JULIANA DA COSTA FLORIM

**EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO
EXTRATO DE SEMENTE DE UVAS PARA ACELERAÇÃO
DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

JULIANA DA COSTA FLORIM

**EMPREGO DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CONTENDO EXTRATO
DE SEMENTE DE UVAS PARA ACELERAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS
CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Florim, Juliana da Costa.

Emprego de nanopartículas lipídicas sólidas contendo extrato de semente de uvas para aceleração da cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos / Juliana da Costa Florim. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Diabetes mellitus e migração celular.

Versão do título para o inglês: Effects of solid lipid nanoparticles containing grape seed extract in diabetic mice cutaneous wound healing.

1. Diabetes mellitus 2. Cicatrização 3. Estresse oxidativo
4. Antioxidantes 5. Proantocianidinas 6. Nanotecnologia I. Santos, Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB089/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Juliana da Costa Florim.

Título da Dissertação: Emprego de nanopartículas lipídicas sólidas contendo
extrato de semente de uvas para aceleração da cicatrização
de feridas cutâneas em camundongos diabéticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **035** nas fls. **101** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Marinilce Fagundes dos Santos**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Emprego de polímeros biodegradáveis contendo proantocianidinas para aceleração da cicatrização de feridas crônicas em diabéticos"* do qual participam o(s) alunos **Juliana da Costa Florim, Maíra Estanislau Soares de Almeida, Ana Flávia Marçal Pessoa, Mariana Marin Monteiro, Kelly Salzmann Monteiro**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **24.03.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 25 de março de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

*Aos meus pais Eduardo e Denise, aos meus familiares e
ao meu amor Leonardo, pelo incentivo e apoio constante.*

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Marinilce Fagundes dos Santos, pela amizade, confiança, apoio, incentivo e ensinamentos profissionais e pessoais. Muito obrigada!

Aos colegas de laboratório Cilene R. Lima, Cibele Crastequini, Douglas Amaral, Maíra E. S. Almeida, Mariana M. Monteiro, Maria Gabriela S. Lima pelo auxílio e convivência e, em especial, à Ana Flávia M. Pessoa que me acompanhou durante a padronização do modelo experimental.

À minha amiga Kelly S. Monteiro, pela amizade e cumplicidade dentro e fora do laboratório.

Às técnicas de laboratório Gabriella M. Moraes e Emília Ribeiro, que transmitiram os seus conhecimentos e contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

À Professora Doutora Neuza Mariko Aymoto Hassimotto e sua aluna de mestrado Regina Stanquevis, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, que me auxiliaram na caracterização do extrato de semente de uva.

À Professora Doutora Sílvia Stanisçuaski Guterres e suas alunas Cássia Detoni e Cristina Venturini, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela receptividade e pela ajuda no desenvolvimento e caracterização das ferramentas de nanotecnologia e ao Professor Doutor Marcelo Lazzaron Lamers pelos ensinamentos.

À Professora Doutora Vanessa Moraes Freitas, por ter me guiado nos experimentos de Zimografia.

À Professora Doutora Patrícia Gama, por ter permitido e auxiliado no uso do microscópio para a obtenção das fotos.

À Professora Doutora Dânia Emi Hamassaki, por ter cedido o seu laboratório para a realização dos experimentos com os camundongos.

Aos Professores do Departamento de Biologia Celular e Tecidual: Alison Colquhoun, Irene Yan, Maria Inês, Marília Seelaender, Ruy Jaeger e Telma Zorn, que contribuíram direta ou indiretamente para o andamento do projeto.

Às secretarias Celiana Marchiori e Regina Valbom que me ajudaram junto à Pós-Graduação.

Aos funcionários da Biblioteca, que contribuíram com a revisão textual.

À minha orientadora de iniciação científica, Débora Regina Machado Silva, pelos ensinamentos, amizade, carinho e por ter incentivado a seguir na área acadêmica. Muito obrigada!

Aos meus pais e familiares, pelo amor incondicional, confiança, apoio e suporte.

Ao meu noivo Leonardo Kazuo, pelo companheirismo, paciência e, sobretudo, amor.

À todos os meus amigos que estiveram ao meu lado torcendo para o meu sucesso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

“A persistência é o menor caminho do êxito”
(Charles Chaplin)

RESUMO

FLORIM, J. C. **Emprego de nanopartículas lipídicas sólidas contendo extrato de semente de uvas para aceleração da cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos**. 2013. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O estresse oxidativo causado pela hiperglicemia desempenha um importante papel no desenvolvimento e progressão do diabetes mellitus (DM) e suas complicações, como a cicatrização deficiente de feridas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da administração tópica de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo extrato de semente de uva sobre a cicatrização cutânea de camundongos controles e diabéticos, observando a cinética de cicatrização, alterações da matriz de colágeno e grau de estresse oxidativo. As análises morfométricas e histológicas mostraram um retardo no fechamento da ferida nos animais diabéticos ao final do 14º dia pós-lesão, acompanhado de uma resposta inflamatória inicial suprimida, mas persistente nas etapas finais do processo de reparo, bem como um atraso na deposição de colágeno fibrilar, demonstrada por coloração picrosírius. Observou-se também um aumento da atividade das metaloproteinases -2 e -9 por zimografia, um aumento de células contendo α -actina de músculo liso (análise imunohistoquímica) e um grau significativo de peroxidação lipídica na derme dos animais diabéticos, avaliada por TBARS e por imunohistoquímica para 4-hidroxi-nonenal (4-HNE). O extrato de semente de uva comercial Vitaflavan® apresentou capacidade antioxidante e 46% de proantocianidinas totais. A NLS foi desenvolvida utilizando-se gordura de coco. A NLS branca e a NLS contendo Vitaflavan® apresentaram características físico-químicas semelhantes e um diâmetro médio variando entre $108,8 \pm 1,3$ e $144 \pm 13,2$ nanômetros. O tratamento tópico com gel (veículo utilizado para a aplicação das NLS), com a NLS branca e com NLS associada com o extrato de semente de uva foram capazes de recuperar o atraso no fechamento da ferida observado anteriormente nos animais diabéticos, com uma melhora no recrutamento de células inflamatórias e reepitelização. Além disso, os tratamentos atenuaram a peroxidação lipídica, de forma mais acentuada com a aplicação da NLS branca e com a NLS contendo Vitaflavan®, comprovando as suas propriedades antioxidantes. Os resultados sugerem, no entanto, que além da ação antioxidante, os efeitos positivos desta terapia estão também bastante associados à cobertura da ferida e prevenção da desidratação tecidual.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. Cicatrização. Estresse oxidativo. Antioxidantes. Proantocianidinas. Nanotecnologia.

ABSTRACT

FLORIM, J. C. **Effects of solid lipid nanoparticles containing grape seed extract in diabetic mice cutaneous wound healing**. 2013. 114 p. Masters thesis (Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Oxidative stress caused by hyperglycemia plays an important role in the development and progression of diabetes mellitus (DM) and its complications, such as impaired wound healing. The aim of this study was to evaluate the effects of the topical administration of solid lipid nanoparticles (NLS) containing grape seed extract on cutaneous wound healing in control and diabetic mice, observing healing kinetics, changes in the collagen matrix and the degree of oxidative stress. Morphometric and histological analyzes showed a delay in wound closure in diabetic animals on the 14th day post-injury, accompanied by an inflammatory response initially suppressed, but persistent in the later stages of repair. There was also a delay in the deposition of fibrillar collagen, as demonstrated by the Picrosirius staining. Increased activity of matrix metalloproteinases -2 and -9 was also observed by zymography, as well as an increase in smooth muscle α -actin-containing cells (observed by immunohistochemistry-IHC). A significant degree of lipid peroxidation in the dermis of diabetic animals was demonstrated by TBARS and IHC for 4-hidroxynonenal (4-HNE). The commercial grape seed extract Vitaflavan[®] showed antioxidant capacity and a total content of 46% of proanthocyanidins. NLS were developed using coconut fat. White (empty) NLS and NLS containing Vitaflavan[®] showed similar physical and chemical characteristics, and an average diameter varying between 108.8 ± 1.3 and 144 ± 13.2 nanometers. Topical treatment with the gel (vehicle used for the application of the NLS), white NLS and NLS associated with grape seed extract were efficient to accelerate wound closure in diabetic animals, improving inflammatory cells recruitment and reepithelization. Furthermore, all treatments attenuated lipid peroxidation in the dermis, especially white NLS and NLS containing Vitaflavan[®], demonstrating antioxidant properties. The results suggest, however, that the positive effects of this therapy were also associated with the covering of the wound and consequent prevention of tissue dehydration.

Keywords: Diabetes mellitus. Wound healing. Oxidative stress. Antioxidants. Proanthocyanidins. Nanotechnology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM - Diabetes mellitus

ATP - Adenosina-5'-trifosfato

GLUT – Transportador de glicose

SGLTs - Transportadores de glicose dependentes de sódio

NAD - Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

FADH₂ - Dinucleotídeo de adenina e flavina

UCPs - Proteínas desacopladoras

EROS - Espécies reativas de oxigênio

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

PKC - Proteína quinase C

AGEs - Produtos finais de glicação avançada

NADPH - Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato

GSH - Glutathione

GFAT - Frutose-6-fosfato amidotransferase

UDP - Difosfato de uridina

TGF-β1 - Fator de crescimento transformante-β1

eNOS - Óxido nítrico sintetase endotelial

NAD(P)H oxidase – Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato oxidase

NF-KB - Fator nuclear kappa B

LPO - Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica

MDA - Malondialdeído

4-HNE - 4-hidróxi-2-nonenal

SOD - Superóxido dismutase

GPx - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione redutase

CoQ10 - Coenzima Q10

MMPs - Metaloproteinases de matriz

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

TNF-α - Fator de necrose tumoral α

IL-10 - Interleucina 10

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

PECAM-1 - Molécula-1 de adesão celular endotelial plaquetária

TFPN - Terapia de feridas por pressão negativa

OHB - Oxigenoterapia hiperbárica

NLS - Nanopartículas lipídicas sólidas

O/A - Emulsões óleo/água

HAP - Homogeneização a alta pressão

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TCA - Ácido tricloroacético

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

BHT - Butil-hidroxitolueno

PMFS - Fluoreto de fenilmetilsulfonil

DAB - 3,3'-diaminobenzidina

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD/FLD - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de photo-diode array (DAD) e detector de fluorescência (FLD)

DPPH• - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

AAPH - 2,20-azobis (2-amidino-propano) dicloridrato

TE - Trolox equivalente

AGE - Equivalente em ácido gálico

Span - Distribuição de tamanho de partícula

PDI - Índice de polidispersão

TIMP-2 - Inibidor tecidual de metaloproteinases-2

TBA - Ácido tiobarbitúrico

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Hiperglicemia provoca aumento da produção de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial	21
Figura 2- Superprodução de superóxido ativa vias metabólicas paralelas que podem reforçar o quadro de estresse oxidativo	22
Figura 3- Estruturas representativas das proantocianidinas	32
Figura 4- Grupos experimentais e metodologia empregada na indução do DM e confecção da ferida.....	38
Quadro 1- Composição das suspensões de NLS contendo antioxidante.....	44
Figura 5- Grupos experimentais e metodologia empregada no tratamento das feridas.....	48
Figura 6- Acompanhamento do fechamento da ferida dos animais normoglicêmicos e diabéticos	51
Figura 7- Morfologia das feridas dos animais normoglicêmicos e diabéticos...533	
Figura 8- Atividade de MMP-2 e MMP-9 nas feridas	544
Figura 9- Presença de miofibroblastos na derme lesionada de camundongos normoglicêmicos e diabéticos	55
Figura 10- Deposição de fibras colágenas na ferida dos animais normoglicêmicos e diabéticos	57
Figura 11- Grau de peroxidação lipídica na derme de camundongos normoglicêmicos e diabéticos	59
Figura 12- Espectro de absorção dos padrões catequina, epicatequina, proantocianidina B1 e proantocianidina B2.....	60
Figura 13- Cromatograma obtido por CLAE-FLD (excitação 230 nm e emissão 321 nm) dos padrões (a) e da amostra de Vitaflavan® (b). Padrões identificados no cromatograma	61
Figura 14- Capacidade antioxidante avaliada pelos métodos ORAC (a) e DPPH (b).....	63
Figura 15- Representação gráfica do diâmetro médio e distribuição de diâmetro de partículas determinados por difratometria de laser	65

Figura 16- Perfil reológico das NLS associadas ao extrato de semente de uva e das NLS brancas	68
Figura 17- Fechamento da ferida em camundongos normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com gel.....	71
Figura 18- Fechamento da ferida em camundongos normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com NLS branca	72
Figura 19- Fechamento da ferida em camundongos normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com NLS associadas ao extrato de semente de uva	73
Figura 20- Morfologia das feridas no 3º dia pós-lesão dos animais normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com gel, NLS branca e NLS contendo extrato de uva.....	75
Figura 21- Morfologia das feridas do 10º dia pós-lesão dos animais normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com gel, NLS branca e NLS contendo extrato de semente de uva	76
Figura 22- Morfologia das feridas do 14º dia pós-lesão dos animais normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com gel, NLS branca e NLS contendo extrato de semente de uva	78
Figura 23- Grau de peroxidação lipídica na derme do 10º dia pós-lesão de camundongos normoglicêmicos e diabéticos antes e após tratamento com gel, NLS branca e NLS contendo extrato de semente de uva.	80
Figura 24- Grau de peroxidação lipídica na derme do 14º dia pós-lesão de camundongos normoglicêmicos e diabéticos antes e após tratamento com gel, NLS branca e NLS contendo extrato de semente de uva	81
Figura 25- Cromatograma obtido por KHANAL et al. (2009) a partir da análise por CLAE de extrato de semente de uva não extrusado.	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Mudanças nos parâmetros fisiológicos em camundongos após 30 dias de indução ao diabetes com aloxana comparado com camundongos normoglicêmicos.....	50
Tabela 2- Teor de monômeros e oligômeros de proantocianidina na amostra de extrato de semente de uva (Vitaflavan®).....	62
Tabela 3- Diâmetro médio das nanopartículas contendo o extrato de uva 0,1% e das nanopartículas sem o princípio ativo (nano branca).	66
Tabela 4- Parâmetros analisados na caracterização físico-química das NLS. ..	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Diabetes mellitus - Considerações gerais	19
1.2 Diabetes, metabolismo da glicose e estresse oxidativo	19
1.3 Diabetes e cicatrização de feridas	24
1.4 Tratamento de feridas	28
1.5 Proantocianidinas como agentes antioxidantes	29
1.6 Estratégias em nanotecnologia para acelerar o processo cicatricial	33
2 OBJETIVO	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Materiais	36
3.2 Animais	36
3.3 Indução do diabetes mellitus (DM) e confecção da ferida	Erro! Indicador não definido.
3.4 Caracterização do modelo experimental	38
3.4.1 Cinética de fechamento das feridas	38
3.4.2 Análises histológicas	39
3.4.3 Imunohistoquímica	39
3.4.4 TBARS	40
3.4.5 Zimografia	40
3.5 Caracterização do extrato de semente de uva	41
3.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD/FLD)	41
3.5.2 Atividade antioxidante	42
3.5.2.1 Redução do radical estável DPPH•	42
3.5.2.2 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	43
3.5.3 Determinação de fenólicos totais	43

3.6 Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo extrato de semente de uva	44
3.7 Incorporação das NLS contendo extrato de semente de uva em gel	44
3.8 Caracterização físico-química das NLS.....	45
3.8.1 Teor de fármaco nas formulações	45
3.8.2 Eficiência de encapsulação (EE).....	45
3.8.3 Diâmetro médio das NLS	46
3.8.3.1 Difratometria de laser	46
3.8.3.2 Espalhamento de luz dinâmico.....	46
3.8.3.3 Análise de monitoramento das nanopartículas.....	46
3.8.4 Determinação de pH e condutividade.....	47
3.8.5 Determinação da viscosidade	47
3.9 Atividade antioxidante das NLS	47
3.10 Tratamento tópico com NLS.....	48
3.11 Análise Estatística.....	48
4 RESULTADOS.....	50
4.1 Caracterização do modelo experimental	50
4.1.1 Diabetes mellitus atrasa o fechamento da ferida	50
4.1.2 Diabetes mellitus atrasa a resposta inflamatória e as fases subsequentes da cicatrização.....	52
4.1.3 MMP-2 e MMP-9 estão aumentadas na ferida dos animais diabéticos	54
4.1.4 Diabetes mellitus aumenta miofibroblastos e altera a distribuição de fibras colágenas na ferida	55
4.1.5 Diabetes mellitus aumenta a peroxidação lipídica na derme não-lesionada e lesionada de camundongos	58
4.2 Caracterização do extrato de semente de uva.....	60
4.2.1 Separação e quantificação dos monômeros e oligômeros (proantocianidinas) presentes no extrato de semente de uva	60
4.2.2 Capacidade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais	62
4.3 Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)	64
4.3.1 Seleção da formulação adequada.....	64

4.3.2 Análises das características físico-químicas	66
4.3.2.1 Diâmetro.....	66
4.3.2.2 Teor de fármaco e eficiência de encapsulação	66
4.3.2.3 pH e condutividade.....	67
4.3.2.4 Viscosidade das NLS e dos géis contendo NLS	67
4.3.2.5 Capacidade antioxidante das NLS	68
4.4 Aplicação tópica de gel contendo NLS associadas ao extrato de semente de uva nas feridas de animais controles e diabéticos	69
4.4.1 Tratamento com NLS acelera o fechamento da ferida	69
4.4.2 Tratamento com NLS melhora a resposta inflamatória e promove reepitelização.....	74
4.4.3 Peroxidação lipídica é atenuada pelo tratamento com NLS no 10º e no 14º dias pós-lesão	79
5 DISCUSSÃO.....	82
6 CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus – Considerações gerais

O Diabetes mellitus (DM) é um grupo de desordens metabólicas que acomete aproximadamente 347 milhões de pessoas em todo mundo e é caracterizado pela hiperglicemia crônica, que é a elevada concentração de glicose no sangue (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Esta hiperglicemia pode ser causada por uma deficiência na produção de insulina (diabetes tipo I), resistência à insulina ou secreção alterada desse hormônio (diabetes tipo II). Dependendo da etiologia da doença, a hiperglicemia pode ser modulada de diferentes maneiras, como por exemplo, pela administração de insulina exógena, pelo exercício físico, pela modificação da dieta, etc. No entanto, inúmeras complicações afetam os pacientes diabéticos expostos por um longo período à hiperglicemia crônica, dentre elas as alterações microvasculares, a nefropatia, a retinopatia, a neuropatia e a cicatrização deficiente (MARITIM; SANDERS; WATKINS III, 2003, revisão; TSILIBARY, 2003; WILLIAMS, 1992). A cicatrização deficiente é uma complicação multifatorial e origina as feridas crônicas, principal causa de internações hospitalares de pessoas com diabetes no mundo desenvolvido, uma vez que acometem cerca de 15% dos pacientes, além de precederem 84% de todas as amputações de pernas relacionadas com o DM (BREM; TOMIC-CANIC, 2007; REIBER et al., 1999; YACH; STUCKLER; BROWNELL, 2006). Sendo assim, o surgimento de feridas crônicas pode ser extremamente danoso em termos de longevidade e qualidade de vida dos pacientes, acarretando perda da produtividade e aumento dos gastos do sistema público de saúde.

1.2 Diabetes, metabolismo da glicose e estresse oxidativo

A glicose ($C_6H_{12}O_6$) é considerada a principal fonte de energia dos organismos eucariontes. Esta molécula desempenha um papel central no metabolismo e na manutenção da homeostase celular e atua como fonte primária na geração de adenosina-5'-trifosfato (ATP). Por se tratar de uma molécula hidrofílica, a glicose é transportada para dentro da célula através de difusão facilitada, acoplada a proteínas carreadoras associadas à membrana, como por exemplo, facilitadores do

transporte de glicose (GLUT) ou transportadores de glicose dependentes de sódio (SGLTs) (SCHEEPERS; JOOST; SCHÜRMANN, 2004, revisão).

No meio intracelular, a oxidação da glicose inicia-se com a glicólise. Nesta etapa, que ocorre no citoplasma, a molécula de glicose sofre sucessivas transformações até dar origem ao piruvato ($C_3H_4O_3$), que pode seguir dois caminhos distintos: ser convertido em lactato pela enzima citoplasmática lactato desidrogenase e então sair da célula e fornecer substrato para a gliconeogênese hepática (BROWNLEE, 2001, revisão), ou ser transportado até a mitocôndria onde será oxidado no ciclo de Krebs, produzindo CO_2 , H_2O , NADH e $FADH_2$. Os doadores de elétrons, NADH e o $FADH_2$, fornecem energia para a produção de ATP através da fosforilação oxidativa pela cadeia de transporte de elétrons, etapa subsequente ao ciclo de Krebs. O fluxo de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons é realizado por quatro complexos enzimáticos associados à membrana interna, pelo citocromo c e pela coenzima Q (ubiquinona). O NADH doa elétrons para o complexo I, enquanto que o $FADH_2$ doa elétrons ao complexo II. Os elétrons do complexo I e II são então transferidos para a coenzima Q, complexo III, citocromo C, complexo IV, consecutivamente, até serem transferidos para o oxigênio molecular, onde serão reduzidos à água. Uma parte da energia desses elétrons é utilizada para bombear prótons através da membrana pelos complexos I, III e IV. A energia gerada por este gradiente dirige a síntese de ATP pela ATP sintase (Figura 1). Proteínas desacopladoras (UCPs) podem diminuir o gradiente de voltagem para gerar calor como forma de manter a taxa de produção de ATP constante.

Na condição hiperglicêmica, devido ao alto teor de glicose dentro das células, há mais glicose sendo oxidada no ciclo de Krebs e uma maior entrada de doadores de elétrons (NADH e $FADH_2$) na cadeia de transporte de elétrons. Como consequência, o gradiente através da membrana mitocondrial aumenta até atingir um limiar crítico. Quando este limiar é atingido, a transferência de elétrons é bloqueada no interior do complexo III, fazendo com que os elétrons retornem para a coenzima Q, onde ocorre a redução de O_2 a superóxido, $O_2^{\bullet-}$ (BROWNLEE, 2001, 2005, revisão) (Figura 1).

Figura 1- Hiperglicemia provoca aumento da produção de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

A alta concentração de glicose dentro das células estimula um aumento da produção de doadores de elétrons (NADH e FADH_2) pelo ciclo de Krebs. O bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna gera um alto potencial de membrana ($\Delta\psi_{\text{H}^+}$). Isso inibe o transporte de elétrons no complexo III, aumentando assim, a meia vida de radicais livres intermediários da coenzima Q, a qual reduz O_2 a superóxido.

Fonte: Brownlee, 2001 (Revisão).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas sob determinadas condições fisiológicas, podendo atuar como moléculas sinalizadoras e em mecanismos de defesa, como por exemplo na fagocitose. No entanto, quando produzidas em excesso, podem ter consequências patológicas, uma vez que são capazes de danificar proteínas, lipídeos e DNA, diretamente ou indiretamente (JOHANSEN et al., 2005, revisão).

No diabetes, a superexpressão de superóxido diminui a atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), enzima que atua na via glicolítica, responsável pela conversão de gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato. A inibição de GAPDH leva a um acúmulo de gliceraldeído-3-fosfato e de metabólitos das reações anteriores da via, como frutose-6-fosfato e glicose-6-fosfato, os quais são substratos para a via dos polióis, via das hexosaminas, via das proteínas quinases C (PKC) e para a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Figura 2).

Figura 2- Superprodução de superóxido ativa vias metabólicas paralelas que podem reforçar o quadro de estresse oxidativo.

Superóxido em excesso inibe parcialmente a atividade da enzima GAPDH, acarretando no acúmulo de metabólitos da via glicolítica e ativação de vias metabólicas paralelas: via do poliol, via das hexosaminas, via da PKC e formação de AGEs. Estas vias metabólicas paralelas ativadas podem potencializar o dano celular.

Fonte: Brownlee, 2001 (Revisão).

Sabe-se que o aumento do fluxo dessas vias metabólicas paralelas pode exacerbar o quadro de estresse oxidativo, dentre outros efeitos. Lee e Chung (1999) relataram que o aumento do fluxo da via dos polióis leva à diminuição do NADPH disponível na célula, consumido na redução de glicose à sorbitol. Como este cofator é utilizado na regeneração de glutathione (GSH), antioxidante intracelular, a diminuição do NADPH acarreta uma maior susceptibilidade ao estresse oxidativo na célula.

As moléculas de frutose-6-fosfato acumuladas na via glicolítica são desviadas para a via das hexosaminas, onde são convertidas em glucosamina-6-fosfato pela enzima chamada glutamina: frutose-6 fosfato amidotransferase (GFAT) e então convertidas em difosfato de uridina (UDP) N-acetil glucosamina. Esta glucosamina modifica fatores de transcrição através da adição de resíduos de serina e treonina, resultando em alterações patológicas na expressão gênica. Du et al. (2000)

observaram que o aumento das modificações do fator de transcrição Sp1 resultou no aumento da expressão do fator de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1) e do inibidor do ativador de plasminogênio-1, ambos fatores que afetam negativamente os vasos sanguíneos dos diabéticos.

Em relação à via da PKC, a alta concentração de glicose dentro da célula provoca um aumento da síntese de uma molécula chamada diacilglicerol, um co-fator essencial para a ativação das isoformas clássicas desta proteína quinase. A ativação de PKCs exerce uma variedade de efeitos sobre a expressão gênica. Um exemplo é a diminuição da produção do vasodilatador óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e, concomitantemente, o aumento do vasoconstrictor endotelina-1, provocando anormalidades no fluxo sanguíneo. Outra consequência da ativação de PKC é o aumento da ativação de NAD(P)H oxidases, que irão estimular a produção de EROs, provocando múltiplos efeitos celulares (BROWNLEE, 2001, revisão).

O aumento da produção intracelular de precursores de AGEs pode levar à alteração funcional de proteínas intracelulares, modificação de componentes da matriz extracelular e modificação de proteínas plasmáticas, que se ligam aos receptores de AGEs em diferentes tipos celulares (inclusive células endoteliais, mesangiais e macrófagos), induzindo produção de EROs mediada por estes receptores. Além disso, essa ligação aos receptores de AGEs ativa o fator de transcrição pleiotrópico NF- κ B, alterando a expressão gênica e estimulando a síntese e secreção de citocinas inflamatórias (BROWNLEE, 2001, 2005, revisão).

As EROs podem interagir com os lipídeos insaturados das membranas celulares, levando à sua destruição ou até à morte celular, em um processo conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO). O processo de peroxidação lipídica pode ser definido como uma cascata de eventos bioquímicos que irão resultar na formação de hidroperóxidos lipídicos (em uma fase inicial) e aldeídos reativos, tais como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE) (em uma fase mais tardia), dentre outros produtos. Estes aldeídos reativos podem interagir com proteínas e ácidos nucleicos e gerar adutos (JAGANJAC et al., 2013; POLI; SCHAUR, 2000, revisão; TRAVERSO et al., 1998). Por serem facilmente detectadas em amostras biológicas, estas moléculas reativas são utilizadas como marcadores de estresse oxidativo, empregando-se diferentes técnicas de detecção (LIMA; ABDALLA, 2001).

O balanço entre a geração de radicais livres e defesa antioxidante é extremamente importante. Quando há um aumento significativo na geração de radicais ou uma diminuição na eliminação destes, podemos utilizar o termo “estresse oxidativo”, já mencionado anteriormente.

Nosso organismo é munido de mecanismos de defesa antioxidante que envolvem estratégias enzimáticas e não enzimáticas. Antioxidantes enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), enquanto que os antioxidantes não enzimáticos incluem as vitaminas A, C e E, glutathione, ácido α -lipóico, coenzima Q10 (CoQ10), bioflavonóides, carotenoides, antioxidantes minerais, como cobre, zinco e manganês, dentre outros (MATOUGH et al., 2012, revisão; VALKO et al., 2007, revisão).

Diversos estudos têm mostrado que o DM está relacionado com uma defesa antioxidante suprimida e que esta condição é normalizada com tratamento utilizando antioxidantes (MARITIM; SANDERS; WATKINS III, 2003, revisão). Experimentos realizados por Rasik e Shukla (2000) mostraram uma diminuição de 22% da atividade da enzima catalase, uma redução de 22% no conteúdo de glutathione (GSH), uma diminuição de 65% no nível de ácido ascórbico e de 57% no teor de vitamina E na pele de ratos diabéticos quando comparados com os controles.

1.3 Diabetes e cicatrização de feridas

Conforme mencionado anteriormente, a cicatrização deficiente de feridas é uma complicação comum do DM, que acomete um grande número de pacientes diabéticos levando a uma piora na qualidade de vida. Por isso, este processo merece ser abordado mais detalhadamente.

A cicatrização é um processo fisiológico que procede por meio de uma série de eventos celulares, culminando na restauração da integridade funcional dos tecidos. Este processo envolve um grande número de tipos celulares e pode ser dividido didaticamente em quatro etapas: hemostasia, inflamação, formação do tecido de granulação e remodelação.

Imediatamente após a injúria, as plaquetas se agregam no local da lesão formando o tampão plaquetário, que irá conter o extravasamento sanguíneo. As plaquetas liberam citocinas e outros fatores para recrutar células inflamatórias para o

local da lesão. Os neutrófilos dão início à resposta inflamatória chegando dentro de 1 hora, seguidos dos macrófagos (24 – 48 horas após a injúria). A formação do tecido de granulação ocorre em torno de 48 horas após a lesão e é caracterizada pelo início da angiogênese e recrutamento de fibroblastos, estimulados principalmente por citocinas secretadas por macrófagos. Os fibroblastos do tecido não lesionado proliferam e migram para o local da injúria, onde secretam matriz extracelular. Além disso, estes também podem diferenciar-se em miofibroblastos, assumindo um fenótipo contrátil, importante para a contração da ferida. Na fase de remodelação, os fibroblastos e células inflamatórias remanescentes secretam metaloproteinases de matriz (MMPs) para ajudar no realinhamento e *cross-linking* (formação de ligações covalentes em fibrilas) de colágeno da matriz. Concomitantemente, o epitélio vai sendo restabelecido pela proliferação e migração de queratinócitos presentes nas bordas da lesão sobre a matriz extracelular. Ao final de semanas ou meses, dependendo do grau da lesão, a pele está completamente restabelecida (SONNEMANN; BEMENT, 2011, revisão).

Sabe-se que a imunidade celular exerce um papel importante na regulação do reparo de feridas. Citocinas pró-inflamatórias ajudam a proteger contra a infecção, preparam o tecido lesionado para o reparo e melhoram o recrutamento e ativação fagocitária (LOWRY, 1993¹ apud RASIK; SHUKLA, 2000). Em contrapartida, as citocinas anti-inflamatórias atuam como um mediador importante na retroalimentação negativa do processo. Assim, qualquer desregulação dessas citocinas pode levar à diminuição da disponibilidade de fatores essenciais para o reparo eficiente de feridas.

As citocinas pró-inflamatórias, especialmente a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), são secretadas durante a fase inflamatória do processo de cicatrização (SINGER; CLARK, 1999, revisão). A IL-1 é produzida por neutrófilos, monócitos, macrófagos e queratinócitos e durante a cicatrização é liberada imediatamente por queratinócitos; tem um efeito parácrino e pode atuar de forma autócrina, aumentando a proliferação e migração de queratinócitos. IL-1 também induz expressão de queratinas k6 e k16 em

¹ LOWRY, S. F. Cytokine mediators of immunity and inflammation. **Archives of Surgery**, v. 28, p. 1235-1241, 1993.

queratinócitos migratórios e ativa fibroblastos (FREEDBERG et al., 2001, revisão; TANG; GILCHREST, 1996).

TNF- α em baixos níveis pode promover cicatrização por estimular indiretamente a inflamação e o aumento de fatores de crescimento produzidos por macrófagos. No entanto, em altos níveis, principalmente em períodos prolongados de tempo, o TNF- α exerce um efeito prejudicial sobre a cicatrização. Já foi demonstrado que os níveis das citocinas TNF- α e IL-1 β estão elevados em feridas crônicas. Além disso, feridas não cicatrizadas também apresentam níveis elevados de collagenases intersticiais, gelatinases e estromelisinases que são induzidos por TNF- α e IL-1 β (TARNUZZER; SCHULTZ, 1996² apud BARRIENTOS et al., 2008, revisão; WALLACE; STACEY, 1998).

A citocina IL-6 é produzida por neutrófilos e monócitos e desempenha papel importante na iniciação da resposta de cicatrização. Vários efeitos pró-inflamatórios são atribuídos à IL-6, como efeitos quimioatrativos sobre neutrófilos na fase mais precoce e indução mitótica de queratinócitos (GALLUCCI et al., 2004).

Dentre as citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 é uma das mais conhecidas. Acredita-se que ela seja o mais importante mediador com papel limitador e finalizador da resposta inflamatória. Esta citocina regula o crescimento e diferenciação de várias células do sistema imune, de queratinócitos e de células endoteliais (MOORE et al., 2001, revisão). Estudos realizados por Sato et al. (1999) mostraram um papel regulatório importante da IL-10 na produção de citocinas durante a resposta inflamatória da cicatrização, como por exemplo, a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α em macrófagos ativados.

A angiogênese ocorre para suprir o crescimento do tecido com condições adequadas de oxigênio e nutrição durante a cicatrização. No entanto, complicações vasculares provocadas pela hiperglicemia são comumente associadas a alterações visuais, nervosas e na cicatrização de feridas, consequência da inadequada transferência de nutrientes e oxigênio ao tecido.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma glicoproteína produzida por muitos tipos celulares que participam da cicatrização de feridas como células endoteliais, fibroblastos, plaquetas, neutrófilos e macrófagos (BAO et al.,

² TARNUZZER, R. W.; SCHULTZ, G. S. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair and Regeneration*, v. 4, p. 321-325, 1996.

2009). O VEGF funciona como mitógeno de células endoteliais (LEUNG et al., 1989), agente quimiotático (YOSHIDA et al., 1996³ apud BAO et al., 2009) e indutor de permeabilidade vascular (BRKOVIC; SIROIS, 2007). Outra molécula que parece desempenhar um papel importante na angiogênese é a molécula-1 de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1). PECAM-1 é uma glicoproteína de membrana expressa em plaquetas, leucócitos e em células endoteliais, onde estão presentes em maior quantidade na junções intercelulares. Estudos realizados por DeLisser et al. (1997) e Zhou et al. (1999) demonstraram que o tratamento com bloqueadores de PECAM-1 inibiu a angiogênese induzida por citocinas e a angiogênese tumoral em diversos modelos animais.

O fibroblasto desempenha um papel central no processo de deposição de matriz extracelular e remodelação e funciona como uma célula sinalizadora, secretando fatores de crescimento importantes para a comunicação célula-célula durante o processo de reparo. Além disso, os fibroblastos produzem MMPs que são enzimas críticas para a migração celular e remodelação do tecido durante a cicatrização. Lerman et al. (2003) observaram níveis elevados de MMPs em feridas com cicatrização prejudicada em camundongos e no exsudato de feridas crônicas.

Diversos fatores envolvidos na cicatrização deficiente de feridas diabéticas já foram identificados, como diminuição da angiogênese (FALANGA, 2005, revisão), produção de fatores de crescimento prejudicada (DOXEY et al., 1995; WERNER et al., 1994), resposta inflamatória suprimida (OCHOA; TORRES; SHIREMAN, 2007), aumento da apoptose de queratinócitos e células endoteliais (BAUMGARTNER-PARZER et al., 1995; DEVECI et al., 2005), desequilíbrio entre acúmulo de componentes extracelulares e sua remodelação por MMPs (NEELY et al., 2000; PIRILÄ et al., 2007; VAALAMO et al., 1997), alteração na proliferação de queratinócitos (SPRAVCHIKOV et al., 2001) e na proliferação e migração de fibroblastos (LERMAN et al., 2003; LAMERS et al., 2011), dentre outros.

³ YOSHIDA, A.; ANAND-APTE, B.; ZETTER, B. R. Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors*, vol. 13, n. 1-2, p. 57-64, 1996.

1.4 Tratamento de feridas

O tratamento de feridas geralmente é baseado em terapias tópicas que são norteadas pelos seguintes princípios: remover tecidos necróticos e corpos estranhos do leito da ferida, eliminar processos infecciosos, absorver o excesso de exsudato, manter a região da ferida úmida, promover isolamento térmico, proteger a ferida de traumas, dentre outros (BLANES, 2013).

A limpeza e remoção de tecido desvitalizado (debridamento) é uma terapia bastante utilizada para facilitar o processo de cura de diversos tipos de feridas, uma vez que a presença de tecido desvitalizado representa um grande impedimento para a cicatrização de feridas. Os métodos de debridamento mais comuns incluem o debridamento autolítico, o debridamento enzimático ou químico, o debridamento mecânico e o debridamento cirúrgico ou instrumental, os quais são indicados de acordo com as necessidades do paciente (BLANES, 2013; VALACCHI et al., 2012, revisão).

Além da limpeza e debridamento, outro método bastante empregado é a oclusão de feridas com curativos ou coberturas. O uso de curativos proporciona condições ideais para a cicatrização pelo fato de criar e manter um ambiente úmido no local da ferida, o qual evita a desidratação dos tecidos e morte celular, além de aumentar a taxa de epitelização, proliferação celular e angiogênese. Diversos curativos estão disponíveis no mercado, como filmes semipermeáveis de poliuretano, hidrocolóides, que em contato com a ferida interagem com o exsudato para formar um gel, hidrogéis constituídos de uma matriz polimérica, alginatos, que são produzidos a partir do ácido algínico encontrado em algas marinhas marrons, curativos de espuma e curativos antimicrobianos impregnados com prata ou iodo (BLANES, 2013; JONES; GREY; HARDING, 2006).

Terapia de feridas por pressão negativa (TFPN) é um método bastante popular, eficaz e seguro para o tratamento de úlceras diabéticas (XIE; MCGREGOR; DENDUKURI, 2010). Este método proporciona uma pressão subatmosférica para a região da ferida através de uma bomba a vácuo, sendo a área selada com filme adesivo. A pressão negativa pode reduzir o edema perilesional e hipóxia, além de estimular a proliferação celular. A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) também vem sendo utilizada no tratamento de feridas como forma de melhorar os valores baixos

de O₂ de tecidos hipóxicos e por apresentar algum efeito bactericida (VALACCHI et al., 2012, revisão).

Atualmente, o interesse no uso de antioxidantes no tratamento de feridas crônicas está crescendo, uma vez que vários estudos em animais e em humanos têm mostrado a eficácia desses compostos na cicatrização, principalmente em condições de produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e defesa antioxidante prejudicada, como no caso do DM (FITZMAURICE; SIVAMANI; ISSEROFF, 2011, revisão).

Tratamentos utilizando vitamina C (ácido ascórbico), vitamina D, vitamina E, enzima superóxido dismutase, ácido α -lipóico e fontes antioxidantes de origem vegetal, como proantocianidinas, epigallocatequina galato, curcumina e própolis resultaram, de uma maneira geral, em uma melhora da cicatrização de feridas e da defesa antioxidante (ALLEVA et al., 2005; KAPOOT et al., 2004; KHANNA et al., 2002; MCLENNAN et al., 2008; MUSALMAH, et al., 2005; PANCHATCHARAM et al., 2006; RAMESH; MAHINDRAKAR; BHAT, 1993; TAYLOR et al., 1974; VORAUER-UHL et al., 2002).

1.5 Proantocianidinas como agentes antioxidantes

Devido ao fato do estresse oxidativo desempenhar um papel negativo em eventos celulares fundamentais para uma cicatrização eficiente, um grande número de estudos *in vivo* vem sendo realizado utilizando antioxidantes em modelos diabéticos experimentais.

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: eles podem bloquear a iniciação da oxidação – atividade exercida por enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio – ou podem interagir com os radicais e serem consumidos durante a reação. Nesta última, incluem-se os antioxidantes naturais ou sintéticos como os compostos fenólicos (ANGELO; JORGE, 2007, revisão).

As sementes de uva são uma fonte rica em proantocianidinas, também conhecidas como taninos condensados, que constituem uma classe de compostos fenólicos amplamente encontrados em frutas, verduras, nozes, sementes, flores e cascas de algumas plantas. Os compostos fenólicos são divididos em 10 diferentes classes de acordo com a sua estrutura básica, sendo os flavonóides uma das mais

importantes. Esta classe pode ser dividida em 13 sub-classes, dentre elas, os flavanóis.

As proantocianidinas são polímeros de alto peso molecular que têm como precursores unidades monoméricas de flavan-3-óis (catequinas e epicatequinas) em união com flavan-3,4-dióis ou leucoantocianidinas (EFRAIM, 2004). Quando as moléculas que se condensam são catequinas (Figura 3 A) ou epicatequinas (Figura 3 B), as proantocianidinas são denominadas procianidinas (WOLLGAST; ANKLAM, 2000). Estas unidades monoméricas podem ser ligadas entre si por uma ligação simples C4-C8 ou C4-C6, que é referida como tipo B (Figura 3 C) ou podem ainda apresentar uma ligação éter adicional C2-O-C7 ou C2-O-C5 que é referida como tipo A (Figura 3 D) (APPELDOORN, 2009).

A quantidade, a estrutura e o grau de polimerização das proantocianidinas presentes na uva diferem. Proantocianidinas da semente de uva são oligômeros e polímeros formados por ligações do tipo B, principalmente proantocianidinas B1 e B2 (MONAGAS et al., 2003). A diferença entre as proantocianidinas B1 e B2 é basicamente o tipo de monômero. Enquanto as proantocianidinas B1 são formadas pela união de um monômero de catequina e um monômero de epicatequina (Figura 3 E), as proantocianidinas B2 são formadas pela união de dois monômeros de epicatequina (Figura 3 F).

Diversas propriedades biológicas vêm sendo atribuídas às proantocianidinas, como atividade antioxidante (BAGCHI et al., 1997; 1998; CHIS et al., 2009; LEE et al., 2007), aceleração da cicatrização de feridas e queimaduras (HUPKENS; BOXMA; DOKTER, 1995; ROOT-BERNSTEIN, 1982⁴ apud KHANNA et al., 2002; HEMMATI et al., 2011;; KHANNA et al., 2002), efeito fotoprotetor (AFAQ; KATIYAR, 2011) e atividade anticancerígena (KATIYAR, 2008; KAUR et al., 2006; 2008; KIM et al., 2005; MEERAN; KATIYAR, 2007). Alguns estudos demonstraram que o extrato de semente de uva pode ser considerado um potente agente na prevenção de algumas doenças, dentre elas o DM (EL-ALFY; AHMED; FATANI, 2005; PINENT et al., 2004; ZUNINO et al., 2009).

⁴ ROOT-BERNSTEIN, R. S. Tannic acid, semipermeable membranes, and burn treatment. *Lancet*, v. 2, p. 1168, 1982.

Sabe-se que o poder antioxidante das proantocianidinas é vinte vezes maior do que a vitamina E e cinquenta vezes maior que a vitamina C (USHIDA, 1980⁵ apud SHI et al., 2003, revisão). Quando comparadas às vitaminas C, E e beta-caroteno, as proantocianidinas provenientes do extrato da semente da uva oferecem maior proteção contra os radicais livres e peroxidação lipídica (BAGCHI et al., 1997). Sendo assim, são excelentes agentes antioxidantes.

⁵ UCHIDA, S. Condensed tannins scavenging active oxygen radicals. Medical Science Research, v. 15, p. 831-832, 1980.

Figura 3- Estruturas representativas das proantocianidinas.

As unidades monoméricas catequina (a) e epicatequina (b) podem ser unidas através de uma ligação simples entre os carbonos C4-C8 ou C4-C6 (c) ou com uma ligação éter adicional C2-O-C7 ou C2-O-C5 (d). Dímeros formados por monômeros de catequina e epicatequina são conhecidos como procianidinas B1 (e) e dímeros formados apenas por epicatequinas são conhecidos como procianidinas B2 (f).

1.6 Estratégias em nanotecnologia para acelerar o processo cicatricial

Devido aos transtornos causados pela cicatrização deficiente, tem se buscado desenvolver alternativas biotecnológicas que acelerem o processo cicatricial.

Atualmente, as principais formas farmacêuticas de liberação controlada e/ou sustentada podem ser agrupadas em glóbulos revestidos, matrizes de desintegração lenta, bombas osmóticas, adesivos transdérmicos, géis, implantes poliméricos, microemulsões, lipossomos, microesferas, nanoesferas, nanofibras, nanocápsulas, nanotubos de carbono, nanopartículas lipídicas sólidas e, mais recentemente, carreadores lipídicos nanoestruturados (CHOI; LEONG; YOO, 2008; GIBAUD; ATTIVI, 2012, revisão; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007, revisão; LIMA; SILVA; JÚNIOR, 2000; MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998; MÜLLER et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2004; PAGONA; ORÉFICE; CUNHA, 2010, revisão; SAHOO; LABHASETWAR, 2003, revisão; TAGMATARCHIS, 2006).

Diversos estudos têm focado no desenvolvimento de biopolímeros ou matrizes contendo proteínas da matriz extracelular, bem como na utilização de fatores de crescimento solúveis que estimulem e suportem células e tecidos (CLARK; GHOSH; TONNNESEN, 2007; GHOSH et al., 2006; MACRI; CLARK, 2009). Entretanto, tais metodologias que empregam elementos bioativos, além de terem um custo muito elevado, apresentam como fator complicador a meia-vida muito curta.

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram desenvolvidas no início dos anos 90 como um sistema alternativo de encapsulação de princípios ativos em relação aos sistemas coloidais tradicionais, tais como emulsões, lipossomos e nanopartículas poliméricas (SOUTO et al., 2011, revisão). As NLS podem ser utilizadas por todas as vias de administração, como a oral, parenteral e cutânea devido ao seu tamanho reduzido (50 - 1000 nm) e biocompatibilidade (MUCHOW; MAINCENT; MÜLLER, 2008). Quando comparadas com outros sistemas coloidais, as NLS apresentam certas vantagens, como maior estabilidade físico-química da droga/ fármaco incorporado, aumento de carga, incorporação de fármacos lipofílicos e hidrofílicos, ausência de biotoxicidade causada pelo carreador, fácil produção em larga escala e esterilização (DETONI et al., 2012; MEHNERT; MÄDER, 2001, revisão; MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998).

As NLS são derivadas de emulsões óleo/água (O/A) por simples substituição do óleo por um lipídeo sólido, o qual permanece nesse estado sob a temperatura corporal (MÜLLER et al., 2007, revisão). Dentre os métodos preconizados para a preparação de dispersões nanométricas de lipídeos sólidos, a homogeneização a alta pressão (HAP) é considerada a técnica mais efetiva em produzir partículas com tamanho reduzido, geralmente inferior a 500 nm, além de adequada distribuição de tamanho (Souto et al., 2011, revisão).

De forma geral, os sistemas nanoestruturados retardam a liberação do princípio ativo (sustentar), controlam a sua liberação e/ou direcionam a sítios específicos de ação (células, órgãos, microorganismos), proporcionando melhor adesão do paciente à terapêutica proposta, otimização da dose total do princípio ativo (emprega-se em geral doses menores) e aumento da eficiência do tratamento.

Devido ao fato de 1) o processo cicatricial normal induzir *per se* um aumento na geração de EROs no local da injúria; 2) o estado hiperglicêmico causado pelo DM propiciar a exacerbação da geração de radicais livres por diferentes tipos celulares e uma supressão das defesas antioxidantes; 3) o estresse oxidativo desempenhar um papel negativo na migração celular, um processo importante na cicatrização de feridas (LAMERS et al., 2011); 4) a utilização de diferentes agentes antioxidantes para tratamento de feridas crônicas ser uma terapia potencialmente benéfica e 5) a associação de antioxidantes a nanopartículas ser uma possibilidade economicamente viável, proporcionar longa estabilidade e reduzida possibilidade de efeitos colaterais, este estudo teve como principal objetivo avaliar a eficácia da utilização de NLS como veículos para a administração de antioxidantes provenientes de sementes de uvas em feridas cutâneas de camundongos diabéticos, visando à aceleração da cicatrização de feridas.

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos da administração tópica de extrato de semente de uva associado à NLS sobre a cicatrização cutânea de camundongos controles e diabéticos, observando a cinética de cicatrização, alterações da matriz de colágeno e grau de estresse oxidativo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Poly-L-Lysine, citrato de sódio, Paraplast[®], MDA, Tris-HCl, Triton x-100, azida de sódio (NaN₃), cloreto de cálcio (CaCl₂), butil-hidroxitolueno (BHT), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), gelatina do tipo A de pele suína, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMFS), aprotinina, trolox, padrões analíticos para catequina, epicatequina, procianidina B1, procianidina B2 e outros reagentes foram provenientes da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os anestésicos xilazina/ketamina e isoflurano foram obtidos da Agner União Saúde Animal (São Paulo, SP, Brasil) e do Instituto BioChimico Indústria Farmacêutica Limitada (Itatiaia, RJ, Brasil), respectivamente. Solução de formaldeído 37% e metanol foram obtidos da Merck Millipore KGaA (Darmstadt, HE, Alemanha). Xilol e álcool etílico absoluto foram provenientes da Labsynth Produtos para Laboratório Ltda. (Diadema, SP, Brasil) e o kit MOM[®] da Vector Laboratories Ltd. (Orton Southgate, PE, Reino Unido). Os anticorpos primários anti-4-HNE e anti- α -actina de músculo liso foram obtidos da Abcam (Cambridge, MA, EUA), enquanto que o anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho e aloxana foram provenientes da Invitrogen Life Technologies Inc. (Grand Island, NY, EUA).

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos da linhagem Swiss (*Mus Musculus*, ordem Rodentia mammalia, família Muridae) com 60 dias de idade, provenientes do Biotério de Camundongos do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (majoritariamente), do Biotério da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP) e do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Os animais receberam ração e água *ad libitum* e foram mantidos sob condições padrão de luminosidade (ciclo de 12 h claro/ 12 h escuro) e temperatura em torno de 22 °C. O protocolo de pesquisa utilizado está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela

Comissão de Ética no Uso de Animais do ICB-USP (CEUA), registrado sob nº35/2011 nas fls.101 do livro 02, em 24.03.2011, com validade de 03 anos.

3.3 Indução do diabetes mellitus (DM) e confecção da ferida

Os animais foram divididos inicialmente em 2 grupos: grupo 1- controle e grupo 2- diabético. O DM foi induzido nos camundongos por meio de injeção intravenosa de aloxana (70mg/kg de peso corporal, diluída em tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 4,5), enquanto os animais do grupo controle receberam apenas o veículo (Figura 4). A aloxana é uma droga que induz a destruição das células β pancreáticas produtoras de insulina, pela produção de EROs. Todos os animais foram submetidos a um jejum de 16 h previamente à indução do DM. Os níveis de glicose sanguínea foram mensurados 72 h após a indução e 30 dias após a confirmação do diabetes (em jejum de 4 horas), utilizando o aparelho Accu-Chek (Roche Diagnostics, Brasil). Apenas animais com glicemia igual ou superior a 350 mg/ dL foram considerados diabéticos. Em um intervalo de tempo de 7 dias, alguns parâmetros fisiológicos foram avaliados para a confirmação do estado hiperglicêmico; o consumo alimentar e a ingestão de água foram medidos a cada dois dias, enquanto que o volume urinário foi medido em um período de 22 h, com a utilização de gaiolas metabólicas. O peso dos animais foi medido antes da indução e 30 dias após a indução do DM. Após 30 dias de DM, os animais foram induzidos ao relaxamento e narcose utilizando-se uma mistura de xilazina/ ketamina na concentração de 0,4 mg/ kg de peso corporal, por via intraperitoneal, para confecção da ferida (Figura 4). Após a tricotomia, uma marcação foi feita no dorso dos animais utilizando uma caneta porosa e um molde plastificado de 3 cm², vazado no centro com 1 cm². A remoção da área demarcada foi feita com o auxílio de uma pinça e tesoura ponta fina. Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas individuais (7,5 x 12 cm) e aquecidos, sob luz e com proteção ocular, para evitar hipotermia. Todos os animais receberam uma dose única de analgésico paracetamol (75 mg/ kg) junto com a água logo após a confecção da ferida.

Figura 4- Grupos experimentais e metodologia empregada na indução do DM e confecção da ferida.

Camundongos Swiss machos foram induzidos ao diabetes por meio de injeção intravenosa de aloxana (70 mg/kg de peso) (Grupo 2), enquanto os animais controles foram injetados apenas com o veículo (Grupo 1). A glicemia foi aferida 72 horas após a indução e os animais que apresentaram glicemia ≥ 350 mg/dl foram considerados diabéticos. Os animais permaneceram diabéticos por 30 dias e durante este período alguns parâmetros fisiológicos foram avaliados. Ao final de 30 dias, os animais de ambos os grupos foram anestesiados e uma lesão de 1 cm² foi realizada na região dorsal.

3.4 Caracterização do modelo experimental

3.4.1 Cinética de fechamento das feridas

A região da ferida foi fotografada logo após o procedimento cirúrgico e no 3º, 7º, 10º e 14º dia pós-lesão com câmera digital Sony (Cyber-shot 7,2 mega pixels) a uma distância fixa de 20 cm de altura. Após a obtenção da imagem digitalizada a área da ferida foi medida utilizando o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Para capturar as imagens sem estressar o animal, induzimos a narcose com isoflurano embebido em algodão e acondicionado em uma caixa de acrílico adaptada a este fim. Os resultados foram expressos como a porcentagem (%) de redução a partir da área da ferida inicial (100%).

3.4.2 Análises histológicas

Para a realização das análises histológicas, os animais foram anestesiados utilizando-se uma mistura de xilazina/ ketamina na concentração de 0,4 mg/ kg de peso corporal, por via intraperitoneal. A região da ferida foi removida (juntamente com uma pequena região adjacente intacta) no 3º, 7º, 10º e 14º pós-lesão, devidamente posicionada em pedaços de cortiça e fixada em formaldeído 10% por 8 horas à temperatura ambiente. Após a remoção da pele os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico. As amostras foram desidratadas em gradiente crescente de etanol (70%, 95% e 100%), diafanizadas em Xilol (I, II e III) e incluídas em paraplast®. Cortes de 7 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotatório manual (820 Spencer Microtome), estendidos sobre lâminas previamente cobertas com Poly-L-Lysine, desparafinizados, hidratados e corados com hematoxilina/ eosina para avaliar os aspectos gerais da ferida, e pela técnica de Picrosirius, a fim de avaliar a distribuição de colágeno fibrilar. As imagens foram obtidas com câmera digital (CF160 Epi – Fluorescence Optics) acoplada a um microscópio (Nikon E600 Eclipse Microscopic).

3.4.3 Imunohistoquímica

As peles retiradas no 10º e 14º dia pós-lesão foram fixadas em formaldeído 10% por 8 horas à temperatura ambiente e processadas como descrito no item anterior. Para as análises imunohistoquímicas, as amostras foram desparafinizadas em xilol (Xilol I, II e III) e hidratadas em gradiente decrescente de etanol (100%, 95% e 70%). Foram utilizados os seguintes anticorpos: policlonal de coelho anti-4-HNE, diluição 1:50 (incubação 16 h), para avaliação do grau de peroxidação lipídica, e monoclonal (camundongo) anti- α -actina de músculo liso, diluição 1:500 (incubação 16 h), para evidênciação de miofibroblastos. Ausência do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo da reação. Os anticorpos secundários utilizados foram biotinilados e o bloqueio foi realizado com o soro não imune do animal utilizado para preparar o anticorpo secundário ou com o kit MOM®. A marcação foi visualizada utilizando 3,3'-diaminobenzidine (DAB) e a contra-coloração nuclear foi feita com hematoxilina de Mayer. As imagens foram obtidas com câmera digital

(CF160 Epi – Fluorescence Optics) acoplada a um microscópio (Nikon E600 Eclipse Microscopic).

3.4.4 TBARS

A dosagem do MDA foi realizada pela técnica de TBARS (detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) no homogenato da região da ferida e da área adjacente no 10º dia. As amostras foram picadas com o auxílio de uma tesoura em tampão tris-HCl 10 mM contendo triton x-100 0,1%, TBA 0,73%, TCA 30%, EDTA 0,5 mM e BHT 29,5 mM. O homogenato foi agitado, aquecido a 100 °C por 30 minutos e centrifugado (3000 rpm, 4 °C por 10 minutos). A leitura da quantidade de MDA no sobrenadante foi feita em placa para leitor de ELISA (Spectramax Molecular Advice) no comprimento de onda de 535 nm. A curva padrão foi preparada utilizando-se 1,3,3 tetrametoxipropano diluído em água destilada. Os resultados foram expressos em ug de MDA/ mg de proteína.

3.4.5 Zimografia

A atividade das MMPs -2 e -9 foi mensurada no homogenato da região da ferida e da área adjacente do 14º dia pós-lesão por Zimografia, segundo Hawksws, Li e Taniguchi (2001). As amostras foram homogeneizadas com homogeneizador ultrasônico em tampão PBS pH 7,4, contendo inibidores de proteases PMFS 0,4% e aprotinina 0,25%. Foi feita centrifugação a 12000 rpm, 4 °C por 10 minutos e utilizou-se o sobrenadante. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo gelatina do tipo A de pele suína (10%). Após eletroforese, o gel foi transferido para um recipiente de vidro e lavado duas vezes com 100 mL de triton x-100 (2.5%) sob agitação à temperatura ambiente. Após a segunda lavagem, o triton x-100 foi removido (deixando 2 -3 mL) e o gel foi incubado com 100 mL de tampão *development* (0.05 M Tris-HCl pH 8.8, 5 mM CaCl₂ e NaN₃ 0,02%) em forno de hibridização à 37 °C por 18 horas. Posteriormente, o gel foi corado com Coomassie Blue por 2 horas e descorado com uma solução de metanol, água e ácido acético na proporção de 4,5:1:4,5, respectivamente. Proteínas com atividade gelatinolítica podiam ser visualizadas como bandas não coradas, contrastando com o fundo azul. Com o intuito de verificar se as bandas observadas

nos zimogramas estavam relacionadas com atividade de MMPs, 10 mM de EDTA ou 5 mM de 1,10-fenantrolina foram incluídos no tampão *development* em alguns ensaios. Soro fetal bovino foi utilizado como controle da reação. Os géis foram escaneados e a densitometria das bandas foi realizada utilizando-se o programa Image J.

3.5 Caracterização do extrato de semente de uva

O extrato de semente de uva Vitaflavan[®] foi fornecido pela empresa DRT Nutraceuticals, França. Para realização das análises, o extrato foi diluído (0,0504 g em 50 mL de metanol) e conservado em frasco âmbar a -20 °C por até 7 dias. Para as análises de cromatografia, a amostra de Vitaflavan[®] foi diluída em metanol grau HPLC.

3.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD/FLD)

A quantificação e identificação dos monômeros e oligômeros presentes no extrato de semente de uva foi realizada por CLAE-DAD/FLD (sistema Hewlett-Packard 1100, com injetor automático e bomba quaternária, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) acoplado a um detector de photo-diode array (DAD) (modelo HP) e a um detector de fluorescência (FLD) de acordo com Khanal, Howard e Prior (2009). A coluna utilizada foi a 5 µm Luna sílica (250 × 4.6 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido), com fluxo de 0,8 mL/min e temperatura de 37 °C. A fase móvel consistiu de (A) diclorometano: metanol: ácido acético: água (82: 14: 2: 2), (B) metanol: ácido acético: água (96: 2: 2). O gradiente de 70-min foi 0-20 min 0% a 11,7% B-linear; 20-50 min 11,7% a 25,6% B-linear; 50-55 min 25,6% a 87,7% B-linear; 55-65 min 87,7% B-isocrático, e 65-70 min 87,7% a 0% B-linear, seguido por 10 min de re-equilíbrio da coluna antes da próxima injeção. A detecção foi realizada por fluorescência, excitação 230 nm e emissão 321 nm e a 270 nm. Os monômeros foram identificados de acordo com o tempo de retenção, características do espectro de absorção UV e co-eluídos com os seus respectivos padrões.

A quantificação foi realizada com base em curvas de calibração para catequina, epicatequina, procianidinas B1 e procianidinas B2 (Sigma). Os demais picos (oligômeros) foram estimados utilizando a curva de calibração da catequina e

expressos como catequina equivalente. Não foi utilizada a coluna Develosil Diol (Phenomenex), especificada também na referência e que apresenta melhor resolução que a Luna sílica (Phenomenex), devido à descontinuidade desta coluna pela Phenomenex. Todos os reagentes utilizados na análise por CLAE-DAD/FLD foram grau CLAE (Merck e Carlo Erba).

3.5.2 Atividade antioxidante

3.5.2.1 Redução do radical estável DPPH•

A atividade antioxidante do Vitaflavan foi determinada através da redução do radical estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) pelos antioxidantes presentes na amostra segundo descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). A solução DPPH (~ 20 mg/mL em metanol) foi preparada de modo a apresentar absorvância em 517 nm entre 0,400 e 0,450. As leituras foram realizadas em microplaca de poliestireno com 96 poços (Costar, Cambrigde, EUA) para uso em comprimento de onda entre 340 e 800 nm. Em cada poço da microplaca foram adicionados 200 µL da solução de DPPH e 40 µL de metanol para o grupo controle ou o mesmo volume para a amostra. A reação foi mantida à temperatura ambiente por 20 minutos no escuro. As leituras das absorvâncias foram realizadas em 517 nm em espectrofotômetro de microplaca Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Japão). A absorvância das amostras (Am) correlacionada à absorvância do controle (Ac) resulta na porcentagem de redução de radicais DPPH (%SRL), que pode ser calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\%SRL = \frac{(Ac - Am)}{Ac} \times 100 \quad \text{Fórmula (1)}$$

A curva de calibração foi preparada com uma solução trolox (Sigma) (0,25 mg/mL em metanol), e os resultados foram expressos em mmol Trolox equivalente (TE)/ g de amostra.

3.5.2.2 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

A capacidade de absorção dos radicais de oxigênio (ORAC) foi utilizada para medir a atividade de estabilização dos radicais peroxila da amostra, de acordo com método previamente descrito por Prior et al. (2003). Resumidamente, as amostras foram diluídas em 75 mmol/L de tampão fosfato (pH 7,1). Solução padrão de trolox foi preparada em concentrações variando entre 6,25 e 100 $\mu\text{mol/L}$. O leitor de placas (leitor de microplacas Multi-Detecção; Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, USA) foi programado para gravar a fluorescência a cada minuto após a adição de 2,20-azobis (2-amidino-propano) dicloridrato (AAPH; 153 mmol/L em 75 mmol/L de tampão fosfato, pH 7.1) por 60 minutos e a área sob a curva de decaimento da fluorescência foi integrada utilizando o software Gen5. A intensidade da fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 485 nm e 528 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos em mmol Trolox equivalente (TE)/ g de amostra.

3.5.3 Determinação de fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Swain e Hills (1959), utilizando o reagente de *Folin-Ciocalteu*. Este método envolve a redução do reagente de Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos das amostras com formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 765 nm. Fizemos uma diluição de 1:4 do extrato de semente de uva em metanol (Synth). Em um tubo de ensaio, adicionamos 50 μL da diluição 1:4 e 200 μL de metanol (Synth), 2 mL de água ultra pura, 250 μL do reagente Folin-Ciocalteu. Aguardamos por 3 minutos para reagir. Posteriormente, foram adicionados 250 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) (Synth) e a solução foi colocada em banho maria à 37 °C por 30 minutos. O branco foi preparado nas mesmas condições. O espectrofotômetro Hewlett-Packard 8453 (Palo Alto, E.U.A.) foi zerado com o controle (branco) e foram feitas as leituras de absorbância no comprimento de onda de 765 nm. A quantidade de fenóis do extrato foi avaliada em triplicada e quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico

(0,5 mL da solução estoque 0,01 M em 10 mL de metanol). O resultado foi expresso em mg ácido gálico equivalente (AGE)/ g de amostra.

3.6 Preparação das nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) contendo extrato de semente de uva

As suspensões de NLS contendo extrato de semente de uva foram preparadas através de homogeneização de alta pressão (HAP) (MÜHLEN; SCHWARZ; MEHNERT, 1998; SOUTO et al., 2004), empregando-se a composição descrita no Quadro 1.

Quadro 1- Composição das suspensões de NLS contendo antioxidante.

Fase orgânica (para 200 mL de formulação)	Fase aquosa (para 200 mL de formulação)
+ Gordura de coco (5%).....10 g	H ₂ O - q.s.p. (100%).....183,8 mL
#Span 80® (1,5%).....3 g	#Tween 80® (1,5%).....3 g
‘Extrato de uva (0,1%).....0,2 g	

+ Lipídeo; # Emulsificantes; ‘ Antioxidante.

Os componentes da fase orgânica (exceto o antioxidante) e da fase aquosa foram mantidos sob agitação magnética em banho maria à temperatura de 37 °C até completa dissolução. Em seguida, o antioxidante foi incorporado à massa lipídica fundida e a fase aquosa foi vertida lentamente na fase orgânica. Esta mistura foi dispersada sob alta agitação (13.000 rpm, por 5 minutos) usando um Ultra Turrax® (T25, Ika). A pré-emulsão obtida foi homogeneizada a alta pressão (Panda 2K NS1001L, Niro Saovi), aplicando-se 4 ciclos variando entre 210 a 250 bar). O produto resultante foi uma nanoemulsão O/A, devido ao estado líquido do lipídeo. Contudo, após o resfriamento, ocorreu a recristalização do lipídeo, levando à formação de nanopartículas lipídicas com matriz sólida.

3.7 Incorporação das NLS contendo extrato de semente de uva em gel

O gel foi preparado incorporando a formulação de NLS em Carbopol Ultrez® 0,5% (substância inerte) utilizando gral e pistilo de porcelana e neutralizado com 2

gotas de trietanolamida. Para uma maior preservação, foram adicionadas 2 gotas de imidazolinidil uréia 3%.

3.8 Caracterização físico-química das NLS

3.8.1 Teor de fármaco nas formulações

O doseamento ou teor do extrato de semente de uva nas formulações foi realizado por CLAE-DAD/FLD (sistema Hewlett-Packard 1100, com injetor automático e bomba quaternária, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) acoplado a um detector de photo-diode array (DAD) (HP modelo) e a um detector de fluorescência (FLD) de acordo com Khanal, Howard e Prior (2009), utilizando-se as mesmas condições descritas no item 3.5.1.

3.8.2 Eficiência de encapsulação (EE)

A determinação das taxas de associação do extrato de semente de uva às NLS foi determinada por CLAE, levando em consideração a diferença entre a concentração total do antioxidante na formulação e a concentração presente na fase aquosa da suspensão (antioxidante não associado). A concentração total foi determinada segundo o item 3.5.1. A determinação do ativo livre, presente na fase aquosa da suspensão, foi realizada através da técnica de ultrafiltração-centrifugação (SCHAFFAZICK et al., 2003, revisão) das suspensões com a utilização de membranas Amicon®, Millipore 10.000 Da, durante 5 minutos a 5000 rpm, para obter 40 µL de ultrafiltrado. Dessa forma, as NLS ficaram retidas e o antioxidante não associado ultrapassou a membrana, sendo quantificado no ultrafiltrado utilizando-se as mesmas condições cromatográficas descritas no item 3.5.1. A determinação da taxa de associação das suspensões foi realizada em duplicata.

3.8.3 Diâmetro médio das NLS

3.8.3.1 Difractometria de laser

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho de partícula (Span) foram determinados por difratometria de laser (Malvern Mastersizer 2000). O Span é definido como:

$$Span = \frac{D(90) - D(10)}{D(50)} \quad \text{Fórmula (2)}$$

onde D(10), D(50) e D(90) representam os diâmetros cumulativos de 10%, 50% e 90% das partículas, respectivamente. Essa técnica foi utilizada com o intuito de selecionar formulações devido à sua capacidade de analisar uma ampla faixa de tamanhos, possibilitando a verificação da presença de partículas micrométricas.

3.8.3.2 Espalhamento de luz dinâmico

A avaliação do diâmetro, distribuição do diâmetro e índice de polidispersão (PDI) das nanopartículas foi realizada por espalhamento de luz dinâmico, utilizando um Zetasizer® (Malvern). Para evitar qualquer seleção da amostra, apenas o meio de diluição (água Milli-Q®) foi filtrado.

3.8.3.3 Análise de monitoramento das nanopartículas

A análise de monitoramento das nanopartículas foi realizada através do equipamento NanoSight LM20 (NanoSight®, Amesbury, Reino Unido). As formulações foram diluídas (5000 X) em água MilliQ® e injetadas na câmara de amostra. O sistema consiste em um feixe de luz laser a 640 nm, o qual incide sobre as amostras, cujo espalhamento é captado durante um tempo pré-determinado utilizando-se obturador e ajustes de ganho manuais. Os dados foram coletados e analisados através do software NTA 2.0 Build 127 que identifica e rastreia nanopartículas individuais que se deslocam em movimento browniano e relaciona o movimento para um determinado tamanho de partícula. Os resultados correspondem

à média aritmética dos valores calculados com os tamanhos de todas as partículas analisadas pelo equipamento.

3.8.4 Determinação de pH e condutividade

A determinação de pH das suspensões coloidais e dos géis (diluição 1:10 em água) contendo NLS foi realizada em potenciômetro (B474 Micronal), calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, logo após a preparação. A determinação da condutividade foi realizada em condutivímetro (Gehaka, modelo CG 1800, Brasil) diretamente das formulações coloidais.

3.8.5 Determinação da viscosidade

A viscosidade das nanoemulsões contendo as NLS foi avaliada em Viscosímetro Vibracional (A&D Company, modelo SV10, Japão) utilizando *spindles* ULA. No período de 30 segundos, sete medições foram feitas e os resultados foram expressos em mPa x s (média $\pm$ DP). Para os géis contendo NLS, as análises de viscosidade foram conduzidas em Viscosímetro Rotacional (Brookfield, modelo LV-DV-II+Pro, USA) utilizando *spindles* ULA. Os géis foram acondicionados em dispositivo Brookfield acoplado a banho de água termostatizado circulante a 25° C $\pm$ 1° C. As taxas e tensão de cisalhamento foram medidas nas velocidades de 0,5 rpm e 1,25 rpm e expressas em centipoise (cp) (média $\pm$ DP). A taxa de cisalhamento (γ) indica a taxa com que um material escoar quando uma determinada força é aplicada e a tensão de cisalhamento (t) indica a pressão aplicada sobre o material.

3.9 Atividade antioxidante das NLS

A atividade antioxidante das NLS associadas ao extrato de semente de uva e da nanopartícula branca, sem o fármaco, foi avaliada utilizando-se as mesmas metodologias empregadas na caracterização do extrato de semente de uva, como descrito nos itens 3.5.2.1 e 3.5.2.2.

3.10 Tratamento tópico com NLS

Após a indução do DM e a confecção da ferida de acordo com o item 3.3, os animais foram divididos em 6 grupos experimentais: grupo 3- animais controles tratados com gel (veículo das NLS); grupo 4- animais diabéticos tratados com gel; grupo 5- animais controles tratados com NLS branca (sem o extrato de semente de uva); grupo 6- animais diabéticos tratados com NLS branca; grupo 7- animais controles tratados com NLS contendo extrato de semente de uva; e grupo 8- animais diabéticos tratados com NLS contendo extrato de semente de uva. O gel puro ou contendo as NLS foi aplicado diariamente (300 µL) com o auxílio de uma espátula durante um período de 3, 10 e 14 dias (Figura 5). A cinética do fechamento da ferida foi avaliada por meio de fotografias como descrito previamente no item 3.4.1. Os animais foram eutanasiados no 3º, 10º e 14º dia pós-lesão e a pele foi removida para realização das análises histológicas e imunohistoquímica (4-HNE), de acordo com os itens 3.4.2 e 3.4.3., respectivamente.

Figura 5- Grupos experimentais e metodologia empregada no tratamento das feridas.

Imediatamente após a confecção da ferida os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo 3- animais controles tratados com gel; grupo 4- animais diabéticos tratados com gel; grupo 5- animais controles tratados com NLS branca; grupo 6- animais diabéticos tratados com NLS branca; grupo 7- animais controles tratados com NLS contendo extrato de semente de uva; e grupo 8- animais diabéticos tratados com NLS contendo extrato de semente de uva. O tratamento foi realizado diariamente com o auxílio de uma espátula, durante um período de 3, 10 e 14 dias.

3.11 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, sendo submetidos à análise de variância (ANOVA) *One way* seguida de pós-teste de Tukey ou ANOVA *Two way* seguida de pós-teste de Bonferroni e teste *t Student*. Diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do modelo experimental

4.1.1 Diabetes mellitus atrasa o fechamento da ferida

Camundongos Swiss machos adultos foram induzidos ao DM com injeção intraperitoneal de aloxana (70 mg/ kg), enquanto os controles receberam apenas o veículo (tampão citrato de sódio). Como esperado, os camundongos diabéticos apresentaram uma perda significativa de peso corporal ao final de 30 dias, bem como um aumento no consumo alimentar, na ingestão de água, no volume urinário e nos níveis de glicose sanguínea, que permaneceram acima de 350 mg/dl, confirmando o estado hiperglicêmico (Tabela 1).

Tabela 1- Mudanças nos parâmetros fisiológicos em camundongos após 30 dias de indução ao diabetes com aloxana comparado com camundongos normoglicêmicos.

Variáveis	Grupos	
	CONTROLES (C)	DIABÉTICOS (D)
Δ Peso corporal (g/ 30dias)	01±0,1 (15)	-10,0±0,6*** (07)
Consumo de ração (g/ 7dias)	36,7±2,3 (04)	89,0±3,9* (05)
Ingestão de água (ml/ 7dias)	72,5±6,3 (04)	424,8±4,0*** (05)
Glicemia inicial (mg/ dl)	124,3±3,6 (15)	478,4±21,1*** (10)
Glicemia final (mg/ dl)	133,3±7,5 (15)	480,4±18,3*** (10)
Volume urinário (mL/ 22 horas)	0,58±0,05 (04)	21,50±1,91*** (04)

Valores expressos em média ± desvio padrão, número de camundongos entre parênteses.

(*) p <0,05, (***) p <0,001 de acordo com o teste t Student.

Após 30 dias de DM, uma ferida de 1cm² foi realizada no dorso dos animais controles e diabéticos. As feridas foram fotografadas durante o período de 14 dias

(no 3º, 7º, 10º e 14º dia pós-lesão) e a área da lesão foi mensurada utilizando o software Image J. No 3º dia pós-lesão, os camundongos diabéticos apresentaram uma menor área quando comparados com os controles ($0,61 \pm 0,04$ vs. $1,14 \pm 0,09$ cm², respectivamente), provavelmente devido ao edema reduzido (Figura 6a e 6b). Um atraso de 21% e 23% no fechamento da ferida foi observado nos camundongos diabéticos no 10º ($0,13 \pm 0,01$ vs $0,34 \pm 0,03$ cm²) e no 14º dia ($0,006 \pm 0,002$ vs $0,230 \pm 0,020$ cm²), respectivamente (Figura 6b).

Figura 6- Acompanhamento do fechamento da ferida dos animais normoglicêmicos e diabéticos.

a) Feridas foram fotografadas durante o período de 14 dias (no momento da lesão e no 3º, 7º, 10º e 14º dias pós-lesão) e a área da ferida foi mensurada utilizando o programa Image J (b). Os resultados foram expressos como a porcentagem (%) de redução (média $\pm$ desvio padrão) a partir da área inicial (100%). (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ em relação ao controle, de acordo com a análise de variância (ANOVA) One way e pós-teste de Tukey. N= pelo menos 6 animais por grupo.

4.1.2 Diabetes mellitus atrasa a resposta inflamatória e as fases subsequentes da cicatrização

Como podemos observar na Figura 7, linha 1, a pele sadia (sem lesão) obtida a partir do dorso dos animais controles e diabéticos é revestida por um epitélio estratificado pavimentoso corneificado, denominado epiderme. Logo abaixo da epiderme, encontra-se a derme, formada por tecido conjuntivo denso não modelado que fornece suporte e nutrição ao tecido epitelial. A derme é caracterizada pela presença de anexos, como glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e folículos pilosos.

A análise histológica das feridas mostrou diferenças na fase inflamatória inicial e nas etapas mais tardias do processo de cicatrização. A fase aguda, representada aqui pelo 3º dia pós-lesão, foi caracterizada pela presença do coágulo e pela resposta inflamatória. Devido à remoção da epiderme e grande parte da derme no momento da lesão, foi possível observar tecido adiposo (hipoderme), principalmente nos animais controles. A pele dos animais diabéticos pareceu menos espessa e com uma pequena quantidade de tecido adiposo, provavelmente devido à perda de peso provocada pela hiperglicemia (Figura 7, linha 2). Os animais diabéticos mostraram um atraso na inflamação, aparentemente com menos células inflamatórias quando comparados com os animais normoglicêmicos. Nas fases posteriores, no entanto, os camundongos diabéticos apresentaram uma persistência na reação inflamatória (Figura 7, linhas 3 e 4). Revascularização foi evidente no 10º dia pós-lesão nos animais controles, enquanto que nos animais diabéticos este processo estava atrasado e novos vasos ainda foram observados no 14º dia pós-lesão. Além disso, foi possível observar uma completa reepitelização nos camundongos normoglicêmicos ao redor do 10º dia, embora os anexos da pele ainda não estivessem sido restabelecidos. Por outro lado, no 14º dia pós-lesão, o processo de reepitelização ainda estava atrasado nos animais diabéticos (Figura 7, linha 4).

Figura 7- Morfologia das feridas dos animais normoglicêmicos e diabéticos.

Cortes obtidos a partir da pele de animais controles e diabéticos removidas no dia 0 (pré-lesão) e no 3º, 10º e 14º dias pós-lesão foram corados com hematoxilina-eosina para avaliar os aspectos gerais da ferida e a presença de células inflamatórias. Imagens representativas de pelo menos 6 animais por grupo. DE= derme; EP=epiderme; AX=anexos; seta= neovascularização; cabeça de seta= tecido adiposo. Barra = 83 µm. Caixas menores mostram detalhes em maior aumento.

4.1.3 MMP-2 e MMP-9 estão aumentadas na ferida dos animais diabéticos

A atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 foi avaliada na derme dos camundongos no 14º dia pós-lesão. A zimografia mostrou diferenças significantes nos níveis de MMPs nas feridas diabéticas comparadas com as feridas dos animais controles (Figura 8a). Análise densitométrica revelou um aumento de pro-MMP-9 (8206 ± 1417 vs. 14770 ± 1854 OD) e MMP-9 ativa (5703 ± 1452 vs. 12481 ± 2766 DO) nos camundongos diabéticos (Figura 8b). Similarmente, as feridas diabéticas apresentaram uma alta concentração de pro-MMP-2 (6179 ± 1287 vs. 9814 ± 1876 DO) e MMP-2 ativa ($5775 \pm 976,5$ vs. 10742 ± 2199 DO) (Figure 8c). O arraste observado no controle positivo (soro fetal bovino) ocorreu, provavelmente, pelo excesso de MMP-2 e MMP-9 que acabaram digerindo o gel além do limite. A atividade dessas MMPs foi inibida quando os géis foram incubados na presença de EDTA 10 mM ou 1,10 fenantrolina 5 mM, confirmando assim a atividade gelatinolítica.

Figura 8- Atividade de MMP-2 e MMP-9 nas feridas.

Atividade gelatinolítica foi avaliada por zimografia no homogenato da derme do 14º dia pós-lesão dos animais controles e diabéticos. Bandas representativas são mostradas em a. b,c) Resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (unidades arbitrárias) de pelo menos 6 animais por grupo. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ em relação ao controle, de acordo com a análise de variância (ANOVA) One-way e pós teste de Tukey.

4.1.4 Diabetes mellitus aumenta miofibroblastos e altera a distribuição de fibras colágenas na ferida

Imunohistoquímica para α -actina de músculo liso foi realizada para verificar a presença de miofibroblastos na região da ferida. Essas células têm atividade contrátil e desempenham um papel importante na contração e fechamento da ferida. O número de células marcadas estava aparentemente aumentado na derme dos animais diabéticos no 10º dia pós-lesão quando comparado com os animais normoglicêmicos (Figura 9).

Figura 9- Presença de miofibroblastos na derme lesionada de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Cortes obtidos a partir da pele de animais controles e diabéticos removidas no 10º dia pós-lesão foram imunomarcados com anti- α -actina de músculo liso. Imunomarcagem positiva é indicada em marrom. A contracoloração nuclear foi realizada com hematoxilina de Mayer. N = pelo menos 6 animais por grupo. Barra = 100 μ m.

A distribuição de fibras colágenas, principalmente de colágeno tipo I, foi avaliada após coloração por Picrosirius. Na pele sadia dos animais controles, foi possível observar feixes formados por fibras colágenas altamente compactadas, dispostos paralelamente à superfície da pele. Os animais diabéticos, no entanto, apresentaram uma organização menos compacta (Figura 10, linha 1). No 3º dia pós-lesão, a birrefringência das fibras colágenas estava baixa em ambos os grupos, provavelmente devido à remoção de grande parte da derme no momento da realização da lesão (Figura 10, linha 2). Já no 10º dia pós-lesão, foi possível observar um retardo na deposição de colágeno nos animais diabéticos quando comparados com os controles, tornando-se mais evidente no 14º dia (Figura 10, linhas 3 e 4).

Figura 10- Deposição de fibras colágenas na ferida dos animais normoglicêmicos e diabéticos.

A distribuição de fibras colágenas foi avaliada nos cortes obtidos a partir das peles removidas no dia 0 (pré-lesão) e no 3º, 10º e 14º dia pós-lesão utilizando a coloração Picrosirius, que acentua a birrefringência das fibras colágenas quando observadas sob luz polarizada. DE= derme; EP=epiderme, Ax=anexos. Barra = 100 µm.

4.1.5 Diabetes mellitus aumenta a peroxidação lipídica na derme não-lesionada e lesionada de camundongos

O grau de peroxidação lipídica foi avaliado por imunohistoquímica para 4-HNE, um dos produtos mais importantes da peroxidação. As análises mostraram uma maior distribuição do 4-HNE na ferida diabética no 10º dia pós-lesão quando comparado com a ferida dos animais controles (Figura 11a). Para demonstrar a presença de peroxidação lipídica de forma quantitativa, o MDA foi mensurado utilizando a técnica de TBARS. O MDA estava aumentado 2,5 vezes na derme não lesionada ($4,44 \pm 0,56$ vs. $11,38 \pm 1,90$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) e 1,36 vezes na derme lesionada ($7,55 \pm 0,4064$ vs. $10,28 \pm 0,4992$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) dos camundongos diabéticos obtidas no 10º dia pós-lesão (Figura 11b e 11c). A diferença entre derme não lesionada e lesionada foi observada apenas no grupo controle, já que o MDA aumentou na presença da lesão.

Figura 11- Grau de peroxidação lipídica na derme de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

a)

b)

c)

a) Peroxidação foi avaliada por imunohistoquímica para 4-HNE no 10º dia pós-lesão. Imunomarcção positiva é indicada em marrom. Contracoloração nuclear foi realizada com hematoxilina de Mayer. Barra = 100 μm . A produção de malondialdeído foi mensurada por TBARS no homogenato do raspado dérmico da pele não lesionada (b) e da região da ferida (c) removida no 10º dia pós-lesão. Resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão ($\mu\text{g MDA/mg de proteína}$) de pelo menos 5 animais por grupo. (**) $p < 0.01$ em relação ao controle, de acordo com o teste t Student.

4.2 Caracterização do extrato de semente de uva

4.2.1 Separação e quantificação dos monômeros e oligômeros (proantocianidinas) presentes no extrato de semente de uva

Os componentes da amostra Vitaflavan[®] foram identificados e separados por meio de CLAE, onde parâmetros como comparação do tempo de retenção na coluna e do espectro de absorção dos picos desconhecidos com os padrões de referência foram utilizados. A Figura 12 mostra o espectro de absorção dos monômeros catequina e epicatequina e das proantocianidinas B1 e B2. Como podemos observar, os quatro compostos apresentaram espectro de absorção semelhante, uma vez que a catequina e a epicatequina são isômeros e que as proantocianidinas são formadas pela união destes monômeros. A separação desses compostos se deu então pelo tempo de retenção dessas moléculas na coluna.

Figura 12- Espectro de absorção dos padrões catequina, epicatequina, proantocianidina B1 e proantocianidina B2.

Os picos 1a e 1b identificados na amostra Vitaflavan[®] (Figura 13b) correspondem aos monômeros epicatequina e catequina, respectivamente, confirmado pelos padrões (Figura 13a). Os picos 2, 3 e 4 correspondem aos oligômeros. No entanto, não é possível afirmar que o pico 2 seja proantocianidina B1 ou B2. Não foram detectados polímeros; somente monômeros e oligômeros.

Figura 13- Cromatograma obtido por CLAE-FLD (excitação 230 nm e emissão 321 nm) dos padrões (a) e da amostra de Vitaflavan[®] (b). Padrões identificados no cromatograma.

A partir da área dos picos obtidos no cromatograma é possível determinar a concentração de cada composto no extrato de semente de uva. O teor de monômeros e oligômeros de proantocianidina no extrato de semente de uva está apresentado na Tabela 2. Os picos referentes à proantocianidina B1 e B2 na amostra de Vitaflavan[®] foram expressos como catequina equivalente.

Tabela 2- Teor de monômeros e oligômeros de proantocianidina na amostra de extrato de semente de uva (Vitaflavan[®]).

	Catequina ($\mu\text{g/g}$)	Epicatequina ($\mu\text{g/g}$)	Proantocianidinas totais - picos 2,3,4 ($\mu\text{g catequina eq./g}$)	Total ($\mu\text{g/g}$)
Vitaflavan [®]	130,0 $\pm$ 0,6	100,2 $\pm$ 0,3	195 $\pm$ 7	426
%	30,5	23,5	46	100

Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4.2.2 Capacidade antioxidante e conteúdo de fenólicos totais

A capacidade antioxidante do extrato de semente de uva e de cada composto identificado no extrato foi determinada por espectrometria de fluorescência pelo método *Oxygen radical absorbance capacity* (ORAC) e espectrofotométrico pela redução do radical estável DPPH.

A análise por ORAC mostrou que a capacidade antioxidante do Vitaflavan[®] é inferior à da catequina (18,48 $\pm$ 7,92 vs. 28,07 $\pm$ 1,01 mmol Trolox eq./ g), da epicatequina (18,48 $\pm$ 7,92 vs. 30,42 $\pm$ 0,57 mmol Trolox eq./ g) e da proantocianidina B2 (18,48 $\pm$ 7,92 vs. 31,73 $\pm$ 2,26 mmol Trolox eq./ g) (Figura 14a). No entanto, não houve diferença estatística entre o Vitaflavan[®] e a proantocianidina B1 (18,48 $\pm$ 7,92 e 20,29 $\pm$ 1,69, respectivamente) (Figura 14a). Nossos resultados com o segundo método, no entanto, mostraram que o extrato Vitaflavan[®] tem uma capacidade redutora dos radicais DPPH estatisticamente maior quando comparada com a catequina (5,84 $\pm$ 0,04 vs. 3,68 $\pm$ 0,30), epicatequina (5,84 $\pm$ 0,04 vs. 4,97 $\pm$ 0,37), proantocianidina B1 (5,84 $\pm$ 0,04 vs. 3,19 $\pm$ 0,29) e proantocianidina B2 (5,84 $\pm$ 0,04 vs. 4,10 $\pm$ 0,17) (Figura 14b).

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando o ácido gálico como padrão de referência. A concentração de fenólicos totais presentes no extrato foi de $923,12 \pm 10,97$ mg ácido gálico eq./g de amostra.

Figura 14- Capacidade antioxidante avaliada pelos métodos ORAC (a) e DPPH (b).

Resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (mmol Trolox eq./g), como indicado pela análise de variância (ANOVA) One Way e pós teste de Tukey. Em a, (***) $p < 0,001$ comparado com o Vitaflavan®; Em b, (***) $p < 0,001$ e (*) $p < 0,05$ comparado com o Vitaflavan®.

4.3 Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)

4.3.1 Seleção da formulação adequada

As NLS foram preparadas utilizando gordura de coco como lipídeo sólido. O extrato de semente de uva foi incorporado de forma adequada à massa lipídica fundida e a pré-emulsão obtida passou por um homogeneizador de alta pressão. Este aparelho possui um sistema de cisalhamento que quebra diferentes tamanhos de nanopartículas, deixando-as em tamanho nanométrico. A cada ciclo de cisalhamento, uma pequena amostra foi coletada para leitura no aparelho Mastersizer®, que tem como principal função detectar a presença de partículas micrométricas por meio de difratometria de laser.

As Figuras 15a e 15b mostram a grande variação de diâmetro das partículas contendo extrato de semente de uva e das partículas brancas, sem o antioxidante, quando estas não são passadas pelo homogeneizador de alta pressão. Observamos também a presença de partículas de tamanho micrométrico. Após terem passado quatro vezes pelo homogeneizador, a variação de tamanho de partículas na formulação diminuiu e não observamos a presença de partículas micrométricas, apenas nanométricas (Figura 15c e 15d). Uma vez atestada a ausência de partículas micrométricas, prosseguimos com as análises de caracterização das NLS desenvolvidas.

Figura 15- Representação gráfica do diâmetro médio e distribuição de diâmetro de partículas determinados por difratometria de laser.

a) NLS contendo extrato de uva, sem homogeneizar; b) NLS branca, sem homogeneizar; c) NLS contendo extrato de uva após 4 ciclos de homogeneização; d) NLS branca após 4 ciclos de homogeneização. A análise de cada formulação foi feita em triplicata (lotes 1, 2 e 3). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

4.3.2 Análises das características físico-químicas

4.3.2.1 Diâmetro

Os diâmetros das formulações foram obtidos por três diferentes técnicas: difratometria de laser (Mastersizer®), espalhamento de luz dinâmica (Zetasizer®) e análise de monitoramento de nanopartículas (Nanosight®). Os diâmetros variaram entre $108,8 \pm 1,3$ e $144 \pm 13,2$ nanômetros, como mostrado na Tabela 4. Trinta dias após o preparo das NLS, o diâmetro foi verificado novamente por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmica e os valores se mantiveram os mesmos (dados não mostrados). Ambas as formulações apresentaram Span e PDI menores do que 2,0 e 0,2 (valores ideais), respectivamente (Tabela 3). Ou seja, as nanopartículas estavam distribuídas de forma homogênea.

Tabela 3- Diâmetro médio das nanopartículas contendo o extrato de uva 0,1% e das nanopartículas sem o princípio ativo (nano branca).

Formulação	Mastersizer®		Zetasizer®		Nanosight®	
	Diâmetro (nm)	Span	Diâmetro (nm)	PDI	Diâmetro (nm)	Span
Nano branca	$130 \pm 0,0$	$1,09 \pm 0,18$	$109,1 \pm 1,1$	$0,13 \pm 0,01$	$144,0 \pm 13,2$	$0,78 \pm 0,01$
Nano ext. de uva (0,1%)	$120 \pm 0,0$	$0,84 \pm 0,01$	$108,8 \pm 1,3$	$0,11 \pm 0,02$	$135,7 \pm 9,3$	$0,72 \pm 0,03$

PDI= índice de polidispersão; Span= distribuição de tamanho de partícula. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

4.3.2.2 Teor de fármaco e eficiência de encapsulação

Após a completa dissolução das nanopartículas em metanol, a concentração total de fármaco presente na formulação foi determinada por CLAE, acoplada a um detector de fluorescência. Como mostrado na Tabela 4, $0,91 \pm 0,04$ mg/mL de extrato de semente de uva estava presente em toda a formulação.

Para obter a quantidade de fármaco associada às NLS, a técnica de ultrafiltração-centrifugação foi empregada, utilizando uma membrana (10.000 Da) para separar a parte aquosa das suspensões coloidais. Após a separação, a

concentração de fármaco livre foi determinada no ultrafiltrado por CLAE. A concentração de fármaco associado às nanoestruturas é calculada pela diferença entre as concentrações de fármaco total e livre. Os resultados nos mostraram uma eficiência de encapsulação de 90% a 100%, ou seja, $0,91 \pm 0,04$ mg/mL de extrato de semente de uva estava encapsulado (Tabela 4).

4.3.2.3 pH e condutividade

Os valores de pH das suspensões de NLS e do gel contendo as NLS variaram entre $5,31 \pm 0,17$ e $6,11 \pm 0,10$. A condutividade foi determinada em condutivímetro e os resultados são mostrados na Tabela 4.

4.3.2.4 Viscosidade das NLS e dos géis contendo NLS

As suspensões de NLS sem o princípio ativo e contendo o extrato de uva apresentaram viscosidades médias de $1,32 \pm 0,02$ e $1,31 \pm 0,01$ mPa x s, respectivamente (Tabela 4). Esses valores de viscosidade estão próximos ao valor da viscosidade da água, que está em torno de 1 mPa x s.

A viscosidade dos géis contendo NLS foi avaliada em diferentes velocidades e expressa em centipoise (cp). Os resultados obtidos nas velocidades de 0,5 rpm e 1,25 rpm foram destacados na Tabela 4. É importante destacar que não houve diferença significativa entre os grupos analisados, mostrando que a composição da nanopartícula não interfere na característica reológica. Como pode ser observado no gráfico (Figura 16), a análise reológica demonstrou que tratam-se de fluidos não newtonianos por não apresentarem viscosidades constantes.

Figura 16- Perfil reológico das NLS associadas ao extrato de semente de uva e das NLS brancas.

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

4.3.2.5 Capacidade antioxidante das NLS

A capacidade antioxidante das NLS associadas ao extrato de semente de uva e da nano sem a presença do fármaco foi determinada por espectrometria de fluorescência pelo método *Oxygen radical absorbance capacity* (ORAC) e espectrofotométrico pela redução do radical estável DPPH. Os resultados estão apresentados na Tabela 2. Ambas as técnicas não foram capazes de detectar capacidade antioxidante nas nanopartículas brancas. As NLS associadas ao extrato de semente de uva apresentaram capacidade antioxidante, de forma mais evidenciada pelo método ORAC (Tabela 4). Este experimento foi importante para atestar que mesmo encapsulado, o extrato de semente de uva continua apresentando poder antioxidante.

Tabela 4- Parâmetros analisados na caracterização físico-química das NLS.

Parâmetros analisados	Nano branca	Nano ext. uva (0,1%)
Teor de fármaco (mg/mL)	-	0,91 ± 0,04
Eficiência de encapsulação (%)	-	100
pH	5,93 ± 0,08	5,31 ± 0,17
pH do gel	6,11 ± 0,10	5,88 ± 0,14
Condutividade	23,97 ± 3,00	25,43 ± 2,16
Viscosidade das formulações (mPa x s)	1,32 ± 0,02	1,31 ± 0,01
Viscosidade dos géis (cp)		
	0,5 rpm	235,79 ± 19,82
	1,25 rpm	244,75 ± 18,51
Atividade antioxidante (mmol Trolox eq./200 mL de formulação)		175,96 ± 12,57
	DPPH	não detectada
	ORAC	não detectada
		0,95 ± 0,05
		2,07 ± 0,05

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão.

4.4 Aplicação tópica de gel contendo NLS associadas ao extrato de semente de uva nas feridas de animais controles e diabéticos

4.4.1 Tratamento com NLS acelera o fechamento da ferida

Após 30 dias de DM, uma ferida de 1 cm² foi realizada no dorso dos camundongos controles e diabéticos e com o auxílio de uma espátula, 300 µL de gel contendo as NLS foi aplicado diariamente por um período de 3, 10 e 14 dias. Em um primeiro momento, acompanhamos a cinética de cicatrização através de fotos e análises morfométricas.

Em comparação aos grupos controle e diabético não tratados, a simples aplicação do gel (veículo para as NLS) foi bastante eficiente na aceleração do fechamento das feridas. Este efeito, no entanto, foi observado apenas a partir do 10^o dia pós-lesão (Figura 17). No 3^o dia, fase caracterizada pela presença de edema e aumento da área da lesão nos animais controles não tratados e resposta inflamatória suprimida nos animais diabéticos não tratados, o gel não alterou o quadro de cicatrização.

O resultado observado com o gel foi também obtido com a NLS branca (sem extrato de semente de uva), exceto pelo 3º dia pós-lesão. Nesta fase a NLS branca aumentou a área da ferida nos diabéticos tratados, eliminando a diferença existente entre animais controle e diabéticos tratados (Figura 18).

O tratamento com o extrato de semente de uva, por sua vez, aumentou a área da ferida tanto em animais controle quanto diabéticos no 3º dia pós-lesão, sugerindo um estímulo à reação inflamatória, mas ainda mantendo uma diferença entre os grupos controle e diabéticos tratados (Figura 19). No 10º e 14º dias pós-lesão este tratamento não melhorou a cicatrização em comparação aos grupos não tratados, embora também não tenha piorado o quadro (Figura 19). Houve, de fato, uma tendência (não estatisticamente significativa) de melhora no 14º dia.

Figura 17- Fechamento da ferida em camundongos normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com gel.

a) As feridas foram fotografadas durante um período de tempo de 14 dias (antes da lesão e no 3º, 10º e 14º dia pós-lesão) e a área da ferida foi medida usando o programa Image J. Os resultados foram expressos como a porcentagem (%) de redução (média $\pm$ DP) a partir da área da ferida inicial (100%) (b, c, d, e). (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância (ANOVA) *Two way* seguida de pós-teste de Bonferroni. a= diferente do controle não tratado; b= diferente do diabético não tratado; c= diferente do controle tratado. N = mínimo de 5 animais por grupo.

Figura 18- Fechamento da ferida em camundongos normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com NLS branca.

a) As feridas foram fotografadas durante um período de tempo de 14 dias (antes da lesão e no 3º, 10º e 14º dia pós-lesão) e a área da ferida foi medida usando o programa Image J. Os resultados foram expressos como a porcentagem (%) de redução (média $\pm$ DP) a partir da área da ferida inicial (100%) (b, c, d, e). (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância (ANOVA) Two way seguida de pós-teste de Bonferroni. a= diferente do controle não tratado; b= diferente do diabético não tratado. N = mínimo de 5 animais por grupo.

Figura 19- Fechamento da ferida em camundongos normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com NLS associadas ao extrato de semente de uva.

a) As feridas foram fotografadas durante um período de tempo de 14 dias (antes da lesão e no 3º, 10º e 14º dia pós-lesão) e a área da ferida foi medida usando o programa Image J. Os resultados foram expressos como a porcentagem (%) de redução (média $\pm$ DP) a partir da área da ferida inicial (100%) (b, c, d, e). (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ de acordo com a análise de variância (ANOVA) Two way seguida de pós-teste de Bonferroni. a= diferente do controle não tratado; b= diferente do diabético não tratado; c= diferente do controle tratado. N = mínimo de 5 animais por grupo.

4.4.2 Tratamento com NLS melhora a resposta inflamatória e promove reepitelização

Para as análises morfológicas, os animais controles e diabéticos foram eutanasiados no 3º, 10º e 14º dias pós-tratamento e a região da ferida foi retirada para obtenção de cortes histológicos.

Como mostrado na Figura 20, os tratamentos com gel, NLS branca e NLS associada ao extrato de semente de uva parecem ter aumentado o influxo de células inflamatórias para a região da ferida dos animais diabéticos no 3º dia pós-lesão. No entanto, não observamos alterações nos animais controle tratados quando comparados com os animais controle não tratados.

O tratamento com gel promoveu reepitelização da ferida no 10º dia pós-lesão nos animais diabéticos, além de provocar uma melhora na neovascularização (Figura 21), embora a crosta estivesse ainda presente. Os animais controles também mostraram reepitelização completa no 10º dia pós-lesão após o tratamento com o gel e um aparente aumento de células inflamatórias. Diferentemente, o tratamento com a NLS branca agiu de forma negativa, prejudicando a reepitelização nos animais controles e diabéticos e aumentando a celularidade. Também foi possível observar a presença da crosta. A região da ferida dos animais tratados com NLS branca apresentou um aspecto morfológico menos favorecido quando comparado com o tratamento com o gel e com o controle não tratado (Figura 21, linhas 1, 2 e 3). O tratamento com NLS associada ao extrato de semente de uva não promoveu reepitelização no 10º dia nos animais diabéticos a região da ferida foi caracterizada pela presença da crosta e de células inflamatórias, semelhante ao observado nos animais diabéticos tratados com a NLS branca (Figura 21, linhas 3 e 4). Nos animais normoglicêmicos, embora a reepitelização tenha ocorrido, observou-se um aparente aumento do influxo de células inflamatórias na derme (um efeito semelhante ao observado com o gel apenas).

Figura 20- Morfologia das feridas no 3º dia pós-lesão dos animais normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com gel, NLS branca e NLS contendo extrato de uva.

Cortes obtidos a partir da pele de animais controles e diabéticos removida no 3º dia pós-lesão foram corados com hematoxilina-eosina para avaliar os aspectos gerais da ferida e a presença de células inflamatórias. Imagens representativas de pelo menos 5 animais por grupo. DE= derme; EP=epiderme; AX=anexos. Barra = 83 µm. Caixas menores mostram detalhes em maior aumento.

Figura 21- Morfologia das feridas do 10º dia pós-lesão dos animais normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com gel, NLS branca e NLS contendo extrato de semente de uva.

Cortes obtidos a partir da pele de animais controles e diabéticos removida no 10º dia pós-lesão foram corados com hematoxilina-eosina para avaliar os aspectos gerais da ferida e a presença de células inflamatórias. Imagens representativas de pelo menos 5 animais por grupo. DE= derme; EP=epiderme; AX=anexos. Barra = 83 µm. Caixas menores mostram detalhes em maior aumento.

Ao final de 14 dias, foi possível observar reepitelização completa nos camundongos controles, com presença de estrato córneo, uma maior deposição de matriz extracelular e diminuição da quantidade de células inflamatórias em todos os grupos de tratamento. Ou seja, não foi possível identificar diferenças na epiderme e derme quando comparamos os tratamentos com gel, NLS branca, NLS contendo extrato de semente de uva e os animais não tratados (Figura 22). Os tratamentos também foram capazes de promover a reepitelização da ferida dos animais diabéticos no 14º dia pós-lesão. No entanto, foi possível observar a permanência de células inflamatórias, de forma mais evidenciada nos tratamentos com NLS branca e NLS associada ao extrato de semente de uva. Curiosamente, embora os dados morfométricos não tenham indicado uma melhora significativa no fechamento da ferida dos animais diabéticos tratados com NLS associadas ao extrato de semente de uva no 14º dia pós-lesão, as análises histológicas revelaram a presença de epitélio logo abaixo da crosta (Figura 22, linha 4).

Figura 22- Morfologia das feridas do 14º dia pós-lesão dos animais normoglicêmicos e diabéticos não tratados e tratados com gel, NLS branca e NLS contendo extrato de semente de uva.

Cortes obtidos a partir da pele de animais controles e diabéticos removida no 14º dia pós-lesão foram corados com hematoxilina-eosina para avaliar os aspectos gerais da ferida e a presença de células inflamatórias. Imagens representativas de pelo menos 5 animais por grupo. DE= derme; EP=epiderme; AX=anexos. Barra = 83 µm. Caixas menores mostram detalhes em maior aumento.

4.4.3 Peroxidação lipídica é atenuada pelo tratamento com NLS no 10º e no 14º dias pós-lesão

Com o intuito de avaliar a efetividade do tratamento com as NLS e sua capacidade de proteger contra a ação de radicais livres, a peroxidação lipídica foi avaliada de forma qualitativa por imunohistoquímica para 4-HNE.

No tratamento com o gel, observou-se uma leve redução da imunomarcção na derme dos animais diabéticos no 10º dia pós-lesão, quando comparamos com os diabéticos não tratados (Figura 23, linhas 1 e 2). Ainda no 10º dia pós-lesão, os animais diabéticos tratados com a NLS branca e a NLS contendo extrato de semente de uva apresentaram uma redução na imunomarcção quando comparados aos animais não tratados; entretanto, não foi possível observar diferença entre os tratamentos com a NLS branca e a NLS contendo extrato de semente de uva (Figura 23, linhas 3 e 4). Como esperado, o grau de peroxidação lipídica permaneceu elevado na derme do 14º dia pós-lesão dos animais diabéticos não tratados, quando comparados com os animais normoglicêmicos não tratados (Figura 24, linha 1). De maneira semelhante à observada no 10º dia pós-lesão, todos os tratamentos diminuíram a imunomarcção na derme dos animais nesta etapa da cicatrização em relação aos animais não tratados, de forma mais evidente nos tratamentos com a NLS branca e com a NLS contendo extrato de semente de uva (Figura 24, linhas 2, 3 e 4). É importante ressaltar que nenhum tratamento foi capaz de eliminar a diferença observada entre os animais controles e diabéticos.

Figura 23- Grau de peroxidação lipídica na derme do 10º dia pós-lesão de camundongos normoglicêmicos e diabéticos antes e após tratamento com gel, NLS branca e NLS contendo extrato de semente de uva.

Peroxidação foi avaliada por imunohistoquímica para 4-HNE no 10º dia pós-lesão. Imunomarcção positiva é indicada em marrom. Contracoloração nuclear foi realizada com hematoxilina de Mayer. Imagens representativas de pelo menos 3 animais por grupo. Barra = 33 µm.

Figura 24- Grau de peroxidação lipídica na derme do 14º dia pós-lesão de camundongos normoglicêmicos e diabéticos antes e após tratamento com gel, NLS branca e NLS contendo extrato de semente de uva.

Peroxidação foi avaliada por imunohistoquímica para 4-HNE no 14º dia pós-lesão. Imunomarcção positiva é indicada em marrom. Contracoloração nuclear foi realizada com hematoxilina de Mayer. Imagens representativas de pelo menos 3 animais por grupo. Barra = 33 µm.

5 DISCUSSÃO

A cicatrização de feridas é um processo complexo e altamente dinâmico, que ocorre através de eventos sobrepostos, envolvendo a interação de moléculas da matriz extracelular, mediadores solúveis e muitos tipos celulares, incluindo células inflamatórias, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais (SINGER; CLARK, 1999 revisão). As feridas diabéticas são caracterizadas por diversos defeitos funcionais na maioria desses eventos, levando ao atraso da cicatrização de feridas (BLAKYTY; JUDE, 2006, revisão).

O restabelecimento da homeostase e da integridade tecidual resulta de alternâncias sucessivas entre reações anabólicas e catabólicas, desempenhadas principalmente pelos leucócitos (CLARK, 1993). Além de combaterem patógenos invasores, estas células também estão envolvidas na degradação de tecidos, através da produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e na formação de tecidos, através da produção de fatores de crescimento, por exemplo (EMING et al., 2007; PEREIRA; CURI, 2005, revisão; RICHES, 1996⁶ apud BALBINO, 2005). Assim, um influxo reduzido ou excessivo de leucócitos infiltrantes no tecido lesionado pode ter efeitos negativos sobre a migração celular, proliferação e diferenciação, eventos essenciais para uma cicatrização eficiente.

Nosso modelo experimental foi caracterizado por uma resposta inflamatória inicial suprimida nos animais diabéticos, perdurando nas etapas seguintes do processo de reparo. Estes resultados corroboram estudos realizados por Fahey III et al. (1991), que mostraram uma redução no número total de leucócitos na área da ferida de camundongos e ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina durante a fase inflamatória tardia do processo de cicatrização. Experimentos conduzidos em pacientes diabéticos também relataram uma função leucocitária prejudicada, com uma inadequada migração de neutrófilos e macrófagos para o local da ferida (DELAMAIRE⁷ et al., 1997 apud BLAKYTYNY; JUDE, 2006).

Wetzler et al. (2000) observaram uma presença prolongada de neutrófilos e macrófagos na lesão durante as etapas finais do processo de reparo em

⁶ RICHES, D. W. Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R. A. F., (Ed.) **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2. ed. New York: Plenum, 1996, p. 143-168.

⁷ DELAMAIRE, M.; MAUGENDRE, D.; MORENO, M.; LEGOFF, M. C.; ALLANNIC, H.; GENETET, B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabetic Medicine**, vol. 14, p. 29-34, 1997.

camundongos diabéticos geneticamente modificados. Adicionalmente, Dovi et al. (2003) demonstraram que a depleção de neutrófilos em camundongos selvagens e diabéticos resultou na aceleração do fechamento da ferida, sugerindo que, embora os neutrófilos forneçam proteção contra infecção, a persistência dessas células exerce um papel negativo no processo de reparo. Além disso, estudos realizados por Komesu et al. (2004) mostraram que ratos diabéticos induzidos por aloxana apresentaram uma menor densidade de neutrófilos na área da lesão até três dias após a cirurgia e após esta fase, quando os neutrófilos devem deixar a área da lesão e ser substituídos por macrófagos e linfócitos, os animais diabéticos apresentaram maior número de neutrófilos.

A neovascularização é necessária para sustentar o tecido de granulação recém-formado durante a cicatrização e geralmente é induzida por fatores angiogênicos produzidos por células inflamatórias, como o VEGF (SUNDERKÖTTER et al., 1994, revisão). A angiogênese depende da migração e proliferação de células endoteliais (ARNOLD; WEST, 1991). Várias complicações do DM estão associadas à angiogênese alterada. Sabe-se que angiogênese excessiva desempenha um papel importante na retinopatia e nefropatia diabética, enquanto que angiogênese inibida contribui para a cicatrização deficiente de feridas (MARTIN; KOMADA; SANE, 2003).

A análise histológica da região da ferida no 10º dia pós-lesão mostrou um atraso na angiogênese nos animais diabéticos quando comparados com os animais controles, podendo ser explicado pela possível diminuição da expressão de fatores angiogênicos e até mesmo pela diminuição de células inflamatórias, que disparam o gatilho inicial para que a neovascularização se inicie. Estudos realizados anteriormente mostraram que feridas diabéticas expressam níveis diminuídos de mRNA para VEGF (ALTAVILLA et al., 2001; FRANK et al., 1995). Curiosamente, a aplicação do fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) na ferida diabética, um mediador importante da angiogênese (OKUMURA et al., 1996) e a indução da expressão de VEGF (DI PEPPE et al., 2002; GALEANO et al., 2003) restabeleceram a angiogênese e aceleraram a cicatrização.

Ao final do 14º dia pós-lesão, os animais diabéticos apresentaram um atraso no processo de reepitelização, com presença de vasos recém-formados e células inflamatórias, diferentemente dos animais controles, que mostraram reepitelização completa no 10º dia.

Estudos sugerem que o atraso na cicatrização de feridas diabéticas ocorre, pelo menos em parte, devido a concentrações persistentemente elevadas de citocinas pró-inflamatórias, que induzem altas concentrações de proteases que, por sua vez, degradam vários fatores de crescimento, receptores e proteínas da matriz extracelular essenciais para a manutenção da matriz extracelular provisória e para o restabelecimento da barreira epitelial (BLAKYTNY et al., 2000; MAST; SCHULTZ, 1996⁸ apud LOBMANN et al., 2002; NATH; GULATI, 1998; NEELY et al., 2000; WY SOCKI; GRINNELL, 1990; WY SOCKI; STAIANO-COICO; GRINNELL, 1993).

Entre as proteases aumentadas em feridas crônicas estão as MMPs, endopeptidases zinco-dependentes produzidas por diferentes tipos celulares na pele, incluindo fibroblastos, queratinócitos, macrófagos, células endoteliais, mastócitos e eosinófilos. Estas enzimas estão envolvidas em várias tarefas durante o reparo de feridas: remoção do tecido desvitalizado, regulação da migração de queratinócitos, angiogênese, regulação da atividade de fatores de crescimento e remodelação do tecido conjuntivo recém-sintetizado (KÄHÄRI; SAARIALHO-KERE, 1997).

A MMP-2 (gelatinase A, 72 KDa) é expressa por vários tipos celulares, especialmente fibroblastos, enquanto a expressão da MMP-9 (gelatinase B, 92 KDa) é mais restrita – é produzida por queratinócitos e está presente em grânulos de neutrófilos e eosinófilos (O'GRADY et al., 2007). A avaliação das MMPs -2 e -9 por zimografia nos mostrou um aumento dessas proteases na ferida diabética, corroborando estudos anteriores realizados em animais e em biópsias de úlceras crônicas humanas (BERMUDEZ et al., 2011; HENNESSEY, 1990).

Interessantemente, resultados preliminares em nosso laboratório utilizando o mesmo modelo experimental mostraram uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α nas feridas dos animais diabéticos no 3º dia pós-lesão em relação aos animais normoglicêmicos. Nas fases posteriores, no entanto, os níveis das citocinas IL-1 β e IL-6 permaneceram elevados no 7º, 10º e 14º dia pós-lesão nos animais diabéticos; já os níveis de TNF- α aumentaram significativamente

⁸ MAST, B. A.; SCHULTZ, G. S. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 4, p. 411-420, 1996.

apenas no 14º dia pós-lesão (PESSOA et al., 2013⁹, em submissão). Sendo assim, a persistência dessas citocinas na ferida diabética pode ter induzido um aumento de MMPs, como MMP-2 e MMP-9, avaliadas neste estudo.

Durante a formação do tecido de granulação, alguns fibroblastos podem adquirir características morfológicas e bioquímicas de células musculares lisas. Estas células modificadas, denominadas miofibroblastos, participam da síntese da matriz extracelular e na geração de força mecânica, o que resulta na reorganização da matriz e contração da ferida (AMADEU et al., 2003; TOMASEK et al., 2002, revisão). Os miofibroblastos atuam na fase de remodelação, contraindo seus feixes de microfilamentos que estão ligados à matriz extracelular através de integrinas, resultando na contração da matriz local e agregação da rede de colágeno circundante (TOMASEK et al., 2002, revisão).

A persistência de miofibroblastos dentro de uma lesão fibrótica leva à cicatrização excessiva, podendo haver comprometimento funcional do órgão afetado (GABBIANI, 2004). A fibrose é uma complicação frequente do DM e, embora ocorra por mecanismos pouco esclarecidos, sabe-se que ela pode ser estimulada indiretamente pela glicação de colágeno (YUEN et al., 2010). Apesar da imunohistoquímica para α -actina de músculo liso realizada no 10º dia pós-lesão ter sugerido uma maior quantidade de miofibroblastos na ferida diabética, não podemos caracterizar tal achado como fibrose, uma vez que esta análise foi feita apenas em um único período pós-lesão.

A síntese de colágeno pelos fibroblastos é muito importante para a cicatrização da ferida; um aumento da síntese ocorre 24 h após o ferimento e continua a ocorrer nos 5 dias subseqüentes (SHUKLA; RASIK; SHANKAR, 1999). Schäffer et al. (1997) mostraram uma deposição prejudicada de colágeno em ratos induzidos ao diabetes com estreptozotocina, mas paralelamente mostraram um aumento na expressão de genes para colágenos tipos I e III. O mesmo foi observado por Bermudez et al. (2001). Embora os nossos resultados tenham mostrado um aumento na quantidade de miofibroblastos na ferida diabética no 10º dia pós-lesão, a deposição de colágeno fibrilar estava atrasada. Talvez exista um desequilíbrio entre a síntese de matriz extracelular pelos fibroblastos e miofibroblastos e sua

⁹ PESSOA, A. F. M.; FLORIM, J. C.; SANTOS, M. F. Emprego de nanopartículas em ferida diabética – aplicação de antioxidantes utilizando carreadores lipídicos nanoestruturados. 2013. Em submissão.

degradação por metaloproteínas. Neste estudo, nós investigamos a atividade de MMP-2 e MMP-9, gelatinases que degradam principalmente colágeno desnaturado (gelatina) e colágeno do tipo IV (WOESSNER, 1991). Estudos utilizando biópsias de úlceras diabéticas humanas, no entanto, mostraram um aumento nos níveis de MMP-1, -2, -8 e -9 (LOBMANN et al., 2002), acompanhado de uma redução relativa de inibidor tecidual de metaloproteínas-2 (TIMP-2); MMP-1 and MMP-8 são collagenases que degradam colágeno intersticial dos tipos I e III (encontrados na pele) e colágeno do tipo II, além de digerirem outras moléculas da matriz extracelular (WOESSNER, 1991).

A hiperglicemia crônica estimula o aumento da captação da glicose pelas células, o qual resulta no aumento da atividade mitocondrial, acompanhado por uma geração excessiva de EROs. A geração de altos níveis de radicais livres através da oxidação da glicose resulta na ruptura do equilíbrio redox, o que pode, dentre outros efeitos, danificar organelas celulares, aumentar a peroxidação lipídica e provocar danos ao DNA (DANDONA et al., 1996; NIKI, 2009; SHRILATHA; MURALIDHARA, 2007).

A peroxidação lipídica é frequentemente combinada com a formação de aldeídos reativos, como 4-HNE, um aldeído insaturado que é o produto mais importante da peroxidação lipídica, o qual deriva de ácidos graxos poliinsaturados como o ácido linoléico, ácido linolênico e ácido araquidônico (ESTERBAUER, 1991). Estes compostos têm alta atividade biológica, apresentando uma série de efeitos citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos (POLI; SCHAUR, 2000, revisão), uma vez que reagem com grupo sulfidril e resíduos de proteínas, peptídeos, fosfolipídios e ácidos nucleicos (ESTERBAUER⁹; ZOLLNER; SCHOLZ, 1975 apud UCHIDA et al., 1993).

O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão beta; é volátil, possui baixo peso molecular ($C_3H_4O_2$, P.M. = 72,07), tem uma cadeia curta 1,3-dicarbonil e é um ácido moderadamente fraco. Em condições apropriadas de incubação, reage eficientemente com uma variedade de agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absortividade molar no espectro visível (LIMA; ABDALLA, 2001). A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos que podem ser determinados por absorção no espectro visível ou por fluorescência.

O aumento do estresse oxidativo observado nos animais diabéticos por dois marcadores diferentes (TBARS e 4-HNE) no 10º dia pós-lesão é condizente com estudos prévios realizados por Traverso et al. (1998), que mostraram um aumento do nível de MDA e 4-HNE no plasma de ratos diabéticos tratados com insulina. Outros trabalhos também mostraram um aumento da concentração de MDA na região da ferida (AKTUNC et al., 2010) e no plasma (CHEN et al., 2010) de animais induzidos ao diabetes. É possível que o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia desempenhe um papel importante em várias funções comprometidas na pele diabética.

Várias fontes de antioxidantes naturais são conhecidas e algumas são amplamente encontradas no reino vegetal. Diversos extratos de plantas têm sido estudados devido ao poder antioxidante que pode ser atribuído ao seu conteúdo de compostos fenólicos, como por exemplo, a sálvia (LU; FOO, 2001), o coentro (MELO et al., 2003) e o manjerição (LEE et al., 2005).

O extrato de semente de uva é rico em proantocianidinas, grupo de bioflavonóides polifenólicos que apresentam uma grande variedade de efeitos biológicos, dentre eles a inibição da peroxidação lipídica e aceleração do processo cicatricial. Estes compostos podem ser identificados e quantificados por meio de CLAE, onde parâmetros como comparação dos tempos de retenção e espectro de absorção dos picos desconhecidos com os padrões de referência são utilizados.

Ao compararmos o cromatograma obtido a partir da amostra de Vitaflavan® (Figura 11) e o cromatograma obtido por Khanal et al. (2009) (Figura 25) foi possível concluir que: 1) enquanto Khanal et al. (2009) não conseguiram separar os monômeros, epicatequina e catequina, estes dois picos foram bem resolvidos em nossa condição - picos 1a e 1b, respectivamente; 2) não foi detectado pico de polímero na amostra de Vitaflavan®, o qual deveria eluir após 60 min. Deve-se lembrar que o extrato de semente de uva obtido por Khanal et al. (2009) é um macerado bruto de semente de uva.

Comparando os picos obtidos por Khanal et al. (2009) (Figura 25) e os de Vitaflavan® (Figura 11) podemos supor que: a) o pico 1 obtido por Khanal et al. (2009) corresponde aos monômeros epicatequina e catequina (picos 1a e 1b) obtidos na separação do Vitaflavan® e confirmados pelos padrões; b) na amostra de Vitaflavan® foram encontrados os oligômeros 2, 3 e 4, possivelmente os mesmos encontrados no extrato de semente de uva obtido por Khanal et al. (2009). Neste

caso não é possível afirmar que o pico 2 seja proantocianidina B1 ou B2. Possivelmente sejam os dois, uma vez que os tempos de retenção coincidem com os padrões, e estas duas formas diméricas são relatadas na uva. Seria necessária a confirmação da estrutura por espectrometria de massas, além dos parâmetros já utilizados (tempo de retenção e espectro de absorção); c) de acordo com Khanal et al. (2009), os oligômeros detectados no extrato bruto de semente de uva consistem de unidades de catequina e epicatequina apresentando exclusivamente ligações do tipo B.

A quantificação dos compostos presentes no Vitaflavan® revelou que este extrato é uma fonte razoável de proantocianidinas, correspondendo a 46% do conteúdo total.

Figura 25- Cromatograma obtido por KHANAL et al. (2009) a partir da análise por CLAE de extrato de semente de uva não extrusado.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para acessar a capacidade antioxidante total de todos os componentes antioxidantes não enzimáticos de uma amostra biológica, dada a dificuldade de mensurar cada componente antioxidante separadamente (CAO; PRIOR, 1999; MILLER et al., 1993). De forma resumida, a eficácia de um antioxidante é verificada através do monitoramento da inibição da

oxidação de um substrato adequado sob condições padrão através de métodos químicos, instrumentais ou sensoriais (SÁNCHEZ-MORENO, 1998).

O princípio do ensaio ORAC é baseado na intensidade do sinal da molécula fluorescente, podendo ser fluoresceína ou β -ficoeritrina (SINGH; SINGH, 2008). Na ausência do antioxidante, o radical peroxila, gerado pela decomposição térmica de AAPH, leva à oxidação da fluoresceína, que quando oxidada deixa de emitir fluorescência. Esta oxidação apresenta um perfil de decaimento de fluorescência dependente do tempo e ocorre de forma rápida. Na presença do antioxidante, este transfere átomos de hidrogênio para o radical peroxila, estabilizando o radical e impedindo o seu ataque à fluoresceína. O radical peroxila é constantemente formado e o antioxidante é constantemente consumido até que a quantidade de antioxidante se torne insuficiente para proteção da fluoresceína, iniciando-se então o seu decaimento, que ocorre de forma mais lenta. O cálculo da inibição se dá pela comparação entre a área abaixo da curva sem antioxidante e com antioxidante, onde a diferença corresponde à capacidade antioxidante. Já o método DPPH é baseado na medição da capacidade de redução do radical livre estável DPPH[•] pelos antioxidantes da amostra e esta capacidade é avaliada por meio da diminuição da sua absorção, com mudança de coloração violeta para amarela, proporcional à concentração da substância redutora da amostra (GÜLÇİN, 2012, revisão).

Em geral, o ensaio ORAC é superior a métodos similares, como DPPH, pois combina tempo de inibição e grau de inibição da ação de radicais livres pelos antioxidantes em uma quantidade única. Além disso, a medição de fluorescência aplicada no ensaio provoca menos interferência por compostos coloridos (CAO et al., 1995; PRIOR; CAO, 2000, revisão). Sendo assim, nós levamos em consideração os resultados obtidos neste ensaio e acreditamos que a capacidade antioxidante do extrato Vitaflavan[®] se mostrou inferior à da catequina, epicatequina e proantocianidina B2 devido à interação desses compostos no extrato, o que pode ter levado à redução e/ ou inibição da capacidade antioxidante que estes apresentam individualmente.

Ambos os métodos utilizados para a avaliação da capacidade antioxidante fornecem valores arbitrários. A possibilidade de fazer comparações com dados presentes na literatura é mínima, uma vez que o processo de extração da semente da uva pode ser realizado de diferentes formas e isso pode levar a uma alteração em seu conteúdo total. Estudos realizados por WANG et al. (1996) mostraram que a

uva vermelha apresenta uma capacidade antioxidante (avaliada por ORAC) de $7,39 \pm 0,48$ $\mu\text{mol Trolox eq./g}$ de fruta e $36,0 \pm 1,1$ por grama de matéria seca, enquanto a uva branca apresenta $4,46 \pm 1,06$ $\mu\text{mol Trolox eq./g}$ de fruta e $26,2 \pm 2,6$ por grama de matéria seca. Além disso, o suco de uva vermelha apresentou uma capacidade antioxidante de 3,99 e o suco de uva branca 2,89 $\mu\text{mol Trolox eq./g}$ de fruta.

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando o ácido gálico como padrão de referência. O reagente de Folin Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotúngsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul (NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009). Baydar, Özkan e Sagdiç (2004) mostraram que a quantidade de fenólicos totais extraídos com diferentes misturas de solventes a partir de extrato de semente de uva variou entre 627,98 e 667,87 mg ácido gálico eq./g, valores inferiores ao encontrado no Vitaflavan[®] ($923,12 \pm 10,97$ mg ácido gálico eq./g).

O desenvolvimento de nanocarreadores contendo fármacos envolve uma série de estudos pré-formulação visando a obtenção de formulações realmente nanotecnológicas (que apresentam partículas de tamanho nanométrico), com adequada eficiência de encapsulação do fármaco, estabilidade físico-química e biocompatibilidade. Assim, é imprescindível o emprego de diferentes métodos analíticos para a caracterização de nanopartículas, como forma de atestar a sua característica nanotecnológica e prospectar o seu comportamento *in vivo*. Entre os métodos analíticos mais empregados estão a difratometria de laser, o espalhamento de luz dinâmico, a análise de monitoramento das nanopartículas e a cromatografia líquida.

Os principais ingredientes utilizados no preparo de uma NLS incluem lipídeos sólidos (triglicerídeos, glicerídeos parciais, ácidos graxos ou esteróides), emulsificantes e água. Os emulsificantes são comumente utilizados para estabilizar a dispersão de lipídios e sabe-se que a combinação de diferentes emulsificantes pode prevenir a aglomeração de partículas (MEHNERT; MÄDER, 2001, revisão).

As nanopartículas lipídicas sólidas foram preparadas utilizando a gordura de coco, um ácido graxo saturado, e uma mistura de dois emulsificantes, Span 80 e

Tween 80, para garantir uma incorporação adequada do extrato de semente de uva às NLS e prevenir a aglomeração das partículas.

Segundo Üner (2006, revisão), análises de tamanho de nanopartículas são um bom indicador de instabilidade e são comumente utilizadas para caracterizar o produto. Sistemas bem formulados devem possuir baixa polidispersividade, ou seja, baixa variação de tamanho de partícula e no caso de lipossomos, nanoesferas e nanopartículas, devem possuir tamanhos menores que 1 μm .

Alguns fatores podem interferir no tamanho das nanopartículas como, por exemplo, proporções de tensoativos. Lippacher, Müller e Mäder (2002) mostraram que a diminuição da concentração de tensoativos acarreta no aumento do tamanho das partículas durante o período de estocagem. Outro fator importante é a temperatura utilizada durante o processo de obtenção de NLS por homogeneizadores de alta pressão. A técnica de homogeneização utilizando altas temperaturas produz partículas com tamanhos menores (aproximadamente com 500 nm) do que aquelas produzidas por homogeneização a frio (ÜNER, 2006, revisão).

O uso da técnica de HAP nos permitiu obter nanopartículas com diâmetro médio entre $108,8 \pm 1,3$ e $144 \pm 13,2$ nanômetros e distribuição de tamanho de partícula (SPAN) e índice de polidispersão (PDI) menores do que 2,0 e 0,2, características de sistemas bem formulados.

O pH é uma característica físico-química importante a ser avaliada pois alterações de seus valores podem estar associadas à degradação de componentes pertencentes à formulação e o seu monitoramento é importante para determinar a estabilidade das suspensões (PAESE, 2008; SCHAFFAZICK et al., 2003, revisão). O pH das nossas formulações e do gel contendo as NLS foram avaliados em um único momento, logo após o preparo; portanto, as medidas não foram utilizadas como indicativo de estabilidade, mas sim para mostrar que a presença do extrato de semente de uva na formulação não alterou o pH. O pH ficou próximo da faixa de pH adequada para a aplicação cutânea, entre 5,4-5,9 (SCHMID-WENDTNER; KORTING, 2006, revisão). As análises de condutividade foram realizadas com a mesma finalidade.

No desenvolvimento de produtos farmacêuticos, a otimização das características reológicas é importante, pois está associada a aspectos de absorção e de biodisponibilidade de um fármaco. A viscosidade de uma substância pode ser definida como a expressão da resistência ao fluxo quando submetida a uma tensão;

quanto maior a viscosidade, maior a resistência e mais difícil é a penetração (MARTIN et al., 1993; PAESE, 2008). As viscosidades das nossas formulações ficaram próximas da viscosidade da água (1 mPa x s), que é baixa; ou seja, de fácil penetração.

Alguns conceitos são importantes na determinação do comportamento reológico de um material. A taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) indica a taxa com que um material escoar quando uma determinada força é aplicada e a tensão de cisalhamento (τ) indica a pressão aplicada sobre o material. Fluidos newtonianos caracterizam-se por apresentar viscosidades constantes independentemente da taxa de cisalhamento, enquanto que fluidos não newtonianos são aqueles em que não se verifica uma relação linear direta entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento aplicadas (MARTIN et al., 1993). Não foram observadas diferenças estatísticas na viscosidade das NLS brancas e das NLS associadas ao extrato de semente de uva, mostrando que a presença do extrato não influenciou a viscosidade das formulações.

Para que o tratamento tópico pudesse ser realizado, nós incorporamos as formulações contendo as NLS em gel tendo como base o Carbopol Ultrez[®]. O Carbopol Ultrez[®] é um polímero bastante utilizado em aplicações farmacêuticas como agente espessante devido às suas propriedades de rápida dispersão à temperatura ambiente e por fornecer géis com boas propriedades reológicas (FRESNO; RAMIREZ; SORIANO, 2001). Estes polímeros têm a capacidade de absorver água e aumentam em até 1000 vezes o seu volume original e 10 vezes o seu diâmetro para formar um gel. Para isso, geralmente são utilizados agentes neutralizantes, como a trietanolamina, um amina orgânica, que quando adicionada ao gel promove a gelificação do polímero e a formação da rede de gel contendo o fármaco de interesse.

Os carbômeros são muito adequados para formulações aquosas de aplicação tópica, pois são seguros e eficazes; têm excelente espessamento e emulsificação; baixa irritação e baixa toxicidade com base nas suas propriedades químicas e físicas; não sensibilizantes com o uso repetitivo e totalmente inertes devido ao seu peso molecular extremamente elevado, que os impede de penetrar na pele e afetar a atividade biológica do fármaco (HOSMANI, 2010, revisão).

Os animais diabéticos que receberam aplicação diária de gel apresentaram uma melhora morfológica no que diz respeito à reepitelização e resposta

inflamatória, assim como uma discreta melhora (redução) do grau de peroxidação lipídica no 14º dia pós-lesão. Entretanto, não existem indícios na literatura de que a base utilizada para fazer o gel tenha sido responsável pelos efeitos positivos observados, uma vez que este polímero é amplamente difundido na indústria farmacêutica justamente pela sua propriedade inerte.

Recentemente, Almeida et al. (2012) realizaram um estudo onde hidrogel contendo rutina, um bioflavonóide, foi capaz de acelerar o fechamento da ferida e diminuir os níveis de TBARS em ratos normais, quando comparado com o tratamento com o gel, sem o princípio ativo. O gel continha Carbopol Ultrez®, trietanolamina e imidazolinidil uréia, os mesmos componentes utilizados no preparo do gel empregado em nossas análises. Porém, os pesquisadores não fizeram análises em animais sem nenhum tratamento para avaliar se o gel surtiu algum efeito.

Entre os diversos tipos de terapias tópicas para o tratamento de feridas está o uso de coberturas ou curativos, como filme de poliuretano, hidrocolóide, papaína, carvão ativado, alginatos e hidrogéis que têm como característica comum manter o ambiente propício para o reparo tecidual, como por exemplo manter a umidade no local lesionado (LIONELLI; LAWRENCE, 2003). Já foi demonstrado que a reepitelização de feridas em meio úmido é mais rápida do que nas que permanecem em meio seco (WINTER, 1962¹⁰ apud BLANES, 2013). Além disso, o meio úmido provoca efeitos benéficos como prevenção da desidratação do tecido e morte celular, angiogênese acelerada, redução da dor por evitar desidratação das terminações nervosas e manutenção de células viáveis (FIELD; KERSTEIN, 1994¹¹ apud BLANES, 2013).

Acreditamos, portanto, que os resultados positivos obtidos no tratamento com o gel ocorreram pelo fato da aplicação diária do produto ter mantido um ambiente mais hidratado no local da lesão, contribuindo para uma melhor cicatrização, além da presença do imidazolidinil uréia, que previne a contaminação microbológica.

O tratamento com a NLS branca, sem o antioxidante, também nos mostrou resultados interessantes, pois embora tenha acelerado o fechamento da ferida nos animais diabéticos, provocando a reepitelização ao final do 14º dia, atuou de forma

¹⁰ WINTER, G. D. Formation of the scab and the rate of epithelialization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. **Nature**, v. 193, p. 293-294, 1962.

¹¹ FIELD, C. K; KERSTEIN, M. D. Overview of wound healing in a moist environment. *The American Journal of Surgery*, v. 167, n. 1, p. 2-6, 1994.

negativa nos animais controles, atrasando a reepitelização no 10º dia pós-lesão observada nos animais controles não tratados. O tratamento com a NLS branca também foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica observada na derme dos animais diabéticos não tratados.

A gordura de coco, lipídeo utilizado como base para o preparo das NLS, é composta principalmente pelo ácido láurico ou dodecanóico, ácido graxo saturado de cadeia longa, encontrado também no leite materno (TVRZICKA et al., 2011). Os ácidos graxos saturados têm ponto de fusão mais alto e por isso encontram-se na forma sólida em temperatura ambiente. As maiores fontes de ácidos graxos saturados são de origem animal, com exceção da gordura de coco, que contém aproximadamente 90% de ácidos graxos saturados. Diferentemente dos ácidos graxos insaturados que podem sofrer oxidação nas duplas ligações, os ácidos graxos saturados são mais resistentes à oxidação não enzimática (MACHADO; CHAVES; ANTONIASSI, 2006). No organismo, o ácido láurico é convertido em monolaurina, um monoglicerídeo de ação antibacteriana, antiviral e antiprotzoária (LIEBERMAN; ENIG; PREUSS, 2006¹² apud FREITAS et al., 2009; PREUSS et al., 2005).

Vários trabalhos têm mostrado os efeitos de ácidos graxos essenciais sobre a cicatrização de feridas, mas poucos têm mostrado a influência de ácidos graxos saturados, como a gordura de coco, neste processo (FERREIRA et al., 2012, revisão; MANHEZI; BACHION; PEREIRA, 2008, revisão; RODRIGUES et al., 2012).

Nevin e Rajamohan (2009) avaliaram a influência do tratamento tópico com óleo de coco na cicatrização dérmica de ratos. A ferida de animais tratados com óleo de coco virgem apresentou reepitelização mais rápida quando comparada com a ferida não tratada e um aumento significativo do conteúdo total de colágeno. O tratamento também foi capaz de aumentar o conteúdo de elastina no tecido de granulação e os níveis de glicosaminoglicanas quando comparado com a ferida controle. Adicionalmente, eles verificaram uma alta atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e GR que contribuíram para a redução dos níveis de MDA nos animais tratados. Neste estudo, os efeitos positivos observados na cicatrização foram atribuídos aos componentes biologicamente ativos e ácidos graxos antimicrobianos do óleo de coco. Um estudo anterior realizado pelo mesmo grupo

¹² LIEBERMAN, S.; ENING, M. G.; PREUSS, H. G. **Alternative & Complementary Therapies**, v. 12, p. 310, 2006.

(2009), mostrou que o óleo de coco contém altos níveis de polifenóis, vitamina E e provitamina A com uma significativa atividade eliminadora de radicais livres. Da mesma maneira, Kochikuzhyil, Devi e Fattepur (2010) demonstraram que o óleo de coco melhora o status antioxidante, com aumento na atividade de enzimas antioxidantes, além de melhorar a tolerância à glicose.

Estudos realizados por Radenahmad et al. (2012) mostraram que ratas ovariectomizadas que receberam doses diárias de suco de coco apresentaram uma melhora na cicatrização; no entanto, neste caso, a melhora foi devida à presença de componentes com propriedades semelhantes ao estrógeno, que tem sido reportada por acelerar o processo de reparo.

Embora existam trabalhos na literatura demonstrando a atividade antioxidante da gordura de coco, não foram encontrados estudos utilizando formulações semelhantes às utilizadas neste estudo, com o lipídeo no estado sólido.

O tratamento com as NLS contendo extrato de semente de uva promoveu uma melhora na resposta inflamatória e na reepitelização da ferida diabética, embora a crosta ainda estivesse presente, além de uma diminuição significativa na peroxidação lipídica na derme dos animais diabéticos. Esses resultados corroboram estudos realizados por Khanna et al. (2002), nos quais o tratamento tópico com extrato de semente de uva aumentou de forma acentuada a contração e o fechamento de feridas cutâneas e tais efeitos foram claramente visíveis a partir do dia 1 pós-ferimento. Recentemente, Hemmati et al. (2011) concluíram que a administração tópica de extrato de semente de uva (2%) teve um bom potencial para promover a cicatrização de feridas em coelhos, quando comparado com cremes comerciais.

Em relação ao potencial antioxidante, Koga et al. (1999) sugeriram que a ingestão de proantocianidinas aumenta a resistência do plasma sanguíneo contra o estresse oxidativo. Por outro lado, já foi demonstrado que o tratamento com extrato de semente de uva contendo proantocianidinas está associado com aumento de marcadores de oxidação no local da ferida, como o 4-HNE, e isso pode ser explicado pelo fato de que a modificação oxidativa de antioxidantes pode resultar na formação de oxidantes potentes (KHANNA et al., 2002). Adicionalmente, Lee et al. (2007) mostraram que a administração de proantocianidinas provocou uma diminuição nos níveis de TBARS no fígado e plasma de animais diabéticos induzidos com estreptozotocina. Já estudos realizados por Chis et al. (2010) mostraram que a

administração oral de extrato de semente de uva (100 mg /kg) reduziu os níveis de peróxidos lipídicos e proteínas carboniladas que estavam elevados em ratos diabéticos.

As proantocianidinas podem atuar através de três mecanismos básicos de atividade antioxidante: eliminação de radicais livres, quelação de metais de transição e inibição de enzimas (COS et al., 2003).

Na eliminação de radicais livres, as proantocianidinas, assim como outros antioxidantes, doam um elétron para as espécies radicalares, dando origem a compostos mais estáveis e menos prejudiciais. A atividade de eliminação de radicais livres geralmente é determinada em ensaios utilizando radicais livres relativamente estáveis, como por exemplo, o DPPH[•], empregado em nossas análises.

Os metais de transição ferro e cobre são cofatores essenciais de várias enzimas que estão envolvidas no metabolismo do oxigênio e são normalmente ligados a proteínas, tais como lactoferrina e ferritina no caso do ferro e ceruloplasmina no caso do cobre (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Quando presentes no estado livre em sistemas biológicos, os metais de transição podem catalisar reações de radicais livres, como por exemplo, a reação de Fenton.

Yoneda e Nakatsubo (1998)¹³ apud Cos et al. (2003) estudaram a atividade quelante de metais das proantocianidinas testando a estabilidade relativa de um complexo alumínio-proantocianidina e concluíram que esta capacidade deve-se principalmente a função catecol do anel B das proantocianidinas. Os pesquisadores também observaram que a capacidade quelante de alumínio aumentou de acordo com o grau de polimerização das proantocianidinas.

As proantocianidinas também podem exercer sua atividade antioxidante através da inibição de enzimas pró-oxidantes, como as lipoxigenases. No trabalho desenvolvido por Schewe et al. (2001), a lipoxigenase-15, que é um importante catalisador enzimático de peroxidação lipídica da membrana celular e de lipoproteínas plasmáticas, foi inibida por epicatequina e procianidinas presentes no cacau. Em outro estudo, foi demonstrado que dímeros, trímeros, tetrâmeros e pentâmeros de proantocianidinas inibiram a atividade da enzima lipoxigenase-5 humana (SCHEWE; KÜHN; SIES, 2002). As proantocianidinas também podem inibir a atividade de ciclooxigenases e collagenases (ALMEIDA et al., 2012).

¹³ YONEDA, S.; NAKATSUBO, F. Journal of Wood Chemistry and Technology, v. 18, p. 193, 1998.

Interessantemente, observamos uma resposta inflamatória mais eficiente após tratamento com o extrato de semente de uva e alguns estudos têm demonstrado a ação das proantocianidinas como agentes anti-inflamatórios. Até o momento, a maioria dos trabalhos tem focado na modulação negativa de NF-KB, um indutor de citocinas pró-inflamatórias que desempenha um papel importante na resposta imune inata e em condições inflamatórias crônicas (BREMNER; HEINRICH, 2002; PARK et al., 2000).

Neste estudo, a utilização de NLS associadas ao extrato de semente de uva exerceu um efeito benéfico sobre a cicatrização cutânea em camundongos diabéticos, quando comparados a diabéticos não tratados ou tratados apenas com a NLS sem o extrato. Este efeito foi melhor observado pela reepitelização da ferida ao 14º dia pós-lesão, embora a crosta tenha sido mantida sobre a epiderme na maioria dos animais (gerando um falso resultado de não fechamento da ferida pela análise morfométrica). Embora um efeito antioxidante tenha sido observado, este efeito não foi maior que aquele exercido pela gordura de coco da NLS vazia. A ação antioxidante não seria, portanto, o fator mais importante nesta terapia. Aparentemente, o efeito hidratante e inerte do gel foi mais eficiente que a presença dos ácidos graxos saturados da formulação tópica, que estimulou a inflamação em animais controle e diabéticos, por mecanismos ainda não esclarecidos. De certa forma, é também possível que o modelo experimental utilizado, por representar uma ferida com retardo cicatricial, mas não uma ferida crônica típica de um diabético, tenha limitado a análise da eficácia desta terapia, já que a simples hidratação da ferida foi suficiente para promover efeitos tão positivos.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o tratamento tópico com o gel, com a NLS branca e com a NLS contendo extrato de semente de uva foram capazes de recuperar o atraso na cicatrização observado nos animais diabéticos, com uma melhora na resposta inflamatória inicial e na reepitelização. Além disso, todos os tratamentos atenuaram a peroxidação lipídica observada na derme dos animais, especialmente a aplicação da NLS branca e da NLS contendo extrato de semente de uva, comprovando as suas propriedades antioxidantes. Os resultados sugerem, no entanto, que os efeitos positivos destas terapias tópicas estavam muito associados ao impedimento da desidratação da ferida, provavelmente mais que à ação antioxidante do extrato de uva.

REFERÊNCIAS¹⁴

- AFAQ, F.; KATIYAR, S. T. Polyphenols: Skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 14, p. 1200-1215, 2011.
- AKTUNC, E.; OZACMAK, V. H.; OZACMAK, H. S.; BARUT, F.; BUYUKATES, M.; KANDEMIR, O.; DEMIRCAN, N. N-acetyl cysteine promotes angiogenesis and clearance of free oxygen radicals, thus improving wound healing in an alloxan-induced diabetic mouse model of incisional wound. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, p. 902-909, 2010.
- ALLEVA, R.; NASOLE, E.; DIDONATO, F.; BORGHI, B.; NEUZIL, J.; TOMASETTI, M. alpha-lipoic acid supplementation inhibits oxidative damage, accelerating chronic wound healing in patients undergoing hyperbaric oxygen therapy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 333, n. 2, p. 404-410, 2005.
- ALMEIDA, J. S.; BENVENGNU, D. M.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; BARCELOS, R. C. S.; CORADINI, K.; CARVALHO, L. M.; BÜRGUER, M. E; BECK, R. C. R. Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 7, p. 792-799, 2012.
- ALTAVILLA, D.; SAITTA, A.; CUCINOTTA, D.; GALEANO, M.; DEODATO, B.; COLONNA, M.; TORRE, V.; RUSSO, G.; SARDELLA, A.; URNA, G.; CAMPO, G.; CAVALLARI, V.; SQUADRITO, G.; SQUADRITO, F. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. **Diabetes**, v. 50, p. 667-674, 2001.
- AMADEU, T. P.; COULOMB, B.; DESMOULIERE, A.; COSTA, A. M. A. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro Models. **Lower Extremity Wounds**, v. 2, n. 2, p. 60-68, 2003.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revisão Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- APPELDOORN, M. M. **Dietary A- and B-type procyanidins. Characterization and biofunctional potential of an abundant and diverse group of phenolics**. 2009. 164 p. Thesis (Ph. D. Thesis) - Wageningen University, The Netherlands, 2009.
- ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 52, p. 407-422, 1991.

¹⁴ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAGCHI, D.; GARG, A.; KROHN, R. L.; BAGCHI, M.; TRAN, M. X.; STOHS, S. J. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. **Research communications in molecular pathology and pharmacology**, v. 95, n. 2, p. 179-189, 1997.

BAGCHI, D.; GARG, A.; KROHN, R. L.; BAGCHI, M.; BAGCHI, D. J.; BALMOORI, J.; STOHS, S. J. Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. **General Pharmacology**, v. 30, n. 5, p. 771-776, 1998.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BAO, P.; KODRA, A.; TOMIC-CANIC, M.; GOLINKO, M. S.; EHRLICH, H. P.; BREM, H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. **Journal of Surgical Research**, v. 153, n. 2, p. 347-358, 2009.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, p. 585-601, 2008.

BAUMGARTNER-PARZER, S. M.; WAGNER, L.; PETTERMANN, M.; GRILLARI, J.; GESSL, A.; WALDHÄUSL, W. High-glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. **Diabetes**, v. 44, n. 11, p. 1323-1327, 1995.

BAYDAR, N. G.; ÖZKAN, G.; SAGDIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, v. 15, p. 335-339, 2004.

BERMUDEZ, D. M.; HERDRICH, B. J.; XU, J.; LIND, J.; BEASON, D. P.; MITCHELL, M. E.; SOSLOWSKY, L. J. LIECHTY, K. W. Impaired biomechanical properties of diabetic skin: implications in pathogenesis of diabetic wound complications. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 5, p. 2215-2223, 2011.

BLAKYTNY, R.; JUDE, E. B.; MARTIN, G. J.; BOULTON, A. J.; FERQUSON, M. W. Lack of insulin-like growth factor 1 (IGF1) in the basal keratinocyte layer of diabetic skin and diabetic foot ulcers. **The Journal of Pathology**, v. 190, p. 589-594, 2000.

BLAKYTNY, R.; JUDE, E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 23, p. 594-608, 2006.

BLANES, L. Tratamento de feridas. BAPTISTA-SILVA, J. C. C. (Ed.). **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://www.bapbaptista.com>>. Acesso em: 24 maio 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1219-1222, 2007.

BREMMER, P.; HEINRICH, M. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 453-472, 2002.

BRKOVIC, A.; SIROIS, M. G. Vascular permeability induced by VEGF family members in vivo: role of endogenous PAF and NO synthesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 100, p. 727-737, 2007.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.

BROWNLEE, M. The pathology of diabetic complications. A unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, p. 1615-1625, 2005.

CAO, G.; PRIOR, R. L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 50-62, 1999.

CAO, G.; VERDON, C.; WU, A.; WANG, H.; PRIOR, R.L. Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the COBAS FARA II. **Clinical Chemistry**, vol. 41, p. 1738-1744, 1995.

CHEN, X.; LIN, W.; LU, S. XIE, T.; GE, K.; SHI, Y.; ZOU, J.; LIU, Z.; LIAO, W. Mechanistic study of endogenous skin lesions in diabetic rats. **Experimental Dermatology**, v. 19, p. 1088-1095, 2010.

CHIS, I. C.; UNGUREANU, M. I.; MARTON, A. Antioxidant effects of a grape seed extract in a rat model of diabetes mellitus. **Diabetes & Vascular Disease Research**, v. 6, n. 3, p. 200-204, 2009.

CHOI, J. S.; LEONG, K. W.; YOO, H. S. In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). **Biomaterials**, v. 29, p. 587-596, 2008.

CLARK, R. A. F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 11, p. 647-661, 1993.

CLARK, R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1018-1029, 2007.

COS, P.; BRUYNE, DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; APERS, S.; BERGHE, D. V.; VLIETINCK, A. J. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1345-1359, 2003.

DANDONA, P; THUSU, K.; COOK, S.; SNYDER, B.; MAKOWSKI, J.; ARMSTRONG, D.; NICOTERA, T. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. **The Lancet**, v. 17, n. 347, p. 444-445, 1996.

DELISSER, H. M.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; STRIETER, R. M.; BURDICK, M. D.; ROBINSON, C. S.; WEXLER, R. S.; KERR, J. S.; GARLANDA, C.; MERWIN, J. R.; MADRI, J. A.; ALBELDA, S. T. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 151, n. 3, p. 671-677, 1997.

DETONI, C. B.; SOUTO, G. D.; SILVA, A. L. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Photostability and skin penetration of different E-resveratrol -loaded supramolecular structures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 913-921, 2012.

DEVECI, M.; GILMONT, R. R.; DUNHAM, W. R.; MUDGE, B. P.; SMITH, D. J.; MARCELO, C. L. Glutathione enhances fibroblast collagen contraction and protects keratinocytes from apoptosis in hyperglycaemic culture. **British Journal of Dermatology**, v. 152, p. 217-224, 2005.

DI PEPPE, S. R.; MANGONI, A.; ZAMBRUNO, G.; SPINETTI, G.; MELILLO, G.; NAPOLITANO, M.; CAPOGROSSI, M.C. Adenovirus-mediated VEGF₁₆₅ gene transfer enhances wound healing by promoting angiogenesis in CD1 diabetic mice. **Gene Therapy**, v. 9, p. 1271-1277, 2002.

DOVI, J. V.; HE, L. K.; DIPIETRO, L. A. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, p. 448-455, 2003.

DOXEY, D. L.; NG, M. C.; DILL, R. E.; IACOPINO, A. M. Platelet-derived growth factor levels in wounds of diabetic rats. **Life Sciences**, USA, v. 57, n. 11, p. 1111-1123, 1995.

DU, X.L.; EDELSTEIN, D.; ROSSETI, L.; FANTUS, I. G.; GOLDBERG, H.; ZIYADEH, F.; WU, J.; BROWNLEE, M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Medical Sciences**, v. 97, n. 22, p. 12222-12226, 2000.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate**. 2004. 110 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

EL-ALFY, A. T.; AHMED, A. A. E.; FATANI, A. J. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 264-270, 2005.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 514-525, 2007.

ESTERBAUER, H.; ZOLLNER, H.; SCHAUR, R. J. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, p. 81-128, 1991.

FAHEY III, T. J.; SADATY, A. B. S.; JONES II, W. G.; BARBER, A.; SMOLLER, B.; SHIRES, T. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. **Journal of Surgical Research**, v. 50, n. 4, p. 308-313, 1991.

FALANGA, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **The Lancet**, Boston, v. 366, p. 1736-1743, 2005.

FERREIRA, A. M.; SOUZA, B. M. V.; RIGOTTI, M. A.; LOUREIRO, M. R. D. The use of fatty acids in wound care: na integrative review of the Brazilian literature. **Revista da Escola de Enfermagem USP**, v. 46, n. 3, p. 745-753, 2012.

FITZMAURICE, S. D.; SIVAMANI, R. K.; ISSEROFF, R. R. Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, p. 113-126, 2001.

FRANK, S.; HÜBNER, G.; BREIER, G.; LONGAKER, M. T.; GREENHALGH, D. G.; WERNER, S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 21, p. 12607-12613, 1995.

FREEDBERG, I. M.; TOMIC-CANIC, M.; KOMINE, M.; BLUMENBERG, M. Keratins and keratinocyte activation cycle. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 116, n. 5, p. 633-640, 2001.

FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; BAREZA, M. V.; CASTRO, H. F. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel: síntese enzimática de monolaurina por esterificação. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2277-2281, 2009.

FRESNO, C. M. J.; RAMIREZ, D. A.; SORIANO, J. M. M. Rheological characterization of hydroalcoholic gels -15% ethanol- of Carbopol Ultrez 10. **Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 437-441, 2001.

GABBIANI, G. The evolution of the myofibroblast concept: a key cell for wound healing and fibrotic diseases. **Giornale di Gerontologia**, v. 52, p. 280-282, 2004.

GALEANO, M.; DEODATO, B.; ALTAVILLA, D.; CUCINOTTA, D.; ARSIC, N.; MARINI, H.; TORRE, V.; GIACCA, M.; SQUADRITO, F. Adeno-associated viral vector-mediated human vascular endothelial growth factor gene transfer stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. **Diabetologia**, v. 46, p. 546-555, 2003.

GALLUCCI, R. M.; SLOAN, D. K.; HECK, J. M.; MURRAY, A. R.; O'DELL, S. J. Interleukin 6 indirectly induces keratinocyte migration. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 3, p. 764-772, 2004.

GHOSH, K.; REN, X. D.; SHU, X. Z.; PRESTWICH, G. D.; CLARK, R. A. F. Fibronectin functional domains coupled to hyaluronan stimulate adult human dermal fibroblast responses critical for wound healing. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 3, p. 601-613, 2006.

GIBAUD, S.; ATTIVI, D. Microemulsions for oral administration and their therapeutic applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 8, p. 937-951, 2012.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HAWKES, S. P.; LI, H.; TANIGUCHI, G. T. Zymography and reverse zymography for detecting MMPs and TIMPs. In: CLARK, I. M.; YOUNG, D. A.; ROWAN, A. D. **Matrix metalloproteinase protocols: methods in molecular biology**. 2nd ed. San Francisco (CA, EUA): Humana Press, 2010. v. 622, cap. 16, p. 257-269.

HEMMATI, A. A.; AGHEL, N.; RASHIDI, I.; GHOLAMPUR-AGHDAMI, A. Topical grape (*Vitis vinifera*) seed extract promotes repair of full thickness wound in rabbit. **International Wound Journal**, v. 8, n. 5, p. 514-520, 2011.

HENNESSEY, P. J.; FORD, E. G.; BLACK, C. T.; ANDRASSY, R. J. Wound collagenase activity correlates directly with collagen glycosylation in diabetic rats. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 25, n. 1, p. 75-78, 1990.

HOSMANI, A. H. Carbopol and its pharmaceutical significance: a review. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 5, p. 377-386, 2010.

HUPKENS, P.; BOXMA, H.; DOKTER, J. Tannic acid as a topical agent in burns: historical considerations and implications for new developments. **Burns**, v. 21, n. 1, p. 57-61, 1995.

JAGANJAC, M.; TIROSH, O.; COHEN, G.; SASSON, S.; ZARKOVIC, N. Reactive aldehydes – second messengers of free radicals in diabetes mellitus. **Free Radical Research**, 2013. In press.

JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. L.; RYCHLY, D. J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 4, p. 1-11, 2005.

JONES, V.; GREY, J.E.; HARDING, K. G. ABC of wound healing. **British Medical Journal**, v. 332, p.285-965, 2006.

KÄHÄRI, V. M.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in skin. **Experimental Dermatology**, v. 6, p. 199-213, 1997.

KAPOOR, M.; HOWARD, R.; HALL, I.; APPLETON, I. Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. **The American Journal of Pathology**, v. 165, n. 1, p. 299-307, 2004.

KATIIYAR, S. K. Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: Inhibition of oxidative stress and protection of immune system. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 1-11, 2008.

KAUR, M.; MANDAIR, R.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Grape seed extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma cells. **Nutrition and Cancer**, v. 60, p. 2- 11, 2008.

KAUR, M.; SINGH, R. P.; GU, M.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Grape seed extract inhibits *in vitro* and *in vivo* growth of human colorectal carcinoma cells. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 20, p. 6194-6202, 2006.

KHANAL, R.C.; HOWARD, L.R.; PRIOR R.L. Procyanidin Content of grape seed and pomace, and total anthocyanin content of grape pomace as affected by extrusion processing. **Journal of Food Science**, EUA, v. 74, n. 6, p. 174-182, 2009.

KHANNA, S.; VENOJARVI, M.; ROY, S.; SHARMA, N.; TRIKHA, P.; BAQCHI, D.; BAQCHI, M.; SEN, C. K. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 8, p. 1089-1096, 2002.

KIM, Y. J.; PARK, H. J.; YOON, S. H.; KIM, M. J.; LEEM, K. H.; CHUNG, J. H.; KIM, H. K. Anticancer effects of oligomeric proanthocyanidins on human colorectal cancer cell line, SNU- C4. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, n. 30, p. 4674-4678, 2005.

KOCHIKUZHIL, B. M.; DEVI, K.; FATTEPUR, S. R. Effect of saturated fatty acid-rich dietary vegetable oils on lipid profile, antioxidant enzymes and glucose tolerance in diabetic rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 3, p. 142-145, 2010.

KOGA, T.; MORO, K.; NAKAMORI, K.; YAMAKOSHI, J.; HOSOYAMA, H.; KATAOKA, S.; ARIGA, T. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1892-1897, 1999.

KOMESU, M. C.; TANGA, M. B.; BUTTROS, K. R.; NAKAO, C. Effects on acute diabetes on rat cutaneous wound healing. **Pathophysiology**, v. 11, p. 63-67, 2004.

LAMERS, M. L.; ALMEIDA, M. E. S.; VICENTE-MANZANARES, M.; HORWITZ, A. F.; SANTOS, M. F. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e22865, 2011.

LEE, A. Y.; CHUNG, S. S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 13, n. 1, p. 23-30, 1999.

LEE, S. J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K. G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LEE, Y. A.; KIM, Y. J.; CHO, E. J.; YOKOZAWA, T. Ameliorative effects of proanthocyanidin on oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9395-9400, 2007.

LERMAN, O. Z.; GALIANO, R. D.; AMOUR, M.; LEVINE, J. P.; GURTNER, G. C. Cellular dysfunction in the diabetic fibroblast. Impairment in migration, vascular endothelial growth factor production and response to hypoxia. **American Journal of Pathology**, v. 162, n. 1, p. 303-312, 2003.

LEUNG, D. W.; CACHIANES, G.; KUANG, W. J.; GOEDDEL, D. V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, v. 246, p. 1306-1309, 1989.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA, K. M.; SILVA, C. L.; JÚNIOR, J. M. R. Microesferas biodegradáveis. Uma nova alternativa para administração de vacinas de DNA. **Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento**, p. 10-13, 2000.

LIONELLI, G. T.; LAWRENCE, W. T. Wound dressings. **Surgical Clinics of North America**, v. 83, p. 617-638, 2003.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R. H.; MÄDER, K. Semisolid SLN dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, n. 2, p. 155-160, 2002.

LOBMANN, R.; AMBROSCH, A.; SCHULTZ, G.; WALDMANN, K.; SCHIWECK, S.; LEHNERT, H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. **Diabetologia**, v. 45, p. 1011-1016, 2002.

LU, Y., FOO, L. Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chemistry**, v. 75, n. 2, p. 197-202, 2001.

MACHADO, G. C.; CHAVES, J. B. P.; ANTONIASSI, R. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco babaçu. **Revista Ceres**, v. 53, n. 308, p. 463-470, 2006.

MACRI, L.; CLARK, R. A. F. Tissue engineering for cutaneous wounds: selecting the proper time and space for growth factors, cells and the extracellular matrix. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, p. 83-93, 2009.

MANHEZI, A. C.; BACHION, M. M.; PEREIRA, A. L. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 5, p. 620-629, 2008.

MARITIM, A.C., SANDERS, R. A.; WATKINS III, J. B. Diabetes, oxidative Stress, and antioxidants: A Review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, EUA, v. 17, n.1, p. 24-38, 2003.

MARTIN, A.; KOMADA, M. R.; SANE, D. C. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. **Medicinal Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 117-145, 2003.

MARTIN, A.; WARBRICK, J.; CAMMARATA, A. **Rheology in physical pharmacy**. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

MATOUGH, F. A.; BUDIN, S. B.; HAMID, Z. A.; ALWAHAIBI, N.; MOHAMED, J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. **Sultan Qaboos University Medical Sciences Journal**, v. 12, p. 5-18, 2012.

MCLENNAN, S. V.; BONNER, J.; MILNE, S.; LO, L.; CHARLTON, A.; KURUP, S.; JIA, J.; YUE, D. K.; TWIGG, S. M. The anti-inflammatory agent propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 8, p. 706-713, 2008.

MEERAN, S. M.; KATIYAR, S. K. Grape seed proanthocyanidins promote apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 through alterations in Cdk1-Cdk-cyclin cascade, and caspase-3 activation via loss of mitochondrial membrane potential. **Experimental Dermatology**, v. 16, p. 405-415, 2007.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 165-196, 2001.

MELO, E. A.; MANCINI-FILHO, J.; GUERRA, N. B.; MACIEL, G. R. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 195-199, 2003.

MILLER, N.; RICE-EVANS, C.; DAVIS, M.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

MONAGAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉZ, C.; BARTOLOMÉ, B.; LAUREANO, O.; SILVA, J. M. R. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6475-6481, 2003.

MOORE, K. W.; MALEFYT, R. W.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MUCHOW, M.; MAINCENT, P.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN[®], NLC[®], LDC[®]) for oral drug delivery. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 34, p. 1394-1405, 2008.

MÜHLEN, A. Z.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45, p. 149-155, 1998.

MÜLLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carries (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 522-530, 2007.

MUSALMAH, M.; NIZRANA, M. Y.; FAIRUZ, A. H.; NOORAINI, A. H.; AZIAN, A. L.; GAPOR, M. T.; WAN-NGAH, W. Z. Comparative effects of palm vitamin E and alpha-tocopherol on healing and wound tissue antioxidant enzyme levels in diabetic rats. **Lipids**, v. 40, n. 6, p. 575-580, 2005.

NATH, C.; GULATI, S. C. Role of cytokines in healing chronic skin wounds. **Acta Haematologica**, n. 99, p. 175-179, 1998.

NEELY, A. N.; CLENDENING, C. E.; GARDNER, J.; GREENHALGH, D. G. Gelatinase activities in wounds of healing-impaired mice versus wounds of non-healing-impaired mice. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, v. 21, n. 5, p. 395-402, 2000.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, p. 107-110, 2009.

NEVIN, K. G.; RAJAMOHAN, T. Effect of topical application of virgin coconut oil on skin components and antioxidant status during dermal wound healing in young rats. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 23, p. 290-297, 2009.

NEVIN, K. G.; RAJAMOHAN, T. Wet and dry extraction of coconut oil: impact on lipid metabolic and antioxidant status in cholesterol co-administered rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, p. 610-616, 2009.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 469–484, 2009.

O'GRADY, A.; DUNNE, C.; O'KELLY, P.; MURPHY, G. M.; LEADER, M.; KAY, E. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression. **Histopathology**, v. 51, p. 793-804, 2007.

OCHOA, O.; TORRES, F. M.; SHIREMAN, P. K. Chemokines and diabetic wound healing. **Vascular**, v. 15, n. 6, p. 350-355, 2007.

OKUMURA, M.; OKUDA, T.; NAKAMURA, T.; YAJIMA, M. Acceleration of wound healing in diabetic mice by basic fibroblast growth factor. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 4, p. 530-535, 1996.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciências e Tecnologia**, Minas Gerais, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

PAESE, K. **Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos**. 2008. 185 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.

PAGONA, G.; TAGMATARCHIS, N. Carbon nanotubes: materials for medicinal chemistry and biotechnological applications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1789-1798, 2006.

PANCHATCHARAM, M.; MIRIYALA, S.; GAYATHRI, V. S.; SUGUNA, L. Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 290, n. 1-2, p. 87-96, 2006.

PARK, Y. C.; RIMBACH, G.; SALIOU, C.; VALACCHI, G.; PACKER, L. Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF- α secretion, and NF- κ B-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 465, p. 93-97, 2000.

PIRILA, E.; KORPI, J. T.; KORKIAMÄKI, T.; JANKOLA, T.; GUTIERREZ-FERNANDEZ, A.; LOPEZ-OTIN, C.; SAARIALHO-KERE, U.; SALO, T.; SORSA, T. Collagenase-2 (MMP-8) and matrilysin-2 (MMP-26) expression in human wounds of different etiologies. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, p. 47-57, 2007.

PINENT, M.; BLAY, M.; BLADÉ, M. C.; SALVADÓ, M. J.; AROLA, L.; ARDÉVOL, A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4985-4990, 2004.

POLI, G.; SCHAUR, R. J. 4-hydroxynonenal in the pathomechanisms of oxidative stress. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 50, p. 315-321, 2000.

PREUSS, H. G.; ECHARD, B.; DADGAR, A.; TALPUR, N.; MANOHAR, V.; ENIG, M.; BAGCHI, D.; INGRAM, C. Effects of essential oils and monolaurin on *Staphylococcus aureus*: in vitro and in vivo studies. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 15, n. 4, 2005.

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.

PRIOR, R.L.; CAO, G. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 4, p. 950-956, 2000.

RADENAHMAD, N.; SALEH, F.; SAYOH, I.; SAWANGJAROEN, K.; SUBHADHIRASAKUL, P.; BOONYOUNG, P.; RUNDORN, W.; MITRANUN, W. Young coconut juice can accelerate the healing process of cutaneous wounds. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 252, p. 1-10, 2012.

RAMESH, K. V.; MAHINDRAKAR, M. B.; BHAT, E. P. A new role for vitamin D: cholecalciferol promotes dermal wound strength and re-epithelization. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 31, n. 9, p. 778-779, 1993.

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

REIBER, G. E.; VILEIKYTE, L.; BOYKO, E. J.; AGUILA, M. D.; SMITH, D. G.; LAVERY, L. A.; BOULTON, A. J. M. Causal pathways for incident lower-extremity ulcers in patients with diabetes from two settings. **Diabetes Care**, v. 22, n.1, p. 157-162, 1999.

RODRIGUEZ, H. G.; VINOLO, M. A.; MAGDALON, J.; VITZEL, K.; NACHBAR, R. T.; PESSOA, A. F. M.; DOS SANTOS, M. F.; HATANAKA, E.; CALDER, P. C.; CURI, R. Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 1, p. 208-215, 2012.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 24, p. 1112-1120, 2003.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological samples. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, 121-137, 2002.

SATO, Y.; OHSHIMA, T.; KONDO, T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265, p. 194-199, 1999.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 3, p. 501-505, 2003.

SCHÄFFER, M. R.; TANTRY, U.; EFRON, P. A.; AHRENDT, G. M.; THORNTON F. J.; BARBUL, A. Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis:

a possible pathophysiologic correlation. **Surgery**, v. 121, n. 5, p. 513-519, 1997.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H. G.; SCHURMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 364-371, 2004.

SCHEWE, T.; CHRISTIAN, S.; KLOTZ, L. O.; YOSHIMOTO, T.; KUHN, H.; SIES, H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. **Biological Chemistry**, v. 382, p. 1687-1696, 2001.

SCHEWE, T.; KÜHN, H.; SIES, H. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1825–1829, 2002.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 296-302, 2006.

SHI, J.; YU, S.; POHORLY, J. E.; KAKUDA, Y. Polyphenolics in grape seeds – Biochemistry and functionality. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n. 4, p. 291-299, 2003.

SHRILATHA, B.; MURALIDHARA. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat. **International Journal of Andrology**, v. 30, p. 508-518, 2007.

SHUKLA, A, RASI, A. M.; SHANKAR, R. Nitric oxide inhibits wound collagen synthesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 200, n. 1-2, p. 27-33, 1999.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

SINGH, S.; SINGH, R. P. *In Vitro* methods of assay of antioxidants: an overview. **Food Reviews International**, v. 24, p. 392–415, 2008.

SONNEMANN, K. J.; BEMENT, W. M. Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, p. 237-263, 2011.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S. C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1762-1769, 2011.

SOUTO, E. B.; WISSING, S. A.; BARBOSA, C. M.; MÜLLER, R. H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 83-90, 2004.

SPRAVCHIKOV, N.; SIZYAKOV, G.; GARTSBEIN, M.; ACCILI, D.; TENNENBAUM, T.; WERTHEIMER, E. Glucose effects on skin keratinocytes. **Diabetes**, v. 50, p. 1627-1635, 2001.

SUNDERKÖTTER, C.; STEINBRINK, K.; GOEBELER, M.; BHARDWAJ, R.; SORG, C. Macrophages and angiogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 55, p. 410-422, 1994.

SWAIN, T.; HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus Domestica* L. – The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Bognor Regis, v.10, p. 63-68, 1959.

TANG, A.; GILCHREST, B. A. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression in human skin fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v. 11, p. 41-50, 1996.

TAYLOR, T. V.; RIMMER, S.; DAY, B.; BUTCHER, J.; DYMOCK, I. W. Ascorbic acid supplementation in the treatment of pressure-sores. **Lancet**, v. 7, n. 2, p. 544-546, 1974.

TOMASEK, J. J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 349-363, 2002.

TRAVERSO, N.; MENINI, S.; COSSO, L.; ODETTI, P.; ALBANO, E.; PRONZATO, M. A.; MARINARI, U. M. Immunological evidence for increased oxidative stress in diabetic rats. **Diabetologia**, v. 41, p. 265-270, 1998.

TSILIBARY, E.C. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. **The Journal of Pathology**, Grécia, v. 200, p. 537–546, 2003.

TVRZICKA, E.; KREMMYDA, L. S.; STANKOVA, B.; ZAK, A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 155, n. 2, p. 117-130, 2011.

UCHIDA K, SZWEDA LI, CHAE, H. Z.; STADTMAN, E. R. Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 8742-8746, 1993.

UNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems. **Pharmazie**, v. 61, n. 5, p. 375-386, 2006.

VAALAMO, M.; MATILLA, L.; JOHANSSON, N.; KARINIEMI, A. L.; KARJALAINEN-LINDSBERG, M. L.; KÄHÄRI, V. M.; SAARIALHO-KERE, U. Distinct populations of stromal cells Express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 109, n. 1, p. 96-101, 1997.

VALACCHI, G.; ZANARDI, I.; STICOZZI, C.; BOCCI, V.; TRAVAGLI, V. Emerging topics in cutaneous wound repair. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1259, p. 136-144, 2012.

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

VORAUER-UHL, K.; FÜRNSCHLIEF, E.; WAGNER, A.; FERKO, B.; KATINGER, H. Reepithelization of experimental scalds effected by topically applied superoxide dismutase: controlled animal studies. **Wound Repair and Regeneration**, v. 10, n. 6, p. 366-371, 2002.

WALLACE, H. J.; STACEY, M. C. Levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and soluble TNF receptors in chronic venous leg ulcers- correlations to healing status. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 110, n. 3, p. 292-296, 1998.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 701-705, 1996.

WERNER, S.; BREEDEN, M.; HÜBNER, G.; GREENHALGH, D. G.; LONGAKER, M. T. Induction of keratinocyte growth factor expression is reduced and delayed during wound healing in the genetically diabetic mouse. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 103, n. 4, p. 469-473, 1994.

WETZLER, C.; KÄMPFER, H.; STALLMEYER, B.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 2, p. 245-253, 2000.

WILLIAMS, R. H. Textbook of endocrinology. 8th ed. **Fuel homeostasis**. New York: Saunders, 1992. Section 7.

WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **The FASEB Journal**, v. 5, p. 2145-2154, 1991.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Review in polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 423-447, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/>. Acesso em: 17 abr. 2013.

WYSOCKI, A. B.; GRINNELL, F. Fibronectin profiles in normal and chronic wound fluid. **Laboratory Investigation**, v. 63, p. 825-831, 1990.

WYSOCKI, A. B.; STAIANO-COICO, L.; GRINNELL, F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, p. 64-68, 1993.

XIE, X.; MCGREGOR, M.; DENDUKURI, N. The clinical effectiveness of negative pressure wound therapy: a systematic review. **Journal of Wound Care**, v. 19, p. 490-495, 2010.

YACH, D.; STUCKLER, D.; BROWNELL, K. D. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. **Nature Medicine**, v. 12, n. 1, p. 62-66, 2006.

YUEN, A.; LASCHINGER, C.; TALIOR, I.; LEE, W.; CHAN, M.; BIREK, J.; YOUNG, E. W. K.; SIVAGURUNATHAN, K.; WON, E.; SIMMONS, C. A.; MCCULLOCH, C. A. Methylglyoxal-modified collagen promotes myofibroblast differentiation. **Matrix Biology**, v. 29, n. 6, p. 537-548, 2010.

ZHOU, Z.; CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M.; GARLANDA, C.; DELISSER, H. M. Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. **Angiogenesis**, v. 3, n. 2, p. 181-188, 1999.

ZUNINO, S. J. Type 2 diabetes and glycemic response to grapes or grape products. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 1794S-1800S, 2009.