



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

**Estudo experimental sobre a toxicidade do curativo de hidrogel com
nanoprata em ratos**

GRAZIELLY MENDES DE SOUSA

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

**Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero**

**Coorientador:
Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão**

**São Paulo
2020**

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

**Estudo experimental sobre a toxicidade do curativo de hidrogel
com nanop prata em ratos**

Versão Original

Versão Corrigida disponível no IPEN

GRAZIELLY MENDES DE SOUSA

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

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Rogero

Coorientador:

Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão

São Paulo

2020

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

Como citar:

SOUSA, G. M. d. ***Estudo experimental sobre a toxicidade do curativo de hidrogel com nanoprata em ratos***. 2020. 75 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)

Sousa, Grazielly Mendes de
Estudo experimental sobre a toxicidade do curativo de hidrogel com nanoprata em ratos / Grazielly Mendes de Sousa; orientador José Roberto Rogero; co-orientador Ademar Benévolo Lugão. -- São Paulo, 2020.
75 p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020.

1. Hidrogel. 2. Prata. 3. Toxicidade. 4. Curativo. I. Rogero, José Roberto, orient. II. Lugão, Ademar Benévolo, co-orient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Grazielly Mendes de Sousa

Título: Estudo experimental sobre a toxicidade do curativo de hidrogel com nanoprata em ratos

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

Data: 08/12/2020

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, por ser meu guia, luz e sustento durante essa caminhada.

Aos meus pais, que são meus exemplos de vida.

Ao meu esposo e filha.

AGRADECIMENTOS

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. E ao IPEN pelo programa de pós-graduação que possibilitou a conquista deste sonho.

Ao Sr. Jonny Francisco Ros de Almeida da empresa KHEMIA (Equipamentos Tecnológica de Efluente Ltda) pelo fornecimento da nanop prata para a sínteses dos hidrogéis.

Ao professor Dr. José Roberto Rogero, meu orientador, pela paciência, por sempre ter se mostrado disponível e proporcionar o diálogo mesmo à distância. Minha sincera admiração.

Ao professor Dr. Ademar Benévolo Lugão, meu co-orientador, mentor e idealizador dessa pesquisa. Obrigado por ter me acolhido, pela oportunidade e todo o apoio.

Ao professor Dr. Heitor Franco de Andrade Junior, pelas grandiosas contribuições e apoio nos momentos em que o desconhecido limitava de continuar.

A Dra. Maria José Alves de Oliveira, que sempre esteve disponível, foi o suporte necessário no qual sempre pude me apoiar em todas as etapas desta pesquisa.

Aos veterinários Dra. Obede Rodrigues e Dr. Guilherme Burns, que conduziram a parte cirúrgica do experimento.

A professora e bioquímica Ozenilde Martins pela contribuição durante a coleta e análises hematológicas.

Aos técnicos de laboratório do ITPAC Porto Nacional, Maria, Gustavo e Evanildes, que nunca mediram esforços em ajudar. A toda equipe dos laboratórios do CQMA pelo apoio e disponibilidade em contribuir nas etapas experimentais dessa dissertação.

A minha querida amiga, parceira de trabalho e de pesquisa Me. Karine Kummer pelo apoio e suporte incondicional de sempre.

Aos alunos de graduação Kassandra Martins, Danilo Marinho e Mar Antônio que auxiliaram na parte experimental.

Aos meus pais Leusi (in memoriam) e Selmi por sempre me motivar e fazer acreditar que mesmo com as adversidades tudo seria possível.

Ao meu esposo Rinaldo Manduca, a minha filha Maria Clara, meus familiares e amigos pelo apoio e incentivo em todas as etapas deste trabalho.

RESUMO

SOUSA, Grazielly M. de. **Estudo experimental sobre a toxicidade do curativo de hidrogel com nanop prata em ratos.** 2020. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

OBJETIVOS: avaliar a toxicidade do curativo de hidrogel com nanop prata a 22 ppm e 44 ppm em lesões cutâneas superficiais utilizando ratos Wistar, a partir da análise histopatológica de parte do fígado e rins; avaliar os possíveis efeitos tóxicos sobre as funções renal, hepática e células sanguíneas por meio do hemograma.

METODOLOGIA: Trata-se de um estudo pré-clínico. Os curativos de hidrogel e hidrogel com nanop prata com concentrações de 22 e 44 ppm foram produzidos no Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN. A pesquisa foi realizada no Biotério da Faculdade Presidente Antônio Carlos em Porto Nacional (FAPAC ITPAC Porto), Tocantins. Foram utilizados 85 ratos, adultos jovens, machos, com idade média de 60 a 90 dias. Os animais foram classificados aleatoriamente em três grupos. O tratamento das lesões foi realizado a cada três dias e uma vez ao dia. Os sinais clínicos e peso corporal dos ratos foram registrados. As amostras sanguíneas e os órgãos foram posteriormente coletados para exame bioquímico. As peças anatômicas, após retirados cirurgicamente, foram submetidas aos procedimentos de rotina para blocagem e histotécnica. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da FAPAC ITPAC Porto. Todos os dados foram tabulados e analisados pelo software GraphPad Prism version 8.0.1, teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados. Para dados não paramétricos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e as comparações pelo pós-teste de Dunn. Para dados de distribuição normal análise do (ANOVA) e por meio do teste de Tukey. **RESULTADOS:** Para cada parâmetro hematológico avaliado nos diferentes tempos, os três grupos se comportaram de maneira muito parecida e demonstraram não serem diferentes estatisticamente, salvo poucas exceções ao que se refere as células sanguíneas mononucleares. Na análise de dosagem da uréia as médias do grupo controle comparados com os do demais tratamentos, notou-se que as médias do HP22 foram maiores no tempo de 7 e 14 dias, enquanto que as do grupo do HP44 se apresentaram maiores em 24 horas, 7 dias e 14 dias. Na dosagem de creatinina, somente o grupo (HP44) 14 dias mostrou-se maior. Na comparação das

médias de ALT, em relação ao grupo (H), observou-se que as médias do (HP22) foram maiores em 24 h e 3 dias, enquanto que as do grupo (HP44) mostraram ser maiores em 24 h, 7, 14 e 30 dias. No AST notou-se que o (HP22) foi maior em 3, 7 e 14 dias enquanto que o (HP44) foi em 24 h e 7 dias. O estudo não apresentou alterações significativas ao que se refere às análises histopatológicas do fígado e rins. **CONCLUSÕES:** os curativos de hidrogel com nanopartículas de prata reticulados e esterilizados por irradiação com raios gama produzidos no IPEN/USP, não induziram toxicidade aos animais e os dados servirão como base para estimar o potencial de risco de eventual exposição à saúde humana.

Palavras-chave: Hidrogel; Prata; Toxicidade

ABSTRACT

SOUSA, Grazielly M. de. **Estudo experimental sobre a toxicidade do curativo de hidrogel com nanoprata em ratos**. 2020. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo.

OBJECTIVES: to evaluate the toxicity of the hydrogel dressing with nano-silver at 22 ppm and 44 ppm in superficial skin lesions using Wistar rats, from the histopathological analysis of part of the liver and kidneys; evaluate the possible toxic effects on kidney, liver and blood cell functions through the blood count. **METHODOLOGY:** This is a pre-clinical study. The hydrogel and hydrogel dressings with nano-silver with concentrations of 22 and 44 ppm were produced at the Chemistry and Environment Center (CQMA) of IPEN. The research was carried out at the Vivarium of Faculdade Presidente Antônio Carlos in Porto Nacional (FAPAC ITPAC Porto), Tocantins. Eighty-five young adult male rats were used, with an average age of 60 to 90 days. The animals were randomly classified into three groups. The lesions were treated every three days and once a day. The clinical signs and body weight of the rats were recorded. Blood samples and organs were later collected for biochemical examination. The anatomical specimens, after surgically removed, were submitted to routine blocking and histotechnical procedures. The project was approved by the FAPAC ITPAC Porto Animal Use Ethics Committee. All data were tabulated and analyzed using the GraphPad Prism version 8.0.1 software, Shapiro-Wilk test to verify the normality of the data. For non-parametric data, the Kruskal-Wallis test and comparisons using the Dunn post-test were used. For normal distribution data analysis (ANOVA) and through the Tukey test. **RESULTS:** For each hematological parameter evaluated at different times, the three groups behaved in a very similar way and demonstrated that they were not statistically different, with few exceptions to what refers to mononuclear blood cells. In the analysis of urea dosage the means of the control group compared to those of the other treatments, it was noted that the means of the HP22 were higher in the time of 7 and 14 days, while the group of the HP44 were higher in 24 hours, 7 days and 14 days. In the creatinine dosage, only the group (HP44) 14 days was shown to be higher. When comparing the means of ALT, in relation to the group (H), it was observed that the means of (HP22) were higher in 24 h and 3 days, while the group (HP44) showed to be higher in 24 h, 7, 14 and 30 days. In AST it was noted that (HP22) was higher in 3, 7 and 14 days while (HP44) was

higher in 24 h and 7 days. The study did not show any significant changes regarding the histopathological analyzes of the liver and kidneys. **CONCLUSIONS:** hydrogel dressings with crosslinked silver nanoparticles and sterilized by gamma rays produced at IPEN / USP, did not induce toxicity to animals and the data will serve as a basis to estimate the potential risk of possible exposure to human health.

Keywords: Hydrogel; Silver; Toxicity

LISTAS DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Representação da pele e suas camadas.....	23
Figura 2 - Evolução do número relativo de células sanguíneas e fibroblastos nas fases do processo de cicatrização.....	25
Figura 3 - Rotas de contaminação por nanopartículas.....	28
Figura 4 - Etapas do procedimento cirúrgico.....	35
Figura 5 - Curativo oclusivo após receberem os tratamentos.....	35
Figura 6 - Gráfico comparativo do peso avaliado durante os diferentes tempos de tratamento em relação aos grupos experimentais (H, HP22 e HP44)	41
Figura 7 – Gráfico de comparação de médias dos parâmetros hematológicos (leucócitos, segmentados e monócitos) em 24 horas de tratamento em relação aos grupos experimentais H, HP22 e HP 44.....	43
Figura 8 - Gráfico de comparação de médias do parâmetro hematológico dos neutrófilos segmentados em três dias de tratamento em relação aos grupos experimentais H, HP22 e HP44.....	44
Figura 9 - Gráfico de comparação de médias do parâmetro hematológico dos monócitos em sete dias de tratamento em relação aos grupos experimentais H, HP22 e HP44.....	45
Figura 10 - Gráfico de comparação de médias dos parâmetros hematológicos (eosinófilos e monócitos) em 14 dias de tratamento em relação aos grupos experimentais H, HP22 e HP44.....	46
Figura 11 - Gráfico de comparação de médias dos parâmetros hematológicos (segmentados e linfócitos) em 21 dias de tratamento em relação aos grupos experimentais H, HP22 e HP44.....	47
Figura 12 - Gráfico de comparação de médias dos parâmetros hematológicos (eosinófilos e monócitos) em 30 dias de tratamento em relação aos grupos experimentais H, HP22 e HP44.....	47
Figura 13 - Gráfico comparativo das médias de contagem de células binucleadas por campo (aumento 40x) no grupo de exposição de 24 horas em relação aos de tratamentos H, HP22 e HP44.....	52

Figura 14 - Gráfico comparativo dos valores das médias da contagem de células binucleadas por campo (aumento 40x) nos grupos de exposição de 3, 7, 14, 21 e 30 dias em relação aos de tratamentos H, HP22 e HP44.....	52
Figura 15 - Fotomicrografia da porção central de um lóbulo hepático.....	53
Figura 16 - Fotomicrografia de um lóbulo hepático.....	53
Figura 17 - Fotomicrografia de um espaço porta).....	54
Figura 18 – Fotomicrografia de lâminas do fígado de animais com tratamento de 24 horas nos grupos H, HP22 e HP44.....	55
Figura 19 - Fotomicrografia de lâminas do fígado de animais com tratamento de três dias nos grupos H, HP22 e HP44.....	55
Figura 20 - Fotomicrografia de lâminas do fígado de animais com tratamento de sete dias nos grupos H, HP22 e HP44.....	56
Figura 21 - Fotomicrografia de lâminas do fígado de animais com tratamento de 14 dias nos grupos H, HP22 e HP44.....	56
Figura 22 - Fotomicrografia de lâminas do fígado de animais com tratamento de 21 dias nos grupos H, HP22 e HP44.....	56
Figura 23 - Fotomicrografia de lâminas do fígado de animais com tratamento de 30 dias nos grupos H, HP22 e HP44.....	57
Figura 24 - Fotomicrografia de uma lâmina histológica do rim com a medição da área do corpúsculo renal e espaço de Bowman.....	58
Figura 25 - Fotomicrografia do corpúsculo renal centralizado, composto pelo glomérulo e cápsula de Bowman por meio de uma lâmina histológica do rim de um dos animais.....	59
Figura 26 - Fotomicrografia das características histológicas do corpúsculo renal de um animal com 3 dias de tratamento e eutanásia do grupo experimental com 44 ppm de NPAg.....	59
Figura 27 - Comparação da fotomicrografia do corpúsculo renal e da capsula de Bowman de um dos animais no tratamento de 24 horas em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).....	60
Figura 28 - Gráfico de comparação da área do corpúsculo renal e da capsula de Bowman do rim do animal em 24 horas em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e HP44).....	60
Figura 29 - Comparação da fotomicrografia do corpúsculo renal de um dos animais no tratamento de três dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).....	61

Figura 30 - Gráfico de comparação da área do corpúsculo renal e da capsula de Bowman do rim do animal no tratamento de 03 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e HP44).....	61
Figura 31 - Comparação da fotomicrografia do corpúsculo renal de um dos animais no tratamento de sete dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).....	62
Figura 32 - Gráfico comparativo da área do corpúsculo renal e da capsula de Bowman do rim do animal no tratamento de sete dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e HP44).....	62
Figura 33 - Comparação da fotomicrografia do corpúsculo renal e da capsula de Bowman de um dos animais no tratamento de 14 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).....	63
Figura 34 - Gráfico de comparação da área do corpúsculo renal e da capsula de Bowman do rim do animal no tratamento de 14 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e HP44).....	63
Figura 35 - Comparação da fotomicrografia do corpúsculo renal e da capsula de Bowman de um dos animais no tratamento de 21 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).....	64
Figura 36 - Gráfico de comparação da área do corpúsculo renal e da capsula de Bowman do rim do animal no tratamento de 21 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e HP44).....	64
Figura 37 - Comparação da fotomicrografia do corpúsculo renal e da capsula de Bowman de um dos animais no tratamento de 30 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).....	65
Figura 38 - Gráfico comparativo da área do corpúsculo renal e da capsula de Bowman do rim do animal no tratamento de 30 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e HP44).....	65

LISTAS DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Distribuição dos animais por grupo e quantitativo final dos animais no experimento.....	36
Tabela 2 - Comparação dos parâmetros hematológico através do hemograma dos animais em diferentes tempos e grupos experimentais.....	42
Tabela 3 - Concentrações séricas de uréia, creatinina, AST e ALT dos animais em diferentes tempos e grupos experimentais.....	48
Tabela 4 - Concentrações séricas de ALT e AST dos animais em diferentes tempos e grupos experimentais.....	50
Tabela 5 - Estatística descritiva referente aos valores de medição da área do espaço da cápsula de Bowman (em μm^2).....	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1 Pele.....	23
3.2 Feridas.....	24
3.3 Processo de Cicatrização de Feridas.....	25
3.4 Tratamento de Feridas.....	26
3.5 A Prata e sua Propriedade Antimicrobiana.....	26
3.6 Nanopartículas de Prata.....	27
3.7 Hidrogel.....	29
3.8 Toxicidade das Nanopartículas de Prata.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Delineamento Experimental.....	33
4.2 Padronização dos Grupos.....	34
4.3 Procedimento Cirúrgico.....	34
4.4 Pós Operatório.....	36
4.5 Acompanhamento Clínico.....	36
4.6 Tratamento das Lesões e Coleta das Amostras.....	36
4.7 Avaliação Clínica Bioquímica e Hematológica.....	37
4.8 Avaliação Histológica.....	38
4.9 Análise de Dados.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Análise do acompanhamento clínico dos animais durante o uso do curativo de Hidrogel e Hidrogel com Nano Partículas de Prata.....	40
5.2 Análise do hemograma.....	41
5.3 Análise dos parâmetros bioquímicos de Uréia e Creatinina.....	48
5.4 Análise dos parâmetros bioquímicos ALT e AST.....	49
5.5 Análise Histológica do Fígado.....	51
5.6 Análise Histológica do Rim.....	57

6 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS.....	68
ANEXO 1 - Carta de Autorização do CEUA.....	74

1 INTRODUÇÃO

Ferida é toda lesão que cause descontinuidade no tecido epitelial, acometem qualquer pessoa, em todas as idades, podendo ser classificadas de diversas formas: pelo tipo de agente causal, pelo grau de contaminação, pelo tempo e profundidade das lesões. É considerado um grande problema de saúde, pois envolve fatores relacionados ao paciente e seu meio externo (IRION, 2005).

O grande desafio para os profissionais da saúde é o tratamento ideal que estimule a cicatrização tecidual, seja da ferida aguda ou crônica. A cicatrização é um processo fisiológico e dinâmico que busca restaurar a continuidade dos tecidos. No processo de reparação tecidual três etapas são evidenciadas: fase inflamatória, proliferativa e de maturação.

Com o desenvolvimento da tecnologia em saúde, tem se produzido diversos tipos de curativos com a finalidade de intensificar o processo de cicatrização e proporcionar ao paciente melhores condições de tratamento e recuperação. Essa variedade de curativos possibilita melhor adequação e manejo das feridas. O curativo além de proteger e manter o ambiente da ferida úmido deve combater a infecção e a inflamação, acelerar o processo de cicatrização, reduzir a dor e proporcionar conforto ao paciente (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

A escolha do curativo tem papel singular para o sucesso do tratamento, sendo 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. Associado a estas questões deve-se levar em consideração a não aderência ao leito da ferida, diminuição do número de trocas, absorção de exsudato, proteção da lesão, influencia na ausência ou diminuição da dor, estímulo do tecido de cicatrização e baixo custo (IRION, 2005).

Os hidrogéis são redes poliméricas capazes de absorver e reter grandes volumes de água e fluídos corpóreos sem se dissolver. Apresentam em sua estrutura domínios hidrofílicos que são hidratados e reticulados em suas cadeias poliméricas. Possui em sua composição elevado teor de água, baixa tensão interfacial possibilitando baixa tendência em adsorver proteínas dos fluidos corpóreos e adesão celular, propriedades físicas similares ao tecido humano, estrutura microporosa e boa permeabilidade ao oxigênio (ALCANTRA, *et al.*, 2013). Os hidrogéis estão entre os produtos mais utilizados no tratamento de feridas

abertas, pois mantem o meio úmido ideal para o processo de cicatrização, são macios e não causam danos ao tecido de granulação.

Inúmeros compostos são associados às coberturas de feridas entre eles pode-se citar a utilização da prata (Ag) ou das nanopartículas de prata (NPAg) que tem ação bactericida e bacteriostática aos microorganismos do leito da ferida, o que garante a segurança do nível de contaminação, prevenindo o desequilíbrio que propicia a infecção.

A prata tem sido usada como um agente terapêutico antimicrobiano há mais de 2000 anos. Apresenta ação antisséptica, antimicrobiana e anti-inflamatória. É eficaz contra um amplo espectro de bactérias aeróbias, anaeróbias, gram positivas, gram negativas; além de atividade contra fungos e vírus. É biologicamente ativa na sua forma solúvel, iônica ou não (Ag^+ ou Ag^0). A forma iônica possui potente efeito antimicrobiano por meio do bloqueio imediato da cadeia respiratória, destruição da membrana celular e parede bacteriana. A forma Ag^0 está presente nos compostos nanocristalinos (WRIGHT *et al.*, 2002).

Muitos estudos apontam um futuro promissor ao uso de NPAg, pois sua atividade antibacteriana é influenciada pelo tamanho das partículas, com o tamanho reduzido e sem agregação demonstram ação contra as bactérias gram-negativas e gram-positivas. Além disso, a NPAg pode promover a proliferação de queratinócitos no processo de reepitalização e também conduzir a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos (NOGUEIRA; PAINO; ZUCOLOTTO, 2013).

A exposição humana a NPAg pode ocorrer de diferentes maneiras: inalação, ingestão, injeção e contato dérmico. Uma vez dentro do corpo, as NPAg entram rapidamente na circulação e podem migrar para o fígado, rim, baço, pulmões e cérebro, induzindo toxicidade (PAULA, 2013).

O fígado é o órgão mais atingido pela ação tóxica de várias substâncias e por possuir grande importância na manutenção da homeostasia, se faz necessário estudos para que haja uma segura utilização das nanopartículas. A acumulação excessiva de NPAg no fígado pode levar a certos efeitos adversos tais como alterações patológicas na morfologia hepática, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos no DNA e alterações nas atividades enzimáticas hepáticas (COSTA, 2009).

Testes subagudos de toxicidade em ratos, mostraram tolerância em doses de 1000 mg Kg^{-1} de NPAg sem alterações significativas no peso corporal. Também

foi observado aumento dos níveis de fosfatase alcalina e do colesterol com doses acima de 300 mg kg^{-1} indicando alterações funcionais do tecido hepático (PAL; TAK e SONG, 2007).

Acredita-se que a toxicidade possa depender do tamanho e a forma, pois partículas de tamanho reduzido (10nm) podem passar através da membrana celular e o seu acúmulo intracelular pode levar a uma deficiência no funcionamento da célula. A toxicidade da nanop prata provoca indução de estresse oxidativo ou disfunção celular (NEVES, 2013).

Diversos curativos com prata e nanop prata vêm sendo introduzidos no mercado. E faz-se necessário avaliar o real efeito deste metal na cicatrização e ação anti-inflamatória das feridas, bem como, sobre a sua toxicidade. Alguns estudos indicam possíveis efeitos tóxicos agudos, demonstrando a necessidade de um melhor entendimento dos efeitos destes materiais antes de serem utilizados em processos ou em produtos do cotidiano. Embora a toxicologia da prata e seus compostos tenham sido estudados, existem várias lacunas para mais conhecimentos sobre os riscos causados pela prata na forma de nanopartículas, tanto para seres humanos quanto para o meio ambiente. Ainda são poucos os estudos sobre a toxicidade da prata no organismo, que por vezes são contraditórios.

O estudo sobre o hidrogel com nanop prata nas concentrações de 22 e 44 ppm produzidos no laboratório do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN, torna importante para melhor compreender a toxicidade, distribuição, bioacumulação e excreção da nanopartícula

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade do curativo de hidrogel com nanop prata a 22 ppm e 44 ppm em lesões cutâneas superficiais com cicatrização por segunda intenção utilizando ratos Wistar.

2.2 Objetivos Específicos

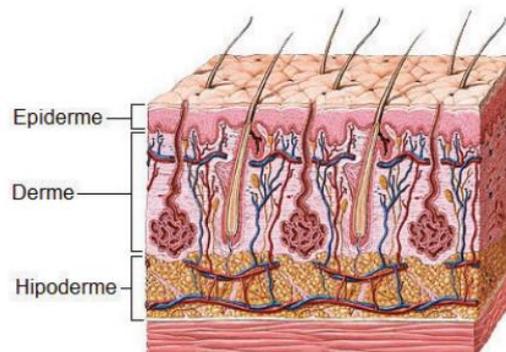
- Acompanhar as possíveis alterações clínicas provenientes do uso tópico do hidrogel com nanop prata.
- Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos das nanopartículas de prata em animais submetidos a lesões superficiais a partir da histopatologia de amostras de fígado e rins.
- Avaliar os possíveis efeitos tóxicos do uso tópico de hidrogel com nanop prata sobre as funções renal e hepática, por meio das concentrações séricas de creatinina e uréia, bem como, dosar as enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).
- Avaliar os possíveis efeitos tóxicos do uso tópico do hidrogel com nanop prata sobre os componentes sanguíneos por meio do hemograma completo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 16% do peso corpóreo total, é responsável por diversas funções no organismo, como proteção contra desidratação, atrito e invasão de microrganismos, envio de informações do ambiente externo ao sistema nervoso central (SNC), termorregulação e excreção de substâncias. A pele é composta por duas camadas: epiderme (camada superficial, não vascularizada e constituída por tecido epitelial) e derme (camada profunda, ricamente vascularizada e constituída por tecido conjuntivo) A hipoderme ou tecido subcutâneo não pertence à camada da pele e serve-lhe apenas de união com órgãos adjacentes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2018).

Figura 1: Representação da pele e suas camadas



Fonte: <https://ssl.adam.com/content.aspx?productId=125&pid=70&qid=8912&site=bestdoctors.adam.com&login=BEST4545>

A epiderme é constituída por cinco camadas (basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea). Na camada granulosa, os grânulos lamelares (que contêm discos lamelares formados por bicamadas lipídicas) são sintetizados e, posteriormente, seu material lipídico é depositado no espaço intercelular da camada córnea. Juntamente com os corneócitos (queratinócitos maduros) ali presentes, a deposição deste material contribui para a formação de uma barreira impermeável à água e contra a penetração de substâncias. Desta forma, a camada córnea atua como fator limitante para a penetração de agentes terapêuticos (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2018).

A derme é rica em terminações nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos, mas basicamente acelular. É constituída por duas camadas: **papilar**, na qual estão presentes fibrilas de colágeno (que prendem a derme à epiderme) e pequenos vasos sanguíneos que nutrem e oxigenam a epiderme, e **reticular**, a qual apresenta muitas fibras proteicas (colágeno e elastina), que juntamente com a camada papilar são responsáveis pela elasticidade da pele (CHURCH et al., 2006). Epiderme e derme são unidas por um complexo de apêndices epidérmicos (foliculos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas), cujos eixos são revestidos com células epiteliais. Os apêndices epidérmicos, embora com capacidade limitada, podem ser utilizados como vias adicionais de absorção de fármacos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2018).

A hipoderme é constituída basicamente por adipócitos (células que armazenam grandes quantidades de lipídeos) e desempenha funções de isolamento térmico, fornecimento de energia e absorção de choque (amortecimento) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2018).

3.2 Feridas

Feridas são caracterizadas como lesões ou alterações de ordem celular, sobre a superfície da pele, as quais podem estar relacionadas a diversos fatores desencadeadores, tais como danos externos ao corpo, respostas imunológicas, tumores, entre outras diversas etiologias. São usualmente classificadas em agudas ou crônicas: **agudas**: lesões que se regeneram com menos de 21 dias e as **crônicas**: demandam mais tempo no processo de cicatrização (ARCARO, 2018).

Podem ser também classificadas quanto as suas características, causas, cirúrgicas (por incisão, excisão ou punção), traumáticas (mecânico, físico ou químico) ou ulcerativas. Quanto ao conteúdo microbiano, as feridas podem ser classificadas como limpas (em condições assépticas), limpas contaminadas (tempo inferior de 6 horas entre trauma e atendimento, sem contaminação significativa), contaminadas (tempo de atendimento superior a 6 horas, sem sinal de infecção) e infectadas (presença de agente infeccioso ou intensa reação inflamatória, podendo estar presente o pus). Classifica-se ainda as feridas de acordo com o volume de exsudato (líquido com alto teor de proteínas séricas e leucócitos, produzido como reação a danos nos tecidos e vasos sanguíneos), sendo definidas como secas,

pouco exsudativas, moderadamente exsudativas e altamente exsudativas (SANTOS, 2016).

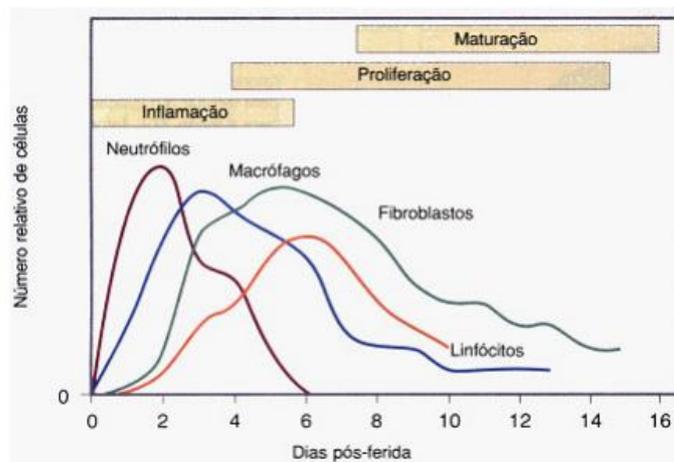
Quanto a cicatrização existe três formas distintas as quais dependem da quantidade de tecido lesionado e da presença ou não de infecção. Cientificamente podem ser classificadas como: cicatrização por primeira intenção (não há perda de tecido e as bordas da ferida ficam justapostas), cicatrização por segunda intenção (perda de tecido e bordas não justapostas, cicatrizando mais lentamente) e cicatrização por terceira intenção (corrigidas cirurgicamente, normalmente crônicas sem resposta a tratamento usual) (COELHO et al., 2010).

3.3 Processo de cicatrização de feridas

Quando a pele é lesionada, uma série de eventos celulares e moleculares é desencadeada visando à regeneração do tecido danificado e o restabelecimento da hemostasia. Os eventos que desencadeiam a cicatrização são intercedidos e sustentados por mediadores bioquímicos, descritos em diferentes fases em determinado período de tempo (LIMA et al., 2012).

A cicatrização é classificada em três fases distintas: inflamação, proliferação e maturação (remodelação). A profundidade da lesão determina a sequência dessas fases, uma vez que as feridas podem ser superficiais, parciais ou totais (IRION, 2012). A evolução do número de células sanguíneas e fibroblastos nas fases do processo de cicatrização estão representados na (Figura 2).

Figura 2: Evolução do número relativo de células sanguíneas e fibroblastos nas fases do processo de cicatrização.



Fonte: <https://www.nescon.medicina.ufmg.br/biblioteca/imagem/4491.pdf>

A fase inflamatória inicia após a ocorrência da lesão e libera substâncias vasoconstritoras como primeira resposta. No local onde o endotélio é lesado há um estímulo para que se inicie a cascata de coagulação visando a homeostasia. Quando a cascata é iniciada são liberados das plaquetas fatores de crescimento, tais como, fator de transformação beta (TGF- β), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), prostaglandinas e tromboxanas, que atraem neutrófilos para ferida (SZWED e SANTOS, 2015). A resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia. As substâncias quimiotáticas liberadas pelas plaquetas atraem neutrófilos para o local. O pico de atividade ocorre nas primeiras 24-48 horas após a lesão, seguindo um maior aporte de macrófagos nos dois a três dias seguintes. Os macrófagos também ativam os elementares celulares das fases subseqüentes da cicatrização como os fibroblastos e as células endoteliais (CAMPOS, BORGES, GROTH, 2007; TAZIMA, ANDRADE VICENTE, MORIYA, 2008).

A fase proliferativa tem início quatro dias após a lesão e estende-se até o final da segunda semana. Nesta fase ocorre a reparação do tecido conjuntivo e do epitélio. A fase proliferativa é dividida em quatro etapas: reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. A reepitelização ocorre precocemente se a membrana basal estiver intacta. As células epiteliais migram em direção superior e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias (SZWED; SANTOS, 2015).

A última fase é a de remodelagem e apresenta o colágeno como principal componente da derme. O colágeno é uma proteína encontrada na matriz extracelular, fundamental na organização do tecido e na resistência, sendo a mais abundante do tecido conectivo em fase de cicatrização. Esta fase de reparação pode durar até 6 meses, período caracterizado pela maturação das fibras colágenas, diminuição da vascularização e de densidade de células. 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 Tratamento de feridas

No tratamento de feridas crônicas diariamente são testadas diversas terapias alternativas, dentre as quais, o uso tópico de substâncias com elevada osmolaridade tem demonstrado efeitos benéficos no tratamento das lesões, evidenciando potencial cicatrizante e antimicrobiano (ARCARO, 2018).

Nos dias atuais a terapia tópica empregada em feridas gera conflito de opiniões, em especial entre profissionais da área da saúde. Fato este justificado pela terapêutica a ser implantada que deve atentar para o tipo de lesão, as características do paciente, facilidade de aplicação e remoção, conforto do paciente, manutenção da umidade adequada no leito da ferida, custo-benefício atrativo, dentre outras qualidades (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

3.5 Prata e sua propriedade antimicrobiana

A Ag tem propriedades medicinais e é usada há mais de 2000 anos devido a sua eficiência bactericida, ligando-se ao DNA e impedindo a multiplicação celular. É um metal derivado de um subproduto da mineração de chumbo e é frequentemente associado ao cobre. Possui propriedades antimicrobianas e seus compostos é a principal base de sua aplicação na área médica uma vez que, a prata tem muitos usos e tem grande potencial para o tratamento de lesões (PRESTES *et al.* 2012).

A prata pode apresentar-se em diversas formas (metálicas, não metálicas e salinas), e não está claro como essas diferenças influenciam suas propriedades antimicrobianas, num possível aumento da resistência antimicrobiana e no processo de cicatrização (VIEGAS, 2018).

O uso de prata no tratamento de feridas vem aumentando progressivamente e está presente em uma ampla gama de aplicações e pode se apresentar de duas formas: **compostos**: quando associados a um sal e produz a prata iônica (Ag^+) quando em contato com fluidos das feridas; **e elementar**: apresentam-se na forma metálica (Ag), também descrita como prata coloidal ou nanopartículas de prata (PRESTES *et al.* 2012).

A utilização da prata passou a ser intensamente estudada nos últimos anos, principalmente na forma de nanopartículas (NP). Acredita-se que esse metal

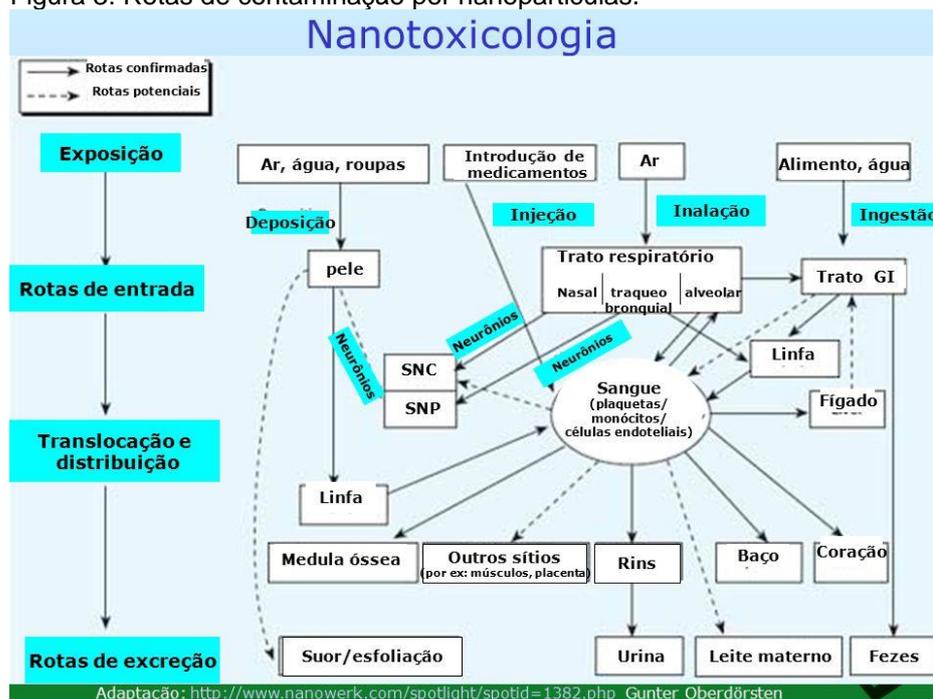
oferece menos risco de desenvolvimento da resistência pelos microrganismos (bactérias) por agir de forma complexa, ao contrário dos antibióticos que geralmente exercem seu efeito em locais específicos nas células (FERNANDES, 2010).

3.6 Nanopartículas de Prata

As NP são definidas como materiais com tamanho entre 1 e 100 nanômetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), o que confere propriedades mecânicas, ópticas, elétricas e estruturais avançadas, além de uma aumentada área de superfície em relação à substância original (BEER, et al., 2012). Devido à escala nanométrica e grande área superficial, as mesmas têm propriedades únicas comparadas com os mesmos materiais em escala maior. Isto inclui um aumento da reatividade química na superfície da NP e por isso podem provocar consequências não esperadas (e até desconhecidas) quando elas entram em contato com o tecido biológico. As NP podem facilmente penetrar na pele ou se tornar um aerossol e entrar no organismo por via respiratória (VIEGAS, 2018).

A figura 3 demonstra as possíveis rotas de contaminação pelas nanopartículas.

Figura 3: Rotas de contaminação por nanopartículas.



Fonte: <https://slideplayer.com.br/slide/4211111/>

A indústria de nanomateriais está crescendo rapidamente e com ela se faz necessário refletir sobre o impacto das nanotecnologias, e importantes consequências econômicas, sociais, ambientais e militares. São amplos os seus campos de aplicação, com grande ação na medicina, engenharia, informática, física, química, biologia, entre outras (HOUGAARD et al., 2015).

As nanopartículas de prata (NPAg) estão entre os nanomateriais mais estudados atualmente. São as nanopartículas mais utilizadas do ponto de vista industrial e comercial devido a sua estabilidade química, maleabilidade, flexibilidade, elevada condutividade elétrica e térmica, atividade catalítica, baixo custo de produção e principalmente por possuir potente ação antimicrobiana frente a bactérias, vírus, fungos e protozoários. São amplamente utilizadas em várias aplicações como agentes antibacterianos, antifúngicos, antivirais, anti-inflamatórios, antitumorais, regeneradores, biosensores e catalisadores (DURAN et al., 2019).

A prata sempre foi usada na forma de prata metálica, nitrato de prata, sulfadiazina de prata para o tratamento de feridas, queimaduras e várias infecções bacterianas. A prata metálica em forma das nanopartículas, se mostra como um potente agente antimicrobiano, uma vez que, bactérias patogênicas desenvolveram resistência contra vários antibióticos (VIRGENS, 2017).

O mecanismo de ação da atividade antimicrobiana pelas NPAg é amplamente reconhecido como resultado da oxidação parcial das NPAg e liberação de íons de prata (Ag^+). Por sua vez, os Ag^+ podem interagir com o peptidoglicano da parede celular e membrana plasmática, causando lise celular; com o DNA bacteriano (citoplasmático), impedindo a replicação do DNA; e com proteínas bacterianas, interrompendo a síntese proteica. As NPAg também podem danificar as bactérias diretamente por penetração na parede celular e membrana celular. Como agentes antimicrobianos têm aplicação na prevenção de infecções, em curativos para queimaduras e feridas traumáticas, revestimento de cateteres e anticáries (VIEGAS, 2018).

As NPAg são únicas, em função da sua rota de preparação, tamanho, estado de agregação, estabilidade em meio biológico, natureza química do revestimento e carga superficial. O controle nos parâmetros de síntese de NPAg é necessário para garantir a reprodutibilidade de sua produção (DURAN et al., 2019).

As mesmas características que tornam as NPAg atraentes, também as fazem apresentar um grande potencial causador de riscos à saúde humana e a outros seres vivos, resultando em impacto negativo tanto para o ambiente quanto à saúde pública (LEE, et al., 2007).

Os principais órgãos alvo para a deposição de NPAg após a disponibilidade sistêmica, são o fígado, baço e rim, sendo sua a distribuição menor para outros órgãos. Além disso, já foram encontrados níveis elevados de prata também nos testículos (EUROPEAN COMMISSION, 2014).

Quanto a cicatrização de feridas as NPAg podem estar implicadas nas alterações ou supressão de eventos inflamatórios nas fases iniciais da cicatrização. Podem promover a proliferação de queratinócitos no processo de reepitelização e também conduzir a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos para a diminuição da ferida. Estudos referem que a função mecânica da pele tratada com NPAg possui melhores propriedades elásticas e deposição de colágeno (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

As nanopartículas possuem excelentes propriedades físicas e químicas, porém não apresentam propriedades de superfície adequadas para certas aplicações. Para evitar a agregação e a aglomeração destas NPs, são utilizados agentes estabilizadores, dos quais se destacam os polímeros.

Os polímeros são agentes estabilizadores que protegem as NPs da precipitação e desempenham um papel crítico no tamanho, distribuição, morfologia e biocompatibilidade das mesmas. A PVP é considerada uma excelente estabilizadora polimérica para as NPAg. Outros polímeros também são eficazes como moléculas estabilizadoras de NPAg que incluem os poliacrilatos, polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico, poliacrilonitrilo, poliacrilamida, carbono em espuma e albumina sérica bovina (BSA) (SOARES, 2014).

3.7 Hidrogel

Os hidrogéis são redes tridimensionais constituídas por cadeias poliméricas capazes de absorver grandes quantidades de água e fluidos biológicos sem se dissolver. É considerado um biomaterial com elevado teor de água, o que contribui para sua biocompatibilidade, baixa tensão interfacial possibilitando baixa tendência à adesão celular e adsorção de proteínas dos fluidos corpóreos e possui

propriedades físicas similares as do tecido humano, de consistência macia e elástica, minimizando a irritação mecânica por atrito (ALCANTRA et al., 2013).

Os hidrogéis podem ser preparados por processos químicos ou físicos que envolvem reticulação por radiação ou agentes químicos. O uso da radiação possibilita a reticulação e esterilização simultânea, permitindo a síntese de um produto não contaminado com resíduos tóxicos além de sua produção ser por um processo mais simplificado (ALCANTARA et al., 2013; BENAMER et al., 2006; PEPPAS, 2000). Vale ressaltar que a radiação pode alterar algumas substâncias biologicamente ativas se estas forem imobilizadas no hidrogel antes de ser reticulado (HENNINK, et al., 2008).

Existem muitas pesquisas e trabalhos nacionais e internacionais que fundamentam a eficácia do hidrogel e da prata como cicatrizantes de feridas, porém separadamente (ARAÚJO, 2017).

3.8 Toxicidade das nanopartículas de prata

A prata na forma de nanopartículas podem ser mais reativas em decorrência do seu aumento de propriedades catalíticas e tornar-se mais tóxicas do que seu equivalente em outra forma química. Presume-se que a toxicidade depende do tamanho e da forma, partículas de tamanho reduzido (10nm) podem passar através da membrana celular, e o acúmulo intracelular de nanopartículas pode levar a deficiência no funcionamento da célula (FERNANDES, 2010).

Ainda não se tem um consenso sobre a citotoxicidade de NP_{Ag}, a maioria dos estudos se referem uma viabilidade celular reduzida e aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (SAMBERG, et al., 2012).

A toxicidade de nanopartículas depende em grande parte das suas propriedades físico-químicas, que incluem tamanho, forma, composição, características da superfície, carga e taxa de dissolução (VIEGAS, 2018). NP menores apresentam uma tendência a maior habilidade de penetração celular e conseqüentemente, mais toxicidade em função da maior área superficial, promovendo uma superior área de contato e interação entre a nanopartículas e a entidade biológica (DURAN et al., 2019).

As NP_{Ag} podem liberar íons Ag^+ , quando são expostas a água e oxigênio, situação encontrada no meio biológico. A toxicidade das NP_{Ag} está relacionada

com a sua área superficial, uma maior área superficial pode promover uma maior liberação de íons Ag^+ , os quais estão relacionados à toxicidade e ação antimicrobiana dessas nanopartículas (FERNANDES, 2010).

Em estudos sobre a toxicidade em animais foram observados aumento de marcadores de várias enzimas hepáticas, indicando hepatotoxicidade após administração de NPAg, porém essa toxicidade não foi confirmada pela histopatologia. Outros estudos referiram que após exposição oral a NPAg não resultou em alterações de respostas imunes não específicas. No entanto, para exposição intravenosa, demonstrou-se que o sistema imunológico é o alvo mais sensível para a toxicidade de NPAg (SANTOS, 2014).

O fígado é um alvo da exposição à NPAg conduzindo a alterações na função das mitocôndrias hepáticas. Desta forma, a toxicidade mitocondrial pode desempenhar um papel crucial na ação resultante da exposição à nanopartículas de prata (FONG e WOOD, 2006).

Após a inalação de NPAg de aproximadamente 20 nm de diâmetro em ratos por um período de 90 dias os resultados revelaram que a exposição crônica a esse metal resultou em deposição de prata no trato respiratório, resposta inflamatória nos pulmões e redução da capacidade pulmonar (SUNG et al., 2008). Outro estudo com experimento similar utilizou concentrações iguais ou menores ao estudo previamente mencionado e foi observado presença de NPAg no fígado, bulbo olfatório e cérebro, porém em baixa concentração no sangue e não foi observado nenhum efeito que levasse danos (DURAN et al, 2019).

No estudo de KIM et al. (2008), ao expor ratos às NPAg por via oral os resultados mostraram que ocorreram alterações na atividade da enzima fosfatase alcalina, nos níveis de colesterol e presença de danos hepáticos leves.

Em Pourhamzeh, *et al.* (2015), após a ingestão via oral das AgNPs em ratos nas concentrações de 30, 125, 300, e 700 mg kg durante 28 dias, observou-se que os parâmetros de AST e ALT não apresentaram alterações, sugerindo que nessas concentrações não causaram nenhuma disfunção significativa nas células do fígado dos animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo pré-clínico que busca avaliar a toxicidade da nano partícula de prata utilizando curativos de hidrogel e hidrogel com nanop prata em concentrações de 22 e 44 ppm no tratamento de feridas de lesões superficiais.

Os curativos foram produzidos no Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN sob coordenação do professor Dr. Ademar Benévolo Lugão. Sua preparação foi constituída 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 radiação ionizante sem uso de catalisadores ou outros reagentes. Nos curativos compostos de prata foi acrescido prata iônica (Ag⁺) nas concentrações de 22 ppm e 44 ppm, sendo que após processamento transformam-se em nanop prata. A reticulação, síntese das NPAg e esterilização simultânea foi por meio da irradiação com raios gama proveniente de uma fonte de ⁶⁰Co com uma dose de 25kGy.

4.1 Delineamento Experimental

Foram utilizados 84 ratos da linhagem Wistar, machos, adultos jovens com idade média de 90 dias, pesando entre 335g a 525g, fornecidos pelo Biotério IPEN – CNEN/SP. Os animais envolvidos no estudo foram recebidos 30 dias antes do início dos experimentos para aclimação e mantidos no Biotério da Faculdade Presidente Antônio Carlos – FAPAC ITPAC Porto Nacional. Ao chegarem todos foram pesados para acompanhamento do ganho de peso e recuperação do estresse do transporte e logo após foram alocados em duas salas com temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade (50-70%), em gaiolas individuais suspensas, cama de maravalha estéril, cilindros de papelão para minimizar o estresse, ração estéril comercial (Nuvilab CR-1) e água *ad libitum* em ambiente com ciclo de 12 horas claro/escuro durante todo período do experimento. Os animais foram monitorados quanto à ingestão hídrica (10 a 20 ml/dia) e alimentação (10 a 20 g/dia) e foram pesados a cada 03 dias para acompanhamento da variação do peso.

Todos os procedimentos estavam de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pelo Comitê de Ética em

Pesquisa com animais da FAPAC ITPAC Porto Nacional sob o número de processo 005/2017 (Anexo 1).

4.2 Padronização dos grupos

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, de acordo com o tratamento recebido após a indução cirúrgica da ferida no dorso, e cada um constituído de quatro animais com um número total de 72 ratos:

H- Grupo controle: 24 animais cujas lesões foram tratadas com o hidrogel e acompanhadas durante o tempo de 24 horas, 3, 7, 14, 21 e 30 dias (n = 4 ratos por tempo de tratamento).

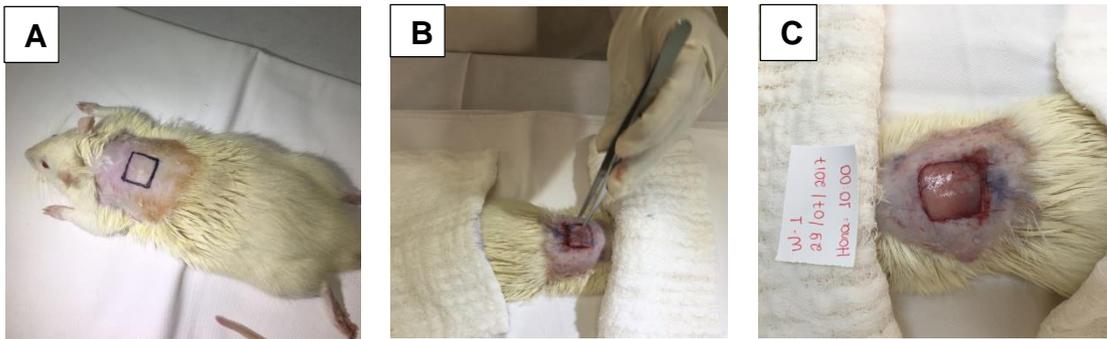
HP22: 24 animais cujas lesões foram tratadas com hidrogel contendo nanopartículas de prata a 22 ppm e acompanhadas durante o tempo de 24 horas, 3, 7, 14, 21 e 30 dias (n = 4 ratos por tempo de tratamento).

HP44: 24 animais cujas lesões foram tratadas com hidrogel contendo nanopartículas de prata a 44 ppm e acompanhadas durante o tempo de 24 horas, 3, 7, 14, 21 e 30 dias (n = 4 ratos por tempo de tratamento).

4.3 Procedimento cirúrgico

Nos dias do procedimento cirúrgico para geração da lesão os animais foram pesados para ajuste das doses da medicação, em seguida pré-medicados analgesicamente com acepromazina na dose de 2,5 mg/kg de peso vivo, anestesiados com 1,5 mg/kg de xilazina 2% e 50 mg/kg de cetamina intraperitoneal. Posteriormente os animais foram tricotomizados na região do dorso, posicionados na mesa operatória em decúbito ventral, realizada a demarcação na pele e após antissepsia com clorexidina foi produzida uma lesão cutânea retangular com retirada de tecido da área de (2cm x 2cm), de profundidade superficial para acompanhamento posterior da cicatrização por segunda intenção (Figura 4).

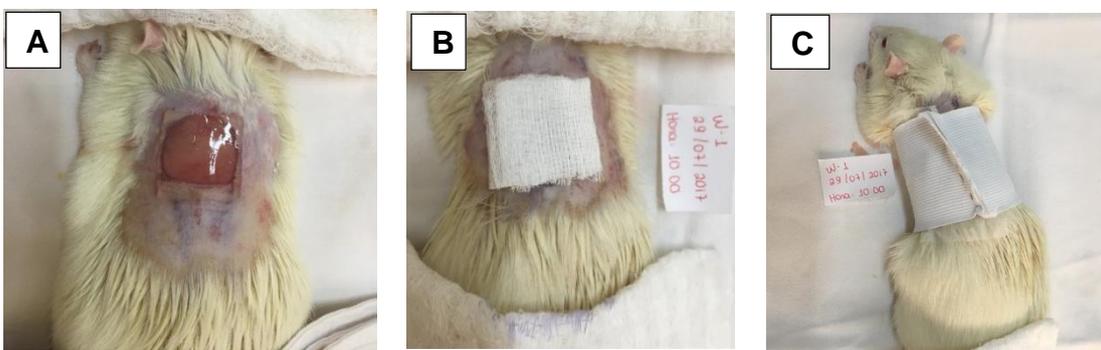
Figura 4: Etapas do procedimento cirúrgico



(A) Animal tricotomizado sobre efeito anestésico em posição ventral com demarcação da área. **(B)** Realização da lesão cirúrgica com uso de bisturi. **(C)** Animal após a lesão cirúrgica superficial.
Fonte: O autor, Agosto 2017

Cada ferida foi tratada imediatamente após o procedimento cirúrgico conforme o tipo de tratamento. Os curativos de hidrogel e hidrogel com nanop prata foram umidificados com água destilada, cobertos por uma gaze estéril e fixados no animal com auxílio de um esparadrapo do tipo micropore e em seguida protegidos por uma malha elástica para garantir que o animal não removesse o curativo (Figura 5).

Figura 5: Curativo oclusivo após receberem os tratamentos



(A) Ferida que recebeu o hidrogel. **(B)** Cobertura com gaze estéril. **(C)** Fixação com esparadrapo e malha de elástico.
Fonte: O autor, agosto 2017

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram colocados em gaiolas individualizadas, com identificação numérica e grupo experimental. O isolamento dos animais é necessário para que no decorrer da experimentação não haja a retirada dos curativos pelos outros animais do grupo. Para o alívio da dor provocada administrado dipirona 50-600 mg/ kg subcutâneo 12/12 horas quando necessário.

4.4 Pós operatório

Os animais foram observados após o procedimento cirúrgico por 2 horas a fim de serem acompanhados na recuperação e restabelecimento da rotina. Alguns animais antes do procedimento cirúrgico tiveram que receber dosagem extra de anestésico e 14 animais evoluíram a óbito devido superdose do anestésico, totalizando 69 ratos. A tabela 01 representa a distribuição final dos grupos e quantitativo de animais.

Tabela 01: Distribuição dos animais por grupo e quantitativo final dos animais no experimento

Tempo de exposição ao curativo	H	HP22	HP44
	Nº de animais	Nº de animais	Nº de animais
24 h	4	4	4
3 dias	4	4	3
7 dias	4	3	3
14 dias	4	4	4
21 dias	4	4	4
30 dias	4	4	4
Total do Grupo	24	23	22

Fonte: O autor

4.5 Acompanhamento clínico

Durante os 30 dias de experimento foi realizado o acompanhamento clínico dos animais por meio da verificação da aparência da pelagem (erizada, emaranhada, opaca), coloração azulada na pele (argiria), 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 ou diminuição dos movimentos, automutilação, 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.

4.6 Tratamento das lesões e coleta das amostras

O tratamento das lesões foi realizado no animal sem sedação, somente com contenção manual. As trocas dos curativos ocorreram a cada três dias, uma

vez ao dia e aplicado na área lesionada. A evolução das lesões foi fotografada separadamente pela câmara digital Nikon modelo d3200. Na realização das imagens a câmera foi fixada numa base de metal com 15 cm de distância da lesão a fim de manter padronização.

Com relação ao curativo, observou-se que o mesmo manteve o meio úmido no seio da ferida, promovendo interação com o fluido da lesão e era de fácil remoção. No entanto a margem livre do curativo que ficava em contato com a pele integra do animal ressecava, perdendo água para o meio externo. Observou-se ainda que quando a cobertura se deslocava do centro da lesão a cobertura secundária de gaze aderida na ferida e na retirada acabava provocando sangramento do tecido, mesmo com intensa hidratação da área aderida.

Nos tempos determinados de avaliação dos grupos, os animais foram eutanasiados por um profissional habilitado em manipulação animal e técnica operatória por método químico com dose excessiva de anestésico, 90mg/kg de Tiopental intra-peritoneal, utilizando previamente botão anestésico de lidocaína 2%. A coleta de amostra sanguínea foi realizada através da punção da aorta abdominal e cardíaca com auxílio de seringa de 5 ml e agulha 28x7. O fígado e os rins foram extraídos cirurgicamente, em seguida foram pesados em uma balança de precisão e posteriormente imersos em solução formalina tamponada a 10% para fixação. A carcaça dos animais foi descartada conforme plano de gerenciamento de resíduos da FAPAC ITPAC Porto Nacional.

4.7 Avaliação clínica bioquímica e hematológica

Parte do sangue coletado foi acondicionado em tubos contendo heparina, centrifugados (Centribio® TDL80-2B) a 2500 rpm por 10 minutos, resultando na separação entre plasma e elementos figurados. O plasma obtido foi cuidadosamente retirado armazenado em frasco de eppendorf e congelado em freezer (-20°C).

O objetivo foi determinar os parâmetros bioquímicos de avaliação da função hepática por meio de análises de ALT/TGP (Alanina Aminotransferase) e AST/TGO (Aspartato Aminotransferase), e a avaliação da função renal por meio dos testes de Creatinina e Uréia. Para as análises foram utilizados kits Labtest® específicos para

cada parâmetro seguindo as instruções determinadas pelo fabricante, em um analisador semi-automático Bioplus® BIO-2000.

Outra parte do sangue coletado foi colocada em tubos contendo EDTA para determinação dos parâmetros hematológicos (hemácias, leucócitos, plaquetas, hemoglobina e hematócrito). A contagem diferencial de leucócitos (eosinófilos, basófilos, segmentados, linfócitos e monócitos) foi pela técnica de contagem do esfregaço e coradas com o May-Grunwald-Giemsa.

4.8 Avaliação histológica

Após 24 horas de fixação das amostras do fígado e rins com solução formalina tamponada a 10% as amostras foram acondicionadas em cassetes histológicos e conservadas em álcool 70%. Posteriormente foram desidratados com álcool, diafanizados com xilol e por fim a impregnação e blocagem com parafina. Após, as peças blocadas em parafina foram enviadas para o Setor de Técnicas Histológicas do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) – USP, sob supervisão técnica de Gisela Ramos Terçarioli, para preparo das lâminas histológicas. Os blocos foram seccionados em cortes histológicos na espessura de 5,0 µm e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE). Para avaliação microscópica as lâminas coradas foram encaminhadas ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP para escaneamento e digitalização. 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).

No estudo histopatológico do fígado foram avaliados os indicadores para regeneração tecidual e da mitocôndria das células, presença de infiltrado inflamatório, fibrose e necrose e de celularidade: neutrófilos, macrófagos e linfócitos.

No estudo histopatológico dos rins foram feitas fotomicrografias de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina utilizando a lente objetiva de 40x na região cortical do rim, onde estão contidos os corpúsculos renais bem como os túbulos contorcidos e coletores, artérias e veias. As imagens foram obtidas através de um microscópio de luz da marca Olympus - modelo CHS e de um escâner de lâminas

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). Para cada animal, foram fotografados 4 campos histológicos oriundos de diferentes profundidades do órgão, contendo um ou dois corpúsculos renais na região central. Todo campo histológico foi analisado qualitativamente com relação aos seguintes parâmetros:

- presença/ausência de infiltrado inflamatório no tecido intersticial próximo ao glomérulo.
- alteração segmentar do glomérulo, causada pela deposição de material hialino na região ocupada pelas células mesangiais.
- alterações tubulares adjacentes aos glomérulos (hipertrofia/atrofia, dilatação tubular, deposição de material na luz tubular).

Estudos histológicos quantitativos também foram realizados, sendo eles a medição da área do corpúsculo renal e a do espaço da cápsula de Bowman. Dados provenientes desse estudo foram tabulados e passaram por uma análise estatística.

4.9 Análise de dados

Os resultados dos testes para determinar os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram utilizados a partir de uma tabela contendo todas as informações numéricas e em seguida usou-se o programa Past v 3.22 (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo) para fazer as análises.

Na análise estatística das laminas histológicas do fígado foram obtidas três fotomicrografias por amostra e na análise estatística dos rins foram feitas por meio de fotomicrografias de pelo menos quatro corpúsculos renais por amostra, sendo que em ambos se utilizou a lente objetiva de 40x num microscópio de luz da marca Olympus modelo CHS e num escâner de lâminas (Pannoramica Scan 250).

As imagens do fígado foram feitas centralizando a veia central dos lóbulos hepáticos e realizado a contagem de hepatócitos que apresentavam dois ou mais núcleos.

As imagens dos rins foram feitas sempre centralizando os corpúsculos renais presentes na região cortical do rim, os quais foram escolhidos de maneira randômica e em diferentes fragmentos do tecido. Nesse estudo foram analisados a

área do espaço da capsula de Bowman e a área do corpúsculo renal. A área do espaço capsular (localizada entre os dois folhetos da cápsula de Bowman) foi medida utilizando as ferramentas “*threshold*” e “*wand tool*” do software ImageJ 1.50i (Figura 1). E a área do corpúsculo renal foi medida utilizando a ferramenta “*freehand selections*” do software ImageJ 1.50i.

Todos os dados foram tabulados e analisados pelo software GraphPad Prism version 8.0.1. 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. Foi considerado como nível de significância valor de $p < 0,05$.

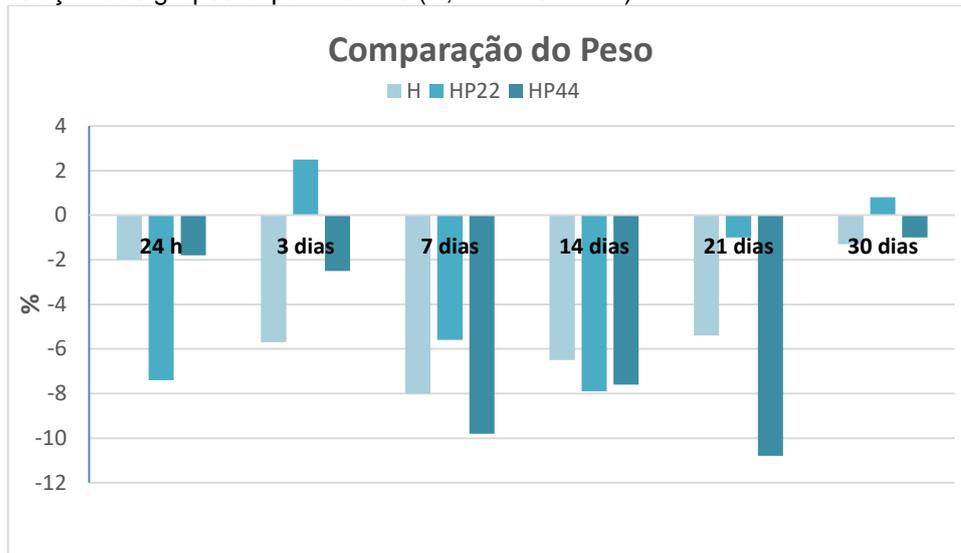
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da toxicidade dos curativos de hidrogel com NPAg nas concentrações de 22 e 44 ppm foi feita por meio da análise dos componentes sanguíneos pelo hemograma, quantificação bioquímica das concentrações séricas de creatinina e uréia, das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) buscando conhecer a nefro e hepatotoxicidade bem como, pela análise histológica de amostras de fígado e rim dos animais sacrificados. Todos os dados estão apresentados em tabelas, gráficos e fotomicrografias dos órgãos com seus respectivos valores médios considerando $p < 0,05$.

5.1 Análise do acompanhamento clínico dos animais durante o uso do curativo de Hidrogel e Hidrogel com Nano Partículas de Prata

Pelos resultados obtidos verificou-se que durante o acompanhamento clínico nos 30 dias de experimento os animais não apresentaram alterações em relação aos critérios avaliados (aparência, coloração da pele, postura, lacrimejamento, reflexo de piscar, ausência de automutilação e/ou vocalização, diminuição do consumo hídrico, dificuldade de respirar e alterações na área da ferida). As análises estatísticas indicaram que não houve diferenças significativas de variação do peso entre os animais nos diferentes grupos experimentais (H, HP22 e HP44) em todos os tempos de tratamento. No entanto, os animais que foram eutanasiados com 21 dias mostraram diferença estatísticas significativas entres os grupos HP22 ($p=0,01157$) e HP44 ($p=0,009166$) (Figura 6).

Figura 6 – Gráfico comparativo do peso avaliado durante os diferentes tempos de tratamento em relação aos grupos experimentais (H, HP22 e HP44).



Fonte: O autor

Observou-se que a maioria dos animais teve perda de peso após o procedimento cirúrgico e acredita-se que possa ter ocorrido pela situação do estresse cirúrgico ao qual o animal foi submetido, pelo curativo oclusivo com malha elástica ou pelas práticas diárias do manejo com o animal. Observou-se ainda que os animais com 30 dias de tratamento mostraram menores médias de perda de peso, provavelmente porque tiveram mais tempo em vida para se recuperar. Estudos como de Rivera (2002), tem demonstrado que alguns animais expostos ao estresse, podem apresentar alteração do apetite (consumo de água e alimento) e perda de peso.

No acompanhamento das feridas ao longo dos trinta dias de experimento, as lesões mantiveram-se livres da formação de fibrina e necrose indicando que o curativo não foi tóxico para evolução da ferida.

5.2 Análise do hemograma

Na tabela 2, é apresentado os resultados obtidos das amostras dos componentes sanguíneos do hemograma (hemácias, hematócrito, hemoglobina, leucócitos, segmentados, eosinófilos, linfócitos e monócitos) após a exposição dos animais aos tratamentos com os curativos de hidrogel sem a NPAG (grupo controle H) e hidrogel com NPAG nas concentrações de 22 e 44 ppm (HP22 e HP44), baseado nos tempos de tratamento e eutanásia (24 horas, 3, 7, 14, 21 e 30 dias).

Com 17 dias de tratamento as lesões estavam cicatrizadas por completo e foi suspenso o uso das coberturas. Manteve-se a análise de 21 e 30 dias com intuito de evidenciar um possível efeito tardio de toxicidade das NPAg nos animais.

Tabela 2: Comparação dos parâmetros hematológicos por meio do hemograma dos animais em diferentes tempos de eutanásia e tratamento em relação aos grupos experimentais (H), (HP22), (HP44)

GRUPO EXPERIMENTAL - CONTROLE (H)								
Tempo de eutanásia e tratamento	HM (x10 ⁶ /mm ³)	HT (%)	Hb (g/dL)	Leuc. (mm ³)	Seg. (%)	Eosi. (%)	Linf. (%)	Mono (%)
24 h	5,2 ^a	44,8 ^a	14,3 ^a	5,7 ^a	41,5 ^a	1,3 ^a	54,5 ^a	3,3 ^a
03 dias	5,1 ^a	45,3 ^a	14,5 ^a	4,8 ^a	26,0 ^a	4,8 ^b	63,3 ^b	6,0 ^b
07 dias	5,4 ^a	44,0 ^a	14,3 ^a	5,7 ^a	37,5 ^a	2,3 ^a	56,3 ^a	3,3 ^a
14 dias	5,4 ^a	44,8 ^a	14,2 ^a	5,1 ^a	33,0 ^a	2,8 ^a	59,5 ^a	4,8 ^a
21 dias	4,6 ^b	40,5 ^a	13,1 ^b	4,1 ^a	26,5 ^b	3,0 ^a	67,8 ^b	2,8 ^a
30 dias	5,1 ^a	44,0 ^a	14,4 ^a	4,6 ^a	30,3 ^a	1,8 ^a	64,8 ^b	3,3 ^a
GRUPO EXPERIMENTAL - 22 ppm (HP22)								
Tempo de eutanásia e tratamento	HM (x10 ⁶ /mm ³)	HT (%)	Hb (g/dL)	Leuc. (mm ³)	Seg. (%)	Eosi. (%)	Linf. (%)	Mono (%)
24 h	5,2 ^a	45,3 ^a	14,5 ^a	5,5 ^a	43,5 ^a	1,3 ^a	53,0 ^a	2,3 ^b
03 dias	5,0 ^a	43,0 ^a	13,8 ^a	4,6 ^a	33,5 ^b	3,5 ^b	57,5 ^a	5,0 ^a
07 dias	5,1 ^a	43,7 ^a	14,0 ^a	5,6 ^a	42,0 ^{ab}	2,3 ^a	51,0 ^b	4,7 ^b
14 dias	5,0 ^a	43,8 ^a	13,7 ^a	4,8 ^a	31,3 ^{ab}	1,3 ^{ab}	62,3 ^b	5,3 ^{ab}
21 dias	4,8 ^b	42,3 ^{ab}	13,5 ^{ab}	4,2 ^a	31,8 ^a	3,3 ^a	61,5 ^b	3,5 ^b
30 dias	5,0 ^a	44,0 ^a	14,0 ^a	5,0 ^a	29,8 ^a	3,5 ^b	62,3 ^b	4,5 ^b
GRUPO EXPERIMENTAL - 44 ppm (HP44)								
Tempo de eutanásia e tratamento	HM (x10 ⁶ /mm ³)	HT (%)	Hb (g/dL)	Leuc. (mm ³)	Seg. (%)	Eosi. (%)	Linf. (%)	Mono (%)
24 h	5,0 ^a	43,8 ^a	14,0 ^a	4,8 ^b	36,0 ^b	1,3 ^a	56,5 ^a	4,8 ^c
03 dias	5,0 ^a	43,0 ^a	13,8 ^a	4,3 ^a	25,6 ^b	3,6 ^b	64,0 ^b	6,6 ^b
07 dias	5,0 ^a	44,3 ^a	14,3 ^a	5,2 ^a	37,3 ^b	2,0 ^a	56,3 ^{ab}	4,3 ^{cb}
14 dias	5,0 ^a	43,5 ^a	13,8 ^a	5,0 ^a	31,3 ^a	2,0 ^b	62,5 ^b	4,3 ^{ca}
21 dias	4,9 ^a	44,0 ^{ab}	14,0 ^{ab}	4,9 ^{ab}	33,0 ^{ab}	2,8 ^{ab}	60,3 ^b	4,0 ^{cb}
30 dias	4,7 ^b	42,0 ^{ab}	13,4 ^a	5,1 ^a	30,3 ^a	2,5 ^b	62,5 ^b	4,8 ^{cb}

HM: hemácias HT: hematócrito Hb: hemoglobina Leuc.: leucócitos Seg.: segmentados
Eosi.: eosinófilos Linf.: linfócitos Mono.: monócitos

OBS: Letras diferentes nas colunas (a, b, ab, c e cb) indicam diferença em números absolutos.

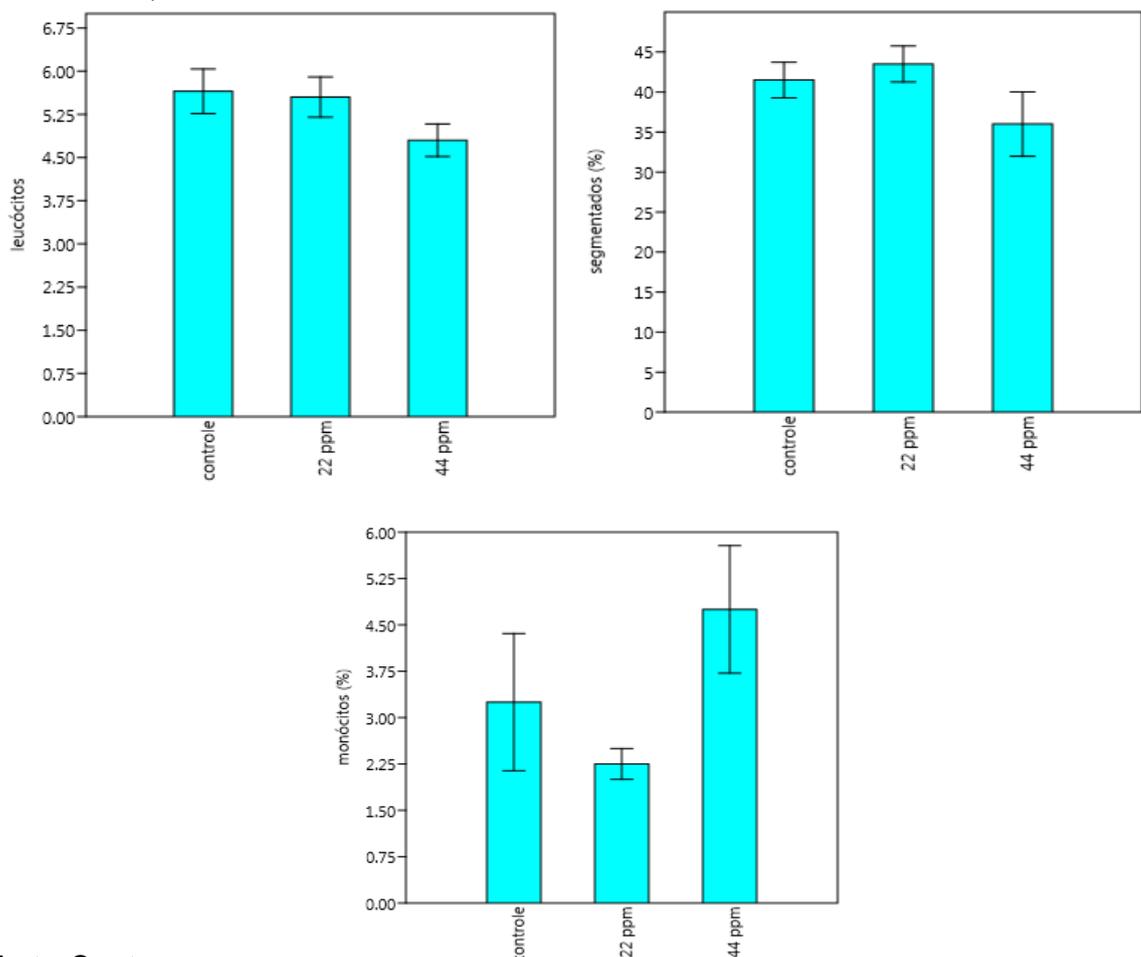
Fonte: Autor

Para cada parâmetro hematológico avaliado, os três grupos se comportaram de maneira muito parecida, exibindo, valores de média e mediana que pela análise de variância (ANOVA) demonstraram não serem diferentes estatisticamente ($P > 0,05$) – salvo poucas exceções. Todos os dados mostraram-se como paramétricos e foram, portanto, analisados pela metodologia *one Way ANOVA*.

Na análise dos parâmetros hematológicos do hemograma os valores de média identificados em cada um dos componentes sanguíneos não mostraram alterações em semelhança aos dados do estudo de Melo et al. (2012) e Lima et al. (2014) que em seus experimentos utilizaram animais com características parecidas a este estudo.

Os resultados apontaram que nas primeiras 24 horas após início dos tratamentos quando comparado os três grupos não revelaram diferenças estatísticas significantes, sendo muito semelhantes (em termos de média, mediana e desvio padrão). Destaca-se o grupo (HP44) que mostrou valores menores do que os grupos (H e HP22) nos leucócitos ($p=0,2136$) e segmentados ($p=0,2315$). No entanto, os valores dos monócitos do grupo (HP44) demonstraram ser maiores que os demais grupos ($p=0,1888$), pela análise de variância (ANOVA) e estatisticamente diferentes. (Figura 7).

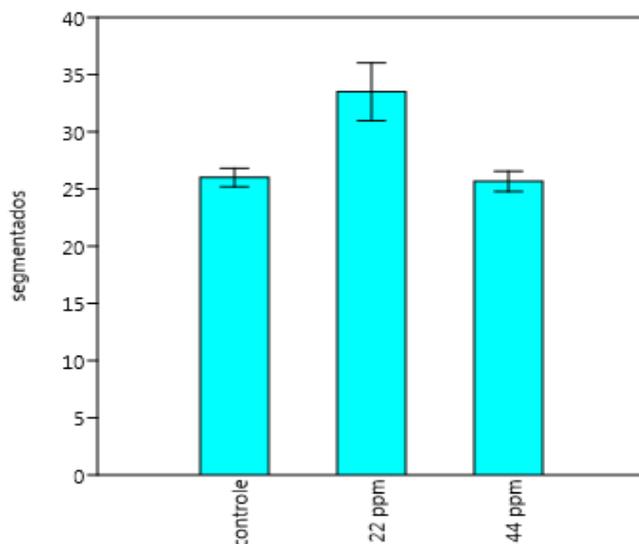
Figura 7 - Gráfico de comparação de médias dos parâmetros hematológicos (leucócitos, segmentados e monócitos) no grupo de exposição de 24 horas em relação aos tratamentos (H, HP22 e HP44).



Fonte: O autor

Nos três dias de tratamento notou-se que todos os grupos apresentaram aspectos estatísticos bastante semelhantes entre si (média, mediana, máxima e mínima), além de a maioria não expressarem diferenças estatísticas significativas. Entre os parâmetros analisados do hemograma destacam-se os neutrófilos segmentados do grupo (HP22) que apresentaram valores maiores em relação aos demais grupos, sendo essa uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,01996$) (Figura 8). Os neutrófilos são as células mais abundantes da série branca no sangue e são responsáveis pela defesa do organismo, acredita-se que este resultado seja em resposta da reação inflamatória da lesão. Segundo Medeiros e Dantas Filho (2016), os neutrófilos são estimulados por prostaglandinas, interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) no qual podem aumentar a resposta inflamatória no período de 24 a 48 horas após a ocorrência da lesão. O papel secundário dos neutrófilos é manter a fase inicial do processo inflamatório através da excreção de citocinas e estimular macrófagos, queratinócitos, fibroblastos, fatores de crescimento necessários na angiogênese e síntese de colágeno.

Figura 8- Gráfico de comparação de médias do parâmetro hematológico dos neutrófilos segmentados no grupo de exposição de três dias em relação aos tratamentos (H, HP22 e HP44).

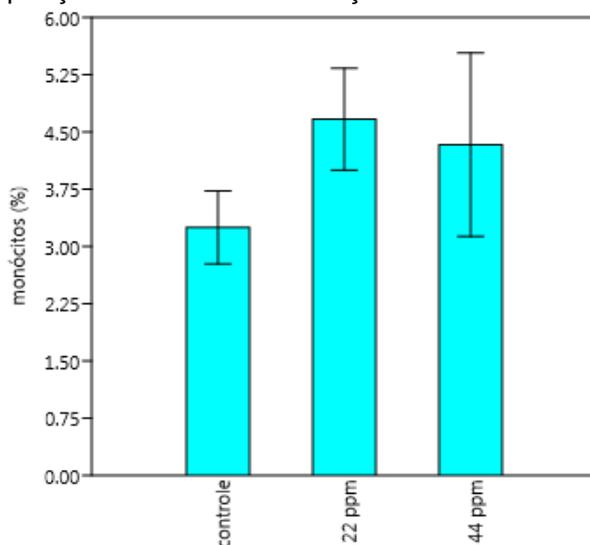


Fonte: O autor

No tempo de sete dias os animais nos diferentes grupos de tratamento apresentaram comportamento semelhante de acordo com o hemograma, havendo poucas variações nos valores absolutos e nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada. Destacam-se os monócitos do grupo (H) por ser menor

em relação aos demais grupos ($p=0,4237$). (Figura 9). Os monócitos atuam no sistema imunológico e tem a função de defender o organismo contra corpos estranhos e são essenciais no processo de cicatrização de feridas. Os monócitos auxiliam os neutrófilos na eliminação de microrganismos pela fagocitose e liberam mediadores químicos que ativam a produção de fibroblastos para produção do colágeno (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005).

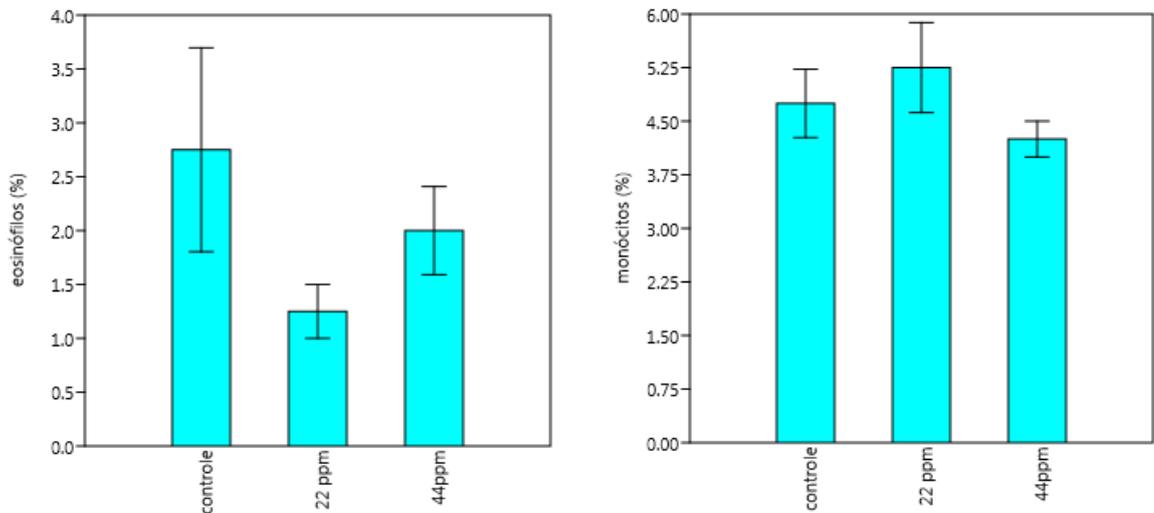
Figura 9: Gráfico de comparação de médias do parâmetro hematológico dos monócitos no grupo de exposição de sete dias em relação aos tratamentos (H, HP22 e HP44).



Fonte: O autor

A análise do hemograma dos animais dos três grupos após 14 dias de tratamento não revelou nenhuma diferença estatística significativa em nenhum dos parâmetros hematológicos analisados, porém foi observado que no eosinófilo o grupo (HP22) apresentou médias menores do que os demais grupos não sendo essa uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,274$). Observou-se também que os monócitos do grupo (HP22) teve médias maiores do que os outros grupos ($p=0,3765$). (Figura 10).

Figura 10 - Gráfico de comparação de médias dos parâmetros hematológicos (eosinófilos e monócitos) no grupo de exposição de 14 dias em relação aos tratamentos (H, HP22 e HP44).



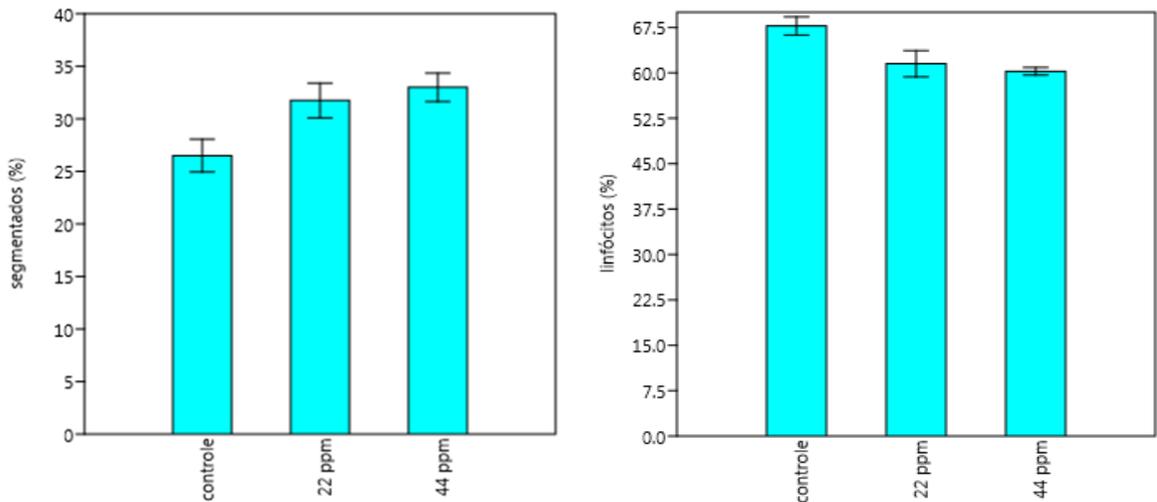
Fonte: O autor

Após o tratamento de 21 dias os animais dos diferentes grupos comportaram-se de maneira semelhante, sem alguma diferença significativa entre seus valores, nos seguintes parâmetros: hemácias, hematócrito, hemoglobina, leucócitos, eosinófilos e monócitos.

Com relação à análise de neutrófilos segmentados verificou-se que o grupo (HP44) apresentou valores maiores que os do grupo controle demonstrando diferenças estatísticas ($p=0,0354$). O resultado dos linfócitos mostrou que o grupo (H) possui valores maiores do que ambos os grupos tratados ($p=0,01743$) (Figura 11).

Os linfócitos são vistos como uma das principais células de defesa do organismo e contribuem para a cicatrização. Segundo Medeiros e Dantas Filho (2016), após 14 dias os linfócitos estão predominantes na ferida e são considerados importantes nas fases inflamatória e proliferativa da lesão, pois fornecem imunidade celular e atuam como mediadores dentro do ambiente da ferida através da secreção de linfocinas.

Figura 11 – Gráfico de comparação de médias dos parâmetros hematológicos (segmentados e linfócitos) no grupo de exposição de 21 dias em relação aos tratamentos (H, HP22 e HP44).

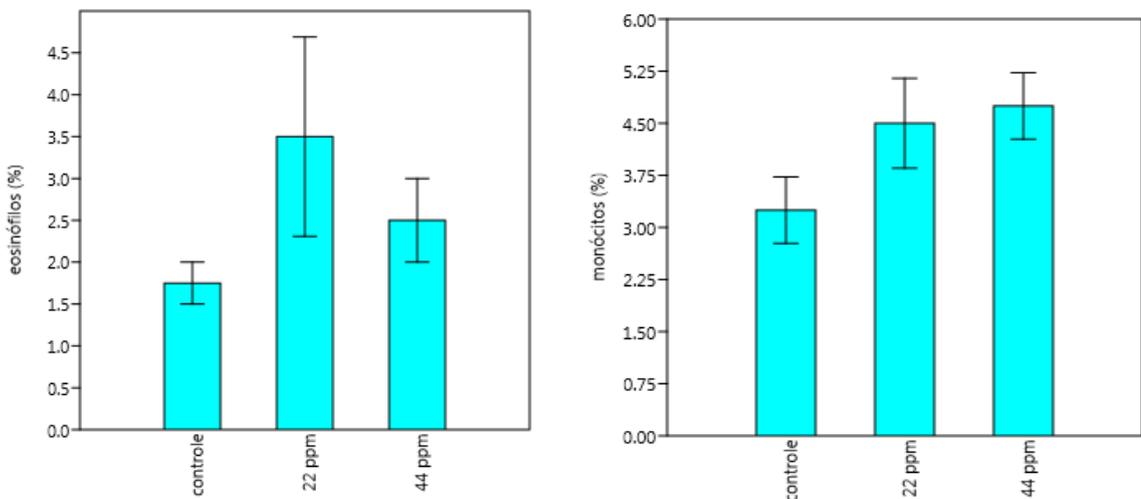


Fonte: O autor

Pela análise do tempo de 30 dias verificou-se que os eosinófilos no grupo (HP22) apresentou valores maiores do que os demais grupos ($p=0,45$) e os monócitos tiveram médias maiores nos grupos (HP22 e HP44) em relação ao (H) ($p=0,1652$), não sendo essas uma diferença estatística significativa (Figura 12).

Os eosinófilos também atuam na defesa do organismo contra agentes estranhos e controla o processo inflamatório. De acordo com Balbino, Pereira e Curi (2005), os eosinófilos aparecem nas últimas fases de reparação tecidual e associam isso a produção de fatores de crescimento.

Figura 12 - Gráfico de comparação de médias dos parâmetros hematológicos (eosinófilos e monócitos) no grupo de exposição de 30 dias em relação aos tratamentos (H, HP22 e HP44).



Fonte: O autor

Os resultados das análises do hemograma não se mostraram alterados durante o tempo de exposição ao tratamento com os curativos de hidrogel com NPAg nas diferentes concentrações, o que pode observar em números absolutos foi que houve um aumento de células mononucleares, principalmente em monócitos no tratamento (HP44) em 24 h, 3, 7, 21 e 30 dias.

Entre o segundo e o quinto dia após a lesão os macrófagos derivados dos monócitos tem função de auxiliar os neutrófilos na fagocitose de microorganismos, debris teciduais e remover neutrófilos senis. Sua participação mais relevante na inflamação e reparo tissular é na produção e liberação local de diversos fatores de crescimento e citocinas, cruciais na maturação da reação inflamatória e na iniciação do processo de cicatrização da ferida (BALBINO, PEREIRA, CURTI, 2015).

5.3 Análise dos parâmetros bioquímicos de uréia e creatinina

As amostras sanguíneas foram coletadas por punção de aorta abdominal e cardíaca em todos os tempos determinados para eutanásia. Algumas amostras do soro dos animais hemolizaram, prejudicando uma correta análise nos grupos (H) e (HP22) no tempo de 21 dias.

A análise dos dados foi por meio da média entre os valores de todas as amostras de uréia e creatinina, os resultados estão apresentados na (Tabela 03).

Tabela 03: Concentrações séricas de uréia e creatinina dos animais em diferentes tempos e grupos experimentais

Tempo eutanásia e tratamento	Uréia (mg/dL)			Creatinina (mg/dL)		
	H	HP22	HP44	H	HP22	HP44
24 horas	53,9 ^a	52,6 ^a	55,2 ^b	0,4 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a
03 dias	61,0 ^a	60,0 ^a	47,9 ^b	0,5 ^a	0,4 ^a	0,3 ^b
07 dias	40,3 ^a	44,1 ^a	49,6 ^b	0,3 ^a	0,3 ^a	0,2 ^a
14 dias	46,6 ^a	53,7 ^b	48,9 ^a	0,3 ^a	0,4 ^a	0,5 ^b
21 dias	-	-	55,2 ^a	-	-	0,4 ^a
30 dias	54,4 ^a	48,6 ^b	47,6 ^b	0,4 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a

H (grupo controle – hidrogel sem NPAg); HP22 (grupo com curativo NPAg na concentração de 22 ppm) e HP44 (grupo com curativo NPAg na concentração de 44 ppm)

OBS. Letras diferentes nas linhas (a e b) indicam diferenças em números absolutos

Fonte: O autor

Ao analisar os valores das concentrações séricas de uréia, pode-se observar que a maior média entre os grupos e em relação ao tempo foi do (H) e (HP22) no terceiro dia de tratamento, porém o grupo (HP44) no mesmo tempo

mostrou valores de médias inferiores aos dos outros grupos. Observou-se ainda que a menor média foi nos grupos (H) e (HP22) em 7 dias, não apresentando diferenças estatísticas entre eles ($p=0,9233$).

Comparando os valores do grupo controle (H) com os do tratamento que usou NPAg nas concentrações de 22 e 44 ppm, notou-se que as médias do (HP22) foram maiores no tempo de 7 e 14 dias, enquanto que o grupo do (HP44) apresentaram-se maiores no tempo de 24 horas, 7 dias e 14 dias.

Na análise de dosagem de creatinina, notou-se as maiores médias no grupo (H) 3 dias e (HP44) 14 dias, com diferença estatísticas entre os grupos em cada um dos referidos dias ($p=0,5051$) e ($p=0,6833$). Observou-se que a menor média foi no grupo (HP44) 7 dias.

Comparando os valores do grupo controle e os tratamentos com NPAg notou-se que somente o grupo (HP44) 14 dias mostrou-se maior.

De maneira geral os parâmetros bioquímicos de uréia e creatinina encontrados neste estudo, mostraram-se semelhantes aos valores apresentados em outros biotérios, como descrito por Lima et al. (2018), com valor de uréia de $53,15 \text{ mg/dL} \pm 11,7$ e creatinina de $0,33 \text{ mg/dL} \pm 0,15$. No centro de Bioterismo da Universidade de Medicina, da Universidade de São Paulo foram encontrados valores de creatinina entre 0,3 e 0,6 mg/dL, sendo semelhantes aos resultados deste estudo (CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP, 2018).

A partir das análises bioquímicas de uréia e creatinina apresentadas no estudo, os resultados não mostraram alterações, e nesse sentido, não foi possível evidenciar potencial nefrotóxico nos animais expostos aos curativos de hidrogel com NPAg nas concentrações de 22 e 44 ppm em todos os tempos determinados.

5.4 Análise dos parâmetros bioquímicos de AST e ALT

Complementando a análise de toxicidade, foi realizado quantificação de valores dos indicadores de lesão hepática ALT (Alanina Aminotransferase) e AST (Aspartato Aminotransferase) entre os grupos (H, HP22 e HP44) em relação aos tempos de 24 horas, 03, 07, 14, 21 e 30 dias, os dados estão apresentados como média e expostos na (tabela 4).

Tabela 4: Concentrações séricas de ALT e AST dos animais em diferentes tempos e grupos experimentais

Tempo eutanásia e tratamento	ALT (U/L)			AST (U/L)		
	H	HP22	HP44	H	HP22	HP44
24 h	39,3 ^a	47,7 ^b	53,8 ^c	234,3 ^a	217,3 ^b	259,2 ^c
03 dias	43,3 ^a	50,3 ^b	36,1 ^c	197,1 ^a	243,7 ^b	167,5 ^c
07 dias	20,7 ^a	17,9 ^b	23,9 ^c	79,7 ^a	103,9 ^b	105,7 ^b
14 dias	35,7 ^a	35,5 ^a	42,7 ^b	175,5 ^b	194,6 ^b	175,3 ^b
21 dias	-	-	31,1 ^a	-	-	245,3 ^a
30 dias	42,6 ^a	41,2 ^a	52,3 ^b	235,7 ^a	204,7 ^b	234,1 ^a

H (grupo controle – hidrogel sem NPAg) HP22 (grupo com curativo de NPAg na concentração de 22 ppm) HP44 (grupo com curativo de NPAg na concentração de 44 ppm)

OBS. Letras diferentes nas linhas *a, b e c) indicam diferenças em números absolutos

Fonte: O autor

Os níveis de concentrações séricas de (ALT) e (AST) servem como marcadores para monitorar a função hepática. Lesões hepáticas agudas induzidas por agentes químicos podem refletir danos aos hepatócitos e por isso eles são considerados biomarcadores pré-clínicos e clínicos bastante específicos para hepatotoxicidade.

Estudos referem que o órgão alvo principal de acumulação das AgNPs é o fígado e a toxicidade pode estar relacionada ao tamanho da partícula, quanto menor, maior a probabilidade do seu efeito tóxico, isso possivelmente está relacionado à combinação do tamanho e da sua dissolução (VIEGAS, 2018).

Ao analisar os valores das concentrações séricas de ALT, os resultados mostraram que a maior média entre os tratamentos foi no grupo (HP44) no tempo de 24 h ($p=0,6939$), enquanto a menor média foi no grupo (HP22) nos 7 dias ($p=0,7473$).

Comparando as médias dos grupos tratados com NPAg nas concentrações de 22 e 44 ppm em relação ao grupo (H) nos diferentes tempos de tratamento, observou-se que as médias do (HP22) foram maiores em 24 horas e 3 dias, enquanto que as do grupo (HP44) mostraram-se maiores em 24 h, 7, 14 e 30 dias, porém segundo a análise de variância não houve diferenças estatísticas significativas.

Ao realizar análise similar nos valores das concentrações séricas de AST, observou-se que a maior média dos valores foi no grupo (HP44) no tempo de 24 h, mas essa diferença não foi apresentada como significativa pela análise do teste ANOVA ($p=0,8714$). A menor média foi encontrada no grupo (H) no tempo de 7 dias ($p=0,6991$).

Comparando os valores dos grupos controle com os demais tratamentos em relação a todos os tempos, notou-se que o (HP22) foi maior em 3, 7 e 14 dias enquanto que o (HP44) foi em 24 h e 7 dias.

Nota-se que os valores das enzimas ALT obtidos neste estudo se mostraram similares quando comparados aos valores de referência descritos nos estudos de Melo et al. (2012) e Lima et al. (2018). No entanto para as enzimas AST os valores de média encontrados no grupo (H) que não tiveram em seu tratamento as NPAg quanto nos grupos (HP22) e (HP44) expostos as NPAg em suas diferentes concentrações apresentaram valores superiores quando comparados as referências desses mesmos estudos.

Alguns animais quando submetidos a coleta de sangue podem apresentar o AST mais elevado possivelmente pela influência da anestesia ou estresse muscular (MELO et al., 2012). Considerando o que foi mostrado no estudo de Melo et al., (2012), e os dados obtidos neste estudo não se sabe se as diferenças em números absolutos encontradas possuem relação exclusiva com a prata ou se possui associação com o estresse anestésico.

5.5 Análise histológica do fígado

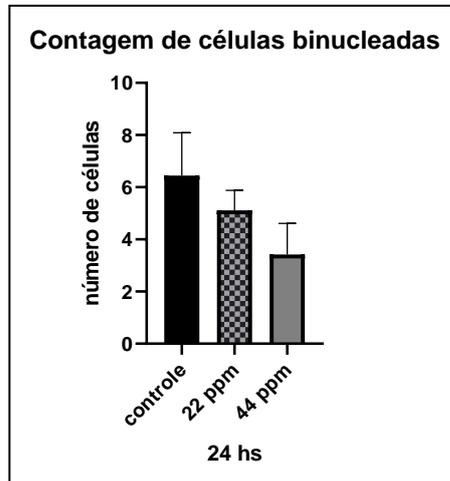
As lâminas de fígado foram analisadas com a lente objetiva de 10x para obter uma visão panorâmica e de grande dimensão da organização tecidual, verificando o arranjo e distribuição dos lóbulos hepáticos e espaços porta. Nesse aumento, procuraram-se anomalias tais como presença de infiltrado inflamatório (neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, macrófagos e monócitos), indícios de fibrose - proliferação excessiva de tecido conjuntivo por entre os lóbulos e contagem de células de hepatócitos.

Na análise histológica não foram observados hepatócitos com três ou mais núcleos em nenhuma das imagens analisadas, independentemente do tipo de tratamento (H, HP22 e HP44). Assim sendo, só foi feita contagem de hepatócitos binucleados.

Em relação a contagem de hepatócitos binucleados nos animais sacrificados após 24 horas de tratamento, foi possível observar valores de média decrescentes partindo do grupo (H) para o (HP22) e finalmente (HP44). O teste ANOVA constatou diferença estatística entre os grupos ($p=0,0421$), e o pós-teste

de Tukey apontou uma diferença significativa somente entre os grupos (H) e (HP44) ($p=0,0365$). (Figura 13).

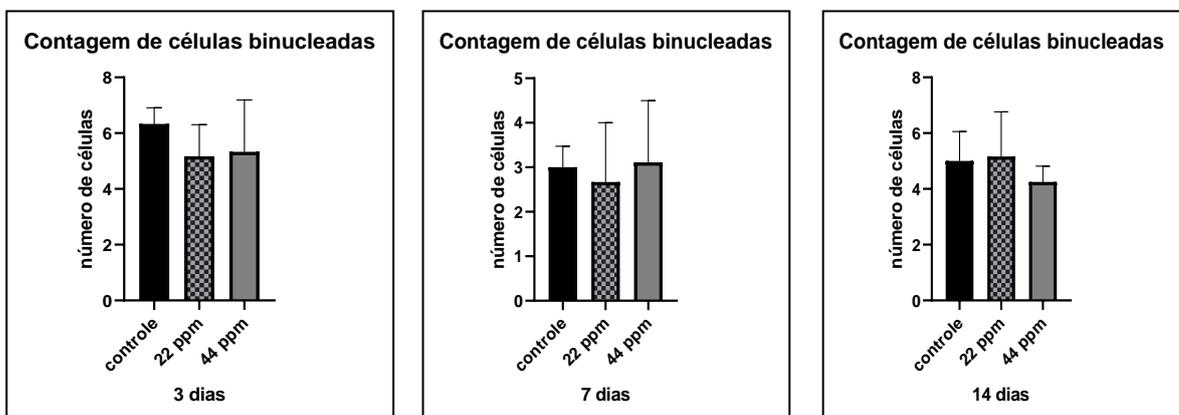
Figura 13: Gráfico comparativo das médias de contagem de células binucleadas por campo (aumento 40x) no grupo de exposição de 24 horas em relação aos de tratamentos (H, HP22 e HP44).



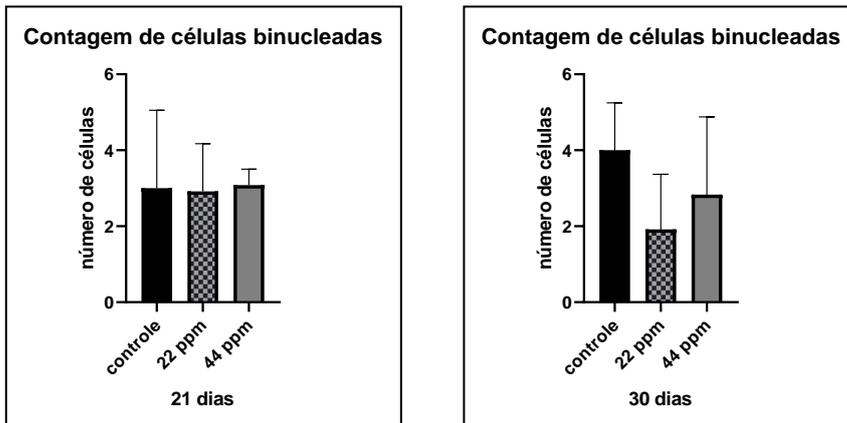
Fonte: O autor

Independentemente do tempo de coleta do material (3, 7, 14, 21 e 30 dias) e do tipo de tratamento realizado nos animais (controle, 22 ppm e 44 ppm de prata) os valores referentes à contagem de células binucleadas comportaram-se de maneira parecida. Os valores de média não expressaram grande variação, todos os grupos passaram no teste de normalidade (segundo Shapiro-Wilk), e os valores de $p < 0,05$ no teste de ANOVA, portanto, a análise estatística não revelou nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos (Figura 14).

Figura 14 - Gráfico comparativo dos valores das médias da contagem de células binucleadas por campo (aumento 40x) nos grupos de exposição de 3, 7, 14, 21 e 30 dias em relação aos de tratamentos (H, HP22 e HP44).



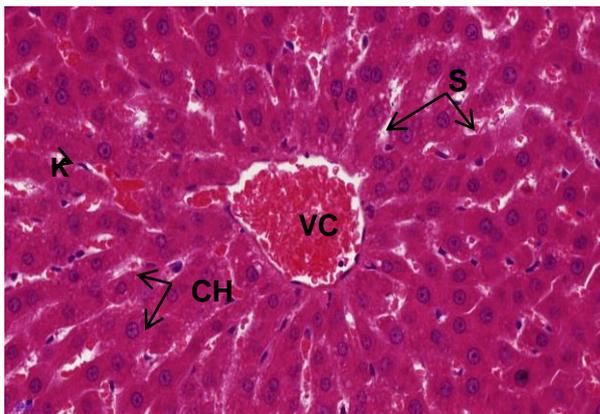
Continua



Fonte: O autor

Também foram feitas análises utilizando a objetiva de 40x, onde foi possível observar detalhes morfológicos dos cordões de hepatócitos e dos sinusóides hepáticos. Como forma de padronização, buscou-se focalizar a imagem em cima de uma veia central, de onde partem os cordões de hepatócitos numa orientação radial. Nesse aumento buscou-se analisar os seguintes detalhes: volume e aspecto do citoplasma do hepatócito, presença/ausência e quantidade de macro ou microvacúolos no citoplasma, morfologia e localização dos núcleos dos hepatócitos, contagem de células bi ou trinucleadas (indicativo de proliferação celular) e aspecto dos sinusóides hepáticos (Figuras 15 e 16).

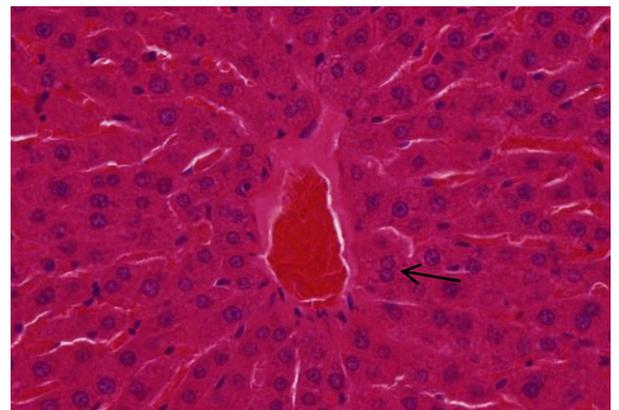
Figura 15 - Fotomicrografia da porção central de um lóbulo hepático.



No centro da imagem está a veia central (VC) contendo hemácias, de onde partem os cordões de hepatócitos (CH) entremeados pelos sinusóides (S). Também é possível observar algumas células de *kupffer* (K) nas paredes do sinusóide. (Coloração H&E aumento 40x).

Fonte: O autor

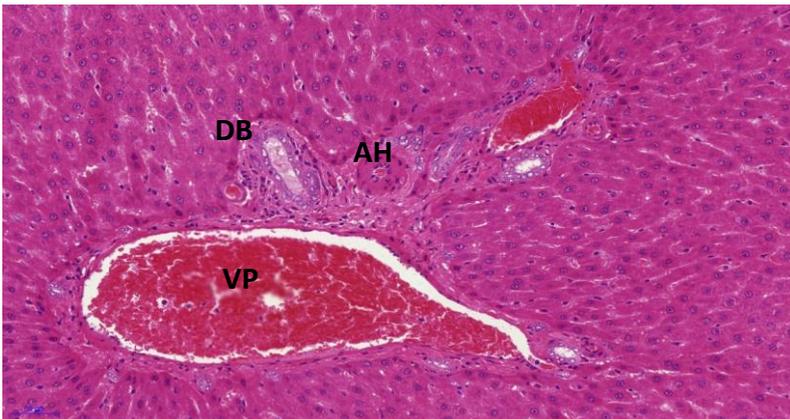
Figura 16 - Fotomicrografia de um lóbulo hepático



Hepatócito bi-nucleado (indicação da seta). (Coloração H&E aumento 40x – animal N° 27).

Foram analisadas lâminas de fígado numa visão em campo maior e mais abrangente (aumento 10x) onde não se observou presença de células inflamatórias e nem de tecido fibroso por entre os lóbulos hepáticos. Tais lóbulos encontravam-se tradicionalmente orientados ao redor de uma veia central. Os hepatócitos encontram-se anastomosados uns com os outros, formando os cordões de hepatócitos – o principal componente do parênquima hepático. Por entre os cordões é possível observar os sinusóides, alguns até mesmo preenchidos com hemácias, e que se apresentam com um aspecto normal. Espalhados proporcionalmente pelo parênquima hepático, também foram observados espaços porta muito bem definidos e constituídos por ramos da veia porta, artéria hepática e ductos biliares (Figura 17).

Figura 17 - Fotomicrografia de um espaço porta (Coloração H&E aumento 20x – animal N° 53)



Ramos da veia porta (VP), artérias hepáticas (AH) e ductos biliares (DB).
Fonte: O autor

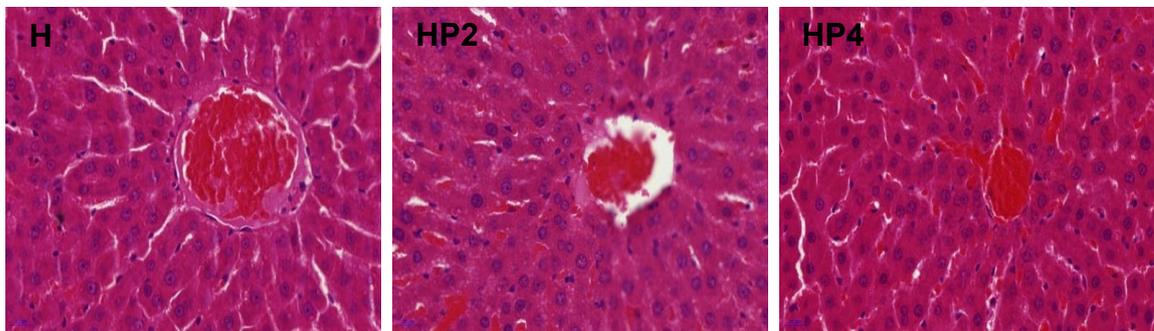
Num estudo mais detalhado, com imagens obtidas a partir da objetiva de 40x, foi possível observar que os hepatócitos possuem tamanhos e volume normal, sem inclusões de pigmentos significativas, com núcleos grandes, íntegros e bem corados pela hematoxilina, todos muito bem centralizados. Células uninucleadas compõem a esmagadora maioria da população de hepatócitos da população estudada, mas também foram visualizadas e contadas células binucleadas, com o objetivo de verificar se havia diferença no índice de proliferação celular entre os grupos. Não foram vistas células trinucleadas.

Ainda observando os hepatócitos, não se notou a presença desproporcional de vacúolos grandes ou pequenos preenchendo o citoplasma

dessas células. Agregado aos sinusóides também foi possível observar esparsas células de *Kupffer* nos campos analisados.

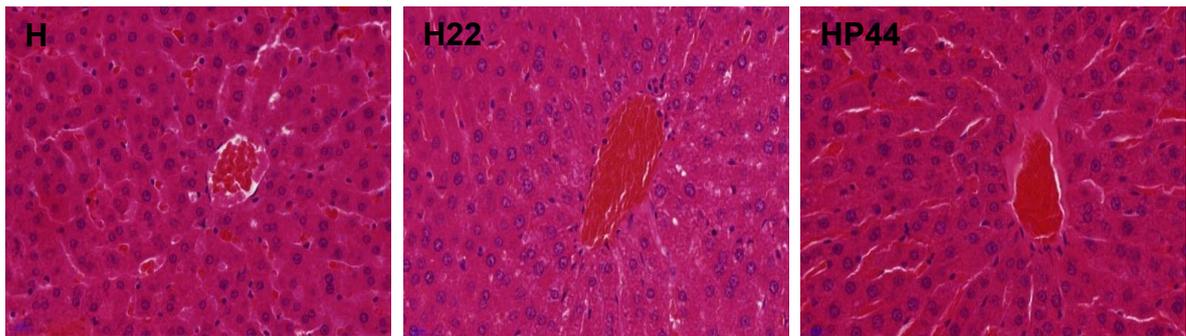
Essa descrição histológica acima citada é cabível para todas as lâminas analisadas, independentemente do tempo em que o animal foi sacrificado bem como do tipo de tratamento que ele recebeu (controle, 22ppm e 44ppm), assim sendo, há grande similaridade micromorfológica entre as amostras, tais como se pode observar nas (Figuras de 18 a 23) que correspondem aos tempos de tratamento.

Figura 18 - Laminas do fígado de animais com tratamento de 24 horas nos grupos (H), (HP22) e (HP44).



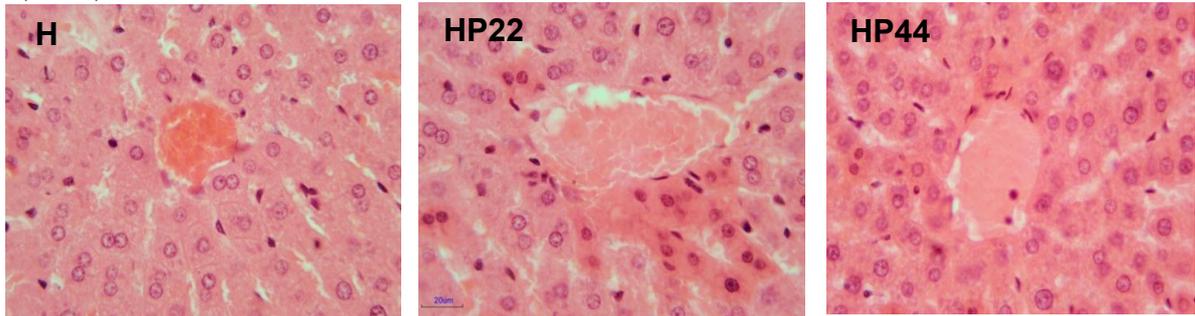
(Coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem Scanner).
Fonte: O autor

Figura 19 - Laminas do fígado de animais com tratamento de 3 dias nos grupos (H), (HP22) e (HP44).



(Coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem Scanner).
Fonte: O autor

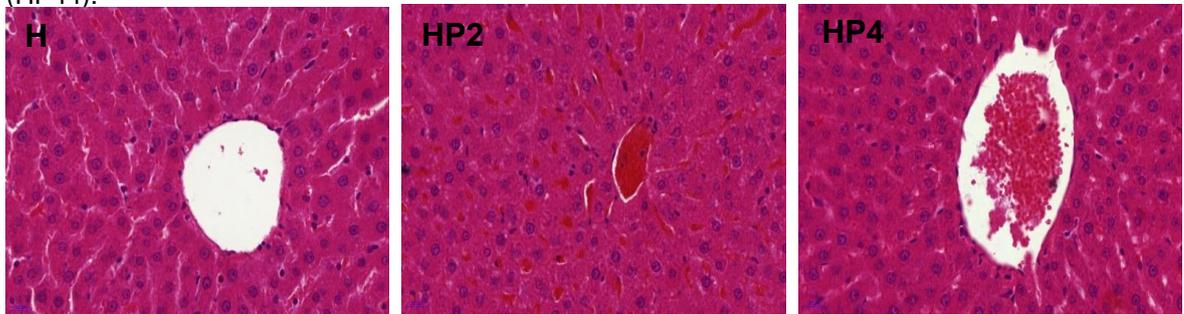
Figura 20 - Laminas do fígado de animais com tratamento de 7 dias nos grupos (H), (HP22) e (HP44).



(Coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem microscópio Olympus).

Fonte: O autor

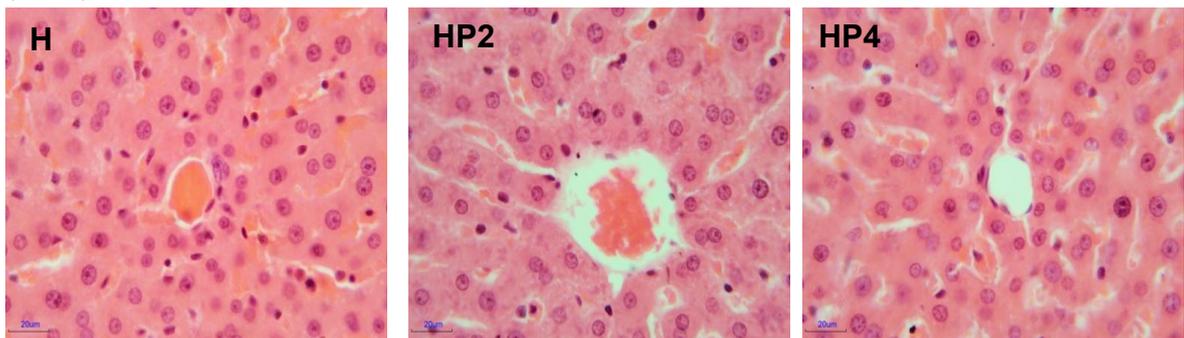
Figura 21 - Laminas do fígado de animais com tratamento de 14 dias nos grupos (H), (HP22) e (HP44).



(Coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem Scanner).

Fonte: O autor

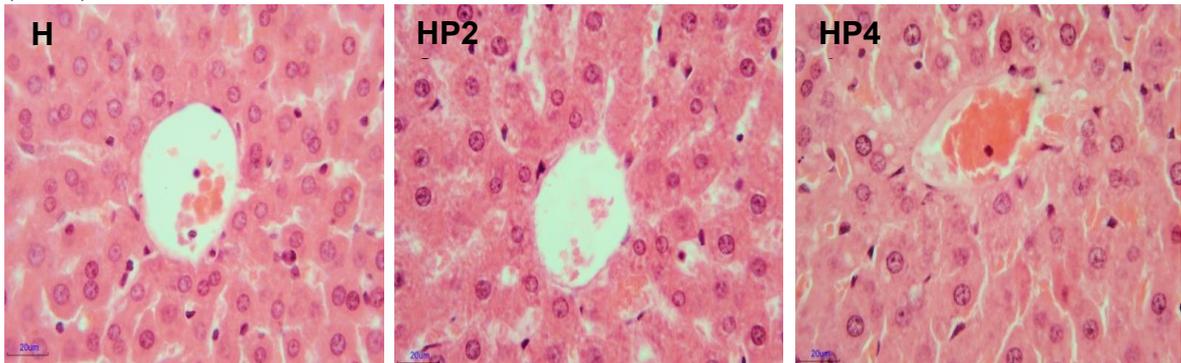
Figura 22 - Laminas do fígado de animais com tratamento de 21 dias nos grupos (H), (HP22) e (HP44).



(Coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem microscópio Olympus).

Fonte: O autor

Figura 23 - Laminas do fígado de animais com tratamento de 30 dias nos grupos (H), (HP22) e (HP44).



(Coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem microscópio Olympus).

Fonte: O autor

Segundo o estudo de Quaresma et al. (2007), independente do agente causador da lesão hepática, o fígado ao sofrer alterações poderá apresentar necrose e afetar os hepatócitos que podem ficar aumentados de tamanho, apresentar citoplasma irregular compacto e grandes espaços claros. Pode ainda apresentar afluxo de células inflamatórias aos espaços portais ou no parênquima, espessamento de cordões dos hepatócitos e desorganização da estrutura do parênquima, além de fibrose observado através do aumento da deposição do colágeno ao redor dos espaços portais ou veia centrolobular.

O fígado é um órgão vulnerável a uma ampla variedade de agressões metabólicas, tóxicas, microbianas, circulatórias e neoplásicas. É considerado o segundo maior órgão do corpo, sendo responsável pelo processamento e armazenamento dos nutrientes absorvidos no trato digestivo (DOS REIS, et al., 2017).

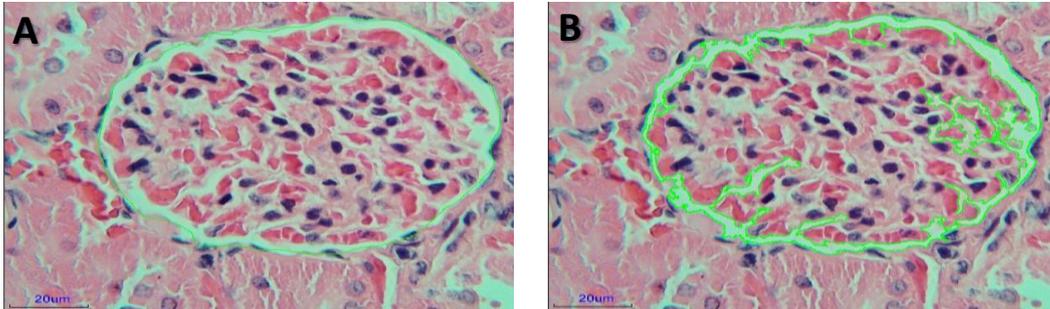
Em se tratando de potenciais alterações histológica do fígado após exposição das nanopartículas de prata, no estudo de Sarhan e Hussein (2014), foi possível identificar que o tecido hepático apresentou estreitamento dos sinusóides, hepatócitos de tamanho aumentado e núcleos e as células de Kupffer hipertrofiados.

5.6 Análise histológica do rim

No estudo, após a análise histológica, os resultados revelaram que todas as amostras analisadas, independente do tratamento que receberam, apresentaram micromorfologia condizentes com os padrões descritos na literatura

para um rim normal (Figura 24). As alterações que poderiam ser detectadas seriam a nefrite, congestão, tumefação turva e espessamento de alças glomerulares.

Figura 24 – Fotomicrografia de uma lâmina histológica do rim com a medição da área do corpúsculo renal e espaço de Bowman



(A) Corpúsculo renal e (B) Espaço de Bowman.

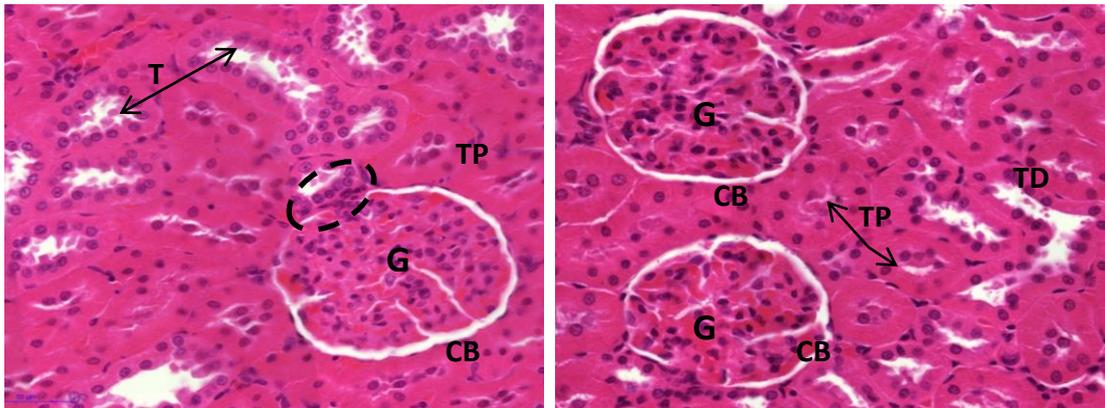
A área de seleção está demarcada pelo traço verde foi obtida com o software ImageJ. Coloração H&E aumento 400x.

Fonte: O autor

Verificou-se a presença de corpúsculos renais onde se pode identificar os glomérulos envolvidos pela cápsula de Bowman, com espaço capsular nítido e de tamanho proporcional. Observam-se também células epiteliais bem evidentes constituindo o folheto parietal da cápsula de Bowman. Na região adjacente ao corpúsculo, notou-se a presença de túbulos contorcidos proximais com suas células cuboides volumosas, cuja porção apical forma orla em escova, o que torna a luz desses túbulos quase que inexistente. Também há nessa região os túbulos contorcidos distais, que não possuem orla em escova e são menos acidófilos, sendo mais fácil distinguir a luz do tubo. Em alguns casos é possível identificar a mácula densa, que é uma porção do túbulo contorcido distal modificada (os núcleos ficam próximos uns aos outros) encostada no corpúsculo renal (figuras 25 e 26).

Em se tratando de alterações histopatológica dos rins induzidos por toxicidade as nanopartículas de prata, no estudo de Sarhan e Hussein (2014), observou-se os túbulos renais mostraram epitélios aumentados, vacuolização citoplasmática, espessamento da membrana basal e destruição de algumas cristas mitocondriais.

Figura 25 – Fotomicrografia do corpúsculo renal centralizado, composto pelo glomérulo e cápsula de Bowman por meio de uma lâmina histológica do rim de um dos animais.

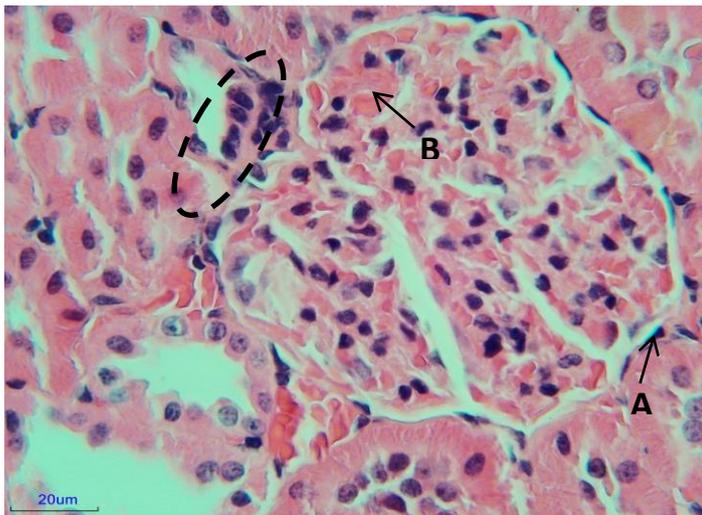


(G) Glomérulo; (CB) cápsula de Bowman; (Elipse tracejada) uma mácula densa em suas adjacências; (TD) túbulos contorcidos distais e (TP) túbulos contorcidos proximais.

Coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem Scanner.

Fonte: O autor

Figura 26 – Fotomicrografia das características histológicas do corpúsculo renal de um animal com 3 dias de tratamento e eutanásia do grupo experimental com 44 ppm de NPAg.



(Elipse tracejada) presença da mácula densa.

(A) epitélio parietal da cápsula de Bowman bem definido e (B) tufos glomerulares preenchidos pelo mesângio.

Fonte: O autor

Essas fotomicrografias correspondem ao animal número 25 (com 3 dias de tratamento com uso do curativo com NAPg com 44ppm), porém esse padrão se repete em praticamente todos as lâminas analisadas, independentemente do tempo e do tipo de tratamento recebido pelo animal.

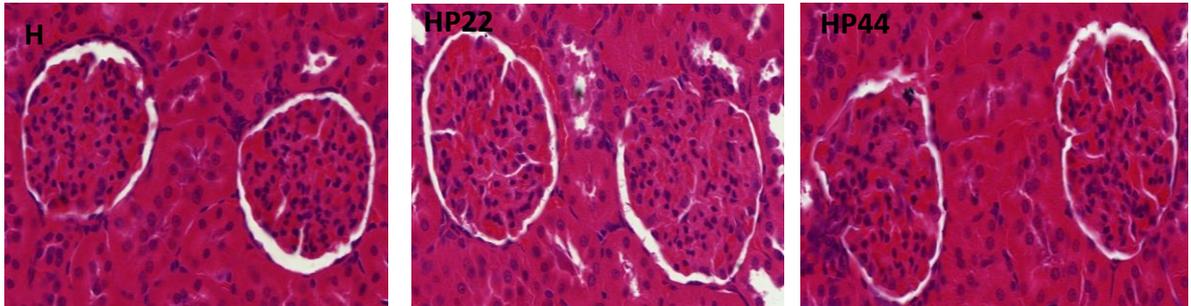
Numa análise mais abrangente, observando regiões maiores dos cortes histológicos pela lente objetiva de 20x, e também pela análise das fotomicrografias, não se observou a presença de nenhum infiltrado inflamatório nem nos corpúsculos renais e nem nas regiões adjacentes. Nos glomérulos, observou-se material

mesangial por entre os tufo glomerulares (porção eosinofílica) sem que houvesse excesso em sua quantidade (Figura 26).

Nas adjacências do corpúsculo renal, diversos tubos contorcidos proximais e distais foram encontrados com suas estruturas íntegras, formados por células justapostas e com conteúdo citoplasmático eosinofílico abundante, bem como a região da luz tubular preservada.

Com 24 horas de tratamento, os corpúsculos analisados apresentaram medidas de área similares entre si, sendo $6486 \mu\text{m}^2$ para (H), $6573 \mu\text{m}^2$ para o grupo (HP22) e $6217 \mu\text{m}^2$ para o grupo (HP44). O teste ANOVA não constatou diferença estatística entre nenhum dos grupos (Figuras 27 e 28).

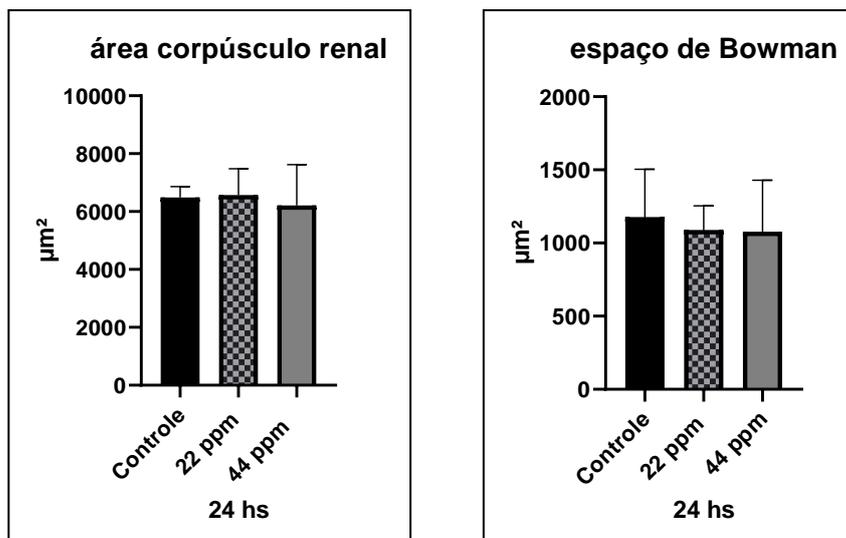
Figura 27 – Comparação da fotomicrografia do corpúsculo renal e da capsula de Bowman de um dos animais no tratamento de 24 horas em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).



Presença de dois corpúsculos renais e túbulos nas regiões adjacentes. (coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem Scanner) .

Fonte: O autor

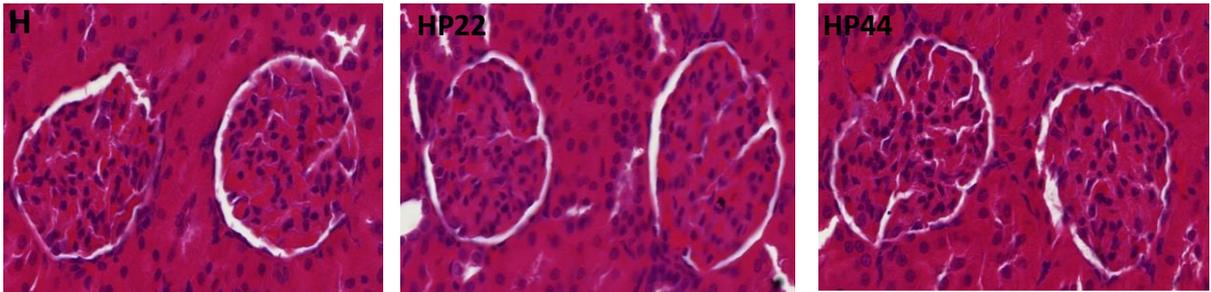
Figura 28 – Gráfico de comparação da área do corpúsculo renal e da capsula de Bowman do rim do animal em 24 horas em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).



Fonte: O autor

Os animais sacrificados após três dias de tratamento demonstraram valores crescentes de medição de área corpuscular, sendo 6400, 6824 e 7876 μm^2 respectivamente para os grupos H, HP22 e HP44 (Figura 29). A análise de variância apontou uma diferença estatística significativa entre os grupos H e o HP44 ($p=0,0171$) (Figura 30).

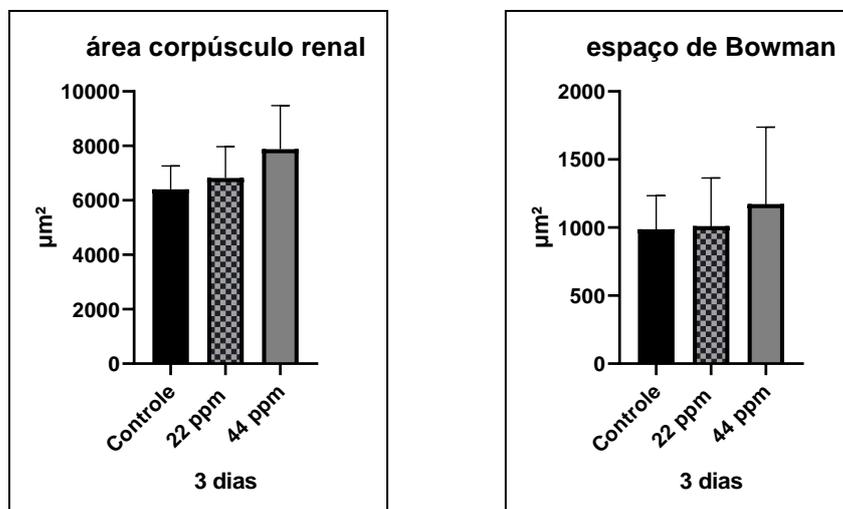
Figura 29 – Comparação da fotomicrografia do corpúsculo renal de um dos animais no tratamento de 03 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).



Presença de dois corpúsculos renais e túbulos nas regiões adjacentes. (Coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem Scanner).

Fonte: O autor

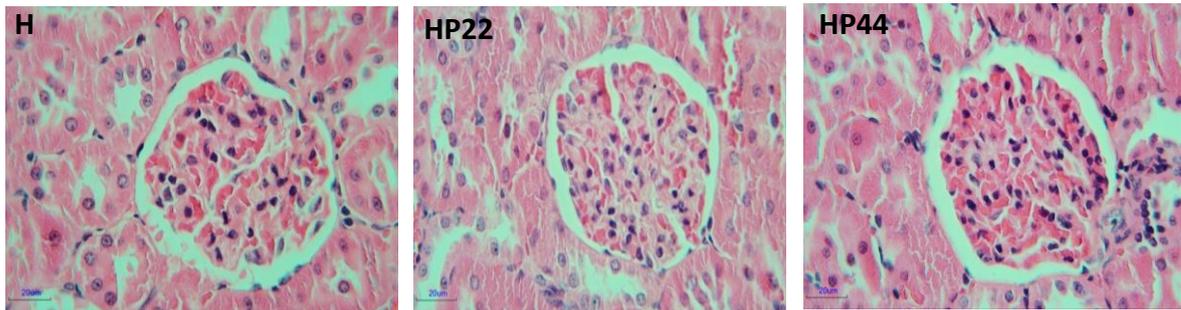
Figura 30 – Gráfico de comparação da área do corpúsculo renal e da capsula de Bowman do rim do animal no tratamento de 03 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).



Fonte: O autor

Amostras referentes a sete dias de tratamento apresentaram médias para medida de área do corpúsculo renal de 7282, 7094, 6533 μm^2 respectivamente para os grupos H, HP22 e HP44 (Figuras 31 e 32). Não foi identificada diferença significativa entre as médias obtidas.

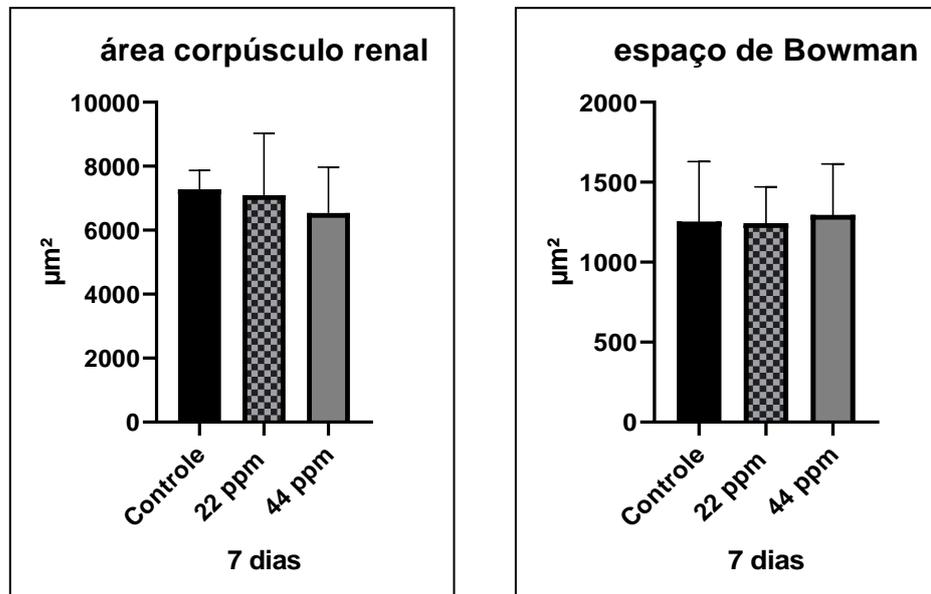
Figura 31 – Comparação da fotomicrografia do corpúsculo renal de um dos animais no tratamento de 07 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).



Presença de corpúsculos renais e túbulos nas regiões adjacentes. (Coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem microscópio óptico).

Fonte: O autor

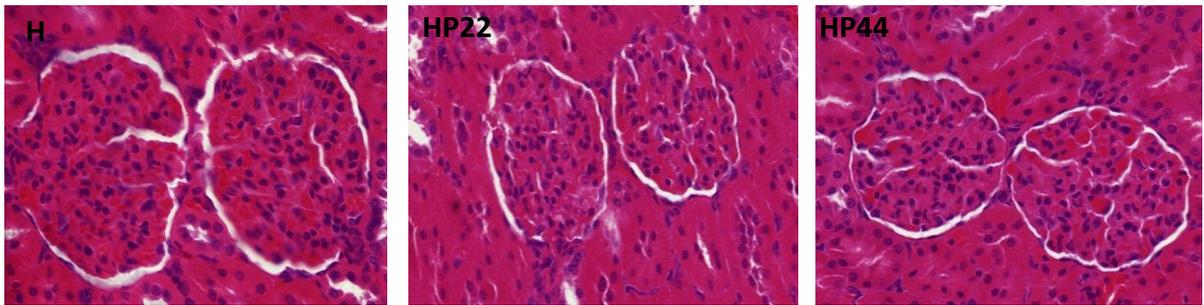
Figura 32 – Gráfico comparativo da área do corpúsculo renal e da capsula de Bowman do rim do animal no tratamento de 07 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e HP44).



Fonte: O autor

A análise morfométrica das lâminas obtidas de animais sacrificados após 14 dias de tratamento revelou medição de área corpuscular muito parecida nos 3 grupos tratados, sem que houvesse diferença estatística significativa entre eles: 7587 μm² no grupo H, 7206 μm² para grupo H22 e 7008 μm² grupo HP44 (Figuras 33 e 34).

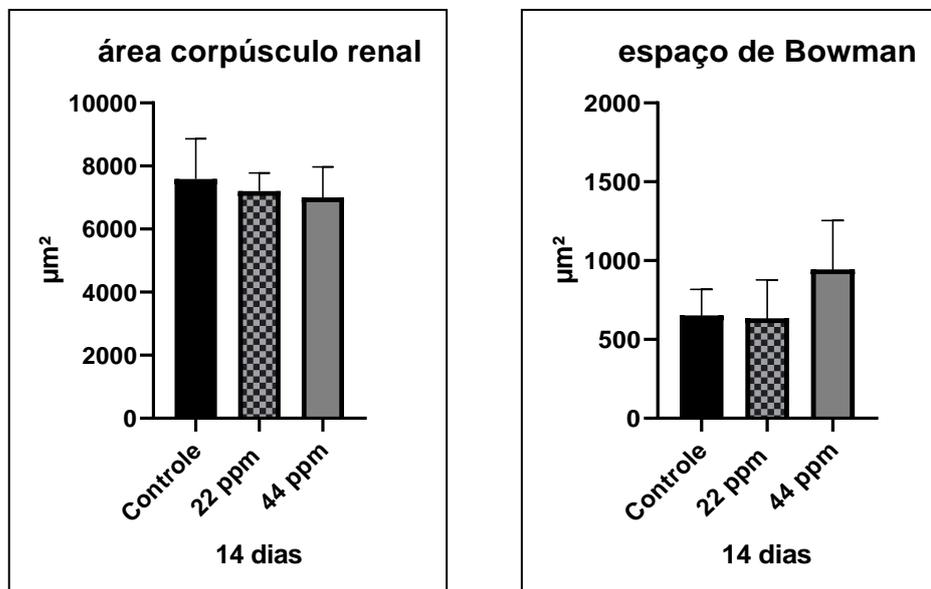
Figura 33 – Comparação da fotomicrografia do corpúsculo renal e da capsula de Bowman de um dos animais no tratamento de 14 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).



Presença de dois corpúsculos renais e túbulos nas regiões adjacentes. (Coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem Scanner).

Fonte: O autor

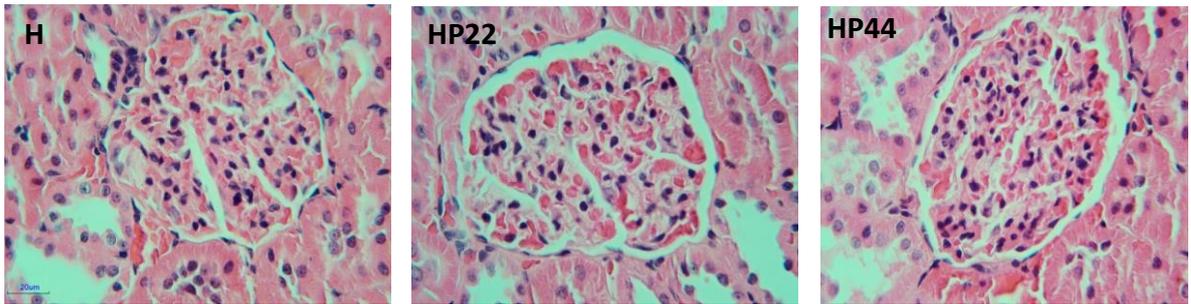
Figura 34 – Gráfico de comparação da área do corpúsculo renal e da capsula de Bowman do rim do animal no tratamento de 14 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).



Fonte: O autor

Com 21 dias de tratamento, as amostras demonstraram valores de média da área corpuscular de 6010 µm², 6632 µm² e 6633 µm², respectivamente para os grupos H, HP22 e HP44. O teste de ANOVA não demonstrou nenhuma diferença estatística significativa entre amostras dos três grupos tratados (Figuras 35 e 36).

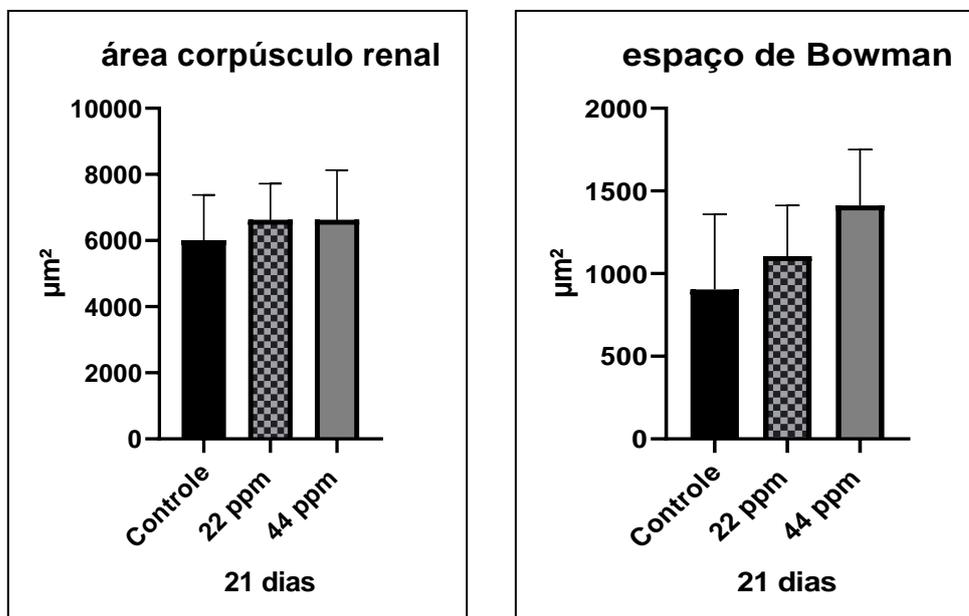
Figura 35 – Comparação da fotomicrografia do corpúsculo renal e da capsula de Bowman de um dos animais no tratamento de 21 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).



Presença de dois corpúsculos renais e túbulos nas regiões adjacentes. (Coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem microscópio óptico).

Fonte: O autor

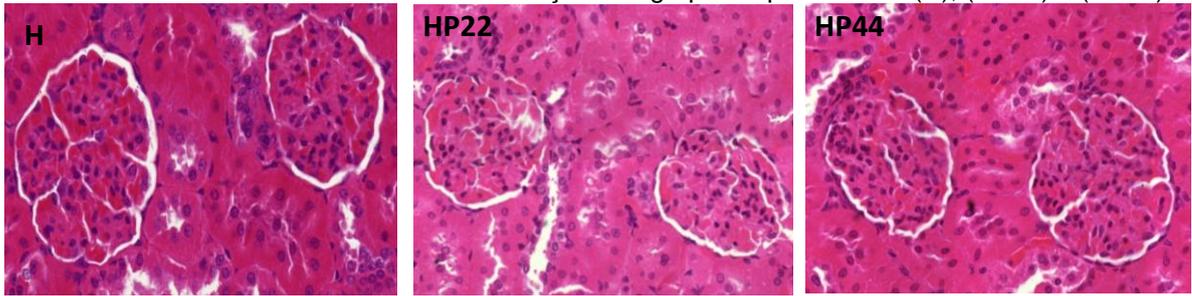
Figura 36 – Gráfico de comparação da área do corpúsculo renal e da capsula de Bowman do rim do animal no tratamento de 21 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e HP44).



Fonte: O autor

A análise das amostras referentes aos animais que passaram por tratamento durante 30 dias revelou valores de média da área do corpúsculo renal de 7776 μm², 5875 μm² e 6607 μm² para os grupos H, HP22 e HP44 respectivamente. A análise de variância apontou diferença estatística significativa entre o grupo H e o grupo HP22 com (p = 0,0397) (Figuras 37 e 38).

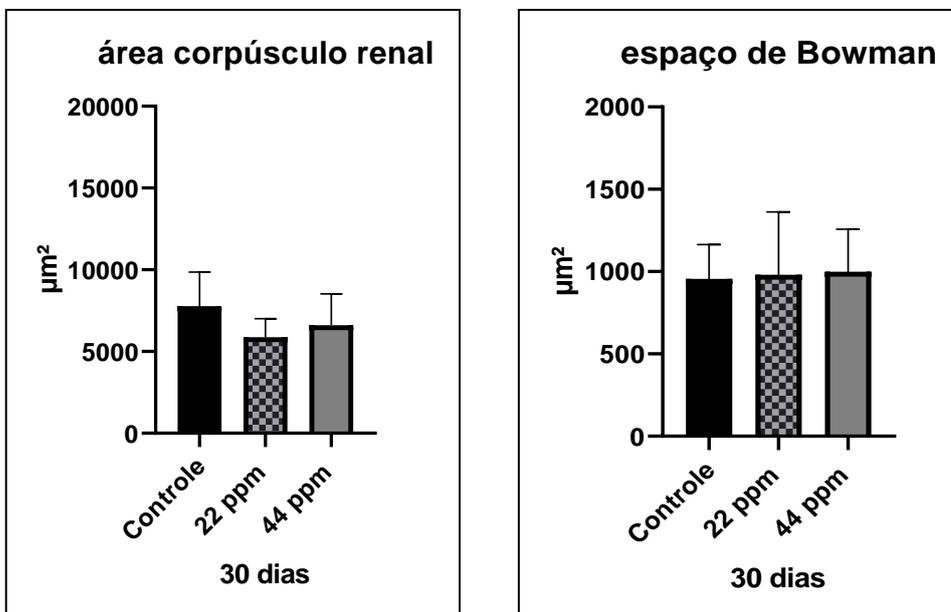
Figura 37 – Comparação da fotomicrografia do corpúsculo renal e da capsula de Bowman de um dos animais no tratamento de 21 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e (HP44).



Presença de dois corpúsculos renais e túbulos nas regiões adjacentes. (coloração HE em aumento de 40x – captação de imagem Scanner).

Fonte: O autor

Figura 38 – Gráfico comparativo da área do corpúsculo renal e da capsula de Bowman do rim do animal no tratamento de 30 dias em relação aos grupos experimentais (H), (HP22) e HP44).



Fonte: O autor

Todos os dados gerados, independente do grupo amostral, apresentaram comportamento paramétrico. Os valores referentes à medição da área do espaço capsular encontram-se explícitos na (Tabela 5).

Tabela 5 - Estatística descritiva referente aos valores de medição da área do espaço da cápsula de Bowman (em μm²).

Tempo eutanásia e tratamento	Média ± desvio padrão					
	H		HP22		HP44	
24 h	1178	(± 327,0)	1089	(± 165,0)	1078	(± 351,4)
03 dias	986,9	(± 246,5)	1010	(± 354,6)	1173	(± 564,0)
07 dias	1254	(± 375,1)	1245	(± 225,4)	1295	(± 319,6)
14 dias	652,1	(± 165,2)	633,3	(± 244,6)	944,7	(± 309,2)
21 dias	903,8	(± 456,0)	1107	(± 305,9)	1413	(± 337,9)
30 dias	956,3	(± 208,7)	980,9	(± 381,3)	999,4	(± 258,4)

Fonte: O autor

De maneira geral, os valores médios da área não se diferenciaram muito entre si, tanto com relação ao tempo quanto ao tipo do tratamento pelo qual o animal foi submetido, e, em algumas ocasiões, os valores de desvio padrão foram elevados, provavelmente pela natureza do experimento e pela metodologia de análise.

O teste de ANOVA não revelou diferença estatística significativa entre os grupos (H), (HP22) e (HP44) em amostras coletadas com 24 horas, 3, 7 e 30 dias de tratamento. Em animais que foram sacrificados com 14 dias de tratamento a análise de variância demonstrou diferença estatística significativa entre o grupo HP44 e os demais, apresentando *P value* de 0,025 e 0,016 respectivamente com os grupos H e HP22. Também foi verificada diferença estatística significativa em animais com 21 dias de tratamento, em que o grupo HP44 apresentou valores de média maiores do que os do grupo H ($p=0,056$).

6 CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado conclui-se que os curativos de hidrogel com nanopartículas de prata reticulados e esterilizados por irradiação com raios gama produzidos no IPEN/USP, nas concentrações de 22ppm e 44ppm mostraram possuir uma boa evolução nos processos de cicatrização das lesões provocadas no modelo experimental (ratos Wistar), que tem características de formar lesões altamente exsudativas e que são ideais para o curativo testado.

Os resultados revelaram que os curativos de hidrogel com nanopartículas de prata nas concentrações de 22ppm e 44ppm não induziram toxicidade nos animais nas condições experimentais utilizadas.

Na avaliação comportamental os animais não apresentaram sinais e sintomas evidentes de alterações em decorrência da exposição as NPAg.

Nas condições testadas os resultados das análises dos parâmetros do hemograma não se mostraram alterados, sendo observado um aumento de células mononucleares no grupo experimental com 44ppm. As análises bioquímicas denotaram ausência de atividade nefrotóxica ou hepatotóxica.

Notou-se também que nas análises histológicas de amostras de fígado e rins que as estruturas se mantiveram integras e preservadas.

Os dados apresentados neste estudo podem auxiliar na melhor compreensão sobre a exposição e toxicidade das NPAg e servirão como base para estimar o potencial de risco de eventual exposição à saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTRA, M.T.S.O., W. L.; BRANT, A. J. C.; de OLIVEIRA, M. J. A.; RIELLA, H. G.; LUGÃO, A. B. Synthesis of Silver Nanoparticles in Hydrogels Crosslinked by Ionizing Radiation. in 2013 *International Nuclear Atlantic Conference*, Vol. 45 (ed. IAEA) 7 (IAEA, Recife - PE –Brazil).

ARAÚJO, J. G. de. *Eficácia Do Curativo De Hidrogel Com Nanopartículas De Prata Na Cicatrização De Feridas Crônicas: Estudo Clínico Randomizado*. 2017. Dissertação (mestrado em ciências da saúde) - Universidade Federal de Uberlândia. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/19038/1/EficaciaCurativoHidrogel.pdf> Acesso em: 12 out. 2019.

ARCARO, G. Mucilagem De Ocotea Puberula (Rich.) Nees.: *Desenvolvimento De Um Fitomedicamento E Testes “In Vivo” Para Cicatrização De Feridas*. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Disponível em: <https://sites.uepg.br/ppgcs/dissertacoes/2018/15-2018.pdf> Acesso em: 28 abr. 2019.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 41, n. 1, p. 27-51. 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S15169332200500010004&lng=en&nrm=iso Acesso em 28 abr. 2019.

BENAMER, S; MAHLOUS, M; BOUKRIF, A; MANSOURI, B.; YOUCEF, S.L. Synthesis and characterization of gels based on poly(vinyl pyrrolidone), *Nuc Inst andM eth Phys Res B*, v. 248, p. 284-290, 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/223844560_Synthesis_and_characterisation_of_hydrogels_based_on_polyvinyl_pyrrolidone>. Acesso em 20 abr. 2019.

BEER, F.; JUNIOR, E. R. J; DEWOFF, J. T.; MARUZEK, D. F., *Mecânica dos Materiais*. 6ª edição. 2012. Disponível em: https://www.academia.edu/29185374/Mechanics_of_materials_Ferdinand_Beer_et_al_6th_ed_2012 Acesso em 22 de abr. 2019.

CAMPOS A.C.L, BORGES-BANCO A, GROTH AK. Cicatrização de feridas. *Arq. Bras. Cir. Dig.* 2007; v. 20, n. 1, p. 51–8. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S01026720200700010010&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em 12 ago. 2019.

CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP. *Parâmetros bioquímicos de ratos do centro de Bioterismo da FMUSP*, 2008. Disponível em: http://www.biot.fm.usp.br/index.php?mpg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17¶metros=sim . Acesso em 05 ago. 2019.

COELHO, J. M. et al. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, p. 45-51, 2010. Disponível em: < https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010069912010000100010>. Acesso em 20 mar. 2019.

COSTA, C.S. da. **Efeito In Vitro De Nanopartículas De Prata Em Creatina Quinase E Cadeia Respiratória Celular**. 2009. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Do Extremo Sul Catarinense – Criciúma. Disponível em: < <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp119091.pdf>>. Acesso em 20 mar. 2019

CHURCH, D. et al. Burn wound infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 403-434, 2006. Disponível em: < <https://cmr.asm.org/content/19/2/403>>. Acesso em 12 mar. 2018.

DOS REIS, M.F.; PAIVA, H.P. de; BARBOSA, A.N.; BARROS, E.M.L; LUZ, R.F.; VIANA, G.V.F. Estudo histológico do efeito agudo de prata coloidal nos órgãos de ratos Wistar. **Rev Enferm**, v. 6, n.1, p. 9-13, 2017. Disponível em: < <https://ojs.ufpi.br/index.php/reufpi/article/view/5778/pdf>>. Acesso em 30 jun. 2020.

DURAN, N; ROLIM, W. R.; DURÁN, M.; FÁVARO, W.J.; & SEABRA, A.B. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Quím. Nova**. São Paulo, v. 42, n. 2, p. 206-213, fev. 2019. Disponível em: < https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422019000200206>. Acesso em 24 abr. 2019.

EUROPEAN COMMISSION; DIRECTORATE GENERAL FOR HEALTH & CONSUMERS. **Opinion on nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance. Luxembourg: European Commission**, 2014. Disponível em: < https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_039.pdf>. Acesso em 20 fev. 2019.

FERNANDES, P. E. **Novo Método de Síntese de Nanopartículas de Prata e Avaliação do seu Efeito Antimicrobiano**. 2010. p 72, Dissertação. (Programa de Pós Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: < <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/2885>>. Acesso em 20 fev. 2019.

FONG, J.; WOOD, F. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 01, n. 04, p. 441-449, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2676636/>>. Acesso em 20 jun. 2019.

FRANCO, D; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 25, n. 3, p. 203-206, 2008. Disponível em: < https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010069912008000300013>. Acesso em 22 jan. 2018.

GAMBA, M. A.; PETRI, V.; COSTA, M. T. F. **Feridas: Prevenção, Causas e Tratamento**. [si]: Santos, 2016. 352 p.

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. Drug target insights. **journals.sagepub.com**, v. 2, p. 147-57, 2007. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/117739280700200002>> Acesso em 25 jan. 2018.

HENNINK, W.E.; VERMODEN, T.; FEDOROVICH, N. E.; GEEMEN, D. V.; ALBLAS, J.; NOSTRUM, C.F.; DHERT, W.J.A. Photopolymerized Thermosensitive Hydrogels: Synthesis, Degradation, and Cytocompatibility. **ACS Publications**, v. 9, n. 3, p. 919-26, 2008. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm7013075> Acesso em 10 abr. 2019.

HOUGAARD, K.S. CAPAGNOLO, L.; CHAVATTE-PALMER, P.; TARRADE, A.; ROUSSEAU-RALLIARD, D.; VALENTINO, S.; PARK, M.V.D.Z; JONG, W.H. de; WOLTERINK, G.; PIERSMA, A.H.; ROSS, V.L.; RUTCHISON, G.R.; HANSEN, J. S; VOGEL, U; JACKSON, P; SLAMA, R; PIETROIUSTI, A; CASSEE, F.R. A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. **Reproductive toxicology** (Elmsford, N.Y.), v. 56, p. 118–140, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26050605/>>. Acesso em 12 de abr. 2018.

IRION, G. **Feridas: Novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005

IRION, G. **Feridas: Novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. p. 359-370.

KIM, Y.S.; KIM, J.S.; CHO, H.S.; RHA, D.S.; KIM, J.M.; PARK, J.D.; CHOI, B.S.; LIM, R.; CHANG, H.K.; CHUNG, Y.H.; KWON, I.H.; JEONG, J.; HAN, B.S.; YU, I.J. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. **Inhalation Toxicol**, v. 20, n. 6, p. 575-583, 2008. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18444010/>>. Acesso em 12 abr. 2018.

LEE, K.J., NALLATHAMBY, P.D., BROWNING, L.M., OSGOOD, C.J., XU, X.N. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos, **Am. Chem. Soc.**, v. 1, n. 2, p. 133-143, 2007. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19122772/>>. Acesso em 22 set. 2018.

LIMA R.O.L., RABELO E.R., MOURA V.M.B.D., SILVA L.A.F., TRESVENZOL L.M.F. Cicatrização de feridas cutâneas e métodos de avaliação. Revisão de literatura. **Revista CFMV**, 2012. Ano XVIII. 56:53-59.

LIMA, F.E.G.; SANTOS, M.S.N. dos; BACHUR, P.R.; FILHO, M.O.de M.; MORAES, M.E.A de; ARAGÃO, G.F. Perfil bioquímico de ratos wistar do biotério central da Universidade Federal do Ceará. **Ciência Animal**, v. 28, n.3, p.1-11, 2018. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-16138>. Acesso em 20 de novembro de 2019.

MEDEIROS, A.C; DANTAS FILHO, A.M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **J Surg CI Res**, v. 7 n. 2, p 87-102, 2016. Disponível em: <<https://www.periodicos.ufrn.br>>. Acesso em 20 abr. 2020.

MELO C.M.L.; CORREIA, M.T.S. **Avaliação da atividade cicatrizante da Lectina de Cratylia mollis em camundongos normais e imunodeprimidos experimentalmente**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Recife. Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

MELO, M.G.D; DORIA, G.A.A; SERAFINI, M. R.; ARAUJO, A.A.S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (Rattus norvegicus linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **ScientiaPlena**, v. 8, n.4(a), 2012. Disponível em: <https://www.scientiaplena.org.br/sp/article/view/494/0>. Acesso em: 20 de novembro de 2019.

NOGUEIRA, P.F. M; PAINO, I.M.M; ZUCOLOTTI, V. NanoSilver: Propriedades, Aplicações e Impactos na Saúde Pública e Meio Ambiente. **Rev. Vigilância Sanitária em Debate**, v. 1 n. 4, 2013. Disponível em: <<https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/88>>. Acesso em 12 abr. 2019

PAULA, L.B. de. **Nanopartículas poliméricas e de prata: avaliação da toxicidade in vitro e in vivo e do processo de cicatrização em animais submetidos à queimadura térmica**. 2013, 193 p. Dissertação (Mestrado em biologia funcional e molecular). Universidade Estadual de Campinas. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br>>. Acesso em 12 mai. 2019.

PAL, S.; TAK, Y.K.; SONG, J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? a study of the gram-negative bacterium escherichia coli applied and environmental microbiology. **Eviron. Microbiol**, v.73, p. 1712-20, 2007. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/6541826>>. Acesso em 20 dez. 2019.

PEPPAS, N A, BURES, P; LECBANDUNG, W; ICHIKAWA, H **Hydrogels in pharmaceutical formulations**. Eur. J. Pharm. Biopharm, v. 50, n 1, 27-46, 2000.

PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=6262>. Acesso em 20 nov. 2019

POURHAMZEH, M.; MAHMOUDIAN, Z.G.; SAIDIJAM, M.; ASARI, M.J.; ALIZADEH, Z. The Effect of Silver Nanoparticles on the Biochemical Parameters of Liver Function in Serum, and the Expression of Caspase-3 in the Liver Tissues of Male Rats. Avicenna. **Med Biochem.** 2016. Disponível em: <http://ajmb.umsha.ac.ir/FullHtml/e35557>. Acesso em: 20 de novembro de 2019.

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.; BERNARD, J.A; CESAR DIAS, F. Cicatrização de feridas em ratos utilizando curativos com prata iônica e nanocristalina. São Paulo. **Acta Cir. Bras.**, v. 27, n. 11, p. 761-767, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010286502012001100004&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 07 out. 2019

QUARESMA, A.B; D' ACAMPORA, A.J.; TRAMONTE, R.; FARIAS, D.C. de; JOLY, F.S. Estudo histológico do fígado e bioquímico do sangue de ratos após ligadura do ducto hepático direito. **Acta Cir. Bras.**, v. n.1, 2007. Disponível em: < https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010286502007000100013&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em 30 mai. 2020.

RIVERA, E.A.B. Estresse em animais de laboratório. Fiocruz, p. 388. 2002. Disponível em: < <http://books.scielo.org/id/sfwtj/pdf/andrade-9788575413869-31.pdf>>. Acesso em 12 abr. 2020.

SAMBERG, M.E.; LOBOA, E.G.; OLDENBURG, S.J.; MONTEIRO-RIVIERE, N.A. Nanopartículas de prata não influenciam a diferenciação de células-tronco, mas causam toxicidade mínima. **Nanomedicine**, v. 7, n 8. 2012. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/nnm.12.18> Acesso em: 22 abr. 2019.

SANTOS, F.V. et al. Manual de Curativos: Prefeitura Municipal de Campinas. 2016, v. 2. Disponível em: <http://www.saude.campinas.sp.gov.br/enfermagem/2016/Manual_de_Curativos_2016.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2018.

SANTOS, P.C. dos. **Nanopartículas: Toxicidade Biológica**. Universidade Federal da Paraíba. Centro de ciências da saúde. João Pessoa. 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/898/1/PCS24022015.pdf>>. Acesso em 20 nov. 2019.

SOARES, T. **Efeito de nanopartículas de prata em neutrófilos humanos**. 2014. 92 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade do Porto, Cidade do Porto, Portugal. Disponível em: <<https://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/77140>>. Acesso em 22 abr. 2019.

SUNG, J. H.; JI, J. H.; PARK, J.D.; YOON, J.U.; KIM, D.S.; JEON, K.S.; SONG, M.Y.; JEONG, J.; HAN, B.S.; HAN, J.H. Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles. **Toxicological Sciences**, v. 108, 2008. Disponível em:

<https://academic.oup.com/toxsci/article/108/2/452/1664330> Acesso em 22 abr. 2019.

SZWED, D.N.; SANTOS, V.L.P. dos. Fatores de crescimento envolvidos na cicatrização de pele. **Cad. da Esc. de Saúde**, v. 1, n. 15, p. 7-17, Curitiba, 2015. Disponível em: <<https://portaldeperiodicos.unibrasil.com.br/index.php/cadernossaude/article/view/2450>>. Acesso em jan. 2019.

TAZIMA M de F.G.S; ANDRADE VICENTE Y.A de M.V; MORIYA T. Biologia da ferida e cicatrização. **Revistas USP**, v. 41, n. 3, p. 259-64, 2008. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/271>>. Acesso em 10 out. 2018.

VIEGAS, M. de F.T.F. **Avaliação da qualidade de revisões sistemáticas sobre toxicidade de nanopartículas de prata**. 2018. 255 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/27004/2/ve_Maria_Fatima_ENSP_2018.pdf>. Acesso em 20 jan. 2019.

VIRGENS, J.N. das. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana-colágeno carregada com nanopartículas de prata para aplicação como biomaterial**. 2017. 74 p. Dissertação (Mestrado em química). Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória. Disponível em: <<https://repositorio.ufes.br/handle/10/7344>>. Acesso em 05 abr. 2019.

WRIGHT, J.B.; LAM, K.; BURET, A.G., OLSON, M.E.; BURRELL, R.E. Early healing events in a porcine model contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis. **Wound Repair and Regeneration**. v.10, p.141-151, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12100375/>>. Acesso em 05 abr. 2019.

ANEXO 1

Carta de autorização da pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais



COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 INSTITUTO TOCANTINENSE PRESIDENTE ANTÔNIO CARLOS PORTO LTDA
 Rua 02 Qd 07, S/N - Jardins dos Ypês - Porto Nacional - TO - CEP 77.500-000
 Fone: (63) 3363 - 9600 - www.itpacporto.com.br

**CERTIFICADO**

A coordenação do Comitê de Ética no Uso de Animais do ITPAC Porto Nacional certifica que o Projeto "ESTUDO EXPERIMENTAL SOBRE A TOXICIDADE DO CURATIVO DE HIDROGEL COM NANOPRATA EM RATOS" protocolado sob nº 005/2017, foi analisado e julgado pelos membros deste comitê e obteve a APROVAÇÃO para a sua execução, iniciando a partir desta data e finalizando após 24 meses, conforme o cronograma do projeto. Nestes termos, os autores tomam ciência da responsabilidade de envio do relatório de atividades executadas, para este comitê, ao final do período supra-citado.

Porto Nacional, 29 de junho de 2017.

Drª Josefa Moreira do Nascimento-Rocha
 Presidente do CEUA ITPAC Porto Nacional.

Assinatura: _____

Coordenador da Comissão

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.
