INSTITUTO DE PESQUISA ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Estudo pré clínico de cicatrização de feridas com curativos de
hidrogel com nanoprata em ratos**

KARINE KUMMER

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:

Prof Dr. Ademar Benévolo Lugão

Coorientador:

Prof. Dr. José Roberto Rogero

São Paulo

2019

INSTITUTO DE PESQUISA ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Estudo pré clínico de cicatrização de feridas com curativos de
hidrogel com nanoprata em ratos**

Versão Original

Versão Corrigida disponível no IPEN

KARINE KUMMER

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Materiais

Orientador:

Prof Dr. Ademar Benévolo Lugão

Coorientador:

Prof. Dr. José Roberto Rogero

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

KUMMER, K. **ESTUDO PRÉ CLÍNICO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS COM CURATIVOS DE HIDROGEL COM NANOPRATA EM RATOS**. 2019. 71 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Kummer, Karine

ESTUDO PRÉ CLÍNICO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS COM CURATIVOS DE HIDROGEL COM NANOPRATA EM RATOS / Karine Kummer; orientador Ademar Benévolo Lugão; co-orientador José Roberto Rogero. -- São Paulo, 2019.

71 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2019.

1. Cicatrização. 2. Hidrogel. 3. Prata. I. Lugão, Ademar Benévolo, orient. II. Rogero, José Roberto, co-orient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Karine Kummer

Título: Estudo pré clínico de cicatrização de feridas com curativos de hidrogel com nanoprata em ratos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia Nuclear – Aplicações Materiais

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À Deus que foi meu sustento e amparo em toda esta trajetória.

Às mulheres da minha vida, mãe e avó.

E aos meus filhos.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao orientador Dr Ademar Benévolo Lugão pela paciência, orientação e acompanhamento de todo o trabalho de dissertação e ao co-orientador Dr. José Roberto Rogero. Ao Dr Heitor Franco de Andrade Junior pelas grandiosas contribuições e apoio nos momentos em que o desconhecido limitava de continuar. À querida Maria José que esteve junto em todos os momentos desta pesquisa compartilhando as dificuldades, e sempre apoiando e sendo suporte para todas as necessidades. E à equipe do CQMA pelo apoio em todas as etapas da pesquisa.

Agradecimento ao Sr. Jonny Francisco Ros de Almeida da empresa KHEMIA (Equipamentos Tecnológica de Efluente Ltda) pelo fornecimento da nanoprata para a sínteses dos hidrogéis.

À Dr Veterinária Obede Rodrigues que auxiliou conduzindo a parte experimental, responsabilizando-se tecnicamente pelos animais além de dispor todo o seu conhecimento e habilidades para a execução do procedimento cirurgico. E ao Dr Veterinário Guilherme Burns que não mediu esforços para auxiliar no experimento responsabilizando-se pela bancada anestésica.

À minha colega e amiga Grazielly Mendes pelo suporte diário desde a ideia inicial desta dissertação até sua conclusão. Aos alunos de graduação que auxiliaram na parte experimental: Danilo Marinho, Kassandra Martins e Marco Antonio Lima Gomes. E todos os profissionais que contribuíram na execução das etapas deste mestrado.

Ao Tiago Farret e meus filhos Bernardo e Isadora pelo apoio, entendimento das ausências e incentivo em todas as etapas deste trabalho. Meu pai e meus irmãos e em especial minha irmã Pamela Kummer que foi suporte todas as vezes que estive em São Paulo. Às amigas Talita Rocha e Albeliggia Vicentine que sempre estimularam a realização deste trabalho, agradeço por estarem ao meu lado. E à amiga Bruna Caroline por sempre estar próxima.

Agradecimento especial ao Instituto Presidente Antônio Carlos Porto – ITPAC Porto Nacional, TO que cedeu espaço e toda a estrutura necessária para a realização da fase experimental do estudo, não medindo esforços para que este trabalho viesse a acontecer. E à USP pelo programa que possibilitou-me participar desta Pós Graduação residindo tão longe.

RESUMO

KUMMER, Karine. **Estudo pré clínico de cicatrização de feridas com curativos de hidrogel com nanoprata em ratos**. 2019. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

OBJETIVO: Comparar o processo de cicatrização de segunda intenção de feridas cutâneas em ratos Wistar considerando a eficácia de curativos de hidrogel com nanoprata. **METODOLOGIA:** Estudo experimental com 69 *ratos Wistar* machos, jovens com idade entre 90 e 120 dias. Os animais foram distribuídos em três grupos que receberam tratamento com curativo de hidrogel, e hidrogel com 22ppm e 44ppm de nanoprata, sendo o curativo trocado a cada 48 horas. Foi realizada a remoção de aproximadamente 2cm² de pele e tecido subcutâneo do dorso dos animais, que receberam os tratamentos sendo eutanasiados com 24 horas, 3 dias, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 30 dias. O projeto foi aprovado no CEUA FAPAC/ ITPAC PORTO sob número 006/2017. As peças de pele retiradas foram submetidas à procedimentos de rotina para blocagem e histotécnica. Os cortes histológicos foram analisados qualitativamente a fim de avaliar comparativamente a estrutura do tegumento epitelial e dérmico no grupo controle e experimental com o programa Past. Os resultados quantitativos utilizou-se como análise estatística ANOVA e Kruskal-Wallis com nível de significância de 95%. **RESULTADOS:** Com 24 horas de tratamento os indicadores de atividade inflamatória e área de colágeno foram significativamente maior no grupo controle bem como a neovascularização, quando comparado com os dois grupos de tratamento com a prata. Nos tempos de 3, 7 e 14 dias não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos utilizados. Com 21 dias todas as lesões já estavam cicatrizadas por completas com espessura da epiderme variando em torno de 100µm; e as amostras tratadas com 44ppm de prata expressaram média maior que os outros tratamentos de maneira estatisticamente significativa. Após 30 dias observou-se que os três grupos comportaram-se de maneira parecida (médias pouco discrepantes) nos três parâmetros analisados: formação de colágeno, espessura da epiderme e contagem do número de vasos. Entretanto, o teste ANOVA mostrou que o grupo controle apresentou maior espessura de epiderme que os

demais grupos, com um nível de significância ($p = 0,043$). E o tratamento com 44ppm de prata mostrou melhor resultado na formação de colágeno.

CONCLUSÕES: O curativo é transparente, mantém o meio úmido, não adere no leito da ferida e é de fácil remoção e acompanhamento. Houve controle inflamatório das lesões tratadas com curativos com nanop prata em 24 horas de uso. Em 21 e 30 dias o tratamento de hidrogel com 44ppm de nanop prata mostrou maior expressividade em colágeno e formação de novos vasos sanguíneos, mostrando melhor resultado tardio na cicatrização que os demais tratamentos. Todas as lesões cicatrizaram por completo, sem diferença de tempo, mostrando que os curativos com prata propiciaram o processo de cicatrização em segunda intenção de feridas não infectadas, em dorso de ratos.

Palavras-chave: Cicatrização. Hidrogel. Prata.

ABSTRACT

KUMMER, Karine. **Estudo pré clínico de cicatrização de feridas com curativos de hidrogel com nanoprata em ratos**. 2019. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IF CNEN/SP. São Paulo.

OBJECTIVE: To compare the secondary intention healing process of skin wounds in Wistar rats considering the effectiveness of hydrogel dressing with nanosilver. **METHODOLOGY:** Experimental study of 69 young male Wistar rats aged 90 to 120 days. The animals were divided into three groups that received treatment with hydrogel dressing, and hydrogel with 22ppm and 44ppm nanosilver, the dressing being changed every 48 hours. Approximately 2cm² of skin and subcutaneous tissue were removed from the back of the animals, which received the treatment being euthanized 24 hours, 3 days, 7 days, 14 days, 21 days and 30 days. The project was approved in CEUA FAPAC / ITPAC PORTO under number 006/2017. The removed skin pieces were submitted to routine blocking and histotechnical procedures. The histological sections were analyzed qualitatively in order to comparatively evaluate the structure of the epithelial and dermal integument in the control and experimental group with the Past program. Quantitative results were used as statistical analysis ANOVA and Kruskal-Wallis with a significance level of 95%. **RESULTS:** At 24 hours of treatment the indicators of inflammatory activity and collagen area were significantly higher in the control group as well as neovascularization when compared to the two silver treatment groups. At 3, 7 and 14 days there were no statistical differences between the treatments used. By 21 days all lesions were already healed by complete with epidermis thickness ranging around 100µm; and the samples treated with silver 44ppm expressed a statistically higher mean than the other treatments. After 30 days, it was observed that the three groups behaved similarly (slightly discrepant averages) in the three parameters analyzed: collagen formation, epidermis thickness and vessel number counting. However, the ANOVA test showed that the control group had greater epidermis thickness than the other groups, with a significance level ($p = 0.043$). And treatment with 44ppm silver showed better results in collagen formation. **CONCLUSIONS:** The dressing is transparent, keeps the environment moist, doesn't stick to the wound bed and

is easy to remove and follow up. There was inflammatory control of lesions treated with nanosilver dressings within 24 hours of use. At 21 and 30 days, the hydrogel treatment with 44ppm nanosilver showed higher collagen expressiveness and formation of new blood vessels, showing better late healing results than the other treatments. All lesions healed completely, without time difference, showing that the silver dressings provided the second intention healing process of uninfected wounds on the backs of rats.

Key words: Healing. Hydrogel. Silver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tecido Epitelial e a camada de queratina	20
Figura 2 - Camadas celulares da epiderme	21
Figura 3 - Camadas da derme.	22
Figura 4 - Tecido Conjuntivo Frouxo e Denso	23
Figura 5 - Cronologia das fases de regeneração por segunda intenção das feridas	24
Figura 6 - Formação do edema e migração celular na fase inflamatória.	25
Figura 7 - Ambientação.....	30
Figura 8 - Enriquecimento ambiental para os animais.....	30
Figura 9 - Delineamento do experimento	31
Figura 10 - Anestesia infiltrativa.	32
Figura 11 - Molde para padronização do tamanho da lesão.....	33
Figura 12 - Lesão cirúrgica	33
Figura 13 - Fixação do curativo com elástico.	34
Figura 14 - Mesa de padronização de medidas e acompanhamento de lesões. ..	35
Figura 15 - Retalhos de tecido retirado dos animais com 7 e 30 dias.	37
Figura 16 - Desidratação das peças em álcool para preparo de lâminas.	38
Figura 17 – Padronização da análise de infiltrado celular	39
Figura 18 – Padronização da análise de colágeno.....	40
Figura 19 – Gráfico comparativo da variação do peso entre os tratamentos e tempo de eutanásia dos animais.....	44
Figura 20 – Característica do curativo de hidrogel.	45
Figura 21 – Comparação de infiltrado celular no grupo com 24 horas de tratamento.....	48
Figura 22 – Comparação de fibras colágenas no grupo de 24 horas de tratamento.	48
Figura 23 - Comparação de infiltrado celular no grupo com 3 dias de tratamento.	50
Figura 24 - Comparação de fibras colágenas no grupo de 3 dias de tratamento..	51
Figura 25 – Formação vascular em animal com uso de curativos de 22ppm.	51
Figura 26 – Comparativo de cicatrização da região da borda e do centro da ferida – 7 dias de tratamento.	52

Figura 27 - Comparação de infiltrado celular no grupo com 7 dias de tratamento.	53
Figura 28 – Comparação de fibras colágenas no grupo de 7 dias de tratamento.	54
Figura 29 – Comparação de infiltrado celular e vasos sanguíneos no grupo de 14 dias de tratamento.	55
Figura 30 - Comparação de fibras colágenas no grupo de 14 dias de tratamento.	56
Figura 31 - Fotomicrografias de colágeno com luz polarizada nos cortes de 14 dias pós-cirúrgico.	57
Figura 32 - Fotomicrografias de colágeno com birrefringência da cor verde nos cortes de 14 dias pós-cirúrgico	57
Figura 33 - Comparação de epiderme, queratina, infiltrado celular e vasos sanguíneos no grupo de 21 dias de tratamento.	59
Figura 34 - Comparação de fibras colágenas no grupo de 21 dias de tratamento.	59
Figura 35 - Comparação de epiderme, queratina, infiltrado celular e vasos sanguíneos no grupo de 30 dias de tratamento.	61
Figura 36 - Comparação de fibras colágenas no grupo de 30 dias de tratamento.	61
Figura 37 - Fotomicrografias de colágeno com luz polarizada nos cortes de 30 dias pós-cirúrgico.	62
Figura 38 - Fotomicrografias de colágeno com birrefringência da cor verde nos cortes de 30 dias pós-cirúrgico	63
Figura 39 - Macroscopia das lesões do grupo experimental de controle – animal 57	65
Figura 40 - Macroscopia das lesões do grupo experimental de 22ppm – animal 58.	66
Figura 41 - Macroscopia das lesões do grupo experimental de 44 ppm – animal 59.	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Distribuição dos animais por grupo	43
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVO	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos.....	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1	A Pele	19
3.1.1	Tecido Epitelial	19
3.1.2	Tecido Conjuntivo	21
3.1.3	Matriz extracelular fibrilar	23
3.2	Cicatrização Tecidual	23
3.4	Feridas.....	26
3.5	Prata	27
3.6	Curativo de Hidrogel.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1	Tipo e Local de Estudo.....	29
4.2	Animais.....	29
4.2.1	Ambientação e controle animal.....	29
4.2.2	Seleção dos grupos e delineamento do experimento	31
4.2.3	Seguimento e Procedimento Cirúrgico	32
4.3.3	Acompanhamento clínico dos animais.....	34
4.4	Avaliação macroscópica de seguimento das lesões	35
4.5	Curativo de Hidrogel e Hidrogel com Nano Partículas de Prata	36
4.6	Eutanásia dos animais	37
4.7	Preparação das peças	38
4.8	Análise Histológica.....	38
4.8.1	Coloração Hematoxilina e Eosina.....	39
4.8.2	Colágeno com Picrosirius	39
4.8.3	Colágeno com Picrosirius em Luz Polarizada	40
4.9	Análise Estatística	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
5.1	Delineamento Pós Operatório.....	43

5.2 Acompanhamento Clínico.....	43
5.3 Avaliação histológica	47
5.3.1 Grupo de 24 horas de tratamento	47
5.3.2 Grupo de 3 dias de tratamento	50
5.3.3 Grupo de 7 dias de tratamento	52
5.3.4 Grupo de 14 dias de tratamento	55
5.3.5 Grupo de 21 dias de tratamento	58
5.3.6 Grupo de 30 dias de tratamento	60
5.4 Avaliação Macroscópica	64
6 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida populacional é uma realidade vivida mundialmente, especificamente nos países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil. Em contrapartida ao envelhecimento temos a incidência das doenças crônicas e degenerativas. E atrelado à este processo o aumento do número de lesões de pele, popularmente conhecidas como feridas.

Ferida é toda e qualquer lesão que cause descontinuidade no tecido epitelial, que acometem qualquer pessoa, em todas as idades, podendo apresentar diversas origens (IRION, 2012). Existem inúmeras formas de classificar uma ferida, mas quanto ao tempo de desenvolvimento são crônicas ou agudas, e o grande desafio para os profissionais da saúde é o tratamento ideal que estimule a cicatrização tecidual, seja da ferida aguda ou da crônica (MALAGUTTI, 2015).

Inúmeros fatores estão envolvidos no processo de cicatrização, e vão além dos fatores envolvidos e inerentes às fases de cicatrização, como formação de neovascularização, fibroblastos, colágeno e elastina. Neste contexto a escolha do curativo tem papel singular para o sucesso do tratamento. E a escolha do curativo ideal não é uma decisão fácil, considerando o vasto mercado de oferta de coberturas para feridas (IRION, 2012; KEIRSZENBAUM, TRES, 2012)

A resistência dos microrganismos patogênicos aos antibióticos é outro problema mundial. E neste sentido os produtos com prata, em suas diversas formulações e apresentações, são estudados e aprimorados devido ao efeito bactericida deste metal (KONOP, DAMPS, MISICKA, RUDNICKA, 2016). A Prata (Ag) é associada às coberturas de curativos para tratamento de feridas, buscando estimular o tecido cicatricial, diminuir o tempo da lesão e prevenir a infecção. E a nanotecnologia é um futuro promissor ao tratamento de feridas, pois a prata tem ação bactericida e bacteriostática aos microrganismos do leito da lesão, o que garante a segurança do nível de contaminação da ferida, prevenindo o desequilíbrio que propicia a infecção. Manter a ferida livre de infecção acelera e melhora o processo de cicatrização propiciando melhor qualidade na formação da cicatriz (GUNASEKARAN, NIGUSSE, DHANARAJU, 2012; KLIPPSTEIN et al, 2010; KORBKANDI, IRAVANI, 2012).

Diversos curativos com prata vêm sendo introduzidos no mercado e faz-se necessário avaliar o real efeito deste metal na cicatrização e ação anti-

inflamatória nas feridas. Também deve-se determinar a quantidade de prata necessária no curativo para propiciar a cicatrização tecidual mantendo a atividade celular sem toxicidade aos tecidos. O hidrogel com nanopartículas de prata fabricado no Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares é de baixo custo (acessível para qualquer usuário de serviço de saúde) e tem um processo de fabricação simples que parece ser uma alternativa ao tratamento das lesões agudas e crônicas. Logo, realizar estudos pré clínicos dos curativos de hidrogel com nanoprata são necessários para a padronização do curativo bem como seguimento aos testes clínicos em diversas condições nas quais o uso de prata possa ser indicado.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do curativo de hidrogel com nanopartículas de prata na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar.

2.2 Objetivos Específicos

Comparar os efeitos do curativo de hidrogel com 22ppm de nanop prata e 44ppm de nanop prata.

Avaliar macroscopicamente a cicatrização das feridas quanto à área, exsudato, característica das bordas, evolução do tecido de cicatrização e área perilesão.

Comparar por histotécnica a cicatrização nas fases inflamatória, proliferativa e de remodelação nos diferentes curativos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os tecidos do organismo são constituídos por células e matriz extracelular (MEC). O corpo humano é composto basicamente por quatro tipos de tecidos: epitelial, conjuntivo, muscular e nervoso. O tecido epitelial reveste todas as superfícies mas tem pouca matriz extracelular; o tecido conjuntivo tem muita matriz extracelular produzida por suas próprias células; o tecido muscular tem células alongadas com capacidade de contração; e o tecido nervoso tem células com prolongamentos capazes de gerar, transmitir e receber estímulos (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018).

3.1 A Pele

A pele recobre todo o corpo humano sendo formada por dois tecidos fortemente aderidos, o tecido epitelial denominado epiderme e o tecido conjuntivo denominado derme. Abaixo da derme está o tecido adiposo, também denominado hipoderme, caracterizado por tecido conjuntivo frouxo constituído de células adiposas (subcutâneo). A pele é o maior órgão do corpo humano, compondo aproximadamente 16% do peso corporal, apresentando diversas funções: estética, proteção (melanina e queratina), termorregulação e excreção de substâncias. Estima-se que a epiderme se renove a cada 15 a 30 dias e que sua espessura chegue até 1,5mm dependendo da localização (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018).

3.1.1 Tecido Epitelial

O tecido epitelial é formado por muitas células, que apresentam-se de várias formas. Estas células são bem próximas, o que lhes permite resistências e conseqüentemente pouca matriz extracelular. Revestem toda a superfície externa do corpo e as cavidades. Suas principais funções são revestimento e secreção (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018).

A camada basal deste tecido é composta das chamadas células-tronco da epiderme, com alta capacidade proliferativa e diferenciação celular. Com o tempo estas células perdem a capacidade proliferativa despreendendo-se desta camada. Então migram para a superfície, diferenciando-se nos chamados queratinócitos – células mais abundantes do tecido epitelial. A medida que as células são movimentadas para a superfície vão perdendo substratos e recebendo cada vez menos nutrição, até o momento que entram em apoptose (morte celular)

restando apenas a membrana celular com glicolípídios e o citoplasma com queratina, o que confere a função de proteção do corpo, evitando também a perda de água (GAMBA, PETRI, COSTA, 2016). A renovação das células deste tecido acontece por mitose das células da porção basal para a apical, substituindo as células velhas que desprendem-se da superfície, chamada camada de queratina (Figura 1) (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018).

Figura 1 – Tecido Epitelial e a camada de queratina

Fonte: JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018

Praticamente todos os tecidos epiteliais apoiam-se no tecido conjuntivo, sendo unidos pela chamada lâmina basal (mede de 20 a 100nm de espessura). Esta lâmina é delimitada pela porção basal das células epiteliais e pelo tecido conjuntivo. Une-se ao tecido conjuntivo pelo colágeno tipo VII. Dentre várias funções desta lâmina está a união dos tecidos epitelial e conjuntivo (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018). O contato entre o tecido epitelial (epiderme) e o tecido conjuntivo (derme) é irregular, sendo esta junção formada por cristas e sulcos que garantem maior resistência e adesão dos tecidos (GAMBA, PETRI, COSTA, 2016).

Da derme para a epiderme define-se 5 tipos de camadas celulares (Figura 2): camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018).

Figura 2 - Camadas celulares da epiderme

Fonte: JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018

3.1.2 Tecido Conjuntivo

O tecido conjuntivo é responsável pela forma do corpo, pois é o suporte para órgãos e tecidos do corpo, mas também tem papel importante na síntese de fatores de crescimento que controlam a proliferação e diferenciação celular. É formado principalmente por matriz extracelular (MEC) e tem função de rigidez, elasticidade e resistência à tensão. Dentre as células do tecido conjuntivo os fibroblastos são as mais comuns e sintetizam o colágeno e a elastina, além de outros elementos que fazem a composição da MEC. Estas quando estão na forma inativa chamam-se fibrócitos. As fibras deste tecido são formadas por proteínas, e são denominadas fibras colágenas, reticulares e elásticas e um dos principais locais onde encontra-se colágeno é na pele (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018).

A derme une o tecido subcutâneo (adiposo) à epiderme, apresentando espessuras variadas de até 3mm na planta dos pés. A derme faz a nutrição da epiderme, pois nesta não há vascularização. Define-se duas camadas na derme: papilar (superficial) e reticular (profunda) (Figura 3). A camada papilar é constituída de tecido conjuntivo frouxo sendo mais delgada, e com papilas que penetram a epiderme e a porção profunda da derme garantindo união das camadas. Os vasos sanguíneos desta camada superficial nutrem e oxigenam a epiderme, além de ser uma camada rica em células de defesa (macrófagos e leucócitos). A camada reticular, mais espessa, contém fibras elásticas que conferem elasticidade ao tecido

além de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, glândulas e folículo piloso; está relacionada à resistência do tecido e seu rompimento configura as conhecidas estrias (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018; GAMBA, PETRI, COSTA, 2016).

Figura 3 - Camadas da derme.

Fonte: JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018

O tecido conjuntivo propriamente dito do tipo frouxo é encontrado abaixo da epiderme, sendo composto por todas as estruturas do tecido conjuntivo, é bem flexível, vascularizado e resiste pouco às tensões. O tecido conjuntivo denso contém menos células e mais fibras colágenas, logo é mais resistente protegendo mais os tecidos. Este tecido pode ser modelado ou não modelado, o que depende da direção das fibras de colágeno, quanto mais unidas e no mesmo sentido estiverem as fibras colágenas, maior resistência haverá neste tecido. O tecido conjuntivo denso encontra-se na parte mais profunda da derme (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018). Na figura 4 observa-se o corte da pele de rato em fase de cicatrização com o tecido conjuntivo frouxo a inúmeras células fibroblastos e o tecido conjuntivo denso com predomínio de fibras colágenas (coradas em rosa).

Figura 4 - Tecido Conjuntivo Frouxo e Denso

Fonte: JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2018

3.2 Cicatrização Tecidual

A cicatrização de um tecido lesado é uma resposta natural do organismo, e ocorre através da interação de eventos de reconstituição, restauração e reconstituição da força de tensão do tecido lesado (SIMON, 2018). Ocorre através de processos biológicos contínuos e sobrepostos que podem dividir-se em regeneração celular, proliferação celular e produção de colágeno (GAMBA, PETRI, COSTA, 2016).

Toda lesão na pele desencadeia eventos cicatriciais e pode-se definir quatro fases que iniciam imediatamente da ocorrência da lesão: hemostasia, inflamação, granulação e epitelização (MEIKLE, 2016). A profundidade dessa lesão determina a sequência dos eventos, uma vez que as feridas podem ser superficial, parcial ou total. A cicatrização por segunda intenção é aquela que fecha por si só e ocorre em feridas com perda de tecido, bordas irregulares, necrose tecidual e ou contaminação microbiana. E cicatrização de feridas por segunda intenção também passa por todas as fases descritas (Figura 5) (IRION, 2012; MALAGUTTI, 2015).

Figura 5 - Cronologia das fases de regeneração por segunda intenção das feridas

Fonte: IRION, 2012

A fase de hemostasia inicia no momento da lesão tecidual, quando ocorre ruptura dos vasos sanguíneos. Ocorre rápida ativação da cascata de coagulação e agregação de plaquetas. Neste momento inicia o estímulo para migração de macrófagos e neutrófilos afim de iniciar a fase inflamatória (IRION, 2012). As plaquetas contém o fator derivado de plaquetas (PDFG) que estimulam diversos fatores de crescimento, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). É a partir da cascata de coagulação que os macrófagos e fibroblastos serão atraídos para ocorrer a fase de proliferação (IRION, 2012; MALAGUTTI, 2015).

A fase inflamatória inicia com a chegada dos neutrófilos, que são predominantes no infiltrado inflamatório. São os responsáveis pelo aumento da permeabilidade capilar para extravasamento de plasma e proteínas de modo que ocorre o edema associado à inflamação. Os mastócitos também tem papel importante na inflamação pois produzem histamina, heparina, fator de estímulo ao colágeno e citocina interleucina 4 (IL-4) para síntese de colágeno I e III. Os monócitos recrutados chegam ao tecido e se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos são responsáveis pela produção de citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina 1 (IL-1), fatores de crescimento e fatores angiogênicos, que por sua vez darão origem ao tecido de granulação (KIERSENBAUM, TRES, 2012; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013). A figura 6 ilustra o tempo da formação do edema e migração de neutrófilos e macrófagos para a lesão na fase inflamatória.

Figura 6 - Formação do edema e migração celular na fase inflamatória.

Fonte: KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013

A fase proliferativa, também chamada de granulação, inicia com a proliferação de fibroblastos da derme. Após 3 à 4 dias da lesão já inicia a contração da ferida, que ocorre por migração de células das bordas da lesão (GAMBA, PETRI, COSTA, 2016). Os macrófagos, da fase inflamatória, estimulam a formação de fibroblastos, tecido conjuntivo frouxo e angiogênese (KIERSZENBAUM, TRES, 2012; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013).

A transição da fase inflamatória para a fase proliferativa é dependente da fagocitose dos macrófagos bem como da liberação dos fatores de crescimento para a formação do tecido de granulação (IRION, 2012). E na fase proliferativa ocorre tanto a formação do tecido de granulação como a reepitelização com contração da ferida. A estimulação de fibroblastos por fatores de crescimento resultam na proliferação destas células, bem como da migração para a área de lesão com concomitante depósito de fibras de colágeno e contração da ferida (IRION, 2012). Os fibroblastos são os principais responsáveis pela formação do colágeno, que durante esta fase vai tornando o espaço da ferida mais denso para unir a derme à epiderme (GAMBA, PETRI, COSTA, 2016).

A angiogênese, também chamada de neovascularização, ocorre por migração dos angioblastos para as extremidades distais dos capilares existentes, estimulando a formação de novos capilares, além do envolvimento do VEGF. Com a formação de novos vasos sanguíneos e matriz o tecido de granulação deverá ser róseo-avermelhado brilhante (IRION, 2012).

A fase de remodelamento ou reepitelização inicia em torno de duas à três semanas do início da lesão e ocorre pela movimentação dos queratinócitos a partir das bordas livres da ferida a partir do fator de crescimento VEGF e de IL-1. As novas células aderem ao tecido de granulação avançando sobre o leito da ferida (IRION, 2012; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013). Esta fase reparativa pode durar até 6 meses, período caracterizado pela maturação das fibras colágenas, diminuição da vascularização da ferida e de densidade de células, logo a coloração do tecido é mais pálida. A pele cicatrizada ganha resistência e a cicatriz diminui a espessura e o tamanho até voltar ao aspecto anterior à lesão. Ao final do primeiro mês a lesão já está coberta por epitélio íntegro (GAMBA, PETRI, COSTA, 2016).

3.4 Feridas

Feridas é qualquer lesão na continuidade da pele e pode ser de etiologia aguda ou crônica com múltiplas causas: traumáticas, cirúrgicas, queimadura, acidentais, por doenças cutâneas, por pressão, entre outras (ROCHA, 2011; GEOVANINNI, 2014).

É escasso na maioria dos países dados epidemiológicos de prevalência de feridas. O Brasil tem taxas elevadas de prevalência de feridas crônicas, principalmente do tipo lesões por pressão, chegando a 23,52% (BEZERRA et al., 2015). Atinge a maioria de pessoas idosas, sem escolaridade e de baixa renda familiar (VIEIRA, ARAÚJO, 2018). Em Manaus estudo epidemiológico para feridas encontrou maior ocorrência em homens com média de idade de 60,4 anos com baixa escolaridade (GALVÃO, 2016).

A avaliação e acompanhamento clínico dos pacientes com feridas bem como das lesões é fundamental para o sucesso do tratamento. Na realização do curativo deve-se acompanhar a extensão da lesão (área de superfície, profundidade e presença de tuneis e descolamentos), a coloração do tecido cicatricial (granulação, fibrina, necrose), o tecido adjacente (coloração, hidratação e circulação), a secreção (quantidade e aspecto), o odor (intensidade e características), e a dor (tipo, intensidade, momento) (IRION, 2012; GEOVANINI, 2014).

Diversos curativos atualmente existem no mercado e escolher o tratamento ideal para uma ferida é dependente do tipo de lesão e das

características clínicas apresentadas no tecido, sendo que durante o tratamento de uma lesão dificilmente o mesmo curativo será mantido do início ao fim. A cobertura ideal deve oferecer mais proteção e menos risco para infecções e promover boa cicatrização em meio úmido. Também é desejável que o curativo seja fácil de ser aplicado e removido, tenha uma relação custo benefício satisfatória, apresente controle da dor e proporcione melhora da autoestima e autoimagem dos pacientes (GEOVANINI, 2014).

3.5 Prata

A prata é amplamente utilizada e a terapia de tratamento tem muitos benefícios. Apresenta efeito antibacteriano com redução de microrganismos bem como é um composto que apresenta menor resistência que outros tratamentos medicamentosos além de ser menos tóxica. A prata iônica pode promover alterações sistêmicas como a argiria e coloração azul acinzentada em uso prolongado, bem como pode apresentar toxicidade em fibroblastos e células epiteliais, prejudicando o processo de cicatrização (GUNASEKARAN et al., 2012).

Nanopartículas é um material com dimensões que variam de 0,1 a 100nm, apresentando propriedades ópticas, elétricas e biológicas que permitem seu uso em muitas aplicações. A nanoprata tem diversas aplicações biomédicas, devida a biocompatibilidade e propriedades antibacterianas, além de interagir com vírus e bactérias no sistema imunológico (KLIPPSTEIN et al., 2010). E vários métodos físicos, químicos, biológicos vem sendo utilizados para sintetizar e estabilizar as nanopartículas de forma que seja um produto livre de toxicidade, muitas vezes resultantes dos produtos utilizados durante o processo de fabricação (KORBKANDI, IRAVANI, 2012).

A nanoprata tem mostrado efeito anti-inflamatório pela proliferação e migração de queratinócitos. Também modula as citocinas melhorando os níveis de interleucina 10 (IL-10), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e interferon alfa (IFN- λ); diminui os níveis de fator de necrose tumoral (TNF), fator crescimento tumoral (TGF), e interleucina 6 (IL-6); e participa na diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Desta forma exerce função na contração da derme e reepitelização da epiderme proliferando células que resultarão na cicatrização da lesão (GUNASEKARAN et al., 2012).

Alguns estudos remetem toxicidade às nanopartículas de prata referindo danos cerebrais, danos às células do fígado e danos à pele causando a argirose (HUSSAIN et al., 2005; HUSSAIN et al., 2006). Também mostraram mudanças nas células como apoptose e necrose celular, além de redução na função mitocondrial alterando a viabilidade celular (MARGARET et al., 2006; PARK e BAE, 2010).

No entanto, para que a nanopartícula de prata seja usada em fins biomédicos, deve ter compatibilidade com as células e capacidades de restaurar a morfologia do tecido sem desencadear imunogenicidade (KLIPPSTEIN et al., 2010).

3.6 Curativo de Hidrogel

Curativos de hidrogel são transparentes e incolores, compostos por água e no mínimo carboximetilcelulose, podendo ser encontrados com outras associações. É usado como cobertura primária, em lesões com pouca exsudações ou secas. O mecanismo de ação é promover um meio úmido no leito da ferida capaz de auxiliar no desbridamento autolítico bem como estimular a cicatrização. Pode ser utilizado em feridas abertas com tecido desvitalizado, queimaduras de 2º e 3º graus, úlceras venosas e lesões por pressão. E dependendo da cobertura secundária utilizada e das características da lesão o curativo de hidrogel pode permanecer no leito da ferida por até 7 dias (SOUBHIA et al., 2016).

Curativos de hidrogel apresenta efeito na redução da dor e do desconforto pela sensação agradável que proporciona na medida que mantém o meio úmido favorecendo a cicatrização tecidual. Indicados para queimaduras (TAVARES, SILVA, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo e Local de Estudo

Trata-se de um estudo pré clínico experimental, exploratório, descritivo, quantitativo utilizando curativos de hidrogel, curativos de hidrogel com 22ppm e 44ppm de nanoprata no tratamento de feridas superficiais em *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar.

A parte experimental do estudo de aplicação do curativo e coleta dos materiais desenvolveu-se no Biotério da Faculdade Presidente Antônio Carlos (FAPAC) em Porto Nacional, Tocantins, enquanto a fase de processamento histopatológico desenvolveu-se no Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina e no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (USP).

4.2 Animais

Foram utilizados como modelos experimentais 85 *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, provenientes do Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), registrado e regulamentado. E utilizou-se animais machos, adultos jovens, com média de idade entre 90 e 120 dias.

4.2.1 Ambientação e controle animal

Ao chegarem no biotério da Faculdade Presidente Antônio Carlos Porto, no município de Porto Nacional, Estado do Tocantins, todos os animais foram pesados e acompanhados semanalmente quanto ao ganho de peso e recuperação do estresse do transporte aéreo. Ficaram em ambientação durante 30 (trinta) dias antes do início do experimento.

Durante o período de ambientação e durante o experimento os animais ficaram em condições de controle de luz (12 horas de ciclos intercalados de luz e escuridão), controle de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ventilação climatizada (20 trocas de ar/hora), controle de umidade (50-70%) e pressão ambiente. Os animais foram alocados individualmente nas gaiolas suspensas com fundo de acrílico e plástico (Figura 1), e cama de maravalha esteril (NIH, 2010), sendo esta de flocos obtidos da madeira *Pinus elliotti*, esterilizada previamente no biotério, e o produto atendia a Legislação MTC- CONCEA RN 33. Receberam água filtrada e alimento *ad libitum*

(NEVES, et al, 2013), sendo alimentados com ração para roedores especial para biotério da marca Nuvilab® (Figura 7).

Figura 7 - Ambientação

Fonte: Autor da Dissertação

Atendendo a legislação de enriquecimento ambiental, foi colocado nas gaiolas tiras de papel picados e tubos de papelão (Figura 8) para reproduzir ao máximo o ambiente natural, promovendo o bem estar do animal nas condições de toca, nidificação e escavação, auxiliar na auto regulação de temperatura e ser distrativo, contribuindo para a diminuição do estresse animal (NEVES, et al, 2013).

Figura 8 - Enriquecimento ambiental para os animais

Fonte: Autor da Dissertação

Seguiu-se as legislações e as orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal quanto aos cuidados com o uso de animais para fins de experimentação científica. O projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade Presidente Antônio Carlos - Itapac Porto sob número 006/2017, atendendo todos os aspectos das resoluções, diretrizes e normativas em vigor.

4.2.2 Seleção dos grupos e delineamento do experimento

Os animais foram divididos em três grupos, conforme o tratamento de curativo aplicado, sendo o grupo controle (utilizou curativo de hidrogel), grupo de tratamento 1 (utilizou curativo de hidrogel com 22ppm de nanoprata), e grupo de tratamento 2 (utilizou curativo de hidrogel com 44ppm de nanoprata).

O delineamento foi realizado a partir do ganho de peso dos animais durante a ambientação, sendo agrupados conforme média de peso e desvio padrão de forma aleatória. E cada animal recebeu identificação individual durante todo o período experimental.

Cada grupo de tratamento do experimento contou com 24 animais, totalizando 72 animais experimentados; haviam 12 animais extras para substituição. Em cada grupo de tratamento os animais foram subdivididos em grupos de 4 (quatro) animais, conforme o tempo de exposição do tratamento até a eutanásia (Figura 9).

Figura 9 - Delineamento do experimento

No trigésimo dia da ambientação iniciou a experimentação propriamente dita, não havendo perda de animais e/ou intercorrências no período de ambientação.

4.2.3 Seguimento e Procedimento Cirúrgico

No dia anterior ao procedimento cirúrgico para produção das lesões, os animais foram pesados para ajuste de doses das medicações. E no dia do experimento submetidos à jejum hídrico e alimentar, de uma e duas horas respectivamente. Os animais foram pré-medicados analgesicamente com Acepromazina na dose de 2,5mg/kg de peso vivo intra-peritoneal, e anestesiados com 1,5mg/kg de Xilazina 2% e 50mg/kg de Cetamina intra-peritoneal.

O campo operatório foi preparado empregando ampla tricotomia da região do dorso, anti-sepsia com clorexidine, anestesia local infiltrativa com aplicação de solução de lidocaína a 2% na área pré estabelecida como campo cirúrgico (Figura 10). Realizou-se na sequência a marcação da área cirúrgica e após a retirada de 20mm x 20mm de profundidade superficial da pele do dorso do animal, com retirada do tecido de pele até a fáscia muscular (Figuras 11 e 12). A área retirada foi mantida exposta ao curativo com cicatrização por segunda intenção (CARDOSO et al, 2013; GIRARD, 2005).

Figura 10 - Anestesia infiltrativa.

Fonte: Autor da Dissertação

Figura 11 - Molde para padronização do tamanho da lesão.

Fonte: Autor da Dissertação

Figura 12 - Lesão cirúrgica

Fonte: Autor da Dissertação

Cada ferida foi tratada imediatamente após o procedimento cirúrgico e a cada dois dias com limpeza em jato de solução fisiológica (NaCl 0,9%) e aplicação do curativo determinado umedecido em água destilada. Os curativos de hidrogel e hidrogel com prata foram cobertos com gazes e fixados no animal com auxílio de fita micropore (GIRARD, 2005). Para manter a fixação do micropore e a contenção do curativo no animal os pesquisadores utilizaram fixação com elástico de 4cm (Figura 13).

Figura 13 - Fixação do curativo com elástico.

Fonte: Autor da Dissertação.

Os animais foram observados após o procedimento cirúrgico por 2 (duas) horas a fim de serem acompanhados na recuperação e restabelecimento da rotina. Para controle da dor pós operatória foi administrado, em 41 animais, Dipirona 50mg intramuscular.

4.3.3 Acompanhamento clínico dos animais

Avaliar a dor e o estresse dos animais é importante não somente por terem sido submetidos à procedimento cirúrgico de pesquisa, mas também por estar sendo testado um produto de curativo que dentre as particularidades para a cicatrização promove meio úmido com diminuição da dor.

Os animais foram monitorados diariamente quanto ao sofrimento ou estresse através de:

- Aparência anormal: aparência de pelagem (erizada, emaranhada, opaca), postura anormal (arqueada), lacrimejamento, porfirina e falta do reflexo de piscar;
- Alteração comportamental: diminuição do consumo de água e alimento, perda de peso, desidratação e olhos fundos, aumento e diminuição dos movimentos;
- Proteção: rigidez muscular e/ou falta de tônus muscular, proteção da região lesada evitando que toque a caixa;
- Auto mutilação: mordedura de membros, lambedura e coceira;
- Vocalização: quando a área de algia é tocada ou sem manipulação;
- Mudança no comportamento da espécie: isolamento social, respiração acelerada, respiração abdominal, ranger de dentes, pupilas dilatadas,

espasmos e tremores, vermelhidão ou inchaço ao redor da ferida e aumento da salivação (NEVES et al., 2013; NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2010).

A avaliação do peso dos animais teve como objetivo verificar possíveis comprometimentos no desenvolvimento causados pela utilização do curativo. Também controlou-se o consumo alimentar dos animais através da pesagem em gramas da ração disponibilizada *ad libidum*.

Na identificação de dor os animais foram medicados com dipirona 50mg de Dipirona intramuscular.

4.4 Avaliação macroscópica de seguimento das lesões

A lesão dos animais foi avaliada em mesa apropriada para medições e curativo (Figura 14). O tamanho da extensão da lesão foi mensurado através do auxílio de paquímetro digital da marca Digimess e as lesões foram mensuradas na área de maior comprimento e largura. Todas as lesões foram fotografadas com câmera da marca Nikon modelo d3200 fixada em um tripé na distância padronizada de 15cm da lesão para manter a padronização dos registros fotográficos. As fotos foram realizadas com ausência de flash, em local iluminado e com o animal contido manualmente.

Figura 14 - Mesa de padronização de medidas e acompanhamento de lesões.

Na imagem “A” organização da mesa de curativo e avaliação das lesões; e na imagem “B” o trabalho de avaliação sendo executado.

Fonte: Autor da Dissertação.

A primeira avaliação aconteceu logo após o procedimento cirúrgico da lesão, fez-se a mensuração e a colocação do curativo apropriado conforme o

delineamento do tratamento experimental e na sequência do experimento a cada curativo realizado foram realizados registros fotográficos e descrição das características encontradas na lesão.

O grupo de 24 horas ficou sob tratamento durante 24 horas, sendo realizada nova análise da lesão no momento da eutanásia. O grupo de 3 dias também manteve o curativo inicial até o momento da eutanásia. Nos demais grupos (7, 14, 21 e 30 dias) os curativos foram trocados a cada 48 horas.

A avaliação macroscópica da ferida foi realizada através da observação do tecido de cicatrização durante a realização dos curativos nos diversos grupos seguindo os padrões pré-estabelecidos. Os tecidos foram classificados percentualmente em crosta, necrose, fibrina, granulação e epitelização.

A quantidade de exsudato do leito da ferida foi mensurado como escasso (sujidade apenas das primeira gaze colocada como curativo secundário), moderado (sujidade das três gazes colocadas como curativo secundário) ou intenso (sujidade de todas as gazes, cobertura de fixação e/ou necessidade de troca antes do período determinado de 2 dias). O exsudato também foi classificado quanto à sua característica serosa, sero-sanguinolenta, sanguinolento ou purulento.

Quanto às bordas da lesão foram avaliadas e classificadas como íntegras, edemaciadas, hiperemidas, maceradas, descamadas, ressecadas, queratose, ou calosidade. E a área adjacente à ferida foi acompanhada quanto ao edema e hiperemia.

4.5 Curativo de Hidrogel e Hidrogel com Nano Partículas de Prata

O hidrogel é um biomaterial, transparente, incolor, formado na maior composição por água. É uma cobertura não aderente ao leito da lesão e que proporciona meio úmido para que ocorra a cicatrização ao mesmo tempo que é capaz de absorver exsudato (GEOVANINI, 2014).

O hidrogel e o hidrogel com nanopartículas de prata produzido pelo IPEN são sintetizados a partir de radiação gama, sem uso de catalisadores ou outros reagentes. Consegue-se reticular e esterilizar com radiação gama Co^{60} ao mesmo tempo, garantindo-se um curativo mais puro e com ação antimicrobiana, pois o uso da radiação é eficaz para a síntese de nanopartículas (GIRARD, 2005).

O hidrogel é formado por uma blenda polimérica de 8% poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP), 1,5% polietilenoglicol (PEG), 1% ágar e 89,5% água de osmose reversa formando uma rede tridimensional composta de polímeros reticulados por irradiação ionizante (ALCANTARA, 2013; SUNARTI, 2015). Nos curativos compostos de prata é acrescido prata iônica (Ag^+) nas concentrações de 22ppm e 44ppm, sendo que após processamento transformam-se em nanoprata. Todos os curativos são esterilizados com 25kGy. É um curativo de baixo custo, estéril, com ação antimicrobiana de formulação simples comparado às formulações comerciais existentes no mercado.

No experimento foi utilizado três tratamentos comparativos com curativo de hidrogel. O grupo controle foi tratado com curativo simples de hidrogel, e os comparativos com hidrogel reticulados com 22ppm e 44ppm de nanoprata.

4.6 Eutanásia dos animais

Nos tempos determinados de avaliação dos grupos (24 horas, 3 dias, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 30 dias) (Figura 3), os animais foram eutanasiados por método químico com sobredose anestésica de 90mg/kg de Tiopental intra-peritoneal, utilizando previamente botão anestésico de lidocaína 2%. Na sequência os animais foram pesados, as lesões mensuradas e feito a remoção cirúrgica do tecido de cicatrização na profundidade muscular com bordas livres para estudo histológico (Figura 15).

Figura 15 - Retalhos de tecido retirado dos animais com 7 e 30 dias.

Fonte: Autor da Dissertação.

Após a eutanásia e retirada dos tecidos a carcaça dos animais foi descartada conforme plano de gerenciamento de resíduos da Instituição de Ensino Superior. E os retalhos de pele seguiram para o tratamento de histotécnica.

4.7 Preparação das peças

As peças anatômicas de tecido de cicatrização, após retirados cirurgicamente, foram imersas em Formol 10% para fixação seguidos de desidratação com álcool (Figura 16), diafanização com xilol e impregnação e blocagem com parafina.

Figura 16 - Desidratação das peças em álcool para preparo de lâminas.

Fonte: Autor da Dissertação.

Foi realizado microtomia e citoquímica dos tecidos com Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrosirius.

4.8 Análise Histológica

As lâminas foram digitalizadas pelo equipamento Pannoramica Scan 250 e em seguida foram obtidas imagens digitais dos campos histológicos em aumento de 20x, a partir do software CaseViewer 2.2 (3DHISTECH Ltda., Budapeste Hungria), sendo fotografados três campos por amostra em todas as análises.

Na análises das lâminas histológicas, em todos os grupos, realizou-se a verificação do tecido encontrado na região central da lâmina. A região central apresenta maior distância das bordas e maior distância para alcance vascular, sendo melhor indicada para análise do processo cicatricial.

4.8.1 Coloração Hematoxilina e Eosina

O processo de angiogênese foi analisado nas lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) através da contagem manual do número de vasos presentes nos campos histológicos fotografados, realizado em duplicidade.

Para analisar o processo inflamatório durante a cicatrização, determinou-se o percentual de área ocupado por células inflamatórias (principalmente neutrófilos e macrófagos, cujos núcleos basófilos coram-se fortemente com a Hematoxilina) utilizando-se a ferramenta “Threshold” do software ImageJ v1.50i (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA), (Figura 17). Estas análises foram realizadas nos animais sacrificados em 24 horas, 3, 7 e 14 dias. A ferramenta Threshold através da padronização da coloração desejada, soma os pixels da imagem, gerando as informações quantitativas de concentração de células na área selecionada da lâmina.

Nos animais que foram sacrificados após 21 e 30 dias da cirurgia, realizou-se a medida de comprimento da epiderme (em μm) através do uso da régua de medida do software ImageJ.

Figura 17 – Padronização da análise de infiltrado celular

Em A observa-se um campo histológico corado com HE – animal 02 sacrificado após 24 horas da cirurgia – e em B observa-se o mesmo campo histológico tratado pela ferramenta *Threshold* do programa ImageJ. Em vermelho destacam-se somente os núcleos das células inflamatórias.
Fonte: Autor da dissertação.

4.8.2 Colágeno com Picrosirius

Adicionalmente, todas as lâminas coradas com picrosirius foram avaliadas com relação ao grau de modelamento das fibras colágenas e também realizou-se uma

quantificação das mesmas com a ferramenta *color Threshold* do software ImageJ (Figura 18).

Figura 18 – Padronização da análise de colágeno

Em A observa-se um campo histológico corado com picrosirius, em que as fibras colágenas destacam-se pela cor vermelha – animal 04 sacrificado após 30 dias da cirurgia – e em B observa-se o mesmo campo histológico tratado pela ferramenta *Color Threshold* do programa ImageJ. Em vermelho destaca-se a área ocupada por fibras de colágeno que podem ser quantificadas.

Fonte: Autor da dissertação.

4.8.3 Colágeno com Picrosirius em Luz Polarizada

Foram analisadas lâminas coradas com *Picrosirius* referente aos animais sacrificados 14 e 30 dias após a cirurgia, a fim de estudar o colágeno dérmico na fase de proliferação e de remodelamento respectivamente. Observou-se as lâminas sob luz polarizada em microscópio óptico Nikon Eclipse E600 e em seguida foram obtidas imagens digitais dos campos histológicos em aumento de 20x, utilizando a câmera digital Olympus DP72, sendo fotografados três campos por amostra. As imagens digitalizadas com a lente polarizadora foram submetidas à avaliação pelo programa ImageJ 1.50i, o qual quantificou a densidade do colágeno com a ferramenta *Threshold* (ajustado em 42 mínimo – 255 máximo). As imagens também foram analisadas visualmente para observar a variação de fibras colágenas de acordo com a birrefringência apresentada.

4.9 Análise Estatística

A estatística foi realizada para as lâminas histológicas, cicatrização macroscópica, variação do ganho de peso e tempo de retirada do curativo. Em todos

os ensaios considerou-se significância de $p < 0,05$ e utilizou-se o programa Past v 3.22 (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo) para fazer as análises.

Para as lâminas histológicas foram realizadas análises estatísticas para quatro parâmetros: percentual de área ocupado por células inflamatórias/basófilas, contagem do número de vasos sanguíneos, comprimento da camada de epiderme e área de estruturas coradas pelo picosírius/colágeno com e sem luz polarizada. Uma tabela contendo todas as informações numéricas foi montada para o programa estatístico. Inicialmente realizou-se o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Para dados não paramétricos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (combinação pareada) e as comparações múltiplas entre os grupos foram feitas pelo pós teste de Dunn. Para dados de distribuição normal foi feita análise de variância (ANOVA) e os testes de comparação de medias por meio do teste de Tukey.

O modelo de gráfico e de manipulação dos dados para análise de cicatrização das feridas nos animais com diferentes tratamentos foi feita segundo FIORAVANTE GA, 2012. A taxa de cicatrização da ferida foi obtida seguindo a fórmula matemática:

$$WCR = \left[\frac{(Ai - Af)}{Ai} \right] \times 100\%.$$

Onde:

Ai = área da ferida inicial mm^2

Af = área da ferida final mm^2

As análises estatísticas foram feitas a partir dos valores de WCR. Todos os valores obtidos comportaram-se como dados paramétricos (segundo teste Shapiro-Wilk) e, portanto, foram realizadas análises de variância entre os grupos (ANOVA).

Para avaliar a variação de peso (ganho ou perda) dos animais no momento em que foi feita a lesão (Pi) e depois quando os mesmos foram sacrificados (Pf), foi feito um cálculo de proporcionalidade da variação de peso com relação ao peso inicial: valores positivos indicam ganho de peso após a lesão e valores negativos indicam perda de peso. Todos os valores obtidos comportaram-se como dados paramétricos (segundo teste Shapiro-Wilk) e, portanto, foram realizadas análises de variância entre os grupos (ANOVA).

A fórmula matemática utilizada para definir os valores: $\left[\frac{(Pf - Pi) \times 100}{Pi} \right]$

Para a análise dos dias de uso do tratamento de curativo até sua retirada foram excluídos os grupos de 21 e 30 dias devido as lesões já estarem cicatrizadas. E foram realizadas análises de variância entre os grupos (ANOVA) porque todos os valores obtidos comportaram-se como dados paramétricos (segundo teste Shapiro-Wilk).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As possíveis alterações provocadas aos ratos machos tratados durante o período experimental com os curativos de hidrogel com nanopartículas de prata foram determinadas através do acompanhamento clínico, avaliação macroscópica e microscópica da lesão.

5.1 Delineamento Pós Operatório

Durante o acompanhamento clínico dos animais não houve óbitos no período de adaptação, no entanto após o procedimento cirúrgico 14 animais evoluíram à óbito, sendo necessário remanejar os animais extras para preenchimento dos grupos de tratamento. O quadro representa a distribuição final dos grupos e quantitativo de animais, totalizando no experimento 69 animais (Quadro 1).

Quadro 1: Distribuição dos animais por grupo

Grupo Controle		Grupo tratamento 22 ppm		Grupo tratamento 44ppm	
Tempo de Exposição	Nº de Animais	Tempo de Exposição	Nº de Animais	Tempo de Exposição	Nº de Animais
24 horas	4	24 horas	4	24 horas	4
3 dias	4	3 dias	4	3 dias	3
7 dias	4	7 dias	3	7 dias	3
14 dias	4	14 dias	4	14 dias	4
21 dias	4	21 dias	4	21 dias	4
30 dias	4	30 dias	4	30 dias	4
Total do Grupo	24	Total do Grupo	23	Total do Grupo	22

Fonte: Autor da Dissertação.

5.2 Acompanhamento Clínico

Durante o experimento 41 (34,4%) dos animais foram medicados no pós operatório para dor com 50mg de dipirona intramuscular.

No seguimento dos 30 dias de experimento todos os animal apresentaram aparência normal, ausentes de auto mutilação e/ou vocalização. As análises estatísticas indicaram que não houve diferença significativa de variação de peso entre os animais dos diferentes tratamentos (controle, 22 ppm, 44 ppm) em todos os períodos observados (Figura 19). No entanto, a exceção ocorreu nos animais sacrificados aos 21 dias ($p=0,01157$), em que o valor mostrou diferença significativa

entre o grupo tratado com 22 ppm e o de 44 ppm, sendo esse último maior que o primeiro ($p=0,009166$). Considerando que esse foi o único acontecimento entre os demais e que o desvio padrão em todas as análises ocorreu de maneira significativamente alta, considera-se casualidade do grupo, não corroborando com a ideia de que os tratamentos influenciaram na variação de peso dos animais.

Figura 19 – Gráfico comparativo da variação do peso entre os tratamentos e tempo de eutanásia dos animais.

Fonte: Autor da Dissertação.

De maneira geral a maioria dos animais perdeu peso após o procedimento cirúrgico, provavelmente pelo fato da situação de estresse cirúrgico ao qual o animal foi submetido, mesmo não tendo sido observado comportamentos estereotipados para estresse. E também ressalta-se que o grupo dos animais sacrificados após 30 dias de tratamento foram os que apresentaram menores médias de perda de peso, provavelmente porque tiveram tempo hábil em vida para superar, recuperar e se acostumar com as situações estressantes, além de restabelecerem a restauração tecidual.

A recuperação do peso corporal é um excelente indicador da recuperação pós procedimento cirúrgico, bem como o consumo de água e alimento (ANDRADE, PINTO, OLIVEIRA, 2002).

Avaliar a dor e o estresse dos animais é importante não somente por terem sido submetidos ao procedimento cirúrgico de pesquisa, mas também por estar sendo testado um produto de curativo que dentre as particularidades propostas para a cicatrização promove meio úmido com diminuição da dor. Os animais não apresentaram diminuição da ingesta alimentar durante o experimento, pois realizou-se acompanhamento do consumo alimentar, não sendo observado alteração na ingestão de gramas alimentares entre os grupos. Ressalta-se que a troca do curativo foi realizada no animal sem sedação, somente com contenção manual do mesmo. Isso nos permite inferir que o curativo contribui diminuindo a sensação dolorosa, foi fácil realizar a troca dos curativos nos animais, pois mostraram-se colaborativos durante o processo.

Neste estudo a troca dos curativos ocorreu a cada 48 horas, principalmente no período inflamatório, onde ocorre maior vasodilatação e edema do tecido, período que exige maior umidade à lesão, mas pode ser mantido por mais tempo nas fases de granulação e epitelização. Os curativos de hidrogel utilizados são transparentes e permitem a visualização exata do centro da lesão, garantindo que fique bem distribuído com bordas livres. Observou-se que a parte do curativo que estava em contato com a ferida manteve o meio úmido, promovendo interação com o fluido da lesão, e sendo de fácil remoção. Em todas as etapas da reparação tecidual o curativo permitiu a remoção sem prejuízo ao tecido de cicatrização. A margem livre do curativo, que ficou em contato com a pele íntegra do animal, ressecou consideravelmente perdendo água para o meio externo, o que reforça a ação deste curativo em meio úmido. Nas trocas de curativo quando a cobertura havia deslocado do centro da lesão a cobertura de gaze aderiu na ferida provocando sangramento do tecido ao ser removida, mesmo com intensa hidratação da área aderida (Figura 20).

Figura 20 – Característica do curativo de hidrogel.

Curativo aplicado sobre a ferida com margem livre (A); Curativo deslocado da área central da lesão manteve parte da ferida em contato com a gaze e parte em contato com o hidrogel (B); e margens do curativo em contato com a pele íntegra ressecada (C).

Fonte: Autor da dissertação.

Curativos com prata são cada vez mais estudados e utilizados no tratamento de feridas, principalmente feridas provocadas por queimadura, onde tratamentos convencionais utilizam curativos até duas vezes ao dia. Quanto mais tempo for possível manter o curativo em uma ferida sem necessidade de troca, maior é o conforto para o paciente e menor é o estresse da equipe de saúde envolvida no tratamento (FARINA Jr, et al, 2017). Estudo clínico que utilizou membranas de hidrogel com nanopartículas de prata observou eficiência da cobertura visto que não aderiu na ferida, promoveu o meio úmido para que as enzimas corporais executassem a ação de degradação celular, além de diminuir o odor da feridas bem como o tamanho e a quantidade de exsudato (CARDOSO, 2017). O curativo de hidrogel deste estudo mostrou-se adequado à cicatrização pois não adere no leito da ferida, permitindo a troca ausente de novos traumas no tecido, pois livre de aderência no leito da ferida a remoção é realizada facilmente diminuindo e/ou ausentando estímulos dolorosos, fato comprovado pela troca do curativo somente com contenção manual dos animais. Curativos de fácil manipulação, que estimulem o tecido de cicatrização permitindo a troca ausente de dor e sem aderência no leito das feridas são desejados pelos pacientes e pela equipe de saúde, principalmente a equipe de enfermagem. Enfermeiros são responsáveis pelo tratamento de feridas e lesões de pele e tais características apresentadas nos permite concluir que o curativo pode reduzir o custo do tratamento em termos de tempo de serviço de enfermagem e gastos com medicamentos anestésicos e anti-inflamatórios além de contribuir na redução do tempo de internação hospitalar.

No acompanhamento das feridas ao longo dos trinta dias de experimento, as lesões mantiveram-se livres da formação de fibrina e necrose. Quando da ocorrência de deslocamento do curativo do centro da lesão havia aderência da gaze ao leito da ferida, traumatizando o tecido no momento da remoção. O exsudato das lesões foram sempre escassos não ultrapassando a área da cobertura. O curativo mostrou-se capaz de adsorver a umidade produzida, e o exsudato apresentou-se sempre de característica serosa, não havendo piora clínica da lesão com o uso da cobertura de hidrogel.

As trocas do curativo foram realizadas a cada 48 horas, no entanto observou-se que na fase de proliferação e remodelamento a cobertura poderia ser mantida por um tempo maior. Optou-se por manter a padronização do tempo de troca devido a movimentação dos animais que algumas vezes acabavam por deslocar a cobertura do centro da lesão. Não foi possível aumentar a área perilesão de margem da cobertura visto que a mesma acabava secando e aderindo na pelagem do animal, provocando desconforto no momento da retirada. As bordas das feridas mantiveram-se íntegras, ausentes de ressecamento, queratose, descolamento ou qualquer outra complicação, bem como a área adjacente não evoluiu com edema e/ou hiperemia que pudesse indicar reação à cobertura ou processo infeccioso em evolução.

Existe um vasto mercado de ofertas de curativos para o tratamento de feridas, mas para escolher o curativo ideal é necessário avaliar a causa da ferida, o local e tamanho da lesão, a quantidade de exsudato, o leito da ferida e o potencial de contaminação; além de considerar os fatores intrínsecos ao ser humano, como idade e comorbidades associadas (MALAGUTTI, 2015; KIERSZENBAUM, TRES, 2012; KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013). E associa-se à estas questões os requisitos para um curativo ideal: não aderência ao leito da ferida, diminuído número de trocas, absorção de exsudato, proteção da lesão, influencia na ausência ou diminuição da dor, estímulo do tecido de cicatrização e principalmente baixo custo e acessível à toda a população (KIERSZENBAUM, TRES, 2012; ROCHA, 2011; GEOVANINI, 2014).

5.3 Avaliação histológica

A avaliação histológica da cicatrização da lesão ocorreu com duas colorações: hematoxilina e eosina foi utilizada para avaliação infiltrados celulares e quantitativo do colágeno, e picrosirius para análise qualitativa do colágeno.

5.3.1 Grupo de 24 horas de tratamento

Nas primeiras 24hs de tratamento constatou-se a formação de crosta fibrino-leucocitária, ausência de epitélio e moderada infiltração de células inflamatórias (principalmente neutrófilos) em todos os grupos. Nesta fase também é possível observar alguns vasos sanguíneos já formados (relativamente grandes), oriundos de tecidos que não foram removidos cirurgicamente (Figura 21).

Figura 21 – Comparação de infiltrado celular no grupo com 24 horas de tratamento.

Pós-operatório de 24 horas nos grupos controle (i), 22 ppm de prata (ii) e 44 ppm de prata (iii). Observa-se a presença da crosta fibrino-leucocitária (C), muitas células inflamatórias (I) e raros vasos sanguíneos neoformados/pequenos (V) nos três grupos (coloração HE em aumento de 20x).

Fonte: Autor da dissertação.

Neste tempo de tratamento as feridas apresentaram pequena quantidade de fibras colágenas coradas pelo picrosirius, sendo que as mesmas encontravam-se espalhadas de maneira desordenada por entre células inflamatórias na região que corresponderia a derme (Figura 22).

Figura 22 – Comparação de fibras colágenas no grupo de 24 horas de tratamento.

Grupo controle (A) com maior área exposta de colágeno, grupo de tratamento com 22ppm (B) e grupo de tratamento com 44ppm (C) (coloração Picrosirius – hematoxilina em aumento de 20x – campo claro).

Fonte: Autor da dissertação.

A porcentagem de área correspondente às células basófilas (indicadores de atividade inflamatória) foi significativamente maior no grupo controle, quando comparado com os dois grupos de tratamento com a prata ($p=0,0001594$). O mesmo foi observado com relação à área corada com o corante picrosirius, em que o grupo controle teve maior área de colágeno exposta quando comparada com o grupo de 22 ppm ($p= 0,000159$) e grupo de 44pm ($p= 0,001743$). Com relação à

neovascularização, notou-se que o grupo controle é o de maior quantidade de vasos, diferindo-se estatisticamente do grupo de 44ppm ($p= 0,006122$).

Analisando os gráficos de barras dos 3 parâmetros (inflamação, neovascularização e formação de colágeno), o grupo controle sempre apresenta a maior média dos valores, seguido do grupo de 22ppm e depois do grupo de 44ppm (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Comparação de médias de inflamação, neovascularização e formação de colágeno no grupo de exposição de 24 horas¹.

Fonte: Autor da dissertação.

Estudo de cicatrização de ferida em ratos também mostrou maior manifestação de processo inflamatório no grupo controle que utilizou tratamento convencional com água destilada, quando comparado à curativo com prata iônica e nanocristalina (PRESTES, et al, 2012). A nanop prata tem mostrado efeito anti-inflamatório através da proliferação e migração de queratinócitos. Também modula as citocinas melhorando os níveis de interleucina 10 (IL-10), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e interferon alfa (IFN- λ); e diminui os níveis de fator de necrose tumoral (TNF), fator crescimento tumoral (TGF), e interleucina 6 (IL-6). E participa na diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Desta forma exerce função na contração da derme e reepitelização da epiderme proliferando células que resultarão na cicatrização da lesão (GUNASEKARAN, NIGUSSE, DHANARAJU, 2012). No entanto, para que a nanopartícula de prata seja usada em fins biomédicos,

deve ter compatibilidade com as células e capacidades de restaurar a morfologia do tecido sem desencadear imunogenicidade (KLIPPSTEIN, et al, 2010). O uso de prata e nanopartículas de prata em coberturas de curativo produz controle bacteriano otimizando a cicatrização do tecido, visto que qualquer reação inflamatória exacerbada como também contaminação do meio atuam como barreira física para o desenvolvimento adequado do processo de reparação tecidual (LEAL et al, 2017).

Este estudo mostrou controle inflamatório dos hidrogéis com nanopartículas de prata comparados com o grupo controle. E esta ação é benéfica principalmente em feridas contaminadas ou com alta carga de microrganismos antes do desencadeamento da infecção propriamente dita.

5.3.2 Grupo de 3 dias de tratamento

Aos três dias de pós-operatório os achados histológicos foram semelhantes nos três grupos: presença de crosta fibrino-leucocitária, ausência de epitélio, presença de alguns poucos vasos sanguíneos e intensa presença de células inflamatórias, cujos núcleos são fortemente corados com a hematoxilina (Figura 23).

Figura 23 - Comparação de infiltrado celular no grupo com 3 dias de tratamento.

Pós-operatório de 3 dias nos grupos controle (i), 22 ppm de prata (ii) e 44 ppm de prata (iii). Observa-se a presença da crosta fibrino-leucocitária (C), grande quantidade de células inflamatórias (I) e poucos vasos sanguíneos neoformados/pequenos (V) nos três grupos (coloração HE em aumento de 20x).

Fonte: Autor da dissertação.

Na análise do colágeno para o grupo de tratamento de 3 dias apresentaram pequena quantidade de fibras coradas pelo picrosirius, sendo que as mesmas encontravam-se espalhadas de maneira desordenada por entre células inflamatórias na região que corresponderia a derme (Figura 24), muito semelhante ao que foi encontrado no grupo de 24 horas, no entanto neste grupo não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Figura 24 - Comparação de fibras colágenas no grupo de 3 dias de tratamento.

Grupo controle (A), grupo de tratamento com 22ppm (B) e grupo de tratamento com 44ppm (C) (coloração Picrosirius – hematoxilina em aumento de 20x – campo claro).

Fonte: Autor da dissertação.

Na avaliação macroscópica dos tecidos com 3 dias de tratamento era possível observar a rede vascular formada sobre a fáscia muscular (Figura 25).

Figura 25 – Formação vascular em animal com uso de curativos de 22ppm.

A imagem “A” mostra a lesão inicial do animal com a rede vascular menos desenvolvida e a imagem “B” apresenta a rede vascular sobre o tecido muscular com bordas reparadas ausentes de crostas e maior desenvolvimento da rede vascular.

Fonte: Autor da Dissertação

Analisando os gráficos de barras dos 3 parâmetros (inflamação, neovascularização e formação de colágeno), todos os parâmetros avaliados indicaram que não houve diferença significativa entre os grupos, assim sendo, o tratamento com a prata em suas diferentes concentrações modificou as variáveis estudadas da mesma forma que o grupo controle (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Comparação de médias de inflamação, neovascularização e formação de colágeno no grupo de exposição de 3 dias.

Fonte: Autor da dissertação.

5.3.3 Grupo de 7 dias de tratamento

Com sete dias de pós-operatório já é possível observar nos três grupos o processo de reepitelização nas regiões próximas à pele íntegra (Figura 26), sendo que nas regiões mais distais a epiderme ainda não é visualizada.

Figura 26 – Comparativo de cicatrização da região da borda e do centro da ferida – 7 dias de tratamento.

Tempo de tratamento de 7 dias Campo histológico mostrando a divisa entre a pele íntegra (A) e a pele em estágio de cicatrização (B). Na pele íntegra observa-se a presença de glândulas sebáceas e folículos pilosos na região da derme. A pele em processo de cicatrização ainda apresenta quadro inflamatório intenso porém já expressa epiderme recém-formada (E) (coloração HE em aumento de 10x).

Fonte: Autor da dissertação.

Também nesse período já é possível observar a presença de diversos fibroblastos por entre as células inflamatórias que ainda persistem em quantidade moderada. Observa-se também a presença da crosta e de vasos sanguíneos em todas as lâminas, independentemente do tipo de curativo/tratamento utilizado (Figura 27).

Figura 27 - Comparação de infiltrado celular no grupo com 7 dias de tratamento.

Tempo de tratamento 7 dias nos grupos controle (i), 22 ppm de prata (ii) e 44 ppm de prata (iii). Observa-se a presença da crosta fibrino-leucocitária (C), grande quantidade de células inflamatórias (I), alguns fibroblastos (F) e vasos sanguíneos (V) nos três grupos (coloração HE em aumento de 20x).

Fonte: Autor da dissertação.

Dos parâmetros analisados, somente houve diferença estatística significativa na análise de células basófilas, em que o grupo controle foi o de maior média ($p=0,00621$), seguido pelo grupo de 44 ppm ($p=0,02964$) e de 22 ppm ($p=0,00368$). O grupo de 44ppm também apresentou maior expressão celular e significância quando comparado com o grupo de 22ppm ($p=0,002502$) (Gráfico 3). Nos outros parâmetros, o grupo controle sobressaiu sobre os demais, com maiores médias para neovascularização ($p=0,18$) e colágeno ($p=0,07988$), porém sem diferença estatística. Importante destacar que a análise dos animais sacrificados após 7 dias foi prejudicada em função da morte de um animal do grupo de 22ppm e um animal do grupo de 44ppm, sendo feita análise com três animais por tratamento. Nesse caso, os dados também foram analisados pelo teste de Kuskal-Wallis (indicado para dados não normais e com pouca amostragem) e coincidiram com os mesmos resultados do ANOVA.

Gráfico 3 - Comparação de médias de inflamação, neovascularização e formação de colágeno no grupo de exposição de 7 dias.

Fonte: Autor da dissertação.

Na análise de tratamento de 7 dias dos tecidos corados com picosírius observa-se um aumento na produção de fibras colágenas, as quais se apresentam em quantidade discreta. Nesse estágio, as fibras estão permeando as células inflamatórias e não demonstram nenhum nível de organização (Figura 28).

Figura 28 – Comparação de fibras colágenas no grupo de 7 dias de tratamento.

Grupo controle (A), grupo de tratamento com 22ppm (B) e grupo de tratamento com 44ppm (C) (coloração Picosírius – hematoxilina em aumento de 20x – campo claro).

Fonte: Autor da dissertação.

Observa-se neste grupo novamente a expressão do controle inflamatório dos curativos de prata sobre o grupo controle, mostrando sua eficácia na redução da resposta inflamatória, que pode ser benéfico em feridas contaminadas ou lesões com inflamação aguda. Produtos com nanop prata tem ação microbiana e mostram menor resistência dos microorganismos, conseguem inibir microorganismos resistentes à antibióticos e apresentam baixa toxicidade sistêmica, mostrando-se superiores aos

produtos com prata iônica como sulfadiazina de prata e nitrato de prata, pois estes em uso prolongado inibem a proliferação de fibroblastos devido a toxicidade ao tecido (GUNASEKARAN, NIGUSSE, DHANARAJU, 2012).

5.3.4 Grupo de 14 dias de tratamento

Nos três grupos, as lâminas correspondentes aos animais com 14 dias de tratamento revelaram presença de epiderme nas regiões próximas à pele integra e presença crosta fibrino-leucocitária nas regiões distais. Entretanto, a porção correspondente à crosta já se encontrava bastante reduzida, ou seja, o processo de reepitelização já está quase completo em toda a ferida. Observou-se também em todas as lâminas um discreto infiltrado com células inflamatórias, aumento considerável na quantidade de fibroblastos e presença de vasos sanguíneos pequenos, ou seja, neoformados (Figura 29).

Figura 29 – Comparação de infiltrado celular e vasos sanguíneos no grupo de 14 dias de tratamento.

Tempo de tratamento de 14 dias nos grupos controle (i), 22 ppm de prata (ii) e 44 ppm de prata (iii). Observa-se a presença da crosta fibrino-leucocitária (C), razoável quantidade de células inflamatórias (I) e de fibroblastos (F), bem como moderada quantidade de vasos sanguíneos neoformados (V) nos três grupos (coloração HE em aumento de 20x).

Fonte: Autor da dissertação.

É possível observar uma quantidade moderada de fibras colágenas coradas pelo picrosirius, além do mais, as mesmas já apresentam um grau moderado de organização (Figura 30).

Figura 30 - Comparação de fibras colágenas no grupo de 14 dias de tratamento.

Grupo controle (A), grupo de tratamento com 22ppm (B) e grupo de tratamento com 44ppm (C) (coloração Picrosirius – hematoxilina em aumento de 20x – campo claro).

Fonte: Autor da dissertação.

No entanto não foi observada diferença significativa entre os grupos no que diz respeito à % de área de células basófilas ($p=0,4822$) e a contagem do número de vasos ($p=0,335$). Com relação a presença do colágeno, pode-se dizer que o grupo controle contém maior área corada pelo picrosirius do que o grupo tratado com 22ppm de prata ($p=0,04557$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - As médias de células basófilas, vasos sanguíneos e colágeno para todos os tratamentos.

Fonte: Autor da dissertação.

Ao realizar a análise do colágeno com luz polarizada as lâminas coradas com picrosirius referentes aos animais com 14 dias de pós-operatório expressaram grande quantidade de fibras colágenas na fase proliferativa, dispostas de maneira moderadamente organizadas (agrupadas e em paralelo). Foi predominante a

visualização da birrefringência na cor vermelha e laranja, embora fracos sinais de coloração verde também possam ser observados em alguns campos histológicos, independente do tratamento recebido pelo animal. Assim sendo, ao quantificar a quantidade de colágeno presente em cada grupo, levou-se em consideração a presença de pixels oriundos da birrefringência na cor vermelha/amarela/laranja (Figuras 31 e 32).

Figura 31: Fotomicrografias de colágeno com luz polarizada nos cortes de 14 dias pós-cirúrgico.

Animais 70, 12 e 75, representando os grupos controle (A) e tratados com 22ppm (B) e 44 ppm (C) de prata respectivamente (*picrosirius* sob luz polarizada, aumento 20x).
Fonte: Autor da dissertação.

Figura 32: Fotomicrografias de colágeno com birrefringência da cor verde nos cortes de 14 dias pós-cirúrgico

Animais 11, 72 e 53, representando os grupos controle (A) e tratados com 22ppm (B) e 44 ppm (C) de prata respectivamente. As setas apontam birrefringência da cor verde e o quadro abaixo é um “zoom” de uma das regiões (*picrosirius* sob luz polarizada, aumento 20x).
Fonte: Autor da dissertação.

Nos animais com 14 dias de pós-operatório, observou-se maior produção de colágeno no grupo controle, seguido pelo grupo tratado com 44 ppm de prata e depois

com 22 ppm de prata – valores de média = 5094, 2424 e 3081 respectivamente. A análise em ANOVA revelou diferença estatisticamente significativa somente entre os grupos controle e o 22 ppm de prata ($p=0,027$) (Gráfico 5).

Gráfico 5: Análise de médias de colágeno em luz polarizada em todos os tratamentos grupo de 14 dias.

Fonte: Autor da dissertação.

Importante levar em consideração que houve um desvio padrão muito grande na amostragem do grupo controle em função dos altos valores medidos da densidade de colágeno da amostra do animal 51, que apresentou valores muito maiores do que os demais animais. Foram fotografados 6 campos histológicos nesse caso. Esse fato modificou consideravelmente o valor da média do grupo controle que ficou maior do que as dos outros dois tratamentos.

5.3.5 Grupo de 21 dias de tratamento

A análise dos animais sacrificados aos 21 dias de tratamento revelou presença de epiderme em toda região de ferida, com notável produção de queratina e já não havendo mais a crosta. Nesse período já se observam pouquíssimas células inflamatórias (neutrófilo ou macrófago) e os fibroblastos já se encontram em toda parte no seu formato típico. Também nessa fase a presença de inúmeros vasos pequenos pode ser observada na região da derme. Estas observações foram constatadas nos três grupos de tratamento conforme ilustrado (Figura 33).

Figura 33 - Comparação de epiderme, queratina, infiltrado celular e vasos sanguíneos no grupo de 21 dias de tratamento.

Com 21 dias de tratamento nos grupos controle (i), 22 ppm de prata (ii) e 44 ppm de prata (iii). Observa-se a presença da epiderme (E), de queratina (Q), de raras células inflamatórias (I) e de grande quantidade de fibroblastos (F). Nesse estágio encontra-se vasos sanguíneos neoformados (V) em quantidade moderada na região da derme nos três grupos (coloração HE em aumento de 20x).
Fonte: Autor da dissertação.

Quanto à análise do colágeno as lâminas mostraram a presença de grande quantidade de fibras colágenas na região da derme, sendo que as mesmas apresentaram intenso grau de organização, ou seja, as fibras encontram-se pareadas e paralelas à epiderme, todas numa mesma direção, indicando intenso grau de remodelamento das mesmas (Figura 34).

Figura 34 - Comparação de fibras colágenas no grupo de 21 dias de tratamento.

Grupo controle (A), grupo de tratamento com 22ppm (B) e grupo de tratamento com 44ppm (C) (coloração Picrosirius – hematoxilina em aumento de 20x – campo claro).
Fonte: Autor da dissertação.

E neste tempo observou-se que a espessura da epiderme variou em torno de 100 μ m ($p= 0,1521$), sendo que a mesma já se encontrou formada por toda extensão da ferida (o que não ocorreu nas análises feitas anteriormente quando havia porções da ferida em que a epiderme ainda não havia se formado, e, portanto, analisou-se outro parâmetro). As amostras tratadas com 44ppm de prata expressaram média maior que os outros tratamentos de maneira estatisticamente significativa, portanto tecidos tratados com 44 ppm de prata tiveram maior desenvolvimento de colágeno ($p= 0,02429$) bem como no processo de neovascularização ($p= 0,00003628$) (Gráfico 6).

Gráfico 6 - As médias de espessura da epiderme, vasos sanguíneos e colágeno para o todos os tratamentos no tempo de 21 dias.

Fonte: Autor da dissertação.

Curativos com nanop prata modulam a resposta inflamatória local e sistêmica, através do controle de citocinas inflamatórias, além de que as lesões tratadas com nanopartículas apresentaram melhores resultados estéticos, possivelmente associados ao efeito da nanop prata no controle da fibrose tecidual e cicatrização pós lesão (TIAN, et al, 2007).

5.3.6 Grupo de 30 dias de tratamento

No tempo de eutanásia para 30 dias, considera-se que as lesões estavam cicatrizadas por completos sendo as coberturas suspensas de uso há aproximadamente 10 dias anteriores. E esta análise tardia buscou evidenciar possível efeito da prata na cicatriz através da organização do colágeno.

Com 30 dias de tratamento, os achados histológicos foram semelhantes aos de 21 dias, com total reepitelização, produção de queratina, ausência ou raras aparições de células inflamatórias, abundância na quantidade de fibroblastos e visualização de diversos vasos sanguíneos na região da derme (Figura 35). Raras foram às vezes em que glândulas sebáceas e folículos pilosos foram observados, os quais estavam presentes em maior quantidade na porção mais próxima à pele íntegra. Novamente, os três grupos exibiram perfil histológico muito parecido.

Figura 35 - Comparação de epiderme, queratina, infiltrado celular e vasos sanguíneos no grupo de 30 dias de tratamento.

Tempo de tratamento de 30 dias nos grupos controle (i), 22 ppm de prata (ii) e 44 ppm de prata (iii). Observa-se a presença da epiderme (E), de queratina (Q), de intensa quantidade de fibroblastos (F), bem como muitos vasos sanguíneos neoformados (V) na região da derme (coloração HE em aumento de 20x).

Fonte: Autor da dissertação.

Os campos histológicos de colágeno mostraram grande quantidade de fibras colágenas na região da derme com intenso grau de organização, semelhante às características encontradas no tempo de 21 dias (Figura 36).

Figura 36 - Comparação de fibras colágenas no grupo de 30 dias de tratamento.

Grupo controle (A), grupo de tratamento com 22ppm (B) e grupo de tratamento com 44ppm (C) (coloração Picrosirius – hematoxilina em aumento de 20x – campo claro).

Fonte: Autor da dissertação.

Observou-se que os três grupos comportaram-se de maneira parecida (médias pouco discrepantes) nos três parâmetros analisados: formação de colágeno, espessura da epiderme e contagem do número de vasos. Entretanto, o teste ANOVA mostrou que o grupo controle apresentou maior espessura de epiderme que os demais grupos ($p=0,043$) e o teste de discrepância entre os grupos utilizado foi o de Dunn's, uma vez que o de Tukey's não mostrou diferença entre os grupos (Gráfico 7).

Gráfico 7 – As médias de espessura da epiderme, vasos sanguíneos e colágeno para o todos os tratamentos no tempo de 30 dias.

Fonte: Autor da dissertação.

A análise da densidade de colágeno nos animais com 30 dias de pós-cirúrgico reflete a fase de remodelamento das fibras, e foi possível observar presença de grande quantidade de fibras colágenas, todas elas bem aglutinadas e intensamente organizadas. Com relação ao padrão de birrefringência, observou-se a cor vermelha-alaranjada como expressão predominante do colágeno, sendo raro o aparecimento da cor verde (tal como o que ocorreu com o grupo de 14 dias). Observou-se que há expressão muito maior da birrefringência vermelha no grupo de 30 dias comparado ao de 14 dias, já que aquele grupo se encontra em período mais avançado na produção e organização do colágeno (Figuras 37 e 38).

Figura 37 - Fotomicrografias de colágeno com luz polarizada nos cortes de 30 dias pós-cirúrgico.

Animais 4, 40 e 59, representando os grupos controle (A) e tratados com 22ppm (B) e 44 ppm (C) de prata respectivamente (*picosirius* sob luz polarizada, aumento 20x).

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 38 - Fotomicrografias de colágeno com birrefringência da cor verde nos cortes de 30 dias pós-cirúrgico

Animais 57, 83 e 19, representando os grupos controle (A) e tratados com 22ppm (B) e 44 ppm (C) de prata respectivamente. As setas apontam birrefringência da cor verde e o quadro abaixo é um “zoom” de uma das regiões (*picrosirius* sob luz polarizada, aumento 20x).

Fonte: Autor da dissertação.

As medições das áreas ocupadas pelo colágeno revelou maior produção de fibras colágenas no grupo tratado com 44 ppm de prata, seguida dos grupos de 22 ppm e do controle - valores de média respectivamente iguais a 14496, 7553 e 6550. A análise estatística feita em ANOVA revelou que há diferença estatística significativa entre os grupos 44 ppm e o controle ($p=0,0059$) e 44 ppm e o 22 ppm ($p=0,0124$), portanto o grupo tratado com 44 ppm de prata destaca-se bastante na produção de fibras colágenas (Gráfico 8).

Gráfico 8: Análise de médias de colágeno em luz polarizada em todos os tratamentos grupo de 30 dias.

Fonte: Autor da dissertação.

Segundo literatura, as diferentes cores da birrefringência do colágeno não servem para caracterizar os tipos de colágeno I e III. Sabe-se que existem mais de 20 tipos de colágenos, além do que, a cor e a intensidade de birrefringência ocorrem em função da espessura da fibra de colágeno e de seu arranjo espacial. Dessa forma, a determinação específica do colágeno tipo I e III só poderia ser demonstrada a partir de ensaios de imunoistoquímica utilizando anticorpos específicos (MONTES, JUNQUEIRA 1991; COLEMAN 2011).

Os curativos com nanop prata modulam a resposta inflamatória, e neste estudo através da avaliação histológica foi possível confirmar que a prata não provocou prejuízo na cicatrização das lesões nas concentrações de 22ppm e 44ppm. E conhecendo o controle microbiano que a prata exerce o curativo testado pode ser benéfico na reparação tecidual.

Sabe-se que os fibroblastos contribuem na formação de colágeno tipo III para a formação da cicatriz. E a angiogênese garante oxigênio e nutrientes para o tecido recém formado (GUPTA, et al, 2019). Embora o estudo não diferenciou o tipo do colágeno, as amostras tratadas com 44ppm de prata mostraram melhor reparação tecidual no final do tratamento, provavelmente por apresentarem diferença estatística na formação de colágeno e neovascularização quanto comparada com os demais tratamentos.

5.4 Avaliação Macroscópica

A análise macroscópica permitiu observar diferenças de coloração e aspecto das lesões dos animais, sendo avaliadas em cada curativo. As Figuras 39, 40 e 41 demonstram a evolução visual das lesões desde o início do tratamento até o momento da eutanásia de cada grupo por tratamento.

Figura 39 - Macroscopia das lesões do grupo experimental de controle – animal 57

Incisão (A), 3 dias (B), 10 dias (C), 14 dias (D), 18 dias (E) e 30 dias (F). Curativo retirado do animal no 18º dia de tratamento. Fonte: Autor da dissertação.

Figura 40 - Macroscopia das lesões do grupo experimental de 22ppm – animal 58.

Incisão (A), 2 dias (B), 8 dias (C), 14 dias (D), 16 dias (E) e 30 dias (F). Curativo retirado do animal no 16º dia de tratamento.

Fonte: Autor da dissertação.

Figura 41 - Macroscopia das lesões do grupo experimental de 44 ppm – animal 59.

Incisão (A), 8 dias (B), 14 dias (C), 16 dias (D) e 30 dias (E). Curativo retirado do animal no 16º dia de tratamento.

Fonte: Autor da dissertação.

Não foi encontrada diferença estatística significativa no tempo de fechamento das lesões entre nenhum dos grupos tratados (controle, 22 ppm, 44 ppm) em nenhum dos tempos analisados: 24 horas, 3, 7 e 14 dias. Assim sendo, pode-se afirmar que nenhum tratamento mostrou influência no processo macroscópico de fechamento da lesão.

Em média, o tempo de uso do curativo nos animais foi de 17,7 dias para o grupo controle, 16,5 para o grupo tratado com 22 ppm de prata e de 18,3 para o grupo tratado com 44 ppm de prata. Além de serem valores bem próximos, essas médias não expressaram diferença estatística significativa entre si, portanto os diferentes tratamentos não influenciaram no tempo de uso do curativo pelos animais.

Nos animais que foram tratados até os 21 e 30 dias com a prata, não foi viável coletar dados a respeito da taxa de cura das feridas, uma vez que as mesmas já haviam cicatrizado totalmente no momento da coleta de dados de comprimento e largura da lesão. Assim sendo, para esses dois grupos, foi feita uma análise do momento em que os curativos foram retirados dos animais, ou seja, quando o tecido já se encontrava totalmente epitelizado.

É possível observar nas imagens apresentadas do processo de cicatrização todas as etapas da reparação tecidual. Observou-se em todo o processo de cicatrização que o exsudato foi escasso, bem como as bordas das lesões permaneceram íntegras, ausentes de descolamento ou maceração. E a área perilesão manteve-se íntegra, ausente de sinais de irritação ou alteração tecidual.

Compostos com nanopartículas de prata contribuem no controle de microrganismos, no entanto o desenho desse estudo é realizado com ausência de infecção. Infecção é a principal causa de não cicatrização de lesões, e testar novas formulações em ausência de infecção pode ser questionado visto que estes tipos de lesões poderiam cicatrizar sem qualquer produto. É necessário fortalecer estudos de protocolos de tratamento de feridas contaminadas para avaliar a atividade antimicrobiana dos curativos em feridas colonizadas e infectadas (NAGIBA, GAVANE, 2019).

Este estudo evidenciou a cicatrização das lesões independente do curativo utilizado. E embora os curativos com prata não mostraram-se superiores ao curativo controle no tempo de reparação tecidual, foram compatíveis com o processo de cicatrização demonstrando biocompatibilidade na reparação tecidual sem infecção.

6 CONCLUSÕES

Os curativos de hidrogel são transparentes e permitem a visualização do leito da ferida, garantido o adequado posicionamento com margens livres. Mantém o meio úmido e não aderem ao tecido recém formado, permitindo a troca sem dor. A remoção é facilitada e não prejudica a evolução da ferida pela remoção.

Os animais foram contidos manualmente durante o procedimento, não sendo observado manifestações de dor ou estresse durante o processo de troca dos curativos e evolução da cicatrização. Os animais mantiveram-se livres de complicações advindas do uso do curativo, e esse promoveu a reparação dos tecidos.

Os curativos de hidrogel com nanopartículas de prata evidenciaram o controle inflamatório nas lesões, pois o curativo controle de hidrogel em 24 horas de uso mostrou maiores médias dos valores para inflamação, formação de colágeno e neovascularização. E curativos com controle inflamatório são benéficos em feridas contaminadas ou com alta carga de microrganismos antes do desencadeamento da infecção propriamente dita.

No tempo de 21 dias, as lesões tratadas com curativo de hidrogel com 44ppm de prata mostraram melhor expressividade sobre a produção de neovasos, e organização e desenvolvimento de colágeno, certificando melhores efeitos na fase de epitelização.

Os curativos com prata foram compatíveis com o processo de cicatrização de segunda intenção em dorso de ratos, e o curativo com 44ppm de prata mostrou-se melhor que o de 22ppm para a epitelização e colágeno. Ao final do tratamento todas as lesões cicatrizaram por completo sem diferença significativa de tempo, mantendo-se a troca a cada 48 horas. No entanto o curativo pode ser mantido por tempo maior de 48 horas nas fases de granulação e epitelização.

As características deste curativo nos permite concluir que o possa reduzir o custo do tratamento em termos de tempo de enfermagem, gastos com outros medicamentos e tempo de internação hospitalar. Estudos direcionados à esses aspectos são interessantes e sugeridos.

Sugere-se estudos destes curativos de hidrogel com nanopartículas de prata em lesões contaminadas e/ou infectadas afim de avaliar a efetividade da prata na reparação tecidual em condições adversas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, M. T. S. **Hidrogéis Poliméricos com Nanopartículas de Prata para Aplicações Médicas**. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) Instituto de Pesquisa em Energia Nuclear. São Paulo. 166p. 2013.
- ANDRADE, A., PINTO, SC., and OLIVEIRA, RS., orgs. **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books.
- BEZERRA GC, SANTOS ICRV, LIMA JC, SOUZA MAO. Avaliação do risco para desenvolver pé diabético na atenção básica. **Rev Estima [Internet]**. 2015 [citado 2017 mar. 20];13(3). Disponível em: <https://www.revistaestima.com.br/index.php/estima/article/view/108>
- CARDOSO, L.; USERO, R.; CATANI, S. M. M.; BARBO, M. L. P.; ESPOSITO, A. R.; DUEK, E. A. R. **Implante de membranas de PLLA/Trietil-Citrato como alternativa no tratamento de feridas cutâneas**. Polímeros [online]. v. 23, n. 6, p. 798-806, 2013. ISSN 0104-1428. <http://dx.doi.org/10.4322/polimeros.2013.058>.
- CARDOSO, T. R. **Aplicabilidade de Curativos a base de hidrogel com nanopartículas de prata em lesão por pressão**. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo. 67p. 2017.
- FARINA JUNIOR, J. A.; COLTRO, P. S.; OLIVEIRA, T. S.; CORREA, F. B.; CASTRO, J. C. D. Curativos de prata iônica como substitutos da sulfadiazina para feridas de queimaduras profundas: relato de caso. **Rev Bras Queimaduras**. v. 16, n. 1, p. 53-7, 2017.
- GALVÃO, N.S. **Prevalência de feridas agudas e crônicas e fatores associados em pacientes de hospitais públicos em Manuas – AM**. 2016. Tese (Doutorado em Enfermagem em Saúde do Adulto) – Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2016. Acesso em 12/04/2019.
- GAMBA, M. A.; PETRI, V.; COSTA, M. T. F. **Feridas: prevenção, causas e tratamento**. Rio de Janeiro: Santos Ed., 2016. 352 p.
- GEOVANINI, T. **Tratado de Feridas e Curativos - Enfoque Multiprofissional**. São Paulo: Rideel, 2014.
- GIRARD, R. C. G. **Comportamento de Matrizes de colágenos utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de ratos**. Dissertação (Mestrado em Bioengenharias) Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo. 101p. 2005.
- GUNASEKARAN, T.; NIGUSSE, T.; DHANARAJU, M. D. Silver Nanoparticles as Real Topical Bullets for Wound Healing. **Journal of American College of Clinical Wound Specialists**. v. 3, p. 82-96, 2012.

GUPTA, A.; KOWALCZUK, M.; HEASELGRAVE, W.; BRITLAND, S. T.; MARTIN, C.; RADECKA, I. The production and application of hydrogels for wound management: a review. **European Polymer Journal**. v. 111, p. 134-151, Feb, 2019.

HUSSAIN, S. M.; HESS, K. L.; GEARHART, J. M.; GEISS, K. T.; SCHLAGER, J. J. Toxicity of Silver Nanoparticles at Noncytotoxic Doses to HepG2 Human Hepatoma Cells. **Toxicology in Vitro**. v. 19, p. 975, 2005.

HUSSAIN, S. M.; JAVORINA, M. K.; SCHRAND, A. M.; DUHART, H. M.; ALI, S. F.; SCHLAGER, J. J.; Silver Nanoparticle Induced Blood-Brain Barrier Inflammation and Increased Permeability in Primary Rat Brain Microvessel Endothelial Cells. **Toxicology Science**. v. 92, p. 456, 2006.

IRION, G. L. **Feridas: Novas Abordagens, Manejo Clínico E Atlas Em Cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. [Reimpr.]. 13. ed., 2018. Cap. 4, Tecido Epitelial. Cap. 5, Tecido Conjuntivo. p. 62-115.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KLIPPSTEIN, R.; MONTESINOS, R. F.; CASTILLOS, P. M.; ZADERENKO, A. P.; POZO, D. Silver Nanoparticles interactions with the immune system: implications for health and disease. **Silver Nanoparticles**. p. 309-324, Mar, 2010.

KONOP, M.; DAMPS, T.; MISICKA, A.; RUDNICKA, L. Certain Aspects of Silver and Silver Nanoparticles in Wound Care: A Minireview. **Journal of Nanomaterials**. v. 2016, Article ID 7614753, 10 p, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/7614753>. Acesso em 21 abr. 2019.

KORBEKANDI, H; IRAVANI, S. Silver Nanoparticles. **The Delivery of Nanoparticles**. p.1-35, Mai, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, C. J. **Robbins Patologia Básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LEAL, E. R.; OLIVEIRA, I. S.; ISNÁRIA; JUSCELINO, L. S.; RODRIGUES, A. C. E.; FERREIRA, D. C. L.; VIANA, V. G. F.; ARAÚJO, K. S. A.; SANTOS, M. C.; LEAL, N. S. M. L.; MAIA FILHO, A. L. M. Ação cicatrizante da nanopartícula de prata com norbixina em queimaduras. **Com Scientiae Saúde**. São Paulo. v. 16, n. 2, p. 241-248, 2017. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92953318010> Acesso em 20 abr. 2019.

MALAGUTTI, W. **Feridas: Conceitos e Atualidades**. Martinari, 2015.

MARGARET, I. P.; LUI, S. L.; POON, V. K. M.; LUNG, I.; BURD, A. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? **Journal of Medical Microbiology**. v. 55, p. 59-63, 2006.

MEIKLE, S T. Wound Healing Bioaterials. Cap 16: Elsevier. p. 335-348. 2016.
NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH). **Guidelines for Pain and Distress in Laboratory Animals**. 8. Washington: OACU, 2010.

NAGOBA, B.; DAVANE, M. Studies on wound healing potential of topical herbal formulations do we need to strengthen study protocol? **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**. v.10, n, 4, p. 316-318, Oct-Dec, 2019.

NEVES, S. M. P., PRATES, F. M.; RODRIGUES, L. D.; SANTOS, R. A.; FONTES, R. S.; SANTANA, R. O. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.

PARK, E. J.; BAE, E.; YI, J. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 30, n. 2, p.162–168, 2010.

PRESTES, M. A.; RIBAS, C. A. P. M.; RIBAS FILHO, J. M.; MOREIRA, L. B.; BOLDT, A. B. W.; BRUSTOLIN, E. V.; CASTANHO, L. S.; BERNARDI, J. A.; DIAS, F. C. Wound healing using ionic silver dressing and nonocrystalline silver dressing in rats. **Acta Cir. Bras.** São Paulo, v. 27, n. 11, p. 761-767, Nov, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502012001100004> Acesso em 07 abr. 2019.

ROCHA, T. M. **Feridas e Estomas Em Oncologia – Uma Abordagem Interdisciplinar**. Fisiologia do Processo Cicatricial. São Paulo: Lemar, 2011.

SIMON, P E. Skin Wound Healing. Medscape. 2018. Disponível em: <https://emedicine.medscape.com/article/884594-overview> Acesso em: 13/07/2019.

SOUBHIA, C. M. et al. **MANUAL DE CURATIVOS**. Prefeitura Municipal de Campinas, 2016.

SUNARTI, S. Successful Treatment of Unstageable Pressure Ulcer by Using Advanced Wound Dressing. **Acta Med. Indones**. v. 47, n. 3, p. 251-2, Jul, 2015.

TAVARES, W. S.; SILVA, R. S. Curativos utilizados no tratamento de queimaduras: uma revisão integrativa. **Rev. Bras. Queimaduras**. v. 4, n. 14, 2015.

TIAN, J.; WONG, K. K.; HO, C. M.; LOK, C. N.; YU, W. Y.; CHE, C. M.; CHIU, J. F.; TAM, P. K. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. **Chem Med Chem**. v. 2, n. 1, p. 129-36, Jan, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cmdc.200600171> Acesso em 21 abr. 2019.

VIEIRA CPB, ARAÚJO TME. Prevalence and factors associated with chronic wounds in older adults in primary care. **Rev Esc Enferm USP**. v. 52,e03415, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1980-220X2017051303415>

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.