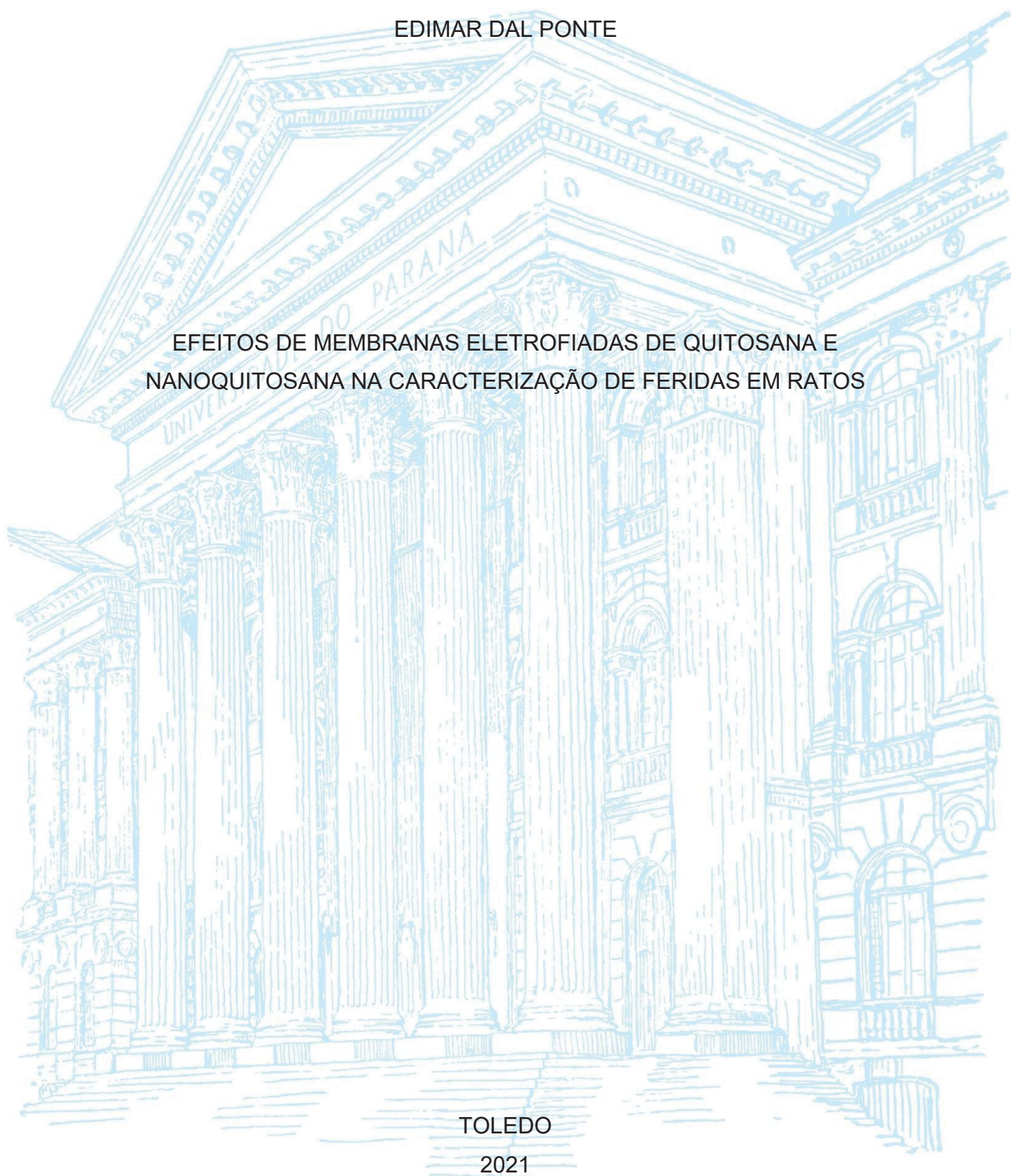


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDIMAR DAL PONTE

EFEITOS DE MEMBRANAS ELETROFIADAS DE QUITOSANA E
NANOQUITOSANA NA CARACTERIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS

TOLEDO
2021



EDIMAR DAL PONTE

EFEITOS DE MEMBRANAS ELETROFIADAS DE QUITOSANA E
NANOQUITOSANA NA CARACTERIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná- Setor Palotina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Bernardi Wenzel

Coorientador: Prof. Dr. Helton José Alves

TOLEDO

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

D136 Dal Ponte, Edimar
Efeitos de membranas eletrofiadas de quitosana e nanoquitosana na caracterização de feridas em ratos / Edimar Dal Ponte – Palotina, 2021.
80f.

Orientadora: Juliana Bernardi Wenzel
Coorientador: Helton José Alves
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

1. Cicatrização. 2. Feridas. 3. Eletrofiação. 4. Nanopartículas.
I. Wenzel, Juliana Bernardi. II. Alves, Helton José. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 615

Ficha catalográfica elaborada por Lilliane Cristina Soares Sousa – CRB 9/1736

TERMO DE APROVAÇÃO

EDIMAR DAL PONTE

EFEITOS DE MEMBRANAS ELETROFIADAS DE QUITOSANA E
NANOQUITOSANA NA CARACTERIZAÇÃO DE FERIDAS EM RATOS

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre, Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná. Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Profa. Dra Juliana Bernardi Wenzel

Orientadora – Pós -graduação em Biotecnologia - UFPR



Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski

Departamento Centro de Engenharias e Ciências Exatas – UNIOESTE



Prof. Dr. Marcelo Alves de Sousa

Curso de Medicina – Campus Toledo - UFPR

Toledo, 17 de dezembro de 2021.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado saúde, paciência, sabedoria e perseverança para buscar equilíbrio.

Agradeço de maneira imensurável aos meus pais Amarildo Dal Ponte e Maria Rosa Dal Ponte, eterna fonte de amor e motivação para que eu me torne uma pessoa cada vez melhor. Obrigado por todo sacrifício realizado, esse e todos os meus trabalhos dedico a vocês. Também a minha namorada e companheira Thays Zenô Chedlovski, que sempre me incentivou e sempre está do meu lado para que eu realize minhas conquistas.

Ao Prof. Dr. Douglas Cardoso Dragunski e aos discentes Camila Cordeiro, Gabriel Nardi e Leandro Couto da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela cessão e disponibilização dos equipamentos para eletrofiação e demais análises.

A Minha professora e orientadora Juliana Bernardi Wenzel pelos ensinamentos, aprendizado e sua dedicação na condução e orientação deste estudo.

Ao Me. Rafael Messias Luiz pela iniciação do manejo dos animais e colaboração dos processos cirúrgicos.

Aos acadêmicos do curso de Medicina da UFPR – Campus Toledo Alexia de Almeida Ignatowicz, Eduardo dos Santos Sônego, Gabriel Raio Volpato, João Vitor Taffarel e Priscila Takahashi que auxiliaram no manejo dos animais e nos procedimentos cirúrgicos.

Aos alunos Felipe Silva e Marcos Antônio Polinarski do Setor Palotina da UFPR que colaboraram com a produção da quitosana e nanoquitosana e com as análises de MEV.

À empresa Prati- Donaduzzi por disponibilizar horas de trabalho para que pudesse realizar este mestrado.

Não encontre defeitos,
Encontre soluções.
Qualquer um sabe queixar-se!
Henry Ford

RESUMO

A evolução da tecnologia com a utilização de biomateriais para curativos possibilitou um tratamento do reparo tecidual da ferida, a fim de oferecer a proteção contra infecções e traumas, deixando o ambiente úmido, diminuir o número de trocas dos curativos, reduzir o quadro algico, proporcionar maior conforto para os indivíduos, além de favorecer a liberação de substâncias bioativas. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura sobre o uso de nanopartículas na cicatrização de feridas e eletrofiar membranas de quitosana, quitosana com ácido hialurônico, nanoquitosana e nanoquitosana com ácido hialurônico foram eletrofiadas e seu efeito na cicatrização de feridas de pele em ratos foi avaliado pela aplicação destas sobre feridas dorsais de 8mm. A literatura demonstra a utilização da nanotecnologia, que utiliza compostos em escala nanométrica para a dispersão ou atuação em diferentes processos, como um importante recurso na cicatrização de feridas. Além de atuarem sozinha, dependendo do polímero, as nanopartículas também podem ser carreadoras de moléculas com atividades biológicas. Para sua utilização na cicatrização de feridas, é importante que a nanopartícula apresente, além dos efeitos desejáveis na cicatrização da ferida, biocompatibilidade e preferencialmente, biodegradabilidade. A aplicação destas nanopartículas na forma de gel, suspensão, solução, filmes ou membranas podem contribuir para a aceleração do processo de cicatrização de feridas. A avaliação do efeito cicatrizante foi realizada pelo acompanhamento da redução do diâmetro das lesões, porcentagem de retração das feridas e análise histológica dos tecidos por 21 dias, sendo realizados seis tratamentos: G1: NaCl 0,9% (soro fisiológico); G2: NaCl 0,9% + membrana eletrofiada de quitosana a 4% + PEO a 1%; G3: NaCl 0,9% + membrana eletrofiada de nanoquitosana a 4% + PEO a 1%; G4: NaCl 0,9% + membrana eletrofiada de quitosana a 3% + PEO a 1% + ácido hialurônico 1%; G5: NaCl 0,9% + membrana eletrofiada de nanoquitosana a 4% + PEO a 1% + ácido hialurônico 1%; G6: NaCl 0,9% + curativo hidrocoloide comercial. As membranas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, atividade antimicrobiana e análises mecânicas. As membranas de nanoquitosana com ácido hialurônico (G5) obtiveram maior espessura, diâmetro e uniformidade das fibras, resistência, elasticidade e estabilidade térmica, apresentando resultados superiores aos demais tratamentos, com retração de 73,8 % da ferida até o sétimo dia de avaliação. A quitosana como nanopartícula e em especial associada ao ácido hialurônico mostrou-se mais promissora para a produção de membranas para a cicatrização de feridas cutâneas, especialmente para aplicação até o sétimo dia do tratamento.

PALAVRAS-CHAVES: Cicatrização. Feridas. Eletrofiação. Nanopartículas.

ABSTRACT

Evolution of technology with the use of biomaterials for dressings made it possible to treat wound tissue repair, in order to offer protection against infections and traumas, leaving the environment moist, reducing the number of dressing changes, reducing pain, providing greater comfort for individuals, in addition to favoring the release of bioactive substances. The objective of this work was to carry out a literature review on the use of nanoparticles in wound healing and electrospinning membranes of chitosan, chitosan with hyaluronic acid, nanochitosan and nanochitosan with hyaluronic acid were electrospun and their effect on the healing of skin wounds in rats was evaluated by applying these to 8mm dorsal wounds. The literature demonstrates the use of nanotechnology, which uses nanometer-scale compounds for dispersion or action in different processes, as an important resource in wound healing. In addition to acting alone, depending on the polymer, nanoparticles can also be carriers of molecules with biological activities. For its use in wound healing, it is important that the nanoparticle presents, in addition to the desirable effects on wound healing, biocompatibility and preferably, biodegradability. The application of these nanoparticles in the form of gel, suspension, solution, films or membranes can contribute to the acceleration of the wound healing process. The evaluation of the healing effect was performed by monitoring the reduction of the diameter of the lesions, percentage of wound retraction and histological analysis of the tissues for 21 days, with six treatments: G1: NaCl 0.9% (saline); G2: 0.9% NaCl + 4% chitosan electrospun membrane + 1% PEO; G3: 0.9% NaCl + 4% nanochitosan electrospun membrane + 1% PEO; G4: 0.9% NaCl + 3% chitosan electrospun membrane + 1% PEO + 1% hyaluronic acid; G5: 0.9% NaCl + 4% nanochitosan electrospun membrane + 1% PEO + 1% hyaluronic acid; G6: 0.9% NaCl + commercial hydrocolloid dressing. Membranes were characterized by scanning electron microscopy, antimicrobial activity and mechanical analysis. The nanochitosan membranes with hyaluronic acid (G5) obtained greater thickness, diameter and uniformity of the fibers, resistance, elasticity and thermal stability, presenting superior results to the other treatments, with retraction of 73.8% of the wound until the seventh day of evaluation. Chitosan as a nanoparticle and in particular associated with hyaluronic acid showed to be more promising for the production of membranes for the healing of skin wounds, especially for application until the seventh day of treatment.

KEYWORDS: Healing. Wounds. Electrospinning. Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

CÁPITULO 1

FIGURA 1 - Classificação dos curativos baseados em diferentes tipos de fibras. 46

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)..... 44

FIGURA 2 - MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS FIBRAS DAS MEMBRANAS ELETROFIADAS..... 45

FIGURA 3 - FERIDAS CUTÂNEAS..... 48

FIGURA 4 – Evolução histológica das feridas, coradas com HE (aumento de 400 x). 52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CALORIMETRIA DAS MEMBRANAS ELETROFIADAS DE QUITOSANA, QUITOSANA COM ÁCIDO HIALURÔNICO, NANOQUITOSANA E NANOQUITOSANA COM ÁCIDO HIALURÔNICO	46
TABELA 2 – VALORES DOS RESULTADOS OBTIDOS DAS ANÁLISES MECÂNICAS DAS MEMBRANAS DE NANOQUITOSANA E NANOQUITOSANA COM ÁCIDO HIALURÔNICO	47
TABELA 3 –VALORES MÉDIOS DAS ÁREAS DAS FERIDAS E PORCENTAGEM DE RETRAÇÃO DAS FERIDAS DE RATOS TRATADAS COM MEMBRANAS ELETROFIADAS DE QUITOSANA E QUITOSANA COM ÁCIDO HIALURÔNICO	49
TABELA 4 – VALORES MÉDIOS DAS ÁREAS DAS FERIDAS E PORCENTAGEM DE RETRAÇÃO DAS FERIDAS DE RATOS TRATADAS COM MEMBRANAS ELETROFIADAS DE NANOQUITOSANA E NANOQUITOSANA COM ÁCIDO HIALURÔNICO.....	50

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1 INTRODUÇÃO	13
2 TIPOS DE FERIDAS	16
3 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	18
4 TIPOS DE CURATIVOS	21
5 NANOPARTICULAS COM POTENCIAL PARA CICATRIZAÇÃO	26
6 NANOPARTICULAS DE QUITOSANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	27
7 REFERÊNCIAS	31
CATÍTULO 2	37
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES	41
2.2 ELETROFIAÇÃO DAS MEMBRANAS	42
2.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOFIBRAS	42
2.3.1 MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA (MEV)	42
2.3.2 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERÊNCIAL – DSC	42
2.3.3 ANÁLISES MECÂNICAS	42
2.4 ANÁLISE ANTIMICROBIANA	43
2.5 POTENCIAL CICATRIZANTE EM ANIMAIS	43
2.5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	45
3 RESULTADOS	46
4 DISCUSSÃO	55
5 CONCLUSÃO	62
6 REFERÊNCIAS	62

CAPÍTULO 1 - Artigo a ser submetido a revista Ciência, Cuidado e Saúde

Uso da nanoquitosana no reparo e tratamento de feridas cutâneas: uma revisão de literatura

Edimar Dal Ponte^a, Helton J. Alves^a e Juliana Bernardi-Wenzel^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

RESUMO

Introdução: A utilização de biomateriais para curativos possibilitou a evolução de uma ferramenta para auxílio no reparo tecidual das feridas, proporcionando um microambiente adequado, com redução do número de trocas dos curativos e melhora do quadro algico, por meio da liberação de substâncias bioativas. **Objetivo:** realizar uma revisão de literatura sobre as feridas cutâneas e a utilização de nanoquitosana no desenvolvimento de curativos. **Desenvolvimento:** Foram consultadas as bases de dados Pubmed e Web of Science para a pesquisa de artigos. A literatura enfatiza as características das lesões de pele e o importante processo de cicatrização tecidual, com reações bioquímicas e celulares que tem por finalidade induzir reparo. Durante o processo de restabelecimento completo do tecido, pode ocorrer desestruturação tecidual, desencadeando cicatrizes hipertróficas e queloides. Essas situações dependem do tamanho da lesão, condições imunológicas e perfil do paciente. Assim, curativos vêm sendo desenvolvidos com diferentes tecnologias para acelerar o processo de cicatrização e devem atuar na higienização, desbridamento, controle de crescimento microbiano, manejo do exsudato, incentivo à granulação e a reepitelização. Os materiais utilizados na produção destes curativos devem apresentar estas atividades e biocompatibilidade. A aplicação de materiais nanoparticulados estão demonstrando-se promissores nessa função, pois além das características do próprio material, seu tamanho facilita sua dispersão nos tecidos. A quitosana é um polissacarídeo obtido principalmente da carapaça de crustáceos e que apresenta atividades antimicrobiana, anticoagulante, imunoestimulante, gera rápida regeneração dérmica e estimula o processo de cicatrização. Aplicada na forma de nanopartícula, pode apresentar potencial promissor na cicatrização de feridas cutâneas. **Conclusão:** Conclui-se com a pesquisa a importância e o benefício exibido por nanopartículas, visto que atende vários critérios no processo de cicatrização de feridas, diminuindo a lesão e colaborando nos aspectos reparatórios.

PALAVRAS-CHAVE: Cicatrização, curativos, nanopartículas, biopolímeros.

1. Introdução

A pele é o maior órgão do corpo humano e possui importante função de proteger o organismo do ambiente externo. Sua atuação de barreira contra meios nocivos previne a entrada de patógenos (1). Além disso, a pele atua em muitas funções vitais, incluindo a regulação da temperatura, imunidade contra microrganismos, manutenção do equilíbrio eletrolítico, bem como proteção contra lesões físicas, agentes químicos e radiação ultravioleta. Também se configura como via importante para administração e absorção de medicamentos (2).

As lesões cutâneas crônicas representam àquelas que não se enquadram à um processo de cicatrização organizado estando expostas há mais de trinta dias. Estes tipos de lesões frequentemente podem ulcerar e estar sujeitas a passar por infecções bacterianas que comprometem a cicatrização de feridas (3).

Com o alto custo com procedimentos para cicatrização de lesões cutâneas, estudos pela busca de fármacos e curativos que atuam no tecido lesionado, com a finalidade de diminuir os valores nos tratamentos e aumentar os estímulos para cicatrização são muito importantes. Diversas pesquisas foram realizadas com o intuito de buscar compostos eficientes no processo de reparação. Assim, a procura por materiais que estimulassem a ação angiogênica, que promovessem atividade direta na cicatrização e reduzissem o tempo de cura de lesões intensificou-se (4).

De acordo com (5) o recurso para cicatrização das feridas exige pesquisas e métodos com resultados diferenciais com intervalos de tempo reduzido através da utilização de substâncias no tratamento de lesões. Na maioria das vezes são utilizados fatores empíricos, ineficazes e nocivos a período de cicatrização. O progresso da tecnologia traz resultados benéficos, proporcionando grande evolução no processo de reconstrução do tecido lesionado e características recorrentes a sua lesão.

Os curativos para lesões cutâneas executam um papel fundamental no processo da reparação de feridas. Eles preservam a lesão de agentes de risco externos e agilizam o processo de reparação. Com suporte no mecanismo de regeneração das lesões, um curativo adequado deve conter como suas

principais características: absorção do excesso de exsudado; amparar a lesão de infecção microbiana; conservar uma base de cicatrização umedecida no local da lesão; favorecer a troca gasosa; não possui toxicidade, biocompatível e degradável; não adere na ferida, praticidade para remoção e substituição; proporcionar angiogênese e reestruturação de tecidos (3).

Geralmente, as lesões cutâneas são minimizadas pela resposta fisiológica, porém, as causas sistêmicas ou regiões específicas podem colaborar para o retardo da cicatrização. Deste modo a flexibilidade de reparadores que possam cooperar para esses resultados é de extrema importância (6). Apesar de haver uma diversidade de curativos para feridas no mercado, lesões altamente exsudativas são difíceis de cicatrizar, pois os curativos não podem inibir de forma eficiente a invasão microbiana da ferida.

Muitos fármacos e biomateriais são utilizados para acelerar o processo de cicatrização, sendo eles os ácidos graxos essenciais, alginato de cálcio, anti-sépticos e detergentes, bandagens para compressão, carvão ativado e prata, filmes semi-permeáveis, colágeno biológico, fator de crescimento celular, hidropolímeros, hidrogel, hidrocoloides, enzimas proteolíticas, sulfadiazina de prata, acetato de celulose permeável ao vapor, protetores cutâneos, membranas permeáveis ao vapor e curativos com gaze (7).

A maioria desses avanços englobam a nanotecnologia, ciência de empregar matéria em escala atômica e molecular para a evolução de novos artigos, tem estimulado o interesse de cientistas das mais variadas áreas em todo o mundo, pelo fato do seu grande potencial ainda por ser explorado completamente. Pesquisa desta tecnologia envolvem partículas com dimensões menores que 100 nm e podem ser utilizadas no reparo tecidual de ferida, podendo oferecer a proteção contra infecções e traumas, manter o ambiente úmido, diminuir o número de trocas dos curativos, redução do quadro alérgico, proporcionar maior conforto para os indivíduos, além de favorecer a liberação de substâncias bioativas (8,9).

Os polímeros naturais cresceram como possíveis novos reparadores, pois são fáceis de serem obtidos, apresentam propriedades antimicrobianas e antecipam o processo de cicatrização por motivo da colaboração na proliferação celular (10). De acordo com (11), para tornar mais eficaz o potencial de cicatrização de um curativo, diversas estratégias já foram

empregadas, entre elas, o uso de antibióticos e nanopartículas que apresentam uma maior biocompatibilidade e biodegradabilidade (12).

Portanto, o presente estudo tem o objetivo de abordar o avanço da tecnologia na produção e aplicação de curativos para cicatrização de feridas, abrangendo estudos que mostram a importância da quitosana e suas nanopartículas.

2. Tipos de feridas

Ao atuar como barreira entre o corpo e o ambiente externo, a pele está constantemente exposta a potenciais injúrias e, portanto, a cura de feridas de pele é um processo vital para a sobrevivência (13). Feridas podem ser definidas como uma injúria ou ruptura da estrutura anatômica e funcional de um órgão, sendo resultado de danos físicos, químicos, mecânicos e/ou térmicos (1). As causas podem ser variáveis, incluindo cirurgias, lesões, fatores extrínsecos (como pressão, queimaduras e cortes) ou condições patológicas como diabetes e doenças vasculares. (14).

A classificação das feridas, de maneira geral, pode ser feita de três maneiras diferentes: quanto à etiologia, complexidade e tempo de existência (15). Já as causas das feridas podem ser diversas, podendo estar relacionadas com fatores extrínsecos, como lesões traumáticas provocadas por agentes físicos, químicos ou biológicos, ou por fatores intrínsecos, como feridas crônicas resultantes de neoplasias, distúrbios metabólicos e doenças vasculares (16).

A classificação quanto à complexidade varia entre autores, mas (17) definiram alguns critérios para definir uma ferida como complexa. Nesse aspecto, a lesão deve possuir ao menos um dos seguintes aspectos, sendo: I - perda extensiva de tegumento, independente se a ferida é aguda ou crônica; II - infecção como uma complicação da ferida; III - comprometimento da viabilidade dos tecidos superficiais, o que pode ser revelado pela presença de necrose, sinais de má vascularização, dentre outros; IV - associação com algumas patologias que fazem com que feridas normais falhem em seu processo de cicatrização. Os autores ainda mencionam alguns exemplos de feridas complexas que são mais comuns: úlceras de pressão, feridas nas extremidades inferiores em pacientes diabéticos, úlceras venosas crônicas,

feridas relacionadas a vasculites e terapia imunossupressora que não cicatrizarem com cuidados simples e feridas associadas a necrose causada por infecção.

Ademais, existem ainda outros aspectos a serem classificados em uma ferida, como o grau de contaminação do ferimento, sendo dividido entre feridas limpas, contaminadas e infectadas. As primeiras são aquelas que não possuem sinais de contaminação e menos de 6 horas até o atendimento, sendo fechadas por suturas. Já as feridas contaminadas são aquelas que não possuem sinais de contaminação e mais de 6 horas até o atendimento, de modo que podem ser fechadas por suturas após um criterioso preparo do leito da ferida. A prescrição de antibióticos para este tipo de ferida está indicada em determinados casos. Por fim, as feridas infectadas são aquelas que possuem intenso processo inflamatório e infeccioso, de maneira que a sutura não está indicada neste momento. A infecção deve ser controlada por meio de antibióticos tópicos e/ou sistêmicos (18).

Outro aspecto relevante que pode ser caracterizado em uma ferida é o exsudato. O termo exsudato refere-se à saída de líquidos orgânicos através das paredes dos vasos e das membranas celulares (16), produzido em resposta ao dano tecidual. A quantidade a ser produzida depende do gradiente de pressão entre os tecidos. Uma ferida que evolui pelo ciclo normal de cicatrização produz exsudato suficiente para promover proliferação celular e auxiliar no processo de remoção de tecido desvitalizado por meio da autólise. Nessas feridas que está cicatrizando, a produção de exsudato geralmente se reduz com o tempo. Por outro lado, em feridas que não cicatrizam, a produção de exsudato continua de forma excessiva devido a inflamação e a infecção presentes (19). Há muitas classificações para os tipos de exsudato, mas a *World Union of Wound Healing Societies* (20) divide em oito categorias: seroso, serosanguinolento, sanguinolento, seropurulento, fibrinoso, purulento, hemo purulento ou hemorrágico.

Uma outra maneira de classificar as feridas é quanto à sua profundidade. É uma divisão mais comumente utilizada para avaliar ferimentos por queimaduras, mas que pode ser estendida a outros tipos de feridas (21). Nesse aspecto, podemos dividir em quatro categorias - superficial, dérmica superficial, dérmica profunda e de espessura total. A primeira refere-se àquela

que afeta somente a epiderme. A dérmica superficial afeta a epiderme e as camadas superiores da derme e está associada à formação de bolhas. A dérmica profunda afeta a epiderme e as camadas mais profundas da derme, mas sem afetar toda a derme. Estas três primeiras são classificadas como de profundidade parcial. Já a última, de espessura total, é aquela que acomete todas as camadas da pele e os tecidos subcutâneos (22).

A definição das bordas e limites das feridas são outro aspecto relevante na classificação de feridas. Nesse aspecto, os limites anatômicos são definidos pelo leito, pelos bordos/bordas, pelas margens e pela pele perilesional. O leito é área central da ferida, vascularizada, preenchida por tecidos de granulação e/ou necrose, cuja extremidade é limitada pelos bordos (contorno interno da ferida), onde inicia a etapa da epitelização. A margem funciona como um contorno externo da ferida e limite anatômico entre os bordos e a pele perilesional (16).

Há ainda algumas ferramentas utilizadas para a avaliação de feridas, sendo a ferramenta TIME, uma delas. Esta ferramenta apresenta como objetivo ser implementada no cuidado às feridas, garantir a avaliação e permitir estabelecer intervenções visando a promoção da cicatrização e considerar diferentes parâmetros avaliados (23).

A rápida restauração das condições fisiológicas homeostáticas é um pré-requisito para o reparo completo da lesão. Visto que um reparo lento e incorreto pode causar sérios danos incluindo a perda de pele e anexos, estabelecimento de infecção, ocorrência de doenças dermatológicas, lesões no aparelho circulatório e, em casos graves, morte do tecido (24). Quando a pele está ferida, vários tipos de células das três camadas da pele precisam atuar em estágios precisos para possibilitarem a cura (25).

3. Processo de cicatrização

O processo natural de cicatrização da pele é complexo e contínuo. Requer uma sequência de eventos bioquímicos e celulares, cuja adequada sinergia determinará a concretização do processo ou sua permanência em um estado crônico (26). Embora a pele humana possua elevado potencial de autorregeneração, esta pode estar dificultada em alguns pacientes e em certas extensões de injúria, a feridas crônicas que eventualmente resultam em

amputações e até mesmo mortalidade, tendo a capacidade de cura associada tanto pela natureza e grau dos processos patológicos, quanto pelo estado do hospedeiro e do ambiente (14).

De acordo com (27), quando há formação de uma lesão ou ferida, a pele necessita de uma restauração tissular baseada em dois processos, que são a regeneração e a cicatrização. Na regeneração ocorre alteração do tecido danificado e produção de um tecido novo, com as mesmas proporções, por meio de um processo inflamatório agudo. Esse processo ocorre no período em que a camada basal está danificada, com a aproximação das extremidades epiteliais no sentido ao meio da lesão, vedando ligeiramente sua superfície. A cicatrização, por sua vez, ocorre quando há uma lesão mais excessiva nos tecidos da pele, e há incapacidade de reparação das condições epiteliais, dos quais a cicatrização acontece com degradação de colágeno.

A fase inicial da cicatrização de lesões é a hemostasia, onde inicialmente as plaquetas sanguíneas se espalham com ruptura dos vasos sanguíneos, formando o tampão plaquetário, seguido da segunda fase na qual ocorre a ativação da cascata de coagulação, que atua por meio da via intrínseca e extrínseca para converter a protrombina em trombina, a qual cliva o fibrinogênio solúvel em fitas insolúveis que compõem a malha de fibrina. Por fim, o tampão plaquetário e a malha de fibrina interagem para formar um trombo, sendo este importante na prevenção do sangramento, bem como fornecimento de uma matriz provisória para a infiltração de outras células nas fases subsequentes da cicatrização (28,25).

A fase inflamatória da cicatrização é o primeiro processo após a pele ser lesionada (que dura cerca de três a seis dias após a instalação da lesão), na qual ocorre vasodilatação, migração celular e liberação de substâncias que irão atuar no desbridamento inicial da lesão e a estimular a mitose. A resposta inflamatória resultante serve não apenas para remover corpos estranhos, bactérias e tecidos endógenos danificados, mas também secretar quimiocinas e fatores de crescimento para atrair ainda mais células (29,30). As citocinas liberadas no processo de recuperação das feridas promovem a cicatrização por várias vias, estimulando a produção de componentes da membrana basal, evitando a desidratação, aumentando a inflamação e a formação de tecido de granulação (31). Os fatores de crescimento são liberados por uma variedade

de células ativadas no local da lesão e possuem importante papel na medida em que estimulam a proliferação e migração de queratinócitos, células epidérmicas, fibroblastos e células endoteliais, além de recrutar outros tipos celulares variados ao sítio de injúria (32).

A fase seguinte é a proliferativa que também se denomina a fase de formação do tecido granular (que dura do terceiro dia até cerca de três semanas após o estabelecimento da lesão) é caracterizada pelo aparecimento de fibroblastos e produção de nova matriz extracelular, composta principalmente de colágeno para reconstruir o tecido. Paralelamente, há formação de novos vasos sanguíneos pela ativação de células endoteliais, intermediada pelos fatores de crescimento liberados por macrófagos pró-angiogênicos e de tecido de granulação. Esse processo de neovascularização é essencial para a eficiência do processo de cicatrização da ferida, ao fornecer oxigênio e nutrientes que permitem a proliferação celular e, conseqüentemente, a regeneração tecidual (26).

O tecido de granulação formado na fase proliferativa serve como suporte para outras células e componentes extracelulares e é constituído em sua maior parte por fibroblastos ativados, células inflamatórias e capilares neoformados. (30). A reepitelização envolve a proliferação e migração de células epidérmicas, bem como de queratinócitos, presentes nas bordas da lesão. O reparo da camada epidérmica envolve ainda a reconstrução dos anexos da pele, a partir de células-tronco residentes, bem como pela diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, que também auxiliam na contração da ferida (25).

Por fim, no processo de remodelamento, a composição da matriz se altera (29). Há regressão da neovasculatura e reconstituição do tecido de granulação em tecido cicatricial, sendo que todas as etapas iniciadas anteriormente terminarão quando ocorrer a formação da cicatriz. A maturação do colágeno se inicia na primeira semana após a lesão, continuando por 12 a 18 meses. Nesse estágio de remodelamento, o tecido de granulação sofre síntese simultânea de colágeno tipo I, mais forte, e lise de colágeno tipo III, decorrentes respectivamente da ação de fibroblastos e enzimas líticas (colagenases e proteinases) (27,25,33).

As feridas agudas são capazes de curar por progressão oportuna através dos estágios normais da cicatrização. No entanto, existem circunstâncias fisiopatológicas complexas e multifatoriais que levam as feridas crônicas a passar por um processo de cura prolongado em um ou mais dos estágios descritos, ou falham em cicatrizar e frequentemente se contaminam e geralmente não cicatrizam devido a traumas repetidos na área lesada ou condições fisiológicas subjacentes (24).

Há de se considerar ainda, além dos fatores locais, fatores sistêmicos que podem afetar as etapas envolvidas no processo de cicatrização. Entre eles, a idade, condições de estresse psicológico, isquemia, doenças subjacentes, obesidade, deficiência nutricional, uso de medicações, tabagismo, alcoolismo e imunossupressão (34).

Portanto, a complexidade e a participação de múltiplos fatores no processo de cicatrização, demanda um adequado manejo no tratamento de lesões cutâneas, o qual deve levar em consideração as características da ferida e as condições individuais do paciente (29).

4. Tipos de curativos

O tratamento das feridas pode ser feito a partir de métodos clínicos ou cirúrgicos. Quando se trata de método clínico o tratamento mais comumente utilizado é o uso de curativos. Pela limpeza e aplicação de um material sobre o ferimento esses curativos consistem em um meio terapêutico que busca proteger, absorver e drenar o leito da ferida com o objetivo de facilitar a resolução dessa (15). Esse tipo de cobertura pode, dependendo da ocasião, ser utilizada como tratamento definitivo ou etapa intermediária do tratamento (35).

Segundo (36) os curativos se apresentam de diversas formas e uma única forma de apresentação desses não possui todas as características necessárias para ser aplicado em todos os tipos de ferida de pele. Além disso, para esse autor a antiga discussão entre o uso de curativos secos ou úmidos hoje foi substituída pela certeza de que se deve manter o meio úmido durante a cicatrização.

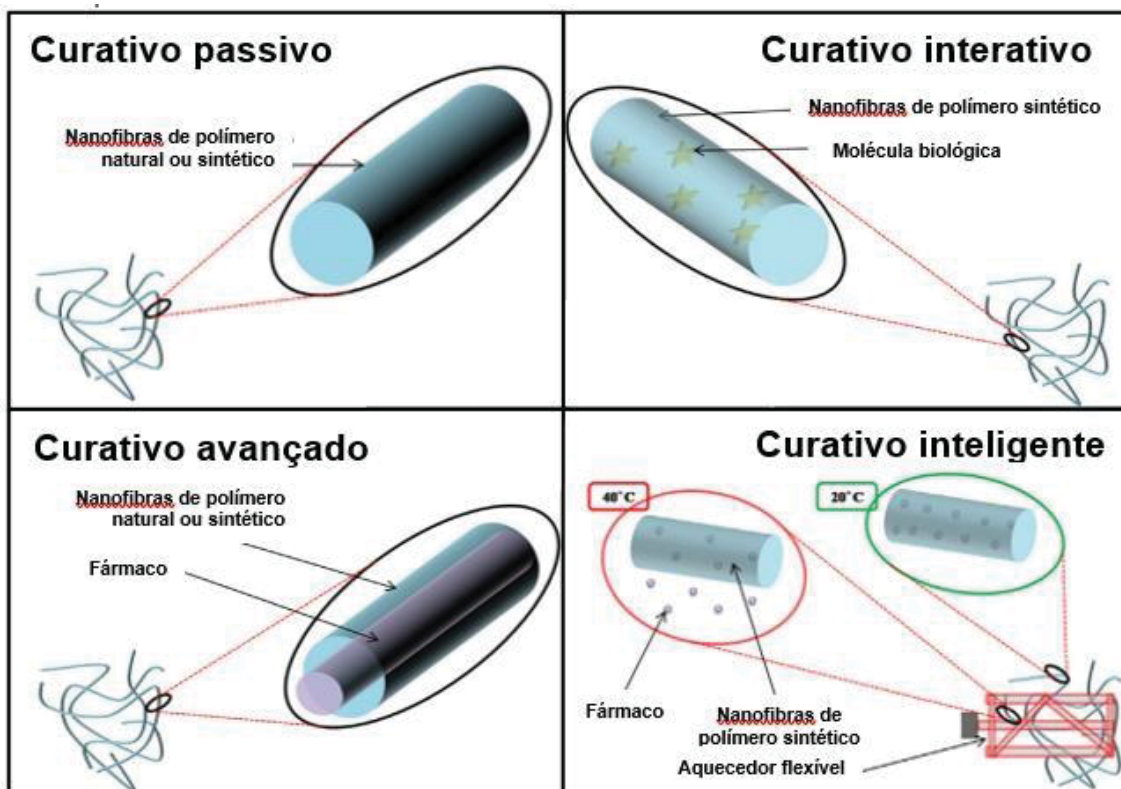
Os curativos mais utilizados são os agem especificamente na reparação passiva da lesão, fazendo a separação do meio externo. Porém, a reparação

satisfatória é aquela que além de segregar a lesão, melhora o processo de cicatrização, proporciona um meio apto a beneficiar a geração do tecido de granulação cicatricial, conservar a hidratação, manejo térmico, remoção do exsudato inflamatório e mantendo as trocas gasosas. Diversos meios alternativos tendem encontrar o melhor processo para cicatrização, algo que proporcione a reconstituição do epitélio lesionado. Especialmente os que exibem na composição os polissacarídeos com ação biológica comprovada, e que demonstram grande destaque nos procedimentos de reparações das lesões (37).

Os compostos presentes nos curativos, que são aplicados em diversos processos de reparação das lesões, têm por finalidade a ação de higienização, desbridamento, controle de crescimento microbiano, manejo do exsudato, incentivo à granulação e a reepitelização (38).

Neste sentido, os curativos podem ser classificados em quatro tipos: curativos passivos, interativos, avançados e inteligentes. Os curativos passivos são aqueles voltados a realizar apenas a cobertura da ferida, permitindo que ela realize o processo natural de restauração tecidual, sendo os mais utilizados a gaze, algodão e esparadrapo. Os curativos interativos são os que apresentam um polímero sintético associado a uma molécula biológica que tenha ação antimicrobiana e quando ainda associados a um fármaco são classificados como curativos avançados. Já os curativos inteligentes são aqueles que favorecem o processo cicatricial como os demais, porém são dotados de sensores que podem liberar compostos de acordo com alterações específicas detectadas na ferida, como a alteração de temperatura. Estes curativos alteram o ambiente interno da ferida e gera, estímulo aos sinalizadores endógenos responsáveis por organizar o reparo dessa (39).

Os diferentes tipos de curativos produzidos com nanofibras estão representados esquematicamente na Figura 1.



FONTE: Adaptado de De Vries (2018).

Figura 1: Classificação dos curativos baseados em diferentes tipos de fibras. Curativos passivos, que realizam a cobertura da ferida; interativos que associam um polímero sintético a uma molécula biológica e os avançados que ainda apresentam um fármaco associado e os curativos inteligentes que apresentam sensores para atuar de maneira dinâmica, de acordo com as variações no leito da ferida (40).

Assim, independente da ação dos curativos, estes podem ser aplicados de diferentes formas sobre as feridas como: bandagens, membranas ou esponjas, filmes, hidrogéis, hidrocoloides, fibras e nanofibras. Cada um aplicado a um tipo diferente de ferida e com desempenho mais ou menos eficiente, dependendo da combinação do material e forma em que são utilizados (36).

Segundo (41) curativos de filme semipermeável são aqueles permeáveis a gás, mas impermeável a líquidos e bactérias. Esses curativos são formados a partir de filmes de poliuretano o que os torna adaptáveis e adesivos, além da transparência que permite a inspeção da ferida sem a retirada do curativo. Apresentaram ainda a redução da dor como vantagem para o uso desse curativo, todavia, apresenta como desvantagens a necessidade de remoção traumática e o acúmulo de exsudato quando utilizado em feridas altamente exsudativas (42).

Curativos hidrocoloides, por sua vez, são curativos que contém agentes formadores de gel como gelatina, entre outros. Em contato com o exsudato da ferida esses curativos absorvem o líquido e formam um gel que ajudará a manter o leito da ferida úmido, além disso, essa propriedade facilita o desbridamento autolítico da lesão (43).

Como vantagens desse curativo a redução da frequência de troca para até uma semana (43), devido a propriedade oclusiva, mantém a umidade e fornece uma barreira contra água, oxigênio e microrganismos, favorece a angiogênese e granulação do tecido e possibilita sua retirada de maneira indolor (44).

Curativos de hidrogel, segundo (41), são curativos semioclusivos compostos de polímeros hidrofílicos complexos com alto teor de água (90%). Possuem como função a hidratação da ferida, reidratação da escara e auxílio no desbridamento autolítico. Curativos hidrocoloides possuem duas camadas é recomendado para lesões com baixa formação de exsudato. Os cremes são mais utilizados para desinfetar a ferida desde que seja trocado frequentemente, pois participa da regeneração dos tecidos. As membranas porosas participam da migração e crescimento celular e possuem propriedades mecânicas adequadas para funções como reparos dérmicos, é derivado de fontes renováveis, biodegradável e biocompatível (45).

As vantagens desse método de curativo são permitir um leito da ferida úmida, que auxilia na migração celular, absorção de exsudato e desbridamento autolítico (46). (47) aponta como desvantagem do método a pobre barreira contra bactérias que esse tipo de curativo apresenta.

Existem também curativos com princípio ativo que possuem ação tópica dependendo da composição química desse. O princípio ativo opera no desbridamento enzimático do leito da ferida e no controle da microbiota bacteriana (36).

O curativo de alginato, biopolímero natural (48), ao entrar em contato com o leito da ferida permite a troca do cálcio por sódio, o que possibilita a formação do alginato de sódio, um gel hidrofílico. As principais vantagens desse curativo são a alta absorção do exsudato, criação de um ambiente úmido, fácil remoção, entre outros.

Já as desvantagens desse curativo se devem ao fato de que eles isoladamente não são adesivos, ou seja, precisam de um curativo secundário para fixação ademais a relatos de reações alérgicas (41) (49).

Outro curativo com princípio ativo é o curativo com carvão ativado. Ao desenvolver uma ligação química (forças de Van-der-Waals) esse tipo de curativo gera uma força de atração eletrostática responsável pela drenagem de bactérias, secreções e odores (50).

Segundo (51) os curativos atuais possuem como limite sua incapacidade de informar sobre o ambiente interno da ferida bem como sobre o estado de cicatrização, carga de microrganismos, entre outros. Para esses autores curativos inteligentes são aqueles que possuem não somente capacidade de proteger a lesão e liberar drogas, mas também possuem sensores de pH, temperatura e oxigênio, por exemplo, que viabilizam a obtenção de informações que aceleram a tomada de decisão para o tratamento das feridas de pele.

De acordo com (52) traz como exemplo de curativo biológico os substitutos de pele temporários e permanentes. Em seu artigo, o autor apresenta que os substitutos temporários de pele, como aloenxerto de cadáver humano e enxerto de pele de animal, são cruciais na cicatrização das feridas de pele dos pacientes com queimadura durante a fase de proliferação celular, na diminuição do quadro álgico e principalmente na formação de uma barreira física que diminui os riscos de infecção. Porém, considerando-se a forma de aplicação, estes na verdade não são curativos simples, pois necessitam de processo cirúrgico para aplicação.

Neste sentido, os nanofilmes e as membranas destacam-se tanto para a cicatrização de feridas quanto de queimaduras, podendo substituir a pele lesionada protegendo-a da ação de microrganismos, além de manter um ambiente adequado para o processo de recuperação tecidual, podendo carrear substâncias atuando como curativos inteligentes. Uma das maiores vantagens destes tipos de curativos é o tempo de ação, podendo ser trocados ou repostos em média a cada sete dias, o que reduz o trauma a ferida, além de reduzir os custos do tratamento em cerca de 10 vezes, se comparado aos tratamentos passivos (40).

5. Nanopartículas com potencial para cicatrização

As nanopartículas (NPs) caracterizam-se por partículas que apresentam dimensão variável entre 1 e 100nm (53). A partir da redução de materiais ao nível de escala nanométrica, tem-se um aumento significativo na área de superfície e na razão área de superfície/volume, promovendo propriedades físico-químicas melhoradas (54).

Sua aplicabilidade clínica é dependente de determinadas variáveis, entre elas as propriedades físico-químicas, eficiência no carregamento e liberação de fármacos e ausência de toxicidade da partícula em si. (53).

A utilização de nanofibras produzidas com compostos poliméricos biocompatíveis vem aumentando nos últimos anos, devido a capacidade de induzir o reparo tecidual ou de órgãos humanos, tendo como objetivo um eficiente método de reparação por meio das melhorias na conexão de implantes e tecidos. Dentre as características mais relevantes para a aplicação em tecidos, deve-se mencionar aumento da região superficial, boa elasticidade e permeabilidade a gases. Alguns estudos relatam a utilização de nanofibras como fragmento de próteses, vasos sanguíneos, tecido cutâneo artificial, biossensores e desbloqueio monitorado de fármacos, dispositivos médicos e curativos (55).

Nanopartículas baseadas em peptídeos compreendem moléculas com possibilidade de uso em diversas aplicações biomédicas, mas majoritariamente direcionadas à liberação de medicamentos. Essas nanoestruturas apresentam biocompatibilidade e biodegradabilidade, promove formação de uma rede fibrilar que se assemelha à estrutura fibrilar natural da matriz extracelular, bem como apresenta estrutura adaptável que permite melhoras na interação com outros componentes celulares. No que se refere ao reparo tecidual, esse nanomaterial gera um meio propício à crescimento e diferenciação celular (54).

Pesquisas sugerem que nanopartículas poliméricas estimulam a angiogênese e re-epitelização, potencializando a proliferação celular em feridas. (53).

A formulação de medicamentos em nanopartículas confere vantagens, em relação às drogas livres, em razão da aquisição de novas propriedades, incluindo melhor biodisponibilidade e farmacocinética, minimização dos efeitos

colaterais tóxicos, permite uma liberação mais previsível, entrega dirigida e possibilidade de aumentar a carga medicamentosa (3).

Dentro do aspecto da cicatrização de feridas, as nanopartículas possibilitam o fornecimento de substâncias continuamente produzidas no sítio da lesão. Entre essas moléculas endógenas, destaca-se o óxido nítrico (NO), cuja produção é reduzida em feridas não-cicatrizantes. A aplicação de diazeniumdiolato, uma nanopartícula liberadora de NO, acelerou a cicatrização da ferida promovendo menor nível de células inflamatórias, aumento de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento, aumento de fibroblastos e vasos sanguíneos (54)

A incorporação de nanopartículas de ouro com outros biomateriais promove biocompatibilidade e biodegradabilidade à essas moléculas, possibilitando um uso efetivo em aplicações biomédicas, como na cicatrização de feridas. (54) Dentro desse contexto, as nanopartículas de ouro favorecem a cicatrização através de ação antibacteriana, promoção da angiogênese e regulação de citocinas anti-inflamatórias (55).

Os efeitos das nanopartículas de óxido de zinco sobre a cicatrização são fundamentados no tamanho e concentração das nanopartículas, já que essa nanopartícula apresenta maior atividade antimicrobiana em razão de seu menor tamanho e elevada razão superfície/volume. A aplicação tópica de zinco em feridas crônicas demonstrou redução na inflamação, potencializou a re-epitelização e promoveu menor crescimento bacteriano, bem como favorece a regeneração de matriz extracelular (54).

6. Nanopartículas de quitosana na cicatrização de feridas

De acordo com (57) as nanopartículas poliméricas são desenvolvidas por parte de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis variando o diâmetro entre 10 e 1000 nm. No mais, o fármaco é diluído, encapsulado ou agregado à matriz da nanopartícula. Em soma, devido o método de produção das nanopartículas, podem ser atingidas nanoesferas ou nanocápsulas.

Nanocápsulas são formas nos quais o fármaco é cativado em uma cavidade, bloqueado por uma única camada polimérica, enquanto nanoesferas são conjuntos matriciais na qual o fármaco é eventualmente e realmente disperso.

A utilização em nanoescala possibilita a exploração das propriedades físicas desiguais daquelas que são visualizadas em escala “micro” ou “macro”. Uma região que tem mostrado grande desenvolvimento é a de “nanofármacos”, em que nanopartículas são avançadas para a utilização organizada de fármacos internamente no organismo. A utilização desses “sistemas carreadores” beneficia a biodistribuição do fármaco, dirigindo moléculas ativas para tecidos lesados enquanto defende o tecido saudável (57).

A quitosana derivado da quitina, que é extraída do exoesqueleto de insetos, crustáceos e formada pelos elementos monoméricos de β -(1→4)-2-amino-2-desoxi-Dglicose e β -(1→4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose. A obtenção da quitosana ocorre por um processo de desacetilação em uma extensão variável apresentando unidades *D-glucosamina* (58). Quando a fração de unidades de *D-glucosamina* for acima de 50%, a quitosana e o número a quantidade de glucosamina é o grau de desacetilização, ou DDA. A quitina é o nome utilizado quando as unidades de *N-acetil-D-glucosamina* são acima de 50% e a quantidade de grupos acetamido é denominado grau de acetilação (10).

Quando o grau de desacetilização da quitina chega à 50% ou mais, torna-se solúvel em meio ácido aquoso. A quitosana é insolúvel em solução aquosa superior à pH 7, na sua forma cristalina. Entretanto, em ácidos diluídos (pH <6), os grupos amino livres protonados na glucosamina varorece a solubilidade da molécula polimérica. Em meios ácidos, o polissacarídeo é convertido num polieletrólito. Um polieletrólito é um polímero que conduz grupos ionizáveis carregados positivamente ou negativamente (10).

Pesquisas apontam que a quitosana apresenta um potencial promissor na reparação de lesões cutâneas, de forma a antecipar o processo de cicatrização. Diversas características da quitosana como a biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxicidade, atividade antimicrobiana, ser hemostática, além de possuir a função analgésica e ação no recrutamento de macrófagos e fibroblastos, para o local de lesões, auxiliando no processo de formação de tecido de granulação. Diante dessas propriedades e da versatilidade, a quitosana pode ser utilizada para a produção de géis, membranas e filmes para uso no tratamento de feridas (59).

Para (60), a extração deste polímero é satisfatória e que interfere especificamente na atividade das cadeias poliméricas dos quitopolissacarídeos, precisa que todo o processo biológico, considerando as características físico-químicas dos quitoderivados, seja averiguado o grau de polimerização, grau desacetilação, grau de acetilação, padrão de acetilação e massa molecular. Além disso, a adequação de quitina e quitosana, mostram de forma benéfica sua grandeza disponibilidade e a sua viabilidade econômica, formando um fator inovador e de baixo custo (59).

Segundo (61) este polímero natural apresenta uma massa de amínicos livres, devido à solubilidade em materiais ácidos, em pH menor que 6,5, insolubilidade em H_2SO_4 , pequena solubilidade em H_3PO_4 , insolubilidade em materiais orgânicos e presença de grupos amínicos protonados ($-NH_3^+$), características que permitem a formação de soluções viscosas com processo de geleificação. (36) verificou que a quitosana em formato de membranas controlam a diminuição de água e podem drenar o exsudato das lesões devido a sua permeabilidade ao oxigênio.

Para (62) o peso molecular e o nível de desacetilação são relevantes aos padrões que interferem as características consequentes da quitosana. Com o elevado nível de desacetilação existe uma massa de amino mais responsivo e são protonados em medida de pH ácidos. Nanopartículas de quitosana possuem eficácia em elementos negativamente repletos das membranas de bactérias, elevando ação antimicrobiana em confronto com nanopartículas de quitosana com padrão inferior aos de nível de desacetilação. A quitosana é um polissacarídeo com função de muco adesão e favorece o transporte de fármacos para células, por meio da abertura transitória das junções estreitas entre as células epiteliais. Deste modo, a quitosana é especificamente utilizada para implantar os fármacos nas mucosas, especificamente como sistemas de entrega oral e nasal (63).

Em estudos a quitosana é utilizada em diversos setores, em específico para cicatrizar lesões cutâneas, preservação da hemostasia, por meio do agrupamento de plaquetas, diminuição do tecido adiposo, suturas cirúrgicas, restauração óssea, na oftalmologia, indústria de vestimentas, diminuição do colesterol, implantações ortopédicas e odontológicas. Na área farmacêutica a aplicabilidade da quitosana vem se tornando fundamental, pois é utilizada na

formação de drogas em tamanho de microesferas, hidrogéis, filmes, cápsulas e nanopartículas. Sendo também incorporada relevantemente em recursos para complicações nasais, oculares e via oral (12).

O produto de maior confiabilidade é a quitosana por ter uma ação fundamental no processo de recuperação de feridas cutâneas, mostrando o potencial bactericida, fungicida e analgésico resistente à umidade e de baixo custo-benefício (64). Para (65) a quitosana tem o papel fundamental de aumentar a cicatrização de feridas, evitando a infecção na lesão, e possibilitar uma fluidez na reparação do envoltório e ser acessível.

A quitosana é um material promissor para a engenharia de tecidos, pois possui igualdades nas estruturas com os glicosaminoglicanos e é hidrófilo. A medida monomérica de quitosana, N- acetilglucosamina é semelhante à do ácido hialurônico, uma macromolécula extracelular que é fundamental na recuperação de lesões (1).

Sendo biodegradável, biocompatível e por ter baixa toxicidade a quitosana é caracterizada pelas atividades antimicrobianas, anticoagulante, imunoestimulante, gera rápida regeneração dérmica e estimula o processo de cicatrização. Sua ação antimicrobiana é ocasionada pela interação entre suas cargas positivas, que interagem com as cargas negativas das paredes celulares bacterianas, alterando sua permeabilidade, bloqueio do metabolismo normal e morte celular (8).

Um dos maiores benefícios no uso da quitosana para a cicatrização de feridas é sua capacidade de estimular a ação dos macrófagos, pelos oligômeros, que liberam interleucina, a qual ativa a proliferação dos fibroblastos e o depósito de colágeno no reparo da reconstrução do tecido lesionado (66) Para além, a quitosana também apresenta atividade analgésica e anti-inflamatória (64) e atua na quimioatração de neutrófilos, permitindo a aceleração do processo de cicatrização de lesões (7).

A utilização da quitosana como um nanopolímero e na apresentação como nanofibras, pode beneficiar o processo cicatricial devido a melhora na aderência e proliferação do tecido lesado (28).

Diante de diversas características benéficas na cicatrização de lesões, a quitosana tem uso limitado e afastado devido à sua baixa resistência mecânica, especialmente em estados hidratados, como feridas exsudativas. Além do

mais, seu tratamento específico para a modulação de curativos fibrosos com elevada área superficial não é provável devido à elevada viscosidade dos solventes de quitosana. Por isso, mecanismos que se assemelham as propriedades da quitosana como as de polímeros sintéticos, como a policaprolactona (PCL), podem ser favoráveis para a aplicabilidade da fase terminal do produto (14).

Para (57) as características da quitosana despertam possíveis junções com diversos polímeros, com o projeto de aperfeiçoar a performance do polímero em sua utilidade. Diversas pesquisas apontam a sua flexibilidade como material de matriz em nanopartículas, pois é aplicada para a liberação de diversos fármacos, o que a torna uma boa opção para o tratamento de feridas.

A literatura abrange o quão importante é o desenvolvimento de novos curativos, que apresentem uma interação com os diferentes tipos de feridas, possibilitando a recuperação mais rápida do paciente e com menores custos. Polímeros como a quitosana podem ser utilizados na forma de nanopartículas, conferindo maior maleabilidade, porosidade, resistência e ação no processo de reparação tecidual, melhorando a qualidade dos curativos desenvolvidos.

7. REFERÊNCIAS

1. Ahmed, S.; Ikram, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. *Achievements in the Life Sciences*. 2016; 10(1): 27-37.
2. Zhou X, Hao Y, Yuan L, Pradhan S, Shrestha K, Pradhan O, Liu H, Li W, Nano-formulations for transdermal drug delivery: a review, *Chinese Chemical Letters* (2018).
3. Liu, X. et al. Electrospun Medicated Nanofibers for Wound Healing: Review. *Membranes*. 2021; 11(770): 1-22.
4. Lucena, M.T. Membrana do biopolímero da cana-de-açúcar no tratamento de feridas cutâneas induzidas, em ratos. Tese de Doutorado na Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, 2012, p.1-99.
5. Arcaro, G. Mucilagem de *Ocotea Puberula* (RICH). NEES: Desenvolvimento de um Fitomedicamento e Teste “In Vivo” Para Cicatrização de Feridas. Dissertação de Mestrado na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa – PR, 2018, p.1-131.
6. Zhanchetta, F.C.; et al. Effects of Electrospun Fibrous Membranes of PolyCaprolactone and Chitosan/Poly (Ethylene Oxide) on Mouse Acute Skin Lesions. *Polymers*, 2020; 12(1580):.1-18.

7. Duarte, L.C. Desenvolvimento de película biocompatível para cicatrização de feridas. Tese de Doutorado do Programa de PósGraduação em Biotecnologia e Biodiversidade na Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS, 2018, 1-74.
8. Pereira, J.S. Efeito da quitosana e alginato na cicatrização de feridas: revisão integrativa. *Revista Enfermagem Atual*. 2018; 18(84) 123-134.
9. Silva, J.M. preparação e caracterização de nanofibras de celulose de Jacitara (*Desmoncuspolyacanthosmart.*) Para obtenção de compósitos poliméricos. Dissertação de Mestrado da UTFPR, Curitiba – PR, 2018, p.1-98
10. Scheidt DT. Eletrofiação da quitosana e sua aplicação como curativo para feridas. Dissertação de Mestrado na Unioeste/CampusToledo, Toledo – PR, 2018.
11. Kharat, Z. et al. Chitosan/PEO nanofibers containing Calendula officinalis extract: Preparation, characterization, in vitro and in vivo evaluation for wound healing applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021; 609: 1-13.
12. Costa, G.C.R. Biopolímero quitosana: propriedades, características e aplicações na cicatrização de feridas. Trabalho Conclusão de Curso na UNIFOR, Formiga – MG, 2018.
13. Takeo M, Lee W, Ito M. Woundhealingandskinregeneration. *Cold Spring HarbPerspect Med*. 2015;5(1):a023267.
14. TottoliEM, Dorati R, Genta I, Chiesa E, Pisani S, Conti B. SkinWoundHealingProcessand New Emerging Technologies for SkinWoundCareandRegeneration. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):735.
15. Smaniotto, et al. Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, 2012; 27(4): 623-626.
16. Campos, A.C.L.; Branco. A.B.; Groth, A.K. Cicatrização de feridas. *ABCD ArqBrasCir Dig*. 2007; 20(1): 51-58.
17. Ferreira, M. C. et al. Complex wounds. *CLINICS*.2006; 571-578.
18. Tazima, M.F.G.S.; Vicente, Y.A.M.V.A.; Motiya, T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2008; 41(3) 259-264.
19. Dowsett, M.; et al. Relationship Between Quantitative Estrogen and Progesterone Receptor Expression and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2) Status With Recurrence in the Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination Trial. *Journal of clinical oncology*. 2008; 26(7): 1-7.
20. World Union of Wound Healing Societies (WUWHS) Consensus Document. Surgical wound dehiscence. 2018. 1-48.
21. Iacob, A. T. et al. An overview of biopolimeric electrospun nanofibers based on polysaccharides for wound healing management. *MDPI: Pharmaceutics*. 2020; 12(983): 1-49.

22. Hettiaratchy, S.; Papini, R. Initial management of a major burn: II-assessment and resuscitation. *BMJ*. 2004; 329: 101-103.
23. Coutinho Júnior, N. F. L. et al. Ferramenta TIME para avaliação de feridas: concordância interobservador. *Revista da Associação Brasileira de Estomaterapia*. 2020; 18(1720): 1-8.
24. Boateng J, Catanzano O. AdvancedTherapeuticDressings for EffectiveWoundHealing--A Review. *J PharmSci*. 2015 Nov;104(11):3653-3680.
25. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. WoundHealing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*. 2019 Jan 1;99(1):665-706.
26. Aduba DC, Yang H. PolysaccharideFabricationPlatformsandBiocompatibility Assessment as Candidate WoundDressingMaterials. *Bioengineering (Basel)*. 2017 Jan 18;4(1):1.
27. Medeiros, A. C., & Dantas-Filho, A. M. (2017). Cicatrização das feridas cirúrgicas. *JournalofSurgicalandClinicalResearch*, 7(2), 87-102.
28. Ridolfi, D.M. Produção e caracterização de nanofibras de quitosana com nanocristais de celulose para aplicações biomédicas. Tese de Doutorado no Instituto de Química da UNICAMP, Campinas – SP, 2014.
29. Moeini A, Pedram P, Makvandi P, Malinconico M, Gomez d'Ayala G. Woundhealingandantimicrobialeffectofactivesecondarymetabolites in chitosan-basedwounddressings: A review. *CarbohydrPolym*. 2020 Apr1;233:115839.
30. Liang Y, He J, Guo B. FunctionalHydrogels as WoundDressingtoEnhanceWoundHealing. *ACS Nano*. 2021.
31. Dhivya S, Padma VV, Santhini E. Wounddressings - a review. *Biomedicine (Taipei)*. 2015;5(4):22.
32. Sorg H, Tilkorn DJ, Hager S, Hauser J, Mirastschijski U. SkinWoundHealing: An Update ontheCurrentKnowledgeandConcepts. *EurSurg Res*. 2017;58(1-2):81-94.
33. Tavakoli S, Klar AS. AdvancedHydrogels as WoundDressings. *Biomolecules*. 2020;10(8):1169.
34. Furtado, S. C., Srinivasan, B., & ABRAHAM, S. WoundHealingConcepts: ContemporaryPracticesand Future Perspectives. *InternationalJournalof Applied Pharmaceutics*. 2020;12(5):7–15.
35. Harding, K G; Morris, H L; Patel, G K. Clinical Review Healing chronic wounds. *BMJ*. 2002; 324(160): 1-9.
36. Franco, D.; Gonçalves, L.F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2008; 35(3): 203-206.
37. Nakasse, T.S.L.; et al. Padronização da produção de biocurativosDérmo-Epidérmicos de Quitosana, Xantana e Beta-Glucana. *BrazilianJournalofhealth Review*.2020; 3(3): 5496-5506.

38. Mota, D.S.A. Efeitos do d-limoneno incorporado em membranas bioativas de colágeno sobre a cicatrização de feridas cutâneas. Dissertação de Mestrado na Universidade Federal de Sergipe, Aracaju – SE, 2019, P.1-64.
39. Fan, B S K et al. State of the Art in Topical Wound-Healing Products. *Plastic and Reconstructive Surgery*.2011;127: 44-59.
40. Ambekar, R.S.; Kandasubramanian, B.Progress in the Advancement of Porous Biopolymer Scaffold: Tissue Engineering Application. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2019; 58(16): 6163-6194.
41. Weller, C; Team, V. Interactive dressings and their role in moist wound management. *School of Nursing and Midwifery*. 2019; 2:105-134.
42. Arroyo, A. A. et al. Open label clinical trial comparing the clinical and economic effectiveness of using a polyurethane film surgical dressing with gauze surgical dressings in the care of post-operative surgical wounds. *Int Wound J*. 2015; 12: 285-292.
43. De Vries, K. Primary care: Hydrocolloid and hydroactive wound dressings. *The Australian Journal of Pharmacy*. 2018; 99(1175): 81-83.
44. Wovden, K; Vovden, P. Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)*. 2017; 35: 489-494.
45. Gonzaga, V.A.M. Desenvolvimento de membranas porosas à base de quitosana e laponita para tratamento de lesões de pele. Tese de Doutorado na Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, 2018, p.1-76.
46. Kumar, A. et al. Biodegradable hydrogel-based biomaterials with high absorbent properties for non-adherent wound dressing. *International Wound Journal*. 2017; 14: 1076–1087.
47. Weller, C. D. et al. First-Line Interactive Wound Dressing Update: A Comprehensive Review of the Evidence. *Frontier in Pharmacology*. 2020; 11(155): 1-13.
48. Aderibigbe, B. A.; Buyana, B. Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics*. 2018; 10(2): 1-7.
49. Mccarthy, S. et al. Anaphylaxis caused by alginate dressing. *Contact Dermatitis*. 2018; 79: 396 – 397.
50. Scheer, H.S.; Kaiser, M.; Zingg, U. Results of directly applied activated carbon cloth in chronic wounds: a preliminary study. *Journal of Wound Care*. 2017: 26(8) 476-481.
51. Derakhshandeh, H. et al. Smart bandages: The future of wound care. *Trends Biotechnology*. 2018; 36(12): 1259-1274.
52. Abdel-Sayed, P. et al. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. Evolution of Biological Bandages as First Cover for Burn Patients. 2019; 8(11): 555-564.

53. Missaoui, W.N.; Arnold, R.D.; Cummings, B.S. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(385): 1-21.
54. Rajendran, N. K. et al. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. A review on nanoparticle based treatment for wound healing. 2018; 44: 421-430.
55. Costa, R.G.F.; et al. Eletrofiação de polímeros em Solução. Parte II: Aplicações e Perspectivas. *Polímeros Ciência e Tecnologia*. 2012; 22(2): 178-185.
56. Ampuero, F. O. *Current Pharmaceutical Design*. Nanoparticles for the Treatment of Wounds. 2015; 21(29): 4329-4341.
57. Pereira, K.J.G. Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas dcquitosana/pla contendo própolis para aplicações biomédicas. Dissertação de Mestrado na Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas – MG, 2020. p.1-71.
58. Queiroz, B.B.; Tomaz, A.F. Eficácia do curativo de quitosana na cicatrização: revisão integrativa. *Revista Tema*. 2020; 21(34) 68-82.
59. Ataíde, R.K.F. Membranas à base de quitosana, poli (álcool vinílico) e casca de banana madura visando aplicação como curativo cutâneo. Trabalho Conclusão de Curso na Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa – PB, 2018, p.1-78.
60. Filho, S.H.A.; et al. Propriedades físicas-áreas, atividades biológicas e resultados obtidos após utilização médica da quitosana e seus derivados / propriedades físicas e químicas, atividades biológicas e resultados obtidos após o uso médico de quitosana e seus derivados. *Brazilian Journal of Development*. 2020; 6(12): 95250-95270.
61. Damian, C.; et al. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Revista Alimento e Nutrição*. 2005; 2(16): 195-205.
62. Polinarski, M.A.; et al. New Perspectives of Using Chitosan, Silver, and Chitosan–Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacteria. *Particle and Particle Systems Characterization*. 2021; 38(4): 1-18.
63. Barbosa, A.I.; Lima, S.A.C.; Reis, S. Development of methotrexate loaded fucoidan/chitosan nanoparticles with anti-inflammatory potential and enhanced skin permeation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019; 124(1): 1115-1122.
64. Cremar, L.; et al. Development of antimicrobial chitosan based nanofiber dressings for wound healing applications. *Wound dressings developed by Forcespinning Technology*. 2018; 5(1): 6-14.
65. Laranjeira, M. C. M.; Fávere, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Revista Química Nova*. 2009; 32(3): 672-678.
66. Nascimento, J. K.M. Membranas de quitosana-G-acrilato de sódio incorporadas com nanopartículas de prata para o desenvolvimento de curativos. Dissertação – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2012.

CAPÍTULO 2 - Artigo a ser submetido a revista Biomaterials, Science, Polymer Edition

Efeito de membranas eletrofiadas de quitosana e nanoquitosana na cicatrização de feridas em ratos

Edimar Dal Ponte^a, Helton J. Alves^a e Juliana Bernardi-Wenzel^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

RESUMO

A evolução no desenvolvimento de curativos é notável, na qual além de proteger a ferida, deve criar um microambiente favorável para a cicatrização. Para tanto, os curativos devem apresentar características como: biocompatibilidade, flexibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e ação antimicrobiana, características presentes na quitosana que pode ser utilizada como nanopartícula. Assim, os objetivos deste trabalho foram produzir membranas de quitosana e de nanoquitosana acrescidas ou não de ácido hialurônico pela técnica de eletrofição e avaliar sua efetividade na cicatrização de feridas de pele em modelo animal. As soluções de quitosana, nanoquitosana, quitosana com ácido hialurônico e nanoquitosana com ácido hialurônico (GD 90%) foram preparadas e submetidas ao processo de eletrofição para obtenção de membranas, que foram posteriormente submetidas a análises de microscopia eletrônica de varredura, calorimetria diferencial exploratória, força, tração e elasticidade. O efeito das membranas na cicatrização de feridas de ratos foi avaliado pela aplicação destas sobre feridas dorsais de 8mm e acompanhamento da redução do diâmetro das lesões, porcentagem de retração das feridas e análise histológica dos tecidos por 21 dias. Os grupos experimentais foram: G1: NaCl 0,9% (soro fisiológico); G2: NaCl 0,9% + membrana eletrofiada de quitosana a 4% + PEO a 1%; G3: NaCl 0,9% + membrana eletrofiada de nanoquitosana a 4% + PEO a 1%; G4: NaCl 0,9% + membrana eletrofiada de quitosana a 3% + PEO a 1% + ácido hialurônico 1%; G5: NaCl 0,9% + membrana eletrofiada de nanoquitosana a 4% + PEO a 1% + ácido hialurônico 1%; G6: NaCl 0,9% + curativo hidrocoloide comercial. As membranas de nanoquitosana e nanoquitosana com ácido hialurônico obtiveram maior espessura, diâmetro e uniformidade das fibras, resistência, elasticidade e estabilidade térmica. Na cicatrização das lesões apresentaram resultados superiores aos controles e as demais membranas, com redução mais acentuada da área das feridas até o sétimo dia da avaliação. A quitosana como nanopartícula e em especial associada ao ácido hialurônico, mostrou-se mais promissora para a produção de membranas para a cicatrização de feridas cutâneas para aplicação até o sétimo dia de tratamento.

Palavras-chave: Eletrofição, nanopartículas, curativos, ácido hialurônico, processo inflamatório.

1. Introdução

O maior órgão do corpo humano é a pele, correspondendo a quase 20% do peso corporal. Sendo composta pela epiderme e derme, apresenta função fundamental de proteção, servindo como uma barreira contra riscos externos, especialmente patógenos, além de permitir a manutenção da hemostase e controlar a perda de água do organismo. Qualquer interrupção da pele, ocasionada por trauma físico, químico ou mecânico originará uma ferida. Essas lesões expõe o tecido subcutâneo a infecções, motivo pelo qual a reparação imediata é fundamental e crucial para o processo de cicatrização [1,2].

Para auxiliar no processo cicatricial e evitar infecções, são utilizados diferentes tipos de curativos, que tem como função realizar a proteção física, evitar infecções, bem permitir a hemostasia, mantendo uma condição favorável para contribuir na reparação dos tecidos lesados [3]. A evolução no desenvolvimento de curativos é notável, na qual além de proteger a ferida, novas tecnologias são incorporadas com a finalidade de criar um microambiente úmido para a cicatrização, podendo agir também na eliminação do excesso de exsudato, elevar o desbridamento da autólise, evitar infecções, favorecer a migração celular e o acelerar o processo de regeneração tecidual. Para tanto, estes curativos devem apresentar características como: biocompatibilidade, flexibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e ação antimicrobiana [4].

Inúmeros biomateriais e fármacos são utilizados em curativos para acelerar o processo de cicatrização, sendo eles os ácidos graxos essenciais, alginato de cálcio, anti-sépticos e detergentes, bandagens para compressão, carvão ativado e prata, filmes semi-permeáveis, colágeno biológico, fator de crescimento celular, hidropolímeros, hidrogeis, hidrocoloides, enzimas proteolíticas, sulfadiazina de prata, acetato de celulose permeável ao vapor, protetores cutâneos, membranas permeáveis ao vapor e curativos com gaze [5,6]. Entre os anos de 2009 e 2018 foram depositadas patentes de 48 tipos

diferentes de curativos no Brasil, dentre os quais a maior quantidade refere-se aos adesivos (18), seguidos de placas (9), dispositivos/técnicas (7), membranas (4) e outros (10) [7], o que demonstra que há necessidade e mercado para novos curativos.

Sendo biodegradável, biocompatível e por apresentar baixa toxicidade, a quitosana é um material promissor para o desenvolvimento de curativos para feridas. Caracterizada pelas atividades antimicrobiana, anticoagulante, imunoestimulante, gera rápida regeneração dérmica e estimula o processo de cicatrização. Sua ação antimicrobiana é ocasionada pela interação entre suas cargas positivas, que interagem com as cargas negativas das paredes celulares bacterianas, alterando sua permeabilidade, bloqueio do metabolismo normal e morte celular [8].

A quitosana é um polímero obtido pelo processo de N-desacetilação da quitina, que é um polímero natural extraído de exoesqueleto de crustáceos, insetos, formados pelas unidades monoméricas 2-amino-2-desoxi-D-glicose e tipo β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose ligadas pelas ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4)- [9]. Sendo a segunda fibra mais presente da natureza, após a celulose, a quitosana se classifica em segunda colocada no ranking de flexibilidade dos biopolímeros naturais, além de apresentar baixo custo de obtenção [10].

A semelhança apresentada com os glicosaminoglicanos como o ácido hialurônico permite que a quitosana auxilie na recuperação tecidual, em especial do tecido conjuntivo, atuando no estímulo a migração de células e a recuperação de lesões [11,12]. Um dos maiores benefícios no uso da quitosana é justamente sua capacidade de estimular a ação dos macrófagos, pelos oligômeros, que liberam interleucina, a qual ativa a proliferação dos fibroblastos e o depósito de colágeno no reparo da reconstrução do tecido lesionado [13]. Para além, a quitosana também apresenta atividade analgésica e anti-inflamatória [14] e atua na quimioatração de neutrófilos, permitindo a aceleração

do processo de cicatrização de lesões [15], o que a coloca na posição de um material promissor para a engenharia de tecidos e regeneração celular.

A aplicação da quitosana para utilização como curativos de pele, com o intuito de recuperar os tecidos e estimular o processo cicatricial pode ser realizado de diferentes formas, incluindo sua utilização como nanopartícula, atuando possivelmente de maneira mais eficiente na permeabilidade, além de auxiliar no transporte de fármacos [12].

Algumas características químico-físicas das nanopartículas como o tamanho, a forma, bem como a o tipo de polímero utilizado, pode favorecer sua aplicação em dispositivos médicos, como no processo de cicatrização de feridas, nos quais é possível associar as características favoráveis da quitosana como a biocompatibilidade e atividade antimicrobiana a um formato mais efetivo para aplicação [15]. Nanofibras com a função e transportar fármacos, tem mostrado um grande avanço para aplicabilidade biomédica podendo ser produzidas pelo processo de eletrofiação, com a formação de membranas que podem ser utilizadas de forma isolada ou com a inclusão de fármacos em sua estrutura [16].

O processo de eletrofiação é conduzido em equipamento composto por uma fonte de alta tensão, capilar (agulha metálica) e coletor metálico, e uma bomba de injeção [17]. A gota do polímero expelida pela agulha é vaporizada e alongada pelas forças eletrostáticas, formando as fibras eletrofiadas [18] que formam um filme ou membrana pelos quais o polímero pode ser aplicado sobre as feridas. Para a efetividade dos curativos observam-se características como a resistência, biocompatibilidade, aplicabilidade, disposição das fibras, efeito antimicrobiano e cicatrizante [19], que quando alcançadas podem acelerar o processo de cicatrização.

Os objetivos deste trabalho foram produzir membranas de quitosana e de nanoquitosana acrescidas ou não de ácido hialurônico pela técnica de eletrofiação e avaliar sua efetividade na cicatrização de feridas de pele em modelo animal (ratos).

2. Materiais e métodos

2.1. Preparo das soluções

A quitosana e nanoquitosana utilizadas para a produção das membranas eletrofiadas foram produzidas na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, de acordo com Alves et al. [20]. Ambas apresentavam grau de desacetilação de 90%, sendo a quitosana com 50 kDa e a nanoquitosana com 22 kDa.

Para a realização do processo de eletrofiação, foram preparadas quatro soluções distintas, sendo: quitosana, nanoquitosana, quitosana com ácido hialurônico e nanoquitosana com ácido hialurônico. Adicionalmente foi utilizado poli (óxido de etileno) PEO um polímero que pode se ligar facilmente a outros, dando origem a misturas poliméricas homogêneas para e contribuir com o processo de eletrofiação (3). As soluções de quitosana, nanoquitosana e PEO foram preparadas separadamente, sendo: quitosana a 4% com 1% de PEO; quitosana a 3% com 1% de PEO e 1% de ácido hialurônico; nanoquitosana a 4% com 1% de PEO e; nanoquitosana a 4% com 1% de PEO e 1% de ácido hialurônico. As misturas das soluções foram realizadas em temperatura ambiente, utilizando um agitador magnético, por um período de 24 horas para garantir a completa dissolução dos solutos e a obtenção de soluções homogêneas. Em seguida essas soluções foram submetidas ao processo de eletrofiação.

2.2. Eletrofiação das membranas

A eletrofição foi conduzida com voltagem de 18 kV e uma distância de 18 cm entre o tubo capilar de onde os polímeros foram liberados e o coletor, adaptado de Guellis et al. [21].

2.3. Caracterização das nanofibras

2.3.1.1. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia da superfície das nanofibras foram caracterizadas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) no equipamento VEGA3 TESCAN. Antes da observação no MEV, uma pequena amostra da membrana foi expelida com uma fina camada de ouro em um Deton. As amostras foram observadas em uma ampliação de 50.000 vezes ($5\mu\text{m}$) em relação ao seu tamanho original para que fosse possível avaliar visualmente a eletrofiabilidade das membranas. Por meio dessas imagens, também foi possível determinar o diâmetro médio das fibras obtidas utilizando o software de processamento de imagens VEGA do microscópio.

2.3.1.2. Calorimetria exploratória diferencial – DSC

Com o intuito de avaliar o comportamento térmico e as possíveis alterações na formação das membranas, foi realizada a análise de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) utilizando o calorímetro Shimadzu DSC-60 plus. Foram utilizados 6 mg de amostra com aquecimento a temperatura de 30 até 200 °C, em uma taxa de 10°C min⁻¹ e vazão de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹. Foi utilizada um cadinho de alumínio fechado [3].

2.3.1.3. Análises mecânicas

Para a análise do comportamento mecânico, as membranas pré-condicionadas foram cortados em moldes de 50 mm × 10 mm, cuja espessura foi medida em 4 pontos

com um micrômetro. O teste de propriedades de tração foi realizado com um analisador montando as extremidades do filme na garra de extensão do analisador e esticando as amostras a uma taxa de 10 mm/min até a ruptura dos filmes. As propriedades mecânicas foram determinadas em termos de capacidade de elasticidade (GPa), resistência a tração (MPa) e tensão de ruptura (MPa) [17].

2.4. Análise antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana das membranas eletrofiadas foi utilizado o teste de difusão, em triplicata, contra a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC6538. Para os testes, a bactéria *S. aureus* foi incubada em meio Mueller Hinton (MH) a 37°C por 24 h. Após, a suspensão bacteriana teve sua concentração ajustada a $1,5 \times 10^8$ células por mL. Foram inoculados 100 µL da suspensão bacteriana sobre placas de Petri contendo ágar MH e realizou-se o espalhamento com alça de Drigalsky. Posteriormente foram adicionados quatro fragmentos das membranas (Ø 6 mm), equidistantes, sobre a bactéria inoculada no meio de cultura. Adicionalmente foi realizado um controle negativo, contendo discos de papel filtro embebidos de água destilada esterilizada e um controle positivo com o antibiótico Ciprofloxacina 5 µg por disco. As placas permaneceram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. A atividade antimicrobiana foi determinada pela formação e medida do halo de inibição, adaptado de CLSI [22].

2.5. Potencial cicatrizante em animais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina sob protocolo 14/2021 (Anexo 1). O protocolo de testes dos curativos *in vivo* foi adaptado de Guirro et al. [23]. O delineamento do experimento é o em blocos incompletos. Foram utilizados ratos Wistar de 90 a 120 dias

de vida, independente do sexo, que foram aleatoriamente distribuídos em seis grupos experimentais de 20 animais cada, totalizando 120 animais. Os animais foram mantidos em grupos de três animais do mesmo sexo em cada caixa de polipropileno de 41x33x16cm, normalmente utilizadas no alojamento de ratos e receberam ração peletizada e água ad libitum, com troca da maravalha a cada dois dias. Os animais foram mantidos em temperatura de $22\pm 2,0^{\circ}\text{C}$, no ciclo claro/escuro de 12 horas, tendo sido realizado manejo adaptativo durante 15 dias antes do início do experimento. No dia denominado como “zero”, os animais foram submetidos à realização da ferida cirúrgica. Para tanto, cada animal foi pesado em balança digital e, então, recebeu diazepam (2mg/Kg, IP). Após 10 minutos, foi realizada a indução e manutenção anestésica com isoflurano diluído em 100% de oxigênio. Após realização de tricotomia de 2x2cm na região dorsal a cerca de 2 cm após a base do pescoço, foi realizada a antisepsia com clorexidina, administrada lidocaína (5mg/Kg, SC) e, então, foi realizada uma ferida circular de pele de 8mm de diâmetro com o uso de *punch* metálico. Removida a pele, a ferida foi limpa com NaCl 0,9% e os animais receberam os tratamentos tópicos conforme o grupo experimental. Os grupos experimentais foram: G1 (grupo controle): NaCl 0,9% (soro fisiológico); G2: NaCl 0,9% + membrana eletrofiada de quitosana a 4% + PEO a 1%; G3: NaCl 0,9% + membrana eletrofiada de nanoquitosana a 4% + PEO a 1%; G4: NaCl 0,9% + membrana eletrofiada de quitosana a 3% + PEO a 1% + ácido hialurônico 1%; G5: NaCl 0,9% + membrana eletrofiada de nanoquitosana a 4% + PEO a 1% + ácido hialurônico 1%; G6: NaCl 0,9% + curativo hidrocoloide comercial. Ato contínuo, cada animal recebeu administração única de cefalotina (60mg/Kg, SC) e de meloxicam (2,0mg/kg, SC) e foi devolvido à caixa de polipropileno. A limpeza com NaCl 0,9% e a administração tópica das membranas em teste foi realizada conforme a necessidade (em caso de reposição) ou a cada sete dias do tratamento, após o

desbridamento da ferida, até a resolução da ferida. No 3º, 7º, 10º, 14º e 21º dias (D3, D7, D10, D14 e D21) quatro animais de cada grupo foram aleatoriamente removidos da caixa, sendo realizada a avaliação visual dos ferimentos e estes submetidos à eutanásia com overdose de isoflurano para avaliação do processo de cicatrização. O processo de cicatrização das lesões foi avaliado pela medida do diâmetro da área da ferida nos dias do tratamento, realizadas com auxílio do software ImageJ. A análise estatística comparativa entre os tratamentos e os controles foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, utilizando o software XLSTAT [24]. Adicionalmente, foi calculada a área de retração da ferida, dada pela fórmula: $100 \times (W_o - W_i) / W_o = M \pm DP$, onde : W_o = área inicial da ferida; W_i = área da ferida no dia da biópsia [25].

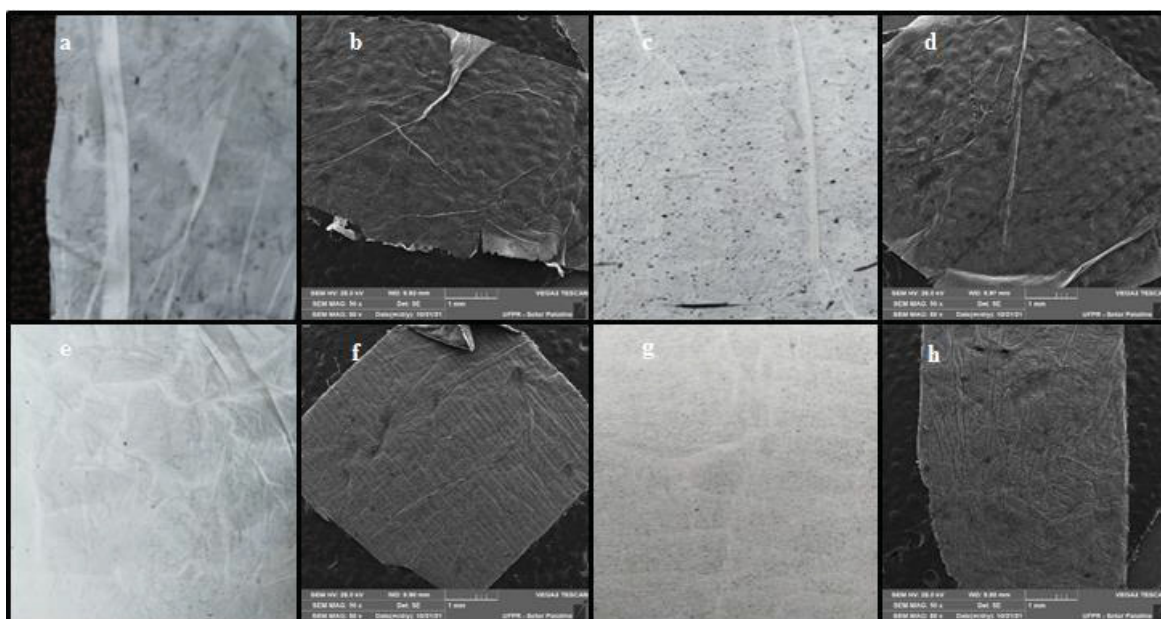
2.5.1.1. Análise histológica

Após a eutanásia dos animais, foi retirado um fragmento de pele, subcutâneo e musculatura da região lesionada e acondicionado em 30 mL de formol tamponado (proporção: 0,6 mg de fosfato de sódio dibásico; 0,4 mg de fosfato de sódio monobásico; 10 mL formol; 90 mL de água destilada) para avaliação histopatológica. As amostras foram cortadas em 5 µm e coradas com hematoxilina-eosina (HE). Foi realizada a avaliação das características da cicatrização do tecido, como o grau de inflamação, necrose, fibroplasia, tecido de granulação e reepitelização. Foi realizada também coloração com *Picrosiriusred* para avaliação do tipo de colágeno (colágeno do tipo 1 ou 3) e grau de desenvolvimento (ausente; leve; moderado; acentuado) [26].

3. Resultados

Morfologia e diâmetro das fibras

As membranas apresentaram uma coloração esbranquiçada, sobretudo, macroscopicamente, quando aplicadas sobre o leito das feridas, as membranas ficaram transparentes, permitindo a visualização dos tecidos subjacentes. A espessura média das membranas foi de 0,5 mm, sendo que as membranas de quitosana e quitosana com ácido hialurônico apresentaram-se levemente mais finas e com distribuição mais heterogênea, com a formação de poros maiores em comparação com as membranas de nanoquitosana e nanoquitosana com ácido hialurônico (Figura 1).



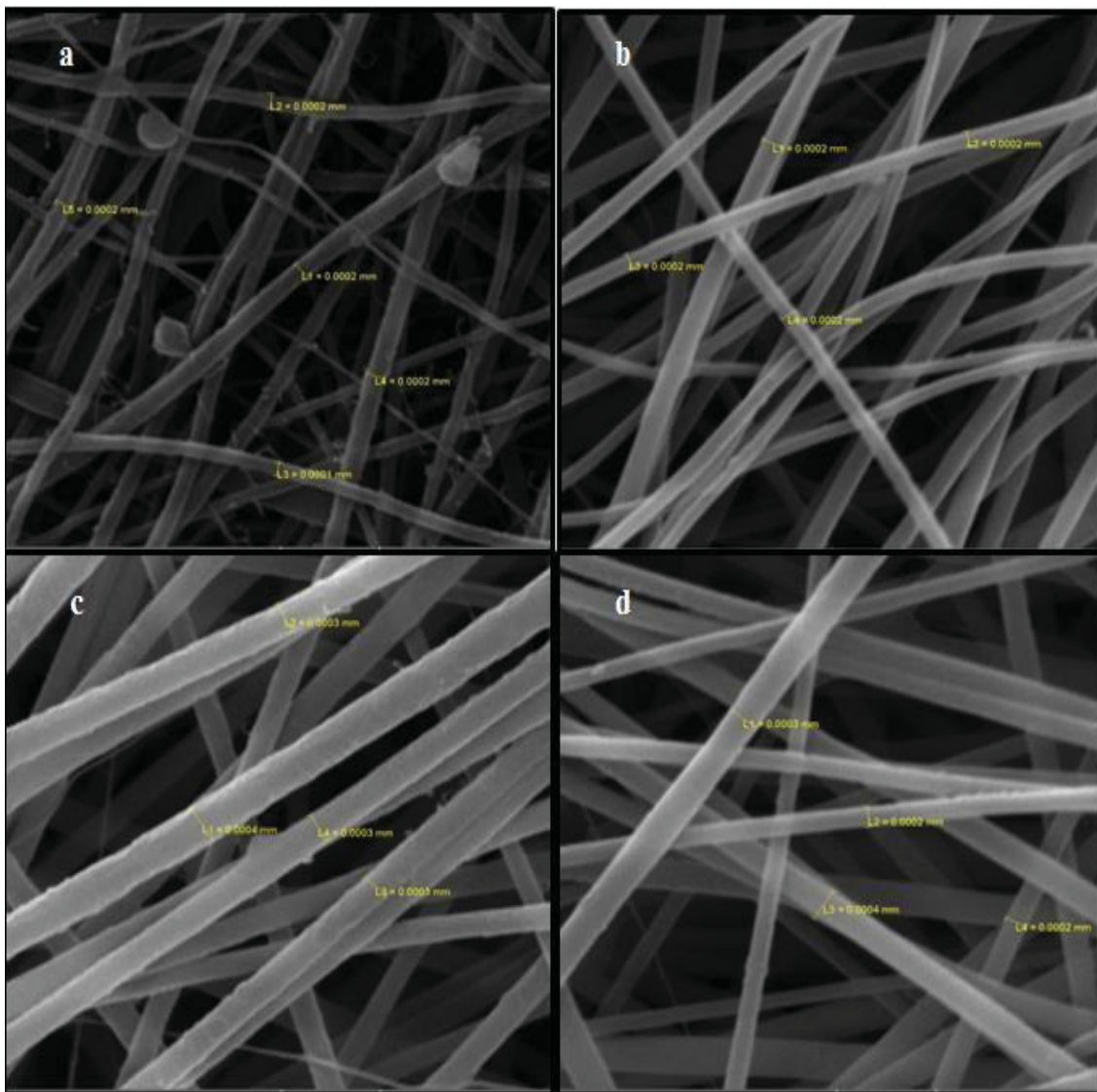
FORNTE: O autor.

Figura 1: Visualização macroscópica e microscópica em microscopia eletrônica de varredura (MEV) das membranas eletrofiadas, respectivamente. Em a e b: membrana quitosana; c e d: membrana de quitosana com ácido hialurônico; e e f: membrana de nanoquitosana e; g e h: membrana nanoquitosana com ácido hialurônico. Aumento em MEV 50 x.

A estrutura microscópica, bem como os diâmetros das fibras das membranas podem ser observados na Figura 2. Foi possível verificar que assim como na estrutura das membranas, as fibras produzidas com quitosana e quitosana com ácido hialurônico apresentaram diâmetro menor, com média de 200 nm, enquanto as fibras produzidas com nanoquitosana e nanoquitosana com ácido hialurônico apresentaram diâmetros maiores, variando de 200 a 400 nm. Observou-se também uma quantidade maior de

gotículas do polímero nas membranas eletrofiadas de quitosana, aparentando maior dificuldade no processo de atração eletrostática.

Figura 2: Micrografia eletrônica de varredura das fibras das membranas eletrofiadas de: A- quitosana; B – quitosana com ácido hialurônico; C – nanoquitosana e; D – nanoquitosana com ácido hialurônico. Aumento de 50.000x.



FONTE: O autor.

Calorimetria exploratória diferencial – DSC

Os resultados da análise calorimétrica exploratória diferencial encontram-se na Tabela 1. Analisando-se os dados da calorimetria onde ocorre a perda de água das membranas pode-se verificar pequena diferença obtida no primeiro pico endotérmico.

Em ambos os polímeros

(quitosana e nanoquitosana), foi possível verificar que a incorporação do ácido hialurônico gerou aumento do primeiro pico na temperatura.

Tabela 1: Calorimetria das membranas eletrofiadas de quitosana, quitosana com ácido hialurônico, nanoquitosana e nanoquitosana com ácido hialurônico.

Membrana	Temperatura (C°) 1ºPico
Quitosana	58
Quitosana com ácido hialurônico	62
Nanoquitosana	52
Nanoquitosana com ácido hialurônico	65

FONTE: O autor.

Ao comparar as análises DSC da perda de água das membranas não se observa diferenças consideráveis entre a quitosana e sua forma de nanoestrutura, porém, a incorporação do ácido hialurônico gerou aumento de temperatura, indicando que este promove aumento da estabilidade térmica das membranas.

Em relação ao comportamento mecânico, não foi possível a obtenção de dados das membranas de quitosana e quitosana com ácido hialurônico, devido a pequena espessura e alta porosidade das membranas, o que gerou seu rompimento logo que submetidas as análises. Os valores obtidos de resistência a tração, tensão de ruptura e capacidade de elasticidade das membranas de nanoquitosana e nanoquitosana com ácido hialurônico estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores obtidos em triplicata para os parâmetros de resistência máxima a tração, tensão máxima de ruptura e capacidade de elasticidade das membranas eletrofiadas de nanoquitosana e de nanoquitosana com ácido hialurônico.

Parâmetros	Membranas	
	Nanoquitosana	Nanoquitosana + ácido hialurônico
Resistência máxima a tração (N)	13,79	5,17
Tensão máxima de ruptura (Mpa)	13,98	9,7
Capacidade de elasticidade (%)	12,76	9,93

FONTE: O autor.

Observou-se uma diferença entre as membranas de nanoquitosana e nanoquitosana com ácido hialurônico, na qual as membranas de nanoquitosana

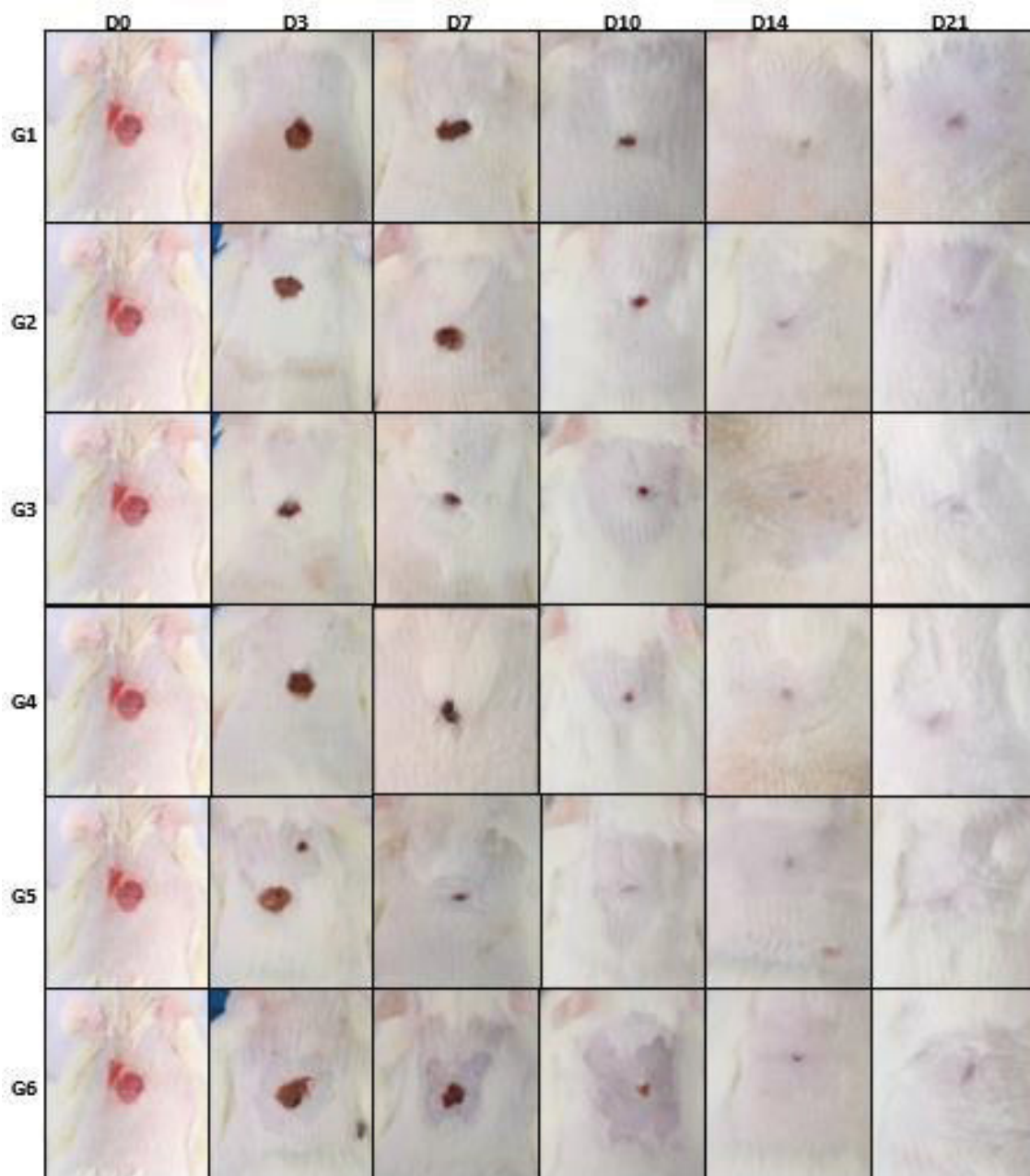
apresentaram-se superiores em termos de resistência e de capacidade de elasticidade em relação as membranas de nanoquitosana com ácido hialurônico.

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das membranas contra a bactéria *S. aureus* não foi verificada em nenhuma das membranas avaliadas. A média dos halos de inibição gerados pelas membranas foram: quitosana 10 mm, quitosana com ácido hialurônico 13 mm, nanoquitosana 10 mm e nanoquitosana com ácido hialurônico 12 mm, enquanto a média dos halos do antibiótico foi de 30 mm.

Potencial cicatrizante em animais

A evolução da cicatrização das feridas dos animais em comparação com os tratamentos controle durante os 21 dias de tratamento, que estão apresentadas na Figura 3. Nota-se que o processo de cicatrização das feridas estava muito avançado até o 10º dia após o início da lesão e que praticamente todas estavam totalmente cicatrizadas até o 14º dia.



FONTE: O autor.

Figura 3: Imagens das feridas cutâneas em ratos dos grupos com tratamentos de NaCl 0,9% (G1 controle), quitosana eletrofiada (G2), nanoquitosana eletrofiada (G3), quitosana + ácido hialurônico eletrofiada (G4), nanoquitosana + ácido hialurônico eletrofiada (G5), curativo comercial (G6), no dia da cirurgia (D0) e nos dias 3, 7, 10, 14 e 21.

A redução das lesões nos animais tratados com as membranas eletrofiadas de quitosana, quitosana com ácido hialurônico, bem como dos controles com soro fisiológico e pomada comercial foi determinada pela aferição do diâmetro das feridas e na porcentagem de retração das feridas, apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Valores médios das áreas das feridas e porcentagem de retração das feridas de ratos tratadas com membranas eletrofiadas de quitosana (G2) e quitosana com ácido hialurônico (G4), bem como dos tratamentos controle com soro fisiológico (G1) e pomada comercial (G6), nos dias avaliados.

Tratamento/ Retração da ferida (%)*	Diâmetro das lesões (mm)/				
	Dia da avaliação				
	D3	D7	D10	D14	D21
G1	0,54 ^{a**}	0,34 ^a	0,07 ^a	0,03a	0
DP***	6,05	16,02	3,78	0,36	-
R	0	32,96	85,96	93,32	100
G2	0,54 ^a	0,30 ^a	0,06 ^a	0,05a	0
DP	9,27	13,91	3,38	0,00	-
R	0	39,38	87,80	89,60	100
G4	0,48 ^a	0,26 ^a	0,02 ^a	0,07a	0
DP	7,72	5,99	1,17	0,12	-
R	4,70	48,78	96,74	86,10	100
G6	0,57 ^a	0,31 ^a	0,04 ^a	0,04a	0
DP	8,16	6,08	2,59	0,16	-
R	0	37,16	91,84	91,84	100

FONTE: O autor.

*Área inicial da ferida =0,50 mm. **Valores de médias representados com as mesmas letras não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para cada dia do tratamento. ***DP: Desvio padrão.

No terceiro dia do tratamento, foi possível observar um aumento do diâmetro das lesões nos ratos tratados com soro fisiológico G1, membrana de quitosana G2 e curativo comercial G6, havendo redução inicial somente no tratamento com membrana de quitosana com ácido hialurônico. Foi possível verificar que a diminuição do diâmetro médio das áreas das feridas dos animais tratados com as membranas de quitosana G2 e quitosana com ácido hialurônico G4 não teve valor estatisticamente significativo em relação aos grupos G1 (soro fisiológico- controle negativo) e do G6 (curativo comercial – controle positivo). O desvio padrão das áreas das lesões indica que o início do tratamento houve mais variação no processo cicatricial dos animais do que após o sétimo dia de tratamento.

Ocorreu redução das lesões nos animais tratados com as membranas eletrofiadas de nanoquitosana, nanoquitosana com ácido hialurônico, bem como dos controles com soro fisiológico e pomada comercial determinada pela aferição do diâmetro das feridas apresentaram valores estatisticamente significativos em relação aos grupos G1 (NaCl 0,9%- controle negativo) e do G6 (curativo comercial – controle positivo), no 3º e 7º dia de tratamento, com redução mais acentuada das áreas das lesões do que as apresentadas pelos controles (Tabela 4).

Tabela4: Valores médios das áreas das feridas e porcentagem de retração das feridas de ratos tratadas com membranas eletrofiadas de nanoquitosana e nanoquitosana com ácido hialurônico, bem como dos tratamentos controle com soro fisiológico (G1) e pomada comercial (G6), nos dias avaliados.

Tratamento/ Retração da ferida (%)*	Diâmetro das lesões (mm)				
	Dia da avaliação				
	D3	D7	D10	D14	D21
G1	0,54***	0,34a	0,07a	0,03a	0
DP***	6,05	16,02	3,78	0,36	-
R	0	32,96	85,96	93,32	100
G3	0,51b	0,27ab	0,03a	0,04a	0
DP	6,77	6,18	0,55	0,12	-
R	0	46,8	93,12	91,84	
G5	0,47b	0,13b	0,02a	0,04a	0
DP	6,57	4,14	1,36	0	-
R	0	73,80	95,92	91,84	
G6	0,57a	0,31a	0,04a	0,04a	0
DP	8,16	6,08	2,59	0,16	-
R	0	37,16	91,84	91,84	100

FONTES: O autor.

*Área inicial da ferida = 0,50 mm. **Valores de médias representados com as mesmas letras não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para cada dia do tratamento. *** DP: desvio padrão.

De acordo com os tratamentos controle e o tratamento com membranas de nanoquitosana geraram aumento da área da lesão no terceiro dia. Dentre os tratamentos avaliados destaca-se das membranas de nanoquitosana com ácido hialurônico (G5), que

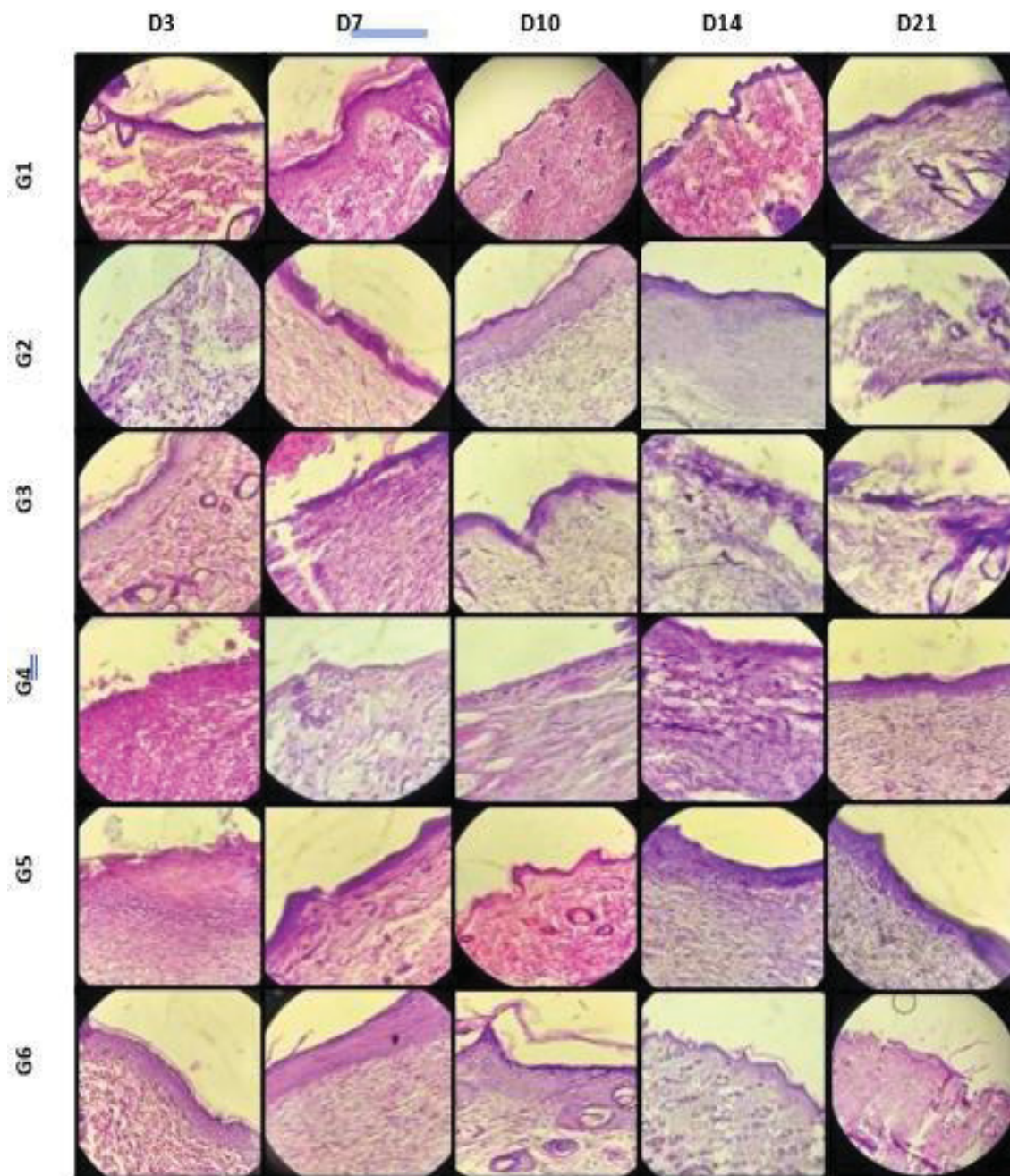
apresentou resultados muito superiores aos demais tratamentos, com retração de 73,8 % da ferida até o sétimo dia de avaliação. Apesar de mostrar-se semelhante ao G5, as membranas de nanoquitosana tiveram um resultado mais significativo até o 3º dia de tratamento, não apresentando diferença em relação aos controles no sétimo dia.

Avaliação histológica

Os fragmentos dos tecidos obtidos das áreas das lesões foram analisados em microscopia óptica após coloração com HE, conforme Figura 4. Na análise da epiderme, foi possível verificar presença de crosta no tratamento controle com soro fisiológico (G1), especialmente até o sétimo dia, enquanto os tratamentos com as membranas e com o curativo hidrocoloide comercial não apresentaram formação de crosta.

É possível observar também que a reepitelização foi mais acelerada em G3 nanoquitosana e G5 nanoquitosana + ácido hialurônico, grupos que tiveram melhor resultado no processo cicatricial, ocorrendo até o 7º dia, enquanto dos demais grupos foi possível verificar após o 10º dia e de maneira mais consistente no soro fisiológico (G1) apenas após o 14º dia.

Em relação ao processo de migração celular, pode-se observar densidade semelhante de fibroblastos no 3º dia, com exceção do G1, no qual a densidade celular encontrava-se reduzida em relação aos demais grupos. Nos tratamentos G5 e G6 observou-se a formação de folículos pilosos após no 10º dia.



FONTE: O autor.

Figura 4: Evolução histológica das feridas, coradas com HE (aumento de 400 x). Imagem microscópica dos fragmentos das lesões dos grupos tratados com NaCl 0,9% (G1 controle), quitosana eletrofiada (G2), nanoquitosana eletrofiada (G3), quitosana + ácido hialurônico eletrofiada (G4), nanoquitosana + ácido hialurônico eletrofiada (G5), curativo comercial (G6), nos dias 3, 7, 10, 14 e 21.

Em relação a derme, a organização das fibras colágenas foi observada em todos os tratamentos no 7º dia. O processo de neovascularização foi mais evidente em G5, comparado aos demais tratamentos. Em relação as análises do tecido conjuntivo

realizadas com lâminas coradas com *Picrosiriusred*, não foi possível observar diferença entre os tratamentos na deposição do colágeno. O predomínio de fibras colágenas do tipo III ocorreu até o 7º dia. Após o 10º dia havia presença de quantidade maior de fibras colágenas do tipo I.

4. Discussão

A técnica de eletrofiação é uma técnica adequada para a produção de membranas de diferentes polímeros, permitindo a aplicação para diferentes finalidades [27], tendo sido possível neste trabalho a produção com quitosana e nanoquitosana e sua aplicação na recuperação de feridas. Membranas eletrofiadas de nanoquitosana e nanoquitosana com ácido hialurônico exibiram efeito superior na cicatrização das feridas. Essas membranas apresentaram seus diâmetros maiores em relação as membranas de quitosana e quitosana com ácido hialurônico, variando entre 200 e 400nm, apresentando também sentido mais estável e baixa composição de poros e gotas, possivelmente recobrando de maneira satisfatória a área da ferida e agindo de maneira mais considerável para a migração celular e a reestruturação dos tecidos.

A maior concentração da nanoquitosana (4%) colaborou para a produção de membranas mais consistentes, enquanto a membrana de quitosana, aplicada em concentração de 3%, demonstrou uma porosidade e descontinuidade elevada.

Embora a porosidade ser uma condição significativa para a reparação das feridas, pois concede a troca gasosa e não caracteriza um curativo de obstrução, a exorbitância de poros e fragilidade das membranas de quitosana e quitosana com ácido hialurônico exibiram resultados menos satisfatório no processo de cicatrização.

Andrade [28] descreveu em seu estudo que a utilização da eletrofiação com a distância do capilar até o coletor de 10 cm e com tensões de 25 a 30 kV favorece a

vaporização do polímero e facilita a criação das membranas eletrofiadas. A distância de 5 cm e tensão de 20 kV não foi eficaz para formar nanofilamentos a uma temperatura de 23°C e umidade em 49%.

De acordo aos dados em um estudo realizado por Fahimirad et al. [29] os parâmetros de fluxo utilizado para eletrofição de fibras foram ajustadas para 0,5 mL/h, a voltagem aplicada foi ajustada em 21 KV, a distância da ponta-coletor e um coletor de tambor com velocidade de rotação foram fixadas em 12 cm e 700 rpm, respectivamente. Desta produção de membranas, foram obtidas entre 214,9 e 99,84 nm. Nos parâmetros utilizados neste estudo, nota-se que a distância utilizada da agulha até o coletor e a voltagem ajustada, de 18 cm e 18Kv, respectivamente pode interferir na formação das membranas de quitosana e quitosana com ácido hialurônico, que se apresentaram mais finas.

Kuntzler, Costa e Moraes [30] desenvolveram um método de eletrofição de nanofibras com quitosana a 3%, PEO a 2% e composto fenólicos a 1%, produzindo nanofibras com atividade antibacteriana, sendo promissoras a utilização de polímeros bioativos. Na preparação da eletrofição os polímeros foram homogeneizados em um agitador magnético em um período de 16 horas, utilizando a distância do coletor de 10 cm com potencial de 20 Kv e com a temperatura estabelecida em 22°C e umidade mantida em 60±1%. As pequenas variações nas condições de eletrofição, bem como a efetividade na formação das fibras, demonstra que as condições empregadas neste estudo foram satisfatórias para a produção das membranas, porém algumas variações na distância e voltagem empregadas para a confecção das membranas de quitosana e quitosana com ácido hialurônico permitem a confecção de membranas mais espessas e com fibras mais contínuas e homogêneas. Franco [31] verificou que a quitosana em

formato de membranas controlam a diminuição de água e podem drenar o exsudato das lesões devido a sua permeabilidade ao oxigênio.

Nas análises do MEV, um estudo realizado com nanofibras de proteína com a adição do PEO (0,05%) aquecido, a temperatura inicial de degradação foi de 56°C sendo depois diminuída quando incorporado o PEO aquecido [32]. Deste modo, a temperatura exibida entre as membranas foi de 52°C e 65°C, isso mostra que não há diferenças significativas da utilização do PEO aquecido. Além do mais, não foram observadas falhas nas nanofibras obtidas.

Scheidt et al. [3] obtiveram diâmetro médio das fibras para diferentes misturas de quitosana e PEO variando de 190, 310, 272, 320 e 360nm. Neste trabalho as membranas de quitosana e quitosana com ácido hialurônico não foram satisfatórias, visto que a média dos diâmetros das membranas foi de 100 e 200 nm, com elevado número de falhas nas fibras após o processo de eletrofição.

Bagheri et al. [4] prepararam membranas nanofibrosas contendo nanopartículas de óxido de prata e zinco, que apresentaram morfologia da superfície uniforme, com espessura de 100–300 nm de diâmetro, demonstrando-se ideais na fixação de fibroblastos. O diâmetro perfeito das nanofibras de quitosana/PEO foi descrito entre 120 e 230 nm. Em sua pesquisa, o diâmetro mediano das nanofibras eletrofiadas contendo AgNPs, ZnONPs e AgNPs-ZnONPs foi de 185 ± 15 nm, 184 ± 26 nm e 193 ± 15 nm, respectivamente. No presente trabalho, os melhores resultados foram obtidos com as fibras maiores, variando entre 200 e 400 nm.

Em comparação, membranas que foram realizadas com concentração de quitosana de 3,5% em peso e contração de PEO de 3,5% em peso, apresentaram fibras mais finas e mais lisas com diâmetro médio de 190 nm, que mantevem absolutamente sua individualidade, gerando à criação de um elevado número de poros interconectados. Por

outro lado, o procedimento químico de reticulação gerou a coalescência parcial das nanofibras, isso é um diâmetro médio de 270 nm, sendo formado uma nanoestrutura mais densa com uma porosidade média baixa [33].

Segundo Moreira [32], a formação de gotas com a utilização de soluções poliméricas que é observada neste estudo pode modificar a densidade da carga da solução utilizada. A condutividade pode ser reduzida ao utilizar soluções ácidas, na qual irá promover a produção de fibras mais finas, lisas e longas, diminuindo assim as gotas e aglomerados. Ocorrendo quantidade reduzida da quantidade correta de soluções ácidas, pode gerar a diminuição da densidade de carga na superfície de jato do polímero durante o processo de eletrofiação. De forma semelhante, Fathi et al. [34] produziram membranas de quitosana, álcool polivinílico (PVA) e proteínas da seda (Silk), que obtiveram constituição lisa sem grânulos e demonstraram que as fibras definidas obtêm maior flexibilidade. Além disso, as membranas fibrosas produzidas foram muito eficientes em acelerar o processo de recuperação de feridas de ratos.

Em relação a elasticidade das membranas, um estudo realizado por Emuno [35] com membranas produzidas com acetato de celulose recobertas com quitosana apresentaram maior elasticidade (30,2%), em relação as que continham curcumina associada em sua constituição (13,3%). As membranas de nanoquitosana e nanoquitosana com ácido hialurônico eletrofiadas seguiram essa mesma tendência, de redução da elasticidade quando associadas a outro polímero, reduzindo de 12,76 para e 9,93% a capacidade, quando adicionado o ácido hialurônico. Verifica-se também que as membranas de quitosana com celulose apresentaram maior elasticidade quando comparadas as obtidas neste trabalho.

De maneira geral, todas as membranas testadas foram satisfatórias no manejo, aplicação e reposição. As membranas apresentaram boa maleabilidade, ajustando-se as

feridas, apresentaram fácil aplicação e boa aderência nas lesões. Após a aplicação foi possível manter a membrana nas feridas até o sétimo dia, quando foi realizado o desbridamento das feridas e a reposição das membranas. De acordo com Ambekar e Kandasubramanian [36], uma das maiores vantagens da aplicação de curativos no formato de membranas ou filmes é o tempo de ação, podendo ser trocados ou repostos em média a cada sete dias, o que reduz o trauma a ferida, além de reduzir os custos do tratamento em cerca de 10 vezes, se comparado aos tratamentos passivos.

A retração significativa apresentada pelo tratamento com as membranas de nanoquitosana com ácido hialurônico provavelmente se relaciona a combinação de fatores satisfatórios apresentados por estas em relação aos parâmetros avaliados, no qual a membrana G3 e G5 tiveram melhor eficácia. Estas membranas apresentaram maior estabilidade térmica, espessura de fibras de disposição e espessura homogênea, além de maiores com diâmetros (200-400 nm). Muitas destas características também foram observadas nas fibras de nanoquitosana, quando em comparação as demais, que apresentaram espessura mais homogênea, fibras com a menor variação de diâmetro e com a maior capacidade de resistência e elasticidade. Muitas características destas podem justificar os melhores efeitos no processo de cicatrização das feridas, especialmente até o terceiro dia, em que houve uma diferença estatística significativa em relação aos controles, o que pode ser justificado pelo efeito hemostático da nanoquitosana [37,38].

A associação do ácido hialurônico é um importante fator favorável aos resultados, já que se trata de um glicosaminoglicano importante para o processo de reparo tecidual por auxiliar na migração de fibroblastos para o local da lesão, além de favorecer a deposição mais ordenada do colágeno [39], efeito também presente na quitosana e que pode ser potencializado pelas nanopartículas terem permeado melhor no tecido. Yang et

al. [40] desenvolveram membranas de ácido hialurônico por eletrofição e avaliaram diferentes parâmetros para a aplicação em curativos, tendo demonstrado que as membranas apresentaram boa permeabilidade a água, biocompatibilidade, além de fácil degradação, podendo ser promissoras no tratamento de feridas. A associação do PEO nas membranas não interfere nos resultados no processo inflamatório, por tratar-se de um polímero inerte que pode se ligar facilmente a outros, dando origem a misturas poliméricas homogêneas para, porém, contribuir para o processo de eletrofição, permitindo a formação de um polímero eletrofiável, o que já foi demonstrado por Zanchetta et al. [41], que também obtiveram bons resultados com as membranas de quitosana associadas ao ácido hialurônico e PEO.

A porosidade excessiva das membranas de quitosana e quitosana com ácido hialurônico também podem ter contribuído para o processo de evaporação, retardando o processo de recuperação das feridas, já que se sabe que o controle da umidade da ferida é importante para o processo cicatricial e epitelização [42,43].

Por tratar-se de um polímero biodegradável, a quitosana utilizada na confecção das membranas foi totalmente absorvida nas feridas, sem haver formação de crostas ou de alterações nas feridas. Além disso, a transparência obtida quando em contato com a lesão permitiu o acompanhamento de sua evolução, característica muito desejável em um curativo, possibilitando a inspeção da ferida sem necessidade de troca [44].

Apesar da similaridade estatística nos dados comparativos de todas as membranas no 10º dia de tratamento, as lesões estavam visualmente mais bem cicatrizadas em todos os tratamentos em comparação com o controle do soro fisiológico, que demonstrou que o processo natural de cicatrização pode ser acelerado com a utilização dos curativos.

Pela avaliação histológica das lesões, as membranas favoreceram a reepitelização do tecido lesionado, sugerindo que a adição de fibras de quitosana e

nanoquitosana as membranas foi importante no tempo de reepitelização do tecido cutâneo em camundongos. Na avaliação morfométrica, Zanchetta et al. [41], as membranas depolicaprolactona, quitosana e PEO favoreceram a migração do infiltrado inflamatório no 3º e 7º dias após a lesão. Comparando-se a este estudo, a quitosana e o PEO foram mais eficazes quanto aos benefícios de todas as fases do processo de cicatrização. Na fase inflamatória, esse polímero pode proporcionar a infiltração de neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos.

No estudo de Fahimirad et al. [29] sendo realizado com tratamentos de quitosana eletropulverizada, o tecido de granulação encontra-se organizado, melhorou a epitelização, além da diminuição da infiltração de linfócitos e neutrófilos que foram visualizadas em feridas infectadas que foram tratadas com membranas de quitosana, levando a aglomeração de fibroblastos no revestimento dérmico e a uma reparação mais eficaz da lesão.

Em relação a atividade antimicrobiana, muitos estudos descrevem a ação bactericida de fibras compostas por quitosana em solução maior que 3% [45], todavia, as membranas de quitosana e nanoquitosana com ou sem ácido hialurônico produzidas neste trabalho não demonstraram atividade antimicrobiana significativa nos testes *in vitro*.

De acordo com a CLSI [22], os halos de inibição gerados pelos antibióticos efetivos contra *S. aureus* são \geq a 15 mm. Para o antibiótico utilizado como controle positivo (Ciprofloxacina) o halo de inibição produzido para bactérias sensíveis é \geq 21 mm, o que indica que a bactéria avaliada era sensível a este, porém não apresentou sensibilidade as membranas utilizadas nos testes.

Comparando a atividade antimicrobiana das membranas, verificou-se que o ácido hialurônico apresentou maior inibição frente ao micro-organismo empregado, seguido

da quitosana e nanoquitosana. Assim como os resultados apresentados contra a bactéria *S. aureus* neste trabalho, as membranas de quitosana com extrato de uva produzidas por Almeida [46] e as membranas de quitosana e quitosana com compostos bioativos produzidas por Santos [47], não apresentaram efeito antimicrobiano significativo. Estes resultados indicam que a incorporação de outros polímeros ou compostos possam influenciar na atividade antimicrobiana da quitosana.

5. Conclusão

Neste estudo foi possível a obtenção de membranas eletrofiadas, que mostraram bons resultados quanto aos parâmetros físicos e de força, resistência, espessura quando confeccionadas com nanoquitosana e nanoquitosana com ácido hialurônico. As membranas eletrofiadas com quitosana e quitosana com ácido hialurônico apresentaram-se mais finas, menos resistentes e não diferiram dos controles no processo de cicatrização das feridas. Nenhuma das membranas eletrofiadas mostrou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. As membranas de nanoquitosana com ácido hialurônico demonstraram resultados superiores também no processo de cicatrização das feridas, comprovando que a interação entre esses dois compostos é eficiente na reparação de feridas, além de permitir a visualização do leito da ferida durante o processo cicatricial, sendo promissoras para a produção de curativos.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Roger M, Fullard N, Costello L, et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J. Anat.* 2019;234(4):438–455.
- [2] Sousa FGF, Ponte VA, Brandão MGSA. Análise histórica de diagnósticos de enfermagem relacionados a feridas e lesões de pele. *Rev. Enf. atual in Derme.* 2019;90(28):1-6.

- [3] Scheidt DT. Eletrofiação da quitosana e sua aplicação como curativo para feridas. Dissertação de Mestrado na Unioeste/Campus Toledo, Toledo – PR, 2018.
- [4] Bagheri M, Validi M, Makvandi P, et al. Chitosan nanofiber biocomposites for potential wound healing applications: Antioxidant activity with synergistic antibacterial effect. *Bioeng. Transl. Med.* e10254, 2021.
- [5] Duarte LC. Desenvolvimento de película biocompatível para cicatrização de feridas. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade na Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS, 2018.
- [6] Silva MMP, Aguiar MIF, Rodrigues AB, et al. The use of nanoparticles in wound treatment: A systematic review. *Rev. Escola Enferm. USP.* 2017; 51:1-18.
- [7] Ralin MAMM, Costa MS, Santos RB. Prospecção tecnológica de patentes de curativos depositados no Brasil de 2009 a 2018. *Res. Soc. Dev.* 2020; 9(11):1-18.
- [8] Pereira JS. Efeito da quitosana e alginato na cicatrização de feridas: revisão integrativa. *Revista Enf. Atual.* 2018; 18(84): 123-134.
- [9] Arantes MK, Kugelmeier CL, Cardozo-Filho L, et al. Influence of the drying route on the depolymerization and properties of chitosan. *Polym Eng Sci.* 2014; 55:1969–1976.
- [10] Costa GCR. Biopolímero quitosana: propriedades, características e aplicações na cicatrização de feridas. Trabalho Conclusão de Curso na UNIFOR, Formiga – MG, 2018.
- [11] Ahmed S, Ikram S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. *Achiev. Life Sci.* 2016; 10:27-37.
- [12] Souza JR. Estudo da desacetilação da quitosana e obtenção de suas nanopartículas para aplicação em engenharia de tecidos. Dissertação de Mestrado na Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2017.
- [13] Nascimento JKM. Membranas de quitosana-G-acrilato de sódio incorporadas com nanopartículas de prata para o desenvolvimento de curativos. Dissertação – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2012.
- [14] Cremar L, et al. Development of antimicrobial chitosan based nanofiber dressings for wound healing applications. *Wound dressings developed by Forcespinning Technology.* 2018; 5(1):6-14.
- [15] Polinarski MA, Beal ALB, Silva FEB, et al. New perspectives of using chitosan, silver, and chitosan–silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *Particle & Particle System Characterization.* 2021; 2100009:1-18.
- [16] Nista SVG, Melo TB, Mei LHI. Membrana de nanofibras mucoadesivas de quitosana/peo. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 2015; 16(6):288-294.

[17] Andrade SMB. Eletrofiação e caracterização de membranas biopoliméricas a base de quitosana extraídas dos exoesqueletos de crustáceos. Tese de Doutorado da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2012.

[18] Rossin ARS, Oliveira EL, Moraes FAP, et al. Terapia fotodinâmica em eletrofiação: Revisão de técnicas e aplicações. *Química Nova*. 2020;43(5):613-622.

[19] Simas SM. O tratamento de feridas cutâneas em cães e gatos, Conclusão de Graduação na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2010.

[20] Alves HJ, Vieceli M, Alves C, et al. Chitosan polymerization and nanochitosan production using a single physical procedure. *J. Polym. Environ.* 2018; 26: 3913–3923.

[21] Guellis C, Rossin ARS, Bessegato SS, et al. Incorporation of Fluorescent Dyes in Electrospun Chitosan/Poly (ethylene oxide). *J. Braz. Chem. Soc.* 2021;32(5):1040-1050.

[22] CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories. 29ed. CLSI guideline M100-S29. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Institute, 2019.

[23] Guirro ECBP, Puntel FC, Beber BA, et al. Efeito do açúcar em diferentes formulações na cicatrização por segunda intenção em ratos Wistar. *Vet. em Foco*. 2015;13(1):3-10.

[24] Addinsoft. XLSTAT version 2021.4. Disponível em <https://www.xlstat.com/en/>. Acesso em 14 de outubro de 2021.

[25] Ramsey D, Pope E, Wagner-mann C, et al. Effect of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. *Am J Vet Res.* 1995;56(7): 941-949.

[26] Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, et al. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010; 18: 113-116.

[27] Marcante LA, Andre RS, Pavinatto A, et al. Nanofibras eletrofiadas e suas aplicações: avanços na última década. *Química Nova*. 2021;44(6):717-736.

[28] Andrade SMB. Eletrofiação e caracterização de membranas biopoliméricas a base de quitosana extraídas dos exoesqueletos de crustáceos. Tese de Doutorado da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2012.

[29] Fahimirad S, Abtahi H, Satei P, et al. Wound healing performance of PCL/chitosan based electrospun nanofiber electrospayed with curcumin loaded chitosan nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* 2021; 259:117640.

[30] Kuntzler SG, Costa JAV, Morais MG. Development of electrospun nanofibers containing chitosan/PEO blend

and phenolic compounds with antibacterial activity. *Inter. J. Biol. Macromol.* 2018;117(1):800-806.

[31] Franco, P.B, Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana e casca de banana verde para cicatrização de feridas cutâneas. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Alfenas. Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar, P. T., Nair, 2014.

[32] Moreira JB. Desenvolvimento de nanofibras utilizando biocompostos microrganismos com ação antioxidante e indicadores de pH. Tese de Doutorado na Universidade do Rio Grande, Rio Grande – RS, 2018.

[33] Dodero A, Scarfi S, Mirata S, et al. Effect of Crosslinking Type on the Physical-Chemical Properties and Biocompatibility of Chitosan-Based Electrospun Membranes. *Polymers.* 2021;13(5):831-844.

[34] Fathi, A.; et al. Fabrication of chitosan-polyvinyl alcohol and silk electrospun fiber seeded with differentiated keratinocyte for skin tissue regeneration in animal wound model. *Journal of Biological Engineering.* 2020; 14(27): 1-14.

[35] Enumo AJ. Desenvolvimento de fibras eletrofiadas de acetato de celulose recobertas com quitosana contendo curcumina aplicadas em tratamento cutâneo. Tese de Doutorado na Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2020.

[36] Ambekar RS, Kandasubramanian B. Advancements in nanofibers for wound dressing: A review. *Eur. Polym. J.* 2019; 117:304-336.

[37] Fan L, Cheng C, Qiao Y, et al. GNPs-CS/KGM as Hemostatic First Aid Wound Dressing with Antibiotic Effect: In Vitro and In Vivo Study. *PLoS One.* 2013;8(7): e66890.

[38] Kumar PTS, Raj NM, Praveen G, et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of Microporous Chitosan Hydrogel/Nanofibrin Composite Bandage for Skin Tissue Regeneration. *Tissue Eng. Part A.* 2013;19(3-4):380-392.

[39] Debels H, Hamdi M, Abberton K, et al. Dermal matrices and bioengineered skin substitutes: a critical review of current options. *Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open.* 2015; 3(1):e284.

[40] Yang Q, Xie Z, Hu J, et al. Hyaluronic acid nanofiber mats loaded with antimicrobial peptide towards wound dressing applications. *Mater. Sci. Eng. C.* 2021;128:e112319.

[41] Zanchetta FC, Trinca RB, Silva JLG, et al. Effect of Electrospun Fibrous Membranes of PolyCaprolactone and Chitosan/Poly(Ethylene Oxide) on Mouse Acute Skin Lesions. *Polymers.* 2020;12:1580-1598.

[42] Coulombe PA. Wound epithelialization: accelerating the pace of Discovery. *J. Invest. Dermatol.* 2003; 37:219-230.

[43] Farahani M, Shafiee, A. WoundHealing: From Passive toSmartDressings. Adv. Healthcare Mater. 2021;10:e2100477.

[44] Bernatchez SF. CareofPeripheralVenousCatheter Sites: AdvantagesofTransparentFilmDressings Over Tape andGauze. J.A.V.A. 2014;19(4):256-261.

[45] Alarse AC. Desenvolvimento e caracterização de arcabouços à base de blenda poliméricas de PVA e de quitosana para engenharia de tecido, Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do ABC, Santo André – SP, 2015.

[46] Almeida LA. Membrana de quitosana incorporada com extrato de uva jacquez para tratamento de ferida cutâneas. Dissertação de Mestrado na Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas – MG, 2017.

[47] Santos, E.P. Membranas de quitosana/bioativos naturais com atividade antimicrobiana para tratamento de lesões cutâneas. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2018.

ANEXO 1



Certificado

Certificamos que o **Protocolo nº 14/2021** referente ao projeto de pesquisa **Efetividade de curativos eletrofiados de quitosana e nanoquitosana na recuperação de feridas de pele** sob responsabilidade da **Profa. Juliana Bernardi Wenzel**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor Palotina da UFPR (CEUA/Palotina) em **12/08/2021**.

O Docente responsável pelo envio do formulário deve estar ciente de que deve:

- informar qualquer intercorrência, efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo;
- informar sobre a necessidade de modificações ou emendas ao protocolo que foi descrito e aprovado, identificando a parte do protocolo a ser modificada e apresentando justificativas claras

Palotina, 12 de agosto de 2021

Certificate

*Certify that the **Protocol n. 14/2021** regarding the research project **Effectiveness of electrospinnned chitosan and nanochitosan dressings in the recovery of skin wound** of **Juliana Bernardi Wenzel** is according to the Ethical Principles of Animal Experimentation adopted by the National Council for Animal Experiments Control (CONCEA) and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use of the UFPR – Setor Palotina (CEUA / Palotina) in **August 12, 2021**.*

Palotina, August 12, 2021.

Prof. Geraldo Camilo Alberton
Coordenador/Coordinator
CEUA/Palotina - UFPR

APÊNDICE 1

NORMAS DA REVISTACIÊNCIA, CUIDADO E SAÚDE (ONLINE)

Diretrizes para autores

- A submissão dos artigos é **on-line** no site:
<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/CiencCuidSaude>
- O encaminhamento do manuscrito, anexos e o preenchimento de todos os dados, são de inteira responsabilidade dos autores.

Documentação obrigatória

1. **Manuscrito** em formato .doc, o qual deverá ser anexado como documento principal;
2. *Página de Identificação*, anexada como documento suplementar em formato .doc;
3. **Declaração de Autoria, Responsabilidade, Contribuição dos autores e Transferência de Direitos Autorais**, disponível para a qual deve ser devidamente preenchida (título do manuscrito, local e data da assinatura, nomes dos autores digitados, contribuição de autoria*) e assinada pelos autores – Deve ser anexada como documento suplementar em formato PDF.
Obs.: Quando os autores estiverem em locais diferentes, que impossibilite a assinatura em um mesmo documento, é possível anexar mais de uma declaração na plataforma. No entanto, faz-se necessário que todas as declarações devem ser preenchidas da mesma forma, contendo: Título, acordo, transferência de direitos, nomes de todos os autores e contribuições.

Contribuição de autoria:

Cada autor deve indicar o número correspondente à sua forma de contribuição intelectual e substancial no manuscrito - (1) concepção ou desenho do estudo/pesquisa; (2) análise e/ou interpretação dos dados (3) revisão final com participação crítica e intelectual no manuscrito.

1. Declaração de ausência/existência de **Conflitos de interesses** que podem ser de natureza pessoal, comercial, política, acadêmica ou financeira - anexada como documento suplementar;
2. **Cópia do Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa**(digitalizada e em pdf), anexada como documento suplementar;

Cópia do **comprovante de pagamento** referente à taxa de submissão do manuscrito (contendo tipo de transação bancária, valor, data e nome do autor), anexada como documento suplementar;

Tipos de artigos considerados:

- **Editorial**– matéria de responsabilidade do Conselho Editorial ou convidados. Texto opinativo sobre assunto de interesse para o momento histórico ou a produção do conhecimento, com repercussão para a Enfermagem e Saúde. Pode conter até **duas (2) páginas**, e até cinco referências.

- **Artigos Originais:** contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa científica, original e concluída, que agrega informação nova ou corrobora o conhecimento disponível sobre objeto de investigação relacionado ao escopo da área da Enfermagem e da Saúde. São incluídos nesta categoria: ensaios clínicos randomizados, estudos de caso-controle, coorte, prevalência, incidência, estudos de acurácia, estudo de caso e estudos qualitativos. Deve conter a seguinte estrutura: **Introdução:** apresentar o tema, definir o problema e sua importância, revisão da literatura e objetivo. **Método/Metodologia:** descrever de forma clara, objetiva, compreensiva e completa o método empregado, a população/amostra estudada, participantes do estudo ou fonte de dados, data da coleta de dados, local de realização da pesquisa (sem citar o nome da instituição), técnica de coleta de dados, critérios de seleção entre outros. Inserir o número do parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e relatar que a pesquisa foi conduzida de acordo com os padrões éticos exigidos. **Resultados:** deverá ser apresentado com sequência lógica. Quando houver tabelas, gráficos ou figuras as informações devem ser complementares. **Discussão:** deverá seguir a sequência lógica dos resultados, comparação com a literatura pertinente e atualizadas da área e a interpretação dos autores. **Conclusão ou Considerações Finais:** devem destacar os achados mais importantes, comentar as limitações e implicações para pesquisas futuras.

Deve limitar-se a **quinze (15) páginas**, incluindo resumo, mínimo de 10 e máximo de 25 referências e até sete autores.

- **Artigos de Revisão** – Serão aceitas revisões sistemáticas, integrativas e bibliométricas. Estudo que reúne, de forma ordenada e sintética, resultados

de pesquisa a respeito de um tema específico, auxiliando na explicação e compreensão de diferenças encontradas entre estudos primários que investigam a mesma questão, de forma a aprofundar o conhecimento sobre o objeto investigado. As revisões utilizam métodos sistemáticos e critérios explícitos para identificar, selecionar e avaliar criticamente pesquisas relevantes, e para coletar e analisar dados dos estudos incluídos na revisão. Deve incluir uma seção que descreva os métodos utilizados para localizar, selecionar, extrair e sintetizar os dados e conclusões.

Os artigos de revisão devem conter um máximo de **quinze (15) páginas**, incluindo resumo, mínimo de 10 e máximo de 25 referências, além das incluídas na revisão, e até seis autores.

- **Artigos de Reflexão** – Texto reflexivo ou análise de temas que contribuam para o aprofundamento do conhecimento relacionado à área da enfermagem e saúde, estabelecendo analogias, apresentando e analisando diferentes pontos de vista, teóricos ou práticos. As reflexões devem conter **minimamente Introdução, desenvolvimento e conclusão**.

Limite máximo **de doze (12) páginas**, incluindo resumo, mínimo de 10 e 25 referências e até cinco autores.

- **Relato de Experiência** – Estudo em que se descreve situações da prática e/ou inovação (ensino, assistência, pesquisa ou gestão/gerenciamento), as estratégias de intervenção e a avaliação de sua eficácia, de interesse para a atuação profissional. Deve incluir: **Introdução** apresentando uma situação problema e o objetivo do relato; **Metodologia** com descrição de local, período, participantes ou fontes de informação, com descrição pormenorizada das ações realizadas e vivenciadas, detalhe de informações e informantes que assegurem uma representação sobre a experiência. Deve incluir algum tipo, mesmo que informal, de avaliação final da experiência. Na **discussão** incluir possíveis facilidades e dificuldades encontradas no processo, impactos na prática e mudanças a serem efetivadas. **Conclusão** com síntese da experiência, recomendações e estudos futuros.

Limite máximo de **doze (12) páginas**, incluindo resumo, mínimo de 10 e no máximo 25 referências e até cinco autores.

ATENÇÃO: *Ciência, Cuidado e Saúde* considera para publicação artigos que atendem aos padrões de qualidade estabelecidos pelas diretrizes para

produção de pesquisa em saúde – Enhancing the Quality and Transparency of Health Research Network (EQUATOR) (<https://www.equator-network.org/>). É indicado citar no método qual instrumento do Equator foi utilizado para nortear a pesquisa (<https://www.equator-network.org/toolkits/selecting-the-appropriate-reporting-guideline/>).

- **Ensaio clínico randomizado:** **CONSORT** (<https://www.equator-network.org/reporting-guidelines/consort/>);
- **Revisão sistemática e metanálise:** **PRISMA**; **ENTREQ**, para sínteses de pesquisa qualitativas; <http://www.prisma-statement.org/statement.htm>.
- **Estudos epidemiológicos:** **STROBE** (<https://www.equator-network.org/reporting-guidelines/strobe/>);
- **Estudos qualitativos:** **COREQ** (<https://www.equator-network.org/reporting-guidelines/srqr/>).

Autoria

O número de autores é definido pelo tipo de contribuição. Nos artigos originais e de revisão são permitidos até sete autores e nos de reflexão e relato de experiência, até cinco autores.

São autores aqueles que tornam pública suas responsabilidades pelo conteúdo do artigo, concordando que a escrita e conteúdos intelectuais foram revisados criticamente por todo os autores. Cada autor deve aprovar a versão final do conteúdo a ser publicado e concordar em responsabilizar-se por todos os aspectos do trabalho assegurando que questões relacionadas a acurácia ou integridade de quaisquer parte do trabalho sejam adequadamente investigadas e resolvidas. Além disso, cada autor declara a forma de contribuição intelectual substancial à concepção ou desenho do estudo/pesquisa e/ou aquisição, e/ou análise ou interpretação dos dados, em acordo com os critérios estabelecidos pelo [ICMJE](#).

Direitos autorais

Os direitos autorais são de propriedade exclusiva da revista, transferidos por meio da Declaração de responsabilidade e transferência de direitos autorais assinada pelos autores. Para a utilização dos artigos, a revista adota a Licença Creative Commons, CC BY-NC Atribuição não comercial. Com essa licença é permitido acessar, baixar (download), copiar, imprimir, compartilhar, reutilizar e distribuir os artigos, desde que para uso não comercial e com a citação da

fonte, conferindo os devidos créditos autorais à revista. Nesses casos, nenhuma permissão é necessária por parte dos autores ou dos editores.

PREPARO DO MANUSCRITO

- Os artigos deverão ser digitados em “Word for Windows” 98 ou superior, fonte “Times New Roman”, tamanho 12, papel A4, com margens de 2,5 cm nos quatro lados, e espaçamento duplo em todo o texto, com exceção de resumos, referências, citações diretas, depoimentos, tabelas e quadros que deverão ter espaçamento simples.

- Para maiores informações, consultar o check-list de normas da revista (no final deste documento).

a) Página de identificação deverá conter:

- Título do trabalho em caixa alta e negrito (somente em Português);
- Nome completo do(s) autor(es), logo abaixo do título, com indicação da formação profissional (graduação – sem especificar local de formação), instituição em que esteja cursando pós-graduação strictu sensu ou maior titulação (nunca especificar onde o título foi obtido), instituição em que atua profissionalmente e endereço eletrônico em nota de rodapé;
- As especificações sobre quais foram as contribuições individuais de cada autor na elaboração do artigo conforme os critérios de autoria do *International Committee of Medical Journal Editors*. O reconhecimento da autoria deve estar baseado em contribuição substancial relacionada aos seguintes aspectos: 1. Concepção e projeto ou análise e interpretação dos dados; 2. Redação do artigo ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual; 3. Aprovação final da versão a ser publicada.
- Indicação se o trabalho foi financiado por algum órgão ou instituição;
- Indicação se o manuscrito é originário de dissertação ou tese;
- Indicação se o manuscrito já foi discutido em evento científico ou publicado em revista estrangeira;
- Indicação da seção a que o texto se destina (Artigo de Pesquisa; de Revisão; de Reflexão; e Relato de Experiência).
- Endereço completo do autor correspondente.

b) Manuscrito:

- Não deverá conter notas de rodapé.

Deverá apresentar a seguinte estrutura:

- Resumo estruturado (Objetivo, Método/Metodologia, Resultados e Conclusão/Considerações finais) em português contendo no mínimo 150 e no máximo 200 palavras;
- Palavras-chave em Português, Inglês (Keywords) e Espanhol (Palabrasclave): três e cinco palavras ou expressões que identifiquem o tema, utilizando termos listados nos “Descritores em Ciências da Saúde- DECS-LILACS” elaborado pela BIREME.
- Texto propriamente dito (Introdução, Método / Metodologia, Resultados, Discussão, Conclusão /Considerações finais, Agradecimentos e Referências).
- Nos estudos qualitativos, a critério dos autores, a apresentação de resultados e discussão pode ser conjunta ou separada. Já nos estudos quantitativos devem ser necessariamente, apresentadas separadamente.

Observações

- Os depoimentos dos sujeitos deverão ser apresentados em espaço simples, itálico, com recuo à esquerda de 4cm, fonte tamanho 10, sem aspas e com sua identificação codificada a critério do autor, entre parênteses. Supressões devem ser indicadas pelo uso das reticências entre colchetes [...], e intervenções ao que foi dito devem ser apresentadas entre chave { };
- citação "ipsis literes" de até três linhas, usar aspas, na sequência do texto; acima de três linhas, colocar em espaço simples, com recuo à esquerda de 4cm, fonte tamanho 10. Nos dois casos fazer referência ao número da página de onde foi retirado o trecho em questão. Exemplo^(19:6).
- Figuras e tabelas devem ser limitadas(os) a cinco no total, estar inseridas no texto do artigo e em formato editável. Utilizar fonte 10 e espaço simples.
- Fazer referência a figuras e tabelas no texto, utilizando o número respectivo (não utilizar expressões *a tabela acima* ou *a figura abaixo*).

c) Referências

- Não ultrapassar o limite de 25 (vinte e cinco), para artigos de pesquisa, reflexão e relato de experiência. Nos artigos de revisão, o número de artigos incluídos na análise da mesma pode ser acrescido às 25 referências permitidas.
- A formatação da lista de referências deve adotar espaço 1,0 e 0,6 depois. Tamanho de fonte 12, alinhadas à esquerda, sem parágrafo, recuo ou deslocamento das margens.

- Pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos cinco anos
- Pelo menos 70% das referências devem ser de periódicos Nacionais e internacionais.
- No texto devem ser numeradas, de forma consecutiva de acordo com a ordem em que forem mencionadas pela primeira vez. As referências devem ser listadas na mesma ordem de citação no texto, ignorando a ordem alfabética de autores.
- Devem ser identificadas no texto por números arábicos entre parênteses e sobrescritos, sem a menção aos autores, exceto quando estritamente necessária à construção da frase. Nesse caso além do nome (sem o ano), deve aparecer o número correspondente.
- Ao fazer a citação sequencial de autores, separe-as por um traço Ex: ^(4,5,6 e 7) substituir por ⁽⁴⁻⁷⁾; quando intercalados utilize vírgula Ex:^(6,8,12). Quando a sequência for de apenas dois números, utilizar vírgula Ex:^(5,6).
- Constar o nome dos seis primeiros autores e só depois utilizar a expressão “*et al.*”.
- A exatidão das referências é de responsabilidade do(s) autor(es) e devem ser descritas em estilo Vancouver.
- Os títulos dos periódicos devem estar abreviados e de acordo com informação na página oficial eletrônica do periódico ou no Catálogo Coletivo Nacional: <http://ccn.ibict.br/busca.jsf> .

Exemplos:

Livros: Marcondes E. *Pediátrica básica*. 8ª ed. São Paulo: Sarvier: 1999.

Capítulo de Livro: Centa ML. A família enfrentando a infertilidade. In: Elsen I, Marcon SS, Silva MRD. *O viver em família e sua interface com a saúde e doença*. Maringá: Eduem; 2002. p.121-40.

Dissertação/Tese: Silva RLDT. *Avaliação da implantação da assistência às pessoas com hipertensão arterial em município do estado do Paraná*. 2013. [tese]. Maringá (PR). Programa de Pós-graduação em Enfermagem. Universidade Estadual de Maringá – UEM. 2013.

Artigos de periódicos: Gvozd R, Haddad MCL, Garcia AB, Sentone ADD. Perfil ocupacional de trabalhadores de instituição universitária pública em pré-aposentadoria. Cienc. cuid. saúde. 2014 jan/mar; 13(1): 43-48.

Artigo de Jornal: Silva HS. Estatuto do idoso em estudo. Jornal do Brasil. 2003 Jul 6; Caderno B: p. 6. Ministério proíbe fabricação de uso de agrotóxicos à base de organoclorados. Folha de S. Paulo. 2002 Set 3; p. 25.

Documentos federais, estaduais e municipais: Rio de Janeiro. Secretaria de Estado de Educação e Cultura. Programa Estadual de Educação Física - 1987/1990. Rio de Janeiro: ECEF/SEEC - RJ; 1987. Mimeografado. Brasil. Ministério da Saúde. INCA / Comprev. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2006.

Documentos eletrônicos: Godoy CB. O Curso de Enfermagem da Universidade Estadual de Londrina na construção de uma nova proposta pedagógica. Rev Latino-Am Enfermagem [on-line]. 2002 jul/ago. [citado em 28 abr 2006];10(4):596-603]. Disponível em: URL: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-1169200200400018&lng=pt&nrm=iso.jcn.co.uk/journal%202001/4_03_03.htm.

Para outros exemplos de referências consultar o site:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Abreviaturas de títulos de periódicos em português consulte o site:

<http://www.ibict.br> e em outras línguas:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals>.

POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.

ENDEREÇO

Departamento de Enfermagem - Bloco 02
Av. Colombo, 5790 - Jd. Universitário
CEP 87020-900 - Maringá - PR - BR

CONTATO

Sonia Silva Marcon

Presidente da Comissão Editorial

Telefone: +55(44)3011-5156

E-mail: revdenuem@gmail.com

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

NORMAS DA REVISTA 2

JOURNAL OF BIOMATERIALS SCIENCE, POLYMER EDITION

How should I format my manuscript?

This guide contains general advice, but some journals will have specific layout and formatting requirements. Before you submit your article, please make sure you've checked the instructions for authors for your chosen journal, so you are aware of everything that is needed. You can find the instructions for authors on the journal's homepage on Taylor and Francis Online.

If your article is accepted for publication, the manuscript will be further formatted and typeset in the correct style for the journal.

Font

Use Times New Roman font in size 12 with double-line spacing.

Margins

Margins should be at least 2.5cm (1 inch).

Title

Use bold for your article title, with an initial capital letter for any proper nouns.

Abstract

Indicate the abstract paragraph with a heading or by reducing the font size. The instructions for authors for each journal will give specific guidelines on what's required here, including whether it should be a structured abstract or graphical abstract, and any word limits.

Keywords

Keywords help readers find your article, so are vital for discoverability. If the journal instructions for authors don't give a set number of keywords to provide, aim for five or six.

Learn more about choosing suitable keywords to make your article and you more discoverable.

Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

Headings

Please follow this guide to show the level of these section headings in your article:

1. First-level headings (e.g. Introduction, Conclusion) should be in bold, with an initial capital letter for any proper nouns.
2. Second-level headings should be in bold italics, with an initial capital letter for any proper nouns.

3. Third-level headings should be in italics, with an initial capital letter for any proper nouns.
4. Fourth-level headings should be in bold italics, at the beginning of a paragraph. The text follows immediately after a full stop (full point) or other punctuation mark.
5. Fifth-level headings should be in italics, at the beginning of a paragraph. The text follows immediately after a full stop (full point) or other punctuation mark.

Tables and figures

Show clearly in the article text where the tables and figures should appear, for example, by writing [*Table 1 near here*].

Check the instructions for authors to see how you should supply tables and figures, whether at the end of the text or in separate files, and follow any guidance given on the submission system.

Find more detailed advice on including tables in your article.

It's very important that you have been given permission to use any tables or figures you are reproducing from another source before you submit.

References

References are numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and captions by bracketed numbers [1], and provide a list of references at the end of the article in numerical order with square brackets around the numbers. Reuse the original number assigned to the reference each time a reference is repeated in the text.

Insert the citation numbers at the relevant place in the text, inside any adjacent punctuation mark. Examples: Myopathy typically occurs in fewer than one in 10,000 patients on standard doses [1]. This approach was successfully implemented by Benders et al. [30] and Zhao [31] for modular NN. For this purpose, the NNs were widely used in structural inverse problems [24], damage identification [14,25], or parameter estimation [26], among many applications.

When citing multiple references, use commas (without spaces) to separate them. Use an unspaced endash to join inclusive first and last numbers, e.g. [2,3,4,5,7,10] would be abbreviated to [2–5,7,10]. Examples: Compared to the initial shape, the optimized surface shape can substantially improve the structural characteristics [12,13]. Most of the optimization methods proposed in previous studies are parametric methods [3–7]. See, for example, [1,3,10–13,15–20,22–25,27,28]. For some work along these lines, see [3,13,17,18,27]. The crack boundary was discretized using 10 discontinuous quadratic elements, where the crack-tip elements are discontinuous quarter-point [see 17,28].

Give a number even if the author is named in the text: Jones [10] has argued that ... Jones and Smith [12] have argued that ... If you want to name more than two authors in the text, use: Jones et al. [3] have argued that ...

For the journal references: Basic format: Author AA. Title of article. Abbreviated Journal Title. Date; volume(number): pages. MacGregor RJ. A functional view of consciousness and its relations in Warning | Not controlled when printed Maintained by Head of Copyediting | Taylor & Francis | Journals Page 4 of 11 Information Classification: General brain. J Integr Neurosci. 2004;3(3):253–266.

For more than three authors to cite: Meneton P, Jeunemaitre X, de Wardener HE, et al. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiol Rev.* 2005;85:679–715.

Organization as author: American Diabetes Association. Diabetes update. *Nursing.* 2003 Nov;Suppl:19–20, 24.

No author: Pelvic floor exercise can reduce stress incontinence. *Health News.* 2005;11(4):11.

For the book references: Basic format: Author AA. Book title: and subtitle. Place: Publisher; Year. Jenkins PF. Making sense of the chest x-ray: a hands-on guide. New York (NY): Oxford University Press; 2005.

For more than three authors to cite: Wenger NK, Sivarajan Froelicher E, Smith LK, et al. Cardiac rehabilitation. Rockville (MD): Agency for Health Care Policy and Research (US); 1995.

For the Thesis: PhD: Zhao C. Development of nanoelectrospray and application to protein research and drug discovery [dissertation]. Buffalo (NY): State University of New York at Buffalo; 2005.

Master's: Roguskie JM. The role of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilinglycan in virulence [master's thesis]. Pittsburgh (PA): Duquesne University; 2005.

For the website references: Website name [Internet]. Place: Publisher; Year [cited Date]. Available from: Web address StatePublicHealth.org [Internet]. Washington (DC): ASTHO; [cited 2007 Feb 23]. Available from: <http://statepublichealth.org/> BIRDNET [Internet]. Washington (DC): Ornithological Council; c1999–2006 [updated 2006 Dec 8; cited 2007 Feb 20]. Available from: <http://www.nmnh.si.edu/BIRDNET/>