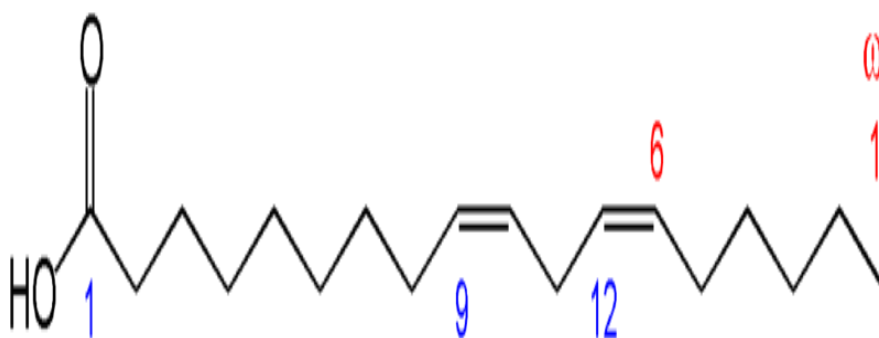


Figura7. Estrutura química do ácido linoléico
(fonte: www.3dchem.com)

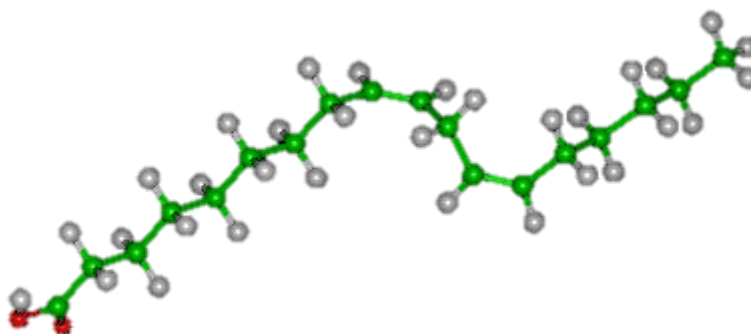


Figura 8. Estrutura molecular do ácido linoléico
(fonte: www.3dchem.com)

2.7 Métodos para caracterização dos filmes

2.7.1 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas de um filme são um dos parâmetros mais importantes a serem analisados, pois elas influenciam diretamente na sua utilidade. Estas propriedades determinam como os filmes irão reagir às influências mecânicas externas. Flexibilidade, resistência à tração e alongamento adequados, são características importantes que permitem identificar se um filme é adequado ou não para a utilização a que se destina (LIEBERMAN e GILBERT, 2007).

As propriedades mecânicas que os filmes apresentam são: resistência à tração, alongação, módulo de Young e força resultante. As mesmas são avaliadas durante a realização do teste de tração, no qual uma amostra será deformada até que ocorra seu rompimento. Resistência à tração é a força máxima que um filme pode suportar até o momento de sua ruptura (SARKER et al., 2011).

A alongação por sua vez é o grau de maleabilidade do filme, ou seja, a capacidade que o filme tem em se deformar antes de se romper. Módulo de Young ou módulo de elasticidade é a relação entre a resistência à tração e a porcentagem de alongamento e indica o grau de rigidez do filme. Força resultante é a força de tração que promove o início da deformação não elástica do filme (RIGO, 2006).

Existem diversos fatores que podem influenciar diretamente as propriedades mecânicas, de acordo com COUTINHO et al (2003), a estrutura de cada polímero têm influência direta sobre sua densidade e suas propriedades mecânicas. As propriedades mecânicas e de barreira são superiores nos filmes à base de proteínas do que naqueles constituídos por polissacarídeos devido à estrutura das proteínas (OLIVEIRA et al., 2007).

O poder coesivo do filme é outro parâmetro que exerce influência nas propriedades mecânicas. Estruturas poliméricas de cadeia longa, como o colágeno, por exemplo, produzem matrizes de filmes com adequado poder coesivo. MAIA et al (2000) relata que o aumento da interação molecular entre as cadeias de proteínas promove a formação de filmes com maior força, entretanto menos flexível e permeável.

A estrutura, a composição química do produto, a presença de aditivos, o tipo de solvente e as condições do ambiente para formação do filme também determinam o poder de coesão do filme. O grau de coesão influencia nas propriedades mecânicas e de barreira dos filmes, sendo que quanto maior a coesão estrutural, menor será a flexibilidade, a porosidade e a permeabilidade (RIGO, 2007).

SHIMAZU et al (2007) afirmam que os plastificantes também influenciam as propriedades mecânicas, visto que a adição de plastificante pode promover melhora nas propriedades dos filmes. REIS et al (2011) estudaram a relação entre a deformação dos filmes e a concentração de glicerol aplicada, concluindo que menor quantidade de glicerol resultou em filmes com menores valores de deformação.

MONTERREY- QUINTERO e SOBRAL (2000) afirmam que o glicerol quando adicionado aos filmes, exerce grande influência nas propriedades mecânicas e na solubilidade dos filmes. Estudos com filmes à base de pectina e amido, realizados por COFFIN e FISHMAN (1994), constataram que a adição de glicerol diminuiu a resistência à tração e aumentou o alongamento dos filmes em questão.

A umidade relativa é outro fator que pode influenciar nas propriedades mecânicas dos filmes. MALLI et al (2010) observaram que maior umidade relativa no momento da secagem resulta em maior grau de cristalinidade e maior teor de umidade residual na estrutura filmogênica, o que torna mais fácil ocorrerem alterações no armazenamento e utilização destes filmes. Para que isto não ocorra é de fundamental importância controlar a umidade relativa durante o armazenamento antes da efetivação das análises.

2.7.2 Espessura

A espessura dos filmes é um parâmetro importante e exerce influência sobre suas propriedades, sendo também necessária para realização de outras análises, como a resistência mecânica e as propriedades de barreira aos gases e ao vapor d'água, dessa forma é de grande importância o seu controle e conhecimento. Conforme OLIVEIRA (1996), quando controlada, a espessura permite a uniformidade desses materiais, a repetibilidade da medida de suas propriedades e a validade das comparações entre as suas propriedades.

Entretanto, CORRÊA (2011) relata que o controle da espessura dos filmes não é um processo simples, principalmente nos filmes do tipo casting. O suporte da solução filmogênica e o local onde a mesma permanecerá durante o processo de secagem, necessitam de rigoroso controle, pois podem gerar diferenças na espessura e na homogeneidade dos filmes. De acordo com SANTOS (2004), a heterogeneidade de espessura é um dos mais graves defeitos de fabricação dos filmes biodegradáveis, visto que variações na espessura de um material podem afetar diversas de suas propriedades.

MALI et al (2010) constataram que ao se produzir filmes pelo método *casting*, a medida da espessura vai depender intensamente da viscosidade da solução filmogênica. Para a dispersão de soluções muito viscosas deve-se utilizar um equipamento adequado para dispor o fluido no seu suporte. Já em soluções mais diluídas, é possível controlar a espessura conhecendo a gramatura.

OLIVEIRA (1996) conceitua gramatura como o peso de uma definida área do material e tem uma relação diretamente proporcional com a resistência mecânica dos filmes, ou seja, valores elevados de gramatura resultam em maior resistência mecânica. Maiores interações intermoleculares nos filmes, resultam em maior espessura, portanto dependendo do tipo de polímero utilizado os filmes podem apresentar espessuras diferentes. Como foi relatado por SRIAMORNSAK e KENNEDY (2008), os quais compararam as diferenças de espessura entre filmes de pectina e alginato. Sendo os de pectina mais finos que os de alginato, fato que se explica pela menor massa molecular da pectina, que causa um arranjo molecular mais compacto (CORRÊA, 2011).

Estudos realizados por CUQ et al (1996) relatam uma relação diretamente proporcional entre tensão na ruptura e espessura. FAKHOURI et al (2007) realizaram estudos sobre a influência da espessura nas propriedades de filmes de gelatina, concluindo que a força na ruptura, a permeabilidade ao vapor de água e a cor dos filmes são influenciados linearmente pelo aumento da espessura (FAKHOURI et al., 2007).

Capítulo III – Material e Métodos

Procedimento Experimental

3. METODOLOGIA

Materiais e Aparelhos utilizados: colágeno hidrolisado (Gelita), glicerol (Vetec), formulação comercial de ácidos graxos essenciais com óleo de girassol: AGE50® (Tecpon), formulação comercial de ácidos graxos essenciais: AGE100® (Tecpon), ácido acético (Vetec), tween 80 (Vetec) e tween 20 (Vetec).

3.1 Elaboração dos filmes

Os filmes foram preparados segundo técnica “casting” descrita por Monterrey-Quintero e Sobral (2000) e Vicentini (2003), que consiste na desidratação de uma solução coloidal, chamada de solução filmogênica (SF). As soluções filmogênicas foram constituídas de: 2,13 g de colágeno, 100g de solução de ácido acético 0,5 mol/L, 0,213g de AGE100® ou AGE50®, 0,319g de glicerol quando a SF foi composta de AGE100® e 0,425g de glicerol quando constituída de AGE50® (15% e 20% de glicerol em relação à massa do colágeno respectivamente) e 0,2g de tween 20 para o AGE100® e 0,1g de tween 80 para o AGE50®. Para a obtenção dos filmes de colágeno contendo ambas as formulações, foram realizados os seguintes procedimentos: o colágeno comercial hidrolisado foi disperso em solução de ácido acético 0,5mol/L, o glicerol foi adicionado à dispersão como agente plastificante e o tween 20/80 foi adicionado como agente emulsificante.

Posteriormente a SF foi aquecida na placa agitadora e aquecedora gradualmente até 55°C e mantida na agitação por 20 minutos após atingir a temperatura desejada. O AGE50® e o AGE100® foram incorporados à SF através do turrax (aparelho homogeneizador que permite a homogeneização entre a SF e o AGE®), em uma agitação de 30.000 rpm, na concentração de 10% em relação à massa do colágeno após a fase de aquecimento. Foram produzidos filmes de colágeno sem AGE® e filmes com AGE50® e AGE100®. Posteriormente, as SF foram vertidas em placas de poliestireno e então desidratadas em estufa com circulação e renovação de ar (Marconi, MA 037) com controle de temperatura de (40± 0,5 °C) e com um tempo de secagem médio de 24 h (VICENTINI, 2003). Os filmes foram acondicionados em umidade relativa (UR) de 58% em dessecadores contendo solução saturada de NaBr durante 2 dias a 25°C antes de serem

caracterizados. Após esta etapa, os filmes foram retirados das placas, cortados em quadrados, e esterilizados por raios ultravioleta 30 minutos antes do uso.

3.2 Caracterização dos filmes

As análises para caracterização dos filmes foram realizadas para os três experimentos, filmes com AGE100® (FAGE100), filmes com AGE50® (FAGE50) e filmes de colágeno hidrolisado sem AGE® (FCOL). As caracterizações realizadas foram: avaliação macroscópica, análise de propriedades mecânicas (tensão/deformação), espessura e microscopia óptica.

3.2.1 Avaliação macroscópica dos filmes

Os filmes foram submetidos às análises preliminares macroscópicas para análise de suas superfícies, nas quais foram observadas as seguintes características: continuidade (ausência de rupturas e fraturas após a secagem), homogeneidade (ausência de partículas insolúveis ou visíveis ao olho nu, ou zonas de opacidade ou de cores diferenciadas), manuseabilidade (possibilidade de ser manuseado sem riscos de ruptura) e a capacidade de formação de uma película contínua (MONTERREY e SOBRAL, 1999). Esta análise se deu por meio de avaliação macroscópica, atribuindo escores de + a +++ sendo classificados em deficiente, boa e excelente, respectivamente.

3.2.2 Espessura

Foi determinada conforme MONTERREY e SOBRAL (1999). Após a desidratação a espessura dos filmes foi medida com um micrômetro manual (micrômetro externo digital, Pantec, precisão $\pm 0,001$, com superfície de contato de 6,4 mm de diâmetro) em 5 pontos diferentes do filme, sendo uma no centro e as outras quatro no perímetro. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

3.2.3 Análise de propriedades mecânicas: tensão/deformação

As propriedades mecânicas foram determinadas com o uso de um texturômetro, no modo tração (TA-TX2, Stable Micro Systems, England). Após o acondicionamento em ambiente com 58% de umidade relativa, durante 48 horas, as amostras foram retiradas e cortadas em forma retangular (20 x 10 mm), sendo utilizados 10 corpos de prova (com 20 mm) para cada amostra. A espessura das amostras foi determinada em três pontos com o uso de um micrômetro (micrômetro externo digital, Pantec, precisão $\pm 0,001$ mm, com superfície de contato de 6,4 mm de diâmetro) e foi calculado o valor médio da espessura. O módulo de Young foi calculado a partir da região linear da curva de tensão x deformação, entre 0,00 e 1,00% de alongamento. A resistência (tensão de ruptura e alongamento) do material foi calculada através da área abaixo da curva de tensão x deformação. A separação das garras começou a partir de 10 mm e a velocidade do teste foi de 1 mm/s. Cada medida de tensão de ruptura (s), alongamento máximo e módulo de Young foram a média de 10 leituras (RIGO, 2006).

3.2.4 Análise microscópica: microscopia óptica

Os filmes foram montados em lâminas de vidro e observados em um microscópio óptico (marca Carl Zeiss) com um aumento de 400 vezes. Para analisar qualitativamente a superfície dos filmes (com relação à homogeneidade, continuidade e partículas insolúveis) foram tiradas fotografias dos filmes com uma máquina fotográfica (marca Kodak) acoplada ao microscópio.

3.3 Ensaio biológico de cicatrização

Para o procedimento cirúrgico, foram utilizados um total de 80 ratos machos Wistar (300-350g) mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de 22°C, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h, recebendo água *ad libitum* e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil). A confecção das feridas foi realizada sob anestesia geral, com injeção intraperitoneal de 0,1 mL/100 g de peso de uma solução composta por 1 mL de quetamina (50 mg) e 1 mL de xilazina (20 mg). O dorso dos animais foi tricotomizado e a antissepsia foi efetuada com polvidine (PVPI). Foram então realizadas feridas cirúrgicas padronizadas com *punch* metálico de 8 mm de diâmetro. Não foi realizada sutura das feridas. Após o término do ato operatório, os animais receberam diclofenaco de potássio na dose de 10 mg/kg, por via intramuscular, com finalidade de minimizar a sintomatologia pós-operatória. Os animais foram então subdivididos nos seguintes grupos (n=20): **CTR** – feridas sem filmes ou feridas abertas; **FCOL** – feridas cobertas com filme de colágeno hidrolisado; **FAGE50** – feridas cobertas com filme de colágeno hidrolisado contendo AGE50®; **FAGE100** – feridas cobertas com filme de colágeno hidrolisado contendo AGE100®. Após 3, 7, 14 e 21 dias a partir dos procedimentos cirúrgicos, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (modelo CGSCO2G –Beiramar), onde receberam um fluxo de ar contendo 100% de CO₂, durante 10 minutos. Constatada a morte dos animais, foi realizada a remoção dos espécimes equivalentes à área cicatricial com margens de 3,0 mm. Os espécimes foram acondicionados em frascos plásticos contendo solução de formalina (formol 10%, pH 7,4) e fixados por 48 h. Previamente ao experimento foi realizado teste piloto nos animais com filmes de diferentes concentrações de AGE® no intuito de observar o surgimento de sinais de toxicidade tópica.

3.3.1 Determinação do índice de retração clínica das feridas

As feridas foram mensuradas nos dias 0 (imediatamente após a cirurgia), 3, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório (imediatamente após a eutanásia), com o auxílio de paquímetro (marca Mitutoyo, digital, precisão $\pm 0,01\text{mm}$). A partir das medidas das

bordas da ferida, padronizada na face lateral direita e borda inferior, foi obtido o valor de sua área, sendo avaliada a contração da ferida através da seguinte fórmula: (área inicial - área do dia da medida) ÷ área inicial x 100= percentual da contração no dia da medida (TEO e NAYLOR, 2002).

3.3.2 Análise histomorfológica da reação inflamatória (secções coradas em HE).

Para avaliação das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório/reparativo, foram analisadas as secções histológicas coradas em HE (dos dias 3, 7, 14 e 21) observando-se os seguintes critérios: intensidade e tipo do infiltrado inflamatório.

A intensidade do processo inflamatório foi observada e determinada de acordo com os seguintes critérios: (0) – ausência de infiltração inflamatória; (1) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituírem menos de 10% da população celular observada na área da ferida cirúrgica; (2) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituírem entre 10% a 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica. (3) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituírem mais de 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica. A tipagem da reação inflamatória foi determinada considerando-se a análise qualitativa das diferentes células inflamatórias individualmente, a saber: neutrófilos, eosinófilos (inflamação aguda), linfócitos, plasmócitos e macrófagos (inflamação crônica), identificadas pela sua morfologia específica.

3.3.3 Análise da deposição colagênica (secções coradas em picrossírius)

Foi realizada a análise descritiva dos três grupos, detendo-se na identificação do colágeno, classificação em tipo I ou III de acordo com a birrefringência apresentada, observação do aspecto morfológico das fibras (estiradas ou onduladas,

delgadas ou espessas, curtas ou longas) e disposição dos feixes (reticulares, entrelaçados ou paralelos), tanto na porção superficial quanto profunda da ferida.

3.3.4 Análise Estatística

Foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade dos dados. Os dados com distribuição normal foram analisados pelo teste de variância (ANOVA) com extensão *Post-hoc* de Tukey. Os dados que não atenderam ao pressuposto de normalidade foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com extensão *post-hoc* de Dunnet. Foi utilizado o nível de significância de 5%, de modo que as diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Caracterizações dos Filmes

4.1.1 Avaliação macroscópica dos filmes

As formulações descritas na metodologia possibilitaram a formação dos filmes poliméricos. O filme de colágeno hidrolisado (FCOL), o filme de colágeno hidrolisado contendo AGE50® (FAGE50) e o filme de colágeno hidrolisado contendo AGE100® (FAGE100), estão apresentados na **figura 9 (a, b, c)**. Os filmes produzidos com colágeno, com AGE50® e os filmes com AGE100® apresentaram-se transparentes.

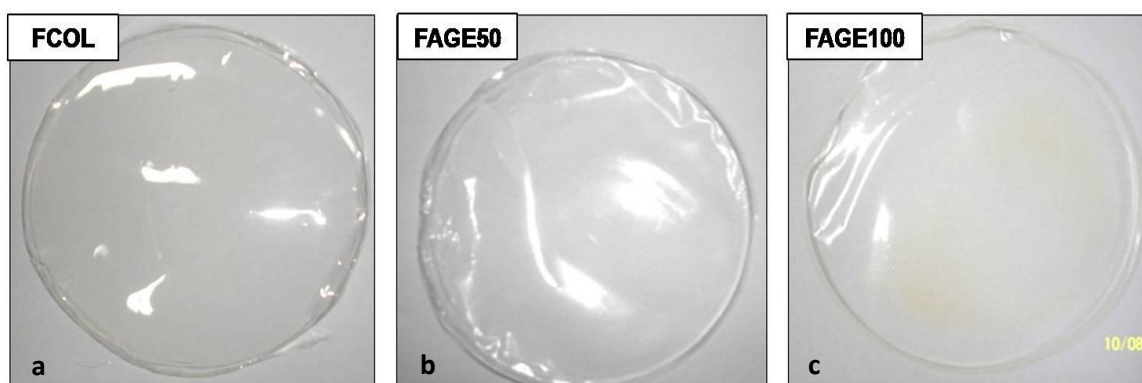


Figura 9. Filmes poliméricos produzidos a partir de colágeno hidrolisado e ácido graxo essencial. (a) FCOL, (b) FAGE50, (c) FAGE100.

As soluções filmogênicas pesquisadas produziram filmes poliméricos com continuidade, homogeneidade, manuseabilidade e formação de película contínua consideradas compatíveis ao uso seguro, conforme distribuição na **tabela 1**.

Tabela 1. Análise macroscópica dos filmes: FCOL, FAGE50 e FAGE100.

Filmes	Homogeneidade	Continuidade	Manuseabilidade	Formação de película contínua
FCOL	+++	+++	+++	+++
FAGE50	+++	+++	+++	+++
FAGE100	+++	+++	+++	+++

Excelente: +++; Boa: ++; Deficiente: +

De acordo com relatos de ROSSI et al (2010), o atendimento satisfatório às características macroscópicas dos filmes constitui um critério de extrema relevância para sua utilização como curativo dérmico. Portanto, filmes escuros, descontínuos, de difícil manuseio ou opacos teriam pouco apelo comercial. No presente estudo, os filmes FCOL, FAGE50 e FAGE100 apresentaram resultados altamente satisfatórios para os parâmetros de continuidade, homogeneidade, manuseabilidade e formação de película contínua.

4.1.2 Espessura

A espessura é um importante parâmetro para avaliar as propriedades dos filmes, através dela é possível avaliar a homogeneidade e uniformidade (RIGO, 2006). A adição de AGE50® e AGE100® aos filmes de colágeno (FCOL) resultou em aumento significativo da espessura das amostras, porém quando comparados entre si, os filmes com ácidos graxos essenciais não apresentaram diferença significativa, conforme descrito na **tabela 2**.

RIGO (2006) e FAKHOURI et al (2007) afirmam que a espessura é um parâmetro importante para avaliar a homogeneidade, para definir a uniformidade dos materiais, para a repetibilidade das medidas das propriedades e validade das comparações entre as propriedades dos filmes. RHIM e NG (2007) relatam que a maior espessura dos filmes pode interferir em suas propriedades mecânicas, particularmente a elasticidade e flexibilidade. Adicionalmente, CUQ et al (1996) em estudos sobre filmes de proteína miofibrilar, afirmaram que quanto maior a espessura dos filmes, maior será a tensão na ruptura, fato associado ao aumento das interações intermoleculares nos filmes de maior espessura, e quanto maior a tensão na ruptura, maior a resistência mecânica dos filmes.

4.1.3 Avaliação de Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas, expressas na **tabela 2**, demonstram as deformações reversíveis ou irreversíveis (Taxa de Alongamento), a rigidez do filme (Módulo Young) e a força exercida no momento da fratura (Tensão). A incorporação

de AGE® na composição dos filmes de colágeno modificou suas propriedades, aumentando significativamente sua taxa de alongamento e deformação, e reduzindo o módulo de Young ($p < 0,05$). Estes dados indicam uma maior elasticidade dos filmes de colágeno contendo AGE® (FAGE50 e FAGE100). Esta alteração nas propriedades mecânicas foram bastante satisfatórias, posto que, determinam uma maior flexibilidade dos filmes, o que é estratégico para o manuseio, transporte e armazenamento da cobertura, sem que haja deformação e ruptura, garantindo seu caráter protetor quando utilizado como curativo ou cobertura de feridas dérmicas (SCARMÍNIO, 1989; ROBERTSON, 1993). É possível que a incorporação dos ácidos graxos nas matrizes de colágeno tenha causado um rearranjo na distribuição das proteínas que compõem o polímero, alterando sua coesão e, por consequência, suas características mecânicas.

Tabela 2. Distribuição dos valores obtidos a partir da análise mecânica dos filmes de colágeno hidrolisado (FCOL) e filmes de colágeno contendo ácidos graxos essenciais (FAGE50 e FAGE100).

Grupos	Tensão (Mpa)	Alongamento (%)	Módulo de Young (Mpa)	Espessura (mm)	Deformação $\epsilon = \Delta l / l_0$
FCOL	$37,45 \pm 14,96^a$	$0,62 \pm 0,29^a$	$633,34 \pm 128,50^a$	$0,05 \pm 0,004^a$	$0,06 \pm 0,03^a$
FAGE50	$36,78 \pm 8,55^a$	$8,92 \pm 3,94^b$	$32,97 \pm 15,61^b$	$0,07 \pm 0,02^b$	$0,73 \pm 0,49^b$
FAGE100	$28,83 \pm 9,93^a$	$9,96 \pm 5,85^b$	$44,34 \pm 27,28^b$	$0,07 \pm 0,01^b$	$0,63 \pm 0,45^b$
P value (Anova)	$p=0,107$	$P=0,0001$	$P=0,0001$	$p=0,001$	$p=0,006$

Letras diferentes na mesma coluna representam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4.1.4 Análise microscópica: microscopia óptica

A morfologia e a superfície dos filmes produzidos foram observadas no microscópio óptico. A **figura 10** mostra as micrografias correspondentes ao filme de colágeno hidrolisado (FCOL), ao FAGE50 e ao FAGE100, respectivamente. Ambos os filmes contendo ácidos graxos essenciais exibiram características superficiais satisfatórias, com aspecto homogêneo, contínuo, sem granulações. Estes dados parecem sugerir que houve uma boa incorporação dos AGEs®, sem formação de partículas insolúveis.



Figura 10: Fotomicrografias dos filmes de colágeno hidrolisado (FCOL), FAGE50 e FAGE100. Observar película contínua, homogênea e sem evidências de partículas insolúveis (400x).

4.2 Ensaio Biológico de Cicatrização

4.2.1 Índice de Retração da Ferida (IRF)

A análise das características macroscópicas das feridas ao longo do período experimental (**figura 11**) não mostrou sinais de exsudação purulenta (abscesso) nas fases inflamatórias do reparo (3 e 7 dias), nem de formação de cicatrizes hipertróficas ou atróficas nas fases finais (14 e 21 dias). Estes dados sugerem que o curso do reparo ocorreu sem intercorrências durante o experimento.

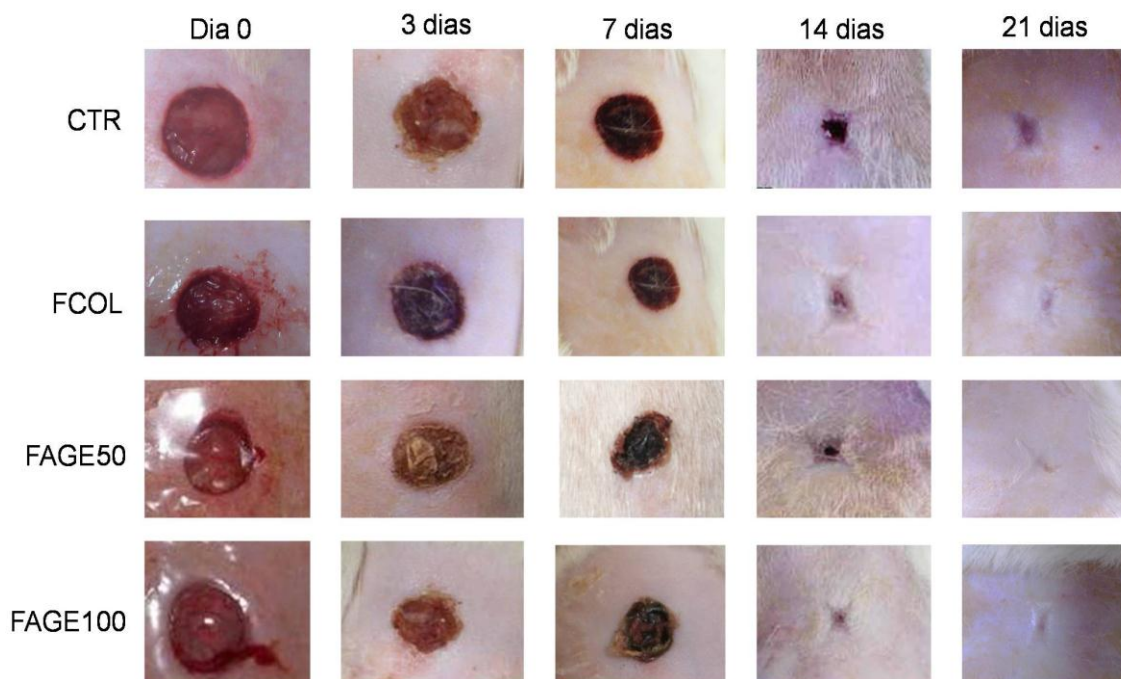


Figura 11. Características macroscópicas das feridas dos diferentes grupos estudados ao longo do período experimental.

Conforme demonstrado na **figura 12**, não foi observada diferença significativa no IRF dos grupos em 3 dias ($p > 0,05$). Em 7 dias, o IRF dos filmes FAGE50 foi significativamente mais elevado do que o CTR ($p < 0,01$), enquanto que em 14 dias, tanto o filme FAGE50 e FAGE100 mostraram um aumento significativo do IRF comparado ao CTR ($p < 0,001$ e $0,001$) e FCOL ($0,001$ e $0,01$). Em 21 dias, todos os grupos apresentaram retração completa das feridas.

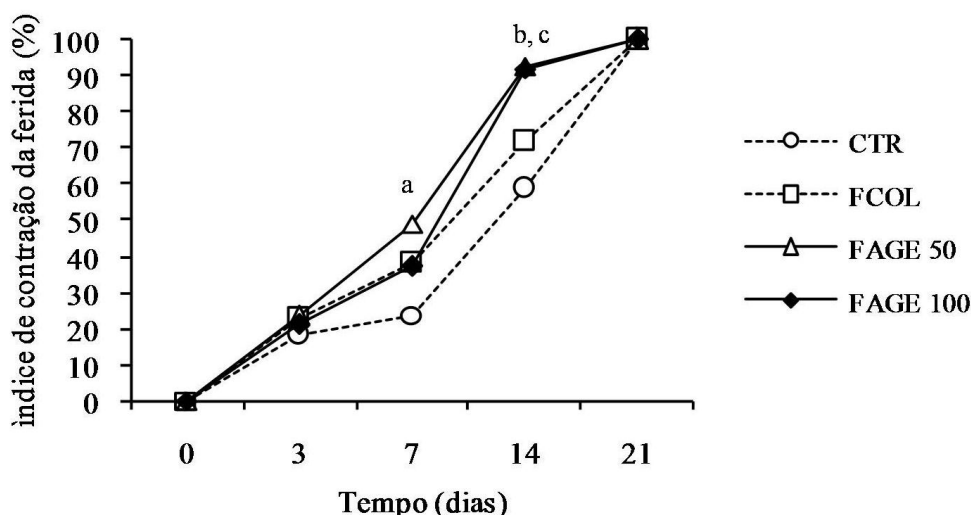


Figura 12. Avaliação das taxas de retração das feridas (IRF) ao longo do tempo em sequência.

- (a) FAGE50 é significativamente diferente do CTR ($p < 0,01$).
- (b) FAGE50 é significativamente diferente do CTR ($p < 0,001$) e FCOL ($P < 0,001$).
- (c) FAGE100 é significativamente diferente do CTR ($p < 0,001$) e FCOL ($P < 0,01$).

Os maiores índices de contração da ferida observados em FAGE50 e FAGE100 sugerem que a presença de ácidos graxos essenciais melhorou significativamente a dinâmica do reparo. Já está bem estabelecido que a contração da ferida é um fenômeno intimamente relacionado com a diferenciação miofibroblástica. Esta é uma alteração fenotípica sofrida por fibroblastos, que adquirem fenótipo contrátil em resposta a ação do fator de crescimento transformador beta (TGF- β), uma citocina liberada por leucócitos mononucleares (linfócitos e macrófagos/histiócitos) na área lesada (THANNICKAL et al., 2003). Uma vez que tem sido relatado que ácidos graxos estimulam a síntese de TGF- β , e induzem a expressão de antígenos contráteis (α actina de músculo liso) em fibroblastos, diferenciando-os em miofibroblastos (MISHRA, SIMONSON, 2008), é possível especular que os índices aumentados de contração da ferida poderiam estar associados com uma liberação aumentada de TGF- β induzida pelos ácidos graxos dos filmes FAGE50 e FAGE100. Deve ser destacado que a inexistência de

diferença significativa em 3 dias parece dar suporte a esta teoria, já que o infiltrado inflamatório neste período é neutrofílico (polimorfonuclear) e não linfo-histiocitário (mononuclear). Adicionalmente, em 21 dias já seria esperada uma redução importante da população de miofibroblastos, provavelmente induzida por apoptose (Ribeiro et al., 2009), o que justifica a falta de diferença significativa entre os grupos nesta etapa final do experimento.

4.2.2 Análise Histológica

Em 3 dias (**figura 13a-d**), todos os grupos apresentaram exsudação plasmática intensa, associada à infiltração marcada de neutrófilos polimorfonucleares. Edema intersticial era notável na base das feridas, enquanto uma neoformação vascular suave foi evidenciada nas áreas marginais. Em 7 dias (**figura 13e-h**), CTR, FCOL e FAGE100 apresentaram tecido de granulação imaturo, com formação de numerosos vasos capilares irregulares e infiltração intensa de linfócitos e histiócitos. Em FAGE50, o tecido de granulação apareceu mais maduro, com proliferação fibroblástica notável, bem como a deposição de fibrilas de colágeno arranjadas paralelamente. O processo de recuperação de epitelização foi inferior a 30% da área da ferida em todos os grupos.

Em 14 dias (**figura 13i-l**), a epitelização completa foi observada em 100% dos FAGE50 e FAGE100. Além disso, rudimentos de apêndices cutâneos foram observados a partir da linha de brotamento do epitélio, particularmente nas margens das feridas. Ambos os grupos tratados com AGE® exibiram tecido epidérmico maduro, com camada granulosa bem desenvolvida e queratinização abundante. A cicatriz primária foi bem desenvolvida, com proliferação fibroblástica intensa, e tecido de granulação residual leve. Em 21 (**figura 13m-t**) dias, houve epitelização completa em todos os grupos, embora os anexos cutâneos tenham sido observados somente em FAGE50 e FAGE100. O tecido conjuntivo foi intensamente fibrótico, com ausência de infiltrado inflamatório em todos os grupos.

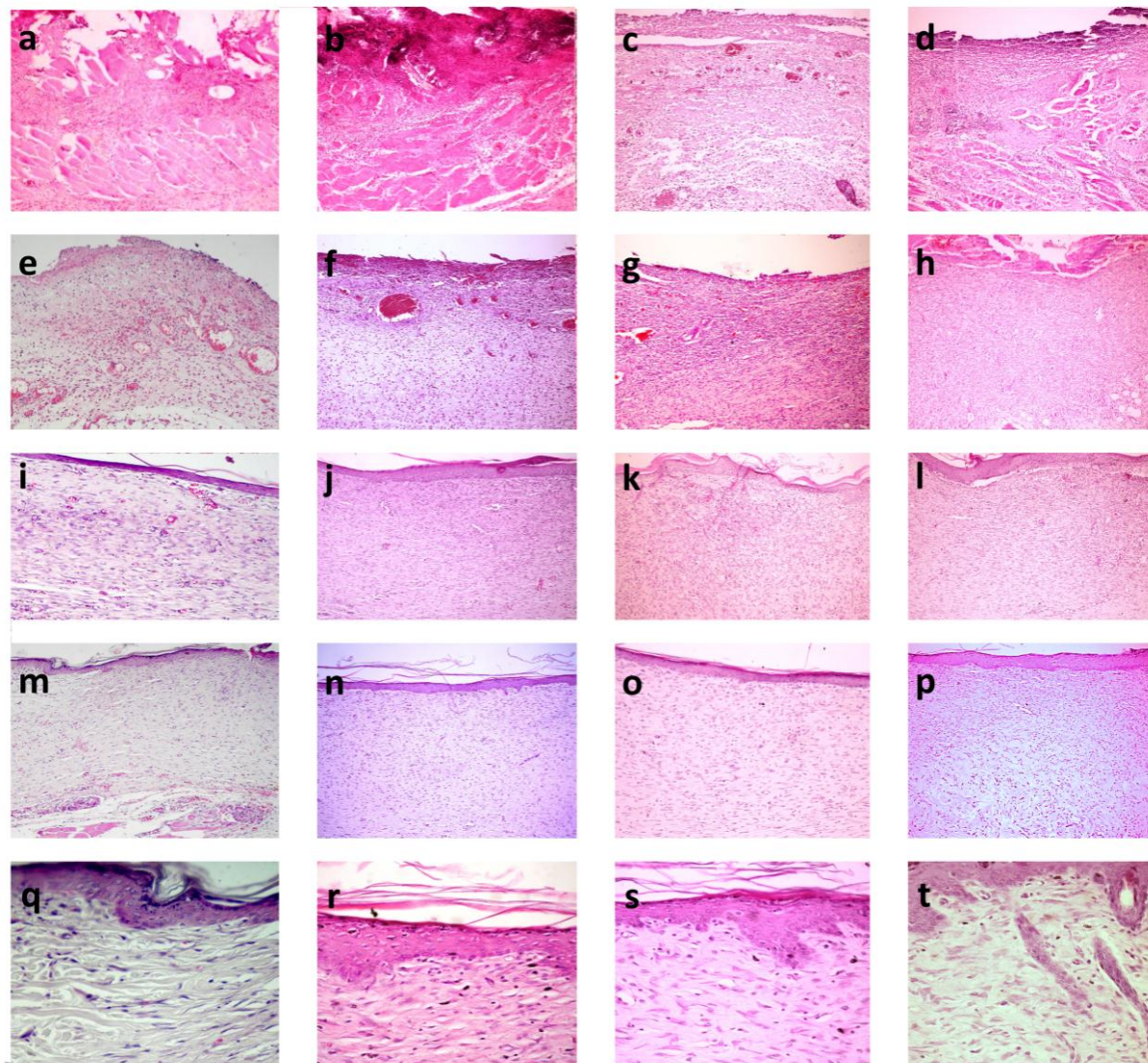


Figura 13. Secções histológicas coradas em HE dos grupos CTR (a/e/i/m/q), FCOL (b/f/j/n/r), FAGE50 (c/g/k/o/s) e FAGE100 (d/h/l/p/t). (a-d) fase inflamatória do reparo em 3 dias, (e-h) formação da reação de granulação em 7 dias, (i-l) desenvolvimento da cicatriz primária em 14 dias, (m-p) cicatriz fibrosa bem desenvolvida em 21 dias nos grupos experimentais (100x). (q-t) características do epitélio de revestimento dérmico, com formação de anexos cutâneos ora rudimentares ora bem diferenciados apenas em FAGE50 e FAGE100 em 21 dias (400x).

Os achados morfológicos observados nas fases iniciais do experimento (3 e 7 dias) sugerem uma aceleração dos eventos biológicos que caracterizam o processo de reparo, particularmente no componente fusocelular, compatível com fibroblastos, nos animais tratados com FAGE50. Recentemente, MAGDALEON et al (2011) demonstraram que o tratamento com ácido oléico, linoléico e palmítico induzem proliferação fibroblástica *in vitro*. Os elevados teores de ácido oléico e linoléico que

constituem o AGE® poderiam, portanto, justificar o amadurecimento fibroblástico precoce da reação de granulação. Além disso, ácidos graxos insaturados, como ácido oléico, parecem exercer atividade antiinflamatória por modular a adesão leucócito-endotélio (IBRAHIM et al., 2011). Este fenômeno poderia reduzir a magnitude da fase inflamatória aguda e, por consequência acelerar a instalação e desenvolvimento da reação de granulação.

Os achados morfológicos nas fases finais do experimento (14 e 21 dias) sugerem fortemente uma ação modulatória dos AGEs® sobre a proliferação de ceratinócitos dérmicos. Têm sido demonstrado, que os ceratinócitos dérmicos utilizam AGEs para síntese de corpos lamelares, estruturas importantes para formação das membranas lipídicas (FEINGOLD et al., 1991). Por outro lado, a inibição experimental da biossíntese de AGEs bloqueia a formação dos corpos lamelares, retardando o fenômeno de corneificação e maturidade de tecidos dérmicos (SCHMUTH et al., 2000). Adicionalmente, SCHMUTH et al (2005) demonstraram a expressão diferenciada de proteínas transportadoras de ácidos graxos (PTAC) durante o desenvolvimento da epiderme e anexos dérmicos, sugerindo a participação ativa destes compostos na formação e amadurecimento destas estruturas epiteliais. Neste sentido, é possível especular que a disponibilização adicional de AGEs, promovida pelos filmes FAGE50 e FAGE100, poderia ter levado a um aumento no metabolismo dos ceratinócitos, resultando em formação mais rápida de um revestimento epidérmico corneificado maduro e desenvolvimento precoce de anexos dérmicos. Contudo, outras investigações se fazem necessárias, analisando o padrão de expressão de PTACs em tecidos epiteliais durante o processo de reparo, a fim de investigar os mecanismos associados ao aumento do metabolismo de ceratinócitos em resposta a oferta local de AGEs.

Conforme pode ser demonstrado na **figura 14**, a intensidade da reação inflamatória decresceu ao longo do tempo experimental. Em 3 dias, FAGE50 e FAGE100 exibiram escores médios mais altos de infiltração inflamatória (representada, nesta etapa, por neutrófilos) em comparação com CTR ($p < 0,01$), enquanto que em 14 dias, o infiltrado inflamatório (desta feita, constituído de linfócitos e ocasionais histiócitos) se mostrou significativamente reduzido nestes grupos ($p < 0,05$). Não foi observada diferença entre os grupos nos períodos de 7 e 21 dias ($p > 0,05$).

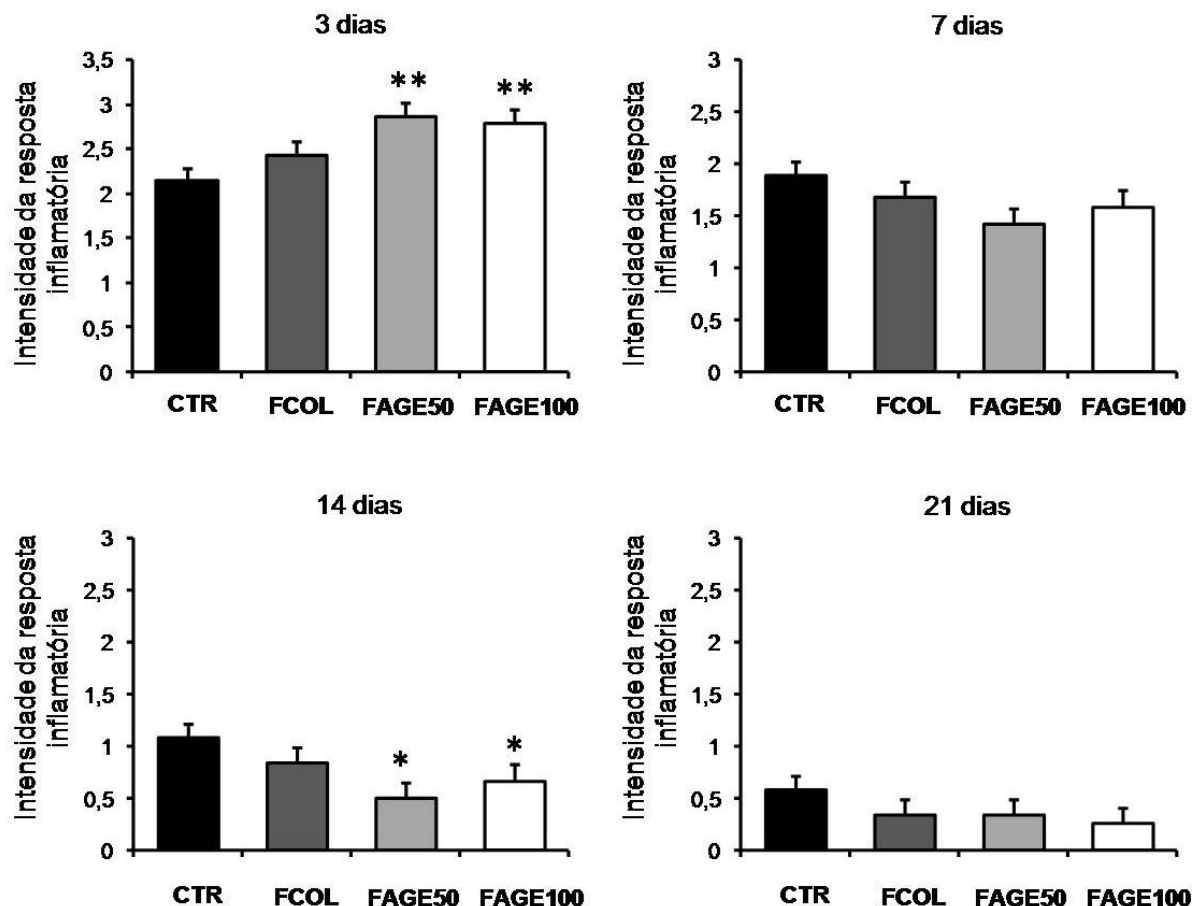


Figura 14. Análise semiquantitativa dos escores médios (média $\pm$ desvio padrão) da intensidade da reação inflamatória ao longo do período experimental nos grupos estudados.

* Significativamente diferente de CTR ($p < 0,05$).

** Significativamente diferente de CTR ($p < 0,01$).

Os dados observados em três dias sugerem que os ácidos graxos presentes nos filmes aumentaram significativamente o influxo local de neutrófilos durante a fase aguda do reparo. Achados similares foram descritos por Pereira et al (2008), que creditaram este aumento de polimorfonucleares a uma ação estimulatória dos ácidos graxos oléico e linoléico sobre a expressão de moléculas de adesão vâsculo-endoteliais (VEGF) em neutrófilos, potencializando a adesão leucocitária ao endotélio, bem como à liberação aumentada de um potente quimiotático, a CINC-2 α/β (do inglês, neutrophil chemoattractant 2 alpha/beta) durante a resposta inflamatória. Por outro lado, foi recentemente relatado que o ácido oléico regula negativamente a reação inflamatória de longa-duração (CARRILLI et al., 2012), tendo sido sugerido que este efeito poderia ser determinado por apoptose de

linfócitos T em resposta a exposição ao ácido graxo. A menor infiltração de linfócitos em FAGE50 e FAGE100 observada já em 14 dias parece ratificar esta teoria. Desta forma, é possível sugerir que a presença de ácidos graxos nos filmes utilizados no presente estudo poderia ter acelerado o curso da resposta inflamatória.

4.2.3 Análise morfológica de colagenização

Em 3 dias (**figura 15**), estruturas fibrilares extremamente delicadas esverdeadas ou amarelo-esverdeado (colagénio tipo III) com dimensões variadas e disposições reticulares foram observadas em todos os grupos. Em 7 dias (**figura 15**), as fibras de colágeno tipo III estavam mais espessas e mais densas, dispostas em um arranjo reticular no CTR e FCOL, e dispostas paralelamente em FAGE50 e FAGE100. Em 14 dias (**figura 15**), houve substituição de fibras de colágeno do tipo III para tipo I, as quais eram curtas, finas, delicadas e irregularmente dispostas no CTR, mas mais longas e dispostas em uma disposição paralela no FCOL, FAGE50 e FAGE100. Em 21 dias (**figura 15**), todos os grupos apresentaram fibras de colágeno tipo I grosseiramente entrelaçadas.

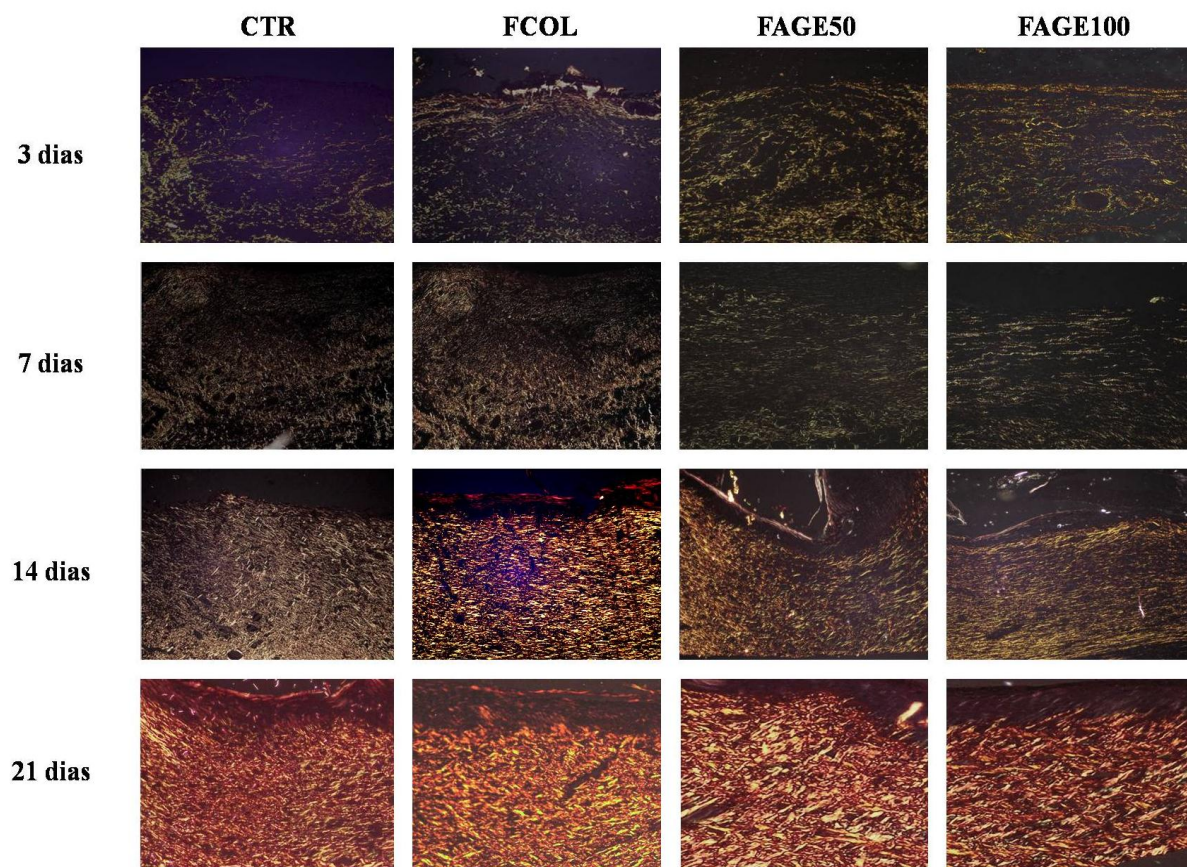


Figura 15: Deposição de colágeno nos grupos experimentais durante o tempo de curso do estudo. Em três e sete dias, houve uma predominância de finas e delicadas fibrilas de colágeno III (birrefringência esverdeada), enquanto que em 14 dias estas fibras foram substituídas por fibras mais grossas e fibras de colágeno do tipo I. Em 21 dias, todos os grupos apresentaram fibras de colágeno tipo I grosseiramente entrelaçadas (Sirius Red/ Luz Polarizada, aumento de 400x).

A análise da deposição de colágeno ao longo do processo de reparo parece corroborar a hipótese de um provável efeito estimulatório dos AGEs veiculados nos filmes sobre os fibroblastos, conforme previamente relatado por Magdaleon et al (2011). No entanto, é importante destacar que, no presente estudo, o efeito modulatório pareceu estar mais relacionado com um aprimoramento da atividade fibroblástica, tanto de síntese como de degradação do colágeno depositado, determinando uma aceleração na remodelação da cicatriz colagênica sem produzir uma excessiva síntese de fibras colágenas (cicatriz hipertrófica).

Em forma global, os dados obtidos neste estudo sugerem que a incorporação de ácidos graxos essenciais à matrizes de colágeno promovem aceleração do processo de reparo, e que estes efeitos estimulatórios parecem estar associados a uma provável atividade bioestimulatória sobre ceratinócitos e fibroblastos. Desta forma, os filmes FAGE50 e FAGE100 parecem representar excelentes biomateriais com potencial aplicação na indústria farmacêutica, como curativos de feridas abertas ou substitutos dérmicos temporários. No entanto, estudos posteriores ainda são demandados a fim de investigar os mecanismos fisiopatológicos, bioquímicos e/ou moleculares associados ao efeito pró-cicatrizante dos filmes desenvolvidos no presente estudo.

V – CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste estudo, foi possível concluir que:

- Os filmes FAGE50 e FAGE100, nas formulações selecionadas, exibiram características macroscópicas satisfatórias para uso como coberturas de feridas dérmicas.
- A incorporação dos ácidos graxos essenciais melhorou as propriedades mecânicas dos filmes, aumentando a elasticidade e flexibilidades dos mesmos, comparado aos filmes produzidos apenas com colágeno.
- Os filmes FAGE50 e FAGE100 se mostraram capazes de modular eventos biológicos associados ao processo de reparo cicatricial em roedores, incrementando a resposta fibroblástica/colagênica e acelerando a maturação epidérmica, bem como a neoformação de anexos dérmicos.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADEWUMI, A. A.; OGUNJINMI, A. A. **The healing potential of honey and propolis lotion on septic wounds.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Vol. 1, p. 55-57, 2011.
2. ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; BARRETO, S. A. L.; PIRES, A. J.; REIS, P. F.; LIMA, O. S.; RIBEIRO, G. M. A. & CARDOSO, C. J. **Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model.** International Journal of Morphology. 27(4): p. 1105-1110, 2009.
3. BATISTA, J. A.; TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. **Efeito da adição de ácidos graxos em filmes à base de pectina.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Vol. 25, n. 4, p. 781-788. Campinas, SP, Brasil, 2005.
4. BORSCHIVER, S.; ALMEIDA, L. F. M.; ROITMAN, T. **Monitoramento Tecnológico e Mercadológico de Biopolímeros.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, Vol. 18, n. 3, p. 256-261. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2008.
5. CAMARGO, M. P. L. O. S. **Estudo Combinado do Ultra-som de Baixa Intensidade e da Papaína na Cicatrização de Úlcera por Pressão no Atendimento Domiciliar.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2006.
6. CARNEIRO, C. M.; SOUZA, B. F.; GAMA, F. M. **Tratamento de feridas: assistência de enfermagem nas unidades de atenção primária à saúde.** Revista Enfermagem Integrada, Vol. 3, n. 2. Centro Universitário do Leste de Minas Gerais, 2010.
7. CARRILLO C.; CAVIA M.; ALONSO-TORRE S. **Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review.** Nutr. Hosp. 27(4):978-990, 2012.
8. COFFIN, D. R.; FISHMAN, M. **Physical and mechanical properties of highly plasticized pectin/starch films.** Journal of Applied Polymer Science, v.54, n.9, p.1311-1320, 1994.
9. COLLINS, N; SULEWSKI, C. **Omega-3 Fatty Acids and Wound Healing.** Ostomy wound management, 411 (1), p. 10-13, 2011.
10. CORRÊA, S. J. P. **Utilização de filmes de pectina contendo extrato de própolis vermelha para recobrimento de sementes de girassol.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente/UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2011.
11. COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. Robbins e Cotran, **Patologia: Bases Patológicas das Doenças.** 8ª.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 102 p., 2010.

12. COUTINHO, F. M. B.; MELLO, I. L.; MARIA, L. C. de S. **Polietileno: Principais Tipos, Propriedades e Aplicações**. Polímeros: Ciência e Tecnologia, Vol. 13, n. 1, p. 1-13, 2003.
13. CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. **Functional properties of myofibrillar protein based biopackaging as affected by film thickness**. Journal of Food Science, Vol. 61, n. 3, p. 580-584, 1996.
14. DANTAS, M. D. M.; CAVALCANTE, D. R. R.; ARAUJO, F. E. N.; BARRETTO, S. R.; ACIOLE, G. T. S.; PINHEIRO, A. L. B.; RIBEIRO, M. A. G.; LIMA-VERDE, I. B.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. **Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy**. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Vol. 105, p. 51-59, 2011.
15. E'GUES, A. M. M. **Compósito de Colágeno com Silicato e Hidroxiapatita como Material para endodontia**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2005.
16. FAKHOURI, F. M.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. **Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, V. 27, n. 2, p. 369-375. Campinas, SP, 2007.
17. FEINGOLD, K. R. **The regulation and role of epidermal lipid synthesis**. Adv. Lipid Res, v. 24, p. 57–82, 1991.
18. FERREIRA, A. M.; SOUZA, B. M. V.; RIGOTTI, M. A.; LOUREIRO, M. R. D. **Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional**. Revista da Escola de Enfermagem da USP, 46 (3), p. 752-760, 2012.
19. FRÉ, N. C. **Obtenção de Ácidos Graxos a partir da Acidulação de Borra de Neutralização de Óleo de Soja**. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil, 2009.
20. GALDINO, A. P. G.; DIAS, K. M.; CAIXETA, A. **Análise comparativa do efeito da corrente microgalvânica: estudo de caso no tratamento de estrias atróficas**. Revista Eletrônica “Saúde CESUC”, Vol 1, n. 1, p. 1-10, 2010.
21. GENOTOX-ROYAL; ROYAL- TOXICOLOGIA; TECPON-INDÚSTRIA e COMÉRCIO de PRODUTOS. **Desenvolvimento de Produto para Tratamento da Úlcera de Pressão e Condições Relacionadas, Baseado em Ésteres de Ácidos Graxos Essenciais**. Disponível em: <<http://www.institutoroyal.org.br/publicacoes.htm>>. Acesso em 10 de Agosto de 2011.
22. GOMES, F. V. L.; COSTA, M. R.; Mariano, L. A. A. **Avaliação e Tratamento de Feridas**. 3ª Revisão. Manual de Curativos. Comissão de Controle de Infecção Hospitalar Universidade Católica de Goiás, 2005.

23. GOMES, M. A. B. **Ácidos Graxos Essenciais (AAL) Ácido α Linolênico 18:3(n-3), (EPA) Ácido Eicosapentaenóico 20:5(n-3) e (DHA) Ácido Docosaheptaenóico 22:6(n-3)**. PPZ - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, Maringá, PR, Brasil, 2008.
24. GORDON, K. A.; LEBRUN, E. A.; TOMIC, C. M.; KIRSNER, R. S. **The Role of Surgical Debridement in Healing of Diabetic Foot Ulcers**. Department of Dermatology, Vol. 1, p. 24-26. University from Miami, USA, 2010.
25. GROAH, S. L.; LIBIN, A.; SPUNGEN, M.; NGUYEN, K. L.; WOODS, E.; NABILI, M.; RAMELLA-ROMAN, J.; BARRITAU, D. **Regenerating matrix-based therapy for chronic wound healing: a prospective within-subject pilot study**. International Wound Journal. Vol 10, p. 1-11, 2010.
26. HATANAKA, E.; CURI, R. **Ácidos Graxos e Cicatrização: Artigo de Revisão**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Vol 88, nº 2, p. 53-58. Departamento de Fisiologia e Biofísica Instituto de Ciências Biomédicas, USP. 2007.
27. IBRAHIM, A.; MBODJI, K.; HASSAN, A.; AZIZ, M.; BOUKHETTALA, N.; COEFFIER, M.; SAVOYE, G.; DÉCHELOTTE, P.; MARION-LETELLIER, R. **Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium**. Clinical Nutrition Journal. Vol 30, p. 678-687, 2011.
28. KUHNEN, A. P.; SILVA, F. L. **Efeitos Fisiológicos do Ultra-Som Terapêutico no Tratamento do Fibro-Edema Gelóide**. Universidade do Vale do Itajaí, UNIVALI. Florianópolis, SC, 2010.
29. LESSA, L. B. S.; SILVA, M. N.; DINIZ, J.; HERRERA, S. D. S. C. **A drenagem linfática manual no tratamento do fibro edema gelóide: uma revisão literária**. Revista Cereus, Vol 1, n. 6, p. 1-12, 2012.
30. LIEBERMAN, E. R.; GILBERT, S. G. **Gas permeation of collagen films as affected by cross-linkage, moisture, and plasticizer content**. Journal of Polymer Science: Polymer Symposia, Vol. 41, n. 1, p. 33-43, 2007.
31. LIMOVÁ, M. **Active Wound Coverings: Bioengineered Skin and Dermal Substitutes**. Scientific article. Department of Dermatology, 90(6). p. 1237-1255 University of California, San Francisco, USA, 2010.
32. MACIEL, A. C.; CASTRO, T. F. de; PAZINATO, F.; PADILHA, F. F.; MARTINS, C. F. **Uso de Biofilme de Colágeno Hidrolisado Associados ao Ultrassom Terapêutico na Reparação Tecidual de Lesões Lacerativas em Membros de Equinos**. In: XII ENPOS, II Amostra Científica Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil, 2010.
33. MAGDALEON, J.; HATANAKA, E.; ROMANATTO, T.; RODRIGUES, H. G.; KUWABARA, W. M. T.; SCAIFE, C.; NEWSHOLME, P.; CURI, R. **A proteomic analysis of the functional effects of fatty acids in NIH 3T3 fibroblasts**. Lipids in Health and Disease Journal, V. 10, p. 218, 2011.

34. MAIA, A. M. S. **Risco das infecções cirúrgicas segundo o potencial de contaminação das feridas operatórias.** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil, 2006.
35. MAIA, L. H.; PORTE, A.; SOUZA, V. F. de. **Filmes comestíveis: aspectos gerais, propriedades de barreira à umidade e o oxigênio.** Boletim do CEPPEA, Curitiba, v.18, n.1, 2000.
36. MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. **Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização.** Seminário: Ciências Agrárias, Londrina, V. 31, n. 1, p. 137-156, 2010.
37. MANDELBUM, H. S.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBUM, M. H. **Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II.** In: Anais Brasileiros de Dermatologia Vol. 78, n.4, p. 393-408, 2003.
38. MELO, J. U. S.; SANTOS, J. M. V.; KIMURA, O. S.; CAMPOS, M. M.; MELO, J. R. B.; VASCONCELOS, P. R. L. **Efeitos dos Ácidos Graxos sobre a Regeneração Hepática em Ratos.** Laboratório de Cirurgia Experimental, Faculdade de Medicina da UFC, Vol. 37, n. 5, p. 351-357, Fortaleza, CE, 2010.
39. MISHRA, R.; SIMONSON, M. S. **Oleate Induces a Myofibroblast-Like Phenotype in Mesangial Cells.** Arteriosclerosis Thrombosis, and Vascular Biology, v. 28, p. 541-547, 2008.
40. MONTERREY, E. S.; SOBRAL, P. J. **Caracterização de propriedades mecânicas e ópticas de biofilmes a base de proteínas miofibrilares de tilápia do Nilo usando uma metodologia de superfície-resposta.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. Vol. 19, n. 2, p. 294-301, 1999.
41. MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. A. **Preparo e Caracterização de Proteínas Miofibrilares de Tilápia-Do-Nilo para Elaboração de Biofilmes.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.35, nº.1, p.179-189, Brasília, 2000.
42. MORAIS, G. F. da C. M.; OLIVEIRA, S. H. dos S.; SOARES, M. J. G. O. **Nurse Wound Evaluations in Public Hospital Institutions.** Revista Texto e Contexto-Enfermagem. Vol. 17, nº 1, Florianópolis, jan./mar, 2008.
43. MORE, L. F.; ARRUDA, S. S. **Protocolo de Cuidados de feridas.** Manual da Secretaria Municipal de Saúde de Florianópolis. Vol. 1, p. 32-43, 2008.
44. NUNES, S. P.; ALBUQUERQUE-JR, R. L. C.; CAVALCANTE, D. R. R.; DANTAS, D. M. M.; CARDOSO, C. J.; Bezerra, M. S.; SOUZA, C. C. J.; SERAFINI, M. R.; QUITANS-JR, L.J.; BONJARDIM, R. L.; ARAUJO, A. S. A. **Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing.** Journal of Biomedicine and Biotechnology. Vol. 2011, ID 761593, p. 1-9, 2010.
45. OKEN, O. F.; YILDIRIM, A. O.; GULCEK, M.; UNAL, V. S.; KARAKUYU, A.; OZLU, K.; UCANET, A. **The effect of prophylactic dose of a low molecular weight heparin on skin wound healing of rats.** Acta Cirúrgica Brasileira. Vol. 24, n. 6, 2009.

46. OLIVEIRA, C. S.; GARDEN, L.; RIBEIRO, M. C. O. **Utilização de filmes comestíveis em alimentos.** Série em Ciência e Tecnologia de Alimentos: Desenvolvimento em Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Ponta Grossa, Brasil, 2007.
47. OLIVEIRA, C. S.; NASCIMENTO, M.; JUNIOR, E. A.; CRUSOE, M.; BAHIA, P.; ROSA, F. P. **Avanços e Aplicações da Bioengenharia Tecidual.** Revista de Ciências Médicas e Biológicas. Universidade Federal da Bahia. Vol.9, n.1, p. 28-36, 2010.
48. OLIVEIRA, L. M. **Ensaio para avaliação de embalagens plásticas flexíveis.** Campinas: Centro de Tecnologia de Embalagem, CETEA, p. 219, 1996.
49. OLIVEIRA, M. A.; CEREDA, M. P. **Pós-colheita de pêssegos (*Prunus pérsica* L.Bastsch) revestidos com filmes a base de amido como alternativa à cera comercial.** Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, v.23, supl, p.28-33. Dez. 2006.
50. PEREIRA L. M.; HATANAKA E.; MARTINS E. F.; OLIVEIRA F.; LIBERTI E. A.; FARSKY S. H.; CURI R.; PITHON-CURI T. C. **Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats.** Cell Biochem Funct. Mar-Apr; 26(2):p. 197-204, 2008.
51. PETROIANU, A. **Síntese de grandes feridas da parede corpórea com tira elástica de borracha.** Revista Brasileira de Cirurgia Digestiva, Vol. 23, n. 1, p. 16-18, 2010.
52. REIS, R. C.; DEVILLA, I. A.; CORRÊA, P. C.; ASCHERI, D. P. R.; SÉRVULO, A. C. O. **Propriedades Mecânicas de Filme Biodegradável de Fécula de Inhame e Glicerol.** In: Anais do IX seminário de iniciação científica. Universidade Estadual de Goiás. 2011
53. RHIM, J. W.; NG, P. K. W. **Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition. v. 47, n. 4, p. 411-433. Boca Raton, 2007.
54. RIBEIRO, M. A. G.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; RAMALHO, L. M. P.; PINHEIRO, A. L. B.; BONJARDIM, L. R.; CUNHA, S. S. **Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660 nm.** Photomedicine and Laser Surgery. Vol. 27, n. 1, p. 49-55, 2009.
55. RIGO, N. L. **Desenvolvimento e Caracterização de Filmes Comestíveis.** Dissertação de Mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto do Uruguai e das Missões-URI. RS, Brasil, 2006.
56. ROBERTSON, G. L. **Optical and mechanical properties of thermoplastic polymers.** In: Food Packaging: Principles and Practice, New York: Marcel Dekker, p.63-107, 1993.

57. RODAS, D. C. A. **Desenvolvimento de Membranas como Compostos Dermo-epidérmicos**. Tese de Doutorado; Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. SP, Brasil, 2004.
58. RODRIGUES, J. M. da C.; VANIN, G. De M.; NASI, L. A. **O perfil fonoaudiológico do paciente portador de queimaduras de cabeça e pescoço internado no hospital de pronto socorro de Porto Alegre/RS**. Revista Brasileira de Queimaduras. Vol. 9, nº 1, p. 14-20, jan./fev./mar, 2010.
59. ROSSI, L. A.; MENEZES, M. A. J.; GONÇALVES, N.; SILVA, C. L. C; FARINA-JUNIOR, J. A.; STUCHI, R. A. G. **Cuidados locais com as feridas das queimaduras**. Revista Brasileira de Queimaduras, Vol. 9, n. 2, p. 54-59. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, 2010.
60. RUSTAN, A. C.; DREVON, C. A. **Fatty Acids: Structures and Properties**. Wiley online Library, Encyclopedia of Life Sciences. Vol. 1, p. 1-7. University of Oslo, Oslo, Norway, 2005.
61. SANT'ANA, S. M. S. C. **Úlceras venosas: caracterização e tratamento em usuários atendidos nas salas de curativos da Rede municipal de Saúde de Goiânia-GO**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil, 2011.
62. SANTOS, V. P. **Elaboração, Aditivção e Caracterização de Biofilmes à Base de Fécula de Mandioca**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, SP, 2004.
63. SARKER, B; DEY, K; KHAN, R. A. **Effect of Incorporation of Polypropylene on the Physico-Mechanical and Thermo-Mechanical Properties of Gelatin Fiber Based Linear Low Density Polyethylene Bio-foamed Composite**. Journal of Thermoplastic Composite Materials, Vol. 24, n. 5, p. 679-694, 2011.
64. SCARMÍNIO, J. **Propriedades Mecânicas em filmes de Nb/Pd**. Tese de Doutorado, Unicamp, São Palo, SP, Brasil, 1989.
65. SCHMUTH, M; MAN, M. Q; WEBER, F. **Permeability barrier disorder in Niemann Pick disease: Sphingomyelin-ceramide processing required for normal barrier homeostasis**. J Invest Dermatol. v. 115: p. 459–466, 2000.
66. SCHMUTH, M; NEYER, S; RAINER, C; GRASSEGER, A; FRITSCH, P; ROMANI, N; HEUFLER, C. **Expression of the C-C chemokine MIP-3 alpha/CCL20 in human epidermis with impaired permeability barrier function**. Journal Exp. Dermatol, v. 11, p. 135-142. 2005.
67. SHIMAZU, A. A; MALI, S; GROSSMANN, M. V. E. **Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca**. Ciências de Alimentos, v. 28, n. 1, p. 79-88. Ciências Agrárias, Londrina, PR. 2007.
68. SILVA, R. M; PERES, R. R; BRUM, C. N. **The Brazilian Scientific Production of Nursing Care to Patients with Pressure Ulcers**. Revista de Enfermagem da

UFSM, Departamento de Enfermagem da Universidade Federal de Santa Maria, Vol. 2, p. 246-253. 2011.

69. SILVA, R. S. G.; BANDEIRA, S. F.; PETRY, F. C.; PINTO, L. A. A. **Extração de gelatina a partir das peles de cabeças de carpa comum**. Revista Ciência Rural. Vol. 41, n. 5, p. 904-909. Universidade Federal do Rio Grande, RS, 2011.
70. SIMAS, S. M. **O Tratamento de Feridas Cutâneas em Cães e Gatos**. Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil, 2010.
71. SOUZA, S. R. P.; BORGES, J. C. A.; PAULO, P. A. F.; JUNIOR, R. F. A. **Uma perspectiva mundial do carcinoma de células escamosas de pele**. Revista Ciências Médicas Biológicas. Vol. 8, n. 1, p. 91-97. Departamento de Morfologia, Universidade do Rio Grande do Norte, 2009.
72. SRIAMORNSAK, P.; KENNEDY, R. A. **Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating**. International Journal of Pharmaceutics, 358, p.205-213, 2008.
73. TAZIMA, M. de F. G S.; VICENTE, Y. A. de M. V. de A.; MORIYA, T. **Biologia da ferida e Cicatrização**. In: Simpósio: Fundamentos em Clínica Cirúrgica. Medicina Ribeirão Preto, 2008.
74. TEO, T. C.; NAYLOR, I. L. **Modifications to the rate of wound contraction by allopurinol**. British Journal of Plastic Surgery, v.48, n. 4, p. 198, 2002.
75. THANNICKAL V. J.; LEE D. Y.; WHITE E. S.; CUI Z.; LARIOS J. M.; CHACON R.; HOROWITZ J. C.; DAY R. M.; THOMAS P. E. **Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase**. J Biol Chem. Apr 4; 278(14): 12384-9, 2003.
76. TOCCO, I.; ZAVAN, B.; BASSETO, F.; VINDIGNIL, V. **Nanotechnology-based therapies for skin wound regeneration**. Journal of Nanomaterials. Vol. 1, p. 1-11, 2012.
77. TODERKE, L. E.; FILHO, O. G.; BARETA, D. G.; SAKAMOTO, D. G.; AGULHAM, M. A.; TAMBARA, E. M.; MATIAS, J. E. F. **Imunossupressão com tacrolimus favorece a regeneração hepática induzida por hepatectomia extensa em ratos**. ABCD Arq Bras Cir Dig Vol. 23, n. 2, p. 74-80, 2010.
78. UKONG, S.; AMPAWONG, S.; KENGKOOM, K. **Collagen Measurement and Staining Pattern of Wound Healing Comparison with Fixations and Stains**. Journal of Microscopy Society of Thailand, Vol. 22, p. 22-29. Departament of Biology, Faculty of Science, Thailand, 2008.
79. VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca, para uso em pós-colheita**. Tese de Doutorado em Agronomia, Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP/SP, Brasil, 2003.

80. VIEIRA, S. A. L. **Efeito do Lazer de Baixa Potência na Cicatrização de Feridas Cutâneas Experimentais**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Franca. SP, Brasil, 2006.
81. WESTGATE, S; CUTTING, K. F. **Collagen dressings, products for practice**. Wounds. UK, V. 8, n. 1, p. 1-4, 2012.
82. WING, S. T.; MIDWOOD, K. S. **Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair**. Fibrogenesis & Tissue Repair. Vol 4 (21), p. 1-17, 2011.
83. YAMAMOTO, M. S. **Desempenho e Características da Carcaça e da Carne De Cordeiros Terminados em Confinamento com Dietas Contendo Silagens de Resíduos de Peixes**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil, 2006.
84. ZIEGLER, F. L. F.; SGARBIERI, V. C. **Caracterização químico-nutricional de um isolado protéico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos**. Revista de Nutrição, Vol. 22, n. 1, p. 61-70. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

VII – ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Desenvolvimento, caracterização e avaliação de potencial cicatrizante de filmes de colágeno contendo ácidos graxos

Pesquisador Responsável Catharina Grace Santos

Data da Versão 13/09/2012

Cadastro 440911

Data do Parecer 29/03/2012

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

OBJETIVOS E HIPÓTESES OU PRESSUPOSTOS DO PROJETO (Ver anexo)

OBJETIVO GERAL:

- Avaliar o efeito de filmes de colágeno hidrolisado contendo ácidos graxos essenciais (AGE®) sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar física-química e termicamente os filmes.
- Avaliar o efeito dos filmes em modelo experimental (roedor) de cicatrização de feridas cirúrgicas por segunda intenção.
- Avaliar a concentração de ácidos graxos (0-5%) em filmes de colágeno hidrolisado.

Sumário do Projeto

Na ocorrência de qualquer tipo de lesão na pele, independente de sua etiologia, o organismo irá produzir uma resposta com o objetivo de restaurar o tecido lesionado. A resposta é o processo de cicatrização de feridas, que consiste em um conjunto de eventos celulares e moleculares, os quais são constituídos por fenômenos bioquímicos e fisiológicos que interagem harmoniosamente visando à reparação tissular. Por mais completo e eficiente que seja o processo sistêmico de reparação tecidual, é necessário, na maior parte dos casos propiciar condições locais através de terapia tópica adequada para tornar viável e acelerar o processo fisiológico. A área de engenharia tecidual vem impulsionando pesquisas pela busca de novos materiais que auxiliem no processo de reparo de tecido, ou membranas que atuem como substitutos de modo a restaurar, manter e melhorar a função do tecido lesionado. Terapias utilizando filmes de colágeno vêm demonstrando potencial na cicatrização, fato atribuído a sua etnofarmacologia, visto que seu uso promove uma predominância de colágeno tipo I. Um dos objetivos do trabalho será desenvolver um novo tipo de filme que é à base de colágeno hidrolisado, ou gelatina. E as estes filmes será incorporado AGE- ácidos graxos essenciais em diferentes proporções. A caracterização dos filmes será feita através de avaliação da tensão/deformação, microscopia eletrônica de varredura, análise térmica, espectroscopia de infravermelho, permeabilidade ao vapor de água e gordura. A avaliação do processo cicatricial será realizada por meio do ensaio biológico, no qual as feridas realizadas nos roedores serão analisadas de acordo com vários critérios que serão citados na metodologia. Por meio desta pesquisa espera-se desenvolver uma nova membrana biológica de colágeno hidrolisado associada ao AGE, que promova melhores resultados cicatriciais não só para feridas de segunda intenção, mas também para outras lesões de pele.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Outro (citar no comentário)
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Página 1-2

Universidade Tiradentes - UNIT
Profª. Adriana Karla de Lima
Comitê de Ética em Pesquisa
Coordenadora

Comentários sobre os Itens de Identificação

- Laboratório de Biomateriais (LBMat)
- Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutura
- Laboratório de Química da UNICAMP

Introdução	Adequada
Comentários sobre a Introdução	
Objetivos	Adequados
Comentários sobre os Objetivos	
Pacientes e Métodos	
Delineamento	Comentário
Tamanho de amostra	Total 100 Local 01
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco-benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Não se aplica
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Comentários sobre os Itens de Pacientes e Métodos	
Cronograma	
Data de início prevista	mês 01
Data de término prevista	mês 09
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não
Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento	
Referências Bibliográficas	Adequadas
Comentários sobre as Referências Bibliográficas	

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Este projeto se encontra dentro dos critérios metodológicos e éticos, e atende aos requisitos da portaria do CNS 196/96.

Universidade Tiradentes - UNT
Profª. Adriana Karla de Lima
Comitê de Ética em Pesquisa
Coordenadora

ANEXO 2 – ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

**- ORIGINAL ARTICLE
MATERIALS TESTING**

Bioassay-guided evaluation of wound healing effect of fatty acids-incorporated collagen-based films¹

Avaliação biomonitorada dos efeitos cicatrizantes de ácidos graxos incorporados em membranas de colágeno

Catharina Grace Santos^I, Marismar Fernandes do Nascimento^I, Clauberto Rodrigues de Oliveira^{II}, Genecy Calado de Melo^{III}, Juliana Cordeiro Cardoso^{IV}, Francine Ferreira Padilha^{IV}, Sonia Oliveira Lima^V, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque-Júnior^{VI}.

^I Fellow Master degree, Post-Graduation Program in Health and Environment, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil. Involved in experimental procedures, manuscript preparation.

^{II} Fellow Master degree, Post-Graduation Program in Industrial Biotechnology, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil. Involved in experimental procedures of films manufacturing and statistical analysis of data.

^{III} Graduate student, Department of Dentistry, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil. Involved in the histological processing of the surgical samples.

^{IV} PhD, Laboratory of Biomaterials, Department of Pharmacy, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil. Involved in the manuscript writing, critical revision.

^V MD, PhD. Department of Medicine, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil. Supervision of the surgical procedures in rodent model.

^{VI} PhD. Morphology and Structural Biology, Department of Medicine, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil. Responsible for the design of the study, the histological examinations, manuscript preparation and supervision of all the phases of the study.

ABSTRACT

Purpose: Evaluate the effects of fatty acids-incorporated collagen-based dressing films on wound healing in rodents.

Methods: Therefore, surgical wounds were performed in the back of 80 Wistar rats, and dressed with collagen-based films (COL), and collagen-based films containing fatty acids (AGEF50 and AGEF100). Undressed wounds were regarded as controls (CTR). The animals were euthanized after 3, 7, 14 and 21 days, and the macroscopic wound contraction rates (WRC) were assessed. The wounded area was also analyzed by conventional and polarized light microscope.

Results: No sign of abscess or hypertrophic scar formation was observed in none of the groups. At 7 days, the WRR of AGEF50 was significantly higher than CTR ($p < 0.01$), whereas at 14 days, both AGE 50 and AGE100 showed a significant increase of the WRR compared to CTR ($p < 0.001$) and COL ($p < 0.01$). Both films promoted increased influx of neutrophils at 3 days ($p < 0.01$), but reduced significantly the mononuclear infiltrate at 14 days ($p < 0.05$). It was also observed earlier maturation of the granulation tissue, full epithelization and cutaneous appendages development, as well as better collagenization, in AGEF50 and AGEF100.

Conclusions: In conclusion, our data suggest that the application of AGEF50/100 as wound dressing improved wound healing in rodents.

Key-words: Wound healing, fatty acids, biological dressings.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito de ácidos graxos incorporados a membranas de colágeno sobre a cicatrização em roedores.

Métodos: Feridas foram confeccionadas no dorso de 80 ratos *Wistar* e cobertas com membranas de colágeno (COL) e membranas de colágeno contendo ácidos graxos (AGEF50 e AGEF100). Feridas não cobertas foram usadas como controle (CTR). Os animais foram sacrificados em 3, 7, 14 e 21 dias, e foram determinados os índices de contração das feridas (WCR). As feridas foram analisadas por microscopia de luz convencional e polarizada.

Resultados: Não foram observados sinais de abscessos ou de cicatrizes hipertróficas em nenhum dos grupos. Em 7 dias, o WCR observado em AGEF50 foi significativamente maior que em CTR ($p<0,01$), enquanto que, em 14 dias, ambos AGEF50 e AGEF100 mostraram aumento significativo destes índices em relação a CTR ($p<0,001$) e COL ($p<0,01$). AGEF50 e AGEF100 promoveram aumento da infiltração neutrofílica em 3 dias ($p<0,01$), mas reduziram significativamente o infiltrado linfocítico em 14 dias ($p<0,05$). Também foi observado desenvolvimento precoce do tecido de granulação, da reepitelização de anexos dérmicos, bem como melhor organização colagênica.

Conclusões: Os dados obtidos sugerem que a aplicação de AGEF50 e AGEF100 como coberturas de feridas acelerou o processo de reparo em ratos.

Palavras-chaves: Cicatrização, ácidos graxos, coberturas biológicas.

Introduction

Wound healing is a complex process that occurs in three overlapping pathophysiological phases named inflammatory reaction, proliferation, and

remodeling¹. The inflammatory phase is characterized by vascular events which allow the influx of leukocytes into the wound site, responsible for microbial and necrotic tissue elimination². The proliferative phase refers to the restoration of the epidermis and collagen formation, and involves migration and proliferation of keratinocytes from the wound edges, as well as fibroblast and endothelial proliferation to form the granulation tissue and further primary collagen scar. The remodeling phase starts during the proliferative phase but continues for a long time after injury (up to many months), and is characterized by increased collagen turnover and wound contraction in an attempt to restore skin morphological and functional integrity³.

However, in the case of full-thickness burn injuries and chronic wounds such as pressure ulcers, venous ulcers and diabetic foot ulcers these processes are damaged and new technologies have been developed to improve the healing in these conditions⁴. Thus, the last two decades have witnessed the introduction of many new dressings, based on the concept of creating an optimum environment to allow epithelial cells to move unimpeded, for the treatment of wounds⁵. Such optimum conditions include a moist environment around the wound, effective oxygen circulation to aid regenerating cells and tissues and a low bacterial load⁶.

Collagen matrix is known to provide physical support for cellular proliferation and qualifies as an excellent material for wound dressing due to its biodegradable and biocompatible properties⁷. In addition, the incorporation of bioactive molecules, such as curcumin⁸ and usnic acid⁹, or natural products, such as red propolis extract¹⁰, into collagen-based films have been successfully used to improve wound healing in experimental models.

Fatty acids are chemical compounds that present a long hydrocarbonate chain and a carboxyl-terminus group, which compose the biological membrane structures; function as precursors of intracellular messengers; and are oxidizers, generating adenosine triphosphate (ATP) and have been applied to wound treatment¹¹. Studies have demonstrated that fatty acids are able to modulate a wide range of biological activities involved in wound healing, such as differentiation of fibroblasts into myofibroblasts¹², fibroblasts proliferation¹³, endothelial-leukocyte adhesion¹⁴. Keratinocytes differentiation and development of the cutaneous appendages¹⁵.

Hence, this study aimed to evaluate the healing potential of fatty acids-incorporated collagen-based films on second-intention wound healing in rodent model.

Material and Methods

Materials

For this study, it was used gelatin (Gellita South America, Cotia/SP, Brazil), glycerol, tween 20 and 80, acetic acid (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro/RJ, Brazil), commercial formulation of essential fatty acids containing oleic/linoleic acids (AGE100®/ Tecpon, Cachoeirinha/RS, Brazil), commercial formulation of essential fatty acids with oleic/linoleic acids and sunflower oil (AGE50®/Tecpon, Cachoeirinha/RS, Brazil).

Films preparation

The films were prepared by casting method from a solution of 2.13% of gelatin powder solubilised in acetic acid (0.5 M) in a vessel equipped with a mechanical stirrer, with heating to 55°C for 20 minutes. Glycerin (15% or 20% w/w) as plasticizer and tween 20 or 80 (9,4% or 4,7% w/w) as emulsifier, respectively, were added to solution while stirring. Thereafter, fatty acid AGE 50 or AGE 100 (10% w/w based on the weight of the gelatin powder) (TECPON, Brazil) added to the solutions, the compositions of the formulations films are listed in Table 1. The solution was homogenized in a Alpax Ltda, Diadema, São Paulo, Brazil) at 30,000 rpm for 10 min. The emulsion (100 mL) was poured into disposable Petri dish, placed on a leveled surface, and dried at 40 °C for 24 h. The obtained films were peeled from the disposable Petri dish plates and stored at 25 °C for 48 h in desiccators at 58% relative humidity (RH) before the tests were carried out. The prepared films with a size of 2 x 3 cm² were sterilized for 30 min in UV-irradiation before use.

TABLE 1. Compositions of the formulations films.

Experimental Film	Glycerol	Solvent
AGEF 50	15 %	Tween 80 (4.7%)
AGEF 100	20%	Tween 20 (9.4%)

Animals

The animals used in this study were adult male *Rattus norvegicus albinus*, Wistar lineage, weighing 250-300 g. The rats were housed in clear plastic cages with solid floors and loose hardwood chip bedding, and supplied with food and water ad libitum in a temperature and humidity-controlled environment. Experimental protocols and procedures were approved by the University Tiradentes Animal Care and Use Committee (CEUA nº 440911).

Surgical Procedures and Groups

Eighty rats were anesthetized with intraperitoneal ketamine-xylazine (100 mg/kg - 5mg/kg) and standard-sized round-shaped surgical wounds were performed in the back of the animals, using metallic punch of 8.0 mm. Animals were handled in accordance to the principles of aseptic chain in order to avoid bacterial contamination. Subsequently, rats were randomly assigned into four groups of 20 animals each: CTR, undressed wounds; COL, dressed with collagen-based films; AGEF50 – dressed collagen-based films containing AGE50® fatty acids formulation; and AGEF100 – dressed collagen-based films containing AGE100® fatty acids formulation. After 3, 7, 14 and 21 days, five animals of each group were euthanized in CO2 chamber, and the healing/scar area was surgically removed, formalin-fixed and paraffin-embedded.

Assessment of the wound contraction rates

For the macroscopic analysis and assessment of the wound contraction rates, after 3, 7, 14, and 21 day, the craniocaudal and latero-lateral measures of each wound were assessed by a digital caliper (precision 0.01 mm), prior to the excision of the wounds, and the final wound areas were obtained through the equation $A = \pi \times R \times r$, where R represents the craniocaudal axis and r corresponds to the latero-lateral axis of the wounds. Clinical features of the wounds were monitored regarding to the presence of crust, secretion, necrosis, and hypertrophic scars.

Histological procedures and morphological analysis.

Serial 5 μm thick sections were obtained from the paraffin-embedded samples and stained in hematoxylin-eosin. The intensity of the inflammatory response was assessed as follows: 0 — absence of inflammatory infiltrate; 1 — inflammatory cells representing less than 10% of the cell population; 2 — inflammatory cells representing between 10% and 50% of the cell population; and 3 — inflammatory cells representing more than 50% of the cell population. The inflammatory profile was classified as acute (predominance of polymorphonuclear cells) and chronic (predominance of mononuclear cells). For the assessment of the collagen deposition, histological sections stained in Sirius Red and analyzed under polarized light were used to the descriptive analysis. Collagen fibers were analyzed according their birefringence pattern (greenish/yellow-greenish or orange, orange-reddish), morphological appearance (wavy or stretched, thin or thick, short or long), and architectural arrangement (reticular, parallel or interlaced). All readings were performed by investigators blinded to treatments (six histological sections/animal).

Statistical analysis

The data concerning the wound contraction rates were analyzed using ANOVA followed by Tukey's test, whereas the analysis of the inflammatory infiltrate was carried out by Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's test. P values less than 0.05 were considered significant.

Results

Macroscopic analysis and wound contraction rates assessment

Fig.1 presents the macroscopic aspects of the wounds over the time course of the experiment, showing no sign of abscess formation in the early phases (3 and 7 days) or hypertrophic cars in the final ones (14 and 21 days).

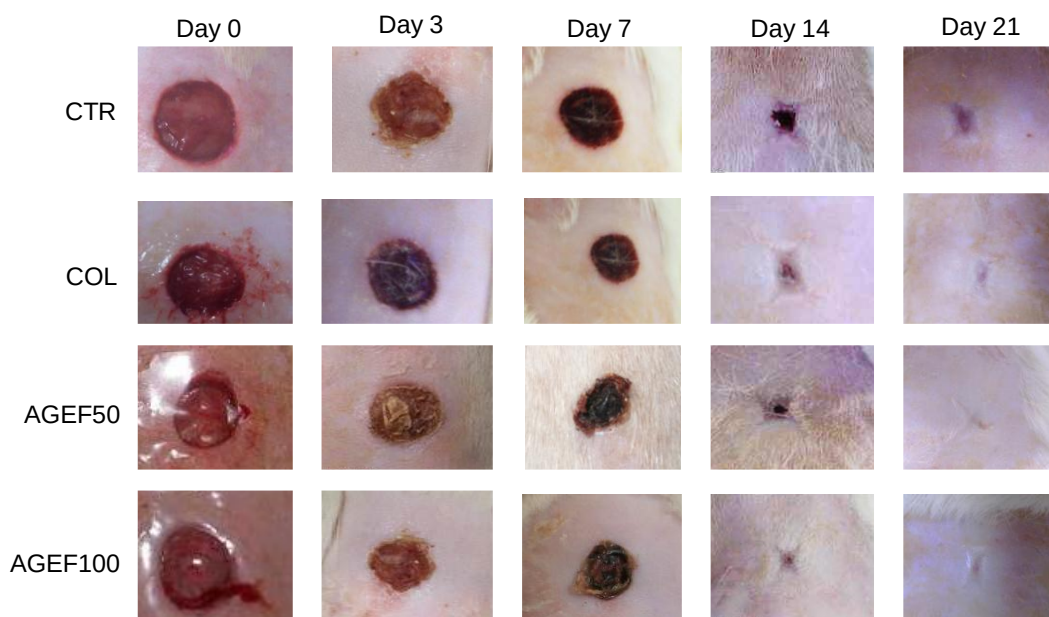


FIGURE 1. Macroscopic features of the wounds of the different groups over the time-course of the experiment.

As demonstrated in Fig. 2, no significant difference was observed in the WRR of the groups in 3 days ($p > 0.05$). In 7 days, the WRR of AGEF50 was significantly higher than CTR ($p < 0.01$), whereas in 14 days, both AGE 50 and AGEF100 showed a significant increase of the WRR compared to CTR ($p < 0.001$ and 0.001) and COL (0.001 and 0.01). In 21 days, all the groups presented full retraction of the wounds.

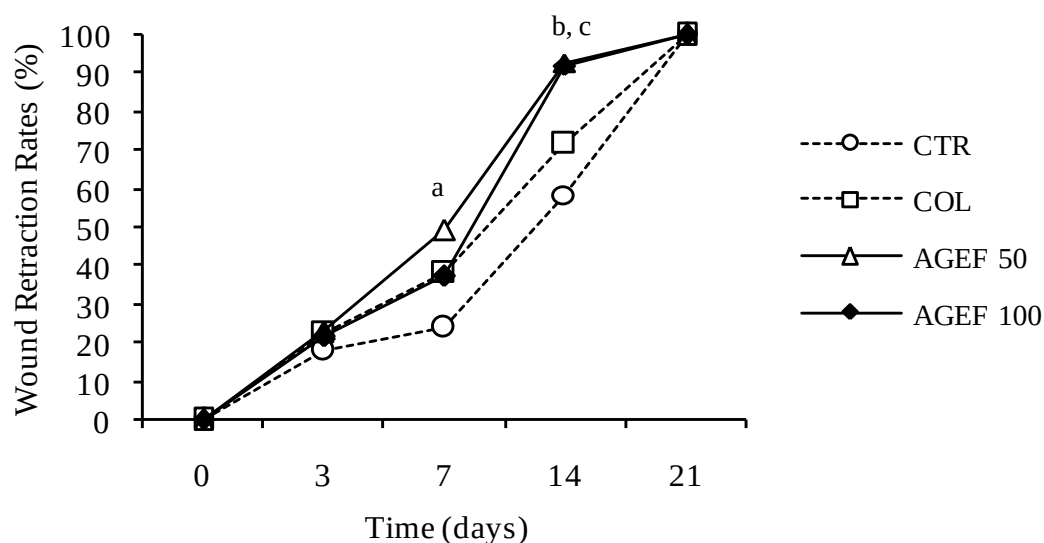


FIGURE 2. Assessment of the wound retraction rates (WRR) throughout the time.

- (d) AGE50 is significantly different from CTR ($p < 0.01$).
- (e) AGE50 is significantly different from CTR ($p < 0.001$) and COL ($P < 0.001$).
- (f) AGE100 is significantly different from CTR ($p < 0.001$) and COL ($P < 0.01$).

Histological analysis

In 3 days, all the groups presented intense plasmatic exudation, associated to marked infiltration of polymorphonuclear neutrophils. Interstitial oedema was remarkable in the bottom of the wounds, whereas mild vascular neoformation was evidenced in the marginal wounded areas. In 7 days, CTR, COL and AGEF100 exhibited immature granulation tissue, with formation of numerous irregular capillary vessels and intense infiltration of lymphocytes and histiocytes. In AGEF50, the granulation tissue appeared more mature, with remarkable fibroblastic proliferation as well as deposition of parallel-arranged collagen fibrils. The epithelization process recovered less than 30% of the wounded area in all the groups. In 14 days, the epithelial lining recovered more than 70% of the wound surface in CTR and COL, but only two samples of both groups presented full epithelization. However, the epithelization process was complete in 100% of AGEF50 and AGEF100. Moreover, rudiments of cutaneous appendages were observed budding from the epithelium line, particularly in the margins of the wounds. The primary scar was well developed, with

intense fibroblastic proliferation, and mild residual granulation tissue. In 21 days, there was full epithelization in all the groups, although the cutaneous appendages were only observed in AGEF50 and AGEF100. The connective tissue was intensely fibrotic, with absence of inflammatory infiltrate in all the groups (Fig. 3).



FIGURE 3. Histological findings observed in CTR (a/e/i/m/q), COL (b/f/j/n/r), AGEF50 (c/g/k/o/s) and AGEF100 (d/h/l/p/t). (a-d) inflammatory phase of wound healing at 3 days, (e-h) granulation tissue formation at 7 days, (i-l) development of the primary fibrous scar at 14 days, (h-p) well developed fibrous scar at 21 days in the experimental groups (HE, 100x magnification). (q-t) Details of the epithelial features, showing formation of cutaneous appendages only in AGEF50 and AGEF100 (400x magnification).

As shown in Fig. 4, the intensity of the inflammatory infiltrate decrease over the time course of the experiment. At 3 days, AGEF50 and AGEF100 presented increased polymorphonuclear neutrophils infiltrate compared to CTR ($p<0.01$), whereas in 14 days, the mononuclear inflammatory content was significantly reduced in both groups ($p<0.05$). No difference among the groups was observed in the inflammatory cells content in 7 and 21 days ($p>0.05$).

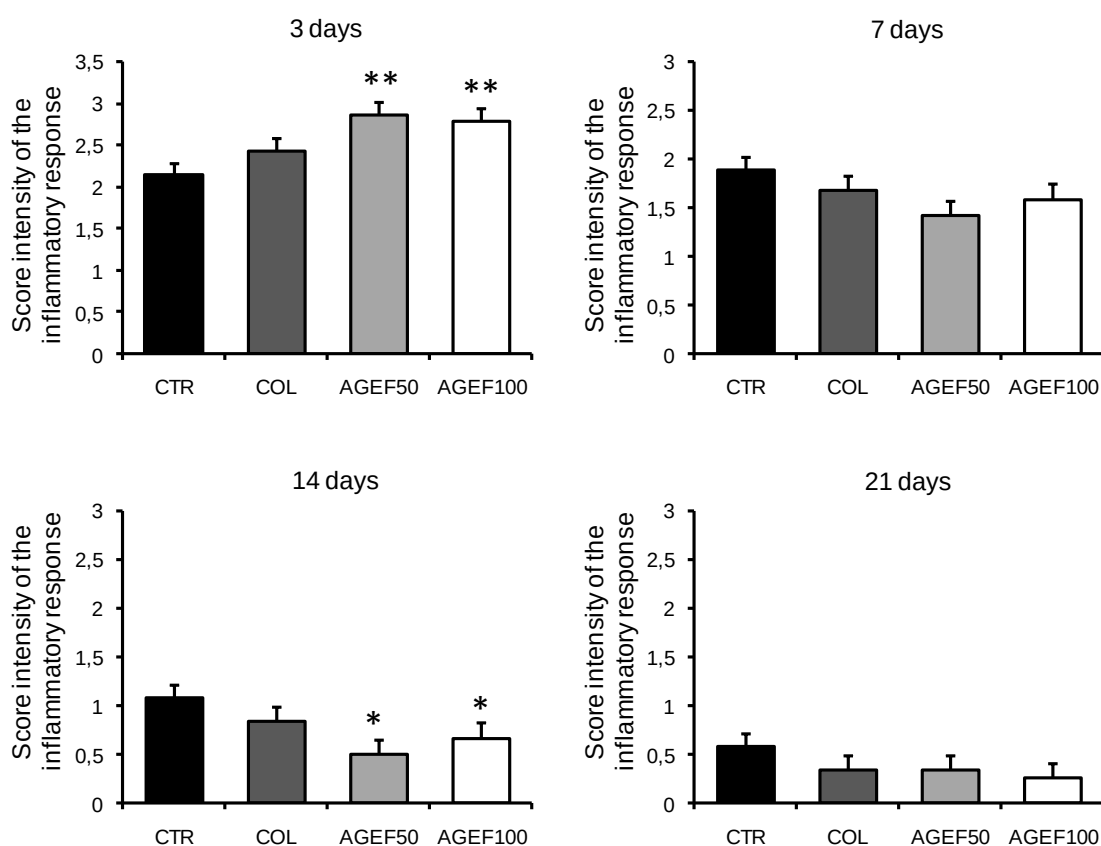


FIGURE 4. Histological assessment of the mean scores ($\pm$ SD) of the intensity of the inflammatory response in the studied groups over the time course of the experiment.

* Significantly different from CTR ($p<0.05$).

** Significantly different from CTR ($p<0.01$).

Morphological analysis of collagenization

In three days, extremely delicate greenish or yellow-greenish fibrillar structures (type-III collagen) with varied dimensions and reticular dispositions were observed in all the groups. In seven days, type-III collagen fibers thicker and denser, disposed in a reticular arrangement in CTR, and COL, and parallel arranged in AGE50 and AGE100. In 14 days, there was replacement of type III for type I collagen fibers, which were short, thin, delicate and irregularly disposed in CTR but longer and arranged in a parallel disposition in COL, AGE50 and AGE100 (Fig. 5).

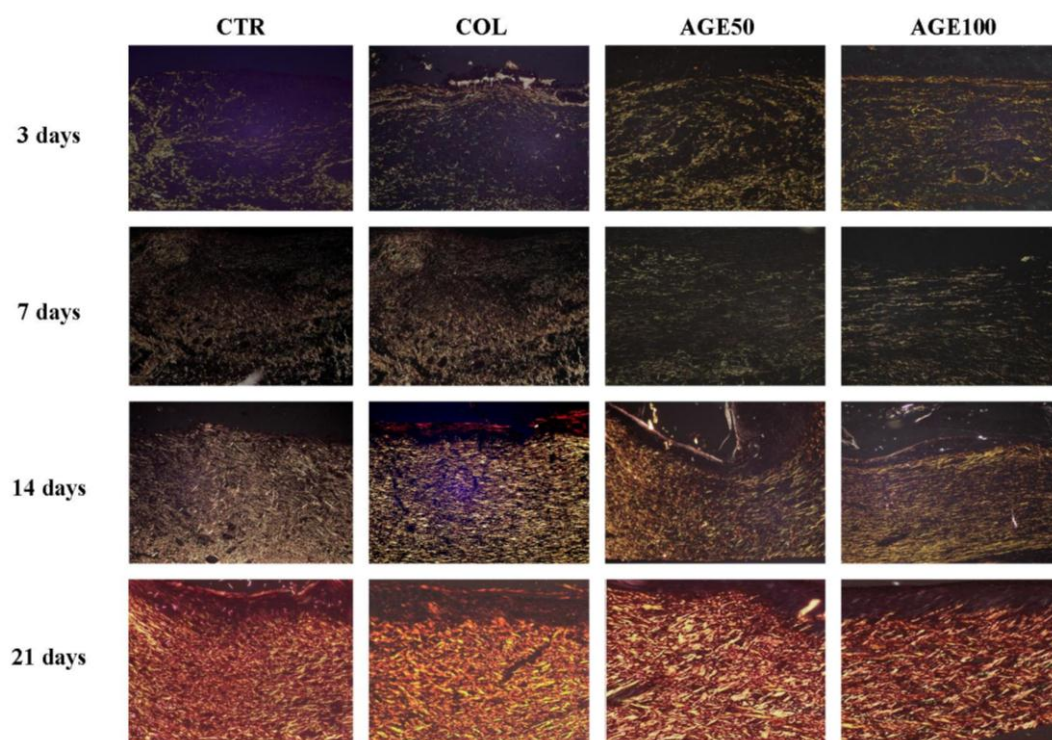


FIGURE 5. Collagen deposition in the experimental groups during the time-course of the study. In three and seven days, there was a predominance of thin delicate type III collagen fibrils (greenish birefringence), whereas in 14 these fibrils were replaced by thicker and longer type I collagen fibers. In 21 days, all the groups presented grossly interlaced type I collagen fibers (Sirius Red/Polarized Light, 400x magnification).

Discussion

The increased wound contraction rates observed in the wounds dressed with AGEF50 and AGEF100 suggest that the presence of essential fatty acids improved significantly the healing process. It is well established that the wound contraction is closely associated to the differentiation fibroblasts into myofibroblasts, a phenotypic change mediated by transforming growth factor beta (TGF- β), a cytokine widely released by mononuclear inflammatory cells within the wound¹⁶. Once it has been previously reported that fatty acids are able to enhance the synthesis and release of TGF- β , and induce the expression of contractile antigens (α smooth muscle actin) in fibroblasts, changing them into a myofibroblastic phenotype, in experimental *in vitro* studies¹², it is possible to speculate that such increased contraction rates might be likely related to higher levels of TGF- β and more expressive myofibroblastic differentiation. Therefore, the lack of significant difference among the groups at 3 days seems to support this theory, since the inflammatory response was rich in polymorphonuclear instead of mononuclear cells, which are the main source of TGF- β . Moreover, at 21 days, a substantial apoptosis-mediated decrease of the myofibroblasts is expected¹⁷, which justifies the findings obtained in this study. Nevertheless, further investigations analyzing the variations in the myofibroblasts subsets by immunohistochemical and molecular methods are necessary in order to assess the validity of such hypothesis.

The morphological evidence of a mature more cellular and less vascular granulation tissue observed in AGEF50 at 7 days suggest an acceleration of the biological events of wound healing. It has been recently reported that oleic and linoleic acids induce fibroblasts proliferation *in vitro*¹³. Therefore, the high content of such fatty acids in AGEF50® formulation might be related with the improvement in the fibroblast-consistent spindle-shaped cell component, promoting earlier maturation of the granulation tissue. Moreover, unsaturated fatty acids, such as oleic acid, seem to exert anti-inflammatory activity by modulating the endothelial-leukocyte adhesion¹⁴. This biological property might shorten the acute phase of the inflammatory response, and consequently accelerate the installation and development of the granulation tissue.

The semi-quantitative analysis of the intensity of the inflammatory response showed that both fatty acids-incorporated collagen-based films increased significantly the influx of neutrophils into the wounded area during the acute inflammatory phase of wound healing. Similar findings have been previously reported¹⁸, who also demonstrated that such increase in the polymorphonuclear content were likely related to an oleic and linoleic-induced enhancement of the expression of vascular endothelial growth factor-alpha (VEGF-alpha) by neutrophils, improving the endothelial-leukocyte adhesion, as well as an increased release of cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2 alpha/beta (CINC-2alpha/beta), a potent chemotactic cytokine during the inflammatory response. Nevertheless, it has been recently reported that oleic acid is able to downregulate long-term inflammatory responses¹⁹, and suggested that this biological phenomenon might be related to apoptosis of T cells mediated by oleic acid exposure. The reduced content of mononuclear inflammatory cells in AGEF50 and AGEF100 observed at 14 days seems to support this theory. Therefore, it is possible to suggest that the presence of fatty acids might have speeded-up the time-course of the inflammatory response, by accelerating the acute phase and shortening the chronic phase.

The analysis of the epithelization process in 14 days suggested that the fatty acids might have played a modulatory role on the proliferation and migration of epidermal keratinocytes, accelerating the full epithelial recovery of the wound surface. In fact, it has been previously reported that keratinocytes use fatty acids to synthesize lamellar bodies, which are regarded as important structures to the formation of the cell lipid membranes²⁰. In addition, the experimental inhibition of fatty acids blocks the formation of such lamellar bodies, impairing the keratinization process and maturation of the epidermal tissue¹⁵.

The earlier development of dermal appendages was also observed in AGEF 50 and AGEF 100. Recent essays have demonstrated the overexpression of fatty acids transport proteins (FATP) over the time-course of the development of the epidermis and cutaneous appendages, suggesting the active participation of such lipid molecules in the formation and maturation of the epidermal-derived structures¹⁵. Accordingly, it is possible to suggest that the additional availability of fatty acids, derived from AGEF50 and AGEF100, might have increased the keratinocytes metabolism, resulting in earlier formation of mature keratinized epithelial lining and

cutaneous appendages. However, further research assessing the FATP expression in epithelial tissues during wound healing is necessary to investigate the precise mechanisms underlying the keratinocytes metabolic enhancement in response to the increased fatty acids supply.

The analysis of the collagenization seemed to corroborate the hypothesis of a possible stimulatory effect of fatty acids on the fibroblasts, as previously reported by others studies¹³. Notwithstanding, the modulatory effects observed in this study appeared to be related to an improvement of both synthesis and degradation of the collagen molecules, promoting faster remodeling of the collagen scar, without excessive deposition of these fibers, which would ultimately lead to hypertrophic scar formation.

Conclusions

In conclusion, our data suggest that the incorporation of fatty acids into collagen-based membranes hasten wound healing. Such modulatory effects seem to be associated to a possible biostimulatory activity on keratinocytes and fibroblasts. Thus, AGEF50 and AGEF100 appear to be biomaterials with potential application in the pharmaceutical industry as wound dressing or temporary dermal substitutes. Nevertheless, further studies are still required in order to clarify the pathological, biochemical and molecular mechanisms underlying the healing activity of the membranes evaluated in this research.

Acknowledgements

The authors thank the Foundation for Research and Technological Innovation Support from Sergipe/Brazil (FAPITEC/SE) for the financial support.

References

1. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun;117(7 Suppl):1e-S-32e-S.
2. Li J, Chen J, Kisher R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology* (2007) 25: 9–18.
3. Rangaraj A, Harding K, Leaper D. Role of collagen in wound management. *Wounds*. 2011; 7(2):54+63.
4. Weller C, Sussman G. Wound Dressings Update. *J Pharm Pract Res*. 2006; 36(4):318-324.
5. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci*. 2008 Aug;97(8):2892-923.
6. Murphy PS, Evans GR. Advances in wound healing: a review of current wound healing products. *Plast Surg Int.*. 2012;2012:190436
7. Deyl Z, Adam M. Preparation of insoluble collagen. In: Hall DA, editor. *The methodology of connective tissue research*. 1st ed. Oxford: Joynton-Bruvvers; 1976. p. 1–7.
8. Gopinath D, Ahmed MR, Gomathi K, Chitra K, Sehgal PK, Jayakumar R. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*. 2004 May;25(10):1911-7.
9. Nunes PS, Albuquerque RL Jr, Cavalcante DR, Dantas MD, Cardoso JC, Bezerra MS, Souza JC, Serafini MR, Quitans LJ Jr, Bonjardim LR, Araújo AA. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:761593.
10. Albuquerque-Júnior RL, Barreto AL, Pires JA, Reis FP, Lima SO, Ribeiro MA, Cardoso JC. Effect of Bovine Type-I Collagen-Based Films Containing Red Propolis on Dermal Wound Healing in Rodent Model. *Int. J. Morphol.* 2009; 27(4): 1105-1110
11. Ferreira AM, de Souza BM, Rigotti MA, Loureiro MR. The use of fatty acids in wound care: an integrative review of the Brazilian literature *Rev Esc Enferm USP*. 2012 Jun;46(3):752-60.

12. Mishra R, Simonson MS. Oleate induces a myofibroblast-like phenotype in mesangial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Mar;28(3):541-7.
 13. Magdalon J, Hatanaka E, Romanatto T, Rodrigues HG, Kuwabara WM, Scaife C, Newsholme P, Curi R. A proteomic analysis of the functional effects of fatty acids in NIH 3T3 fibroblasts. *Lipids Health Dis.* 2011 Nov 24;10:218.
 14. Ibrahim A, Mbodji K, Hassan A, Aziz M, Boukhattala N, Coëffier M, Savoye G, Déchelotte P, Marion-Letellier R. Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium. *Clin Nutr.* 2011 Oct;30(5):678-87.
 15. Schmuth M, Neyer S, Rainer C, Grassegger A, Fritsch P, Romani N, Heufler C. Expression of the C-C chemokine MIP-3 alpha/CCL20 in human epidermis with impaired permeability barrier function. *Exp Dermatol.* 2002 Apr;11(2):135-42.
 16. Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, Horowitz JC, Day RM, Thomas PE. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 2003 Apr 4;278(14):12384-9.
 17. Ribeiro MA, Albuquerque RL Jr, Ramalho LM, Pinheiro AL, Bonjardim LR, Da Cunha SS. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660 nm. *Photomed Laser Surg.* 2009 Feb;27(1):49-55.
 18. Pereira LM, Hatanaka E, Martins EF, Oliveira F, Liberti EA, Farsky SH, Curi R, Pithon-Curi TC. Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. *Cell Biochem Funct.* 2008 Mar-Apr;26(2):197-204.
 19. Carrillo C, Cavia M, Alonso-Torre S. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. *Nutr Hosp.* 2012;27(4):978-990
 20. Feingold KR. The regulation and role of epidermal lipid synthesis. *Adv Lipid Res.* 1991;24:57-82.
-

Correspondence:

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural, Instituto de Tecnologia e Pesquisa,
Universidade Tiradentes.

Av. Murilo SDantas, 300, Farolândia, Aracaju/SE, Btrasil. CEP 49032-490.

Tel: (55 79) 3182190/ramal 2615.

Conflict of interest: none.

Financial source: Foundation for Research and Technological Innovation Support
from Sergipe - FAPITEC/SE.

¹ Research performed at Laboratory of Morphology and Structural Biology (LMBE),
ITP (Science and Technology Institute), University Tiradentes, Sergipe, Brazil.

ANEXO 3 – NORMAS PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO

Acta Cir. Bras. - Instructions to authors

Página 3 de 4

**ACTA
CIRÚRGICA
BRASILEIRA**

ISSN 0102-8650 printed version
ISSN 1678-2674 online version

INSTRUCTIONS TO THE AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Organizing electronic manuscript](#)

Scope and policy

The Journal Acta Cirúrgica Brasileira has rule, norm, standard and style. Follow Instructions to the Authors available from www.scielo.br/ach (English) and observe models of published articles.

Manuscript that does not comply with these instructions is not accepted.

The Journal follows - INTERNATIONAL COMMITTEE OF MEDICAL JOURNAL EDITORS - ICMJE. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Ethical Considerations in the Conduct and Reporting of Research: www.icmje.org

Authorship

The Journal considers all article participants as authors.

Authorship credit should be based on substantial contributions. An author must take responsibility for at least one component of the work:

1. substantive scientific and intellectual contributions to the study;
2. responsible for conception and design;
3. responsible for manuscript preparation;
4. acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
5. manuscript writing;
6. critical revision;
7. final approval of the version to be published.

Contributors who not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgments section (Ex.: Persons who provided purely technical help or general support). Cite the responsible for English language version.

Acta Cirúrgica Brasileira is a peer-reviewed journal and publishes articles on surgical research. Articles are submitted for review by experts who are not part of the editorial staff. The journal has national and international boards of consultants. Each manuscript is read by the Editor and one of the Associate Editors. Together, they decide whether to send the paper to outside reviewers. Rejected manuscripts are returned to authors. Editor-in-Chief has full authority over the editorial content of the journal.

The journal does not accept case reports/retrospective studies/review articles.

Must be submitted manuscripts resulted from experimental surgery.

The Editors of **Acta Cirúrgica Brasileira** welcome systematic reviews and meta-analysis and they will be regarded for publication when a surgical topic of current interest is addressed. All meta-analysis of randomized trials must adhere to guidelines outlined in the QUORUM statement (Lancet 1999;354:1896-1900) and a suitable QUORUM flow chart must be included in the submission.

Manuscript must be delivered by e-mail to the chief editor [soukden@terra.com.br], written in English language.

Organizing electronic manuscript

First page

<http://www.scielo.br/revistas/ach/instruc.htm>

28/01/2013

The title page must contain: a) the title of the article (in English and in Portuguese), which should be concise but informative. Insert the number one superscript (Arabic) indicating, after the References, where research was performed (laboratory, research center, division, department and institution).

Affiliation

Full name of all the authors with the sequence number superscript (Roman) indicating below:

- a) the highest academic degree(s) Access www.scielo.br/actb Â Â Acta Cir Bras. 2006;21(2):60 Mar-Abr. Academic degrees examples
b) the name of division/department and institution Follow examples of published articles.

ABSTRACT

Must not exceed 200 words and should be presented in a structured format:

Purpose: The main aim of the study or investigation.

Methods: Selection of subjects (patients or experimental animals); Basic procedures.

Results: Main findings (giving specific data and their statistical significance).

Conclusion: state the main answer concerning the purpose of the study.

Key words: should be provided based on Medical Subject Headings - Mesh

(<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Authors must include an abstract in Portuguese (**Resumo**), with the key words (**Descritores**) based on

Descritores de Ciências da Saúde (DeCS) - <http://decs.bvs.br>

Manuscript format

Introduction

Clearly state the subject and the purpose of the study. Give only pertinent citations, and do not review the subject extensively.

Methods

Describe your selection of the observational or experimental subjects (patients or laboratory animals, including controls) clearly (quantity and quality). Identify all procedures in sufficient detail. Identify precisely all drugs and chemicals used, **including generic name(s)**, dosage(s), and route(s) of administration. Do not use patient's names, initials, or hospital numbers. Describe statistical procedures with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. Authors are responsible for the accuracy of their report including all statistical calculations and drug doses.

ETHICS

When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures were in accord with the Ethical Committee on Human Experimentation of the Institution in which the experiments were done or in accord with the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2008 [World Medical Association (www.wma.net/e/edociv/b3.htm)]. Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Obligation to register clinical trials in a public trials registry established by the World Health Organization. Identification number at the end of abstract [CONSORT - Consolidated Standards of Reporting Trials (www.consort-statement.org) and International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP)].

When reporting experiments on animals, indicate that the use of laboratory animals follow the Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS) ethical code for animal experimentation (WHO Chronicle 1985; 39(2):51-6)

The journal reserves the right not to accept an article on the grounds that appropriate ethical or experimental standards have not been reached.

Results

Present the results in logical sequence in the text, using table, chart and figure. Do not repeat in the text, all the data in the tables, chart and figures. In the text, emphasize or summarize only important findings. Include the statistical significance.

Tables: Are numbered in sequence (use arabic numerals), and supply a brief title for each at the **top**. Use only approved abbreviations. Explain in footnotes all non standards abbreviations that are used in each table. Must be without vertical lines.

Chart: Is descriptive and closed. title at the **top**.

Figures [illustrations, photos, graphics]: must be with good quality. Numbered in sequence (use arabic numerals). The legends must be **in the bottom** of the figure.

Discussion

Emphasize the new and important aspect of the study. Compare the method and the results with those formerly published. **DO NOT REPEAT RESULTS.**

Conclusion

Must be clear and concise. Link the conclusion with the goals of the study. **AVOID CONCLUSIONS NOT SUPPORTED ON DATA.**

Acknowledgments

Acknowledge only persons who have made substantial contributions to the study.

References

Follow model of published article

The journal follow the Vancouver style:

UNIFORM REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS SUBMITTED TO BIOMEDICAL JOURNALS of the International Committee of Medical Journal Editors (www.icmje.org).

All references should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned by superscript in the text.

List all the authors, **"et al" is not accepted.**

Abbreviations of journals should conform to those used in MEDLINE/PubMed.

The article must have at a maximum of 20 references.

References to abstracts, personal communications and books is discouraged. Books are not indexed. Reference to unpublished communications will not be accepted.

Examples of references are given below:

Journal article

List all authors

You must not repeat a set of ten, one hundred or thousand in the final page.

Diethelm AG. Surgical management of complications of steroid therapy. *Ann Surg.* 1977;185(3):251-63.

Park HK, Fernandez I, Dujovny M, Diaz FG. Experimental animal models of traumatic brain injury: medical and biomechanical mechanism. *Crit Rev Neurosurg.* 1999;9:44-52.

Correspondence:

Name, address

Phone/Fax, e-mail of author.

Declare conflict of interest.

Inform the source(s) of support.

Inform where research was performed (laboratory, research center, division, department and institution).

PROCEDURES OF THE JOURNAL

1. The article will be examined to verify whether it complies with the journal's instructions; **Manuscripts that do not conform to the requirements and style of the journal will be returned for recasting. Do an accurately revision of the manuscript before sending it;**
2. The article will be submitted to peer-review for analysis and approval, in addition to approval by the Editors;
3. After approval, the manuscript will be published according to the date of submission.

The Editors retain the right to alter style and shorten material for publication.

PLEASE, CONSULT RECENT ISSUES OF THE JOURNAL available from www.scielo.br/actb

