

Avaliação da resposta cicatricial à aplicação dérmica de *scaffold* a base de amido aditivado em feridas cirúrgicas de *Oryctolagus cuniculus* em modelo experimental

(Evaluation of the cicatricial response to dermal application of *scaffold* based on additive starch in surgical wounds of *Oryctolagus cuniculus* in an experimental model)

SCHIOCHET¹, Gisele; AMPESSAN, Jonathan¹; ROSSI, Kaue¹; ALBRETCH, Rafael¹; VIEIRA, Francieli¹; LOCATELLI, Gabriela Maria¹; ALBRING, Caren Lis¹; GABRIEL, Mateus¹; SCHWERTZ Claiton¹; MENDES, Ricardo Evandro², FRONZA, Nei², JUNIOR Álvaro Vargas², OLSSON, Débora Cristina^{2*}

1 Discente Curso de Medicina Veterinária – IFC-Concórdia, SC.

2 Professor Adjunto do Instituto Federal Catarinense-Concórdia – IFC

*Autor para correspondência: debora.olsson@fc.br

Artigo enviado em: 19/06/2017, aceito para publicação em 01/08/2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/revcivet.v5i1.37735>

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo desenvolver e investigar experimentalmente as potencialidades de aplicação de bioadesivo a base de amido aditivado, como sistema “patches” transdérmico e intradérmico epitelial, em formato de filme monolaminar tubular, visando a ação futura para administração de anti-inflamatórios, antimicrobianos e atuação terapêutica. Foram utilizados 20 coelhos machos e fêmeas, da raça Nova Zelândia, adultos, separados em quatro grupos com cinco animais que passaram por cirurgia para realização de defeito dérmico. O grupo GA (controle dérmico) e o grupo GB (controle intradérmico) não receberam biomaterial na ferida. Os animais do grupo GC receberam o biofilme adesivo de forma dérmica que foi suturado sobre a ferida cirúrgica e o grupo GD, recebeu o biofilme adesivo de forma intradérmica. Aos sete e 14 dias de pós-operatório os animais foram anestesiados novamente para criação do defeito para biópsia. A análise estatística da planimetria foi conduzida a partir da média dos grupos, utilizando-se o teste de Tukey a significância de 1%, através do software computacional estatístico SAS®. Ao final do período de avaliação, os grupos GB e GD apresentaram diferença estatística significativa da área da ferida em relação ao grupo controle aos 14 dias na evolução da neoangiogênese e os grupo que receberam adesivo a base de amido GC e GD apresentaram maior proporção de células inflamatórias nos tempos de sete e 14 dias. Esses resultados mostram que o amido pode ser introduzido como material. Apesar de a técnica desenvolvida parecer promissora, há necessidade de aprimoramento, principalmente na conformação e densidade do biofilme.

Palavras-chave: amido de milho, bioadesivo, cicatrização, coelho, inflamação.

ABSTRACT

The present study had as objective to experimentally develop and investigate additivated starch-based bio adhesive application potentials as transdermal and intradermal epithelial patches system, in monolayer tubular film form, aiming its future use to anti-inflammatory and antibiotics administration and therapeutic actions. Twenty adult male and female rabbits from the New Zealand breeding were used, divided into four groups with five animals each, which went through surgery to perform a dermal surgical wound. The group GA (dermal control) and the group GB (intradermal control) did not receive biomaterial in their wound. Animals from the group GC received the adhesive biofilm dermally, by suturing it over the wound, and the group GD had the adhesive biofilm positioned intradermally. At days 7 and 14 after surgery the animals were submitted to anesthesia again for wound biopsy. Planimetry statistical analysis was conducted from group averages, using Tukey's test with 1% significance through the SAS® statistical software. At the end of the evaluation period, the GB and GD groups showed significant statistical difference on the wound area accounting neoangiogenesis evolution when compared to control groups at day 14, and the GC and GD groups which received starch-based adhesive showed higher inflammatory cells number at day 7 and day 14. This results show that starch can be introduced as a material. Despite this technique have seemed promising, some improving is needed, especially regarding biofilm conformation and density.

Key-words: maize starch, bio adhesive, healing, rabbit, inflammation.

INTRODUÇÃO

Feridas epiteliais são traumas caracterizadas pela perda da solução de continuidade da pele, podendo ser superficial ou profunda, atingindo a epiderme e derme expondo tecidos subjacentes (ROSA *et al.*, 1983; HASHEMI *et al.*, 2017), e sua fragilidade favorece a integração de agentes oportunistas bacterianos (TRABELSI *et al.*, 2017). São classificadas de acordo com o tempo necessário para reparação do tecido, em agudas e crônicas. As agudas são causadas por cirurgias ou traumas e o processo de reparação pode ocorrer em tempo adequado e previsto, geralmente sem complicações. As crônicas não reparam em um tempo previsto e apresentam complicações variadas (SANTOS, 2000; HOLMES *et al.*, 2015).

Outra maneira para classificar as feridas refere-se às estruturas anatômicas comprometidas e a profundidade da lesão, em superficial e profunda, que trata da extensão do dano tissular. A ferida superficial é aquela limitada à epiderme e estende-

se até derme, com perda parcial de tecido. Na profunda ocorre destruição da epiderme, tecido subcutâneo e estruturas como músculos, tendões e tecido ósseo (SANTOS, 2000).

Em resposta ao ferimento, o organismo inicia o processo de cicatrização para restaurar a integridade anatômica e funcional, através de um complexo mecanismo quimiotático, divisão celular, neovascularização e síntese de matriz protéica extra-celular (MEC) (FERREIRA *et al.*, 2008). Essa combinação de fatores inicia-se imediatamente ao aparecimento da lesão, visando substituir o tecido ferido por colágeno (MANDELBAUM, 2003; HEDLUND, 2005). Esses eventos são divididos em três estágios, parcialmente sobrepostos sendo eles a fase inflamatória, a proliferativa e a reparativa (PORTOU *et al.*, 2015). Todas estas etapas são importantes na tentativa de minimizar as deformidades decorrentes da lesão que poderão atuar diferentemente dependendo da

escolha de tratamento (PEREIRA *et al.*, 2002; PORTOU *et al.*, 2015).

A forma de tratamento escolhida depende da avaliação precisa da lesão e o estágio do processo cicatricial (MARQUEZ, 2003). A terapia tópica se fundamenta em remover tecidos necróticos e corpos estranhos presentes no leito da ferida, identificar e eliminar processos infecciosos, diminuir espaços mortos, absorver o excesso de exsudato, manter a umidade do leito, promover isolamento térmico e proteger o local da invasão bacteriana (YAMADA, 1999; DEALEY, 2007).

Segundo Cuzzel e Krasner (2003) existe atualmente um número aproximado de 2.500 itens destinados ao tratamento de feridas agudas e crônicas para humanos, desde a mais simples cobertura, soluções para higienização e antisepsia, até os produtos complexos chamados curativos inteligentes ou bioativos, os quais interferem de forma ativa nas diversas fases do processo cicatricial nos diferentes tipos de feridas. Embora existam muitos fármacos para auxiliar na reparação, estas nem sempre são eficazes e por inúmeras vezes o custo elevado torna o tratamento inviável (HUSSNI *et al.*, 2004). Algumas opções para o tratamento de lesões adquiridas ou até mesmo defeitos congênitos são a utilização de transplantes de tecidos, materiais naturais ou sintéticos (ROSA *et al.*, 1983), ou ainda, recursos físicos ou químico-medicamentosos como vetor para aceleração da cicatrização e fechamento rápido das lesões cutâneas (FERREIRA *et al.*, 2008).

No decorrer das últimas décadas, vem crescendo o interesse na utilização do sistema transdérmico de administração de substâncias tóxicas. Alguns fármacos que já foram administrados por essa via como *patches* com fentanil (KHARBUSH *et al.*, 2017; ROMUALDI *et al.*, 2017) tiveram sucesso tanto na absorção local como sistêmica (URURAHY, 2010; SILVA *et al.*,

2010). Ainda são escassos os estudos relacionados a adesivos transdérmicos desenvolvidos com biomateriais orgânicos para aplicabilidade em tecidos orgânicos, com propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes na medicina veterinária.

O desenvolvimento de biopelículas ativas à base de uma matéria prima de origem natural, com alta aceitação orgânica e com futura possibilidade de atividade antimicrobiana para aplicabilidade clínica poderá atender uma necessidade terapêutica podendo constituir-se em uma alternativa promissora na indústria farmacológica e estimular futuras pesquisas na terapia adjuvante de cicatrizações. O presente estudo objetivou aplicar *in vivo* um *scaffold* à base de amido aditivado como elemento experimental para administração futura de fármacos, constituído em um formato de filme adesivo monolaminar tubular, e análise da quantificação de células inflamatórias ao contato dérmico visando à atuação cicatricial.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pelo CEUA do IFC-Concórdia com protocolo número 08/2013. Foram utilizados 20 coelhos machos e fêmeas, da raça Nova Zelândia, com peso aproximado de 4 Kg. Os animais foram separados em quatro grupos de pesquisa, com cinco animais, alocados em gaiolas individuais por um período não inferior a 15 dias para sua adaptação. Os grupos foram denominados GA (controle dérmico), grupo GB (controle intradérmico), grupo GC (grupo dérmico) e grupo GD (grupo intradérmico). Dentro de cada grupo, os animais foram submetidos a biópsias aos sete e 14 dias após o procedimento cirúrgico para análise da evolução cicatricial através de exames histológicos de rotina.

A medicação pré-anestésica foi constituída a partir da associação de cloridrato de cetamina

Avaliação da resposta cicatricial à aplicação dérmica de scaffold a base de amido aditivado em feridas cirúrgicas de *oryctolagus cuniculus* em modelo experimental

(4mg/kg), maleato de midazolam (2mg/kg) e sulfato de morfina (5mg/kg), por via intramuscular (FONSECA et al., 1996; TREICHEL et al., 2011). No interior da sala cirúrgica foi procedida a indução anestésica com propofol (10mg/kg), intubação orotraqueal e manutenção anestésica com propofol por infusão contínua (0,4mg/kg min) por via endoflêbica auricular marginal direita.

A fluidoterapia intravenosa foi realizada com solução de ringer com lactato, por meio de canulação da veia auricular marginal, durante todo o procedimento cirúrgico, em gotejamento venoso de 10 a 15ml/kg/h. Com o auxílio de um oxímetro de pulso monitorou-se a perfusão capilar e pressão arterial por meio de um sensor conectado ao pavilhão auricular do paciente. Como antibioticoprofilaxia foi administrado cefalotina (12,5mg/kg), por via intravenosa, 10 minutos antes do procedimento cirúrgico. Com devida tricotomia e os animais posicionados em decúbito lateral direita, foram realizados antissepsia com álcool-iodo-álcool e colocação de panos de campo. Incisou-se a pele da parede torácica direita, sobre a região da última costela, criando ferida medindo aproximadamente 5 x 5 cm² com auxílio de um molde vazado estéril, seguido de divulsão do tecido subcutâneo com tesoura de Metzemaum, com pinças de dissecação, as bordas cutâneas foram manipuladas e os vasos sanguíneos identificados, pinçados e a hemostasia realizada somente por compressão ou por forcitorção. A gordura subcutânea foi divulsionada e excisada completamente.

Os animais do grupo chamado controle dérmico negativo (GA-C), não receberam tratamento para o fechamento do defeito cirúrgico criado, apenas curativo com gaze e atadura, trocados diariamente. Os animais do grupo denominado dérmico positivo (GC -D) tiveram sua lesão cirúrgica lavada com solução fisiológica, o biofilme foi posicionado

sobre a lesão dérmica de maneira tópica e suturada em pontos isolados simples com mononáilon 4-0 ao leito da ferida.

Para os animais denominados grupo intradérmico positivo (GD ID) foi realizado uma incisão epitelial em forma de “L”, com posterior divulsão do tecido subcutâneo onde o biofilme foi inserido e posicionado intradermicamente, seguida de sutura em pontos isolados simples com mononáilon 4-0 ao leito da ferida. Os do grupo denominados intradérmico negativo (GB GI) passaram pelo mesmo processo descrito pelo grupo GD, porém com aplicação tópica somente de gel à base de água.

No pós-operatório imediato os animais foram monitorados até o restabelecimento completo de sua consciência, logo após, encaminhados para seus boxes individuais. Foi administrado meloxicam (0,2mg/kg) como anti-inflamatório, via subcutânea, BID, durante três dias. Para analgesia administrou-se sulfato de morfina (5mg/kg), via intramuscular (IM), SID, durante três dias. Os animais do grupo GA e GB, foram submetidos à limpeza da ferida cirúrgica com solução NaCl 0,9% uma vez ao dia. Em todos os grupos foi realizado curativo com gaze sobre a lesão, o qual foi trocado diariamente.

Após o procedimento, os coelhos foram avaliados clinicamente quanto aos parâmetros fisiológicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, defecação e micção) e quanto ao seu comportamento e retorno da alimentação. A viabilidade cutânea também foi avaliada clinicamente por meio de percepção visual quanto à coloração, aquecimento, sensação de dor e sangramento.

Os animais foram submetidos à mensuração de suas feridas no momento da criação da lesão (dia 0) e aos sete e 14 dias de pós-operatório. Para as biópsias, foram anestesiados com o mesmo protocolo instituído anteriormente e posicionados

em decúbito lateral. As medidas (altura e largura) foram obtidas com a utilização de um paquímetro e desenhadas em papel manteiga para posterior conferência. As novas feridas, ocasionadas pelas biópsias, não foram levadas em consideração nas mensurações seguintes.

Com a utilização de um *punch* de biópsia cutânea de 6mm, foi retirado um fragmento cutâneo, na interface da lesão criada e do tecido não lesado de todos os grupos. A biópsia de sete dias foi realizada na margem dorsal da mesma ferida, enquanto que a segunda biópsia, aos 14 dias, foi realizada na borda caudal da mesma ferida. O fragmento colhido foi fixado em formol tamponado e embocado em parafina para a realização dos cortes de microscopia com auxílio de um micróto. As lâminas de microscopia, contendo os cortes histológicos das amostras foram coradas com hematoxilina-eosina para avaliação histopatológica. A confecção e leitura das lâminas foram executadas por um único avaliador, dispondo de um microscópio óptico conectado a um sistema de captura de imagens.

CONFECÇÃO DO BIOADESIVO

Inicialmente foi realizada a escolha dos componentes. As blendas (mistura de polímeros) produzidas foram compostas por dois polímeros: um natural, o amido de milho comercial e outro sintético, o polietileno linear de baixa densidade, BRASKEM®, com o nome comercial de PELBD HS150, cujas especificações são ponto de fusão: 116 °C, índice de fluidez (mf): 1-2,5 g/10min; cristalinidade parcial: 50 – 60% e densidade: 0,915 g/cm³. Como plasticizantes foi usado Glicerol (Sigma®) e como agente multifuncional, o Ácido cítrico (Sigma®).

A blenda foi aditivada com o antimicrobiano/antioxidante ácido cítrico, o qual foi adquirido comercialmente (Sigma®). A seleção

desta substância deve-se ao fato de ser aprovada nos Estados Unidos como um agente GRAS¹ pelo FDA², na União Europeia ser reconhecido como um conservante natural e ainda, no Brasil, apresenta-se como aditivo BPF³ sem limite de uso. Além destas características, que proporcionam segurança na utilização, estudos indicam suas propriedades antimicrobiana e antioxidante. Ainda, o ácido cítrico proporciona características desejáveis à produção de filmes de amido/PE (NING *et al.*, 2007).

As blendas foram obtidas pela mistura mecânica da resina de PELBD com amido de milho comercial, correspondendo a concentração mássica (m/m) a relação de 40 em 60 partes de amido para Polietileno. Para a compatibilização entre as cadeias poliméricas, foram utilizados glicerina e ácido cítrico, na ordem de 0,3 g/g de amido e ácido cítrico (0,15 g/g de amido).

Após pesagem, para preparação do masterbatches, a mistura foi submetida ao processo de extrusão, nas seguintes condições: 140 °C (zona 1), 140 °C (zona 2) e com velocidade de rosca de 36 rpm. O processo de obtenção dos filmes foi realizado via extrusora (AXPlásticos®, Brasil) em condições idênticas aquelas praticadas em indústrias (Cavalcanti, 2002). A operação ocorreu, com velocidade da rosca de 36 rpm e gradiente de temperatura programado de 150 °C para a zona 1; 150 °C para a zona 2 e 145 °C para a zona 3 (matriz plana – flat die). A alimentação da mistura (blendas) ocorreu manualmente.

O filme obtido com o amido de milho modificado apresentou-se menos quebradiço e mais flexível além de apresentar maior capacidade de dissolução em água, apresentou maior absorção de

¹ Generally Regarded as Safe (Geralmente Reconhecido como Seguro).

² Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos).

³ Boas Práticas de Fabricação

água, conforme comprovado pelo aumento no grau de intumescimento de acordo com Horn (2012). Dependendo da aplicação do filme, altos valores de solubilidade podem ser benéficos e não inviabiliza a sua utilização (CAVALCANTI, 2002).

individualmente em um envoltório de tecido TNT, posteriormente colocados em envelopes de plástico próprio para autoclavagem, também individualmente, sem sofrer alteração química. Esta característica também foi observada por Villanova e Oréfice (2010), ao concluírem que os polímeros em sistemas inovadores de liberação de fármacos devem ser resistentes à esterilização sem perder suas propriedades químicas.

O tecido TNT foi utilizado para evitar possíveis interações entre o plástico e o biofilme. A finalidade foi avaliar se haveria interferência nas características físicas do material mediante o processo de esterilização. Visualizou-se que o produto mantém as características originais mesmo sendo submetido à autoclavagem, o que se apresenta como um ponto positivo, visto que este método de esterilização é acessível e de tempo relativamente curto quando comparado à outros métodos como a utilização de gazes ou do calor seco.

Após esterilização, o material a base de amido foi submetido a testes microbiológicos realizados em culturas de ágar sangue para detecção de bactérias mesófilas e, em ágar Sabouraud para detecção de fungos (QUINN *et al.*, 2005). Ambos os resultados apontaram a ausência de micro-organismos, demonstrando que a autoclavagem pode ser eficaz para a esterilização do biofilme a base de amido. Estes resultados reforçam a viabilidade do material (CAVALCANTI, 2002) a base de amido que uma vez modificado é capaz de liberar óxido nítrico e possui muitas ações como a capacidade bactericida, o que potencializa o seu uso como curativo (VILLANOVA e ORÉFICE, 2010).

Os filmes prontos foram submetidos experimentalmente à esterilização por calor úmido (autoclave a 121 °C por 30 minutos). Para tal, estes foram cortados nas dimensões 2,5cm por 2,5cm e embalado

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com auxílio do software estatístico SAS®. As médias foram comparadas através do teste de Tukey a 1% de probabilidade (SAMPAIO, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A intensidade da proporção volumétrica da angiogênese apresentou diferença significativa entre as médias da neovascularização aos 14 dias após o recebimento da matriz de amido de milho em modo aditivado. Os grupos GC e GD mostraram-se superiores aos grupos GA e GB (Tab. 1), onde não houve aplicação do biomaterial, indicando que o adesivo de amido pode melhorar o processo de angiogênese e garantir o fluxo sanguíneo no tecido lesionado. A proporção volumétrica da neovascularização foi similar nos quatro tratamentos aos sete dias, mantendo-se aos 14 dias no GC e GD. As feridas muito extensas induzem à ativação de células do estroma e do parênquima, as quais se multiplicam rapidamente para produzir fibras de colágeno e fornecer resistência, também observado em feridas de menor extensão como neste experimento, entretanto, sem diferença no mecanismo. Vasos sanguíneos emitem novos brotamentos para nutrir a parte regenerada, formando um tecido de granulação, observados em maior quantificação nos grupos GC e GD (Fig. 3) (TEIXEIRA *et al.*, 2006; MARQUES *et al.*, 2011).

Os resultados sobre a angiogênese foram maiores no GA, GB e GD aos sete dias comparados aos 14 dias. Quando as células são privadas de oxigênio, liberam fatores angiogênicos e formação

Avaliação da resposta cicatricial à aplicação dérmica de *scaffold* a base de amido aditivado em feridas cirúrgicas de *oryctolagus cuniculus* em modelo experimental

de novos capilares, porém quando ocorre a regressão do processo inflamatório, esses capilares também regridem ou desaparecem (Tab. 2 e 3). Isso explica os achados de neoangiogênese serem maiores aos sete dias nos GA, GB e GD e menores aos 14 dias, permanecendo o processo inflamatório maior no GE (Fig. 1 e 2 – seta; Tab. 1 e 3). Estes achados estão de acordo com Shweiki et al (1992),

ao verificarem que neoangiogênese é essencial para o processo de reparação por garantir um abundante suporte de O₂ para a área lesada e a remoção do CO₂ e outros metabólitos. A presença de oxigênio também é fundamental para a hidroxilação dos aminoácidos lisina e prolina e para a formação do colágeno e sua maturação.

Tabela 1. Média da angiogênese dos grupos (A, B, C, D) aos sete e aos 14 dias após o procedimento cirúrgico. Concórdia, SC, junho, 2016.

GRUPOS	DIAS	
	7	14
A-controle dérmico	120 a	97,42 c
B-controle intradérmico	143,67 a	106,92 bc
C-grupo dérmico	137,83 a	148,08 a
D-grupo intradérmico	140,33 a	140,27 ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Grupo A (controle dérmico negativo); Grupo B (controle intradérmico negativo); Grupo C (controle dérmico); Grupo D (controle intradérmico).

Foram encontradas diferenças significativas para as células polimorfonucleares (PMN) (Tab. 2), onde os grupos GA, GB e GD aos sete dias apresentaram maior reação inflamatória que o grupo GC, entretanto, aos 14 dias o GA e GB (Fig. 2) apresentaram menor número de células inflamatórias comparando os GC e GD. Essa diferença revela que os grupos que receberam o adesivo de amido (GC e GD) desenvolveram um processo inflamatório tardio permanecendo presente as células PMN em grande quantidade aos 14 dias, sendo que fisiologicamente deveriam ter desaparecido após 72 horas (Fig. 4 – seta escura) (OLSSON et al., 2006).

Como meio apropriado, os *scaffolds* adesivos devem possuir unidades moleculares que possibilitem modificações e taxa controlada de biodegradação, não desenvolver toxicidade tópica ou sistêmica, ter propriedades para promover ou inibir interação célula -matriz e célula-célula, apresentar respostas imunes à inflamação, ser material de fácil produção ou aquisição e

purificação e possuir compatibilidade com a substância química, com soluções aquosas em condições fisiológicas (HOLMES, 2002). Apesar de o estudo apresentar um material com todas essas características, observou-se que a função imune à inflamação que ocorreu no estudo permaneceu sinalizando o mecanismo inflamatório por tempo maior que os grupos que não receberam contato tópico com o amido aditivado (GA e GB).

Os polímeros podem ser utilizados como *scaffolds* para promover a regeneração tecidual (CAMILO, 2006), proporcionando mínima inflamação ao redor do implante, principalmente em tecidos íntegros como os ossos (BOLSON *et al.*, 2005). No entanto, a maior limitação desses materiais porosos à base de polímeros está em sua relativa baixa elasticidade e resistência mecânica não compatível (CAPK, 1990; GRIFFITH, 2000; GONDAK, 2005; KUNA *et al.*, 2017), podendo ser o fator limitante observado na reação inflamatória tardia em função da presença de PMN aos 14 dias de avaliação, no tecido epitelial.

Avaliação da resposta cicatricial à aplicação dérmica de *scaffold* a base de amido aditivado em feridas cirúrgicas de *oryzotolagus cuniculus* em modelo experimental

Tabela 2. Média das células polimorfonucleares (PMN) dos grupos (A, B, C, D) aos sete e aos 14 dias após o procedimento cirúrgico. Concórdia, SC, junho, 2016

GRUPOS	DIAS	
	7	14
A-controle dérmico	659 c	126 a
B-controle intradérmico	455 bc	289,3 ab
C-grupo dérmico	154 ab	439,8 b
D-grupo intradérmico	233,3 ab	302,9 ab

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Grupo A (controle dérmico negativo); Grupo B (controle intradérmico negativo); Grupo C (controle dérmico); Grupo D (controle intradérmico).

Ao comparar as médias dos grupos para o número de células monocucleares (MN) encontrou-se diferença significativa aos 14 dias (Tab. 3), indicando que os grupos GA e GC apresentaram uma menor quantificação de células MN (Fig. 3), apresentando um processo inflamatório menos persistente (Fig. 3). Nos grupos GB e GD observou-se que o número de células inflamatórias aumentou aos 14 dias, neste caso, a permanência do biofilme

de forma intradérmica por um período de 14 dias demonstrou aumento de reação inflamatória tardia. Isso significa que quanto maior a duração do processo inflamatório, menor será a possibilidade de regeneração (ROMO III e MCLAUGHLIN, 2003). No GB, na derme profunda observou-se ainda infiltrado inflamatório de células PMN e MN moderado difuso, associada à moderada quantidade de capilares sanguíneos (angiogênese).

Tabela 3. Média das células mononucleares (MN) dos grupos (A, B, C, D) aos sete e aos 14 dias após o procedimento cirúrgico. Concórdia, SC, junho, 2016.

GRUPOS	DIAS	
	7	14
GA-controle dérmico	125,67 a	101,33 a
GB-controle intradérmico	250,58 b	351,25 bc
GC-grupo dérmico	217,58 ab	205,80 ab
GD-grupo intradérmico	286,27 b	428,87 c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Grupo A (controle dérmico negativo); Grupo B (controle intradérmico negativo); Grupo C (controle dérmico); Grupo D (controle intradérmico).

As lâminas de microscopia, contendo os cortes histológicos das amostras, foram coradas com hematoxilina-eosina para avaliação histopatológica, dispondo de um microscópio óptico conectado a um sistema de captura de imagens. As imagens de cada grupo foram capturadas aos sete dias e como resultado pode-se observar no grupo GA, infiltrado inflamatório de células PMN severo difuso e de células MN moderado difuso. Observou-se ainda proliferação de fibroblastos leve a moderada e moderada quantidade de capilares sanguíneos (angiogênese) e

encontrou-se necrose tecidual (Fig. 1) associada à debris celulares e células inflamatórias degeneradas (crosta). Quando o tecido orgânico sofre estresse oxidativo de longa duração causados pela superprodução de radicais livres pode induzir necrose (POLLACK e LEEUWENBURH, 2001; BIENERT *et al.*, 2017), fator possível de acontecer se a derme reconhece o material proposto ao contato como um elemento estranho, no entanto, neste estudo observado em maior quantidade no grupo dérmico que não recebeu adesivo.

Avaliação da resposta cicatricial à aplicação dérmica de *scaffold* a base de amido aditivado em feridas cirúrgicas de *oryzotolagus cuniculus* em modelo experimental

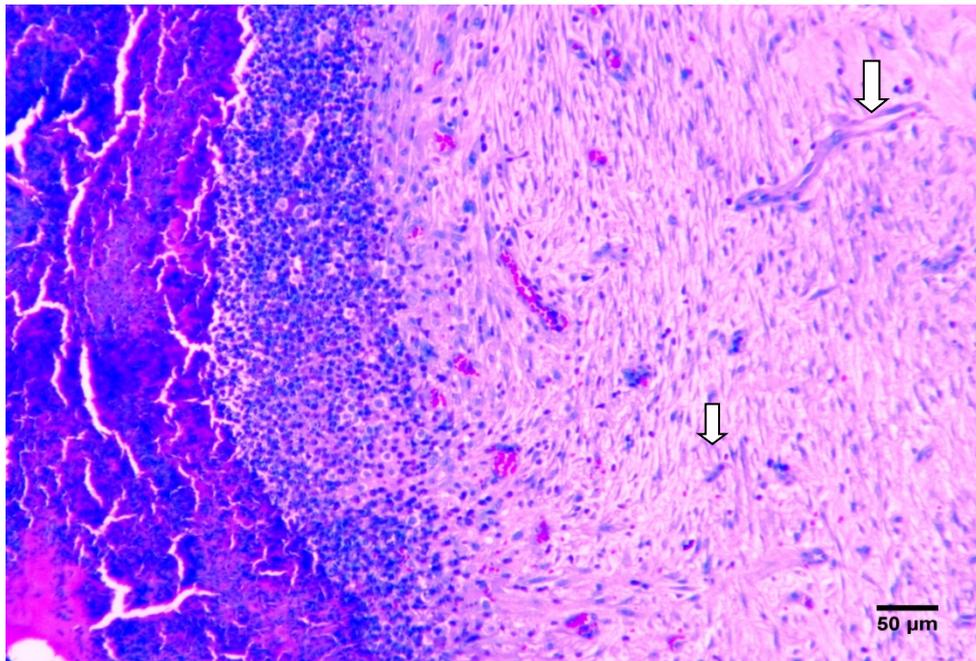


Figura 1. Grupo GA, 14 dias: Na subepiderme observa-se infiltrado inflamatório de células PMN, proliferação de fibroblastos e moderada quantidade de capilares sanguíneos (angiogênese - seta). À esquerda observa-se necrose tecidual.

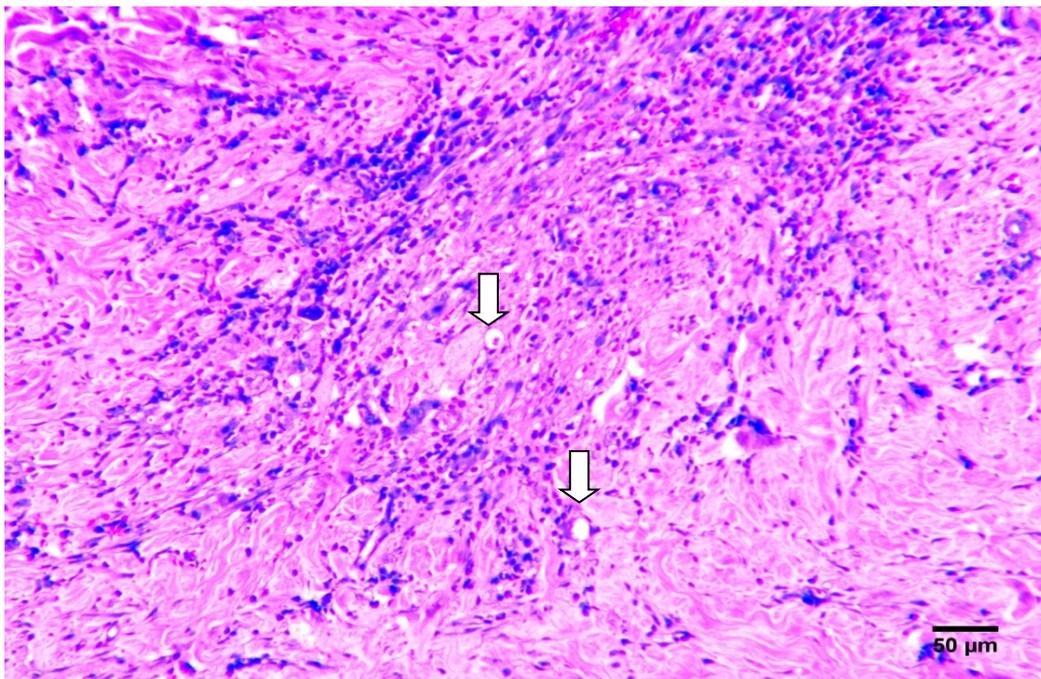


Figura 2. Grupo GB, 14 dias: Na derme profunda observa-se infiltrado inflamatório de células PMN e MN, proliferação de fibroblastos e moderada quantidade de capilares sanguíneos (angiogênese – seta clara).

Avaliação da resposta cicatricial à aplicação dérmica de *scaffold* a base de amido aditivado em feridas cirúrgicas de *oryzotolagus cuniculus* em modelo experimental

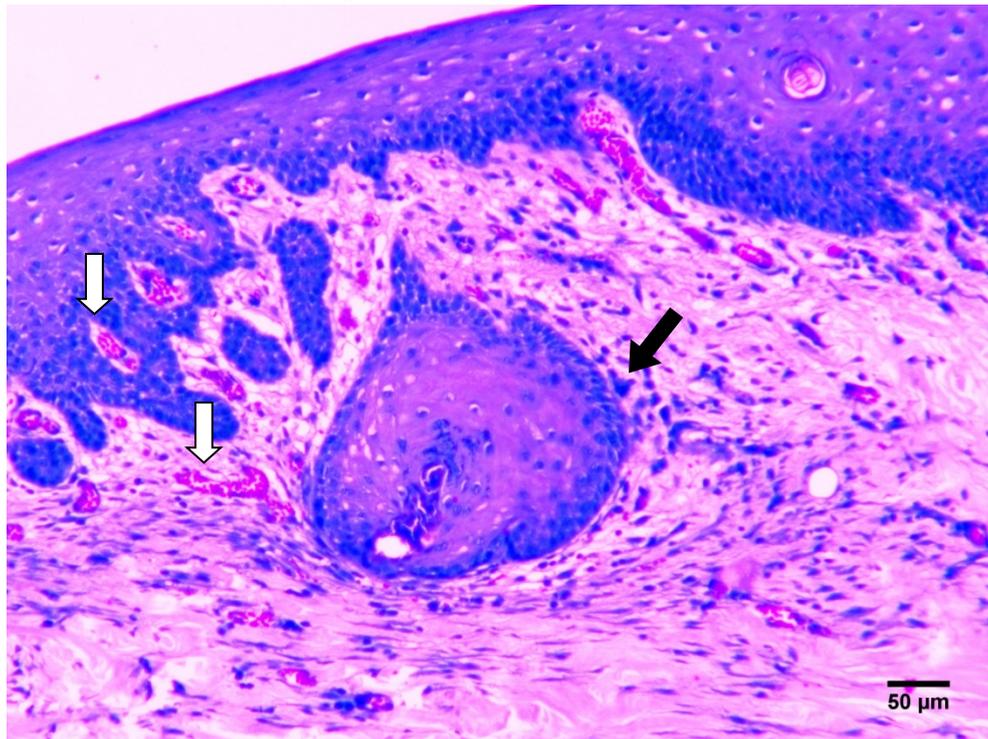


Figura 3. Grupo GC, 14 dias: Abaixo da epiderme observa-se leve infiltrado inflamatório predominantemente de células MN (seta escura), grande quantidade de capilares sanguíneos (angiogênese – seta clara) e moderada proliferação de fibroblastos.

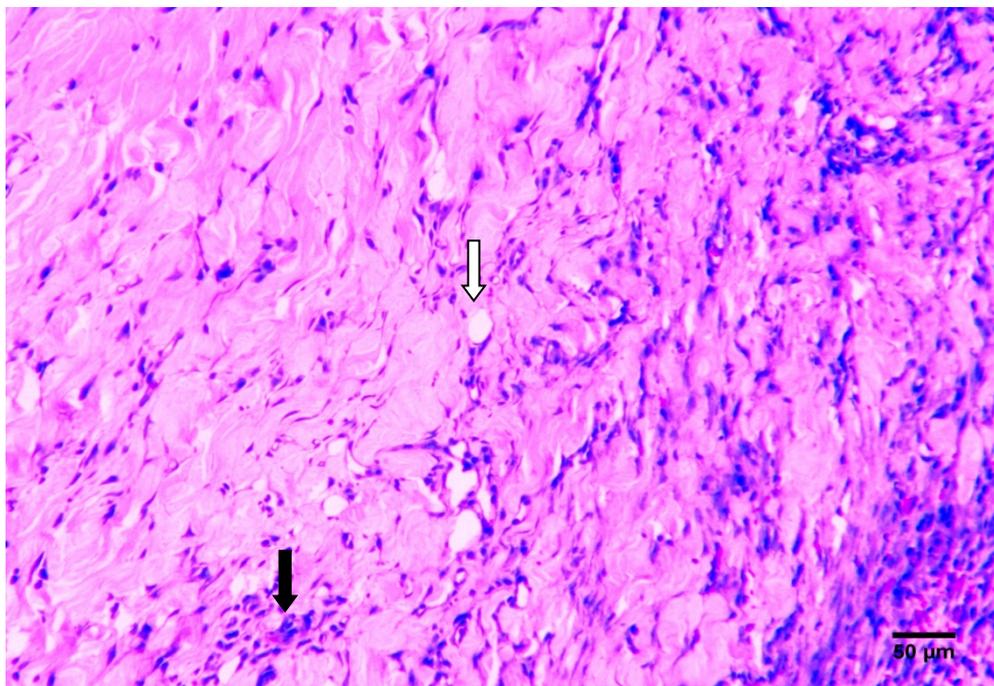


Figura 4. Grupo GD, 14 dias: Na derme profunda observa-se infiltrado inflamatório misto, composto por células MN e PMN (seta escura). Observa-se ainda discreta proliferação de fibroblastos e quantidade leve a moderada de capilares sanguíneos (angiogênese – seta clara).

Quando avaliado o GC (Fig. 3) abaixo da epiderme observou-se leve infiltrado inflamatório predominantemente de células MN, aditivado a grande quantidade de capilares sanguíneos (angiogênese) e

moderada proliferação de fibroblastos. Notou-se ainda uma maior integridade da epiderme, quando comparado ao grupo controle (GA).

Já o grupo GD, na derme profunda pode-se observar infiltrado inflamatório misto, composto por células MN e PMN leve a moderado difuso e presença de discreta proliferação de fibroblastos e quantidade leve a moderada de capilares sanguíneos (angiogênese).

CONCLUSÃO

A pesquisa demonstra que o biofilme utilizado em até sete dias na metodologia dérmica e intradérmica pode reduzir do processo inflamatório agudo e estimular a neoangiogênese. O material produzido apresentou-se maleável e modulador com capacidade de inserção dérmica e transdérmica. Sugerem-se novos estudos incluindo menor quantidade de polímeros aditivado a amido na produção do biodesativo e um tempo maior de avaliação tópica para compreensão dos efeitos da membrana sob o processo de cicatrização e inflamação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIENERT, M.; HOSS, M.; BARTNECK, B.; WEIN ANDY, S.; BÖBEL, M.; JOCKENHÖV, S.; KNÜCH EL, R.; POTTBACKER, K.; WÖLTJE, M.; JAHNE N-DECHENT, W.; NEUSS, S. Growth factor-functionalized silk membranes support wound healing in vitro. **Biomedical Materials**. p.1-23, 2017.

BOLSON, J.; SCHOSSLER, J.E., ORNES, R.C., MOTTIN, V., ALBERTI, T. Análise clínica, radiológica, macroscópica e histológica do úmero de codornas domésticas (*Coturnix japonica*), submetido ao implante da poliuretana derivada do polímero de mamona (*Ricinus communis*). **Ciência Rural**, v.35, n.5, p.1123-1130, 2005.

Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science, v. 48, n. 1, p. 62-72, 2011.

CAMILO, C.C. Escafoides para implantes ósseos em alumina/hidroxiapatita/biovidro: análises mecânica e in vitro. In: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 4., Caxambú. **Anais...** Caxambú: IV COLAQB, 2006. p.28-34, 2006.

CAPK, G. Chemistry of calcium phosphate bioceramics. In: Yamamuro, T. et al. **Handbook on bioactive ceramics**. Boca Raton, FL: CRC, V.II, p.31, 1990.

CAVALCANTI, A.O. Excipientes farmacêuticos: perspectivas dos polissacarídeos na pesquisa e desenvolvimento de novos sistemas de liberação. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, vol. 6, p. 53-56, 2002.

CUZZEL, J.; KRASNER, D. Curativos. In: Gogia P. **Feridas – tratamento e cicatrização**, Rio de Janeiro: Revinter. Cap. 9, p. 113-114, 2003.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras**. São Paulo: Atheneu, 2ed, Cap. 9, p. 200, 2007.

FERREIRA, A.S., BARBIERI, C.H.; MAZZER, N.; CAMPOS, A.D.; MENDONÇA, A.C. Mensuração de área de cicatrização por planimetria após aplicação do ultra-som de baixa intensidade em pele de rato. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 12, n. 5, p. 351-358, 2008.

FONSECA, N.; GOLDENBERG, S.; GOMES, P.O.; LIMA, A.P. Anestesia em coelho. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.11, p.82-104, 1996.

GONDAK, M. O. **Desenvolvimento de composto termoplástico – farinha de madeira – amido de milho para moldagem por injeção**. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica e de Materiais. Departamento de Pesquisa e Pós-Graduação, do Campus de Curitiba, da UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná Campus de Curitiba, PPGEM, 100f, 2005.

- GRIFFITH, L.G. Polymeric biomaterials. **Acta Materialia**, v.48, n.1, p.263-277, 2000.
- HASHEMI, S.S.; MAHMOODI, M.; RAFATI, A.R.; MANAFI, F.; MEHRABANI, D. The Role of Human Adult Peripheral and Umbilical Cord Blood Platelet-Rich Plasma on Proliferation and Migration of Human Skin Fibroblasts. **World Journal Plastic Surgery**. v.6, n.2; p.198-205, 2017.
- HEDLUND, C.S. Cirurgia do sistema tegumentar. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005.
- HOLMES, C.J. ; PLICHTA, J.K.; GAMELLI, R.L.; RADEK, K.A. Dynamic Role of Host Stress Responses in Modulating the Cutaneous Microbiome: Implications for Wound Healing and Infection. **Advances Wound Care (New Rochelle)**, v.4, n.1, p.24-37, 2015.
- HOLMES, T.C. Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v.20, n.1, p.132- 137, 2002.
- HUSSNI, C. A.; GIANINI, C. G.; ALVES, A.L.G.; NICOLETTI, J.L.M., THOMASSIAN, A.; CROCCI, A.J.; SEQUEIRA, J.L. Second intention skin wound healing in equines under vedaprofen treatment. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 87-92, 2004.
- KHARBUSH, R.J.; GUTWILLIG, A.; HARTZLER, K.E.; KIMYON, R.S.; GARDNER, A.N.; ABBOTT, A.D.; COX, S.K.; WATTERS, J.J.; SLADKY, K.K.; JOHNSON, S.M. Antinociceptive and respiratory effects following application of transdermal fentanyl patches and assessment of brain μ -opioid receptor mRNA expression in ball pythons. **American Journal veterinary research**, v.78, n.7, p.785-795, 2017.
- KUNA, V.K.; PADMA, A.M.; HÅKANSSON, J.; NYGREN, J.; SJÖBACK, R.; PETRONIS, S.; SUMITRAN-HOLGERSSON, S. Significantly Accelerated Wound Healing of Full-Thickness Skin Using a Novel Composite Gel of Porcine Acellular Dermal Matrix and Human Peripheral Blood Cells. **Cell Transplantation**, v.26, n.2, p.293-307, 2017.
- MANDELBAUM, S.H. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.78, n.5, Rio de Janeiro, 2003.
- MARQUES S.M.; CAMPOS, P.P.; CASTRO, P.R.; CARDOSO, C.C.; FERREIRA, M.A.; ANDRADE, S.P. Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. **Microvascular Research**, v.82: 246-252, 2011.
- MARQUEZ, R. R. Avaliação da ferida. In: **Gogia P. feridas – tratamento e cicatrização**, Rio de Janeiro: Revinter, Cap. 2, p. 11-23, 2003.
- NING, W.; JIUGAO, Y.; XIAOFEI, M.; YING, W. The influence of citric acid on the properties of thermoplastic starch/linear low-density polyethylene blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 3, p. 446-453, 2007.
- OLSSON, D.C.; MARTINS, V.M.V.; MARTINS, E.; MAZZANTI, A. Estimulação ultra-sônica pulsada e contínua no processo cicatricial de ratos submetidos à celiotomia. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.865-872, 2006.
- PEREIRA, A.M.; ARIAS, M.VB. Manejo de feridas em cães e gatos – revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 38, p. 33-42, 2002.
- POLLACK, M.; LEEUWENBURH, C. Apoptosis and aging: role of the mitochondria. **Journal Gerontology and Biological Science**, v.56, p. 475-482, 2001.
- PORTOU, M. J.; BAKER, D.; ABRAHAM, D.; TSUI, J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review. **Vascular Pharmacology**, v.76, p. 31-36, 2015.

- QUINN, PJ, MARKEY B K, CARTER ME. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- ROMO III, T.; MCLAUGHLIN, L. A . **Wound healing, skin**, 2003.
- ROMUALDI, P. ; SANTI, P.; CANDELETTI, S. Alghedon Fentanyl Transdermal System. **Minerva Medical**, v.108, n.2, p.169-175, 2017.
- ROSA, M.G.S.; PIPPI, N.L.; CASTRO, M.A.S. Transplante de pele pela técnica de semeadura em cães. **Ciência Rural**. v.13,n.2-3, p.203-209, 1983.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2 ed. Belo Horizonte :FEPMVZ, 2002, 265p.
- SANTOS, V.L.C.G . Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: Duarte YAO, Diogo MJD. **Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico**. São Paulo: Atheneu, p. 265-306, 2000.
- SHWEIKI, D.; ITIN, A.; SOFFER, D.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia – initiated angiogenesis. **Nature**, n.359, p.843-845, 1992.
- SILVA, J.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R.; DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p.125-131, 2010.
- TEIXEIRA, A.S.; ARAÚJO, F.A.; FERREIRA, M.A.N.D. Angiogenesis and inflammation in skeletal muscle in response to ascites tumor in mice. **Life Sciences**, v.78: 1637-1645, 2006.
- TRABELSI I, KTARI N, BEN SLIMA S, TRIKI M, BARDAA S, MNIF H, BEN SALAH R. Evaluation of dermal wound healing activity and in vitro antibacterial and antioxidant activities of a new exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp.Ca6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.8,n. 103, p. 194-201, 2017.
- TREICHEL, T.L.E.; DA CUNHA. M.G.M.C.M.; CUNHA, J.P.M.C.M.; SANTOS JUNIOR, E.B.; LEME JUNIOR, P.T.O.; COSTA, M.M.; PIPPI, N.L.; LOPES, S.T.A.; FIGHERA, R.A.; DA ROSA, M.B. Total fraction of mononuclear cell or stromal vascular fraction transplant associated with cellulosic membrane in experimental cutaneous wounds in rabbits.
- URURAHY, K.D.A.C.B. **Revisão de literatura-utilização de adesivo transdérmico de fentanil para controle da dor em pequenos animais**. Faculdade de Jaguariúna, 2010.
- VILLANOVA, J.C.O.; ORÉFICE, R.L. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, São Carlos, 23 v. 20, n. 1, 2010.
- YAMADA, B.F.A. Úlceras venosas. In: JORGE, S, A.; DANTAS, S.R.P.E. **Abordagem multiprofissional no tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, p. 247-259, 2003.