

**UNIVERSIDADE DE UBERABA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS**  
**TRÓPICOS (PPGSPAT)- MESTRADO**  
**ELZA ALICE DE QUADROS**

**EFEITO DO COMPLEXO DE (DRI-12) NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS**  
**EXPERIMENTAIS EM RATOS (*Rattus norvegicus*)**

**UBERABA-MG**

**2024**



**ELZA ALICE DE QUADROS**

**EFEITO DO COMPLEXO DE (DRI-12) NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS  
EXPERIMENTAIS EM RATOS (*Rattus norvegicus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (Uniube) como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.

**Orientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves**

**Coorientadora: Profa. Dra. Isabel Rodrigues Rosado**

**UBERABA-MG**

**2024**

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

- Q22e Quadros, Elza Alice de.  
Efeito do complexo de (DRI-12) na cicatrização de feridas experimentais em ratos (*Rattus norvegicus*) / Elza Alice de Quadros. – Uberaba, 2024.  
94 f. : il., color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.  
Orientador: Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves.  
Coorientadora: Profa. Dra. Isabel Rodrigues Rosado.
1. Patologia veterinária. 2. Terapia. 3. Nanopartículas. 4. Ratos como animais de laboratório. 5. Cicatrização de ferimentos. 6. Pele. I. Alves, Endrigo Gabellini Leonel. II. Rosado, Isabel Rodrigues. III. Universidade de Uberaba. Programa de Pós -Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. IV. Título.
- CDD 636.089607

ELZA ALICE DE QUADROS

EFEITO DO COMPLEXO DE COBRE (DRI-12) NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS  
EXPERIMENTAIS EM RATOS (*Rattus norvegicus*)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

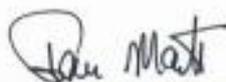
Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 09/08/2024

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves - Orientador  
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Ian Martin  
Universidade de Uberaba

Documento assinado digitalmente  
**gouv** LEONARDO AUGUSTO LOPES MUZZI  
Data: 13/08/2024 17:28:11-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Leonardo Augusto Lopes Muzzi  
Universidade Federal de Lavras



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valéria Cristina de Lima Quadros e Sandro de Quadros, por sempre me incentivarem e por todo suporte fornecido ao longo desses anos.

Aos meus familiares e amigos Aracy Rabelo, David Chaves, Isabela Rodrigues, Letícia Alves Bombig e Poliana Marques, por todo o companheirismo. Em especial, ao Higor Pinheiro, que me apoiou muito enquanto se fez presente em vida.

Ao Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves, meu orientador, e Profa. Dra. Isabel Rodrigues Rosado, coorientadora, por toda paciência, disponibilidade, ensinamentos, cooperação e dedicação com esse projeto.

Ao Prof. Dr. Ian Martin por sempre se fazer disposto a me ajudar.

A todos os professores do programa de pós-graduação por compartilharem seu conhecimento.

Ao Pós-doutorando do programa de pós-graduação, Dr. Bruno Machado Bertassoli, por todo auxílio, companheirismo, dedicação a esse projeto e pela amizade que construímos ao longo dessa trajetória.

Aos colegas de trabalho do Centro Universitário do Cerrado.

Aos alunos de Iniciação Científica, Vinícius Fagundes dos Santos, Keitt Emanuele de Oliveira Miranda e Pamela Eduarda da Silva Silva, por toda ajuda.

A pesquisadora Dr. Roberta Torres de Melo, por fornecer a nanopartícula que permitiu a realização desse estudo.

As secretárias do programa de mestrado, Lanamara Batista Gomes e Flávia Michele da Silva, por todo o carinho.

A Universidade de Uberaba, cuja os recursos financeiros e infraestrutura permitiram a execução desse projeto.

A CAPES-PROSUP pela concessão da bolsa de estudo.

A Deus, por me permitir seguir esse sonho e me proteger ao longo dessa caminhada.

E, por fim, meu respeito e agradecimento a todos os animais desse projeto.



## **APOIO FINANCEIRO**

Esse estudo foi desenvolvido com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Universidade de Uberaba.



## RESUMO

Esse trabalho investiga o efeito do Complexo Ternário de Cobre (II) com Hidrazida de Ácido 4-Fluorofenoxiacético (DRI-12) na cicatrização de feridas experimentais em ratos. Ele foi dividido em três capítulos principais. No primeiro capítulo, há uma revisão da literatura sobre os avanços no tratamento de feridas, explorando terapias não convencionais e os princípios básicos da cicatrização. Diferentes métodos, como laserterapia, uso de células-tronco, e membranas biológicas, são discutidos detalhadamente, destacando suas aplicações, mecanismos de ação e eficácia comprovada através de estudos experimentais e clínicos. O segundo capítulo continua com a revisão de literatura, abordando tratamentos inovadores para feridas utilizando nanopartículas, terapia hiperbárica, ozônio e ultrassom. As propriedades únicas das nanopartículas são destacadas, bem como os benefícios da terapia hiperbárica na melhoria da perfusão tecidual e da cicatrização. A ozonioterapia e o ultrassom terapêutico são examinados por suas ações antimicrobianas e anti-inflamatórias. O terceiro capítulo apresenta a pesquisa experimental realizada, onde 48 ratos Wistar foram divididos em grupos controle e tratado com DRI-12. Avaliações macrocópica, histológicas, pontencial de contração, expressão gênica e testes mecânicos de tração foram realizados para comparar a eficácia do tratamento nas feridas dos ratos. Os resultados indicam que o DRI-12 melhora significativamente a cicatrização, com aumento da epitelização, aumento do potencial de contração já observado nos primeiros dias, além de uma maior deposição de colágeno. Além de estimular a expressão dos transcritos gênicos EGF, VEGF, FGF2 e Colla1 a partir do sétimo dia. A dissertação apresenta um estudo abrangente sobre o potencial dos tratamentos avançados de feridas, com foco especial na eficácia do DRI-12 na cicatrização de feridas em modelos animais, sugerindo que essa abordagem pode ser promissora para aplicações clínicas futuras.

**Palavras-chave:** terapias não convencionais, nanopartículas, repação tecidual, pel



## ABSTRACT

This work investigates the effect of the Copper (II) Ternary Complex with 4-Fluorophenoxyacetic Acid Hydrazide (DRI-12) on the healing of experimental wounds in rats. It is divided into three main chapters. The first chapter includes a literature review on advances in wound treatment, exploring unconventional therapies and the basic principles of healing. Different methods, such as laser therapy, the use of stem cells, and biological membranes, are discussed in detail, highlighting their applications, mechanisms of action, and proven efficacy through experimental and clinical studies. The second chapter continues the literature review, addressing innovative wound treatments using nanoparticles, hyperbaric therapy, ozone, and ultrasound. The unique properties of nanoparticles are highlighted, as well as the benefits of hyperbaric therapy in improving tissue perfusion and healing. Ozone therapy and therapeutic ultrasound are examined for their antimicrobial and anti-inflammatory actions. The third chapter presents the experimental research conducted, where 48 Wistar rats were divided into control and DRI-12 treated groups. Macroscopic and histological evaluations, contraction potential, gene expression, and mechanical tensile tests were performed to compare the effectiveness of the treatment on the rats' wounds. The results indicate that DRI-12 significantly improves healing, with increased epithelialization, enhanced contraction potential observed from the early days, and greater collagen deposition. Additionally, it stimulates the expression of EGF, VEGF, FGF2, and Colla1 gene transcripts from the seventh day. The dissertation presents a comprehensive study on the potential of advanced wound treatments, with a special focus on the efficacy of DRI-12 in wound healing in animal models, suggesting that this approach may be promising for future clinical applications.

**Keywords:** unconventional therapies, nanoparticles, tissue repair, skin



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Fotografia após procedimento cirúrgico (D0) de ressecção de dois segmentos completos de pele de formato circular com 12 mm de diâmetro, sendo um realizado na região dorsal interescapular (seta vermelha) e o outro 30 mm caudal ao primeiro (seta preta) em ratos (*Rattus norvegicus*) pertencentes ao grupo controle (A) e grupo DRI-12, tratado com complexo de cobre DRI-12 na concentração de 50 mmol/L (B). .....46
- Figura 2- Fórmula química do complexo de cobre [Cu(4-fh)(phen)(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] (4-fh = 4-fluorophenoxyacetic acid hydrazide and phen = 1,10-phenanthroline) desenvolvido por Paixão et al. (2017). .....47
- Figura 3 -Fotografia das amostras de pele coletadas no 21° dia após a lesão, de formato retangular, com 50 mm de comprimento por 20 mm de largura colhidas da região dorsal no sentido transversal do eixo longitudinal do animal, sendo que uma delas foi centralizada na lesão/cicatriz (A) e uma na pele íntegra. Antes do início do teste mecânico, foram recortadas a fim de proporcionar-lhes uma conformação de ampulheta, cujo centro apresentasse 10 mm de largura (B). Amostras posicionadas na máquina universal de ensaios, início do teste (C), durante o teste (D), final do teste (E) com a pele rompida. .... 54
- Figura 4- Fotografias obtidas durante a análise clínica das feridas cutâneas experimentais em ratos do grupo controle (A, B, C, D, E) e grupo DRI-12 (F, G, H, I, J) aos 0, 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Observar presença de crostas no 3° e 7° dia (B, C e G); presença de tecido de granulação (D, E, H e I); epitelização completa (J)..... 56
- Figura 5- Média e desvio padrão dos escores obtidos na avaliação clínica de feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. \* Diferem pelo teste não paramétrico Mann-Whitney (p<0,05). ..... 58
- Figura 6- Média e desvio padrão do potencial de contração (%) das feridas experimentais em ratos do grupo controle e do grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. \* Diferem pelo teste T não pareado (p<0,05). ..... 59
- Figura 7- Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos após realização de feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12. A, B, C, e D grupo controle. A', B', C', e D' grupo DRI-12. Hematoxilina e eosina. Aumento de 10x..... 61
- Figura 8- Mediana e distância interquartílica dos escores obtidos na avaliação histológica com hematoxilina-eosina de feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. \* Diferem pelo teste não paramétrico Wilcoxon (p<0,05). .... 63



- Figura 9- Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos após realização de feridas experimentais em ratos do grupo controle grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Tricrômico de masson. Aumento de 10x. Observar deposição de colágeno (área azul claro) em B, B', C, C', D e D'..... 64
- Figura 10- Mediana e distância interquartílica dos escores obtidos na avaliação histológica com tricrômico de masson de feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. \*Diferem pelo teste não paramétrico Wilcoxon ( $p < 0,05$ ). ..... 65
- Figura 11- Média e desvio padrão da área do colágeno (%) das feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. \* Diferem pelo teste T não pareado ( $p < 0,05$ ). ..... 66
- Figura 12- Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos após realização de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com nanopartículas de complexo ternário de cobre (II) com hidrazida de ácido 4-fluorofenoxiacético (Dri-12) (DRI-12) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Picrosirius Red. Aumento de 10x. Observar predominância colágeno tipo III correspondente com a cor verde (A, B, C e E) e predominância de colágeno tipo I correspondente com a cor vermelha (D, F, G e H). ..... 67
- Figura 13- Média e desvio padrão da área do colágeno tipo I e do colágeno tipo III (%) das feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. \* Diferem pelo teste T não pareado ( $p < 0,05$ ). Col I: colágeno do tipo I; Col III: Colágeno do tipo III. .... 68
- Figura 14- Eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade do RNA total extraído. 1, 2 e 3 = grupo Sham 3 dias; 4, 5 e 6 = grupo Sham 7 dias; 7, 8 e 9 = grupo Sham 14 dias; 10, 11 e 12 = Grupo controle 3 dias; 13, 14 e 15 = Grupo controle 7 dias; 16, 17 e 18 = Grupo controle 14 dias; 19, 20 e 21 = Grupo DRI-12 3 dias; 22, 23 e 24 = Grupo DRI-12 7 dias; 25, 26, 27 e 28 = Grupo DRI-12 14 dias. .... 69
- Figura 15- Expressão de transcritos gênicos Colla1, EGF, VEGF, FGF2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das feridas experimentais em ratos do grupo controle, grupo DRI-12) e pele íntegra (Sham), no terceiro dia de avaliação. GAPDH foi utilizado com gene referência. Análise realizada pelo REST2009. \* $p < 0,05$ . ..... 71
- Figura 16- Expressão de transcritos gênicos Colla1, EGF, VEGF, FGF2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das feridas experimentais em ratos do grupo controle, grupo DRI-12) e pele íntegra (Sham), no sétimo dia de avaliação. GAPDH foi utilizado com gene referência. Análise realizada pelo REST2009. \* $p < 0,05$ . ..... 73
- Figura 17- Expressão de transcritos gênicos Colla1, EGF, VEGF, FGF2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das feridas experimentais em ratos do grupo controle, grupo DRI-12 e pele íntegra (Sham), no 14º dia de avaliação. GAPDH foi utilizado com gene referência. Análise realizada pelo REST2009. \* $p < 0,05$ . ..... 75



Figura 18- Média e desvio padrão da tensão (MPa) das peles íntegras (T. íntegro) e com lesão (T. lesão) em amostras cutâneas após reparação de feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 no 21º dia após a lesão através do teste mecânico de tração. \* Diferem pelo teste T pareado e não pareado ( $p < 0,05$ )..... 76



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação utilizada para avaliação macroscópica durante a análise clínica de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com complexo de cobre (DRI-12) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. ....	47
Tabela 2- Classificação utilizada para a análise histológica de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com nanopartículas de Complexo Ternário do Cobre (II) com Hidrazida de Ácido 4-Fluorofenoxiacético (Dri-12) (DRI-12) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. ....	50
Tabela 3- Sequências, temperatura de anelamento e amplicon esperado dos primers utilizados neste estudo. ....	52
Tabela 4- Média e desvio padrão dos escores obtidos na avaliação clínica de feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão .....	57
Tabela 5- Média e desvio padrão do potencial de contração (%) das feridas experimentais em ratos do grupo controle e do grupo DRI-12 aos três, sete, 14 e 21 dias após a lesão.....	59
Tabela 6- Média e desvio padrão dos escores obtidos na avaliação histológica com hematoxilina-eosina das feridas experimentais em ratos do grupo controle do grupo DRI-12 aos três, sete, 14 e 21 dias após a lesão.....	62
Tabela 7- Média e desvio padrão dos escores obtidos na avaliação histológica com o tricrômico de masson das feridas experimentais em ratos do grupo controle e do grupo DRI_12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.....	64
Tabela 8- Média e desvio padrão da área do colágeno (%) das feridas experimentais em ratos do grupo controle e do grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Tricrômico de masson. ....	65
Tabela 9- Média e desvio padrão da área do colágeno (%) das feridas experimentais em ratos do grupo controle e do grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. ....	68
Tabela 10- Expressão e erro padrão dos transcritos gênicos Col1a1, EGF, VEGF, FGF2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das feridas experimentais em ratos do grupo controle, grupo DRI-12 e pele íntegra (Sham), no terceiro dia de avaliação. ....	70



Tabela 11- Expressão e erro padrão dos transcritos gênicos Col1a1, EGF, VEGF, FGF2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das feridas experimentais em ratos do grupo controle, grupo DRI-12 e pele íntegra (Sham), no sétimo dia de avaliação. .... 72

Tabela 12- Expressão de transcritos gênicos Col1a1, EGF, VEGF, FGF2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das feridas experimentais em ratos do grupo controle, grupo DRI-12 e pele íntegra (Sham), no 14º dia de avaliação. .... 74

Tabela 13- Média e desvio padrão da tensão (MPa) das peles íntegras e com lesão em amostras cutâneas após reparação de das feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 no 21º dia após a lesão através do teste mecânico de tração. .... 76



## LISTA DE ANEXOS

Anexo I: Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	85
Anexo II: Protocolo de histologia.....	86
Anexo III: Protocolo de preparação de PBS.....	87
Anexo IV: Protocolo de extração de RNA.....	88
Anexo V: Protocolo de síntese de cDNA.....	90
Anexo VI: Protocolo pra gel de Agarose 1%.....	91



## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Avanços no tratamento de feridas: Parte 1 .....	16
INTRODUÇÃO.....	17
REVISÃO DE LITERATURA .....	18
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	23
REFERÊNCIAS .....	24
CAPÍTULO 2: Avanços no tratamento de feridas: Parte 2 .....	28
INTRODUÇÃO.....	29
REVISÃO DE LITERATURA .....	30
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	34
REFERÊNCIAS .....	35
CAPÍTULO 3: Efeito do Complexo de (DRI-12) na Cicatrização de Feridas Experimentais em Ratos ( <i>Rattus Novergicus</i> ).....	39
INTRODUÇÃO.....	42
OBJETIVOS.....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
Normas éticas.....	44
Animais .....	44
Grupos experimentais .....	45
Indução da lesão.....	45
Tratamento .....	46
Avaliação macroscópica da ferida .....	47
Pontencial de contração .....	47
Coleta das amostras.....	48
Avaliação histológica.....	48
Expressão gênica.....	51



Análise estatística .....	54
RESULTADOS .....	55
Avaliação macroscópica .....	55
Potencial de contração .....	58
Avaliação histológica.....	59
Expressão gênica.....	68
Teste mecânico de tração .....	75
DISCUSSÃO .....	77
CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS .....	81



**CAPÍTULO 1: Avanços no tratamento de feridas: Parte 1**

PEER REVIEW, Vol. 6, Nº 4, 2024  
DOI: 10.53660/PRW-1866-3513  
ISSN: 1541-1389

---

**Avanços no Tratamento de Feridas: Parte 1****Advances in Wound Treatment: Part 1**

---

**Elza Alice de Quadros**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3900-0174>  
Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção  
Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba  
(PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [elzaaliceq@gmail.com](mailto:elzaaliceq@gmail.com)

**Fernanda de Oliveira Soares**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7906-7897> Programa  
de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos  
Trópicos da Universidade de Uberaba  
(PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [fernanda.oliveiramedvet@gmail.com](mailto:fernanda.oliveiramedvet@gmail.com)

**Bruno Machado Bertassoli**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7596-0511>  
Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba  
(PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [brunobertassoli@gmail.com](mailto:brunobertassoli@gmail.com)

**Lara Bernardes Bizinoto**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2409-629X>  
Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba  
(PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [larabbizinoto@gmail.com](mailto:larabbizinoto@gmail.com)

**Isabel Rodrigues Rosado**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7819-4253>  
Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba  
(PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [isabel.rosado@uniube.br](mailto:isabel.rosado@uniube.br)

**Ian Martin**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6934-8257>  
Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba  
(PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [ian.martin@uniube.br](mailto:ian.martin@uniube.br)

**Endrigo Gabellini Leonel Alves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8524-3949>  
Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba  
(PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [endrigoalves@gmail.com](mailto:endrigoalves@gmail.com)

## RESUMO

Este trabalho de revisão de literatura apresenta uma análise abrangente sobre os principais tipos de terapias não convencionais utilizadas no manejo de feridas, além de explorar os princípios básicos da cicatrização de feridas. Destaca-se a importância crucial da limpeza e desbridamento adequados das feridas para uma cicatrização eficaz, juntamente com diferentes abordagens terapêuticas, como tratamento por primeira, segunda e terceira intenção. O estudo também investiga terapias não convencionais, como laserterapia, uso de células-tronco e membranas biológicas, fornecendo detalhes sobre seus mecanismos de ação e evidências de eficácia em estudos experimentais e clínicos. Ao concluir, ressalta-se a necessidade contínua de avanços na área e a importância de pesquisas adicionais para avaliar a eficácia e segurança dessas terapias alternativas. Em síntese, este trabalho oferece uma visão atualizada e abrangente sobre a cicatrização de feridas, fornecendo insights valiosos sobre as opções terapêuticas disponíveis para promover a recuperação dos tecidos lesionados.

**Palavras-chave:** Laserterapia; Células tronco; Membranas biológicas; Celulose bacteriana; Reparação tecidual.

---

## ABSTRACT

This literature review provides a comprehensive analysis of the main types of non-conventional therapies used in wound management, along with an exploration of the basic principles of wound healing. It highlights the crucial importance of proper wound cleansing and debridement for effective healing, alongside different therapeutic approaches such as first, second, and third intention treatments. The study also delves into non-conventional therapies like laser therapy, the use of stem cells, and biological membranes, providing details on their mechanisms of action and evidence of efficacy from experimental and clinical studies. In conclusion, it emphasizes the ongoing need for advancements in the field and the importance of further research to assess the effectiveness and safety of these alternative therapies. In summary, this work offers an updated and comprehensive view of wound healing, providing valuable insights into the available therapeutic options for promoting the recovery of injured tissues.

**Keywords:** Laser therapy; Stem cells; Biological membranes; Bacterial cellulose; Tissue repair.

---

## INTRODUÇÃO

A cicatrização de uma ferida é um processo fisiopatológico, em que inúmeros eventos celulares e bioquímicos ocorrem simultaneamente. O manejo terapêutico adequado da injúria tecidual é muito importante para o sucesso da regressão da ferida. Dessa forma, o tratamento deve ser escolhido mediante avaliação da extensão da lesão, tipo de ferimento, grau de contaminação, presença ou não de outras patologias (BIZINOTO et al., 2022a).

O tratamento de feridas cutâneas pode ser realizado de forma clínica ou cirúrgica. O primeiro passo a ser realizado após uma lesão é o cobrimento da ferida para reduzir a contaminação e evitar traumas e em seguida realizar a avaliação da injúria tecidual para instituir o melhor manejo. A etapa de lavagem da ferida com solução cristalóide isotônica para remoção mecânica das sujidades, células mortas, tecidos necrosados e microrganismos deve ser realizada independente da conduta terapêutica instituída (BIZINOTO et al., 2022b).

A utilização de terapias não convencionais para o manejo de feridas agudas ou crônicas vem crescendo. A composição desses métodos é diversa, podendo ser de origem animal, vegetal, luminosa ou até mesmo com gases. Os tratamentos alternativos não tem a função de substituir os convencionais mais sim de suplementá-los otimizando o processo de cicatrização tecidual, garantindo conforto e controle de dor aos pacientes (MALAQUIAS, 2015).

Portanto, o conhecimento sobre as terapias não convencionais é crucial para otimizar a cicatrização de feridas e encurtar o tempo de reparação tecidual. Compreender as propriedades e mecanismos de ação de cada terapia é essencial para selecionar o método mais eficaz para cada caso específico. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é revisar de forma sistemática e atualizada os princípios fundamentais da reparação cutânea, além de apresentar uma análise dos tratamentos não convencionais descritos nos últimos anos. Ao fornecer uma visão organizada e abrangente das opções terapêuticas disponíveis, este estudo busca contribuir para o avanço da prática clínica, oferecendo *insights* valiosos para a promoção da cicatrização de feridas e, conseqüentemente, melhorando os resultados para os pacientes.

## ANATOMIA E FISIOLOGIA DA PELE

A pele, o maior órgão dos mamíferos, é composta por duas camadas principais: a epiderme, a camada externa, e a derme, localizada abaixo da epiderme. Subjacente a essas camadas, encontra-se a hipoderme, também conhecida como tecido subcutâneo. Devido à sua extensão e complexidade, a pele pode ser classificada em quatro padrões distintos com base em sua espessura: pele com pelos, pele escrotal, coxins e plano nasal (BERNARDO; SANTOS; SILVA, 2019).

A epiderme é a camada mais superficial da pele, caracterizada pela ausência de vascularização. Sua principal função é servir como uma barreira de proteção contra agentes externos. A derme encontra-se entre a epiderme e a hipoderme, desempenhando um papel fundamental nos processos fisiológicos e patológicos da pele. Por fim, o tecido subcutâneo é composto por adipócitos e desempenha diversas funções, como armazenamento de energia, absorção de choques e regulação térmica (BERNARDO; SANTOS; SILVA, 2019).

## CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A pele, sendo um dos maiores órgãos do corpo humano e animal, está constantemente sujeita a diversos tipos de danos, tanto externos, como cortes ou abrasões, quanto internos, como infecções ou condições patológicas. Essas agressões podem resultar na formação de feridas, que são áreas de comprometimento da integridade da pele. Quando isso ocorre, o organismo inicia uma série de processos complexos para reparar o tecido danificado e restaurar a barreira cutânea. Este processo de cicatrização pode ser dividido em três fases distintas, porém interligadas. A primeira fase é a inflamatória, que se inicia imediatamente após a lesão. Nesta fase, ocorre a vasoconstrição para conter o sangramento, seguida pela vasodilatação, que facilita a chegada de células de defesa, como os leucócitos, ao local da lesão. Além disso, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, que estimulam a migração celular e promovem a remoção de detritos e microrganismos presentes na ferida. A segunda fase, denominada proliferativa, é marcada pela intensa atividade celular. Durante esta fase, células especializadas chamadas fibroblastos migram para o local da ferida e começam a produzir colágeno, uma proteína fundamental na formação do tecido de granulação, que serve como uma matriz para a regeneração da pele. Além disso, ocorre angiogênese, ou seja, formação de novos vasos sanguíneos, que são essenciais para fornecer nutrientes e oxigênio às células em crescimento. A reepitelização, processo pelo qual células da borda da ferida se proliferam e migram para cobrir a superfície exposta, também ocorre nesta fase. Por fim, a fase de remodelação é responsável pela organização e maturação do tecido de granulação. Durante esta fase, os fibroblastos continuam a depositar colágeno, que é gradualmente remodelado e reorganizado para formar uma matriz mais resistente e similar ao tecido original. O objetivo final deste processo é restaurar a integridade da pele, conferindo-lhe resistência e função adequadas (CAPELLA et al., 2020; BIZINOTO et al., 2022;).

## TRATAMENTO DE FERIDAS

Para determinar o tratamento mais apropriado para uma ferida, é essencial realizar uma avaliação cuidadosa de sua extensão, grau de contaminação e tempo de evolução. Com base nessas informações, diferentes abordagens terapêuticas podem ser consideradas. Uma opção é o tratamento por primeira intenção, também conhecido como tratamento primário, no qual a ferida é fechada imediatamente após sua ocorrência. Isso é indicado em feridas recentes, com baixo grau de contaminação e que apresentam bordas bem definidas, visando promover uma cicatrização rápida e com mínima formação de tecido de granulação. Por outro lado, o tratamento por segunda intenção envolve manter a ferida aberta, permitindo que a cicatrização ocorra de dentro para fora, com a formação gradual de tecido de granulação. Essa abordagem é adequada para feridas extensas, contaminadas ou com bordas irregulares, onde é necessário um processo de limpeza e desbridamento mais extenso. Uma terceira opção é o tratamento por terceira intenção, que combina elementos do tratamento por segunda intenção com o fechamento cirúrgico posterior da ferida. Esse método é utilizado em casos onde inicialmente é necessário promover a formação de tecido de granulação, seguido pela sutura ou fechamento da ferida para otimizar o resultado estético e funcional. A escolha entre essas abordagens dependerá das características individuais da ferida, bem como da avaliação clínica e preferências do paciente (BIZINOTO et al., 2022a).

A adequada gestão inicial das feridas é crucial, independentemente de sua gravidade, para o sucesso de qualquer tratamento subsequente. Inicialmente, é fundamental realizar a limpeza da área afetada, preferencialmente utilizando uma solução cristalóide isotônica. Se não for possível, água corrente pode ser empregada. Esse procedimento permite a remoção de contaminantes presentes na lesão. Em ambientes hospitalares, é essencial realizar uma tricotomia abrangente na região afetada antes da lavagem, especialmente em pacientes estáveis. Após a limpeza, o próximo passo é o desbridamento da ferida, que visa a remoção de exsudatos, tecidos necróticos, detritos celulares e corpos estranhos, além de auxiliar na redução da carga microbiana. Durante esta fase inicial, também é sugerida a coleta de material para realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos após a lavagem, independentemente da classificação da ferida. Essas etapas iniciais são fundamentais para preparar a ferida para a cicatrização adequada e prevenir complicações como infecções e retardo na recuperação (BIZINOTO et al., 2022b).

Para determinar o tratamento mais adequado para uma lesão tecidual, é imprescindível considerar uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos que têm impacto direto no processo de cicatrização. Os fatores intrínsecos referem-se a eventos que estão relacionados às características do próprio organismo. Isso pode incluir alterações vasculares, como comprometimento da circulação sanguínea, doenças concomitantes que afetam o sistema imunológico ou metabólico, idade do paciente, estado nutricional e condições médicas pré-existentes, entre outros aspectos. Por outro lado, os fatores extrínsecos são influências externas que podem prejudicar a cicatrização da ferida. Isso pode ocorrer devido ao uso de certos medicamentos, como fármacos glicocorticoides, quimioterápicos e radioterápicos, que podem afetar negativamente a capacidade do organismo de se recuperar adequadamente. Portanto, a avaliação criteriosa desses fatores é essencial para selecionar o tratamento mais eficaz e personalizado para cada paciente, levando em consideração suas características individuais e potenciais influências externas que possam impactar o processo de cicatrização (STANLEY; CORNELL, 2018). Outro fator que vem sendo avaliado é a presença de bactérias que tem desenvolvido mecanismos de resistência aos fármacos convencionais que são utilizados para o tratamento de feridas, devido à alta carga bacteriana dos locais lesionados e devido as falhas no mecanismo de reparação tecidual (OLIVEIRA et al., 2021).

No mercado, há uma variedade de produtos disponíveis para auxiliar na realização de curativos, cada um com funcionalidades específicas. Esses produtos são formulados para desempenhar diversas ações, tais como limpeza da ferida, remoção de tecido morto (desbridamento), efeitos bactericidas ou bacteriostáticos, controle do líquido exsudato e estímulo à formação de novo tecido (tecido de granulação) ou à remodelação da pele danificada. Além disso, já foram estudadas técnicas avançadas e/ou alternativas para o tratamento de feridas, visando potencializar ou otimizar o processo de cicatrização. Entre essas técnicas, destacam-se o uso de fitoterápicos, ozonioterapia, laserterapia, terapia com células-tronco, xenoenxerto e celulose bacteriana (COTRIM, 2017). Essas abordagens serão detalhadas a seguir.

## LASERTERAPIA

A sigla LASER, que significa "amplificação de luz por emissão estimulada de radiação", representa dispositivos nos quais partículas de luz (fótons), monocromáticas, são direcionadas em uma única direção para formar um feixe. Esses dispositivos foram desenvolvidos há cerca de 60 anos e desde então têm sido objeto de estudo em diversos campos, especialmente em relação ao seu efeito terapêutico. Os lasers podem ser classificados como de alta ou baixa potência. Os lasers de alta potência são usados para procedimentos como corte ou coagulação de tecidos, enquanto os de baixa potência são empregados no tratamento de feridas e controle da dor (BAVARESCO et al., 2019). A terapia com laser de baixa energia, também conhecida como "laser frio", utiliza uma intensidade de irradiação baixa para promover efeitos biológicos nos tecidos, sem a intenção de gerar calor localmente. Os tipos mais comuns de lasers utilizados são o hélio-neônio (HeNe), gálio-alumínio-arsênio (GaAlAs), arsênio-gálio (AsGa) e índio-gálio-alumínio-fosfeto (InGaAlP) (ANDRADE; CLARK; FERREIRA, 2014).

Existem diversos parâmetros a serem considerados, incluindo comprimento de onda (nm), densidade de energia (J/cm<sup>2</sup>), intensidade (W/cm<sup>2</sup>), frequência (Hz) e duração do pulso (ms), bem como tempo de exposição e duração do tratamento. A variação desses parâmetros entre os estudos dificulta a avaliação precisa da eficácia dos tratamentos (WOODRUFF et al., 2004; POSTEN et al., 2006; SILVA et al., 2010).

Os lasers mais comumente utilizados em terapia emitem comprimentos de onda na faixa do vermelho (620 nm a 750 nm) ou infravermelho (750 nm a 950 nm). No entanto, os comprimentos de onda azul (450 nm a 495 nm) estão sendo investigados devido ao seu possível efeito antimicrobiano (ANDRADE; CLARK; FERREIRA, 2014).

Os parâmetros frequentemente recomendados incluem uma intensidade entre 10 a 100 W/cm, potência de 0,5W, frequência de 5.000 Hz e duração entre 1 a 500 milissegundos, com densidade entre 1 a 6 J/cm<sup>2</sup>. Densidades acima de 10 J/cm<sup>2</sup> têm sido associadas à inibição da proliferação celular e a lesões deletérias (SAMANEH et al., 2015).

O mecanismo de ação se baseia no efeito fotoquímico, no qual a energia emitida em baixa intensidade através de fótons é absorvida pelas mitocôndrias, promovendo maior excitação molecular e facilitando reações de transferência de elétrons na cadeia respiratória. Isso leva a uma maior produção de ATP e à geração em níveis baixos de espécies reativas de oxigênio (EROS), que por sua vez induzem a produção de fatores de transcrição que estimulam a angiogênese, proliferação de fibroblastos, formação de tecido de granulação, síntese de colágeno, controle da dor e ação anti-inflamatória (SILVA et al., 2010; FARIVAR; MALEKSHAHABI; SHIARI, 2014; SAMANEH et al., 2015).

O potencial antimicrobiano do laser de baixa energia está em estudo, com avaliações preliminares mostrando resultados como desnaturação proteica e degradação da parede celular de bactérias devido à liberação de EROs, além de efeitos indiretos na melhoria da função de macrófagos e na modulação da resposta imune (FARIVAR, MALEKSHAHABI, SHIARI, 2014).

A fototerapia com lasers de baixa energia apresenta baixo risco de efeitos colaterais e poucas contraindicações. Estudos têm demonstrado resultados promissores em feridas cirúrgicas, feridas contaminadas e crônicas, embora não seja indicada para feridas neoplásicas devido ao potencial de estimular o crescimento tumoral. No entanto, a falta de padronização nos estudos dificulta análises abrangentes e estudos de grande escala ainda não estão disponíveis na medicina veterinária. Portanto, o uso dessa terapia como alternativa deve ser considerado com cautela, e mais pesquisas são necessárias para determinar protocolos eficazes de tratamento (WOODRUFF et al., 2004; POSTEN et al., 2006; SILVA et al., 2010).

Um estudo experimental envolvendo feridas cirúrgicas em ratos tratados com laser de baixa potência (LBP), utilizando doses de 4 J/cm<sup>2</sup> e 8 J/cm<sup>2</sup>, evidenciou uma reepitelização mais eficiente em comparação com o grupo controle. Esse tratamento demonstrou eficácia em acelerar as fases iniciais do processo de cicatrização, resultando na redução da área da ferida pela metade na maioria dos animais tratados já no sétimo dia pós-operatório. Além disso, observou-se um aumento significativo na produção de colágeno no 14<sup>o</sup> dia nos ratos tratados com LBP (ABREU et al., 2011). Outras pesquisas destacaram a melhoria da estimulação da formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) em pacientes com feridas tratadas com terapia a laser de baixa intensidade (LIB). Um estudo envolvendo pacientes diabéticos submetidos a tratamento com laser do tipo HeNe mostrou uma maior neovascularização em comparação com pacientes do grupo controle. Observou-se que o grupo tratado apresentou o dobro do volume capilar até o décimo quinto dia de aplicação (SCHINDL et al., 1998).

## CÉLULAS TRONCO

Uma outra abordagem amplamente estudada e aplicada no tratamento de feridas é o uso de células-tronco. Essa tecnologia biomédica tem demonstrado capacidade de acelerar o processo de cicatrização em todas as três fases envolvidas nesse processo (HOCKING, 2012). As células-tronco podem ser administradas diretamente na área da lesão ou ao redor dela, onde elas se diferenciam em diversos tipos celulares que desempenham papel na regeneração dos tecidos (BEHEREGARAY et al., 2017).

As células-tronco são caracterizadas por sua capacidade única de proliferação e autorrenovação. Elas são classificadas em células-tronco embrionárias, obtidas de embriões por volta do quinto dia de desenvolvimento, e células-tronco adultas, que são derivadas de tecidos de organismos adultos. Devido a preocupações éticas e questões políticas, o uso de células-tronco embrionárias enfrenta obstáculos significativos (ZORZANELLI, 2017).

As células-tronco adultas, também conhecidas como células-tronco mesenquimais (CTM), não levantam preocupações éticas, pois podem ser isoladas dos tecidos do próprio indivíduo. O isolamento de CTM foi descrito em vários tecidos, como sistema nervoso central, pele, sangue periférico, fígado, trato gastrointestinal, sistema nervoso periférico, pâncreas, vasos sanguíneos, coração, córnea, retina, músculo esquelético, membrana sinovial, periósteo, pulmão, líquido amniótico, sangue do cordão umbilical e placenta. No entanto, a medula óssea e o tecido adiposo são considerados os principais locais de obtenção de CTM, devido à sua abundância e facilidade de acesso (ALVES et al., 2017).

Estudos têm evidenciado que as células-tronco mesenquimais desempenham um papel importante na regulação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1), ao mesmo tempo em que estimulam a produção de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL10). Essa ação contribui diretamente para modular a resposta inflamatória durante o processo de cicatrização. Além disso, as células-tronco mesenquimais promovem a proliferação dos fibroblastos, a formação de novo tecido fibroso (fibroplasia) e a formação de novos vasos sanguíneos (neovascularização), regulando esses processos através da expressão de

vários fatores, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Devido à sua capacidade reguladora do sistema imunológico, essas células também contribuem para o controle de infecções na área da ferida (LI; FU, 2012; HOCKING 2012; BAI et al., 2023).

Em apoio aos efeitos da aplicação de células-tronco mesenquimais em lesões teciduais, um estudo com feridas cirúrgicas em ratos revelou que os animais tratados no primeiro, terceiro e quinto dia após a operação, com a inoculação ao redor da ferida, apresentaram efeitos positivos na proliferação celular e vascularização da lesão em comparação com o grupo controle. No entanto, neste experimento, as células-tronco de tecido adiposo não demonstraram influência na fase inflamatória (BEHEREGARAY et al., 2017).

## MEMBRANAS BIOLÓGICAS

O uso de membranas como adjuvante no tratamento de feridas é bem estabelecido em diversos contextos. Bancos de pele humana e materiais sintéticos ou de origem animal são áreas de pesquisa em crescimento, embora muitos desses biomateriais tenham um custo elevado, o que limita sua acessibilidade (LIMA-JÚNIOR et al., 2020).

Diversas membranas biológicas têm sido estudadas para uso como curativos, incluindo tecidos de diferentes espécies. Por exemplo, pele de suínos, anfíbios, cães e pericárdio bovino têm sido investigados (MILAGRE et al., 2022). Recentemente, no Brasil, a pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) emergiu como um biomaterial promissor para tratamento de feridas, oferecendo uma alternativa de baixo custo (LIMAJÚNIOR et al., 2020).

A pele da tilápia apresenta uma estrutura histológica semelhante à da pele humana, com uma camada densa de colágeno tipo I e alta resistência (ALVES et al., 2015). Estudos microbiológicos demonstraram que não há sinais de infecção nas amostras de pele de tilápia, apenas microbiota normal (LIMA-JÚNIOR et al., 2016). Testes em ratos confirmaram a eficácia e segurança da pele de tilápia no tratamento de queimaduras (LIMA-JÚNIOR et al., 2017), levando a estudos clínicos em humanos, onde foi observada redução da dor e desconforto durante o tratamento (MIRANDA; BRANDT, 2019; LIMA-JÚNIOR et al., 2020; RODRÍGUEZ et al., 2020).

A avaliação histológica da pele de tilápia revela uma epiderme revestida por um epitélio pavimentoso estratificado rico em colágeno, principalmente do tipo I, com organização notável do colágeno, facilitando sua manipulação e sutura em grandes áreas de feridas e apresentando similaridades com a pele humana (FILHO et al., 2015).

A pele de tilápia contém peptídeos como piscidina, defensina e hepcidina, que promovem a proliferação celular, liberação de citocinas e estimulação de fatores como o VEGF, contribuindo para o processo de cicatrização, além de possuir ações antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (MILAGRES et al., 2022).

Na medicina veterinária, a pele de tilápia tem sido usada com sucesso no tratamento de feridas crônicas em equinos, melhorando o manejo e permitindo maior espaçamento entre curativos (COSTA et al., 2020; SILVA et al., 2020).

Estudos em modelos experimentais com ratos mostram que o suporte da matriz de microfibras de colágeno presente na pele de tilápia pode acelerar a cicatrização de feridas cutâneas, promovendo a proliferação de fibroblastos e angiogênese (ELBIALY et al., 2020).

Em um estudo realizado no Hospital São Marcos de Recife, pacientes com queimaduras tratados com pele de tilápia mostraram uma cicatrização sem necessidade de trocas de curativos durante

o período de cicatrização e uma redução significativa na dor relatada em comparação com outro método de tratamento (MIRANDA; BRANDT, 2019).

Curativos oclusivos feitos com pele de tilápia têm sido aplicados com sucesso em várias espécies animais, incluindo equinos, para tratamento de feridas traumáticas, demonstrando eficácia na cicatrização e sendo uma opção de baixo custo (COSTA et al., 2020).

O Brasil desenvolveu o primeiro banco de pele animal, focado na produção de pele de tilápia para tratamento de feridas e queimaduras. Espera-se que, devido ao baixo custo de produção e grande potencial de uso, esse material se torne cada vez mais acessível para tratamento em humanos e na medicina veterinária. No entanto, são necessárias mais pesquisas para avaliar completamente essa nova técnica (LIMAJÚNIOR et al., 2020).

## CELULOSE BACTERIANA

A celulose bacteriana é um biopolímero produzido extracelularmente por várias culturas de bactérias gram-negativas. Suas principais características incluem biocompatibilidade, resistência mecânica, elasticidade e durabilidade (AMORIM, 2020). Por conta dessas propriedades, essa tecnologia ganhou destaque na medicina, especialmente no tratamento de feridas, onde sua utilização como curativos é vantajosa.

Além das propriedades mencionadas anteriormente, a celulose bacteriana possui a capacidade de manter a área lesionada úmida e absorver exsudatos inflamatórios (FORESTI; VÁZQUEZ; BOURY, 2017).

A biocelulose é uma membrana composta por uma estrutura tridimensional de microfibras de celulose alinhadas em paralelo. Para sua fabricação como curativos, o processo de desfibrilação é realizado e essas fibras ou nanofibras são incorporadas a um hidrogel, sendo este o veículo mais comum (PICHETH et al., 2017). Esses curativos são de fácil aplicação, podendo ser utilizados em áreas extensas ou regiões irregulares, e não requerem trocas diárias. Além disso, permitem a oxigenação da pele, são permeáveis a gases, promovem hemostasia e proporcionam alívio imediato da dor após a aplicação (CZAJA et al., 2006; SULAeva et al., 2015). Uma desvantagem desse tipo de material é a ausência de ação antimicrobiana (ALVES, 2019), mas outros compostos podem ser incorporados a membrana adicionando a função antimicrobiana.

De acordo com as vantagens mencionadas anteriormente, um estudo foi conduzido utilizando hidrogel à base de biocelulose a 1% no tratamento de feridas cirúrgicas experimentais em equinos. Os resultados demonstraram que o grupo tratado apresentou um aspecto superior do novo tecido formado e uma melhor ação antiinflamatória em comparação com o grupo controle, que recebeu apenas solução fisiológica. No entanto, a avaliação molecular dos dois grupos não revelou diferença significativa na expressão de citocinas envolvidas no processo de cicatrização e nos tipos I e III de colágeno (ALVES, 2019).

Além disso, em outro estudo realizado com pacientes com feridas isquêmicas devido à Doença Obstrutiva Arterial Periférica em membros inferiores, foi observada uma maior redução na área da ferida após 30 dias e uma taxa de cicatrização mais rápida em 90 dias nos pacientes tratados com um curativo na forma de filme contendo gel de biopolímero de celulose bacteriana em comparação com os pacientes que não receberam esse tratamento (MAIA, 2019).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta incidência de feridas na medicina humana e veterinária destaca a relevância do tema da cicatrização. Diversos tratamentos estão sendo estudados para otimizar esse processo. Atualmente, há um foco em utilizar materiais ou tecnologias que sejam biocompatíveis, eficientes em todas as fases de reparação da lesão e que possuam propriedades antimicrobianas, visando controlar o crescente problema de resistência antimicrobiana associado aos fármacos convencionais.

As novas biotecnologias desenvolvidas para acelerar a reparação tecidual têm demonstrado eficácia. É de extrema importância aprofundar o entendimento sobre seus efeitos e propriedades para uma compreensão completa de seu papel no processo de cicatrização. Isso é especialmente relevante no caso de feridas complexas, onde a recuperação do tecido lesionado é mais desafiadora

## AGRADECIMENTOS

Os autores expressam sua sincera gratidão à CAPES pela concessão da bolsa de estudo por meio do programa CAPES/PROSUP. Além disso, gostariam de agradecer à Universidade de Uberaba por fornecer a infraestrutura necessária e financiar o projeto de pesquisa que deu origem ao presente trabalho. A colaboração e apoio dessas instituições foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste estudo

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. C. Histological analysis of experimental wound healing under the action of low power laser. **Scientia Medica**, v. 21, p. 96-100, 2011.
- ALVES A. P. N. N. et al. Microscopic evaluation, histochemical study and analysis of tensiometric properties of the Nile Tilapia skin. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v.14, n.3, p.203-10, 2015.
- ALVES, A. A. Celulose bacteriana microcristalina modificada: de curativos a filtros bacterianos. 2019. 116 f. Tese (Doutora em Ciência de Materiais) - Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2019.
- ALVES, E. G. L. et al. Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo e da medula óssea de cães. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, p. 1-14, 2017.
- AMORIM, J. D. P. Obtenção de celulose bacteriana aditivada com extrato de própolis para aplicação em cosméticos. 2020. 108f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2020.
- ANDRADE, F. S.; CLARK, R. M.; FERREIRA, M. L. Effects of low-level laser therapy on wound healing. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 41, n. 2, p. 129–133, 2014.
- BAI, R. et al. The Roles of WNT Signaling Pathways in Skin Development and Mechanical-Stretch-Induced Skin Regeneration. **Biomolecules**, v. 13, n. 12, p. 1702, 2023.
- BAVARESCO, T. et al. Terapia a laser de baixa potência na cicatrização de feridas. **Revista de Enfermagem UFPE online**, v. 13, n. 1, p. 216–226, 2019.

- BEHEREGARAY, W. K. et al. Células-tronco mesenquimais aplicadas nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização de feridas cutâneas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1591–1600, 2017.
- BERNARDO, C. B.; SANTOS, K.; SILVA, D. P. Pele: Alterações anatômicas do nascimento à maturidade. **Revista saúde em foco, Brasil**, n.11, p. 1221-1233, 2019.
- BIZINOTO, L. B. et al. Wound treatment principles - part one. **International Journal of Health Science**, v. 2, n. 18, 2022a.
- BIZINOTO, L. B. et al.. Wound treatment principles - part two. **International Journal of Health Science**, v. 2, n. 18, 2022b.
- CAPELLA, S. O. et al. Traumatic skin injuries in small animals: characteristics and treatments. **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 2, p. 459-467, 2020.
- COSTA, B. O. et al. Treatment of a Traumatic Equine Wound Using Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skin as a Xenograft. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 48, p. 506, 2020.
- COTRIM, O. S. Auditoria em saúde promovendo o desenvolvimento de novos produtos para feridas crônicas. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 11, n. 9, p. 283–307, 2017.
- CZAJA, W. et al. Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–151, 2006.
- ELBIALY Z.I. et al. Collagen extract obtained from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) skin accelerates wound healing in rat model via up regulating VEGF, bFGF, and  $\alpha$ SMA genes expression. **BMC Veterinary Research**, v. 16, p. 352, 2020.
- FARIVAR S.; MALEKSHAHABI T.; SHIARI R. Biological effects of low level laser therapy. **Journal of lasers in medical sciences**, v.5, n.2, p.58–62, 2014.
- FILHO, A. P. N. N. et al. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 14, n. 3, p. 203–210, 2015.
- FORESTI, M. L.; VÁZQUEZ, A.; BOURY, B. Applications of bacterial cellulose as precursor of carbon and composites with metal oxide, metal sulfide and metal nanoparticles: A review of recent advances. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 447–467, 2017.
- HOCKING, A. M. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 1, n. 4, p. 166–171, 2012.

LI, H.; FU, X. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. **Cell and Tissue Research**, v. 348, n. 3, p. 371–377, 2012.

LIMA-JÚNIOR E. M. et al. Innovative Burn Treatment Using Tilapia Skin as a Xenograft: A Phase II Randomized Controlled Trial. **Journal of burn care & research**, v.41, n.3, p.585-592, 2020.

LIMA-JÚNIOR E. M. et al. Characterization of the microbiota of the skin and oral cavity of *Oreochromis niloticus*. **Journal of Health and Biological Sciences**, v.4, n.3, p.193-197, 2016.

LIMA-JÚNIOR E. M. et al. The use of tilapia skin (*Oreochromis niloticus*), as an occlusive biological dressing, in the treatment of burn wounds. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v.16, n.1, p.10-17, 2017.

MAIA, A. L. Filme e gel de biopolímero de celulose bacteriana para o tratamento de feridas isquêmicas após revascularização de membros inferiores. 2019. 59 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

MALAQUIAS, T. S. M. Tratamentos não convencionais para o tratamento de feridas. **Revista Contexto & Saúde**, v. 15, n. 29, p. 22–29, 2015.

MILAGRES, A. O. et al. O uso da pele de Tilápia do Nilo como curativo oclusivo temporário no tratamento de queimaduras térmicas: revisão sistemática. **Revista Interdisciplinar Ciências Médicas**, v. 6, n. 2, p. 60–67, 2022.

MIRANDA, M. J. B. D.; BRANDT, C. T. Nile tilapia skin xenograft versus silverbased hydrofiber dressing in the treatment of second-degree burns in adults. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (RBCP) – Brazilian Journal of Plastic Surgery*, v. 34, n. 1, p. 89–95, 2019.

OLIVEIRA, F. T. D. et al. Microrganismos e Resistência Antimicrobiana em feridas complexas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e10110212161, 6 fev. 2021.

PICHETH, G. F. et al. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 97–106, 2017.

POSTEN W.; WRONE D. A.; DOVER J. S.; ARNDT K. A.; SILAPUNT S.; ALAM M. Low-Level Laser Therapy for Wound Healing: Mechanism and Efficacy. **Dermatologic Surgery**, v.31, n.3, p.334–340, 2006.

RODRÍGUEZ A. H. et al. Male-to-Female Gender-Affirming Surgery Using Nile Tilapia Fish Skin as a Biocompatible Graft. **The Journal of Minimally Invasive Gynecology**, v.27, n.7, p.1474-1475, 2020.

SAMANEH R.; et al. Laser Therapy for Wound Healing: A Review of Current Techniques and Mechanisms of Action. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, v.12, p.217-223, 2015.

SCHINDL, A. et al. Low-Intensity Laser Irradiation Improves Skin Circulation in Patients With Diabetic Microangiopathy. **Diabetes Care**, v. 21, n. 4, p. 580–584, 1 abr. 1998.

SILVA J. P.; et al. Laser Therapy in the Tissue Repair Process: A Literature Review. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.28, n.1, p.17–21, 2010.

SILVA S. et al. Using tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) as an occlusive biological curative in equine wounds. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.56, e.154079, 2020.

STANLEY, B. J.; CORNELL, K. Wound Healing. In: JOHNSTON, S. A.; TOBIAS, K. 608 M. *Veterinary Surgery Small Animal*. 2 ed. Elsevier, 2018, p.487-529.

SULAEVA, I. et al. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications: **A review. Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, 2015.

WOODRUFF L. D.; et al. The Efficacy of Laser Therapy in Wound Repair: A MetaAnalysis of the Literature. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.22, n.3, p.241–247, 2004.

ZORZANELLI, R. T. et al. Pesquisa com células-tronco no Brasil: a produção de um novo campo científico. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 24, n. 1, p. 129– 144, 2017.

## CAPÍTULO 2: Avanços no tratamento de feridas: Parte 2



PEER REVIEW, Vol. 6, Nº 4, 2024  
DOI: 10.53660/PRW-1870-3517  
ISSN: 1541-1389

---

### Avanços no Tratamento de Feridas: Parte 2

#### Advances in Wound Treatment: Part 2

---

**Elza Alice de Quadros**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3900-0174>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [elzaaliceq@gmail.com](mailto:elzaaliceq@gmail.com)

**Fernanda de Oliveira Soares**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7906-7897>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [fernanda.oliveiramedvet@gmail.com](mailto:fernanda.oliveiramedvet@gmail.com)

**Lara Bernardes Bizinoto**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2409-629X>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [larabbizinoto@gmail.com](mailto:larabbizinoto@gmail.com)

**Isabel Rodrigues Rosado**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7819-4253>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [isabel.rosado@uniube.br](mailto:isabel.rosado@uniube.br)

**Ian Martin**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6934-8257>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [ian.martin@uniube.br](mailto:ian.martin@uniube.br)

**Bruno Machado Bertanssoli**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7596-0511>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [brunobertassoli@gmail.com](mailto:brunobertassoli@gmail.com)

**Endrigo Gabellini Leonel Alves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8524-3949>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (PPGSPAT/UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil  
E-mail: [endrigoalves@gmail.com](mailto:endrigoalves@gmail.com)

## RESUMO

Os tratamentos de feridas utilizando nanopartículas, terapia hiperbárica, ozônio e ultrassom são avanços marcantes na medicina contemporânea, oferecendo soluções inovadoras para pacientes com feridas de difícil cicatrização. As nanopartículas, devido às suas propriedades únicas, são amplamente investigadas na dermatologia, destacando-se por suas capacidades terapêuticas promissoras. A terapia hiperbárica, por sua vez, tem demonstrado eficácia no tratamento de feridas crônicas, agindo diretamente na melhoria da perfusão tecidual e na promoção da cicatrização. Em contrapartida, a ozonioterapia e o ultrassom se destacam pela sua ação antimicrobiana e anti-inflamatória, respectivamente, oferecendo potenciais benefícios para a saúde dos pacientes com feridas. Apesar dos desafios e da necessidade de mais pesquisas para compreender totalmente o alcance terapêutico dessas modalidades, é inegável que representam avanços significativos na busca por tratamentos mais eficazes para feridas, com potencial para transformar os cuidados médicos nessa área e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

**Palavras-chave:** Nanopartículas; Terapia hiperbárica; Ozonioterapia; Ultrassom terapêutico; Reparação tecidual.

---

## ABSTRACT

Wound treatments using nanoparticles, hyperbaric therapy, ozone, and ultrasound are significant advancements in contemporary medicine, providing innovative solutions for patients with difficult-to-heal wounds. Nanoparticles, owing to their unique properties, are extensively investigated in dermatology, standing out for their promising therapeutic capabilities. Hyperbaric therapy, in turn, has demonstrated efficacy in treating chronic wounds by directly improving tissue perfusion and promoting healing. Conversely, ozone therapy and ultrasound are notable for their antimicrobial and anti-inflammatory actions, respectively, offering potential health benefits for patients with wounds. Despite the challenges and the need for further research to fully comprehend the therapeutic scope of these modalities, they undeniably represent significant advances in the pursuit of more effective wound treatments, with the potential to transform medical care in this area and enhance patients' quality of life.

**Keywords:** Nanoparticles; Hyperbaric Therapy; Ozonotherapy; Therapeutic Ultrasound; Tissue Repair.

---

## INTRODUÇÃO

A importância das inovações no tratamento de feridas é indiscutível no contexto da saúde contemporânea. À medida que a ciência avança, novas abordagens e tecnologias emergem, proporcionando opções mais eficazes e eficientes para promover a cicatrização e o bem-estar dos pacientes. Entre as diversas modalidades de tratamento, destacam-se aqueles que incorporam nanopartículas, terapia hiperbárica, ozonioterapia, fitoterapia e ultrassom terapêutico. As nanopartículas, por exemplo, oferecem uma abordagem inovadora, permitindo a administração controlada de medicamentos diretamente na área afetada, resultando em uma liberação gradual e prolongada do princípio ativo, o que pode acelerar a cicatrização e reduzir complicações (DeLOUISE et al., 2012). A terapia hiperbárica, por sua vez, utiliza oxigênio puro em alta pressão para aumentar a quantidade de oxigênio nos tecidos, promovendo a regeneração celular e melhorando a vascularização, o que contribui para uma recuperação mais rápida e eficaz (EGGLETON; BISHOP; SMERDON., 2015). A ozonioterapia, outra inovação promissora, envolve a aplicação de uma mistura de oxigênio e ozônio na área afetada, o que pode estimular a circulação sanguínea, combater infecções e acelerar a cicatrização (MARCHESINI; RIBEIRO, 2020). Por fim, o ultrassom terapêutico tem sido amplamente utilizado para promover a cicatrização de feridas, através da aplicação de ondas sonoras de alta frequência que podem estimular o processo de reparo tecidual, reduzir a dor e a inflamação (CHANG;

PERRY; CROSS, 2017). Em suma, as inovações no tratamento de feridas não apenas ampliam o arsenal terapêutico à disposição dos profissionais de saúde, mas também representam uma esperança renovada para pacientes que enfrentam desafios na cicatrização de suas lesões. Esse trabalho tem o objetivo de técnicas inovadoras para o tratamento de feridas.

## NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas são definidas como qualquer material com dimensões menores que 100 nm até 0,2 nm. Elas podem variar em tamanho, textura, solubilidade e origem, incluindo fontes naturais e artificiais, bem como partículas produzidas inadvertidamente, como as provenientes da poluição (DOWLING et al., 2004). Entre os diversos tipos de nanopartículas, as mais comumente utilizadas hoje incluem nanotubos de carbono, fulerenos, pontos quânticos, metais como prata (Ag) e ouro (Au), óxidos metálicos como titânio e óxido de ferro, peróxido de zinco, dióxido de silício e nanopartículas lipofílicas (DeLOUISE, 2012).

Nesse contexto, é fundamental compreender os conceitos de nanociência e nanotecnologia. A nanociência envolve o estudo da manipulação de materiais em escalas atômicas, moleculares e macromoleculares, onde as propriedades diferem significativamente daquelas em escalas maiores. Já a nanotecnologia envolve o projeto, caracterização e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas controlando forma e tamanho em escalas de nanômetros (DOWLING et al., 2004).

O estudo das nanopartículas tem impulsionado o desenvolvimento de fármacos e tecnologias para aprimorar diagnósticos, tratamentos e prognósticos de diversas doenças.

Um exemplo é a aplicação de prata nanocristalizada, que tem sido usada para reduzir a carga microbiana no organismo (GRASSI; GRASSI, 2021; WALI et al., 2022).

A dermatologia também se beneficia das nanotecnologias, compreendendo os efeitos das nanopartículas na saúde da pele e em diversas doenças. Os nanomateriais são utilizados em terapêuticas, como protetores solares com proteção UVB, e seus efeitos na penetração da pele e reações adversas estão sendo melhor compreendidos. O mecanismo de penetração de nanopartículas na pele ainda não é totalmente compreendido (DeLOUISE, 2014). A pele intacta apresenta desafios para a absorção de fármacos devido a vários fatores, como espessura, temperatura, pH, grau de hidratação, vascularização, higienização local, camada lipídica, quantidade de folículos pilosos e raça, entre outros (WOKOVICH et al., 2006).

Teorias têm sido propostas sobre a absorção de nanopartículas pela pele. Uma sugere que a pele intacta não permite a passagem desses materiais, enquanto outra indica que os folículos capilares contêm receptores para nanopartículas, especialmente quando estimulados por massagem ou fricção (DeLOUISE, 2014). Uma terceira linha de estudo avalia a interação direta de partículas neutras com a pele e seus efeitos tóxicos. Um estudo quantificou a penetração de polietilenoglicol neutro revestido em fragmentos de pontos quânticos em camundongos sem pelos, mostrando um acúmulo de aproximadamente 2% da droga no fígado após 48 horas de aplicação (GOPPE et al., 2009).

Embora a epiderme seja naturalmente impermeável a partículas e microrganismos devido à sua composição de células mortas e uma camada hidrofóbica, ela pode ser facilmente lesionada (por exemplo, por cortes e abrasões) ou perfurada (por insetos especializados ou injeções terapêuticas). Além disso, várias doenças de pele, como alergias, podem comprometer sua capacidade de resistir a agentes tóxicos (DOWLING et al., 2004).

Nanopartículas têm sido estudadas para o tratamento de feridas, especialmente em pacientes com comorbidades que podem dificultar a cicatrização, como diabetes, obesidade e dermatites atópicas (SILVA et al., 2018; GRASSI; GRASSI 2021). Entre as nanopartículas, as de metais têm sido amplamente testadas para otimizar esse tratamento, apresentando diferentes propriedades que influenciam nas interações moleculares e reações químicas (GRASSESCHI; SANTOS, 2020).

A prata é um exemplo de nanopartícula amplamente utilizada para tratamento de feridas, demonstrando propriedades anti-inflamatórias, bactericidas e não tóxicas ao corpo humano (GRASSI; GRASSI, 2021). Comparada à sulfadiazina de prata, estudos mostraram que a nanopartícula de prata tem menor toxicidade para fibroblastos e promove uma resposta inflamatória mais rápida, acelerando a cicatrização (MOHSENI et al., 2019).

A associação de nanopartículas de prata com fotossensibilizadores em curativos de feridas infectadas demonstrou eficácia antimicrobiana, principalmente quando combinada com exposição à luz (CHEN et al., 2019). Em queimaduras, curativos contendo nanopartículas de prata, colistina e membrana amniótica humana descelularizada aceleraram a cicatrização e eliminaram o crescimento bacteriano (WALI et al., 2022).

Nanopartículas de óxido de zinco extraído da planta *Rubia cordifolia* apresentaram propriedades antimicrobianas e antioxidantes superiores a formulações convencionais, demonstrando potencial para o tratamento de feridas (KAUR et al., 2022). Além disso, hidrogéis contendo nanopartículas de dissulfeto de molibdênio e ouro promoveram a cicatrização de feridas em pacientes diabéticos, eliminando bactérias e acelerando a regeneração tecidual (LI et al., 2022).

Os complexos de cobre são uma alternativa promissora no controle do crescimento bacteriano. Essas moléculas podem matar bactérias por interagir com componentes vitais, perturbando processos celulares cruciais. Eles geram espécies reativas de oxigênio que danificam as membranas celulares e o material genético das bactérias. Além disso, podem inibir enzimas essenciais para o metabolismo bacteriano (NG et al., 2013). Outros autores já mostraram a capacidade dos compostos de cobre para reduzir as populações microbianas (CHEN et al., 2009).

As nanopartículas de cobre têm sido exploradas devido a suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e de estímulo à renovação celular. Estudos mostraram que o tamanho das nanopartículas e sua estabilização influenciam em seu potencial terapêutico, com resultados promissores no tratamento de feridas em modelos animais (DIN; REHAN, 2016; TAO et al., 2019).

## TERAPIA HIPERBÁRICA

A terapia hiperbárica é uma modalidade terapêutica que envolve a administração de oxigênio puro em um ambiente pressurizado, geralmente duas a três vezes acima da pressão atmosférica ao nível do mar (1 atm). Na medicina humana, seu uso abrange uma ampla gama de condições, incluindo o tratamento de feridas crônicas, feridas complexas, traumáticas, com necrose, infectadas, queimaduras, entre outras. No entanto, na medicina veterinária, apesar de estudos promissores, sua aplicação ainda é limitada devido à falta de familiaridade dos profissionais com sua eficácia, ao alto custo inicial de investimento em equipamentos, à escassez de treinamento da equipe e à ausência de protocolos terapêuticos bem definidos para cada doença e adaptados para diferentes espécies (LEVITAN et al., 2021).

A terapia hiperbárica não é indicada para o tratamento de tecidos saudáveis ou em processo normal de cicatrização. Seu uso é mais eficaz em situações onde a cura da ferida é comprometida devido à inflamação excessiva, infecção, formação de fibrose e necrose, resultando em deficiência crônica de

oxigênio (NIINIKOSKI, 2004). Na medicina veterinária, possíveis aplicações incluem lesões relacionadas à síndrome de reperfusão tecidual, feridas por mordedura, envenenamento, necrose, pós-operatório de enxertos e retalhos, queimaduras, feridas ósseas e choque hemorrágico (LEVITAN et al., 2021).

Durante o tratamento hiperbárico, o aumento da pressão atmosférica resulta em uma maior densidade do gás oxigênio devido à redução de seu volume, o que, por sua vez, aumenta sua concentração e facilita sua absorção nos alvéolos pulmonares. O uso de oxigênio puro altera a maneira como ele se difunde nos tecidos. A inalação de oxigênio sob pressão elevada aumenta ainda mais a pressão do oxigênio disponível, promovendo uma maior difusão no sangue. Além disso, o aumento da pressão parcial do oxigênio também aumenta sua capacidade de solubilidade, resultando em uma concentração maior nos tecidos (HARDY; THOM; NEUMANN, 2008).

A fisiopatogenia do tratamento de feridas está em constante estudo. Um dos efeitos observados do ambiente de hiperoxia é a vasoconstrição generalizada, que reduz o edema e melhora a perfusão, resultando na diminuição da dor. Além disso, ocorre um aumento dos fatores estimulantes da proliferação de fibroblastos, angiogênese e deposição de colágeno. O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pode ser benéfico em níveis moderados, agindo como mensageiro no processo de transcrição e estimulando a produção de fatores que modulam a inflamação. Em alta concentração, o oxigênio possui efeitos bacteriostáticos, bactericidas e antifúngicos, agindo diretamente sobre microrganismos anaeróbios e aumentando a capacidade de ação dos leucócitos, além de modular o processo imunológico (AL-WAILI; BUTLER, 2006; THACKHAM; MCELWAIN; LONG, 2008; EGGLETON; BISHOP; SMERDON, 2015;

SUREDA et al., 2016; LEVITAN et al., 2021).

Contudo, é fundamental enfatizar que o uso indiscriminado da terapia hiperbárica pode acarretar em riscos, como barotraumas que resultam em lesões nos tímpanos e pulmões, além de toxicidade após exposição prolongada a altas concentrações de oxigênio. É relevante salientar que, na medicina veterinária, ainda não há consenso sobre protocolos terapêuticos estabelecidos, destacando a necessidade de novos estudos para sua padronização (AMARAL et al., 2021).

## OZONIOTERAPIA

O gás ozônio (O<sub>3</sub>) é uma molécula instável com alto poder oxidativo, incolor e com odor característico. Sua formação ocorre através de descargas elétricas que quebram uma molécula comum de O<sub>2</sub>, liberando um átomo de O para se ligar formando O<sub>3</sub>. Devido às suas propriedades antimicrobianas, cicatrizantes e imunoestimulantes, a ozonioterapia é utilizada em muitos campos, como no tratamento de água, higienização de alimentos, antisepsia em hospitais e como tratamento adjuvante em diversas enfermidades. Na medicina humana e animal, a ozonioterapia tem sido estudada para o tratamento de feridas, lesões dermatológicas, distúrbios musculares, doenças do trato urinário, infecções, doenças inflamatórias, odontologia e como adjuvante no tratamento de pacientes oncológicos (HAYASHI; FRIOLANI, 2018; GAYON-AMARO; FLORES-COLIN, 2019; PETEOACĂ et al., 2020).

Para a produção do gás, são utilizados aparelhos ozonizadores feitos com materiais resistentes à degradação pelo ozônio, como polietileno, polipropileno, teflon, alumínio anodizado, aço inoxidável, cerâmica e vidro. Além disso, materiais adjuvantes aos tratamentos, como seringas e bolsas, também devem ser feitos de materiais resistentes ao ozônio. O gás deve ser utilizado imediatamente, pois é muito reativo e instável, sendo rapidamente transformado em O<sub>2</sub>, com uma meia-vida de cerca de 40 minutos em temperatura ambiente (HAYASHI; FRIOLANI, 2018).

As vias de administração da ozonioterapia são variadas, podendo ser subcutânea, intramuscular, intravenosa, intra-articular, retal, intra-vaginal, auto-hemoterapia ozonizada e tópica. A auto-hemoterapia busca os efeitos sistêmicos da ozonioterapia e consiste na ozonização de uma quantidade de sangue venoso retirado do paciente, seguido da sua reintrodução intravenosa ou intramuscular, utilizando técnicas assépticas adequadas. O gás ozônio também pode ser administrado diretamente nas vias intramuscular e intra-articular ou por insuflação via retal e intra-vaginal (PETEOACĂ et al., 2020).

No tratamento tópico de feridas, o ozônio pode ser aplicado utilizando veículos como solução de água ou óleo ozonizado, ou aplicando o gás diretamente sobre a lesão com o uso de uma bolsa. O óleo ozonizado é produzido através do borbulhamento contínuo do gás. Quando o óleo entra em contato com a pele, o ozônio é liberado, e seus efeitos terapêuticos ocorrem, atuando na desinfecção da ferida e acelerando o processo de cicatrização. Armazenado sem contato com a luz e em local refrigerado, possui validade de até um ano (FERREIRA et al., 2013; MARCHESINI; RIBEIRO, 2020).

Ao entrar em contato com o tecido, o ozônio oxida diversas substâncias, produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO) e produtos oxidantes lipídicos (POL), que são responsáveis pelas ações bioquímicas do O<sub>3</sub>. As EROs atuam de forma imediata e desaparecem rapidamente, enquanto os POLs são distribuídos, atuando de forma mais sistêmica. O peróxido de hidrogênio é a principal ERO produzida, desempenhando diversos efeitos celulares, atuando como sinalizador intracelular e interagindo com diversas células do sangue. Ele atua na glicólise, aumentando a formação de ATP, e no transporte de oxigênio para dentro das células, aumentando a atividade de plaquetas e liberando autacóides e fatores de crescimento, favorecendo o reparo tecidual. Atua em neutrófilos e leucócitos, estimulando a síntese de interleucinas e citocinas, favorecendo a modulação do sistema imune. Já os POLs atuam estimulando a sinalização de mecanismos antioxidativos, podendo aumentar a liberação de células-tronco, favorecendo a cicatrização de tecidos (HAYASHI; FRIOLANI, 2018).

A ação antimicrobiana do ozônio tem potencial microbicida, bactericida, vermicida, fungicida e parasiticida. Sua ação ocorre pela oxidação e degradação da parede celular, alterando a permeabilidade e levando à lise. Ao adentrar na célula, também atua na oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos. A ação cicatrizante ocorre pela migração de fibroblastos e aumento da síntese de colágeno. A ação imunoestimulante ocorre pelo estímulo à síntese de anticorpos, ativação de macrófagos e linfócitos T. O ozônio tem papel direto na mediação da inflamação, atuando na produção de citocinas e inibindo a formação do ácido araquidônico e a síntese de prostaglandinas, bloqueando a inflamação e promovendo analgesia e redução da inflamação desde a primeira aplicação em feridas agudas e crônicas (KOZAT; OKMAN, 2019).

O tratamento com ozônio possui baixos riscos quando realizado corretamente. Existem algumas preocupações ao se utilizar a técnica, como evitar concentrações elevadas e tempo de exposição excessiva. Não é indicado manter em contato com as superfícies em tratamento por mais de 30 minutos, nem realizar a inalação direta do gás, pois possui efeito tóxico no trato respiratório, podendo levar a irritação de mucosas, dores de cabeça, náuseas e colapso pulmonar. O uso excessivo da técnica no tratamento de feridas pode levar à lesão do epitélio, retardando a cicatrização. Algumas contraindicações também incluem pacientes com hipertireoidismo, uma vez que o ozônio pode estimular a produção de hormônios tireoidianos, e não é indicado para pacientes diabéticos, com distúrbios de coagulação, anemias severas e hemorragias ativas, pois a ação rápida do processo oxidativo favorece a ocorrência de distúrbios de coagulação (MARCHESINI; RIBEIRO, 2020).

Embora existam respostas clínicas positivas para diversas condições, a ozonioterapia ainda levanta muitos questionamentos. A maioria dos estudos sugere sua utilização como alternativa de abordagem para patologias específicas ou como uso coadjuvante terapêutico. Realizada de forma criteriosa, há baixos riscos em sua aplicação, mas ainda carecem de estudos mais amplos e específicos, principalmente na área veterinária (PETEOACĂ et al., 2020).

Nos últimos anos, a ozonioterapia tem sido amplamente aplicada no tratamento de feridas, com resultados eficazes. Embora sua origem remonte à Primeira Guerra Mundial, sua popularização ocorreu recentemente. Consiste na aplicação de gás ozônio (O<sub>3</sub>), que age por oxidação, resultando em efeitos imunomoduladores, anti-inflamatórios, analgésicos e antissépticos em dosagens terapêuticas (LIMA; FELIX; CARDOSO, 2021).

Observa-se que o ozônio pode aumentar os níveis de vários fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interleucina-8 (IL-8), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), otimizando o processo de reparação tecidual. Além disso, minimiza os efeitos do processo inflamatório ao melhorar a perfusão tecidual da região. Outro efeito positivo para o tratamento de feridas é sua ação antibacteriana e antifúngica pelo estresse oxidativo causado nesses microrganismos. Pesquisas indicaram que a aplicação direta de ozônio na pele por até 20 minutos, com uma concentração aproximada de 0,90  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em uma câmara, não resulta em efeitos prejudiciais. No entanto, não é recomendado o uso do ozônio na região da cabeça e do pescoço (ZHANG et al., 2014).

Para o tratamento de feridas, as vias tópica e subcutânea são as mais utilizadas, onde o gás é aplicado ao redor da área afetada. Estudos sobre a terapia com ozônio para o tratamento de feridas têm mostrado benefícios em diversas espécies, incluindo aves, répteis, equinos, cães, gatos e pequenos mamíferos silvestres, além de humanos (JARAMILLO et al., 2020; TEODORO et al., 2023).

## TERAPIA COM ULTRASSOM

O ultrassom consiste em ondas sonoras com frequência acima da capacidade de audição humana (20 kHz), geradas pela passagem de corrente alternada por um transdutor com efeito piezoelétrico. Quando aplicado ao tecido, o ultrassom desencadeia forças micromecânicas em nível celular e molecular, resultando em uma variedade de efeitos terapêuticos que contribuem para a cicatrização de feridas. Essa terapia é utilizada há muitos anos com resultados positivos no tratamento de feridas, destacando-se pela capacidade de penetração profunda no leito da ferida e direcionamento altamente preciso, sem evidências de efeitos adversos significativos (HART, 1998; YADOLLAHPOUR et al., 2014).

O ultrassom requer um meio de transmissão, como água, solução salina, gel ou plástico filme, para garantir o contato entre a cabeça do transdutor e a ferida, uma vez que não se propaga no ar. Durante a aplicação, é essencial movimentar continuamente o transdutor em movimentos circulares sobre a lesão para evitar a formação de ondas estacionárias, que podem aumentar a intensidade total e resultar em danos nos tecidos circundantes (HART, 1998).

Os parâmetros do ultrassom terapêutico, como frequência da onda (Hz), intensidade ( $\text{W/cm}^2$ ), tipo de pulso (contínuo ou intermitente), duração e frequência dos tratamentos, variam de acordo com a aplicação clínica. Embora não haja protocolos padronizados, resultados terapêuticos positivos têm sido observados com intensidades entre 0,5 e 3  $\text{W/cm}^2$  e frequências entre 1 a 3.3 MHz, dependendo das características do tecido e da profundidade de penetração necessária (HART, 1998; HESS; HOWARD; ATTINGER, 2003; YADOLLAHPOUR et al., 2014).

Os efeitos terapêuticos do ultrassom podem ser térmicos ou não térmicos, dependendo da intensidade aplicada. Intensidades mais altas resultam em efeitos térmicos, como aumento do fluxo sanguíneo e extensibilidade do colágeno, enquanto intensidades mais baixas produzem efeitos não térmicos, que incluem a cavitação e o microstreaming (HESS; HOWARD; ATTINGER, 2003; ALKAHTANI et al., 2017).

A cavitação e o *microstreaming* são dois mecanismos fundamentais do ultrassom não térmico. Na cavitação, ocorre a formação de bolhas microscópicas nos tecidos, que se expandem e comprimem devido à variação de pressão, gerando um fluido circundante estável. Já no *microstreaming*, a variação de pressão distorce a membrana celular, aumentando sua permeabilidade e influenciando na atividade intracelular (HANKS; SPODNICK, 2005; ALKAHTANI et al., 2017; CHANG; PERRY; CROSS, 2017; KOTRONIS; PRASHANTH, 2020).

A terapia com ultrassom no tratamento de feridas apresenta resultados promissores na medicina humana, porém há escassez de estudos na medicina veterinária, dificultando a definição de protocolos de tratamento. Embora os mecanismos de ação do ultrassom ainda necessitem de melhor compreensão, seu uso adequado, seguindo as recomendações, é considerado seguro e pode ser benéfico para o tratamento de feridas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os tratamentos de feridas com nanopartículas, terapia hiperbárica, ozônio e ultrassom são abordagens promissoras na medicina contemporânea. As nanopartículas oferecem novas perspectivas na dermatologia, proporcionando soluções inovadoras para pacientes com feridas de difícil cicatrização. A terapia hiperbárica demonstra eficácia no tratamento de feridas crônicas, oferecendo benefícios significativos devido à sua capacidade de aumentar a perfusão tecidual e promover a cicatrização. Por sua vez, a ozonioterapia e o ultrassom se destacam pela ação antimicrobiana e anti-inflamatória, respectivamente, mostrando-se terapias promissoras para melhorar a qualidade de vida dos pacientes com feridas. Apesar dos desafios e da necessidade de mais estudos para compreender completamente seu potencial terapêutico, essas modalidades terapêuticas representam avanços importantes na busca por melhores tratamentos para feridas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores expressam sua sincera gratidão à CAPES pela concessão da bolsa de estudo por meio do programa CAPES/PROSUP. Além disso, gostariam de agradecer à Universidade de Uberaba por fornecer a infraestrutura necessária e financiar o projeto de pesquisa que deu origem ao presente trabalho. A colaboração e apoio dessas instituições foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste estudo

## REFERÊNCIAS

- ALKAHTANI S. A. et al. Ultrasound-based Techniques as Alternative Treatments for Chronic Wounds: A Comprehensive Review of Clinical Applications. **Cureus**, v. 9, n. 12, p. e1952, 2017.
- AL-WAILI N. S.; BUTLER G. J. Effects of Hyperbaric Oxygen on Inflammatory Response to Wound and Trauma: Possible Mechanism of Action. **The Scientific World Journal**, v. 6, p. 425–441, 2006.
- AMARAL, B.P. et al. Hyperbaric oxygen therapy in wound healing in mice. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, n. 2, p. 361-366, 2021.

CHANG Y.-J. R.; PERRY J.; CROSS K. Low-Frequency Ultrasound Debridement in Chronic Wound Healing: A Systematic Review of Current Evidence. **Plastic Surgery**, v. 25, n. 1, p. 21–26, 2017.

CHEN, H. et al. Removal of copper ions by a biosorbent. **Cinnamomum camphora leaves powder**, v. 177, p. 228–p236, 2009.

CHEN, J. et al. Composite of silver nanoparticles and photosensitizer leads to mutual enhancement of antimicrobial efficacy and promotes wound healing. **Chemical Engineering Journal**, v. 374, p. 1373–1381, 2019.

DeLOUISE, L. A. Applications of Nanotechnology in Dermatology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 302, p. 964-975, 2012.

DIN, M. I.; REHAN, R. Synthesis, Characterization, and Applications of Copper Nanoparticles. **Analytical Letters**, v. 50, n. 1, p. 50–62, 2017.

DOWLING, A., et al. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. A Report by The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, London. 2004.

EGGLETON P.; BISHOP A.; SMERDON G. Safety and efficacy of hyperbaric oxygen therapy in chronic wound management: current evidence. **Chronic Wound Care Management and Research**, v. 2, p. 81-93, 2015.

FERREIRA S. et al. Ozonioterapia no controle da infecção em cirurgia oral. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 34, n. 1, p. 36–38, 2013.

GAYON-AMARO S. G.; FLORES-COLIN E. Ozone applications in veterinary oncology. **Journal of Ozone Therapy**, v. 3, n. 4, p. 18-19, 2019.

GOPPE, N. V et al. Quantitative Determination of Skin Penetration of PEG-Coated CdSe Quantum Dots in Dermabraded but not Intact SKH-1 Hairless Mouse Skin. **Toxicological Science**, v. 111, n. 1, p. 37-48, 2009.

GRASSESCHI, D.; SANTOS, D. P. Plasmonic nanomaterials: Part I. Fundamentals of nanoparticle spectroscopy and its relation with the sers effect. **Química Nova**, v. 43, n. 10, p. 1463-1481, 2020.

GRASSI, L. T.; GRASSI, V. M. T. Silver nanoparticle action on wound healing: a systematic review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 58109-58131, 2021.

HANKS J.; SPODNICK G. Wound Healing in the Veterinary Rehabilitation Patient. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 35, n. 6, p. 1453– 1471, 2005.

HARDY K.; THOM S. R.; NEUMANN T. **Physiology and Medicine of Hyperbaric Oxygen Therapy**. 1 ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2008.

HART J. The use of ultrasound therapy in wound healing. **Journal of Wound Care**, v. 7, n. 1, p. 25–28, 1998.

HAYASHI M. P.; FRIOLANI M. Aplicabilidade clínica cirúrgica da ozonioterapia em pequenos animais: revisão de literatura. **Unimar Ciência**, v. 27, n. 1-2, p.88-100, 2018.

HESS C. L.; HOWARD M. A.; ATTINGER C. E. A Review of Mechanical Adjuncts in Wound Healing: Hydrotherapy, Ultrasound, Negative Pressure Therapy, Hyperbaric Oxygen, and Electrostimulation. **Annals of Plastic Surgery**, v. 51, n. 2, p. 210–218, 2003

JARAMILLO, F. M. et al. Effects of transrectal medicinal ozone in horses - clinical and laboratory aspects. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 1, p. 56–64, 2020.

KAUR, J. et al. ZnO Nanoparticles of Rubia cordifolia Extract Formulation Developed and Optimized with QbD Application, Considering Ex Vivo Skin Permeation, Antimicrobial and Antioxidant Properties. **Molecules**, v. 27, n. 1450, p. 1-16, 2022.

KOTRONIS G.; VAS P. R. J. Ultrasound Devices to Treat Chronic Wounds: The Current Level of Evidence. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 19, n. 4, p. 341-349, 2020.

KOZAT S.; OKMAN E. N. Has Ozone Therapy a Future in Veterinary Medicine?  
**Journal of Animal Husbandry and Dairy Science**, v. 3, n. 3, p. 25-34, 2019.

LEVITAN D. M et al. Rationale for hyperbaric oxygen therapy in traumatic injury and wound care in small animal veterinary practice. **Journal of Small Animal Practice**, v. 62, n. 9, p. 719–729, 2021.

LI, Y.; et al. Injectable Hydrogel Based on Defect-Rich Multi-Nanozymes for Diabetic Wound Healing via an Oxygen Self-Supplying Cascade Reaction. **Small**, v. 18, n. 18, 2022.

LIMA, M.; FELIX, E.; CARDOSO, A. Aplicações e implicações do ozônio na indústria, ambiente e saúde. **Química Nova**, v. 44, n. 9, p. 1151-1158, 2021.

MARCHESINI B. F.; RIBEIRO S. B. Efeito da ozonioterapia na cicatrização de feridas. **Fisioterapia Brasil**, v. 21, n. 3, p. 281–288, 2020.

MOHSENI, M. et al. comparative study of wound dressings loaded with silver sulfadiazine and silver nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 564, p. 350–358, 2019.

NG, N.S. et al. The antimicrobial properties of some copper(II) and platinum(II) 1,10phenanthroline complexes. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 9, p. 3196-209, 2013.

NIINIKOSKI J. H. A. Clinical hyperbaric oxygen therapy, wound perfusion, and transcutaneous oximetry. **World Journal of Surgery**, v. 28, p. 307-311, 2004.

PETEOACĂ, A. et al. The use of ozone therapy in veterinary medicine: A systematic review. **AgroLife Scientific Journal**, v. 9, n. 2, p. 226-239, 2020.

SILVA, M. M. P. et al. Utilização de nanopartículas no tratamento de feridas: revisão sistemática. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 51, n. 0, 8 jan. 2018.

SUREDA A. et al. Antioxidant Response of Chronic Wounds to Hyperbaric Oxygen Therapy. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p.e. 0163371, 2016.

TAO, B. et al. Copper nanoparticles-embedded hydrogel for killing bacteria and promoting wound healing with photothermal therapy. **Journal of Materials Chemistry**, v. 4, n.1, p. 4-16, 2019.

TEODORO, A. N. et al. Ozônio no tratamento de ferida em gambá de orelha branca “Didelphis albivents”. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 51, p. 875, 2023.

THACKHAM J. A.; MCELWAIN D. L. S.; LONG R. J. The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 3, p. 321–330, 2008.

WALI, N.; SHABBIR, A.; ABBAS, N.; NAQVI, S. Z. H. Synergistic efficacy of colistin and silver nanoparticles impregnated human amniotic membrane in a burn wound infected rat model, **Scientific reports**, v. 12, n. 6414, 2022.

WOKOVICH, A. M. et al. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p. 1-8, 2006.

YADOLLAHPOUR, A. et al. Ultrasound Therapy for Wound Healing: A Review of Current Techniques and Mechanisms of Action. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 8, p. 4071-4085, 2014.

ZHANG, J. et al. Increased Growth Factors Play a Role in Wound Healing Promoted by Noninvasive Oxygen-Ozone Therapy in Diabetic Patients with Foot Ulcers. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 273475, 2014.

### **CAPÍTULO 3: Efeito do Complexo de (DRI-12) na Cicatrização de Feridas Experimentais em Ratos (*Rattus Norvegicus*)**

#### **RESUMO**

Os avanços no tratamento de feridas são indiscutíveis no contexto atual de saúde. As nanopartículas possibilitam a administração controlada diretamente na área afetada, resultando em uma liberação gradual e prolongada do princípio ativo, o que pode acelerar a cicatrização e reduzir complicações. Nanopartículas de complexo ternário de cobre (DRI-12) apresentam propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e antioxidantes que podem auxiliar o processo cicatricial. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do complexo de cobre na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em ratos. O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) com protocolo de nº 010/2022. Para tal, realizou-se a avaliação macroscópica da ferida (AMF), potencial de contração (PC), avaliação histológica (AH), expressão gênica (EG) e teste mecânico de tração (TMT). Foram utilizados 48 *Rattus norvegicus* divididos em dois grupos experimentais: grupo controle (n=24) (tratado com solução fisiológica); e grupo DRI-12 (n=24) - animais tratados com nanopartículas de complexo ternário de cobre (II) com hidrazida de ácido 4-fluorofenoxiacético (DRI-12). Todos os animais foram submetidos a ressecção cirúrgica de dois segmentos completos de pele no formato circular, um realizado na região dorsal interescapular e o outro 30 mm caudal ao primeiro. Nos animais do grupo controle foi feita aplicação de solução fisiológica. No grupo DRI-12, foi realizado o gotejamento de 0,5 mL de uma solução aquosa de DRI-12 na concentração de 50µmol/L. As amostras foram coletadas aos três, sete, 14 e 21 dias após o procedimento de indução das feridas, em 6 animais de cada grupo. Foi observado na AMF diferença significativa na coloração do leito nos terceiro, 14º e 21º dia, em relação as crostas contatou-se escores maiores no grupo DRI-12 no 3º dia, aumento significativo da epitelização no 21º dia no grupo DRI-12 em comparação com o grupo controle. O PC do grupo DRI-12 teve diminuição significativa nos dias três e sete, quando comparado com o controle. Na AH houve aumento significativo da área de colágeno nos dias três e sete e maior quantidade de colágeno tipo I (diferença significativa) no dia sete do grupo DRI-12 em relação ao grupo controle. Houve aumento significativo da expressão de EGF e FGF2 no sétimo e 14º dias. No TMT, notou-se maior tensão das peles com lesão do grupo DRI-12. Conclui-se que o complexo de cobre (DRI-12) demonstra um potencial positivo na cicatrização de feridas cirúrgicas.

**Palavras-chave:** angiogênese, colágeno, nanopartículas metálicas, lesões cutâneas, reparação tecidual.

## ABSTRACT

The advancements in wound treatment are undeniable in the current health context. Nanoparticles enable controlled administration directly to the affected area, resulting in gradual and prolonged release of the active principle, which can accelerate healing and reduce complications. Copper ternary complex nanoparticles (DRI-12) exhibit anti-inflammatory, antimicrobial, and antioxidant properties that can assist the healing process. The objective of this study was to evaluate the effect of the copper complex on the healing of skin lesions. The study was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee (CEEA) with protocol number 010/2022. For this purpose, macroscopic wound evaluation (AMF), contraction potential (PC), histological evaluation (AH), gene expression (EG), and mechanical tensile test (TMT) were performed. Forty-eight *Rattus norvegicus* were used, divided into two experimental groups: control group (n=24) (treated with saline solution); and the DRI-12 group (n=24) - animals treated with copper (II) ternary complex nanoparticles with 4-fluorophenoxyacetic acid hydrazide (DRI-12). All animals underwent surgical resection of two complete skin segments in a circular shape, one in the interscapular dorsal region and the other 30 mm caudal to the first. No medication was applied to the animals in the control group. In the DRI-12 group, 0.5 mL of an aqueous solution of DRI-12 at a concentration of 50 $\mu$ mol/L was dripped. Samples were collected on the third, seventh, 14th, and 21st days after wound induction, from 6 animals in each group. Significant differences in the color of the wound bed were observed on the 3rd, 14th, and 21st days in the AMF. Higher scab scores were noted in the DRI-12 group on the 3rd day, with a significant increase in epithelialization on the 21st day in the DRI-12 group compared to the control group. The PC of the DRI-12 group significantly increased on days 3 and 7 compared to the control group. In the AH, there was a significant increase in collagen area on days 3 and 7 and a higher amount of type I collagen (significant difference) on the 7th day in the DRI-12 group compared to the control group. There was a significant increase in the expression of EGF, VEGF, FGF2 on the 7th and 14th days when comparing the DRI-12 group with the control group. In the TMT, greater tension was observed in the wounded skin of the DRI-12 group. It is concluded that the copper complex (DRI-12) shows positive potential in the healing of surgical wounds.

**Keywords:** angiogenesis, collagen, metallic nanoparticles, skin lesions, tissue repair.

## INTRODUÇÃO

A nanociência tem avançado nas últimas décadas e sua aplicabilidade se estende para diversas áreas do conhecimento. Caracteriza-se pelo estudo de estruturas que apresentam diâmetro entre 1 a 100 nm (SOUSA et al., 2022). É fundamental a aplicação de estudos a cerca desses nanomateriais para compreensão de quais são suas empregabilidades e como eles atuam. Nesse contexto, a utilização de nanopartículas (NPs) na medicina humana e veterinária é muito promissora (ANANDHI; RAJESHKUMAR, 2023).

Os nanocompostos apresentam propriedades diferentes de sua forma de maior escala, sendo elas suas características físico-químicas, resistência mecânica e comportamento com a luz. Além disso, suas características não estão associadas apenas com o tamanho, mas também com sua composição, forma, cristalinidade e estrutura. Variáveis que dependem muito do método e das condições do experimento empregados para a sua produção (FERREIRA, 2010).

As nanopartículas metálicas veem sendo amplamente utilizadas para o tratamento de feridas, dentre elas as nanopartículas de ouro e de prata são as mais aplicadas. Porém a sua obtenção tem um alto custo de produção (SILVA et al., 2018; ANANDHI; RAJESHKUMAR, 2023). Visto isso, os compostos de cobre (NPs Cu) têm recebido atenção devido aos resultados promissores como agentes antibacterianos, além disso, a liberação controlada de medicamentos diretamente no local afetado, proporcionando uma liberação contínua e prolongada do princípio ativo. Isso pode acelerar o processo de cicatrização e minimizar o risco de complicações. (PAIXÃO et al., 2017; TAO et al., 2019; MONTEIRO et al., 2022).

Os metais criam redes cristalinas de energia, já as nanopartículas metálicas têm a capacidade de manter suas bandas energéticas contínuas. Essa mudança de padrão energético também altera as propriedades ópticas das NPs, assim elas apresentam maior potencial de absorção e menor espalhamento em relação a sua forma original (FERREIRA; RANGEL, 2009). Com isso, essas estruturas menores são capazes de gerar um ambiente mais propício para melhor absorção e interação com tecidos biológicos (GUPTA et al., 2022).

As NPs Cu foram testadas *in vitro* com excelentes resultados contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, microrganismos comumente encontrados em lesões cutâneas (ARIAS et al., 2008; MONTERO et al., 2019). Inclusive atuando contra bactérias resistentes e potencializando a ação de antibióticos (PAIXÃO et al., 2017). A atividade antibacteriana dos compostos de cobre é atribuída a liberação de íons que interagem e afetam a integridade da membrana e parede bacteriana e provoca estresse oxidativo resultando em morte desses microrganismos. Outra vantagem do produto é que eles

possuem baixo potencial para gerar resistência bacteriana (MONTERO et al., 2019). Além disso, estudos recentes demonstraram que complexos de cobre podem induzir macrófagos a se diferenciarem no fenótipo M2 (fenótipo anti-inflamatório), ou seja, estes compostos podem ter ação imunomoduladora, o que os tornam ainda mais interessantes para utilização em cicatrização de feridas (DÍEZ-TERCERO et al., 2021).

As NPs Cu têm demonstrado potencial para otimizar o processo de cicatrização de feridas devido ao seu alto potencial de oxiredução. Além disso, em estudos *in vitro* esses nanocompostos estimularam a proliferação celular e a angiogênese, promovendo a reparação tecidual por meio da regulação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (TAO et al., 2019).

A nanopartícula de Complexo Ternário de Cobre (II) com Hidrazida de Ácido 4-Fluorofenoxiacético (Dri-12) [Cu(4 – FH)(fen)(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] foi desenvolvida por Paixão et al. (2017) e apresenta facilidade de interagir com o DNA, por possuir estruturas majoritariamente aromáticas. E as hidrazidas alifáticas de sua composição garantem relações entre a estrutura e função desse composto sintetizado (ALVES, 2022). Com base nesse estudo e nos mencionados anteriormente, o complexo de cobre DRI-12 tem potencial farmacológico para a produção de novos metalofármacos no tratamento de feridas.

## **OBJETIVOS GERAIS**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do complexo de cobre DRI-12 na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar se o complexo de cobre DRI-12 favorece a reparação tecidual encurtando o tempo da cicatrização por meio de avaliação macrocópica.

Avaliar se o complexo de cobre DRI-12 favorece a reparação tecidual por meio de análise histológica (histomorfometria) de células inflamatórias, angiogênese, tecido de granulação, deposição de colágeno, fibroplasia e área do colágeno.

Avaliar se o complexo de cobre DRI-12 favorece a angiogênese por meio da histomorfometria e de expressão gênica de VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular).

Avaliar se complexo de cobre DRI-12 favorece a epitelização por meio das avaliações: potencial de contração, histomorfometria, de expressão de gênica de EGF (Fator de Crescimento Epidérmico).

Avaliar se o complexo de cobre DRI-12 favorece a fibroplasia por meio das avaliações: macroscópica (formação de tecido de granulação), histológica (histomorfometria), de expressão gênica de FGF (Fator de Crescimento Fibroblástico).

Avaliar se o complexo de cobre DRI-12 favorece a produção e deposição de colágeno tipo I e III por meio da expressão gênica de COL1, sua diferenciação pela análise histológica.

Avaliar a qualidade do tecido reparado por meio do teste mecânico de tração.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Normas éticas**

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba (010/2022). O estudo foi conduzido seguindo as normas do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA). Parte do projeto foi realizado no biotério da Universidade de Uberaba, onde foram realizadas as intervenções cirúrgicas, avaliação macroscópica, eutanásias e coleta das amostras. As avaliações histológicas e de expressão gênica ocorreram na Universidade Federal de Minas Gerais. O teste mecânico de tração foi dirigido no Laboratório de Análises Mecânicas da Universidade de Uberaba.

### **Animais**

Foram utilizados 48 *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar, machos, com três meses de idade e peso médio de 300g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia com certificação de ausência de ectoparasitas e endoparasitas. Os animais foram mantidos no Biotério Experimental da Universidade de Uberaba, alojados em caixas com seis animais cada, sob condições de umidade e temperatura controladas, fotoperíodo de 12 horas, recebendo ração comercial para roedores (Nuvilab CR-1<sup>®</sup>, Nuvital Nutrientes S/A, Brasil) e água *ad libitum*.

### **Grupos experimentais**

Os ratos foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais: grupo controle, animais submetidos a confecção da ferida cirúrgica e tratada com solução fisiológica sobre a ferida (Na Cl 0,9%) (n = 24 animais); grupo DRI-12, animais submetidos a confecção da ferida cirúrgica com o tratamento tópico com solução aquosa de complexo de cobre DRI-12 na concentração de 50 mmol/L (n = 24 animais). Ambos os grupos foram divididos em 4 subgrupos contendo 6 animais cada de acordo com os tempos de avaliação: terceiro, sétimo, 14° e 21° (D3, D7, D14 e D21) dias após o procedimento cirúrgico, sendo considerado como 0 o dia da indução das lesões. Um terceiro grupo foi criado, o grupo Sham, a pele íntegra dos animais coletas nos mesmo tempos de avaliação descritos acima.

### **Indução da lesão**

As intervenções cirúrgicas para confecção da ferida foram realizadas na sala de cirurgia do biotério da Universidade de Uberaba. Foram administrados o cloridrato de cetamina (Cetamin® 10%, Syntec, Brasil) na dose de 4 mg/kg e morfina (Dimorf® 10mg/mL, Cristália, Itapira, SP, Brasil) na dose de 2 mg/kg, ambos por via intramuscular (IM) na mesma seringa. Após isso, os animais foram induzidos e mantidos sob anestesia geral pela inalação espontânea de isoflurano (Isoforine® 100%, Cristália, Brasil), diluído em oxigênio puro, ambos fornecidos por máscara facial. Com os animais anestesiados, foi realizada a tricotomia dorsal estendendo-se da região cervical até a lombosacral. Os animais foram posicionados em decúbito ventral e a antisepsia do campo operatório foi preparada com soluções à base de clorexidina degermante a 2% (Rioher® 2%, Rioquímica, Brasil) e alcoólica a 0,5% (Riohex® 0,5%, Rioquímica, Brasil). Em seguida realizou-se a ressecção de dois segmentos completos de pele de formato circular com 12 mm de diâmetro com o auxílio de um punch para marcação e em seguida foi resseccionada com um bisturi número 24, sendo um realizado na região dorsal interescapular e o outro 30 mm caudal ao primeiro (Figura 1). Após a cirurgia, os animais receberam tramadol (Tramadon®, Cristália, Brasil) na dose de 10mg/kg via subcutânea (SC), aplicação única. No grupo controle, as feridas cirúrgicas foram limpas somente com solução fisiológica e auxílio de uma gaze uma vez ao dia até os tempos de avaliação. Nos animais do grupo complexo de cobre (DRI-12), além da limpeza com solução fisiológica e gaze, foi depositado 0,5mL de solução aquosa de complexo de cobre DRI-12 na concentração de 50 mmol/L sobre as feridas cirúrgicas a cada 24 horas até os tempos de avaliação. O dia do procedimento cirúrgico foi considerado com o dia zero (D0) do experimento.

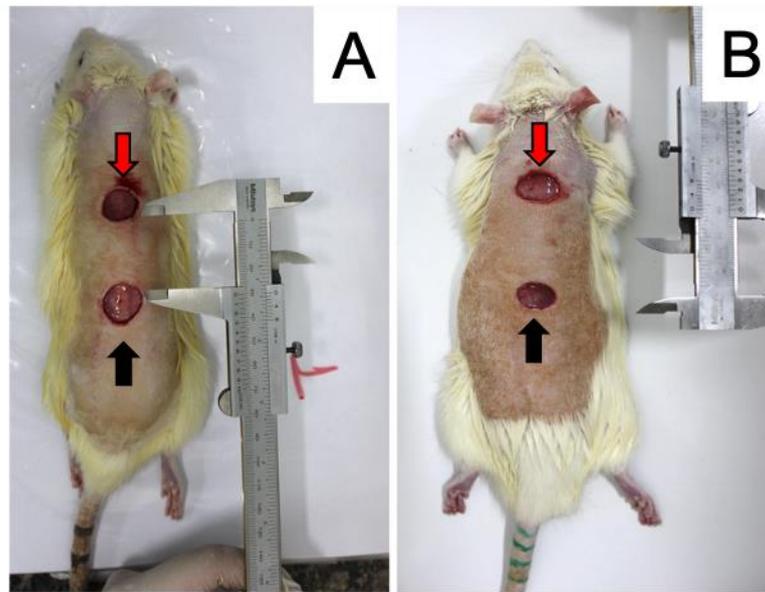


Figura 1- Fotografia após procedimento cirúrgico (D0) de ressecção de dois segmentos completos de pele de formato circular com 12 mm de diâmetro, sendo um realizado na região dorsal interescapular (seta vermelha) e o outro 30 mm caudal ao primeiro (seta preta) em ratos (*Rattus norvegicus*) pertencentes ao grupo controle (A) e grupo DRI-12, tratado com complexo de cobre DRI-12 na concentração de 50 mmol/L (B).

### Tratamento

O complexo de cobre  $[\text{Cu}(4\text{-fh})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]$  (4-fh = 4-fluorophenoxyacetic acid hydrazide and phen = 1,10-phenanthroline) foi preparado através de reações entre  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0,125 mmol) dissolvidos em 1,0 mL de metanol com os respectivos ligante hidrazida e 1,10 – fenantrolina (0,125 mmol) adicionados no estado sólido sobre a solução de íon metálico. Posteriormente, foram adicionados 1,0 mL de metanol e a reação prosseguiu em agitação por 15 minutos (Figura 2). Ao término da síntese a solução foi colocada em repouso para cristalização. A produção e análise elementar foi realizado por espectrofotometria UV-vis para verificar a pureza e composição com complexo, de acordo com Paixão et al. (2017).

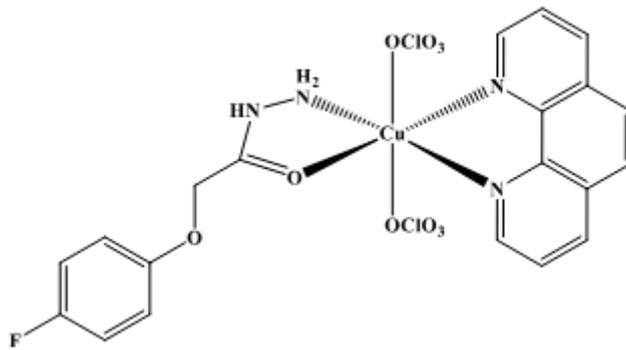


Figura 2- Fórmula química do complexo de cobre [Cu(4-fh)(phen)(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] (4-fh = 4-fluorophenoxyacetic acid hydrazide and phen = 1,10-phenanthroline) desenvolvido por Paixão et al. (2017).

### Avaliação macroscópica da ferida

Foi realizada a avaliação macroscópica das feridas no terceiro, sétimo, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias após o procedimento cirúrgico. Foram avaliados por meio de escores a presença de secreção, prurido (a presença de escoriações e/ou arranhaduras mostram que os animais coçaram o local com os membros pélvicos), coloração do leito e epitelização (Tabela 1).

Tabela 1-Classificação utilizada para avaliação macroscópica durante a análise clínica de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com complexo de cobre (DRI-12) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.

Parâmetros	0	1	2	3
<b>Secreção</b>	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado
<b>Prurido</b>	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado
<b>Coloração do leito</b>	Róseo	Avermelhado	Amarelado	Enegrecido
<b>Crostas</b>	Ausente	Discreto	Moderado	Acentuado
<b>Epitelização</b>	Sem epitelização	Epitelização de 1/3 da ferida	Epitelização de 2/3 da ferida	Epitelização completa

**Fonte:** Elaborado pelos autores com base em Greca et al. (2020).

### Potencial de contração

As medidas da área da ferida foram mensuradas no dia do procedimento de confecção das mesmas, denominado como 0, e no terceiro, sétimo, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia de pós-operatório. As feridas foram fotografadas com máquina fotográfica digital (Canon EOS 550D), mantida a uma distância constante (30 cm) da área cirúrgica. As imagens foram transferidas para um

computador e analisadas através do software ImageJ® (National Institutes of Health, EUA) para a mensuração da área da ferida cutânea através da ferramenta do polígono, tendo o paquímetro como referência para calibrar a imagem, e transformadas em medida decimal. Após a mensuração da área, foi calculado o potencial de contração (PC) das feridas pela fórmula  $PC = [(AF - AI) \times 100] / AI$ , onde AI é a área inicial da ferida e AF a área final da ferida (REZENDE et al., 2020).

### **Coleta das amostras**

Imediatamente antes da coleta das amostras foi realizada eutanásia por aprofundamento anestésico com isoflurano até parada cardiorrespiratória e morte.

As amostras cutâneas colhidas no terceiro, sétimo e 14º dias se constituíram da cicatriz ou lesão cutânea, com margem de 2 mm de pele em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal. A ferida cranial foi utilizada para a avaliação histológica e a ferida caudal foi utilizada para a expressão gênica. As amostras para a realização histológica foram armazenadas em formol e as amostras para a expressão gênica foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -80°C.

No 21º dia foram colhidas três amostras de cada animal. A ferida cranial, com margem de 2 mm de pele em torno da lesão, foi utilizada para as avaliações histológicas. As duas outras amostras foram retiradas para o teste mecânico de tração com formato retangular, de 70 mm de comprimento por 20 mm de largura, da região dorsal no sentido transversal do eixo longitudinal do animal. Uma delas foi centralizada na lesão/cicatriz caudal e uma na pele integra imediatamente caudal à primeira. Essas amostras foram mantidas congeladas a -20°C até o dia da realização do teste mecânico de tração.

### **Avaliação histológica**

As avaliações histológicas foram realizadas no terceiro, sétimo, 14º e 21º dia de pós-cirúrgico. As amostras de pele foram fixadas em formaldeído 10%, e em seguida desidratadas em banhos de álcool nas concentrações crescentes, começando em 50% até chegar em 100%. Após a desidratação, foram diafanizadas com o tratamento em xilol, seguidas da inclusão em blocos de parafina e terminando com a obtenção dos cortes histológicos de 4µm de cada bloco através do micrótomo (Micron® HM315, Swedlick Medical Systems, EUA). Os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE), tricrômico de masson (TM), picrossiruis red

(PR) e avaliados descritivamente por microscopia óptica. A avaliação histológica com a coloração HE foi feita nos aumentos de 2, 4, 10 e 20x, observando células inflamatórias, angiogênese e tecido de granulação. A avaliação histológica com a coloração TM foi feita no aumento de 4x observando fibroplasia e área de colágeno. A avaliação histológica com a coloração PR foi feita no aumento de 4x quantificando o colágeno tipo I e o tipo III. A leitura foi às cegas, sendo descrita a distribuição e a intensidade de cada lâmina e depois gerado um escore, que se baseou multiplicando a distribuição (focal [1]; multifocal [2]; difuso [3]) pela intensidade (ausente [0]; discreto [1]; moderado [2]; acentuado [3]) para células inflamatórias, angiogênese, tecido de granulação e fibroplasia (Tabela 2). Ainda na avaliação histológica com as colorações TM e PR, as lâminas foram fotografadas e analisadas pelo software de análise de imagem ImageJ® (National Institutes of Health, EUA), sendo que para cada imagem quantificada, a porcentagem da área do colágeno foi subtraída do *background*. A coloração com TM a porcentagem da área foi obtida através da quantificação da área azul e a coloração com PR, o colágeno tipo I foi mensurado a partir da área vermelha e o colágeno tipo III através da área verde, após padronização da escala de cinza no software utilizado.

Tabela 2- Classificação utilizada para a análise histológica de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com nanopartículas de Complexo Ternário do Cobre (II) com Hidrazida de Ácido 4-Fluorofenoxiacético (Dri-12) (DRI-12) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.

<b>Categoria</b>	<b>Escore</b>	<b>Especificações</b>
<b>Células inflamatórias</b>	3	Acentuado Intensa proliferação de células polimorfonucleares e mononucleares
	2	Moderado Moderada proliferação de células polimorfonucleares e mononucleares
	1	Discreto Discreta proliferação de células polimorfonucleares e/ ou mononucleares
	0	Ausente Ausência de proliferação de células polimorfonucleares e mononucleares
<b>Angiogênese</b>	3	Acentuado Acentuada presença de neovascularização
	2	Moderado Moderada presença de neovascularização
	1	Discreto Discreta presença de neovascularização
	0	Ausente Ausência de neovascularização
<b>Tecido de granulação</b>	3	Acentuado Acentuado tecido de granulação
	2	Moderado Moderado tecido de granulação
	1	Discreto Discreto tecido de granulação
	0	Ausente Ausência de tecido de granulação
<b>Fibroplasia</b>	3	Acentuado Acentuada deposição de colágeno
	2	Moderada Moderada deposição de colágeno
	1	Discreta Discreta deposição de colágeno
	0	Ausente Ausência de deposição de colágeno

**Fonte:** Adaptado de Santos *et al.* (2002).

## Expressão gênica

As expressões dos transcritos gênicos que codificam o colágeno tipos I (Col1a1), Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF2) foram avaliados no terceiro, sétimo e 14° dia por RT-PCR em tempo real. Para a avaliação foi utilizada a segunda metade das amostras colhidas das feridas caudais que foram acondicionadas em criotubos, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -80°C até o dia do processamento. Para extração do RNA do tecido cutâneo, o mesmo foi macerado com auxílio de pistilo e nitrogênio líquido, transferido para tubo eppendorf adicionado 1 mL Trizol (Invitrogen®). Amostras de RNA foram tratadas com DNase I livre de RNase e posteriormente purificadas por precipitação em phenolcloroformio, para eliminar a contaminação com DNA. A integridade do RNA total isolado foi verificada após eletroferese em agarose 1 % e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro da marca *NanoDrop® ND- 1000 and ND-8000 8- Sample Spectrophotometers*. A partir do RNA extraído, então cerca de 1 µg de RNA total foram convertidos em cDNA seguindo as instruções do Kit *Revert Aid H. Minus First Stand cDNA Synthesis* (Thermo Fisher Scientific). A síntese do cDNA foi confirmada por PCR utilizando-se os *primers* desenhados para amplificar um fragmento de GAPDH. As condições ótimas para a reação de PCR, para cada um dos cDNAs que foram amplificados, foram determinadas em experimentos preliminares. Foram delineados iniciadores com base nas sequências do Col1a1, EGF, VEGF e FGF2 (Tabela 3).

Os níveis de expressão dos transcritos Col1a1, EGF, VEGF e FGF2 nas amostras de pele foram determinados por RT-PCRq, usando-se o nível de expressão de GAPDH como normalizador da quantidade de cDNA em cada uma das amostras.

Tabela 3- Sequências, temperatura de anelamento e amplicon esperado dos *primers* utilizados neste estudo.

<b>PRIMER</b>	<b>Sequência</b>	<b>Ta (°C)</b>	<b>Amplicon</b>
<b>GAPDH</b> <b>(Gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase)</b>	CCTGTTCTAGAGACAGCCGC ACCAGCTTCCCATTCTCAGC	60	255
<b>Col1a1</b> <b>(Colágeno do tipo I)</b>	GCCATGTACGTAGCCATCCA ATGTCACGCACGATTTCCCT	60	184
<b>EGF</b> <b>(Fator de Crescimento Epidérmico)</b>	TCGAGTCAACAAAGGGCCTC GTTCCAGCCTTTCCGTGAGA	60	322
<b>VEGF</b> <b>(Fator de Crescimento Endotelial Vascular)</b>	GACCCTGGCTTTACTGCTGT CAGGGCTTCATCATTGCAGC	60	195
<b>FGF2</b> <b>(Fator de Crescimento Fibroblástico)</b>	TGTGGCACTGAAACGAACTG ACACAGGGAAGGGTTTGACA	60	218

As reações de PCR quantitativa em Tempo Real (RT-PCRq) foram realizadas utilizando-se em 1 µL de de cDNA (diluído 1:10), 0,4 µL de cada um dos *primers* (a 10 µM cada) e 5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher), para um volume final da reação de 10 µL. O procedimento de amplificação ocorreu no termociclador Rotor-Gene (Qiagen). As condições de ciclagem utilizadas foram de 95°C por 2 min (ativação enzimática), seguida de 40

ciclos a 95°C por 15 seg (desnaturação), 60°C por 15 seg (anelamento) e 30 seg a 72°C (extensão).

### **Teste mecânico de tração**

A avaliação mecânica foi realizada no 21º dia de pós-operatório, e para isso foram colhidas duas amostras de pele de cada animal. As amostras foram mantidas congeladas a -20°C até o dia da realização dos testes, acondicionadas em sacos plásticos individuais e imersas em solução fisiológica. Os ensaios de tração foram realizados na máquina universal de ensaios (EMIC®, DL- 3000) com célula de carga de 2000 N e velocidade de deslocamento de 0,3mm/s. Para confecção dos corpos de prova, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e recortadas a fim de proporcionar-lhes uma conformação de ampulheta, cujo centro apresentasse 2 mm de largura. No momento do teste, a espessura de cada corpo de prova foi aferida, sendo a medida tomada no centro da ampulheta utilizando-se um paquímetro. Em cada ensaio, um corpo de prova foi posicionado entre as garras e, com o uso do software, foram mensuradas a força máxima observada (N) e o esforço à tensão (MPa) (Figura 3).

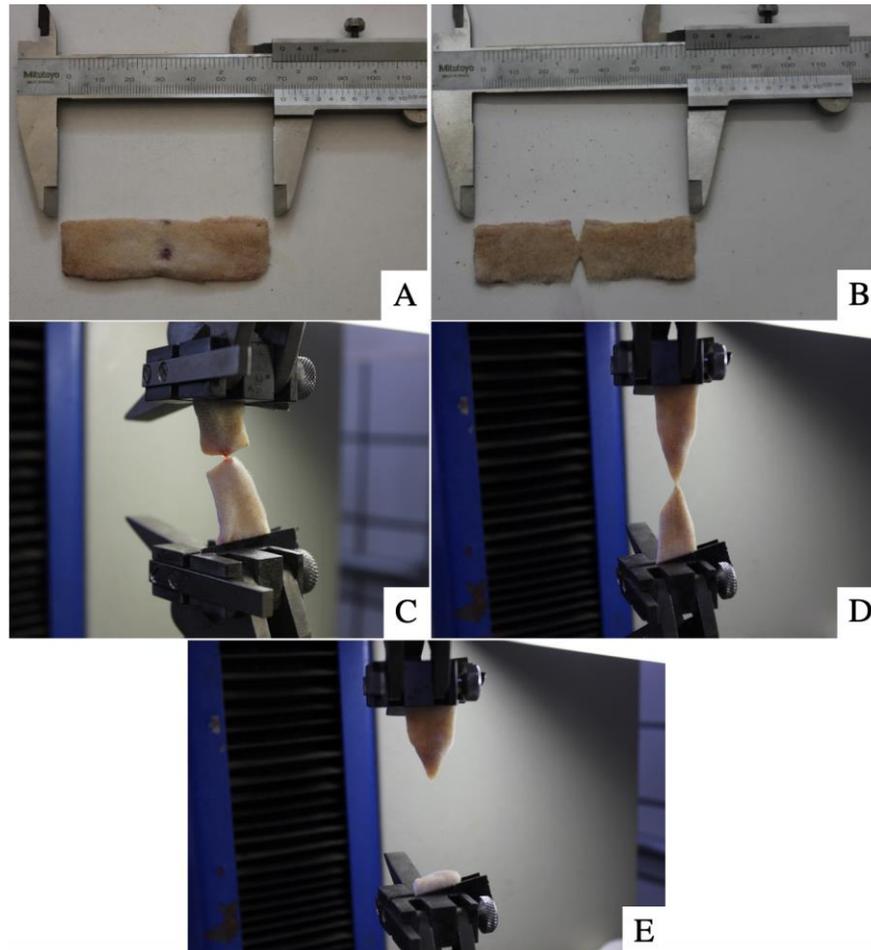


Figura 3 -Fotografia das amostras de pele coletadas no 21º dia após a lesão, de formato retangular, com 70 mm de comprimento por 20 mm de largura colhidas da região dorsal no sentido transversal do eixo longitudinal do animal, sendo que uma delas foi centralizada na lesão/cicatriz (A) e uma na pele íntegra. Antes do início do teste mecânico, foram recortadas a fim de proporcionar-lhes uma conformação de ampulheta, cujo centro apresentasse 10 mm de largura (B). Amostras posicionadas na máquina universal de ensaios, início do teste (C), durante o teste (D), final do teste (E) com a pele rompida.

### **Análise estatística**

O delineamento foi inteiramente casualizado, fatorial 2 x 4 para as avaliações clínicas e histológicas, com dois grupos experimentais (controle e DRI-12) e quatro tempos de avaliação (três, sete, 14 e 21 dias pós-operatório). Os dados paramétricos referentes ao potencial de contração, área do colágeno, deposição de colágeno tipo I e tipo III e teste mecânico de tração foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk. Foram calculadas as médias e desvios padrão dos dois grupos em cada tempo de avaliação estabelecido para cada teste. As médias foram comparadas pelo teste T de Student. Os dados da expressão gênica obtidos nas RT-PCRq foram compilados em tabelas para a análise da expressão relativa dos mesmos, calculando a média dos Cts (número de ciclos), desvio padrão,  $\Delta$ CT,  $\Delta\Delta$ CT e  $2^{-\Delta\Delta$ CT (PFAFFL et al., 2001). Para os dados não paramétricos referentes aos escores de avaliação macroscópica e histológica,

foram gerados gráficos e calculadas as medianas e as distâncias interquartílicas. As medianas dos grupos foram comparadas em cada tempo de avaliação pelos testes de Mann Whitney (macroscópica) e Wilcoxon (histológica). A maioria das análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) adotando um nível de 95% de confiança (SAMPAIO, 1998), exceto a expressão gênica, que foi avaliada pelo software REST2009.

## **RESULTADOS**

Não houve intercorrências no pós-operatório ou complicações que pudessem interferir nos resultados da pesquisa.

### **Avaliação macroscópica**

No terceiro dia de pós-operatório foi observado ausência de secreção, prurido e epitelização e coloração avermelhada do leito em ambos os grupos, controle e DRI-12. Apenas um animal do grupo DRI-12 apresentou 1/3 de epitelização da ferida.

Aos 7 dias, dois animais do grupo DRI-12 apresentaram prurido. Ambos os grupos, mostraram a ferida coberta por crostas e 1/3 de epitelização, exceto 1 animal do grupo DRI-12 com 2/3 de epitelização (Figura 4).

No 14º dia, os animais do grupo DRI-12 apresentaram coloração rósea do leito e 2/3 de epitelização, em apenas dois animais notou-se coloração avermelhada. Já os animais do grupo controle apresentaram coloração avermelhada e 1/3 de epitelização.

Ao 21º dia de avaliação, foi observado prurido em um animal do grupo controle, coloração rósea do leito e completa epitelização em todos os animais do grupo DRI-12 (Figura 4).

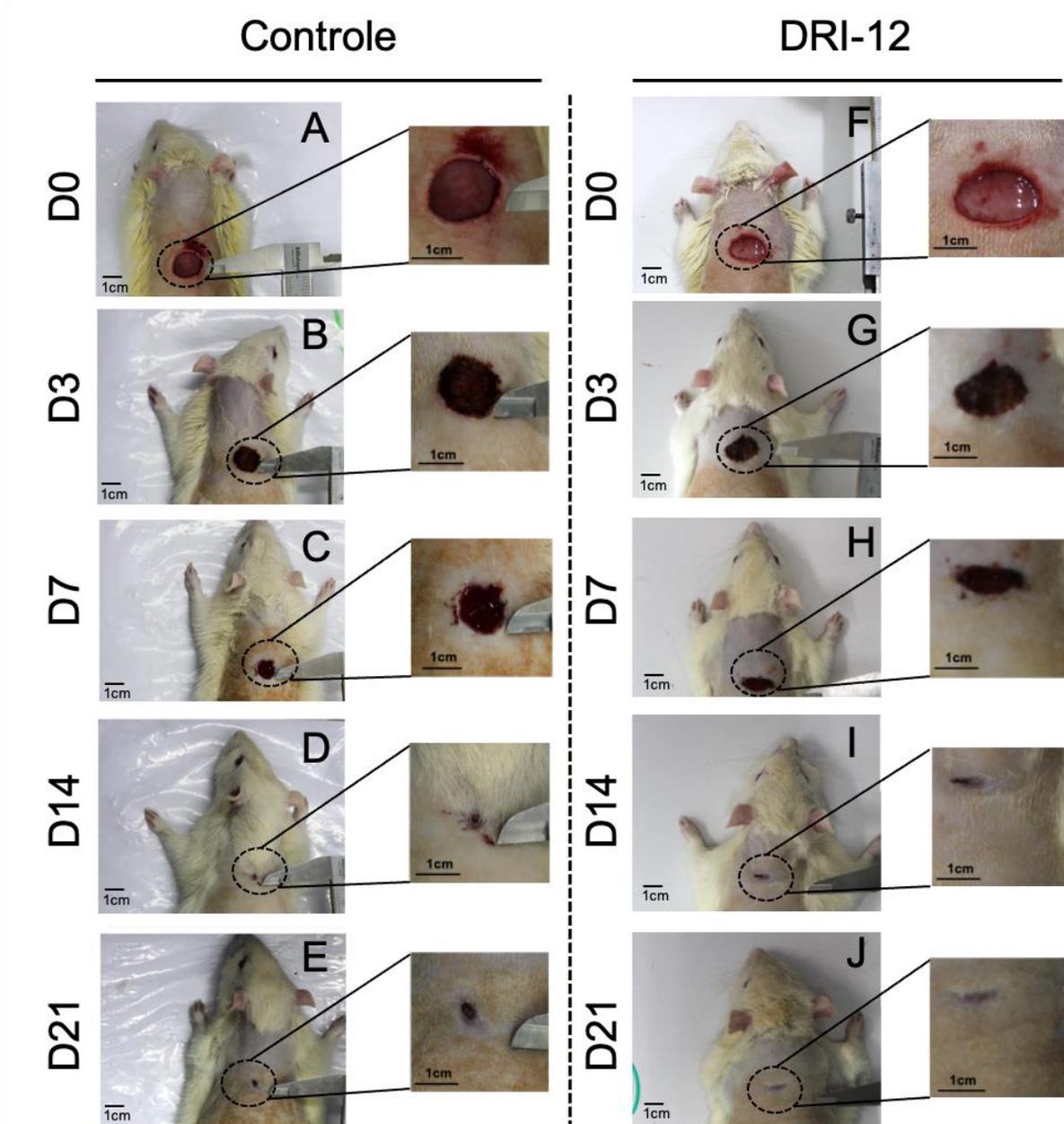


Figura 4- Fotografias obtidas durante a análise clínica das feridas cutâneas experimentais em ratos do grupo controle (A, B, C, D, E) e grupo DRI-12 (F, G, H, I, J) aos 0, 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Observar presença de crostas no 3º e 7º dia (B, C e G); presença de tecido de granulação (D, E, H e I); epiteliação completa (J).

Na avaliação macroscópica, notou-se escores maiores na coloração do leito nos 3º, e escores menores 14º e 21º dia de pós-operatório no grupo DRI-12 quando comparado com grupo controle ( $p < 0,05$ ). Ao analisar a presença de crostas contactou-se escores maiores no grupo DRI-12 no D3 em relação ao grupo controle do D3 ( $p < 0,05$ ). E observou-se diferença significativa na avaliação da epiteliação no 21º dia com escores maiores no grupo DRI-12 em

comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4 e Figura 5). Não houve diferença significativa entre os outros escores e tempos de avaliação.

Tabela 4- Média e desvio padrão dos escores obtidos na avaliação clínica de feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão

	Dia 3		Dia 7		Dia 14		Dia 21	
	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12
<b>PR</b>	0,0 <sup>a</sup> (0)	0,0 <sup>a</sup> (0)	0,0 <sup>a</sup> (0)	0,16 <sup>a</sup> (0,57)	0,0 <sup>a</sup> (0)	0,0 <sup>a</sup> (0)	0,08 <sup>a</sup> (0,28)	0,0 <sup>a</sup> (0)
<b>CL</b>	1,00 <sup>a</sup> (0,28)	2,0 <sup>b</sup> (0,52)	1,00 <sup>a</sup> (0,28)	1,00 <sup>a</sup> (0,49)	1,00 <sup>a</sup> (0)	0,5 <sup>b</sup> (0,52)	1,00 <sup>a</sup> (0,49)	0 <sup>b</sup> (0,0)
<b>CR</b>	1,0 <sup>a</sup> (0,64)	2,0 <sup>b</sup> (0)	2,00 <sup>a</sup> (0,67)	2,00 <sup>a</sup> (1,36)	0,16 <sup>a</sup> (0,4)	1,0 <sup>a</sup> (0,4)	0 <sup>a</sup> (0)	0,33 <sup>a</sup> (0,6)
<b>EP</b>	0,0 <sup>a</sup> (0)	0,08 <sup>a</sup> (0,2)	1,00 <sup>a</sup> (0,28)	1,1 <sup>a</sup> (0,28)	2,00 <sup>a</sup> (0)	2,33 <sup>a</sup> (0,49)	2,08 <sup>a</sup> (0,79)	3,0 <sup>b</sup> (0)

<sup>a</sup> Nas linhas – medianas com letra minúscula diferentes diferem pelo teste não paramétrico Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). Comparação entre animais tratados com solução fisiológica (controle) e tratados com nanopartículas de Complexo Ternário de Cobre (II) com Hidrazida de ácido 4-Fluorofenoxiacético (DRI-12) para cada tempo de avaliação. PR: prurido; CL: coloração do leito; CR: crosta; EP: epitelização.

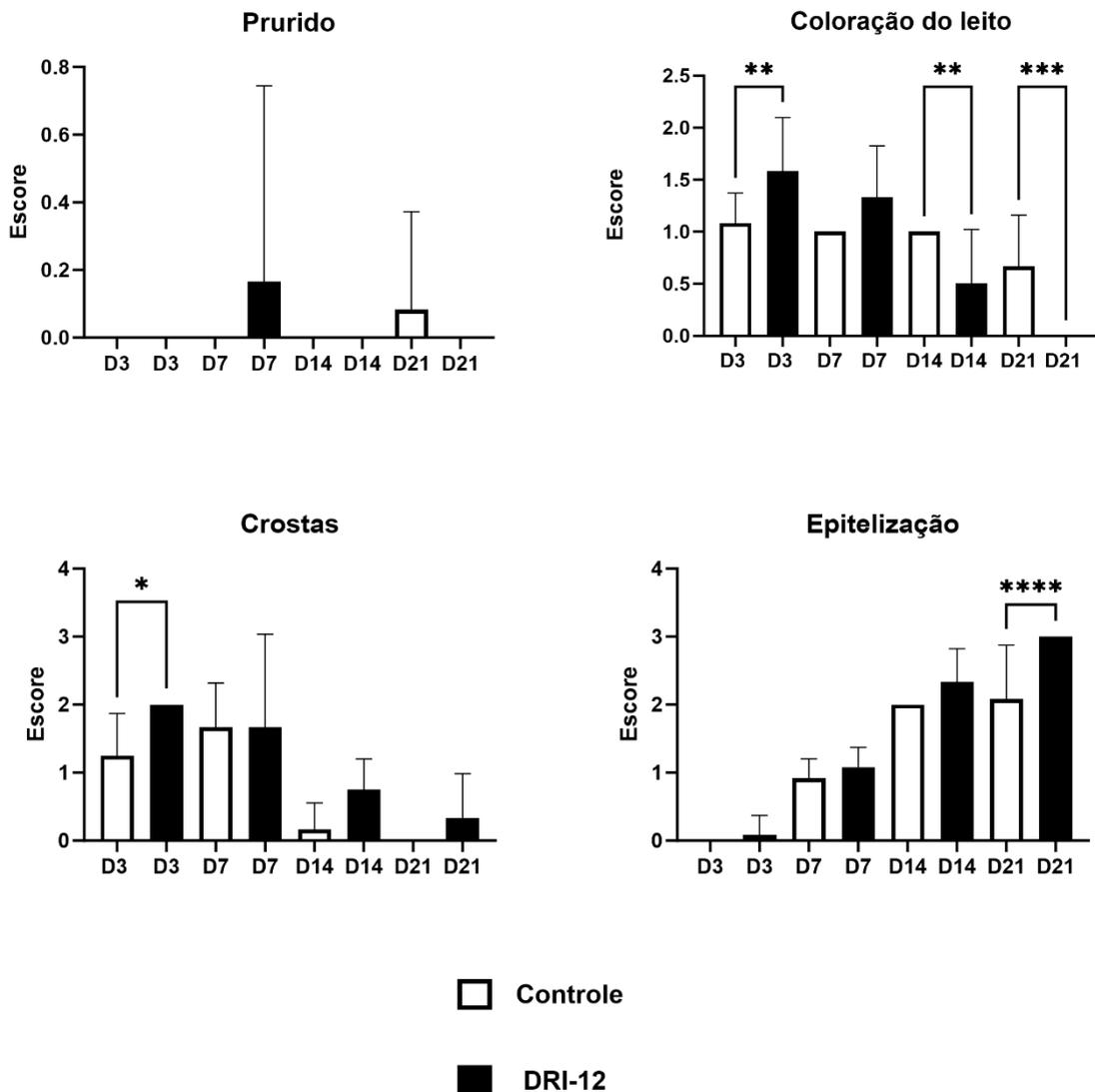


Figura 5- Média e desvio padrão dos escores obtidos na avaliação clínica de feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 aos três, sete, 14 e 21 dias após a lesão. \* Diferem pelo teste não paramétrico Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

### Potencial de contração

Grupo DRI-12 apresentou menor potencial de contração no 3° e 7° dia de mensuração (diferença significativa) quando comparado com o grupo controle. Entretanto, no restante dos tempos, não houve diferença entre os grupos quanto ao potencial de contração (Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 5- Média e desvio padrão do potencial de contração (%) das feridas experimentais em ratos do grupo controle e do grupo DRI-12 aos três, sete, 14 e 21 dias após a lesão.

	Dia 3		Dia 7		Dia 14		Dia 21	
	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12
Média	-6,80 <sup>a</sup>	-46,57 <sup>b</sup>	-39,61 <sup>a</sup>	-58,74 <sup>b</sup>	-89,72 <sup>a</sup>	-90,89 <sup>a</sup>	-89,27 <sup>a</sup>	-98,97 <sup>a</sup>
± (desvio padrão)	(4,55)	(17,2)	(17,99)	(22,79)	(9,09)	(5,95)	(27,03)	(1,73)

<sup>a</sup>Nas linhas – médias com letra minúscula diferentes diferem pelo teste T não pareado ( $p < 0,05$ ). Comparação entre animais tratados com solução fisiológica (controle) e tratados com nanopartículas de Complexo Ternário do Cobre (II) com Hidrazida de Ácido 4-Fluorofenoxiacético (DRI-12) para cada tempo de avaliação.

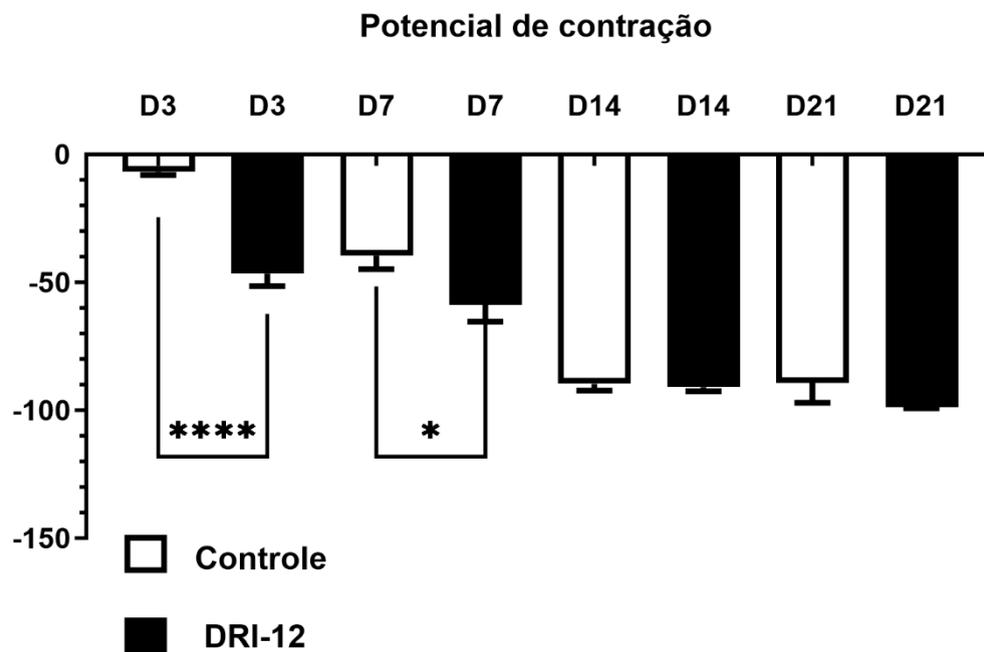


Figura 6- Média e desvio padrão do potencial de contração (%) das feridas experimentais em ratos do grupo controle e do grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. \* Diferem pelo teste T não pareado ( $p < 0,05$ ).

### Avaliação histológica

Na avaliação histológica (Hematoxilina e Eosina), quanto a presença de células inflamatórias, ao longo do experimento, observou-se que ambos os grupos houve diminuição destas entre o terceiro e 21º dias. (Tabela 6, Figuras 7).

Em todos os tempos estudados, tanto o grupo controle quanto o grupo DRI-12 apresentaram angiogênese. Aos 3 dias a angiogênese foi observada em grau de moderado em ambos os grupos. Aos 7 dias moderado a discreto no controle e moderado no grupo DRI-12. Aos 14 dias, apresentou de moderado a discreto em ambos os grupos. Aos 21 dias, moderado a discreto no grupo controle e discreto no grupo DRI-12 (Tabela 6 e Figura 7).

Aos 3 e 7 dias, o grupo controle e o grupo tratado apresentavam moderada a intensa presença de tecido de granulação. No 14° e 21° dias após a lesão o grupo controle apresentava presença moderada tecido de granulação, enquanto o grupo DRI-12 apresentava de moderada a discreta quantidade de tecido de granulação (Tabela 6 e Figura 7).

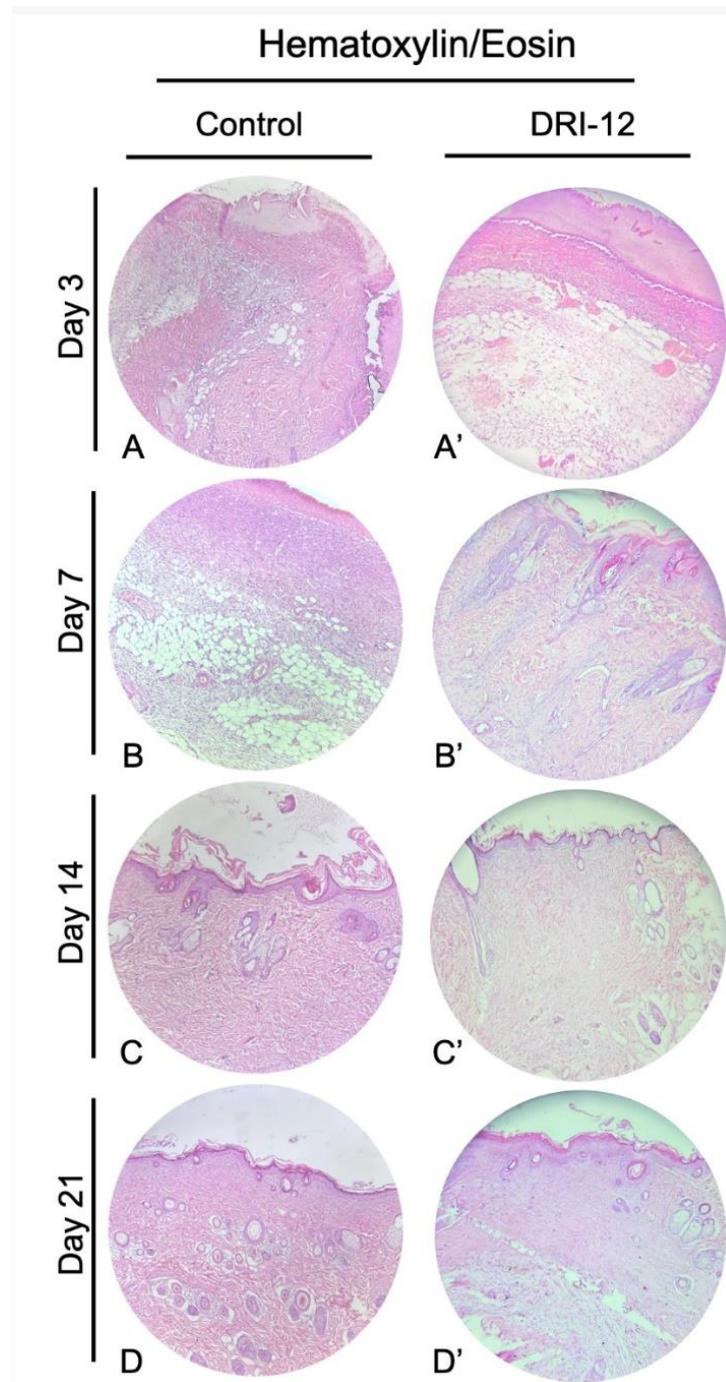


Figura 7- Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos após realização de feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12. A, B, C, e D grupo controle. A', B', C', e D' grupo DRI-12. Hematoxilina e eosina. Aumento de 10x.

Não houve diferença significativa entre os escores de avaliação histológica em todos os tempos de avaliação das características analisadas (Tabela 6 e Figura 8).

Tabela 6- Média e desvio padrão dos escores obtidos na avaliação histológica com hematoxilina-eosina das feridas experimentais em ratos do grupo controle do grupo DRI-12 aos três, sete, 14 e 21 dias após a lesão.

	<b>Dia 3</b>		<b>Dia 7</b>		<b>Dia 14</b>		<b>Dia 21</b>	
	<b>Controle</b>	<b>DRI-12</b>	<b>Controle</b>	<b>DRI-12</b>	<b>Controle</b>	<b>DRI-12</b>	<b>Controle</b>	<b>DRI-12</b>
<b>CI</b>	6,00 <sup>a</sup> (0)	4,00 <sup>a</sup> (1,50)	4,00 <sup>a</sup> (1,22)	4,00 <sup>a</sup> (1,78)	2,00 <sup>a</sup> (0,81)	2,00 <sup>a</sup> (1,36)	2,00 <sup>a</sup> (0,81)	1,00 <sup>a</sup> (0,51)
<b>AN</b>	4,00 <sup>a</sup> (0,82)	3,5 <sup>a</sup> (0,81)	2,5 <sup>a</sup> (0,98)	4,00 <sup>a</sup> (0,83)	2,0 <sup>a</sup> (0,81)	2,00 <sup>a</sup> (1,22)	2,00 <sup>a</sup> (0,83)	1,0 <sup>a</sup> (0,51)
<b>TG</b>	4,00 <sup>a</sup> (0,80)	4,00 <sup>a</sup> (1,03)	4,00 <sup>a</sup> (1,26)	4,00 <sup>a</sup> (1,03)	3,5 <sup>a</sup> (0,98)	2,5 <sup>a</sup> (0,98)	3 <sup>a</sup> (1,50)	2,00 <sup>a</sup> (1,03)

<sup>a</sup> Nas linhas – médias com letra minúscula diferentes diferem pelo teste não paramétrico Wilcoxon ( $p < 0,05$ ). Comparação entre animais tratados com solução fisiológica (controle) e tratados com nanopartículas de complexo ternário de cobre (II) com hidrazida de ácido 4-fluorofenoxiacético (Dri-12) para cada tempo de avaliação. CI.: células inflamatórias; AN: Angiogênese; TG: tecido de granulação.

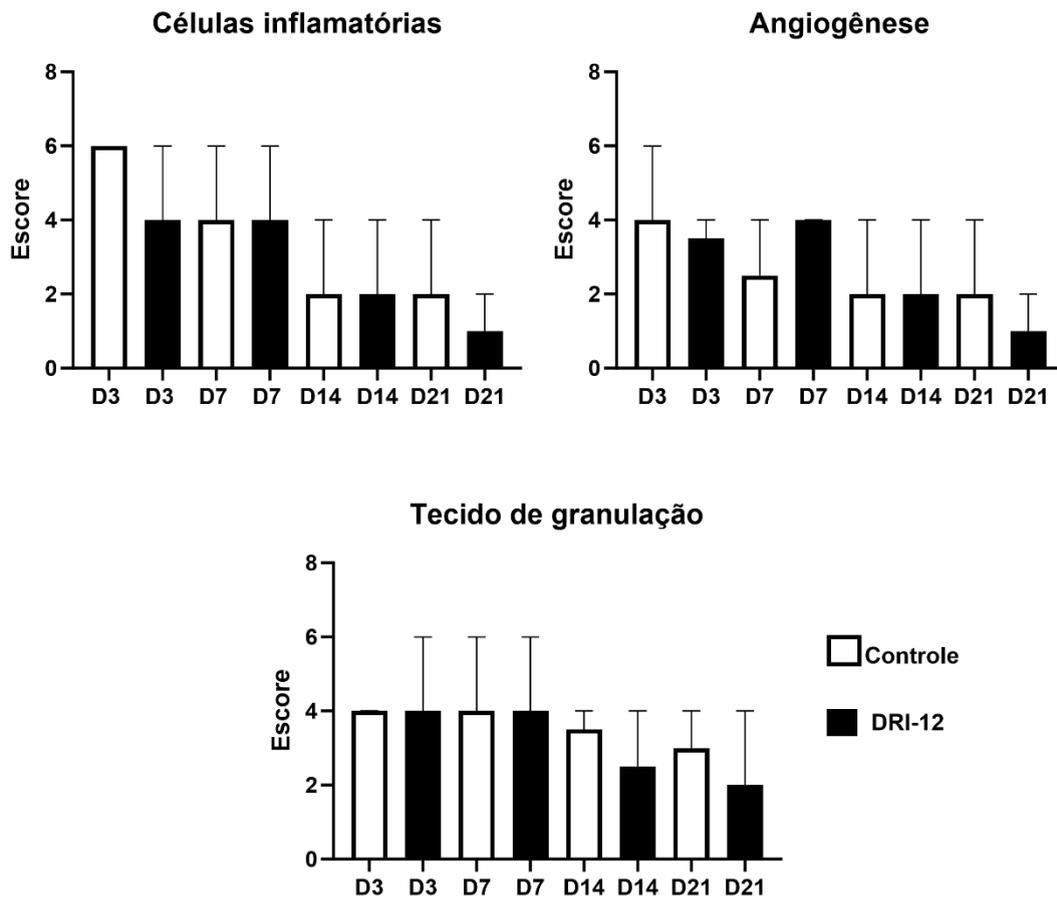


Figura 8- Média e desvio padrão dos escores obtidos na avaliação histológica com hematoxilina-eosina de feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 aos três, sete, 14 e 21 dias após a lesão. \* Diferem pelo teste não paramétrico Wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

Aos três dias após a lesão (D3), avaliação histológica com o tricrômico de masson, observou-se discreta fibroplasia em ambos os grupos, controle e cobre. Aos sete dias, tanto grupo tratado, quanto grupo controle, apresentaram predominância moderada de fibroplasia. No 14º e 21º dia após a lesão, o grupo controle apresentou predominância intensa de fibroplasia, enquanto o grupo tratado apresentou predominância moderada (Figura 9). Não houve diferença significativa entre os grupos em todos os tempos de avaliação quanto ao escore de fibroplasia (Tabela 7 e Figura 10).

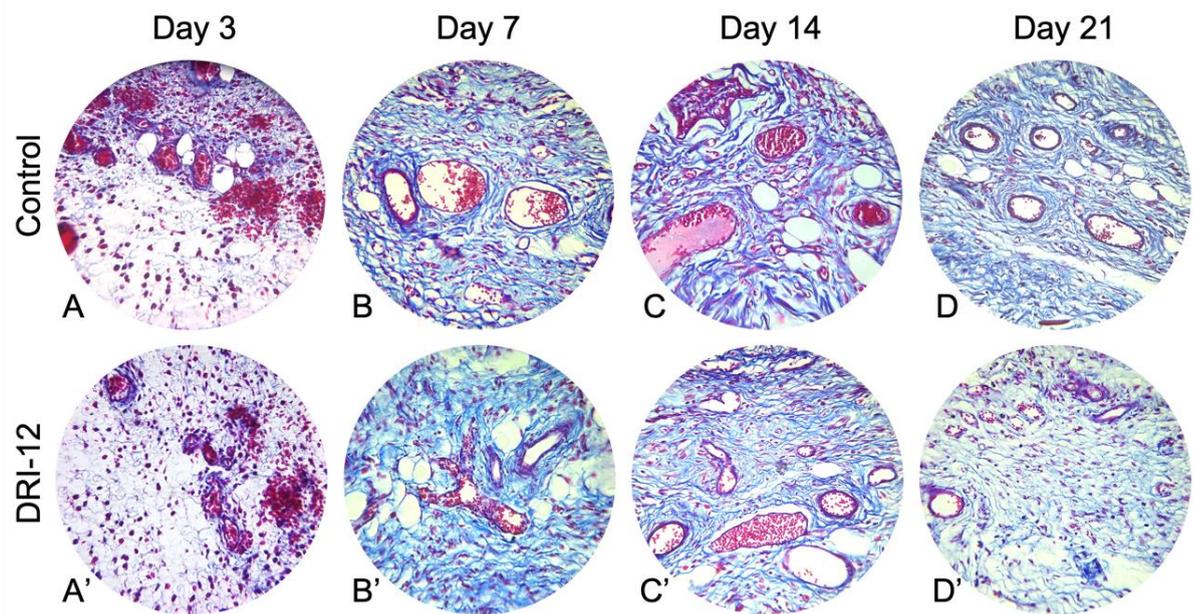


Figura 9- Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos após realização de feridas experimentais em ratos do grupo controle grupo DRI-12 aos três, sete, 14 e 21 dias após a lesão. Tricrômico de masson. Aumento de 10x. Observar deposição de colágeno (área azul claro) em B, B', C, C', D e D'.

Tabela 7- Média e desvio padrão dos escores obtidos na avaliação histológica com o tricrômico de masson das feridas experimentais em ratos do grupo controle e do grupo DRI\_12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.

	Dia 3		Dia 7		Dia 14		Dia 21	
	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12
<b>FB</b>	2,00 <sup>a</sup> (0,52)	2,00 <sup>a</sup> (0,40)	4,00 <sup>a</sup> (0,84)	4,00 <sup>a</sup> (1,22)	5,00 <sup>a</sup> (1,76)	4,00 <sup>a</sup> (2,19)	6,00 <sup>a</sup> (1,3)	5,00 <sup>a</sup> (1,76)

<sup>a</sup>Nas linhas – médias com letra minúscula diferentes diferem pelo teste não paramétrico Wilcoxon ( $p < 0,05$ ). Comparação entre animais tratados com solução fisiológica (controle) e tratados com nanopartículas Complexo Ternário de Cobre (II) com Hidrazida de ácido 4-Fluorofenoxiacético (Dri-12) para cada tempo de avaliação. FB: fibroplasia.

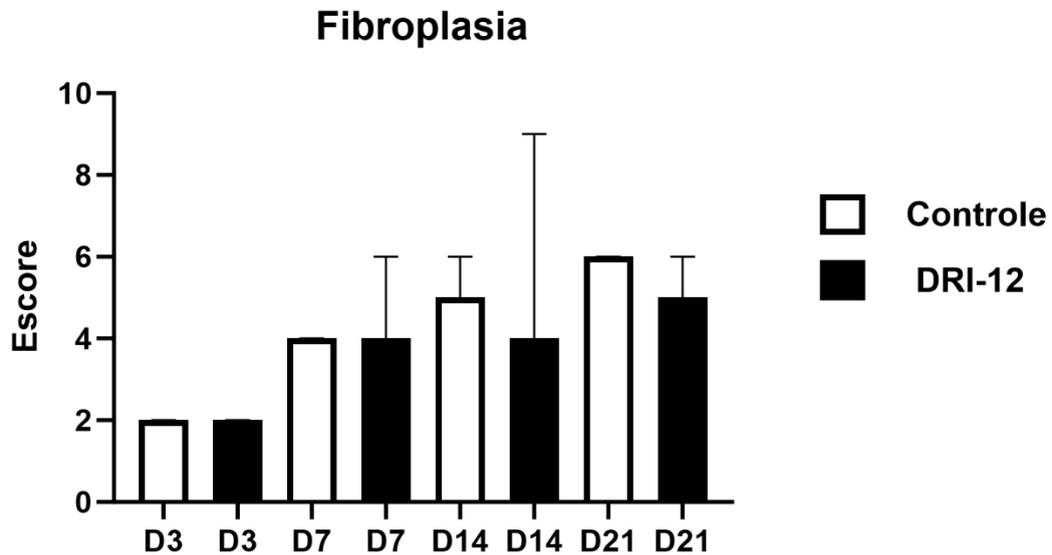


Figura 10- Média e desvio padrão dos escores obtidos na avaliação histológica com tricrômico de masson de feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 aos três, sete, 14 e 21 dias após a lesão. \*Diferem pelo teste não paramétrico Wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

Na avaliação da área do colágeno, foi observada maior porcentagem no grupo DRI-12 no terceiro e sétimo dias quando comparado ao grupo controle nos mesmos tempos de avaliação ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os outros tempos de avaliação (Tabela 8 e Figura 11).

Tabela 8- Média e desvio padrão da área do colágeno (%) das feridas experimentais em ratos do grupo controle e do grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Tricrômico de masson.

	Dia 3		Dia 7		Dia 14		Dia 21	
	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12
Média ± (desvio padrão)	49,78 <sup>a</sup> (0,07)	63,65 <sup>b</sup> (0,09)	46,36 <sup>a</sup> (0,01)	71,18 <sup>b</sup> (0,07)	64,84 <sup>a</sup> (0,04)	72,97 <sup>a</sup> (0,03)	76,14 <sup>a</sup> (0,11)	71,52 <sup>a</sup> (0,12)

<sup>a</sup> Nas linhas – médias com letra minúscula diferentes diferem pelo teste T não pareado ( $p < 0,05$ ). Comparação entre animais tratados com solução fisiológica (controle) e tratados com nanopartículas Complexo Ternário de Cobre (II) com Hidrazida de ácido 4-Fluorofenoxiacético (DRI-12) para cada tempo de avaliação.

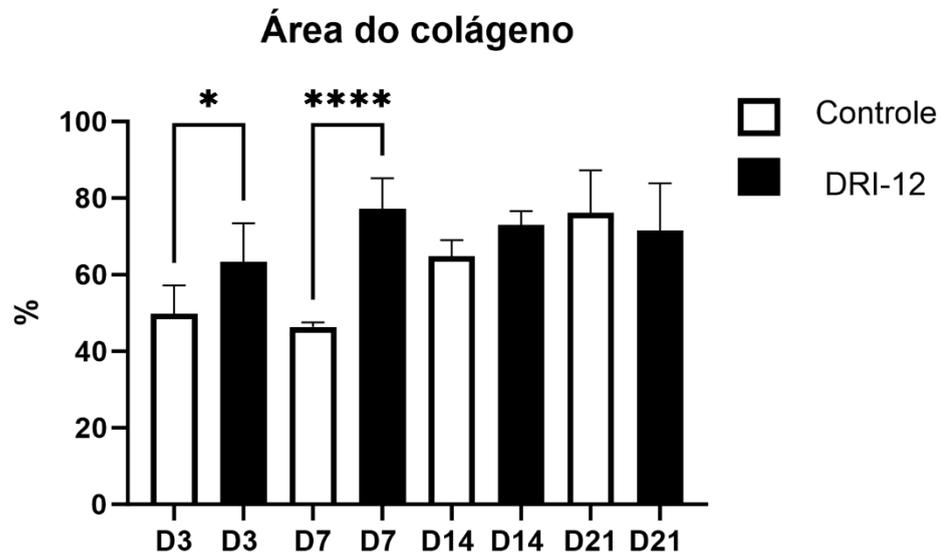


Figura 11- Média e desvio padrão da área do colágeno (%) das feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 aos três, sete, 14 e 21 dias após a lesão. \* Diferem pelo teste T não pareado ( $p < 0,05$ ).

Na avaliação histológica com PR, foi observado maior porcentagem de colágeno tipo I nos animais do grupo DRI-12 em relação ao grupo controle no sétimo dia de avaliação ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os outros tempos de avaliação (Tabela 9, Figura 12 e Figura 13).

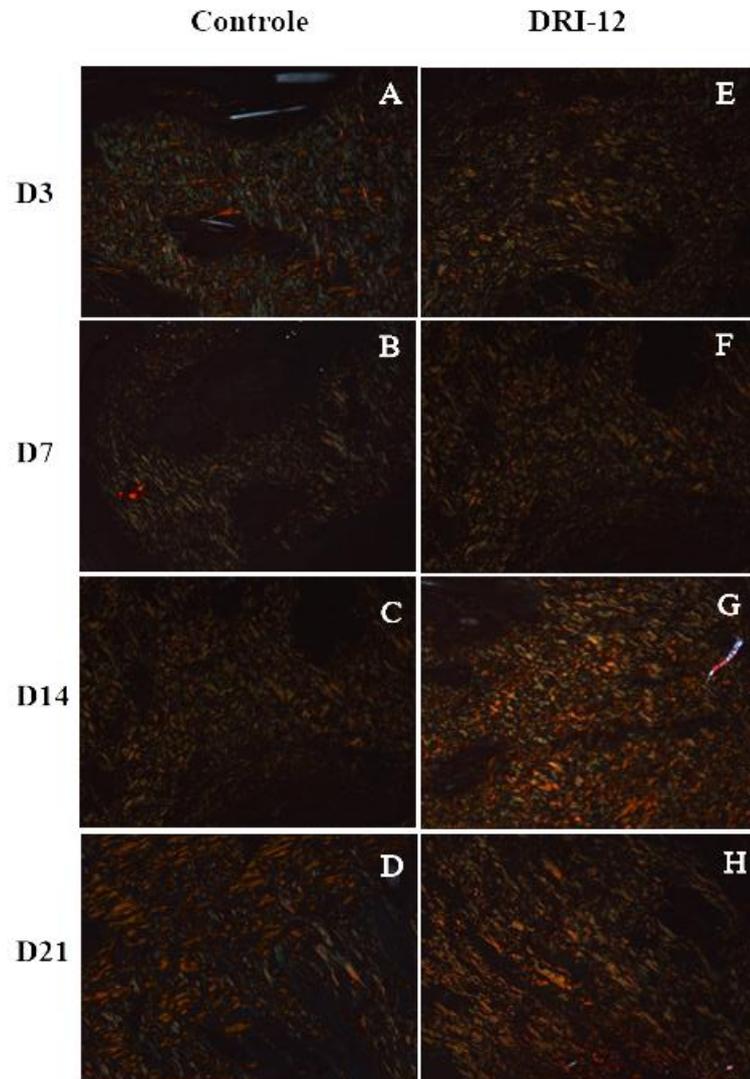


Figura 12- Fotomicrografia de cortes histológicos obtidos após realização de feridas experimentais em ratos não tratados (controle) e tratados com nanopartículas de complexo ternário de cobre (II) com hidrazida de ácido 4-fluorofenoxiacético (DRI-12) aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Picosirus Red. Aumento de 10x. Observar predominância colágeno tipo III correspondente com a cor verde (A, B, C e E) e predominância de colágeno tipo I correspondente com a cor vermelha (D, F, G e H).

Tabela 9- Média e desvio padrão da área do colágeno (%) das feridas experimentais em ratos do grupo controle e do grupo DRI-12 aos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão.

	Dia 3		Dia 7		Dia 14		Dia 21	
	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12	Controle	DRI-12
<b>Col. I</b>	1,63 <sup>a</sup> (±0,30)	0,88 <sup>a</sup> (±0,54)	2,26 <sup>a</sup> (±1,72)	5,21 <sup>b</sup> (±2,41)	3,33 <sup>a</sup> (±1,29)	6,10 <sup>a</sup> (±2,42)	3,73 <sup>a</sup> (±0,98)	5,78 <sup>a</sup> (±1,97)
<b>Col. III</b>	4,51 <sup>a</sup> (±1,21)	4,18 <sup>a</sup> (±1,88)	2,39 <sup>a</sup> (±0,02)	3,71 <sup>a</sup> (±1,78)	2,35 <sup>a</sup> (±0,62)	2,5 <sup>a</sup> (±0,92)	1,61 <sup>a</sup> (±0,54)	2,08 <sup>a</sup> (±0,83)

<sup>a</sup> Nas linhas – médias com letra minúscula diferentes diferem pelo teste T não pareado ( $p < 0,05$ ). Comparação entre animais tratados com solução fisiológica (controle) e tratados com nanopartículas Complexo Ternário de Cobre (II) com Hidrazida de ácido 4-Fluorofenoxiacético (Dri-12) para cada tempo de avaliação. Col. I: colágeno do tipo I; Col. III: colágeno do tipo III.

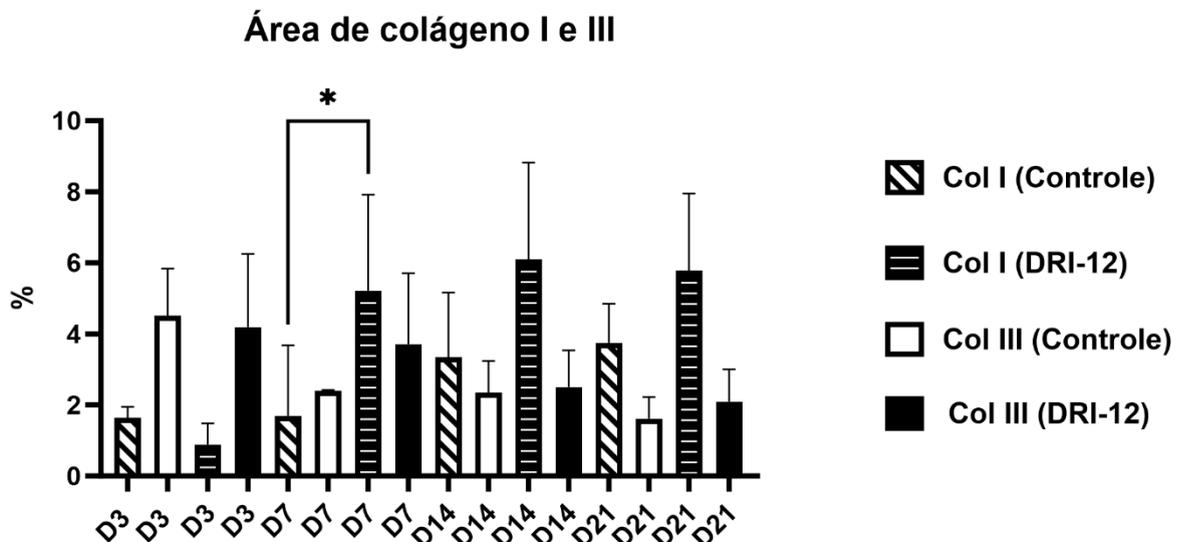


Figura 13- Média e desvio padrão da área do colágeno tipo I e do colágeno tipo III (%) das feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 aos três, sete, 14 e 21 dias após a lesão. \* Diferem pelo teste T não pareado ( $p < 0,05$ ). Col I: colágeno do tipo I; Col III: Colágeno do tipo III.

### Expressão gênica

Foi possível extrair RNA total a partir de todas as amostras utilizadas neste trabalho. Todos os RNA totais apresentaram, após eletroforese em gel de agarose, a presença das 3 bandas

características dos RNA ribossomais (28S, 18S e 5S), que são as visíveis por serem as mais abundantes nas amostras (Figura 14).

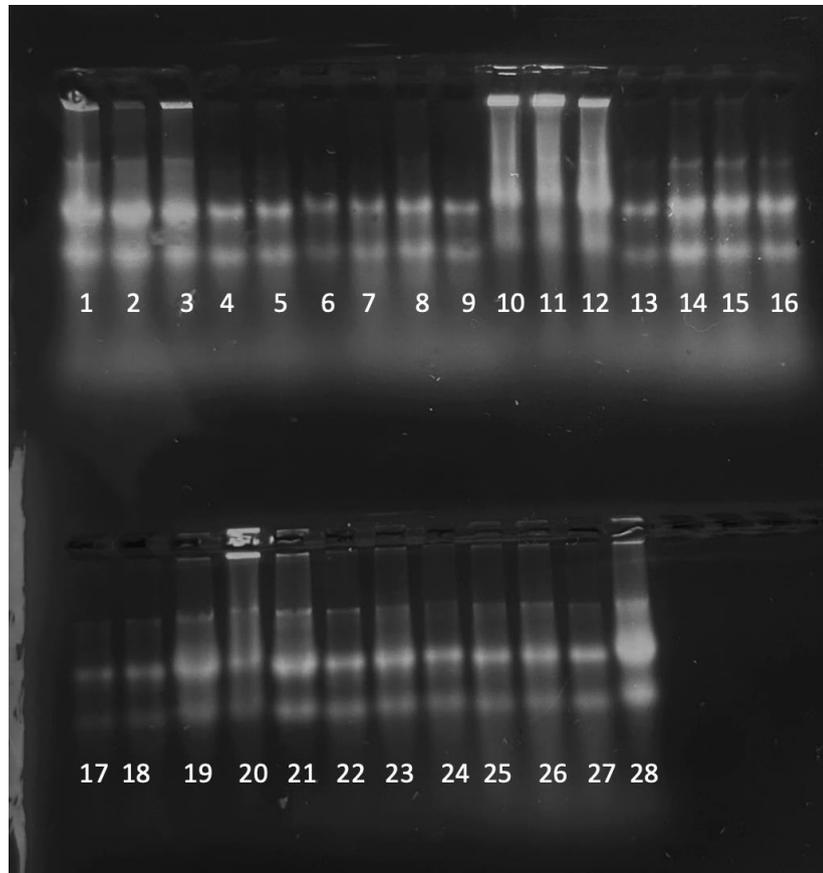


Figura 14- Eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade do RNA total extraído. 1, 2 e 3 = grupo Sham 3 dias; 4, 5 e 6 = grupo Sham 7 dias; 7, 8 e 9 = grupo Sham 14 dias; 10, 11 e 12 = Grupo controle 3 dias; 13, 14 e 15 = Grupo controle 7 dias; 16, 17 e 18 = Grupo controle 14 dias; 19, 20 e 21 = Grupo DRI-12 3 dias; 22, 23 e 24 = Grupo DRI-12 7 dias; 25, 26, 27 e 28 = Grupo DRI-12 14 dias.

Ao terceiro dia de avaliação, o grupo controle teve aumento significativo da expressão dos transcritos gênicos *Colla1* e diminuição do *FGF2* em comparação com o grupo DRI-12. O grupo Sham apresentou diminuição significativa da expressão do transcrito gênico *Colla1*, e aumentos significativos de *VEGF* e *FGF2* em comparação com o grupo controle. Também houve aumento significativo da expressão do transcrito gênico *VEGF* no grupo Sham em comparação com o grupo DRI-12 (Tabela 10, Figura 15).

Tabela 10- Expressão e erro padrão dos transcritos gênicos Colla1, EGF, VEGF, FGF2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das feridas experimentais em ratos do grupo controle, grupo DRI-12 e pele íntegra (Sham), no terceiro dia de avaliação.

<b>Controle vs DRI-12</b>			
<b>Gene</b>	<b>Expressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Resultado</b>
GAPDH	1		
Colla1	1,576	1,096	UP
EGF	0,918	0,789	
VEGF	1,142	0,627	
FGF2	0,776	0,655	DOWN
<b>Controle vs Sham</b>			
<b>Gene</b>	<b>Expressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Resultado</b>
GAPDH	1		
Colla1	0,753	0,629	DOWN
EGF	0,982	0,855	
VEGF	3,227	2,664	UP
FGF2	1,305	1,152	UP
<b>DRI-12 vs Sham</b>			
<b>Gene</b>	<b>Expressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Resultado</b>
GAPDH	1		
Colla1	1,187	0,883	
EGF	0,901	0,814	
VEGF	3,684	2,135	UP
FGF2	1,013	0,859	

GAPDH foi utilizado com gene referência. Análise realizada pelo REST2009. \*p<0.05.

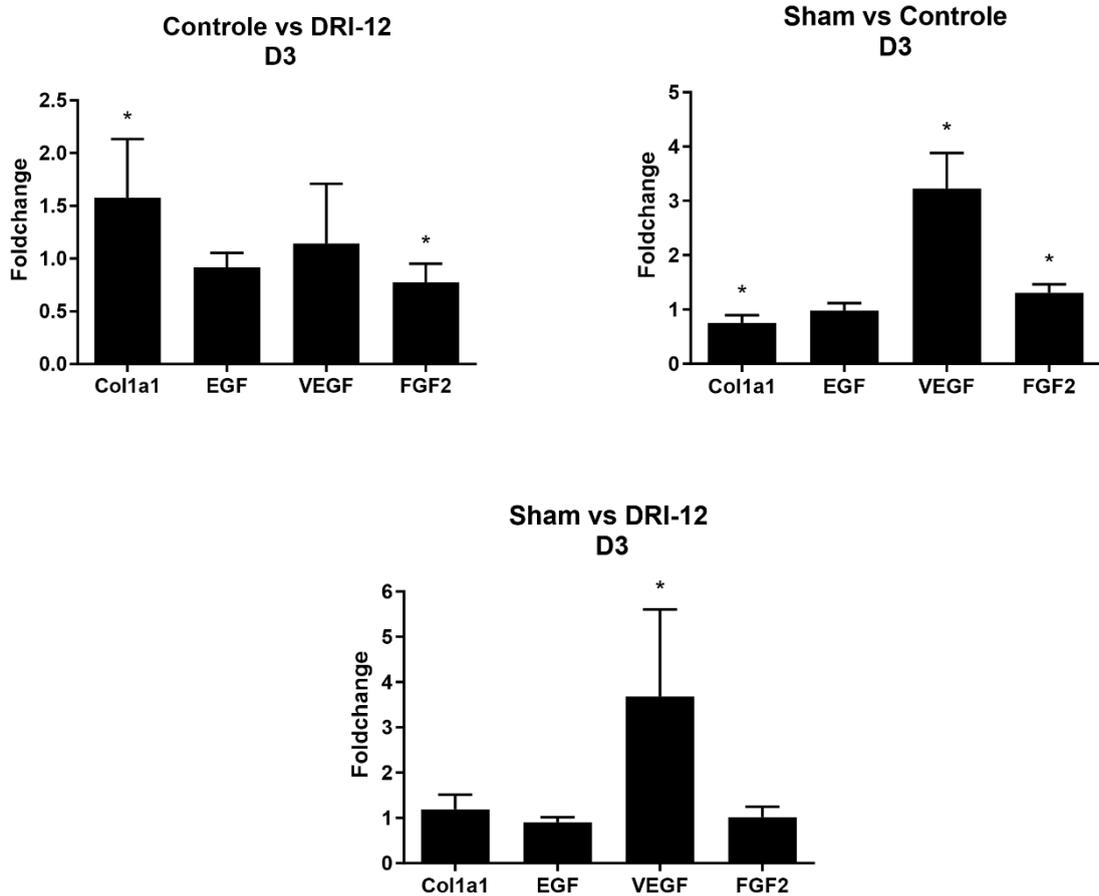


Figura 15- Expressão de transcritos gênicos Col1a1, EGF, VEGF, FGF2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das feridas experimentais em ratos do grupo controle, grupo DRI-12 e pele íntegra (Sham), no terceiro dia de avaliação. GAPDH foi utilizado com gene referência. Análise realizada pelo REST2009. \* $p < 0.05$ .

Na avaliação da expressão dos transcritos gênicos no sétimo dia de avaliação, observou-se aumento significativo do EGF e FGF2 e diminuição significativa de VEGF no grupo DRI-12, quando comparado ao grupo controle. Houve diminuição significativa de Col1a1, EGF, VEGF e FGF2 no grupo controle, quando comparado com o grupo Sham. Além disso, houve diminuição significativa de Col1a1, VEGF e FGF2 no grupo DRI-12, quando comparado com o grupo Sham (Tabela 11, Figura 16).

Tabela 11- Expressão e erro padrão dos transcritos gênicos Colla1, EGF, VEGF, FGF2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das feridas experimentais em ratos do grupo controle, grupo DRI-12 e pele íntegra (Sham), no sétimo dia de avaliação.

<b>DRI-12 vs Controle</b>			
<b>Gene</b>	<b>Expressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Resultado</b>
GAPDH	1		
Colla1	1,28	0,336	
EGF	1,664	1,223	UP
VEGF	0,318	0,088	DOWN
FGF2	1,749	1,368	UP
<b>Controle vs Sham</b>			
<b>Gene</b>	<b>Expressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Resultado</b>
GAPDH	1		
Colla1	0,115	0,057	DOWN
EGF	0,576	0,301	DOWN
VEGF	0,073	0,020	DOWN
FGF2	0,08	0,061	DOWN
<b>DRI-12 vs Sham</b>			
<b>Gene</b>	<b>Expressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Resultado</b>
GAPDH	1		
Colla1	1,187	0,883	DOWN
EGF	0,901	0,814	
VEGF	3,684	2,135	DOWN
FGF2	1,013	0,859	DOWN

GAPDH foi utilizado com gene referência. Análise realizada pelo REST2009. \*p<0.05.

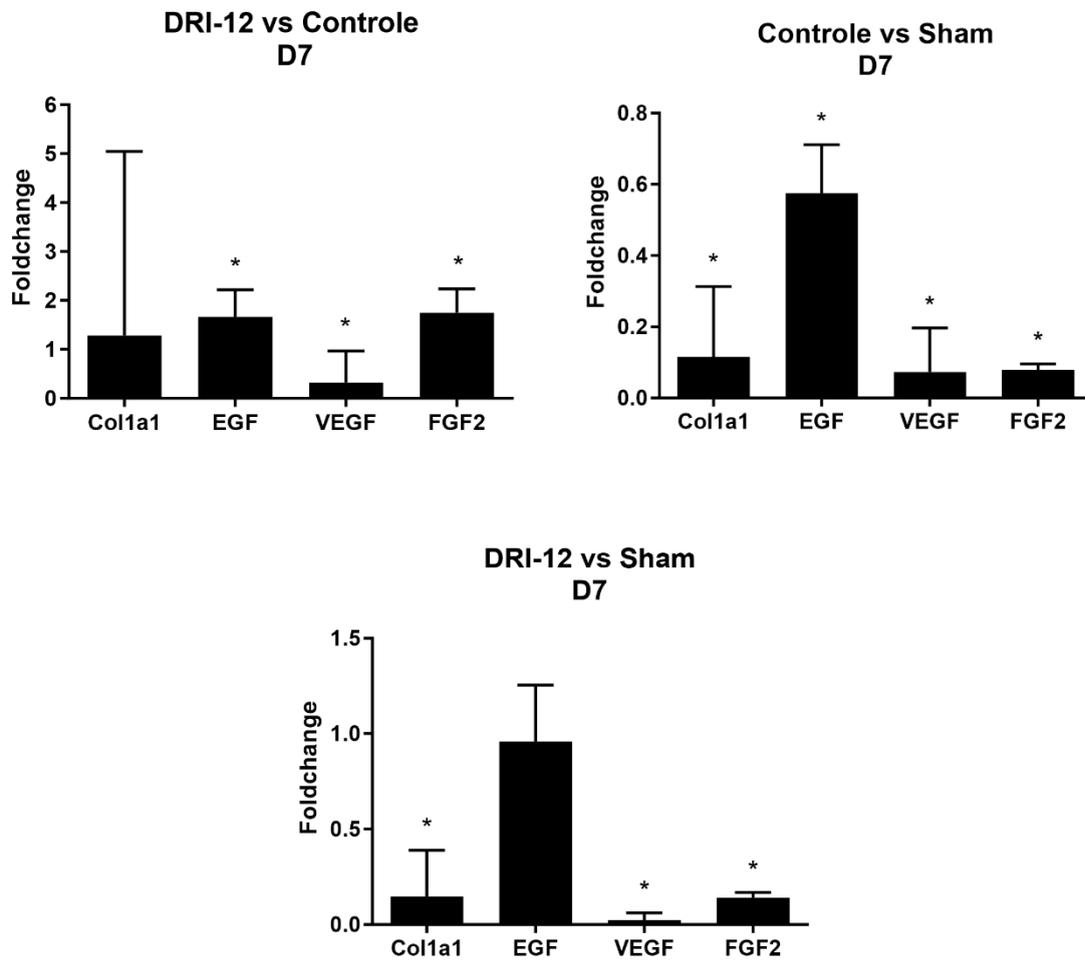


Figura 16- Expressão de transcritos gênicos Col1a1, EGF, VEGF, FGF2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das feridas experimentais em ratos do grupo controle, grupo DRI-12) e pele íntegra (Sham), no sétimo dia de avaliação. GAPDH foi utilizado com gene referência. Análise realizada pelo REST2009. \* $p < 0.05$ .

No 14º dia de avaliação, o grupo DRI-12 apresentou aumento significativo da expressão dos transcritos gênicos EGF e FGF2, e diminuição significativa de Col1a1 e VEGF. Houve aumentos significativos na expressão de Col1a1 e diminuição significativa de todos os transcritos estudados no grupo controle, quando comparado com o grupo Sham. Também foi notado no grupo DRI-12 diminuição significativa de Col1a1, VEGF e FGF2 (Tabela 12, Figura 17).

Tabela 12- Expressão de transcritos gênicos Colla1, EGF, VEGF, FGF2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das feridas experimentais em ratos do grupo controle, grupo DRI-12 e pele íntegra (Sham), no 14º dia de avaliação.

<b>DRI-12 vs Controle</b>			
<b>Gene</b>	<b>Expressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Resultado</b>
GAPDH	1		
Colla1	1,134	0,034	DOWN
EGF	1,728	0,914	UP
VEGF	0,474	0,231	DOWN
FGF2	1,686	0,861	UP
<b>Controle vs Sham</b>			
<b>Gene</b>	<b>Expressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Resultado</b>
GAPDH	1		
Colla1	1,517	1,215	UP
EGF	0,572	0,372	DOWN
VEGF	0,041	0,034	DOWN
FGF2	0,079	0,064	DOWN
<b>DRI-12 vs Sham</b>			
<b>Gene</b>	<b>Expressão</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Resultado</b>
GAPDH	1		
Colla1	0,08	0,014	DOWN
EGF	0,841	0,627	
VEGF	0,006	0,004	DOWN
FGF2	0,274	0,245	DOWN

GAPDH foi utilizado com gene referência. Análise realizada pelo REST2009. \*p<0.05.

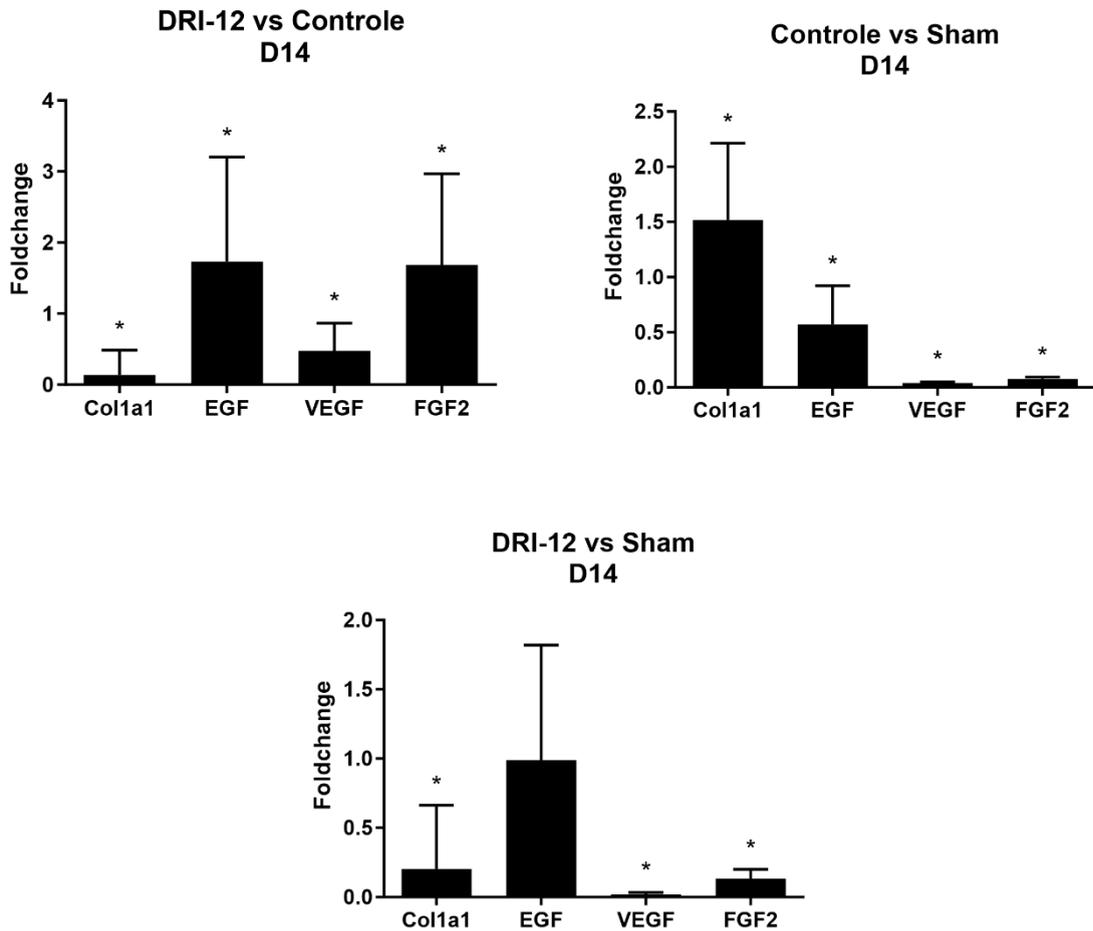


Figura 17- Expressão de transcritos gênicos Col1a1, EGF, VEGF, FGF2 pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) das feridas experimentais em ratos do grupo controle, grupo DRI-12 e pele íntegra (Sham), no 14º dia de avaliação. GAPDH foi utilizado com gene referência. Análise realizada pelo REST2009. \* $p < 0.05$ .

### Teste mecânico de tração

Durante o teste mecânico, a tensão das peles com lesão do grupo DRI-12 foi maior quando comparada com as peles com lesão do grupo controle no mesmo tempo de avaliação ( $p < 0,05$ ). Também foi obtida maior tensão das peles íntegras em ambos os grupos, controle e DRI-12, quando comparou-se com a tensão das peles com lesão dentro do mesmo grupo no tempo de avaliação ( $p < 0,05$ ) (Tabela 13 e Figura 18).

Tabela 13- Média e desvio padrão da tensão (MPa) das peles íntegras e com lesão em amostras cutâneas após reparação das feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 no 21° dia após a lesão através do teste mecânico de tração.

	Controle	DRI-12
<b>Com lesão</b>	0,42 <sup>aA</sup> (±0,12)	2,49 <sup>bA</sup> (±0,71)
<b>Pele íntegra</b>	7,46 <sup>aB</sup> (±0,91)	12,79 <sup>aB</sup> (±1,78)

<sup>a</sup>Nas linhas – médias com letra minúscula diferentes diferem pelo teste T não pareado ( $p < 0,05$ ).

Comparação entre animais tratados com solução fisiológica (controle) e tratados (DRI-12) com nanopartículas de Complexo Ternário do Cobre (II) com Hidrazida de Ácido 4-Fluorofenoxiacético (DRI-12) no 21° de avaliação.

<sup>A</sup>Nas colunas- médias com letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste T não pareado ( $p < 0,05$ ).

Comparação dentro do mesmo grupo (controle) e tratados (DRI-12) nanopartículas de Complexo Ternário do Cobre (II) com Hidrazida de Ácido 4-Fluorofenoxiacético (DRI-12) no 21° dia de avaliação.

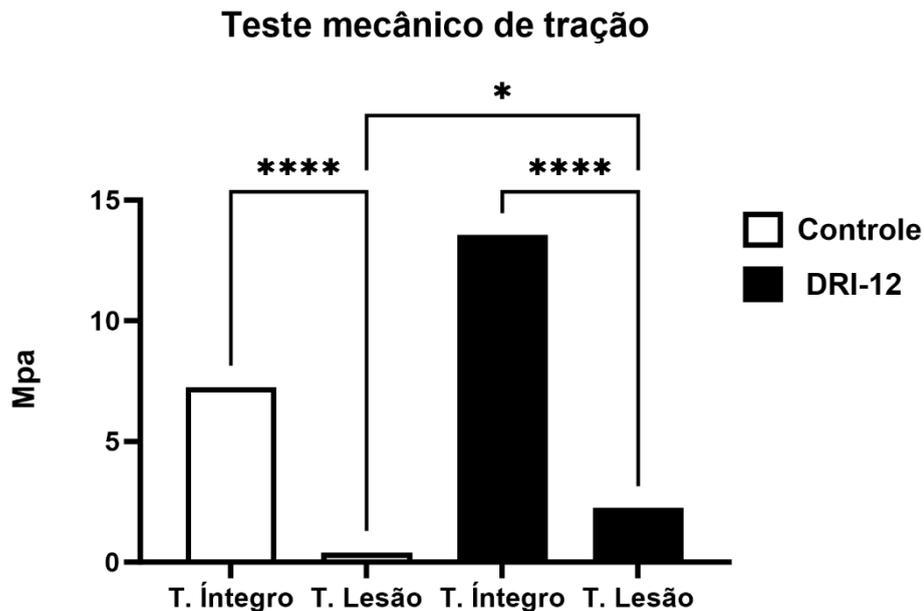


Figura 18- Média e desvio padrão da tensão (MPa) das peles íntegras (T. íntegro) e com lesão (T. lesão) em amostras cutâneas após reparação de feridas experimentais em ratos do grupo controle e grupo DRI-12 no 21° dia após a lesão através do teste mecânico de tração. \* Diferem pelo teste T pareado e não pareado ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Não foram observados sinais clínicos de infecção e ou contaminação no presente estudo. O complexo de cobre (DRI-12) apresenta propriedades que reduzem a proliferação de microrganismos que podem levar à infecção local e posteriormente sistêmica (PAIXÃO et al., 2017). Outro estudo com nanopartículas de cobre em feridas experimentais em ratos, com formulação química diferente desse estudo, mostrou a ação antimicrobiana dessas NPs após a redução significativa de unidades de colônias de *Staphylococcus aureus*, inoculadas na ferida do dia de sua confecção (TAO et al., 2019).

Os escores em relação a presença de crostas foram maiores no terceiro, 14° e 21° avaliação no grupo DRI-12 em relação ao grupo controle, podendo estar relacionado com a osmolaridade desse fármaco. De forma fisiológica, um meio hipertônico faz com que a água saia das células por osmose (QUELEMENTE; MORITA; BALBI, 2009), podendo sugerir que a solução hipertônica desse estudo tenha favorecido a persistência das crostas.

Andrade et al. (2020), notou presença de crostas durante 21 dias no leito da ferida em tratamento com solução aquosa de sulfato de cobre em dois equinos com feridas lacerantes traumáticas. O que já não foi observado em tratamentos com veículos oleosos a base de óleo de semente de uva em feridas experimentais em rato, no qual pôde-se visualizar presença de crostas apenas nos primeiros dias após indução de feridas cirúrgicas em ratos (BIZINOTO, 2023). Um estudo com feridas experimentais em coelhos utilizando gel a base de nanopartículas de prata mostrou que o grupo tratado com essa nanopartícula teve modera formação de crostas quando comparado com o grupo tratado (GUEDES, 2020), o mesmo não foi observado no presente estudo.

As crostas são compostas por células leucocitárias, debris celulares e fluidos, sendo sua formação essencial nos primeiros dias do processo de cicatrização para evitar a perda de água pelo leito da ferida e a contaminação por possíveis agentes infecciosos oportunistas. Entretanto, a persistência da presença de crostas em fases mais avançadas da cicatrização pode prejudicar a migração celular atrasando a reparação da pele (VIEIRA et al., 2022). No presente trabalho, a permanência de crostas não foi fator prejudicial para a completa epitelização do tecido quando comparado o grupo DRI-12 com o grupo controle.

Os escores de coloração do leito e epitelização estão associados. A coloração avermelhada das feridas do terceiro e sétimo dia estavam correlacionadas à presença de crostas e posteriormente, ao tecido de granulação. E a coloração rosada presente a partir do 14° dia estava associada com formação do tecido cicatricial e conseqüentemente um novo epitélio.

O aumento significativo da expressão do transcrito gênico EGF no sétimo dia de avaliação está associado com aumento significativo do escore de epitelização no 21º dia, no grupo DRI-12 quando comparado com o grupo controle. O fator de crescimento epidérmico se liga a um receptor específico da membrana celular (EGFR/ErbB-1) e assim promove efeitos mitogênicos em fibroblastos, células mesenquimais e endoteliais durante o reparo tecidual e sua ação é mais intensa na fase proliferativa, levando a reepitelização da ferida conforme ocorreu no presente estudo (COSTA et al., 2020).

Observou-se em um estudo com feridas experimentais em ratos tratados com hidrogel dopado com outra nanopartícula de cobre (Gel-MA/BACA-Cu NPs) maior epitelização quando comparado com o grupo controle, a partir do 4º ao 8º dia (TAO et al., 2019). Outros estudos apontam que o cobre diminui consideravelmente a expressão de marcadores relacionados com a linhagem de macrófagos pró-inflamatórios (M1) e estimulam o fenótipo de macrófagos anti-inflamatórios (M2), com diminuição de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e receptores de quimiocinas (CCR7), aumento de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-  $\alpha$ ), receptor de manose (CD206) e regulam a interleucina 10 (IL-10) (DÍEZ-TERCERO et al., 2021). Essa imunomodulação, contribui positivamente com a produção de fibroblastos e consequentemente a proliferação de um novo epitélio.

A fase proliferativa tende-se a iniciar no 4º dia após a lesão tecidual, podendo prolongar-se até o 14º e está associada com o aumento da expressão do FGF2 (BIZINOTO et al., 2022a). O maior potencial de contração, no terceiro dia de avaliação, (com diferença significativa) e o aumento da expressão do transcrito gênico FGF2 em todos os tempos de avaliação, do grupo DRI-12 comparado o grupo controle, aponta que a nanopartícula de cobre desse estudo potencializou a regulação da fase inflamatória, otimizando a fase proliferativa. Resultados esses que corroboram com os efeitos encontrados na nanopartícula de cobre (Gel-MA/BACA-Cu NPs) estuda por Tao et al. (2019) e da NPs Cu biossintetizadas avaliados por Tiwari et al. (2014).

O cobre com sua ação imunomoduladora auxiliou os macrófagos a sintetizarem fator de necrose tumoral beta (TNF- $\beta$ ), fator transformador de fibroblastos e microfibriloblastos, que realizam a contração da ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Em condições desfavoráveis para o organismo, como em uma injúria tecidual, o processo inflamatório induz a maior produção de radicais livres. Esse estresse oxidativo gera vários danos aos componentes celulares (MARTELLI; NUNES, 2014). De forma fisiológica o cobre participa ativamente dos processos de oxi-redução, como um cofator enzimático, favorecendo a diminuição da formação de radicais livres. Quando o cobre liga-se as proteínas

como a ceruloplasmina ocorre a prevenção ou diminuição dos efeitos deletérios causados pela reação da formação dos radicais livres (BARBOSA et al., 2010).

Mesmo que não houve diferença significativa na avaliação histológica das células inflamatórias, pôde-se observar aumento da expressão de EGF e FGF2 que são produzidos por macrófagos, ou seja, o complexo de cobre desse estudo também pode ter apresentado ação imunomoduladora e anti-inflamatória. Já em um estudo que utilizaram nanopartícula de ouro com feridas crônicas induzidas observaram diminuição significativa das células inflamatórias, além do seu efeito *in vitro* de induzir ou inibir a resposta inflamatória (MENDES, 2023). Tao et al. (2019) constatou que a (Gel-MA/BACA-Cu NPs) desempenhou um importante papel na regulação do estresse oxidativo, confirmando sua ação anti-inflamatória e antioxidante. Os nanocompostos de cobre têm a capacidade de inibir os lisossomos neutrofílicos, que podem potencializar a inflamação e causar mais danos ao tecido endotelial, como foi descrito por Anandhi; Rajeshkumar (2023). Entretanto, outros estudos apontam que outros tipos de complexos metálicos com cobre tem a capacidade de aumentar a produção de radicais livres e gerar a apoptose celular (QIN et al., 2015; LOW et al., 2017).

Os escores de tecido de granulação, fibroplasia e área de colágeno estão associadas. Nesse estudo não houve diferença significativa para a avaliação do tecido de granulação e fibroplasia, porém pôde-se notar aumento significativo do aumento da porcentagem da área de colágeno do grupo DRI-12 quando comparado com o grupo controle nos terceiro e sétimo dias de avaliação. Dessa maneira, pode-se sugerir que o complexo de cobre DRI-12 otimizou a fase proliferativa, na qual caracteriza-se pela multiplicação dos fibroblastos e produção do tecido de granulação (BIZINOTO et al., 2022a).

A fase de remodelamento caracteriza pela reorganização da deposição de colágeno, no qual o colágeno do tipo III é substituído pelo colágeno do tipo I, ocorrendo a substituição do tecido de granulação por um tecido mais resistente (KONDO; ISHIDA, 2010). Esse evento é regulado pelo aumento da expressão de TGF-beta, que pode ser potencializado pela ação imunomoduladora do cobre (DÍEZ-TERCERO et al., 2021).

A formação de novos vasos também ocorre na fase proliferativa da cicatrização principalmente pelo estímulo do VEGF, expressado pelos macrófagos, plaquetas, queratinócitos e fibroblastos (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; BIZINOTO et al., 2022a).

A utilização de nanocompostos de cobre tem mostrado que essas nanopartículas aumentam a estimulação da expressão de VEGF. Em estudos *in vitro* demonstraram que a regulação desse fator está diretamente associada com o aumento da proliferação celular,

estimuladas pelas (Gel-MA/BACA-Cu NPs) (TAO et al., 2019). Outro estudo com feridas experimentais em ratos diabéticos tratados com um composto biossintetizado adicionado a nanopartículas de cobre (SA-DFO/Cu) ressaltou a estimulação da angiogênese (LI et al., 2022). O mesmo foi confirmado nos resultados desse trabalho, no qual houve aumento da expressão dos transcritos gênicos de VEGF nos dias sete e 14 de avaliação, no grupo DRI-12 comparado com o grupo controle e com o grupo Sham.

A fase de fibroplasia caracteriza-se pela migração dos fibroblastos da borda da ferida para o sítio da lesão, no qual se multiplicam e produzem colágeno através da estimulação de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e do fator de crescimento fibroblástico (FGF), liberado pelos macrófagos e plaquetas (BIZINOTO et al., 2022).

A estabilização da matriz extracelular ocorre através da enzima lisil oxidase (LOL). De forma fisiológica, ela é ativada pela presença do cobre, e como consequência, catalisa as mudanças pós-traducionais que possibilitam a ligação covalente cruzada (*cross-link*) entre as cadeias laterais do colágeno e da elastina (RIBEIRO, 2015; BAIRELE et al., 2010). Dessa maneira pode sugerir que o complexo de cobre DRI-12 favoreceu esse evento fisiológico e otimizou a formação da matriz extracelular e a estabilização do colágeno, uma vez que houve aumento significativo de EGF já nos primeiros dias de avaliação, aumento significativo da área de colágeno nos dias três e sete e aumento significativo do colágeno tipo I no dia sete, no grupo DRI-12 quando comparado com o grupo controle.

De acordo com MacPhail (2015), o ganho de força de uma ferida no seu processo de cicatrização corresponde a apenas 20% durante os primeiros 21 dias, o que pode explicar a maior tensão das peles íntegras do grupo controle e tratado com complexo de cobre DRI-12, quando comparado com os tecidos lesionados.

A maior tensão das peles com lesão do grupo DRI-12 quando comparado com o grupo controle durante o teste mecânico (diferença significativa), pode ser atribuído à otimização da ação fisiológica do cobre como coenzima metalina sobre a enzima LOL, estabilizando as fibras colágeno e elastina, já descrito por Bairele et al. (2010) e Ribeiro (2015), proporcionando às feridas uma maior capacidade de resistência durante o teste. A formação dos *cross-link* em qualquer tecido biológico proporciona maior força e resistência em situações de degradação (SHAVANDI et al., 2008). A fase de remodelamento caracteriza-se pelo aumento da resistência do colágeno, em que o colágeno tipo III caracterizado por pequenos feixes paralelos é substituído lentamente pelo colágeno tipo I que tem uma estrutura mais forte (BIZINOTO et al., 2022a). O aumento significativo do colágeno tipo I no sétimo dia de avaliação no grupo

DRI-12 também justifica a maior tensão das peles no grupo DRI-12, isso significa que o complexo de cobre DRI-12 favorece a fase de remodelamento.

Estudos referentes a suplementação de cobre na alimentação mostraram resultados positivos na otimização da cicatrização de feridas (BECHARA et al., 2021), sendo possível sugerir o mesmo efeito na utilização tópica das NPs Cu.

## CONCLUSÃO

O Complexo Ternário de Cobre (II) com Hidrazida de Ácido 4-Fluorofenoxiacético (DRI-12) otimiza o processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. O DRI-12 promove a epitelização no leito da ferida. Este complexo intensifica significativamente o potencial de contração, aumenta significativamente o colágeno tipo I e reforça a resistência à tensão do tecido. Além de estimular a expressão dos transcritos gênicos EGF, VEGF, FGF2 e CoLa1.

## REFERÊNCIAS

ANANDHI, P.; RAJESHKUMAR, S. Copper nanoparticles in wound healing: a review. **Journal of Survey in Fisheries Sciences**, v. 10, n. 1S, p. 49-63, 2023.

ANDRADE, C. F. O. DE et al. Utilização de sulfato de cobre para debridamento do tecido de granulação exuberante em ferida traumática de equino. **Ciência Animal**, v. 30, n. 3, p. 126–133, 2020.

ARIAS, M.V.B. et al. Identificação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de cães e gatos com feridas traumáticas contaminadas e infectadas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 861-874, 2008.

BAIERLE, M. et al. Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 6, p. 463–470, 2010.

BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BECHARA, N. et al. Associations between Nutrients and Foot Ulceration in Diabetes: A Systematic Review. **Nutrients**, v. 13, n. 8, p. 2576, 2021.

BIZINOTO, L. B. Óleo de semente de uva (*Vitis vinifera*) na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em ratos (*Rattus norvegicus*). 2022. 87 f. Dissertação de Mestrado. Universidade de Uberaba, Minas Gerais, 2022.

BIZINOTO, L. B. et al. Wound treatment principles - part one. **International Journal of Health Science**, v. 2, n. 18, 2022a.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117, n.75, p.12-34, 2006.

COSTA, M. B. Benefício do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) associado a terapia de fotobiomodulação a LED no reparo tecidual de feridas cutâneas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. 1-28, 2020.

DÍEZ-TERCERO, L. et al. Evaluation of the immunomodulatory effects of cobalt, copper and magnesium ions in a pro inflammatory environment. **Scientific Reports**, v.11, p.11707, 2021.

DIN, M. I.; REHAN, R. Synthesis, Characterization, and Applications of Copper Nanoparticles. **Analytical Letters**, v. 50, n. 1, p. 50–62, 2017.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

FERREIRA, N. S. Morfologia e propriedades estruturais de nanopartículas de ZnO sintetizadas pelo processo sol-gel proteico. Dissertação (Mestrado em Física)- Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, SE- Brasil, 2010.

GRECA, F. H. et al. Correlação entre o fluxo sanguíneo intestinal e a cicatrização de anastomoses colônicas: estudo experimental em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 15, p. 88-94, 2000.

GUEDES, H. A. Avaliação da cicatrização cutânea por uso de gel à base de nanopartículas de prata em coelhos. 2020. 59f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2020.

GUPTA, V. et al. Nanotechnology in Cosmetics and Cosmeceuticals - A Review of Latest Advancements. **Gels**, v. 8, n. 3, p. 173, 2022.

KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science International**, v. 203, p. 93-98, 2010.

LI, S. et al. Calcium ion cross-linked sodium alginate hydrogels containing deferoxamine and copper nanoparticles for diabetic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 202, p. 657–670, 2022.

LOW, M. L. et al. Ternary and binary copper (II) complexes: synthesis, characterization, ROS-inductive, proteasome inhibitory, and anticancer properties. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 70, n. 2, p. 223-241, 2017.

MACPHAIL, C. M. Cirurgia do Sistema Tegumentar. *In*: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 4 ed. Elsevier Editora Ltda, 2015, p. 546-596.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54–57, 2014.

MENDES, C. **Efeitos das nanopartículas de ouro obtidas a partir da síntese verde em um modelo animal de ferida crônica induzida com resiquimod**. 2023. 140f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2023.

MENDONÇA, R. J. D.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257–262, 2009.

MONTEIRO, G. P. et al. A Ternary Copper (II) Complex with 4- Fluorophenoxyacetic Acid Hydrazide in Combination with Antibiotics Exhibits Positive Synergistic Effect against Salmonella Typhimurium. **Antibiotics**, v. 11, n. 388, 2022.

MONTERO, D. A. et al. Antimicrobial properties of a novel copper based composite coating with potential for use in healthcare facilities. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 3, 2019.

PAIXÃO, D. A. et al. Novel copper(II) complexes with hydrazides and heterocyclic bases: Synthesis, structure and biological studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 172, p. 138–146, 2017.

PFÄFFL, Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.

QIN, Q. P. et al. Synthesis and antitumor mechanisms of a copper (II) complex of anthracene-9-imidazoline hydrazone (9-AIH). **Metallomics**, v. 7, n. 7, p. 1124-1136, 2015.

QUELEMENTE, B. A.; MORITA, A. B. P. DA S.; BALBI, A. T. Utilização da solução hipertônica de cloreto de sódio em ferida hipergranulada. **Revista de Enfermagem UFPE**, v. 3, n. 2, p. 317–323, 2009.

REZENDE, R. S. et al. Análise ultra estrutural do colágeno de feridas cutâneas de coelhos tratadas com plasma rico em plaquetas de equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 3, p. 827-835, 2020.

RIBEIRO, L. R. Lisol oxidase e propriedades pró-tumorigênicas de pericitos. 2015. 81f. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 1998, 211p.

SANTOS, L. O. M. Efeito da Somatotropina Sobre A Cicatrização de Feridas Cutâneas em Ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 220-224, 2002.

SHAVANDI, A. et al. Polyphenol uses in biomaterials engineering. **Biomaterials**, v. 167, p. 91–106, 2018.

SILVA, M. M. P. et al. Utilização de nanopartículas no tratamento de feridas: revisão sistemática. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 51, n. 0, 8 jan. 2018.

SOUSA, A. et al. Nanopartículas de prata: história, benefício e aplicação. **Revista de Ciência elementar**, v. 10, n. 3, p. 1-5, 2022.

TAO, B. et al. Copper nanoparticles-embedded hydrogel for killing bacteria and promoting wound healing with photothermal therapy. **Journal of Materials Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 4-16, 2019.

TIWARI, M. et al. Biosynthesis and wound healing activity of copper nanoparticles. **IET Nanobiotechnol**, v. 8, p. 230-237, 2014.

VIEIRA, N. R. et al. Avaliação da membrana de colágeno tipo II na cicatrização de cutâneas excisionais em ratos Wistar. **Archives of Veterinary Science**, v. 27, n. 3, p. 1-8, 2022.

## Anexo I

### Comitê de Ética em Experimentação Animal



**Uniube** Comitê de Ética em Experimentação Animal

---

Ofício CEEA-008/2022

Uberaba, 03 de abril de 2023.

#### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 010/2022 relativos ao projeto intitulado “Efeito do Complexo Ternário de Cobre (II) com Hidrazida de Ácido 4-Fluorofenoxiacético (Dri-12) na Cicatrização de Feridas Experimentais em Ratos (*Rattus Novergleus*)” que tem como responsável o Prof<sup>a</sup>. Isabel Rodrigues Rosado, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.794/08.

#### CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 010/2022 related to the project entitled “Effect of Ternary Copper (II) Complex with 4-Fluorophenoxyacetic on the healing of experimental skin wounds in Rats (*Rattus Novergleus*)” under the supervision of Prof<sup>a</sup>. Isabel Rodrigues Rosado, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.794/08.

Atenciosamente,

**Prof.ª Joely Ferreira Figueiredo Bittar**  
Coordenadora do CEEA-UNIUBE

## **Anexo II**

### **Protocolo de Histologia**

1. Desparafinização:
  - Lâminas imersas em xilol 3x por 5 minutos;
2. Hidratação:
  - Lâminas imersas em álcool 100% 3x por 5 minutos;
  - Lâminas imersas em álcool 95% 1x por 5 minutos;
  - Lavar em água corrente por 5 minutos;
3. Coloração:
  - Imersão em hematoxilina por 50 segundos;
  - Lavar em água corrente por 5 minutos;
  - Imersão em eosina por 50 segundos;
4. Desidratação:
  - Lâminas imersas em álcool 100% 3x por 5 minutos;
  - Lâminas imersas em xilol 3x por 5 minutos;
5. Montagem:
  - Montar as lâminas com lamínulas usando resina sintética.

### Anexo III

#### Protocolo de Preparação de PBS

##### **PBS 1,5 Molar (10x):**

Dissolver em água ULTRAPURA aquecida e com agitação:

- 80g de NaCl (cloreto de sódio).
- 2g de KCl (cloreto de potássio).
- 11,5g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato de sódio anidro).
- 2,0g de K H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> (fosfato de potássio).
- Conferir o pH que deve ser de 7,2 (acertar com NaOH sólido).
- Armazenar a 4°C.
- Completar o volume para 1 litro.
- Transferir para frasco âmbar de 1L enchendo-o no máximo com 500mL de solução.
- Armazenar a 4°C.

**IMPORTANTE:** com o tempo a solução pode apresentar a formação de cristais no fundo da garrafa. Caso isso ocorra, coloque o frasco em banho-maria até que os cristais solubilizem. Assim você pode utilizar a solução normalmente.

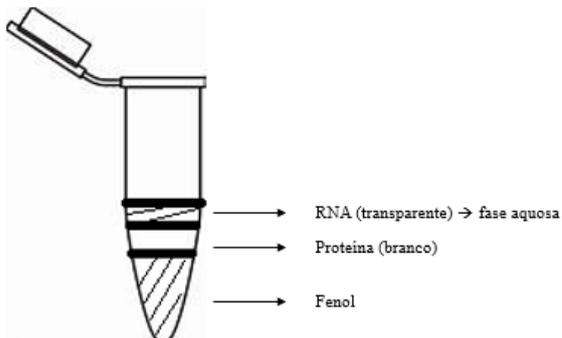
##### **PBS 0,15 Molar (1x)(para uso):**

- 100 mL de PBS 1,5 molar em 900 mL de água ULTRAPURA
- Dentro do fluxo laminar, fazer a filtração em bomba a vácuo com membrana de 0,22 µm ou colocar em frasco de 1L enchendo no máximo com 500mL de solução. Tampar com papel craft e autoclavar.
- Armazenar a 4°C.

## Anexo IV

### Protocolo de Extração de RNA

- Tecido deve estar armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  no Trizol (amostra em eppendorf);
- Adicionar  $20\mu\text{l}$  de clorofórmio;
- Homogenizar viogorosamente de forma manual por 15 vezes;
- Deixar em temperatura ambiente por 5 minutos;
- Centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos:
  - Centrifuga refrigerada ou em câmara fria;
  - Colocar os tubos em lados opostos para equilibrar o peso;



- Remover fase aquosa quase totalmente ( $\pm 400\mu\text{L}$ );
  - OBS: ponteira não pode encostas nas outras fases.
- Adicionar  $500\mu\text{L}$  de isopropanol para cada 1 mL de Trizol (Precipitação do RNA);
- Sacudir o eppendorf com as mãos;
- Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos;
- Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos (sob refrigeração)
  - Formação do pellet
- Descartar o líquido sobrenadante;
- Adicionar 1 mL de etanol 75% no eppendorf com o pellet;
- Soltar o pellet manualmente do fundo do eppendorf;
  - Pode-se armazenar a solução no freezer por até 1 ano ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

- Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos;  
- Manter a amostra sempre no gelo.
- Descartar o etanol 75%, mantendo o pellet no fundo do eppendorf;
- Levar o eppendorf para a placa aquecedora a 34°C para a evaporação do etanol (com a tampa aberta) por cerca de 10 minutos;
- Para ressuspender o RNA, pipetar 20  $\mu$ L de água nucleasse free;
- Homogenizar com a pipeta por várias vezes;

**Anexo V****Protocolo de Síntese de cDNA**

iScript cDNA Synthesis Kit BIO-RAD

- Após a quantificação da concentração no RNA no Nanodrop 2000:

5x iScript Reaction Mix → 4 $\mu$ L

iScript Reverse Transcriptase → 1 $\mu$ L

H<sub>2</sub>O DePC → variável

RNA template (100<sub>Fg</sub> – 1  $\mu$ g total) → variável

} 15 $\mu$ L

Valor total: 20  $\mu$ L

## Anexo VI

### Protocolo para Gel de Agarose 1%

- Para extração de RNA, tratar a cuba com água oxigenada 30% por 15 minutos para inibir ação da RNase.;
- Pesa em um ellernmeyer 1g de agarose para cuba grande
- Adicionar 100 mL de TAE 1x

#### TAE 1%

- Diluir 2 mL de TAE 50x DEPC em 100 mL de água (destilada para PCR e DPEC para RNA)
- Dissolver a agarose completamente no micro-ondas por 1 min (caso não dissolva completamente, adicionar mais 30 minutos no micro-ondas após misturas)

- Montar a cuba no sentido contrário e derrubar a mistura de agarose e TAE 1x com os pentes
- Esperar até que o gel esteja completamente sólido
- Retirar os pentes e virar o gel
- Cobrir o gel completamente com TAE 1x até a marca presente na cuba (cerca de 400 mL)
- Pegar as amostras + BF (freezer -20°C) + gel read
- Fazer gotas de BF e gel read → 2 µL para cada amostra
- Misturar as gotas com 1 µL de RNA
- Após distribuir todas as amostras, fechar a cuba
- Garantir que as amostras estão no pólo negativo
- Ligar os pólos na máquina
- Correr por 40 minutos