

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
CAMPUS DOIS VIZINHOS

CANDIDA NISSOLA

**HIDROGEL CONTENDO (1→6)-β-D-GLUCANA (LASIODIPLODANA):
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE CICATRIZANTE**

DOIS VIZINHOS
2019

CANDIDA NISSOLA

**HIDROGEL CONTENDO (1→6)- β -D-GLUCANA (LASIODIPLODANA):
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE CICATRIZANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Biotecnologia”

Orientador: Dr. Mário Antônio Alves da Cunha

DOIS VIZINHOS

2019

N727h Nissola, Candida.
Hidrogel contendo (1→6)-β-D-glucana (IASIDIPODANA):
desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade
cicatrizante. / Candida Nissola – Dois Vizinhos, 2019.
83 f.: il.

Orientador: Prof^o Dr. Mário Antônio Alves da Cunha.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Dois Vizinhos, 2019.
Bibliografia p.68-77.

1. Macromoléculas. 2. Glucanas. 3. Cicatrização de
ferimentos. I. Cunha, Mário Antônio Alves da, orient.
II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois
Vizinhos. III. Título

CDD:660.6

Ficha catalográfica elaborada por Keli Rodrigues do Amaral Benin CRB: 9/1559

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS DOIS VIZINHOS
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

PPGBIOTEC
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título de Dissertação Nº 9/2019

Hidrogel contendo (1-->6) - β -D-Glucana (Lasiodiplodana): Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade cicatrizante

Por

Candida Nissola

Esta dissertação foi apresentada às **14 horas** e trinta minutos do dia **30 de agosto de 2019**, na, Sala de Reuniões e Vídeo Conferência - UTFPR-DV, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora, composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha
(UTFPR- PB)

Prof^a. Dr.^a Luciane Sene
(UNIOESTE)

Prof. Dr. Cleverson Busso
(UTFPR- TD)



Prof. Dr. Andreia Anschau (UTFPR)
Coordenadora do PPGBIOTEC
UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Dedico a todas as pessoas que apesar das dificuldades, buscam seus objetivos, seus sonhos e conseguem ser felizes na trajetória.

AGRADECIMENTOS

Acreditar que podemos ter com quem dividir ou trocar nosso fardo é uma maneira de viver a vida de forma mais leve, por isso agradeço primeiramente a Deus pela vida, por me guiar e me fazer sentir amada.

Certamente estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase da minha vida. Portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas estejam certas que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão.

Minha gratidão e reconhecimento à minha família, pois acredito que sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha, por acreditar nesse projeto e que poderíamos realizá-lo. Pelo auxílio, sabedoria e paciência com que me guiou nesta trajetória.

Aos professores, Andréia Anschau, Cleverson Busso, Mário Cunha e Paula Montanher, pelos ensinamentos e por compartilharem seus conhecimentos.

Aos meus colegas de mestrado, Tais, Roberta, Paula e Cristian, pela amizade, suporte e apoio ao longo desses anos.

Ao meu namorado Cleverson França, pelo companheirismo, disposição, dedicação, carinho e auxílio nessa fase, com certeza fez uma grande diferença sua presença em minha vida nesse período.

A Thais Theis, pela amizade, auxílio e apoio.

Ao Marcelo Marchioro, Debora Dhamer e Gabrielle Calegari, por toda a disponibilidade e auxílio nas análises realizadas na UTFPR/PB.

A equipe da Universidade Estadual de Maringá (UEM), a professora Eneri Vieira de Souza Leite Mello, ao professor João Carlos Palazzo de Mello, Daniela Cristina de Medeiros, Camila Giroto, e em especial a Ana Carolina Guidi, que foram além de parceiros, pessoas que me acolheram de braços abertos, assim como as técnicas do laboratório de histologia, Silvia e Maria Ângela.

Ao Ângelo Parisotto, pelo auxílio com a estatística.

A contribuição da banca do exame de qualificação e pela participação dos membros da banca examinadora da defesa.

A Secretaria do curso, pela disponibilidade e disposição sempre.

A UTFPR pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização desta pesquisa, tenho certeza que sem o apoio e colaboração de tantas pessoas, não teria sido possível chegar até aqui.

Obrigada!

“A scientist in his laboratory is not a mere technician: he is also a child confronting natural phenomena that impress him as though they were fairy tales”.

Marie Curie

RESUMO

NISSOLA, Candida. Hidrogel contendo (1→6)- β -D-glucana (lasiodiplodana): desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade cicatrizante. 2019. 83f. Dissertação - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2019.

β -glucanas tem despertado grande interesse de pesquisadores e de indústrias farmacêuticas e cosméticas, por apresentam diversas propriedades biotecnológicas e funcionais. Dentre as β -glucanas a lasiodiplodana (LAS), um exopolissacarídeo (EPS) do tipo (1→6)- β -D-glucana, produzida pelo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI e descrita recentemente tem demonstrando diferentes potencialidades biológicas. O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento, a caracterização e avaliação do potencial de indução de cicatrização de um hidrogel contendo lasiodiplodana (0,5%). A formulação desenvolvida foi avaliada quanto a parâmetros físico-químicos (cor, odor, pH, espalhabilidade, viscosidade, atividade de água e umidade), microbiológicos (pesquisa de bactérias mesófilas, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Coliformes* a 35 e a 45 °C e contagem total de bolores e leveduras) e testes preliminares de estabilidade. O potencial antioxidante da formulação foi avaliado pela capacidade de captura dos radicais DPPH, hidroxila (OH•) e poder redutor férrico (FRAP). Análise histológica do tecido cutâneo oriundo da região dorsal (ratos Wistar) submetida a excisões foi realizada. Após 4, 7, 10 e 14 dias, os animais experimentais foram eutanasiados e as feridas cutâneas foram avaliadas quanto ao seu aspecto macroscópico e histológico. No final de cada período, foi avaliada a reepitelização, proliferação celular e a produção de colágeno. O hidrogel contendo LAS demonstrou estabilidade físico-química, atendeu aos parâmetros de qualidade microbiológica pré-estabelecidos e demonstrou potencial antioxidante, especialmente em relação à capacidade de eliminação de radicais hidroxilas. O hidrogel contendo LAS estimulou a reepitelização e proliferação celular em todos os dias de tratamento em relação ao hidrogel controle (sem LAS). O hidrogel contendo LAS estimulou o aumento das fibras de colágeno, sendo verificada diferença significativa das fibras colágenas tipo I nos dias 7, 10 e 14 e nas do tipo III, no sétimo e décimo dia. A lasiodiplodana apresentou atividade imunomoduladora na indução da cicatrização e o hidrogel contendo essa macromolécula pode ser uma alternativa no tratamento de feridas.

Palavras-chave: Bioatividade, exopolissacarídeo, cicatrização, macromoléculas.

ABSTRACT

NISSOLA, Candida. Hydrogel containing (1→6)- β -D-glucan (lasiodiplodan): development, characterization and evaluation of healing activity. 2019. 83f. Dissertation – Postgraduate Program in Biotechnology. Federal Technological University (UTFPR). Dois Vizinhos, 2019.

β -Glucans have attracted the interest of researchers and industries in the pharmaceutical and cosmetic sectors due to its biotechnological and functional properties. Among the β -glucans, lasiodiplodan (LAS) an exopolysaccharide (EPS) of the type (1→6)- β -D-glucan produced by the ascomycete *Lasiodiplodia theobromae* MMPI and recently described in scientific literature, has demonstrated different biological potentialities. The present study aimed to develop, characterize and evaluate the healing stimulant potential of a lasiodiplodan-containing hydrogel (0.5%). The developed formulation was evaluated for physicochemical (color, odor, pH, spreadability, viscosity, water activity and moisture) and microbiological parameters (research of mesophilic bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, Coliform at 35 and 45 ° C and total mold and yeast count) and preliminary stability tests. The antioxidant potential of the formulation was evaluated for its ability to scavenge DPPH and hydroxyl (OH•) radicals and ferric reducing power (FRAP). Histological analysis of cutaneous tissue from the dorsal region (Wistar rats) subjected to excisions was performed. After 4, 7, 10 and 14 days, the experimental animals were euthanized and the skin wounds were evaluated for macroscopic appearance and histological analysis. At the end of each analysis period, re-epithelialization, cell proliferation and collagen production were evaluated. The hydrogel containing LAS demonstrated physicochemical stability, microbiological quality and antioxidant potential, especially in relation to its ability to scavenge hydroxyl radicals. The LAS-containing hydrogel stimulated cell re-epithelialization and proliferation on all treatment days compared to the control hydrogel (without LAS). The hydrogel stimulated an increase of collagen fibers, with significant difference of type I collagen fibers on days 7, 10 and 14 and type III on the seventh and tenth day. Lasiodiplodan (1→6)- β -D-glucan showed immunomodulatory activity in wound healing and the hydrogel containing this macromolecule may be an alternative in wound care.

Keywords: Bioactivity, exopolysaccharide, healing, macromolecules.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação molecular da (1→6)-β-D-glucana (lasiodiplodana)	21
Figura 2 - Camadas estruturais da pele	24
Figura 3 - Aspecto visual da lasiodiplodana (A) e do gel contendo lasiodiplodana (B)	32
Figura 4 - Picnômetro de aço inoxidável	33
Figura 5 - Dispositivo para determinação da espalhabilidade	34
Figura 6 - Procedimento realizado para a confecção das feridas nos ratos, epilação (A), marcação da ferida (B), retirada de pele, formação da ferida (C), decalque das feridas (D).....	40
Figura 7 - Espalhabilidade das formulações de hidrogéis controle (-■-) e contendo lasiodiplodana (-■-) - Resultados expressos como média ± DP de triplicatas	47
Figura 8 - pH das formulações de hidrogel controle (-■-) e contendo lasiodiplodana (- ■-) durante o período de teste preliminar de estabilidade	49
Figura 9 - Viscosidade aparente das amostras de hidrogel (-■-) controle e (-■-) contendo lasiodiplodana. Resultados expressos como média ± DP de triplicatas	50
Figura 10 - Coordenadas de cor das amostras de hidrogel (-■-) controle e (-■-) contendo lasiodiplodana. Resultados expressos como média ± DP de triplicatas	52
Figura 11 - Fotografia da região dorsal do animal após confecção das feridas	56
Figura 12 - Comparação das áreas excisionais (A) após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com hidrogel contendo (1 →6)-β-D-glucana (lasiodiplodana). Tratamento com gel controle (■) e gel contendo lasiodiplodana (■) (n=6, *p<0,05). Imagens da região dorsal do animal (B) após excisões e respectivos dias de tratamento	58
Figura 13 - Contração das áreas excisionais após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com hidrogel contendo (1 →6)-β-D-glucana (lasiodiplodana). Tratamento com gel controle (■) e gel contendo lasiodiplodana (■)	59
Figura 14 - Fotomicrografia de corte histológico com coloração HE para medida da reepitelização da ferida excisional no dorso do rato, tratada com gel contendo lasiodiplodana por um período de 4 dias (ampliação de 10x). Destaque para: crosta (a), tecido de granulação (b), tecido integro (c). As setas indicam o início e o final da área reepitelizada em um dos lados da ferida	61
Figura 15 - Efeito do tratamento das feridas excisionais após 4, 7 e 10 dias com hidrogel contendo (1 →6)- β-D-glucana (lasiodiplodana). Tratamento com gel controle (■) e gel contendo lasiodiplodana (■)	62
Figura 16 - Fotomicrografias de cortes histológicos com coloração HE para medida da espessura da epiderme neoformada de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas com gel controle (A) e com gel contendo lasiodiplodana (B) aos 14 dias. As setas indicam o centro da ferida, com a epiderme completamente reestabelecida (ampliação de 10x).....	63
Figura 17 - Medida da espessura do epitélio após 14 dias de tratamento das feridas excisionais com hidrogel contendo (1 →6)-β-D-glucana (lasiodiplodana). Tratamento com gel controle (■) e gel contendo lasiodiplodana (■).....	63
Figura 18 – Fotomicrografia de corte histológico com coloração HE para a contagem de células em metáfase na epiderme da ferida excisional do dorso do rato	

(ampliação de 40x). Destaque para: crosta (a), tecido de granulação (b), tecido íntegro (c). As setas indicam as células em metáfase na camada basal da epiderme.

.....64

Figura 19 - Número de células em metáfase na extensão da epiderme após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com hidrogel contendo (1 →6)-β-D-glucana (lasiodiplodana). Tratamento com gel controle (■) e gel contendo lasiodiplodana (■)65

Figura 20 - Fotomicrografias de cortes histológicos com coloração Picrossírius para a quantificação de colágeno tipo I (verde) e tipo III (vermelho) da derme neoformada de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas com gel contendo lasiodiplodana, 4 dias (A) e 14 dias (B). (ampliação de 20x)67

Figura 21 - Comparação da área percentual de colágeno tipo I (A) e tipo III (B) após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com hidrogel contendo (1 →6)-β-D-glucana (lasiodiplodana). Tratamento com gel controle (■) e gel contendo lasiodiplodana (■)68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização físico-química e potencial antioxidante do hidrogel contendo lasiodiplodana.....	44
Tabela 2 - Parâmetros de cor do hidrogel contendo lasiodiplodana e amostra controle (hidrogel sem lasiodiplodana).....	54
Tabela 3 - Qualidade microbiológica do gel contendo lasiodiplodana.....	55
Tabela 4 - Índice de maturação do colágeno das feridas tratadas com gel controle (controle negativo) e com gel contendo lasiodiplodana.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
Aw	Atividade de água
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
CMC	Carboximetilcelulose
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EPS	Exopolissacarídeo
FRAP	Poder de Redução do Íon Férrico
HE	Coloração hematoxilina-eosina
ImaC	Índice de maturação do colágeno
LS	Lasiodiplodana
m/m	Massa/massa
mm	Milímetro
MMV	Meio Mínimo de Vogel
mPa.s	Milipascal segundo
OH•	Radical Hidroxila
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PMN	Células polimorfonucleares
q.s.p	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
UFC	Unidade de Formação de Colônias
v/v	Volume/volume
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 POLISSACARÍDEOS E EXOPOLISSACARÍDEOS	19
3.2 β -D-GLUCANAS E LASIODIPLDANA.....	20
3.3 BIOATIVIDADE DAS β -D-GLUCANAS E LASIODIPLDANA	22
3.4 PELE.....	24
3.5 FISILOGIA DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	26
3.6 HIDROGÉIS.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 MANUTENÇÃO DO MICRORGANISMO.....	30
4.2 PREPARO DO INÓCULO PARA A PRODUÇÃO DE LASIODIPLDANA.....	30
4.3 PRODUÇÃO DE LASIODIPLDANA EM CULTIVO SUBMERSO.....	31
4.4 FORMULAÇÃO DO HIDROGEL CONTENDO A LASIODIPLDANA.....	31
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DESENVOLVIDA.....	32
4.5.1 Análises Físico-químicas	32
4.5.2 Testes Preliminares de Estabilidade.....	35
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	37
4.6.1 Captura do radical DPPH.....	37
4.6.2 Atividade de sequestro do radical (OH•).....	37
4.6.3 Poder antioxidante redutor férrico (FRAP).....	38
4.7 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS	38
4.8 ANIMAIS	39
4.8.1 Confeção e Tratamento das Feridas Cutâneas.....	39
4.9 MEDIDA DA ÁREA DAS FERIDAS	40
4.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA	40
4.10.1 Análise da Reepitelização	41
4.10.2 Número de Metáfases Bloqueadas na Epiderme Neoformada.....	41
4.10.3 Análise das fibras colágenas	42
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS HIDROGÉIS.....	44
5.1.1 Avaliação da Espalhabilidade do Hidrogel.....	46
5.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR DOS HIDROGÉIS	47
5.2.1 Teste de Centrifugação e Estresse Térmico.....	47
5.2.2 Avaliação de pH, Viscosidade Aparente e Cor	48
5.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA	55
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE.....	55
6 CONCLUSÕES	71
REFERENCIAS.....	72
ANEXOS	82

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização é um processo fisiológico fundamental na manutenção da integridade do organismo frente a lesões acidentais, crônicas ou cirúrgicas. De acordo com Robbins e Cotran (2005) o processo de cicatrização de feridas é sistêmico, complexo e resulta de uma série de fenômenos desencadeados em resposta à injúria tecidual. Novas propostas têm surgido com o intuito de acelerar a cicatrização, minimizar os riscos, as complicações e melhorar a qualidade de vida do paciente, além de reduzir os custos despendidos com o tratamento (KORELO et al., 2013).

O desenvolvimento de novos produtos efetivos no tratamento de injúrias teciduais ou feridas tem sido objeto de estudos de grupos de pesquisas e de indústrias farmacêuticas em diferentes países. Neste contexto, novas substâncias e moléculas bioativas tem sido avaliadas como ingrediente de novas formulações.

Macromoléculas biológicas como as β -glucanas podem apresentar potencialidades como ingrediente ativo em formulações como hidrogéis ou cremes destinados ao tratamento de feridas, úlceras epiteliais e queimaduras, auxiliando no processo de cicatrização tecidual.

β -glucanas são macromoléculas constituídas por glicose e encontradas como constituinte estrutural da parede celular de fungos e de alguns cereais. Nas últimas décadas essas macromoléculas vem recebendo especial atenção em função de suas propriedades bioativas, principalmente no que se refere a atividade de imunomodulação. Caracterizadas como modificadoras da resposta biológica, o mecanismo de ação das β -glucanas na modulação inclui a ativação de macrófagos e linfócitos polimorfonucleares, além da indução da expressão de diversas citocinas (TONDOLO et al., 2017; WEI et al., 2002).

Medeiros e colaboradores (2012) verificaram o aumento da hiperplasia epitelial das células inflamatórias, angiogênese e proliferação fibroblástica em úlceras venosas humanas pela aplicação tópica da β -(1 \rightarrow 3)-D-glucana de *Sacharomyces cerevisiae*. No estudo realizado por Wei et al. (2002) foi demonstrado que a glucana estimulou a biossíntese de colágeno em cultivo de células fibroblásticas humanas.

Além da imunomodulação, inúmeras atividades biológicas têm sido relacionadas às β -glucanas, como atividade antitumoral, antiinflamatória, antioxidante, antimutagênica, hipocolesterolêmica e hipoglicêmica.

Recentemente foi reportada na literatura científica uma (1→6)- β -D-glucana produzida pelo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI (CUNHA et al., 2012) e denominada de lasiodiplodana. Avaliada por Túrmina et al. (2012) quanto ao seu efeito toxicológico em ratos albinos suíços (*Mus musculus*) alimentados por gavagem durante 28 dias, os autores relataram não haver sinais de toxicidade, alterações hematológicas ou histopatológicas em tecido renal, hepático e cardíaco, além de haver atividade hipoglicemiante em machos e redução de transaminases em machos e fêmeas.

Considerando alguns estudos descritos na literatura, os quais identificaram e destacam a importância das β -glucanas na indução da cicatrização, o presente estudo busca o desenvolvimento, a caracterização e avaliação da efetividade de um hidrogel contendo lasiodiplodana como ingrediente bioativo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar um hidrogel contendo (1→6)- β -D-glucana (lasiodiplodana).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir lasiodiplodana ((1→6)- β -D-glucana) em cultivo submerso com o fungo ascomiceto *L. theobromae* MMPI.
- Isolar e purificar o exopolissacarídeo.
- Formular o hidrogel contendo a lasiodiplodana.
- Caracterizar o hidrogel quanto a parâmetros físico-químicos e microbiológicos.
- Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* da formulação.
- Avaliar a atividade cicatrizante do hidrogel em ensaios *in vivo* usando ratos Wistar como modelo biológico.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 POLISSACARÍDEOS E EXOPOLISSACARÍDEOS

A grande maioria dos carboidratos encontrados na natureza estão na forma de polissacarídeos, com massa molecular variando de média a alta. Estes polímeros são formados a partir da condensação de mais de dez unidades monossacarídicas, através de ligações covalentes chamadas ligações glicosídicas (VOET et al., 2000). O que os difere uns dos outros é a natureza das unidades monossacarídicas (constituídos de um único ou de diversos tipos de unidades monoméricas); o comprimento das cadeias, o tipo de ligação entre os monossacarídeos e o grau de ramificação da macromolécula (NELSON; COX, 2011; MA et al., 2012).

Estas macromoléculas possuem diversas funções fisiológicas em plantas ou microrganismos, seja como forma de armazenamento de energia em plantas (amido e glicogênio) ou como agente estruturante da parede celular e da matriz extracelular (celulose, quitina e peptidoglicanos) (MEDINA-CÓRDOVA et al., 2018).

Um grande número de polissacarídeos tem sido estudado por apresentarem atividades biológicas, sendo alguns polissacarídeos considerados como modificadores da resposta biológica. A ação biológica provocada pelo polissacarídeo está diretamente relacionada com sua estrutura molecular, incluindo a composição monomérica, a ligação glicosídica da cadeia principal, o grau de ramificação, o grau de substituição e a conformação de sua estrutura primária (KAGIMURA et al., 2015b). Dentre as respostas biológicas que apresentam, estão incluídas atividade anti-inflamatória; antioxidante; anti-hipertensiva, antitumoral e hipoglicemiante, além de serem considerados imunoestimuladores e imunomoduladores. Além das potencialidades biológicas que essas macromoléculas demonstram, elas ainda apresentam baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais (ZHENG et al., 2017; MENG et al., 2017; BAI et al., 2017).

Os polissacarídeos de origem microbiana podem ser classificados em função de sua localização celular, como polissacarídeos citosólicos (fornecem recursos energéticos à célula), polissacarídeos de parede celular (peptidoglicanos e lipopolissacarídeos) e os polissacarídeos extracelulares também chamados exopolissacarídeos (EPS) (DONOT et al., 2012). Em cultivos submersos os EPS quando secretados para o meio, formam limos que são difundidos na fase líquida

provocando mudanças no meio de cultivo, alterando a viscosidade e a reologia. Microrganismos capazes de elevar a viscosidade do meio de cultivo possuem maior potencial para a produção de EPS, sendo a recuperação de EPS do meio de cultivo um processo relativamente simples (SILVA et al., 2006).

Microrganismos diferentes produzem exopolissacarídeos distintos, além disso é possível a produção de polissacarídeos com propriedades físico-químicas diferentes a partir de uma mesma cepa microbiana, através da manipulação da composição do meio de cultivo. Comumente o processo de produção microbiana depende da fonte de carbono e nitrogênio disponível no meio de cultivo e em geral a produção do EPS aumenta em condições em que há excesso de substrato (fonte de carbono) e uma maior relação carbono/nitrogênio (CZACZYK; MYSZKA, 2007).

Os poucos relatos encontrados nesse contexto, indicam ser possível modificar o grau de substituição da unidade monossacarídica principal, bem como o grau de polimerização desta, porém, não é possível alterar a composição da macromolécula em relação a sua unidade monomérica estrutural base (SILVA et al., 2006). Estudos *in vitro* sugerem que a atividade biológica está ligada a massa molecular do biopolímero, sendo que β -glucanas de baixo peso molecular de cadeia muito curta são geralmente consideradas biologicamente inativas (AKRAMIENÉ et al., 2007).

As principais fontes de carbono na produção biotecnológica de EPS são a glicose e a sacarose, porém, algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, para uma possível produção industrial com custos reduzidos, incluindo o uso de substratos alternativos de baixo custo gerados como subprodutos de processos agroindustriais (DAMASCENO et al., 2003; THEIS et al., 2019).

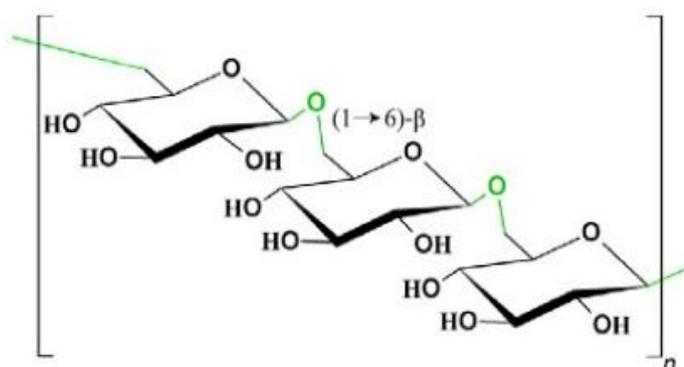
3.2 β -D-GLUCANAS E LASIODIPLODANA

β -D-glucanas são polímeros de glicose encontrados como constituintes estruturantes da parede celular de cereais como aveia e cevada, além de microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. São constituintes da parede celular de certos microrganismos patógenos, tais como *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, e também de fungos unicelulares como da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus neoformans* (LIU et al., 2012).

As β -glucanas provenientes de fontes diferentes apresentam algumas variações quanto a sua estrutura química. Pertencem a um grupo heterogêneo de polímeros de glicose (LIU et al., 2009). Todas são formadas por uma cadeia linear composta de unidades D-glucose unidas entre si através de ligações beta (β) glicosídicas, contendo ou não ramificações (BARROS-FILHO et al., 2010). Comumente, as ligações glicosídicas são do tipo (1 \rightarrow 3), mas também podem ser do tipo (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6), (1 \rightarrow 6) e (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 4). Tais diferenças estruturais podem ter grandes implicações na bioatividade das β -glucanas, principalmente com relação a massa molecular, pois β -glucanas de cadeia muito curta são consideradas inativas (AKRAMIENĖ et al., 2007).

Descrita recentemente na literatura, a lasiodiplodana é uma (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana (Figura 1) produzida extracelularmente pelo fungo ascomiceto *Lasiodiplodia theobromae* MMPI (VASCONCELOS et al. 2008, CUNHA et al. 2012). As (1 \rightarrow 6)- β -D-glucanas são comumente encontradas como compostos insolúveis da parede celular de ascomicetos e basidiomicetos (LESAGE; BUSSEY, 2006). O isolamento destas é complicado e envolve múltiplas etapas de extração com hexano (remoção de lipídios), seguida por extração com água quente e fria e com álcali (CORRADI DA SILVA et al. 2008). No entanto, a lasiodiplodana produzida pelo *L. theobromae* MMPI é secretada no meio de cultivo em cultura submersa e é facilmente precipitada com etanol, sendo seu isolamento mais simples e econômico do que a extração da parede celular de fungos.

Figura 1 - Representação molecular da (1 \rightarrow 6)- β -D-glucana (lasiodiplodana)



Fonte: Cunha et al. (2017).

3.3 BIOATIVIDADE DAS β -D-GLUCANAS E LASIODIPILODANA

A atividade biológica do grupo das biomoléculas β -D-glucanas é influenciada por diferentes parâmetros físico-químicos, tais como solubilidade, massa molecular, estrutura molecular e ramificações. Esta diversidade resulta em inúmeras propriedades, possibilitando uma ampla gama de aplicações em alimentos, nos setores comerciais biomédicos, farmacêuticos e cosméticos (KAGIMURA et al., 2015a).

β -D-glucanas são conhecidas por sua capacidade imunomoduladora (ZHOU et al., 2013, CHENG et al., 2013; LEI et al., 2015), sendo inofensivas ao organismo e auxiliando na adaptação ao ambiente frente aos estresses biológicos (CHEN et al., 2009). A literatura demonstra que as respostas imunitárias específicas e não específicas de mamíferos são estimuladas pelas β -glucanas através de mecanismos de ação que incluem a ativação de macrófagos, neutrófilos e aumento da fagocitose (ZHOU et al., 2013). O mecanismo pelo qual as β -glucanas exercem o efeito imunomodulador é mediado por citocinas, através da estimulação, principalmente, do receptor Dectina-1, receptores Toll-like (TLR-2, 4, 6), receptor 3 do complemento (CR3). O mais importante é o receptor de Dectina-1, que é altamente expresso em muitas células imunocompetentes, como células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, monócitos, vários linfócitos T e também em células cutâneas (queratinócitos e fibroblastos) (MAJTAN; JESENAK, 2018).

Um fator importante, que provavelmente contribui para a atividade biológica das β -glucanas sobre a imunidade de vertebrados, é o longo período de tempo que permanece em tais organismos, em função da ausência nestes de β -glucanases (KAGIMURA et al., 2015a). Os macrófagos representam o que é provavelmente a única ferramenta para a degradação das β -glucanas no organismo e como consequência as β -glucanas estão disponíveis para as células por semanas ou até meses, até serem degradadas via lentos processos oxidativos (NOVAK et al., 2012).

Medeiros et al. (2012), verificaram o aumento da hiperplasia epitelial, das células inflamatórias, angiogênese e proliferação fibroblástica em úlceras venosas humanas pela aplicação tópica da β -(1 \rightarrow 3)-glucana. Em outra avaliação, Wei et al. (2002) demonstraram que a glucana estimulou a biossíntese de colágeno em células fibroblásticas humanas cultivadas. Além da imunomodulação, inúmeras atividades biológicas têm sido relacionadas às β -glucanas como atividade antitumoral,

antinflamatória, antioxidante, antimutagênica, hipocolesterolêmica e hipoglicêmica (OLIVEIRA et al., 2015; TONDOLO et al., 2017; MAITY et al., 2017; MELLO et al.; 2017; Malfatti et al., 2017).

Alguns polissacarídeos com atividade biológica como as β -glucanas, têm apresentado atividade positiva sobre a prevenção e tratamento no crescimento de células cancerosas (ANDOLFI et al., 2014). Alguns estudos que avaliaram a bioatividade de diferentes β -glucanas demonstram resultados efetivos na antiproliferação de células cancerígenas em ensaios *in vitro* (SARANGI et al., 2006, KAGIMURA et al., 2015a).

A literatura reporta inúmeras pesquisas em relação a atividade antioxidante das β -Glucanas. Um grupo de pesquisa da Sérvia (USKOKOVIĆ et al., 2013) verificaram que a administração de um extrato comercial de cereal com alta quantidade de β -glucana em ratos preveniu o diabetes relacionado com a peroxidação lipídica. Nandi et al. (2014), verificaram potencial antioxidante de β -Glucana produzida pelo fungo *Russula albonigra*, através dos ensaios *in vitro* do radical hidroxila, radical superóxido, poder de redução do íon férrico e pelo ensaio com β -caroteno.

Recentemente, Kagimura e colaboradores (2015b) observaram que a lasiodiplodana ((1 \rightarrow 6)- β -D-glucana) produzida pelo ascomiceto *L. theobromae* MMPI apresenta atividade antioxidante, a qual foi avaliada pelos métodos ABTS⁺, DPPH e poder redutor do íon férrico (FRAP). No referido trabalho foi verificado também que a modificação química da glucana por carboximetilação contribuiu para o aumento do potencial antioxidante da macromolécula e sua solubilidade em água. Em estudo conduzido por Theis e colaboradores (2019), também avaliaram a derivatização por carboximetilação da lasiodiplodana e verificaram que a introdução de grupos carboximetílicos na macromolécula promoveu aumento da solubilidade e potencializou a atividade antioxidante. Neste estudo também foi verificado que a lasiodiplodana nativa e derivada mantiveram estabilidade térmica até 210 °C.

No trabalho de Mello et al. (2017), foi investigado os efeitos genotóxicos da lasiodiplodana e sua atividade protetora contra danos do DNA, induzido pela doxorrubicina, seu impacto na expressão de genes e vias de resposta inflamatória, sendo que a mesma não induziu distúrbios na estabilidade do DNA e reduziu significativamente o dano e a inflamação causada por exposição ao quimioterápico.

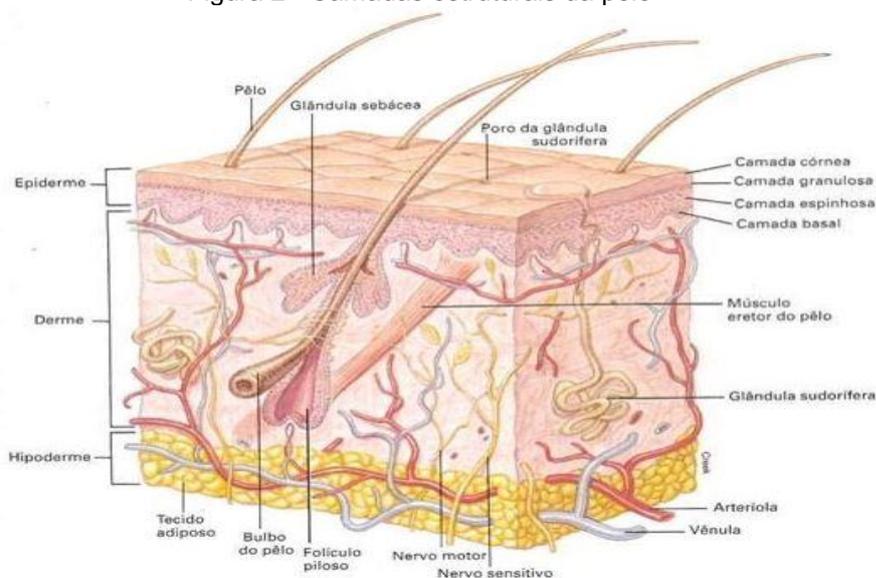
Túrmina et al. (2012), avaliaram os efeitos da lasiodiplodana em ratos albinos suíços (*Mus musculus*) alimentados por gavagem durante 28 dias. Os autores

relataram não haver sinais de toxicidade, alterações hematológicas ou histopatológicas (rins, baço, fígado e coração), além de haver atividade hipoglicemiante em machos e redução de transaminases em machos e fêmeas. Cunha et al. (2012), demonstraram atividade antiproliferativa dose dependente da lasiodiplodana frente a células de câncer de mama (MCF-7) em ensaios *in vitro*. Vasconcelos et al., (2013) avaliaram a atividade anticoagulante de lasiodiplodana oriunda de *Lasiodiplodia theobromae* (MMLR) após sulfonação, demonstrando que, a derivatização da molécula resultou em atividade anticoagulante. A utilização tópica de lasiodiplodana ainda não foi avaliada, sendo um estudo inédito neste âmbito.

3.4 PELE

A pele recobre a superfície do corpo, sendo considerada um dos maiores órgãos, alcançando cerca de 16% do peso corporal. Apresenta-se como uma barreira protetora contra o ambiente externo e micro-organismos, além de regular a temperatura corporal e evitar perda de água. A pele é constituída por uma porção de origem ectodérmica, epitelial e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme (Figura 2). A principal célula componente da epiderme é o queratinócitos e da derme, o fibroblasto. Abaixo da derme encontra-se a hipoderme, que não pertence à pele, mas atua como suporte para ela (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 2 - Camadas estruturais da pele



Fonte: <https://files.passeidireto.com/a419afe0-25ad-4b92-924b-d62f4a18bfb3/bg1.png>

Acessado em 20/08/2019.

Além dos queratinócitos, a epiderme apresenta também os melanócitos (formadores de pigmentos que protegem da luz ultravioleta), células de Langerhans (apresentadoras de antígenos) e células de Merkel (sensoriais) (YOUNG et al., 2007).

A epiderme pode ser dividida em estratos ou camadas: córnea, granulosa, espinhosa e basal. O estrato córneo é o mais externo, formada por células cornificadas (queratinizadas), anucleadas e morta, sua espessura pode variar de acordo com a localização. A camada granulosa encontra-se abaixo da camada córnea e é formada por três ou quatro camadas de células achatadas (OVALLE; NAHIRNEY, 2008). A camada espinhosa possui várias camadas de células, com formato poligonal e vão se tornando mais achatadas quando avançam em direção à superfície. Nela há presença de desmossomos ou mácula de adesão, que permitem a junção intercelular e confere resistência mecânica à pele. A presença dos desmossomos possibilita a ligação entre as células basais e entre os queratinócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O estrato basal ou germinativo é o mais profundo, possuindo uma única camada de células que se acomoda sobre uma membrana basal. Nesse estrato há presença de células-tronco com intensa atividade mitótica dos queratinócitos, que propiciam a renovação celular da epiderme (OVALLE; NAHIRNEY, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008).

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo que se estende da epiderme até o tecido subcutâneo ou hipoderme, é onde a epiderme está apoiada. Pode apresentar espessura variável, de acordo com sua localização. Este tecido é composto por fibras elásticas e colágenas, responsáveis pela elasticidade e tonicidade da pele, além de vasos sanguíneos e terminações nervosas. A derme é constituída de duas camadas: papilar (superficial) e reticular (profunda) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A camada papilar é estreita, constituída de tecido conjuntivo frouxo, apresenta fibras colágenas delicadas, entrelaçadas com fibras delgadas do sistema elástico. Abaixo da camada papilar, encontra-se a camada reticular, a qual constitui a maior parte da derme, possui fibras colágenas e elásticas mais densas que na papilar. Contém vasos sanguíneos, nervos e anexos cutâneos (YOUNG et al., 2007). É composta de vasos linfáticos e sanguíneos, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O colágeno é a proteína mais abundante nos seres humanos e o principal componente da pele, constituindo 80% do peso seco da derme e é responsável pela

sua estrutura e resistência. Na matriz dérmica há essencialmente dois tipos de colágeno: tipo I e tipo III, correspondendo respectivamente a cerca de 80-85% e 15-20% do total desta proteína. O tipo I apresenta diâmetro total de 1 a 20 μm e está localizado principalmente na derme reticular, a mais profunda da pele. O colágeno tipo III apresenta diâmetro de 0,5 a 2 μm e está presente, em sua maioria, na derme papilar, localizada mais superficialmente (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ISAAC et al., 2010).

3.5 FISILOGIA DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

A capacidade auto regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos. O reparo completo de tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas (SINGER; CLARK, 1999).

A cicatrização é um processo dinâmico e complexo, envolvendo interações entre a matriz extracelular, mecanismos celulares e moleculares. Desencadeia proliferação celular, modelação do coágulo sanguíneo, deposição e remodelamento de matriz extracelular, migração e/ou diferenciação celular, formação de novos vasos sanguíneos, e apoptose celular na fase final em células que desempenharam o seu papel nas fases iniciais (DAUER et al., 2005).

Os eventos da cicatrização iniciam-se imediatamente após o dano, e são divididos em três principais fases, sendo elas: inflamatória, proliferativa e de remodelamento. Estas etapas são essenciais para evitar uma contaminação da ferida por microrganismos, além do restabelecimento da integridade do tecido lesado (SINGER; CLARK, 1999).

A fase inflamatória ocorre assim que o tecido é lesionado, resultando em inchaço, rubor, calor e dor, com duração de aproximadamente 24 a 48 h após a lesão (MACKAY; MILLER, 2003). No início do processo cicatricial ocorre rapidamente um extravasamento de sangue e a formação de um coágulo de fibrina formado através da ativação das plaquetas. O coágulo de fibrina passa a ser um suporte para a sustentação das células que irão se infiltrar na ferida e é importante para restabelecer a homeostase. Tanto o tecido lesado quanto o coágulo passam a estimular a liberação de fatores de crescimento e citocinas pré-inflamatórias, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β). O TGF- β facilita o aparecimento de células polimorfonucleares (PMN) através dos

vasos sanguíneos. Logo, o tecido lesado fica cheio de células inflamatórias como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos (PARK et al., 2011).

A segunda fase, proliferativa, compreende a angiogênese, formação do tecido de granulação, início da deposição de colágeno (tecido conjuntivo vascularizado), reepitelização (recobrimento da ferida por um novo epitélio) e contração da ferida (SINGER; CLARK, 1999; YOUNG; McNAUGHT, 2011). A hipóxia presente inicialmente no processo de cicatrização é importante para facilitar a reepitelização e estimular a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) juntamente com outras citocinas, induzindo a neovascularização do local (YOUNG; McNAUGHT, 2011). Estes estímulos locais levam a migração e proliferação de células endoteliais como os queratinócitos presentes nas bordas da ferida. A migração celular ao centro da ferida ocorre com o intuito de recobrir a matriz provisória (SANTORO; GAUDINO, 2005) em função do gradiente quimiotático. A fase proliferativa ocorre de 2 a 10 dias após a lesão (GURTNER et al., 2008).

Por volta do décimo dia a ferida encontra-se toda preenchida pelo tecido de granulação, neovascularizada e na presença de fibras colágenas, iniciando-se a última fase do processo cicatricial, o remodelamento. Nesta fase, o tecido continua a ser enrijecido por mais fibras colágenas obtendo aparência de cicatriz (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005), podendo durar anos. O colágeno é responsável pela resistência e integridade do tecido e dos novos vasos dependendo do tipo e quantidade das fibras formadas (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998).

As fases do processo de cicatrização devem ocorrer a partir de uma sequência e tempo de duração. No entanto, o tempo destas fases pode ser aumentado quando se tem uma cicatrização de feridas deficiente ou uma falha. Estas falhas na cicatrização podem gerar feridas crônicas com atraso em uma das fases do processo cicatricial. Muitos são os fatores envolvidos em uma cicatrização prejudicada como a idade, genética, tabagismo, álcool, estado nutricional, obesidade, infecção do tecido, medicamentos, hipóxia, excesso ou deficiência de citocinas inflamatórias e imunossupressão (GUO; DIPIETRO, 2010; YOUNG; McNAUGHT, 2011).

3.6 HIDROGÉIS

Os hidrogéis são polímeros naturais ou sintéticos, que absorvem água dilatando seus retículos poliméricos formados por ligações cruzadas entre um ou mais

monômeros ou pela associação de ligações como a interação de hidrogênio e fortes interações de Van der Waals entre as cadeias (SILVA; FIGUEIREDO; MEIRELES, 2007; TOLEDO et al., 2015).

São formas farmacêuticas semissólidas de um ou mais princípios ativos que contém um agente gelificante para fornecer viscosidade a um sistema no qual partículas de dimensões coloidais, tipicamente entre 1 nm e 1 μ m, são distribuídas uniformemente (BRASIL, 2010).

A interação do hidrogel com uma ferida varia de acordo com o estado da hidratação do tecido e do curativo, os hidrogéis podem adsorver ou doar água para o leito da ferida. São curativos permeáveis ao vapor de água e oxigênio, mas não à água na forma líquida. São compostos por agente gelificante/espessante (polímero), umectante (glicerina, propilenoglicol), conservante (metilparabeno, propilbparabeno, imidiazolidinil uréia, etc) e alguns deles apresentam componentes aditivos (MEDEIROS; OLIVEIRA; GRANJEIRO, 2009).

A busca de novas tecnologias e de métodos não invasivos para a correção das alterações cutâneas relacionadas a feridas e curativos é tendência cada vez mais expressiva (JONG-SEOK et al. 2018). A carboximetilcelulose (CMC) é um polímero utilizado no tratamento de feridas na forma de hidrogel (RODRIGUES et al. 2013). Tais preparações são classificadas como curativos primários, apresentando excelência para hidratação e manutenção de um ambiente úmido na ferida. Os hidrogéis possuem a propriedade de absorver, desencrostar e desbridar o tecido necrótico e fibrótico (SILVA; FIGUEIREDO; MEIRELES, 2007). CMC é um derivado éter semissintético da celulose, solúvel em água, em que átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila são substituídos por carboximetil; é um polímero biocompatível e biodegradável que forma hidrogéis e tem alta capacidade de captação de água (RAKHSIAEI; NAMASI, 2017).

Diferentes princípios ativos podem ser veiculados em hidrogéis para estimular a cicatrização de feridas, bem como o próprio hidrogel por sua capacidade de proteção das terminações nervosas, diminuindo a sensação de dor nos paciente (RODRIGUES et al., 2013). Mais recentemente, β -glucanas tem sido estudadas como princípio ativo em formulações de hidrogéis. Medeiros et al. (2012) relataram que a aplicação tópica de hidrogel a base de carboximetilcelulose contendo β -(1 \rightarrow 3)-glucana proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*, estimulou a cicatrização de úlceras venosas em estudo clínico.

A aplicação tópica de β -glucanas se mostra promissora devido as propriedades pluripotentes das glucanas em estimular macrófagos e granulação tecidual, a estimulação e deposição de colágeno e reepitelização, favorecendo a cicatrização (MAJTAN; JESENAK, 2018). Diferentes formulações tem sido propostas, porém a forma farmacêutica gel, tem sido a mais relatada na literatura.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no laboratório de Biotecnologia e Bioprocessos da UTFPR, Campus Pato Branco onde foi produzido o exopolissacarídeo (EPS) lasiodiplodana ((1→6)-β-D-glucana) em cultivos submersos, e formulado um hidrogel contendo este EPS, como proposta de um produto cicatrizante. O hidrogel foi caracterizado quanto a parâmetros físico-químicos, microbiológicos, atividade antioxidante e potencial cicatrizante. A etapa de avaliação da indução de cicatrização foi realizada no laboratório de histologia e embriologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM) em parceria com o grupo de pesquisa da professora Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello. Como modelo biológico na etapa de avaliação do processo de cicatrização foram empregados ratos Wistar machos. O projeto foi protocolado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM) sob nº 6010040418 (ID 001688) com responsabilidade da professora Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Histotécnica Animal (Bloco H-79 UEM) e Palafito, Laboratório de Experimentação de Toxicologia Animal (Bloco T22 UEM).

4.1 MANUTENÇÃO DO MICRORGANISMO

No presente trabalho foi utilizado o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI para a produção da lasiodiplodana. O fungo foi mantido em meio ágar Sabouraud com cloranfenicol sob refrigeração a 4 °C, sendo feito repiques periódicos do micélio fúngico para tubos de ensaio contendo meio ágar Sabouraud novo.

4.2 PREPARO DO INÓCULO PARA A PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA

Para o preparo do inóculo, inicialmente o micélio fúngico foi transferido para placas de Petri contendo meio Agar Sabouraud com cloranfenicol. As placas inoculadas com o micélio foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C por 72 horas. O micélio crescido na superfície das placas foi transferido para frascos

Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio mínimo de Vogel (MMV) (VOGEL, 1954) e glicose (5 g/L) e cultivado por 48 horas a 28 °C sob agitação (150 rpm). Esta pré-cultura foi centrifugada para a recuperação do micélio, o qual foi suspenso em solução fisiológica esterilizada e triturado em mixer para obtenção de uma suspensão celular com absorvância entre 0,4 e 0,5 em 400 nm (KAGIMURA et al., 2015b).

4.3 PRODUÇÃO DE LASIODIPLODANA EM CULTIVO SUBMERSO

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL em incubadora orbital (shaker) a 28 °C, 150 rpm por 72 horas. Como meio de cultivo foi empregado meio mínimo de Vogel (MMV) (VOGEL, 1954) e glicose (20 g/L) como fonte de carbono. O pH do meio foi ajustado para 5,5, o volume de inóculo padronizado foi de 10 mL e o volume de trabalho foi de 100 mL (KAGIMURA et al., 2015b).

Ao final do processo o caldo fermentado foi separado da biomassa por centrifugação (1500 x g por 30 min.). Posteriormente, foi adicionado etanol absoluto (3 volumes) ao caldo para precipitar o exopolissacarídeo (EPS) *overnight* a 4 °C (CUNHA et al., 2012). O precipitado foi então separado por filtração e na sequência solubilizado em água destilada sob agitação e aquecimento (60 °C). A solução obtida foi submetida à intensa diálise contra água destilada (5 dias) usando tubos de diálise com diâmetros de poro de aproximadamente 12 Kda (\cong 12,000 Da, 1.3 in. width, MWCO 11,331 Sigma-Aldrich).

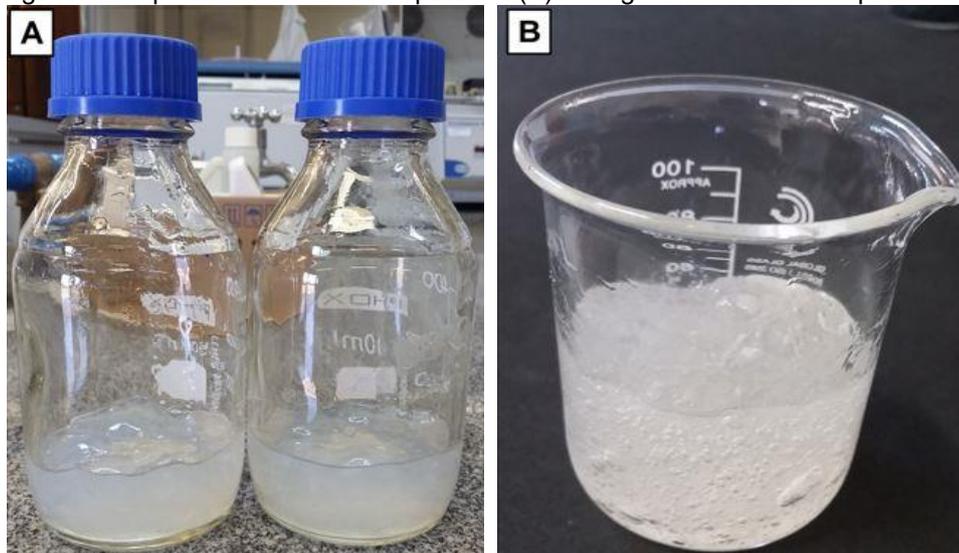
A solução de lasiodiplodana obtida foi concentrada por processo de congelamento a -18 °C (congelador) e descongelamento a 5 °C (geladeira) com eliminação de água de sinérese, e na sequência esterilizada a 121°C por 20 minutos em autoclave e então empregada na formulação do hidrogel.

4.4 FORMULAÇÃO DO HIDROGEL CONTENDO A LASIODIPLODANA

Na formulação do hidrogel foi utilizado carboximetilcelulose (CMC) sódica como agente espessante, considerando este ser um polímero hidrofílico, atóxico, biocompatível e biodegradável (XIAO; GAO, 2008). O hidrogel contendo lasiodiplodana foi formulado conforme descrito por Ferreira (2010), contendo carboximetilcelulose sódica 2% (m/m), metilparabeno 0,15% (m/m), glicerina 10%

(m/m), lasiodiplodana 0,5% (m/m) e água destilada (q. s. p.). Como controle negativo, foi formulado o mesmo hidrogel sem a lasiodiplodana (gel controle) (Figura 3).

Figura 3 - Aspecto visual da lasiodiplodana (A) e do gel contendo lasiodiplodana (B)



Fonte: Autoria própria (2019).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO DESENVOLVIDA

O hidrogel contendo a lasiodiplodana foi caracterizado quanto aos parâmetros físico-químicos (pH, umidade, atividade de H₂O, densidade, espalhabilidade, viscosidade e cor). Análises para verificação preliminar da estabilidade (teste de centrifugação, estresse térmico e ciclos alternados de aquecimento e resfriamento) (LIMA et al., 2008, BRASIL, 2004) e qualidade microbiológica (BRASIL, 2010) do hidrogel também foram procedidas. Os mesmos testes foram viabilizados para o hidrogel controle (sem a lasiodiplodana), realizados em triplicata.

4.5.1 Análises Físico-químicas

4.5.1.1 Avaliação do pH

A verificação do pH das amostras foi realizada pela medida direta em pHmetro. Amostras foram preparadas pela diluição dos hidrogéis (10 g/100 mL) em água destilada e um pHmetro, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,00 e pH 7,00, foi utilizado para as medidas. Os resultados foram analisados em triplicata, segundo método número 981.12 descrito pela AOAC (1997).

4.5.1.2 Umidade e atividade de água

A umidade foi determinada por gravimetria após secagem da amostra (5g) em estufa a 105 °C até massa constante (BRASIL, 2010). A análise de atividade de água (Aw) foi realizada em analisador de Aw LabMaster Standart (NOVASINA, USA). O equipamento foi previamente calibrado e as amostras do hidrogel foram adicionadas na câmara de detecção para a realização da leitura, seguindo protocolo do fabricante do equipamento.

4.5.1.3 Densidade relativa

A densidade foi determinada através do método número 4.4 descrito pela AOAC (1984) em temperatura pré-estabelecida (20 °C), utilizando-se picnômetros de aço inoxidável 25 mL de capacidade (Figura 4), previamente calibrados com água destilada na mesma temperatura.

Figura 4 - Picnômetro de aço inoxidável

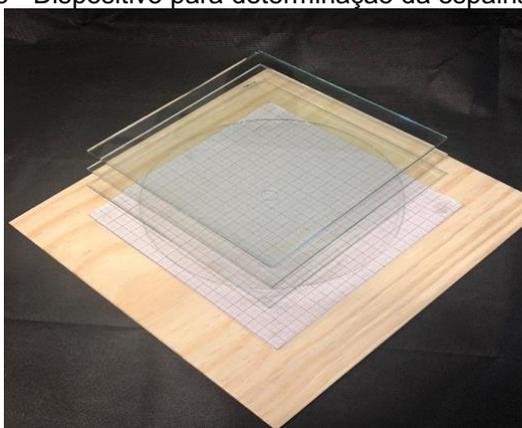


Fonte: Autoria própria (2019).

4.5.1.4 Espalhabilidade

Para a avaliação da espalhabilidade do hidrogel foi utilizado o método de placas paralelas (Figura 5).

Figura 5 - Dispositivo para determinação da espalhabilidade



Fonte: A autoria própria (2019).

Uma placa-molde circular de vidro com orifício central de 1,2 cm de diâmetro foi colocada sobre uma placa suporte de vidro, a qual estava posicionada sobre papel milimetrado. A amostra foi introduzida no orifício da placa molde e nivelada com auxílio de espátula. A placa móvel foi retirada, e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de massa conhecida. Após, um minuto de pressão foi realizada a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra em posições opostas, com auxílio do papel milimetrado (posicionado abaixo da placa suporte) e de um paquímetro (precisão 0,05 mm), e então calculado o diâmetro médio (Equação 1). Este procedimento foi repetido acrescentando-se as placas de vidro com os pesos pré-determinados em intervalos de um minuto de uma placa para outra (KNORST, 1991).

$$Ei = \frac{d^2 \cdot \pi}{4} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

Ei: espalhabilidade da amostra para um determinado peso em milímetros quadrados (mm²); d: diâmetro médio em milímetro (mm).

4.5.1.5 Viscosidade

A Viscosidade aparente das amostras foi determinada utilizando um Analisador Rápido de Viscosidade (Rapid Viscosity Analyser, RVA, Newport Scientific Pty. Ltd., Warriewood, Austrália), seguindo protocolo n° 162 da IACST (1995).

Amostra (5g) em temperatura ambiente (25 °C ±2 °C) foi cisalhada a 960rpm durante 10s.

4.5.1.6 Análise de cor

As características de cor das amostras foram analisadas através das coordenadas cromáticas L*, a*, b* do espaço CIELAB e das coordenadas cilíndricas h° (ângulo Hue: ângulo de tonalidade) e C* (croma). As análises foram realizadas em colorímetro digital CR-410 (Konica Minolta, Japan). No espaço de cor CIE- L*a*b*, a coordenada L* (luminosidade) varia de 0 (preto) a 100 (branco) (grau de brancura, 0 < L* <100, brilho), as coordenadas de cromaticidade a* e b*, variam de -a* (verde) a +a* (vermelho), e de -b* (azul) a +b* (amarelo).

O ângulo de tonalidade h que inicia no eixo +a* e é expresso em graus: 0° corresponde ao +a* (vermelho), 90° corresponde ao +b* (amarelo), 180° corresponde ao -a* (verde), e 270° corresponde ao -b* (azul) (Almeida et al., 1995). O valor de croma C* é 0 no centro e aumenta conforme a distância deste.

A equação 2 foi empregada para determinar a variação de cor entre a amostra de hidrogel contendo lasiodiplodana e o hidrogel controle.

$$\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2} \quad \text{(Equação 2)}$$

Sendo, ΔE a diferença total de cor entre as amostras; ΔL* a diferença de luminosidade, Δa* a diferença em vermelho e verde (+ = mais vermelho, - = mais verde) e Δb* = diferença em amarelo e azul (+ = mais amarelo, - = mais azul).

Foram analisadas amostras dos hidrogéis (com e sem lasiodiplodana) logo após sua formulação e embalagem e após submissão a ciclos de congelamento (24 h) e descongelamento (24 h).

4.5.2 Testes Preliminares de Estabilidade

O estudo de estabilidade permite avaliar a qualidade geral das formulações desenvolvidas. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2004) estabilidade preliminar é um estudo de triagem para orientar na escolha da

formulação, onde são empregadas condições extremas de temperatura com objetivo de acelerar possíveis reações. As formulações desenvolvidas foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade: teste de centrifugação, estresse térmico e ciclos alternados de resfriamento e aquecimento (gelo-degelo), com avaliação do pH, viscosidade e cor (LIMA et al., 2008).

4.5.2.1 Teste de centrifugação

Uma quantidade de 10g da formulação foi centrifugada à 20 °C em tubos falcon graduado. Foram empregados ciclos de 1000, 2500 e 3500 rpm (70, 440 e 863g respectivamente) durante 15 minutos em cada ciclo (LIMA et al., 2008). Após os ciclos de centrifugação foi avaliada a possibilidade de precipitação, separação de fases, formação de *caking* e coalescência da formulação. O produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. Se aprovado nesse teste, pode ser submetido aos testes de estabilidade (BRASIL, 2004).

4.5.2.2 Teste do estresse térmico

Foram pesados aproximadamente 5 g de amostra em tubos de ensaio, os quais foram submetidos ao estresse térmico em banho-maria termostatizado, em temperaturas entre 40 e 80 °C. O aquecimento foi progressivo com elevação de 10 °C a cada 30 minutos. No final do ensaio a amostra permaneceu a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) até equilíbrio térmico e foi avaliada macroscopicamente a estabilidade (BABY et al., 2008).

4.5.2.3 Ciclos alternados de aquecimento e resfriamento

Após a condução dos ensaios de centrifugação e estresse térmico, as amostras foram submetidas a ciclos alternados (total de 6 ciclos) de resfriamento e aquecimento.

Cada ciclo correspondeu a manutenção da amostra durante 24 horas em temperaturas de 45 ± 2 °C em estufa bacteriológica e 24 horas a -5 ± 2 °C em freezer (BRASIL, 2004).

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante da formulação foi avaliada através da determinação de atividade de captura do radical DPPH, atividade de sequestro do radical hidroxila (OH•) e poder antioxidante redutor férrico (FRAP).

4.6.1 Captura do Radical DPPH

O potencial de captura do radical DPPH foi analisado seguindo metodologia descrita por LOCATELLI et al., (2009), com adaptações. Em tubo de ensaio foram misturados 500 µL da amostra ($A_{amostra}$) nas concentrações de 0,10, 0,18 ou 0,26 mgmL⁻¹, 3 mL de etanol P.A e 300 µL de solução etanólica de DPPH (0,5 mmol L⁻¹). As leituras espectrofotométricas foram obtidas em 517 nm após 80 minutos de reação. O aparelho foi zerado com solução etanólica 80% e como controle ($A_{controle}$) foi utilizado a mesma mistura reacional apenas sendo substituído o volume da amostra por igual volume de solução etanólica 80%. A porcentagem de atividade de captura do radical hidroxila foi estimada segundo equação 3.

$$\%AA = 100 - \frac{(A_{amostra} \times 100)}{A_{controle}} \quad (\text{Equação 3})$$

4.6.2 Atividade de Sequestro do Radical (OH•)

A atividade de sequestro do radical hidroxila (HO•) foi analisada seguindo procedimento de Liu et al. (2010) com modificações. Os radicais hidroxila foram gerados a partir de FeSO₄ e H₂O₂ e detectados pela capacidade de hidroxilar o salicilato. A mistura reacional (2 mL) continha 0,5 mL de FeSO₄ (1,5 mmol.L⁻¹), 0,35 mL de H₂O₂ (6 mmol.L⁻¹), 0,15 mL de salicilato de sódio (20 mmol.L⁻¹) e 1 mL das diferentes concentrações de massa seca do hidrogel contendo a lasiodiplodana. Ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. Após incubação por 1 hora a 37 °C, a absorbância do complexo salicilato-hidroxilado foi medido em espectrofotômetro a 562 nm. A porcentagem de remoção será calculada de acordo com a equação 4.

$$\% \text{ de Remoção de HO} \bullet = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100\% \quad (\text{Equação 4})$$

Onde, A_1 representa a absorvância da amostra ou do ácido ascórbico. A_0 a absorvância do controle e A_2 a absorvância do branco sem salicilato de sódio.

4.6.3 Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP)

O poder redutor da amostra foi avaliado pela capacidade de redução do complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina férrico ($[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$), seguindo metodologia descrita por Wang et al. (2013). Este ensaio baseia-se na redução do complexo ($[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$) para o complexo ferroso de cor azul intensa ($[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$) em meio ácido, por ação de compostos antioxidantes. O reagente FRAP será preparado pela mistura de 25 mL de tampão acetato (0,3M); 2,5 mL de solução TPTZ (10 mM) e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico (20 mM).

O reagente foi preparado e utilizado imediatamente. Para a análise, 90 μL da amostra (nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, 2000 $\mu\text{g/mL}$, 5000 $\mu\text{g/mL}$, 10000 $\mu\text{g/mL}$ e 15000 $\mu\text{g/mL}$, em massa de hidrogel correspondente) foram adicionados em tubo de ensaio, juntamente com 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Os tubos foram agitados e incubados a 37°C por 30 minutos. As leituras foram realizadas a 595 nm, utilizando-se o reagente FRAP como branco. Como curva de calibração foi utilizado sulfato ferroso nas concentrações 100 μM , 500 μM , 1000 μM , 1500 μM e 2000 μM , e os resultados expressos em μM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

4.7 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

Os ensaios para a avaliação da qualidade microbiológica do hidrogel seguiram protocolos analíticos descritos na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010). Foram procedidos ensaios de contagem total de bactérias mesófilas, pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, Coliformes a 35 e a 45 °C e contagem total de bolores e leveduras. Em ensaios microbiológicos com produtos não estéreis, devem ser utilizadas técnicas assépticas na amostragem e na execução do ensaio.

Considerando a necessidade de adequação aos métodos farmacopeicos, produtos não estéreis devem ter seu sistema conservante inativado quanto a atividade microbiana, previamente ao ensaio microbiológico. Como reativo inativador foi

empregado polissorbato 80 (3%) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2008).

4.8 ANIMAIS

O ensaio biológico para avaliação da atividade cicatrizante empregando modelo animal seguiu as normas e diretrizes de ética quanto ao uso de animais experimentais, preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e em consonância com a Lei 11.794/2008, submetido para a apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá. O projeto foi aprovado pelo Certificado nº 6010040418 (Anexo 1).

Foram utilizados 24 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos (50-60 dias) pesando 200-250 g, provenientes do Biotério Central da UEM. Os animais permaneceram em gaiolas individuais no Biotério do Laboratório de Experimentação Animal – LEA do Bloco T22 (Departamento de Farmácia – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil), em condições padronizadas (temperatura de 22 ± 1 °C e umidade relativa de $50\pm 10\%$), ciclo dia-noite de 12 h e ração e água *ad libitum*.

Foram divididos em 4 grupos (n=6) de acordo com o período de tratamento: 4, 7, 10 e 14 dias.

4.8.1 Confeção e Tratamento das Feridas Cutâneas

Para a confeção de feridas excisionais, os animais foram anestesiados com Tiopental (40 mg/kg) associado com Lidocaína 10 mg/mL (7 mg/kg), via intraperitoneal. Após epilação manual e assepsia do local, um molde foi utilizado para marcar a área de confeção das feridas (1 cm²). Com auxílio de tesoura, foram feitas duas feridas com remoção de fragmento de pele (epiderme e derme) do dorso dos animais (Figura 6).

Figura 6 - Procedimento realizado para a confecção das feridas nos ratos, epilação (A), marcação da ferida (B), retirada de pele, formação da ferida (C), decalque das feridas (D)



Fonte: Autoria própria (2018).

A ferida esquerda recebeu tratamento com gel contendo lasiodiplodana e a ferida direita recebeu o gel controle. A aplicação dos hidrogéis foi realizada diariamente. O tratamento foi iniciado a partir do dia posterior a confecção das feridas (BUENO et al., 2016).

Após 4, 7, 10 e 14 dias, os animais foram eutanasiados com sobredose de Tiopental (120 mg/kg, via intraperitoneal) associado com lidocaína 10 mg/mL (7 mg/kg). As feridas cutâneas foram avaliadas quanto ao seu aspecto macroscópico e análise histológica (com margem de pele sadia em torno da ferida).

4.9 MEDIDA DA ÁREA DAS FERIDAS

A medida das feridas foi obtida após sua confecção e ao final de cada período de tratamento por decalque em folha plástica transparente. Esses registros foram digitalizados juntamente com escala milimétrica e ampliados. A área das feridas foi calculada utilizando o programa Image Pro-Plus® (v. 4.5). Os resultados foram expressos em cm². O grau de contração das feridas foi expresso em percentual, determinado a partir da equação 5:

$$\% \text{ de contração} = 100 \cdot \frac{(W_0 - W_i)}{W_0} \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: W_0 = área inicial da ferida e W_i = área da ferida no dia da coleta (4, 7, 10 e 14 dias) (OLIVEIRA et al., 2010).

4.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os animais receberam por via endovenosa 0,5 mg/kg de Sulfato de Vincristina (Oncovin Lilly®), duas horas antes da eutanásia, para bloquear a proliferação celular (BESSION et al., 2017).

Fragmentos de pele contendo as feridas foram removidos e fixados em solução de Bouin (ácido pícrico:ácido fórmico:ácido acético; 75:25:5; v/v) por 24 h. Foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo (Leica – Biosystems® RM 2245, Nussloch, Alemanha), com 6 µm de espessura, em cortes semisseriados a partir do centro da ferida. Os cortes foram dispostos em duas lâminas, com cinco cortes cada e foram analisados três cortes de cada lâmina (BUENO et al., 2016). Uma lâmina foi corada pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para análise da reepitelização e número de metáfases bloqueadas presentes na camada basal e supra-basal da epiderme neoformada e a outra lâmina foi corada pela técnica de Picrossírius para a quantificação da área ocupada pelas fibras colágenas tipo I e III.

As imagens foram capturadas em microscópio óptico Nikon® Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera Nikon DS-F11C cooled digital® (Nikon, Tóquio, Japão), com imagens transmitidas através do sistema D-DA simple analyzer, ao monitor colorido LCD G205HV®, congeladas e digitalizadas por meio de computador Intel Pentium Processor® E 5700 LGA775. A análise das imagens foi realizada no programa Image Pro-plus® versão 4.5.

4.10.1 Análise da Reepitelização

Nas imagens referentes aos animais que ainda não completaram a reepitelização, o comprimento das duas margens (línguas de reepitelização) da epiderme neoformada foram medidas e os valores obtidos foram somados. Nas imagens referentes às feridas que já se encontravam reepitelizadas, foi realizada a medida da espessura em três pontos distintos no centro do epitélio neoformado. As análises foram realizadas utilizando aumento de 10X (PINTO et al., 2015; BUENO et al., 2016).

4.10.2 Número de Metáfases Bloqueadas na Epiderme Neoformada

A proliferação de queratinócitos foi determinada pela contagem de células epiteliais bloqueadas na metáfase na camada basal e supra basal da língua de

reepitelização. Para padronização das medidas, foi considerado nos cortes um comprimento total da língua de reepitelização de 10000 μm . O resultado foi expresso em número de metáfases/mm. O aumento utilizado para a contagem das metáfases foi de 40X (PINTO et al., 2015; BUENO et al., 2016).

4.10.3 Análise das Fibras Colágenas

As imagens foram capturadas em microscópio óptico, utilizando fonte de luz polarizada C-SP simple polarizer. O microscópio equipado com polarizador permite birrefringência das fibras colágenas, de modo que o fundo das lâminas permanece com coloração preta e as fibras colágenas são coradas de vermelho/amarelo e verde. Em cada corte histológico, foram considerados três campos da ferida: um campo central e dois laterais, próximos às margens da ferida. Foi utilizada a objetiva de 20X para a captura das imagens.

A quantificação da área ocupada pelas fibras foi realizada por meio do programa Image Pro-Plus® (v. 4.5). A calibração do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (pixels) que formam as imagens, selecionando-se o valor limite de melhor resolução.

Para definir os pixels a serem contados pelo programa foram selecionados tons de vermelho, amarelo e verde. As fibras verdes foram consideradas como tipo III (imaturas) e as vermelhas/amarelas como tipo I (maduras). A porcentagem de área ocupada pelo colágeno tipo I e tipo III é calculada considerando a área total de cada campo (PINTO et al., 2015; BUENO et al., 2016).

Com base nessas porcentagens de colágeno, foi determinado o índice da maturação do colágeno (ImaC), definido como a razão entre a porcentagem da área ocupada pelo colágeno tipo I sobre o tipo III. Valores maiores do que 1 indicam a predominância de colágeno tipo I e valores menores que 1 indicam a predominância do colágeno tipo III (CORREA-NETO et al., 2009).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises macroscópicas (área das feridas e percentual de contração) e histológicas do tratamento com gel-LAS e gel-base foram submetidos à análise estatística pelo teste *t* de *Student*, utilizando o programa GraphPad Prism® 7

(Copyright GraphPad Software, Inc.). Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão e as variáveis foram testadas quanto a sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças significativas foram determinadas pelo teste *t* pareado para resultados paramétricos e o teste de Mann-Whitney foi utilizado para os resultados não paramétricos, sendo considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (BESSON, 2017; BUENO et al., 2016).

Foi utilizado análise de variância unilateral (*one-way ANOVA*) para comparação das médias nas análises físico químicas. As diferenças significativas foram determinadas pelo teste de Tukey para os dados homogêneos e o teste de Kruskal-Wallis para dados heterogêneos, e foi considerado $p < 0,05$ como critério de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS HIDROGÉIS

Pesquisas sobre o processo de reparação tissular são dinâmicas, assim como o desenvolvimento de recursos para favorecê-lo. Um produto eficaz para auxiliar na cicatrização de feridas deve oferecer conforto, boa relação custo/benefício e manter o leito da ferida com umidade ideal. Muito usado na cicatrização de feridas, o hidrogel é um gel formado por uma rede tridimensional de polímeros em meio aquoso, podendo se apresentar na forma de gel transparente, amorfo ou filme. A forma em gel pode ser utilizada no tratamento de diversas patologias e em várias fases da cicatrização (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003b; ALLEN JUNIOR; POPOVICH; ANSEL, 2013).

A formulação desenvolvida no presente trabalho foi avaliada quanto as suas características físico-químicas e microbiológicas, bem como submetida a testes de estabilidade preliminar e avaliação de eficácia na indução da cicatrização.

O estudo da estabilidade de novos produtos fornece informações que indicam a estabilidade do mesmo nas diferentes condições a que possa estar sujeito, desde sua fabricação até o término de sua validade. Essa estabilidade é relativa, pois varia com o tempo e em função de fatores que aceleram ou retardam alterações nos parâmetros do produto (BRASIL, 2004).

Na Tabela 1 estão descritos os resultados da caracterização físico-química do hidrogel contendo lasiodiplodana, bem como s resultados do potencial antioxidante do produto logo após sua formulação (T0).

Tabela 1 - Caracterização físico-química e potencial antioxidante do hidrogel contendo lasiodiplodana (CONTINUA)

Parâmetros Físico-Químicos			
Parâmetros	Resultados	Parâmetros	Resultados
Aspecto	gel translúcido	Teste centrífuga	Estável
Odor	Inodoro		
pH	6,37	Parâmetros colorimétricos	L*: 46,07 ±1,38
Densidade relativa	1,03 g/cm ⁻³ ±0,03		a*: -2,58 ±0,08
Atividade de água	0,93 a 25 °C		b*: -0,76 ±0,06
Resíduo mineral	4,07 g/100g ± 0,04		h°: 177,94 ±1,47
Viscosidade Aparente	1828,7 mPa.s ± 269,8		C*: 2,24 ±0,17
k#	61,3 ± 2,2		

(CONCLUSÃO)

Concentração do hidrogel	Atividade Antioxidante <i>In vitro</i>		
	Remoção do radical OH (%)	DPPH (%)	FRAP (mMol/L Sulfato ferroso equivalente / mL)
7%	60,7	12,9	1,44

Fonte: Autoria própria (2019).

*Viscosidade aparente; #Índice de consistência; nd: não detectado.

O hidrogel contendo a lasiodiplodana como princípio ativo apresentou aspecto de um gel translúcido, incolor e inodoro, com presença de algumas microbolhas perceptíveis visualmente. Embora visualmente não seja percebida coloração na amostra de hidrogel, a análise instrumental de cor demonstra que a amostra apresenta uma luminosidade (L^*) de $46,06 \pm 1,38$ e valores de coordenadas a^* e b^* de $-2,58 \pm 0,08$ e $-0,76 \pm 0,06$, respectivamente. Tais resultados indicam tendência a uma coloração mais acinzentada do que o branco em relação a L^* , e tendência ao verde e azul, em relação às coordenadas a^* e b^* (valores negativos). Cabe destacar, que a amostra apresenta tom muito suave de verde-azulado (baixos valores) e baixa saturação (C^* 2,24).

O produto apresentou pH levemente ácido (pH: 6,37), densidade relativa de $1,03 \text{ g/cm}^3 \pm 0,03$ e elevada atividade de água (0,93) e conteúdo mineral ($4,07\% \text{ g/100g} \pm 0,04$). O elevado conteúdo, mineral verificado pela análise de cinzas, possivelmente se deve à presença de sódio na molécula de carboximetilcelulose de sódio (CMC sódica) empregada com agente espessante na formulação. Além disso, um pequeno conteúdo de minerais poderia ser oriundo da própria lasiodiplodana (Kagimura et al.,2015b) que pode encerrar em sua composição pequena conteúdo mineral.

Elevada viscosidade ($1828,7 \text{ mPa.s} \pm 269,8$) e índice de consistência ($K: 61,3 \pm 2,2$) também foi verificada no produto. A alta viscosidade pode ser justificada pela presença da carboximetilcelulose (agente espessante), bem como da própria lasiodiplodana. De fato, a lasiodiplodana contribuiu para aumento da viscosidade do produto, uma vez que a amostra de hidrogel controle (sem lasiodiplodana) apresentou uma viscosidade 17,60% inferior ($1506,3 \text{ mPa.s} \pm 155,1$) e um índice de consistência de $54,2 \pm 2,08$.

O hidrogel demonstrou boa estabilidade frente ao teste de centrifugação, não sendo verificada precipitação de componentes, coalescência do sistema ou separação de fases, o que sugere que o produto tem boa estabilidade, e assim a amostra foi

submetida ao teste de estabilidade acelerado por condições de estresse térmico (item 4.5.2).

A indústria farmacêutica e cosmética baseada em evidências científicas vem demonstrando interesse em pesquisas voltadas ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos com potencial antioxidante. Estudos indicam que as β -glucanas além da habilidade imunomoduladora possui atividade antioxidante, o que pode representar uma ferramenta terapêutica na prevenção do estresse oxidativo celular (WANG et al., 2013; GIESE et al., 2015; CHEN et al., 2017).

A cicatrização de feridas pode ser acelerada quando há presença de substâncias antioxidantes no local, o que relaciona-se à menor formação de radicais livres e menor dano tecidual em situação de hipóxia, favorecendo positivamente o processo cicatricial (GUPTA et al., 2019).

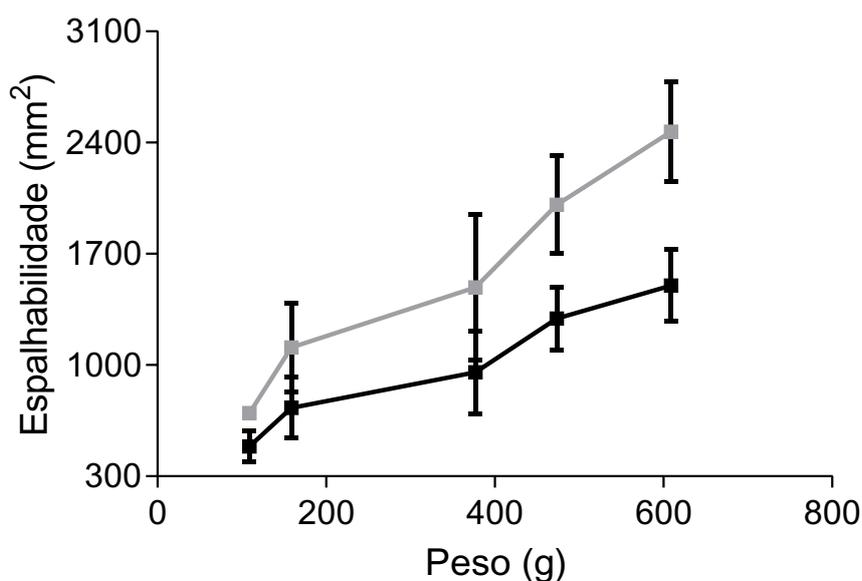
A atividade antioxidante da formulação foi avaliada através da determinação da capacidade de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), atividade de sequestro do radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e poder antioxidante redutor férrico (FRAP). O hidrogel contendo a β -glucana apresentou potencial de captura dos radicais $\text{OH}\cdot$ (60,7%), DDPH (12,9%) e poder redutor do íon férrico (1,44 mmol/L sulfato ferroso equivalente/mL). Maior potencial antioxidante foi verificado em relação à capacidade de eliminação do radical $\text{OH}\cdot$ (60,7%), o que é bastante interessante, visto que o radical hidroxila exibe uma elevada reatividade e pode promover danos severos as funções biológicas da célula (THEIS et al., 2019).

5.1.1 Avaliação da Espalhabilidade do Hidrogel

O teste de espalhabilidade é um teste que se baseia na resistência ao movimento forçado. Os resultados correspondem à relação entre a área de espalhamento com a força aplicada sobre o produto e o esforço limite, relação que corresponde ao fator de espalhabilidade (KNORST, 1991). A espalhabilidade de um produto de uso tópico é importante parâmetro de análise e está relacionada com a aplicação da formulação no local de ação, aderência (BORGHETTI, KNORST 2006), eficácia terapêutica, propagação e uniformidade na aplicação (DANTAS, 2016). Segundo Dantas (2016) a espalhabilidade é considerada um importante fator na adesão do paciente ao tratamento.

Os valores de espalhabilidade verificados nas amostras de hidrogéis (com e sem β -glucana) em função peso empregado no ensaio estão mostrados na Figura 7. Ambas as amostras apresentaram uma boa espalhabilidade. A espalhabilidade da amostra controle (sem β -glucana) variou de 698,7 mm² (peso de 110 g) a 2468,5 mm² (peso 610 g). A amostra contendo lasiodiplodana apresentou espalhabilidade variando de 487,4 mm², quando aplicado peso de 110 g a 1500,24 mm², quando avaliado o peso de 610 g. A adição da lasiodiplodana na formulação contribui para uma redução da espalhabilidade, possivelmente em função do aumento da viscosidade proporcionado pela β -glucana. Entretanto, ainda assim percebe-se uma boa espalhabilidade do produto.

Figura 7 - Espalhabilidade das formulações de hidrogéis controle (-■-) e contendo lasiodiplodana (-■-)- Resultados expressos como média \pm DP de triplicatas



5.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE PRELIMINAR DOS HIDROGÉIS

5.2.1 Teste de Centrifugação e Estresse Térmico

A avaliação da estabilidade preliminar é considerada um procedimento preditivo onde o produto é submetido a condições que visam acelerar possíveis alterações e contribui na orientação e desenvolvimento das formulações, fornecendo subsídios para o melhoramento das mesmas (ISAAC et al.,2008).

Ambas as formulações não apresentaram separação de fases no teste de centrifugação, demonstrando estabilidade e portando sendo submetidas ao ensaio de estabilidade acelerado pelo estresse térmico.

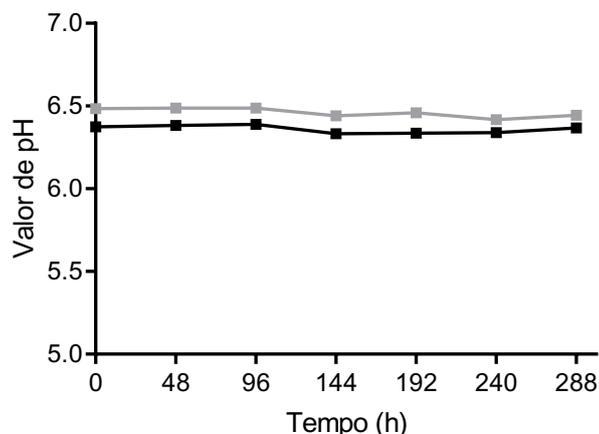
O teste de estresse térmico indicado no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004) emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre os componentes da formulação, mas não prediz a vida útil do produto. Este teste apenas auxilia na escolha das formulações.

As amostras foram submetidas a aquecimento progressivo com elevação de 10 °C a cada 30 minutos e sendo mantidas por 30 minutos em temperaturas de 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Os hidrogéis, com e sem lasiodiplodana, demonstraram estabilidade em todas as condições de estresse térmico, não sendo observadas macroscopicamente alterações de cor, odor, separação de fases, homogeneidade ou formação de precipitados. Considerando que as amostras demonstraram estabilidade ao teste de estresse térmico, as mesmas foram submetidas à continuidade dos ensaios de estabilidade preliminar, sendo então submetidas a ciclos alternados de aquecimento (45 °C) e resfriamento (-5 °C) com avaliação de pH, viscosidade e cor.

5.2.2 Avaliação de pH, Viscosidade Aparente e Cor

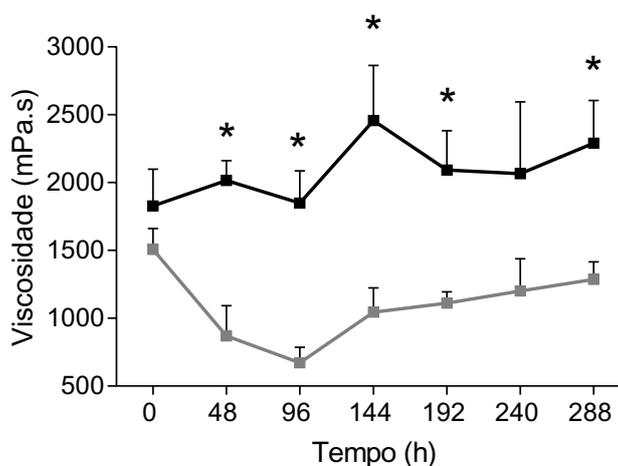
Conforme pode ser verificado na Figura 8, não houve variação nos valores de pH entre as amostras de hidrogel com e sem lasiodiplodana ao longo dos seis (6) ciclos de aquecimento e resfriamento nos quais as amostras foram submetidas. Interessante destacar que valores de pH entre 5,5 e 6,5 são compatíveis com o pH cutâneo não contribuindo para possível irritação dérmica (ISAAC et al., 2008), além da manutenção do pH ser um indicativo de estabilidade da formulação.

Figura 8 - pH das formulações de hidrogel controle (-■-) e contendo lasiodiplodana (-■-) durante o período de teste preliminar de estabilidade



O acompanhamento da viscosidade aparente ao longo dos ciclos de aquecimento e resfriamento está demonstrado na Figura 9. Conforme pode ser verificado, a amostra de hidrogel contendo a lasiodiplodana não apresentou variações estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao longo dos ciclos de aquecimento e resfriamento, o que indica boa estabilidade da amostra quanto ao parâmetro viscosidade. Por outro lado, na amostra controle (sem lasiodiplodana) houve expressiva redução no valor da viscosidade aparente ao final do segundo ciclo (T96) em relação a T0 (ausência de aquecimento/resfriamento), bem como entre os valores de viscosidade aparente medida ao longo dos ciclos de aquecimento/resfriamento. Tais resultados sugerem que a presença da lasiodiplodana no hidrogel pode conferir certa estabilidade reológica na formulação. De fato, a lasiodiplodana tem a capacidade de espessar soluções aquosas (CUNHA et al. 2012) e possivelmente pode ter interagido com a carboximetilcelulose auxiliando sua estabilidade frente a condições de estresse térmico.

Figura 9 - Viscosidade aparente das amostras de hidrogel (-■-) controle e (-■-) contendo lasiodiplodana. Resultados expressos como média \pm DP de triplicatas



*Diferenças estatística ($p < 0,05$) entre as amostras controle e teste.

Os resultados das análises dos parâmetros de cor das amostras de hidrogéis estão descritos na Figura 10 e Tabela 2. Logo após o preparo dos hidrogéis (controle e teste: sem e com glucana a percepção visual das amostras era de géis translúcidos, quase incolores. A caracterização instrumental da cor mostrou que ambas as amostras não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) em relação a todos os parâmetros de cor avaliados: L^* (controle: 43,6 e teste: 46,07), coordenadas cromáticas a^* (controle: -2,90 e teste -2,58) e b^* (controle: -0,63 e teste: -0,76) e coordenadas cilíndricas h° (ângulo hue, controle: 176,20 e teste: 177,94) e C^* (croma, controle: 2,97 e teste: 2,24), logo após o preparo dos hidrogéis (Tempo 0 h).

A luminosidade corresponde ao grau (intensidade) de claro ou escuro e é um atributo da percepção visual onde uma área ou amostra parece emitir mais ou menos luz. Os valores de L^* observados nos hidrogéis logo após preparo, indicam tendência a uma coloração mais acinzentada do que ao branco, e os valores das coordenadas a^* e b^* indicam no diagrama direcionamento ao verde e ao azul (valores negativos). Ao longo dos ciclos de aquecimento e resfriamento das amostras pode ser verificada (Figura 10 e Tabela 2) pequenas variações no parâmetro luminosidade (L^*), mas não havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre a luminosidade da amostra controle (sem a glucana) verificada inicialmente (L^* : 43,6) e após 6 (seis) ciclos de congelamento e descongelamento (L^* : 45,70 em 288 h). No entanto, no hidrogel contendo lasiodiplodana houve pequena redução na luminosidade da amostra após os ciclos de aquecimento e resfriamento (L^* : 46,07) em relação à leitura inicial (L^* : 43,25), o que sugere que a presença da glucana no hidrogel contribuiu para obtenção

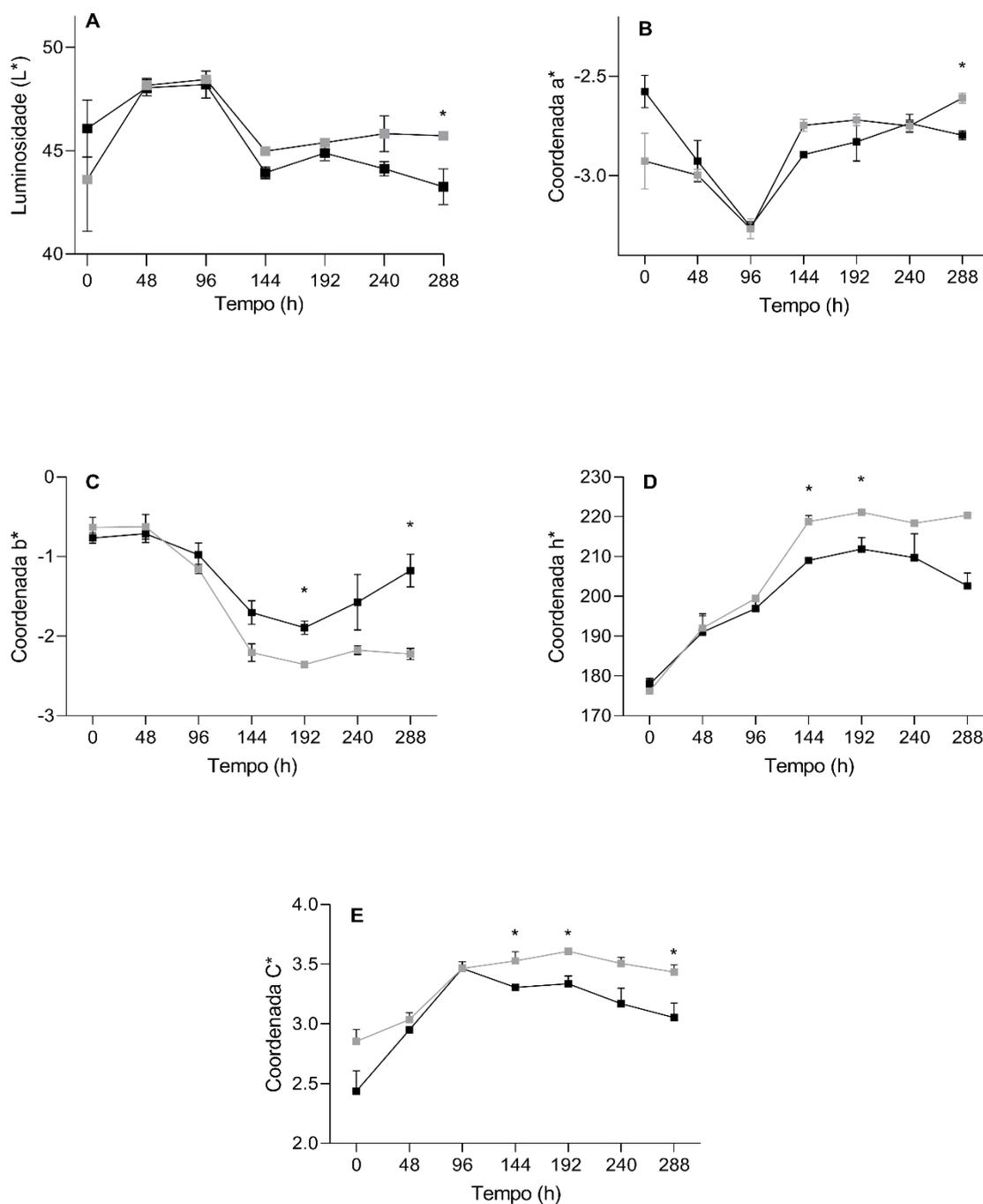
(tendência) de uma coloração um pouco mais escura após submissão a condições de estresse por aquecimento e resfriamento.

A presença da β -glucana no hidrogel também contribuiu para uma redução no valor da coordenada a^* (variando de -2,58 a -2,79 entre os ciclos T0 e 288 h, respectivamente), contrariamente ao observado na amostra controle (variando de -2,90 a -2,60 entre os ciclos T0 e 288 h, respectivamente), ou seja, os ciclos de congelamento e descongelamento tendem a diminuir a intensidade da pigmentação verde no hidrogel controle, e intensificar esta na amostra que contém o princípio ativo (lasiodiplodana). Em relação à coordenada cromática b^* , o congelamento/descongelamento das amostras intensificou o pigmento azul em ambas as amostras (controle variando de -0,63 a -2,22 e teste de -0,76 a -1,17 nos ciclos de 0 e 288 h, respectivamente).

Similarmente, foi verificado aumento no ângulo Hue (h°), o qual indica a tonalidade, ou seja, o atributo da percepção visual onde uma cor de fato é percebida. As amostras apresentam tons muito suaves de verde-azulados e foi observado que são pouco saturadas. Baixos valores de croma (C^*), com muita influência do cinza que se reduz discretamente (se apresentam com pequeno aumento na pureza da cor) em ambas as amostras após seis ciclos de congelamento/descongelamento foram observados.

Em relação à diferença total de cor entre as amostras, maiores diferenças são verificadas entre os hidrogéis não submetidos ao estresse por aquecimento e resfriamento (T0, $\Delta E = 2,49$) e entre os hidrogéis submetidos a cinco (5) e seis (6) ciclos ($\Delta E = 1,79$ e $2,70$, respectivamente). Mitterer-Daltoé et al. (2012), citam o trabalho de Stokes e colaboradores (1992) que pediram a 44 observadores para comparar conjuntos de imagens em cores modificadas aos seus originais, e calcularam um limiar médio (ΔE) para a detecção de diferenças de cor como sendo 2,15, ou seja, os autores concluíram que diferenças menores que estes valores são imperceptíveis ao olho humano. Como os resultados encontrados no presente trabalho encontram-se abaixo e em alguns ciclos pouco superiores, podem ser considerados imperceptíveis ou com diferenças pouco perceptíveis.

Figura 10 - Coordenadas de cor das amostras de hidrogel (-■-) controle e (-■-) contendo lasiodiplodana. Resultados expressos como média \pm DP de triplicatas



*Diferenças estatística ($p < 0,05$) entre as amostras controle e teste.

Os resultados da análise dos parâmetros de cor sugerem que o aquecimento e resfriamento interferiu de forma tolerável nos parâmetros de cor de ambas as amostras, e que a presença da β -glucana contribuiu para a redução da luminosidade e

alteração da coloração. Entretanto, parece não haver uma correlação linear entre diferenças de cor entre as amostras e os ciclos de aquecimento/resfriamento.

Não existem dados na literatura relativo a análise de parâmetros de cor em glucanas. Os dados inéditos apresentados nesse trabalho poderão servir de referência para futuros trabalhos.

Tabela 2 - Parâmetros de cor do hidrogel contendo lasiodiplodana e amostra controle (hidrogel sem lasiodiplodana)

Ciclo* (horas)	Cor										ΔE^{**}
	Hidrogel controle					Hidrogel com lasiodiplodana					
	L*	a*	b*	h	C	L*	a*	b*	h	C	
0	43,6 ^c ± 2,52 [*]	-2,9 ^b ± 0,14 [#]	-0,63 ^c ± 0,12 ^{&}	176,20 ^c ± 2,78 ^{α}	2,97 ^c ± 0,10 ^{Φ}	46,07 ^{b,c} ± 1,38 [*]	-2,58 ^d ± 0,08 [#]	-0,76 ^c ± 0,06 ^{&}	177,94 ^d ± 1,47 ^{α}	2,24 ^e ± 0,17 ^{Φ}	2,49
48	48,2 ^{a,b} ± 0,35 [*]	-2,9 ^b ± 0,02 [#]	-0,63 ^c ± 0,16 ^{&}	192,04 ^b ± 3,09 ^{α}	3,07 ^b ± 0,05 ^{Φ}	48,04 ^{a,b} ± 0,40 [*]	-2,93 ^b ± 0,11 [#]	-0,71 ^c ± 0,11 ^{&}	191,04 ^c ± 4,51 ^{α}	2,94 ^d ± 0,01 ^{Φ}	0,16
96	48,4 ^a ± 0,12 [*]	-3,3 ^a ± 0,05 [#]	-1,15 ^b ± 0,06 ^{&}	199,48 ^a ± 0,88 ^{α}	3,43 ^a ± 0,05 ^{Φ}	48,2 ^a ± 0,65 [*]	-3,25 ^a ± 0,02 [#]	-0,98 ^c ± 0,15 ^{&}	196,91 ^{b,c} ± 2,66 ^{α}	3,43 ^a ± 0,05 ^{Φ}	0,30
144	44,9 ^c ± 0,19 [*]	-2,7 ^c ± 0,03 [#]	-2,20 ^a ± 0,11 ^{&}	218,78 ^a ± 1,47 ^{α}	3,59 ^a ± 0,07 ^{Φ}	43,93 ^d ± 0,28 [*]	-2,89 ^{b,c} ± 0,01 [#]	-1,70 ^a ± 0,14 ^{&}	209,0 ^a ± 0,61 ^{$\alpha\alpha$}	3,32 ^{a,b,c} ± 0,015 ^{$\Phi\Phi$}	1,17
192	45,4 ^{b,c} ± 0,01 [*]	-2,7 ^c ± 0,03 [#]	-2,35 ^a ± 0,03 ^{&}	221,12 ^a ± 0,44 ^{α}	3,59 ^a ± 0,02 ^{Φ}	44,88 ^{c,d} ± 0,36 [*]	-2,83 ^{b,c} ± 0,09 [#]	-1,89 ^a ± 0,08 ^{&&}	211,88 ^a ± 2,87 ^{$\alpha\alpha$}	3,41 ^{a,b,c} ± 0,06 ^{$\Phi\Phi$}	0,69
240	45,8 ^{a,b,c} ± 0,86 [*]	-2,7 ^c ± 0,02 [#]	-2,17 ^a ± 0,05 ^{&}	218,39 ^a ± 0,59 ^{α}	3,5 ^a ± 0,05 ^{Φ}	44,13 ^{c,d} ± 0,34 [*]	-2,73 ^{c,d} ± 0,04 [#]	-1,57 ^{a,b} ± 0,35 ^{&}	209,72 ^a ± 6,01 ^{α}	3,24 ^{b,d} ± 0,13 ^{Φ}	1,79
288	45,7 ^{a,b,c} ± 0,04 [*]	-2,6 ^c ± 0,02 [#]	-2,22 ^a ± 0,07 ^{&}	220,4 ^a ± 0,76 ^{α}	3,49 ^a ± 0,06 ^{Φ}	43,25 ^d ± 0,86 ^{**}	-2,79 ^{b,c} ± 0,02 [#]	-1,17 ^{b,c} ± 0,20 ^{&&}	202,64 ^{a,b} ± 3,24 ^{α}	3,17 ^{c,d} ± 0,12 ^{$\Phi\Phi$}	2,70

Fonte: Autoria própria (2019).

* Ciclos de gelo e degelo: cada ciclo compreendeu 24 horas a 45 ± 2 °C e 24 horas a -5 ± 2 °C.

**Diferença total de cor.

*, #, &, α , Φ Sinais iguais na mesma linha para o mesmo parâmetro de cor não difere estatisticamente em um intervalo de confiança 95% ($p < 0,05$).

a, b, c, d Letras iguais na mesma coluna para o mesmo parâmetro de cor não diferem estatisticamente em um intervalo de confiança 95% ($p < 0,05$).

5.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA

A avaliação da qualidade microbiológica é importante para garantir a segurança do uso produto. Além disso, a presença de microrganismos pode levar a alterações químicas e físicas do produto, e caracterizar um risco de infecção para o paciente. Importante salientar que produtos não estéreis devem cumprir rígidos parâmetros pré-estabelecidos de controle microbiológico.

Conforme pode ser verificado na Tabela 3, o hidrogel contendo lasiodiplodana apresentou qualidade microbiológica condizente com a legislação brasileira em vigor.

Tabela 3 - Qualidade microbiológica do gel contendo lasiodiplodana

Microrganismo	Qualidade Microbiológica	
	Resultados encontrados	Limite microbiano*
Bactérias aeróbias totais	10 ² UFC/mL	10 ² UFC/mL
Coliformes totais	Nd	-
Coliformes a 45 °C	Nd	-
Bolores e leveduras	Nd	10 ¹ UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nd	Ausência em 1 g ou 1 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Nd	Ausência em 1 g ou 1 mL

Fonte: Autoria própria (2019).

*Limites microbianos para preparações de uso tópico não estéreis segundo farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). UFC: unidades formadoras de colônias; nd: não detectado.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE

Para a avaliação da cicatrização de feridas, o modelo de duas feridas paralelas no dorso de ratos, na altura das patas dianteiras foi adotado (Figura 11). Essa região é escolhida, por ser uma região relativamente protegida de contaminação e pela menor possibilidade de contato com fezes e com a saliva do animal. Ainda a região dorsal é escolhida por ser de menor alcance, e as condições da gaiola em que o animal permanece no biotério são escolhidas de modo que evitem atrito e contaminações nas lesões (GUIDI, 2017).

Figura 11 - Fotografia da região dorsal do animal após confecção das feridas



Fonte: Autoria própria (2018).

Por atingir toda a espessura da pele, essa ferida é considerada um tipo de lesão cutânea total e mimetiza uma lesão cutânea grave em que a cicatrização espontânea geralmente é lenta, dessa forma, a ferida tem estímulo máximo das respostas fisiológicas, inclusive com a contração da cicatriz e epitelização central (FERREIRA et al., 2008). A área e aspecto das feridas podem ser influenciados por agressão causada pelo próprio animal, causada pelo ato de coçar a ferida e na tentativa de limpar o tratamento aplicado.

No acompanhamento macroscópico do tratamento com gel contendo lasiodiplodana, as feridas não apresentaram sinais sugestivos de infecção como secreção, presença de pus e de odor fétido ou retardo no processo cicatricial ao longo do tratamento. Guidi (2017), em avaliação da atividade cicatrizante de *Poincianella pluviosa*, também observou esse comportamento referente as feridas avaliadas. Formação e presença de crosta foi observada em todas as feridas, ausência de exsudato inflamatório e edema também foram notados, podendo ser resultante da proteção que o hidrogel exerceu na excisão, o qual forma um revestimento que favorece a reparação tecidual, diminuindo a permeabilidade e exsudação da ferida.

Os hidrogéis têm um comportamento inteligente para várias mudanças fisiológicas, sua capacidade de absorver ou liberar água, de maneira reversível, em resposta a estímulos ambientais específicos, como temperatura, pH e força iônica, sugere seu uso em uma variedade de aplicações biomédicas (MADAGHIELE et al., 2014). Besson et al. (2017), utilizando o mesmo protocolo animal e avaliação

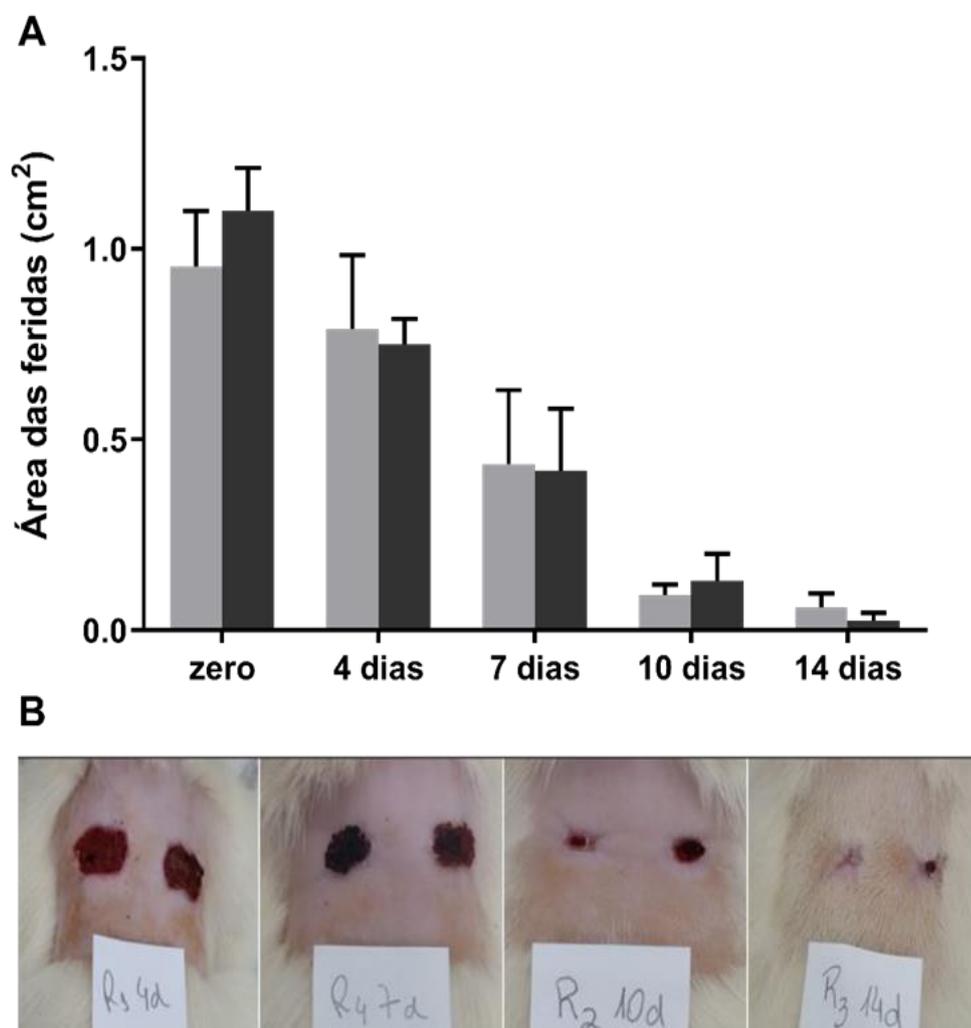
histológica que foi usado no presente trabalho, avaliou a modulação da cicatrização por insulina complexada com uma ciclodextrina (HP β CD) e veiculada em gel, o autor relatou presença de crosta em todas as feridas, e ainda ausência de exsudato inflamatório e edema.

O acompanhamento macroscópico da evolução da medida da circunferência ou da área da lesão cutânea é um parâmetro muito empregado na prática clínica, por ser de baixo custo, fácil manuseio e aplicabilidade clínica (FERREIRA et al., 2008). No acompanhamento macroscópico, o tratamento com gel contendo lasiodiplodana e gel controle, foi notado o fechamento da ferida, sem o desenvolvimento de borda necrótica ou secreções purulentas que pudessem caracterizar infecção.

A contração da ferida é uma etapa importante no fechamento da lesão cutânea e raramente leva à perda da função desses tecidos. Se essa contração for pequena, retarda o fechamento da ferida, permitindo sangramentos e infecções. Entretanto, o fechamento definitivo de uma ferida se deve principalmente à formação do tecido de granulação e à reepitelização (FERREIRA et al., 2008). Os miofibroblastos, através de seus filamentos de actina, são capazes de reduzir a área da lesão facilitando a epitelização por estarem alinhados nos eixos de contração, produzindo movimentos centrípetos das bordas da ferida. A contração do tecido de granulação pode estar associada a ação de mediadores de prostaglandinas (COELHO et al., 1999).

A medida da área das feridas referentes ao tratamento com gel contendo lasiodiplodana e gel controle estão representadas na Figura 12 (A). A Figura 12 (B) mostra a sequência da restauração da pele em função do tempo de tratamento com gel contendo lasiodiplodana (ferida esquerda) e gel controle (ferida direita) nos períodos padronizados.

Figura 12 - Comparação das áreas excisionais (A) após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com hidrogel contendo (1 →6)- β -D-glucana (lasiodiplodana). Tratamento com gel controle (■) e gel contendo lasiodiplodana (■) (n=6, *p<0,05). Imagens da região dorsal do animal (B) após excisões e respectivos dias de tratamento



Fonte: Autoria própria (2018).

As feridas que receberam gel controle apresentaram crosta mais espessa e um pouco mais escura do que as que receberam gel contendo lasiodiplodana. Em ambas houve exsudação plasmática com formação de crostas superficiais até o 7º dia. Após o 10º dia, a crosta se destacou, evoluindo para epiteliação completa, que ocorreu por volta do 14º dia. O crescimento sobre a área reepitelizada iniciou após o 10º dia de tratamento.

Como a contração ocorre de forma centrípeta, as feridas, que inicialmente eram praticamente quadradas, reduziram seu tamanho, originando margens irregulares (Figura 12 B) sem figura geométrica definida. Foi possível demonstrar o decréscimo

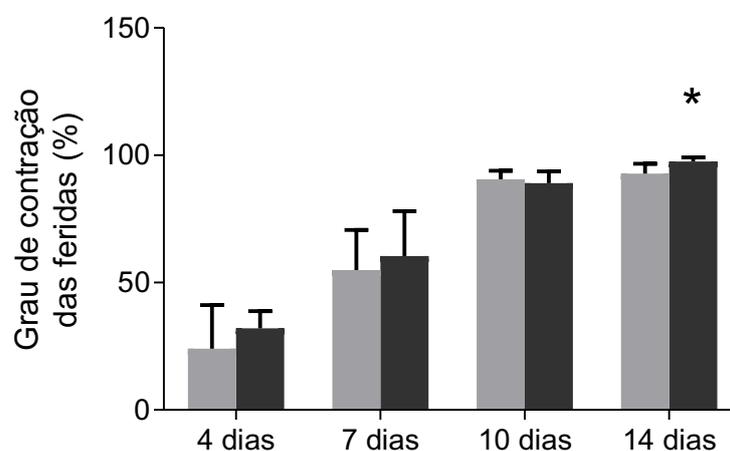
da área e a contração das feridas de forma progressiva e similar entre a ferida tratada e o controle, mostrando que não houve agravos que prejudicassem a cicatrização.

O decalque das excisões foi feito no dia da confecção das feridas (dia zero) e ao final de cada período de tratamento (4, 7, 10 e 14 dias). Apesar das marcações serem feitas utilizando um molde de 1 cm² para a confecção das feridas, elas tendem a sofrer uma distensão após o corte e a retirada do fragmento de pele, provocada pela incisão transversal as linhas de Langer (COELHO et al., 1999), resultando em uma área maior, mostrada como dia zero no gráfico (Figura 12A).

O percentual de contração da área das feridas referentes ao tratamento com gel contendo lasiodiplodana e gel controle, estão apresentados na Figuras 13. A evolução ocorreu de forma gradativa, e observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e o tratado com gel contendo lasiodiplodana apenas no 14º dia de tratamento.

O percentual de contração de feridas mostra a relação do fechamento de cada ferida em relação ao seu tamanho inicial. Em estudo *in vivo* realizado por Wu e colaboradores (2016), os quais avaliaram a capacidade cicatrizante de uma nanofibra a base de (1,3)- β -glucana obtida de *Saccharomyces cerevisiae*, que foi empregada a 2% como princípio ativo, foi observado que a nanofibra reduziu significativamente o tamanho da ferida em comparação ao grupo controle, especialmente no 14º dia de tratamento, similarmente ao observado no presente estudo com o gel contendo lasiodiplodana.

Figura 13 - Contração das áreas excisionais após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com hidrogel contendo (1 →6)- β -D-glucana (lasiodiplodana). Tratamento com gel controle (■) e gel contendo lasiodiplodana (■)



*Diferenças estatística (n=6, * $p < 0,05$) entre as amostras controle e teste.

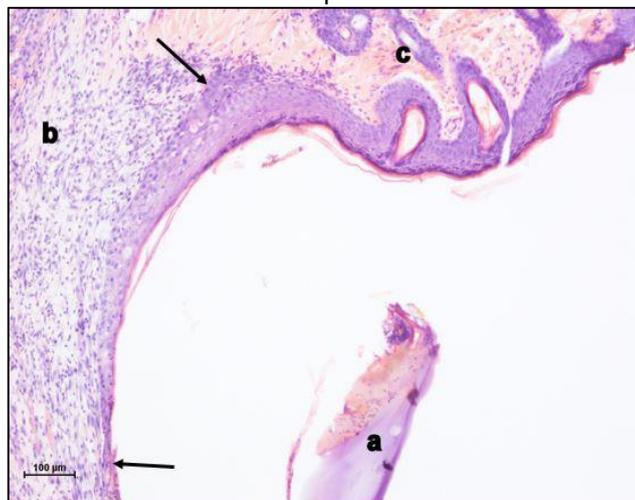
Na análise histológica, as feridas foram avaliadas com base no comprimento e espessura da superfície reepitelizada. A cicatrização da ferida caracteriza-se, entre outros fatores, pela hemostasia, reepitelização e remodelação da matriz extracelular. A epitelização, que é o processo de renovação epitelial após a lesão, envolve a proliferação e migração das células epiteliais para o centro da ferida (RAVICHANDIRAN; MANIVANNAN, 2015).

As fases do processo de cicatrização e fechamento das feridas devem ocorrer a partir de uma sequência e tempo de duração. O tempo dessas fases pode ser aumentado quando se tem uma cicatrização de feridas deficiente ou uma falha, gerando feridas crônicas com atraso em uma das fases do processo cicatricial (OLIVERIA; DIAS, 2012).

As feridas após 4, 7 e 10 dias de tratamento apresentaram duas margens de reepitelização e uma restauração completa ocorreu após 14 dias. A pele adjacente à ferida apresentava aspecto normal caracterizando a efetividade da contração da borda e restauração da área lesada. Em estudo de cicatrização realizado por Sehn et al. (2009), analisando os mesmos períodos de tratamento, também foi observado que as feridas não apresentaram fechamento completo do epitélio. As feridas apresentavam duas margens e uma restauração quase completa ocorreu após 14 dias da lesão. Fenômeno semelhante ocorreu em estudo de avaliação cicatricial *in vivo* realizado por Wu et al (2016) com ratos Kunming e (1→3)-β-glucana insolúvel obtida de *Saccharomyces cerevisiae* a 2% como princípio ativo, incorporada a uma nanofibra.

Na Figura 14 é possível verificar um corte histológico corado por HE após 4 dias de tratamento com gel contendo lasiodiplodana. Na análise do epitélio neoformado durante todos os períodos de tratamento (4, 7, 10 e 14 dias) com o gel contendo lasiodiplodana e gel controle, a área reepitelizada se manteve pequena ou inexistente até o 10º dia de tratamento. Embora frouxo, o tecido de granulação já foi observado desde os cortes obtidos com 4 dias de tratamento.

Figura 14 - Fotomicrografia de corte histológico com coloração HE para medida da reepitelização da ferida excisional no dorso do rato, tratada com gel contendo lasiodiplodana por um período de 4 dias (ampliação de 10x). Destaque para: crosta (a), tecido de granulação (b), tecido integro (c). As setas indicam o início e o final da área reepitelizada em um dos lados da ferida

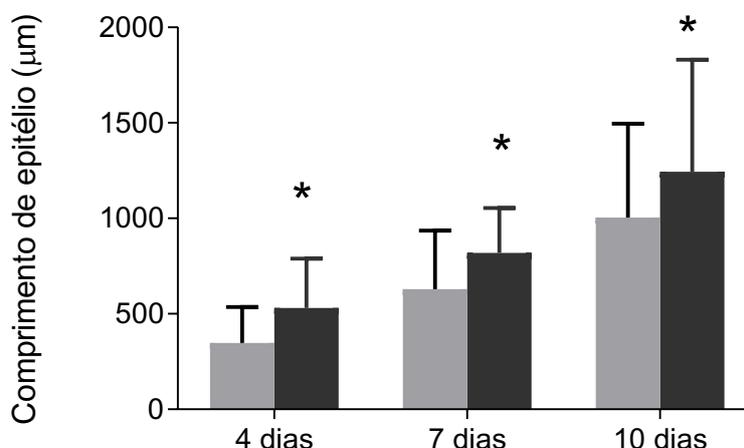


Fonte: Autoria própria (2019).

O comprimento da epiderme neoformada avalia a migração horizontal dos queratinócitos a partir da margem em direção ao centro da ferida. A migração dessas células se dá pela matriz provisória formada e seguindo a orientação do gradiente químico de substâncias quimiotáticas (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). O movimento dos queratinócitos é determinado também pelo conteúdo de água no leito da ferida (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a). Nas feridas de 4, 7 e 10 dias, duas margens de reepitelização (línguas de reepitelização) foram medidas, somadas e os resultados foram expressos em micrômetros.

As feridas tratadas com gel contendo lasiodiplodana apresentaram comprimento da superfície de reepitelização maior já em 4 dias de tratamento ($p < 0,05$) quando comparada ao controle negativo (gel controle) (Figura 15), e se manteve significativa estatisticamente, nos dias 7 e 10 de tratamento, mostrando atuação da lasiodiplodana na migração dos queratinócitos para o centro da ferida.

Figura 15 - Efeito do tratamento das feridas excisionais após 4, 7 e 10 dias com hidrogel contendo (1 →6)- β -D-glucana (lasiodiplodana). Tratamento com gel controle (■) e gel contendo lasiodiplodana (■)



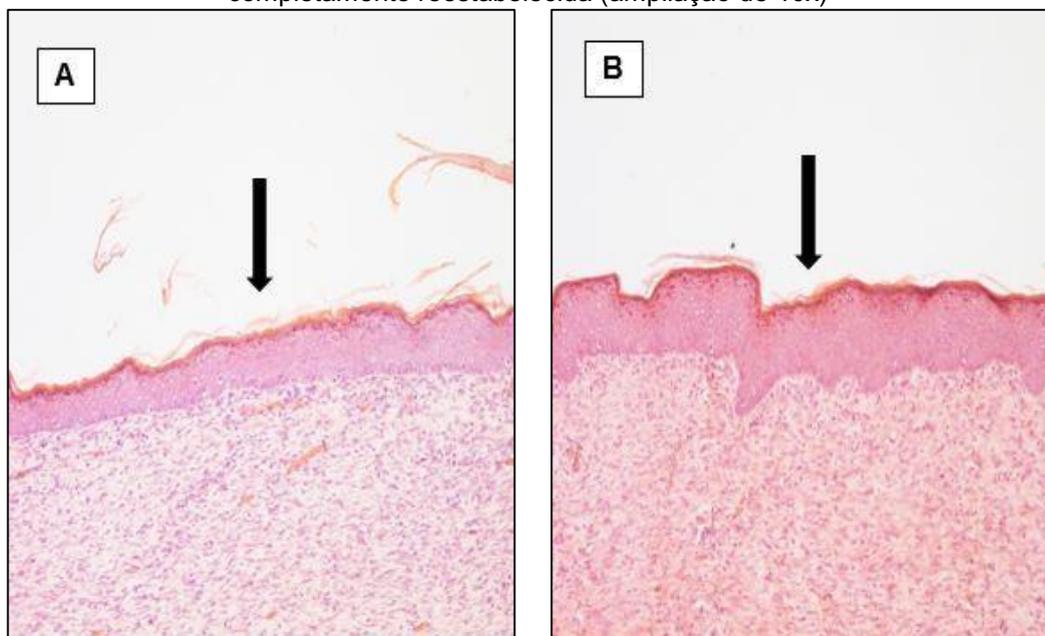
*Diferenças estatística (n=6 p<0,05) entre as amostras controle e teste.

Pesquisas recentes têm demonstrado que polissacarídeos do tipo β -glucanas são substâncias promissoras no tratamento de feridas, tanto como fármaco de uso tópico ou na forma de membrana curativa (ZHU et al., 2016). Em avaliação da aplicação tópica de um produto obtido a partir da curdlana (β -D-(1→3)-glucana) derivatizada por aminação, Berdal e colaboradores (2007), demonstraram que a mesma agilizou o processo de cicatrização em ratos diabéticos em comparação com o controle. De mesmo modo pode ser verificado um aumento significativo na reepitelização das feridas tratadas com gel contendo lasiodiplodana em comparação ao controle, em relação ao comprimento da epiderme.

A avaliação da reepitelização através do comprimento da epiderme no 14º dia de tratamento não é possível, a avaliação da epiderme é proporcionada pela espessura da mesma, pois nesse período do tratamento, com a aplicação diária dos géis, as feridas já se encontravam todas fechadas, a epiderme já havia alcançado as duas bordas da ferida.

Na Figura 16 é mostrado o centro de uma ferida tratada com gel contendo lasiodiplodana (B) e com gel controle (A) após 14 dias, totalmente recoberta pela epiderme. A espessura da epiderme neoformada está relacionada com a diferenciação do tecido, sendo uma maneira indireta de determinar a migração vertical dos queratinócitos (BESSION et al., 2017).

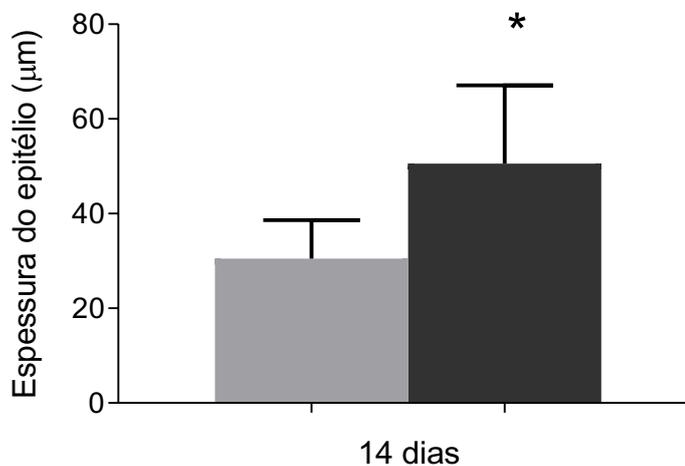
Figura 16 - Fotomicrografias de cortes histológicos com coloração HE para medida da espessura da epiderme neoformada de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas com gel controle (A) e com gel contendo lasiodiplodana (B) aos 14 dias. As setas indicam o centro da ferida, com a epiderme completamente reestabelecida (ampliação de 10x)



Fonte: Autoria própria (2018).

A espessura da epiderme neoformada foi medida em diferentes pontos no centro da ferida (n=3). Aos 14 dias (Figura 17), as feridas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), mostrando um aumento na espessura da epiderme nas feridas tratadas com gel contendo lasiodiplodana.

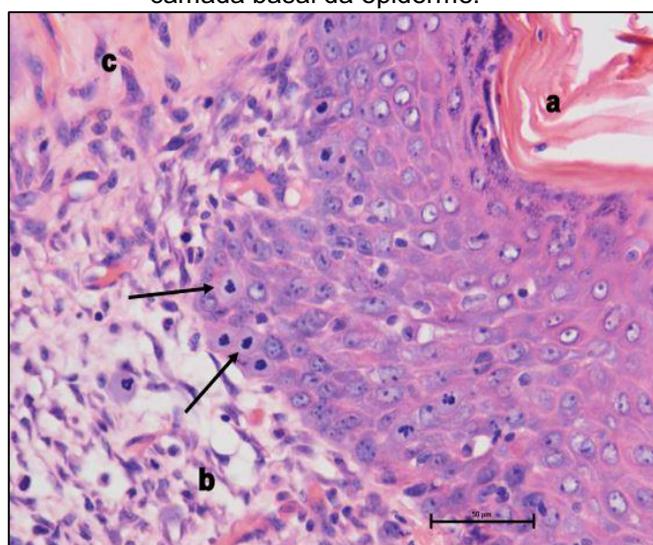
Figura 17 - Medida da espessura do epitélio após 14 dias de tratamento das feridas excisionais com hidrogel contendo (1 →6)- β -D-glucana (lasiodiplodana). Tratamento com gel controle (■) e gel contendo lasiodiplodana (■)



*Diferenças estatística (n=6 $p < 0,05$) entre as amostras controle e teste.

A proliferação celular na epiderme neoformada foi avaliada pela contagem das células epiteliais bloqueadas em metáfase, nas camadas basal e supra-basal. O sulfato de vincristina é um quimioterápico que interrompe a mitose na fase de metáfase (BESSON et al., 2017), permitindo a contagem das células em cortes histológicos. Na figura 18, é possível visualizar células em metáfase, utilizada para a avaliação da proliferação celular.

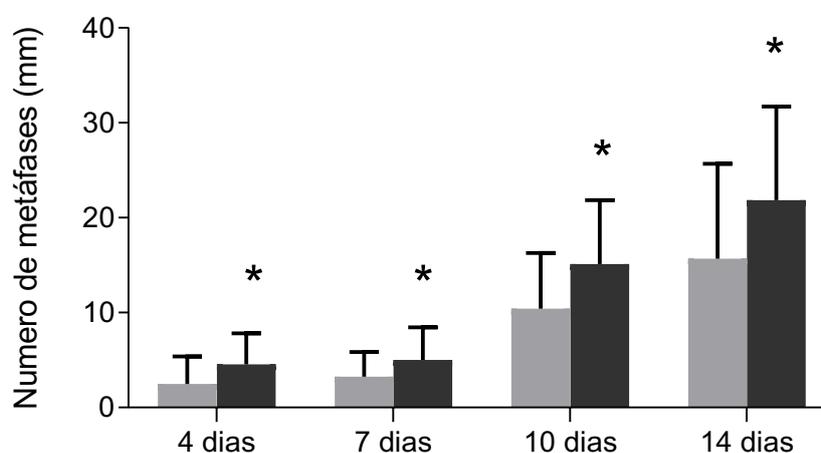
Figura 18 – Fotomicrografia de corte histológico com coloração HE para a contagem de células em metáfase na epiderme da ferida excisional do dorso do rato (ampliação de 40x). Destaque para: crosta (a), tecido de granulação (b), tecido integro (c). As setas indicam as células em metáfase na camada basal da epiderme.



Fonte: autoria própria (2019).

Na figura 19 está representado como gráfico a proliferação celular no epitélio após tratamento com gel contendo lasiodiplodana. Desde o 4 dia de tratamento houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratado e controle (gel controle), porém, aos 10 e 14 dias houve uma proliferação celular mais expressiva. O resultado pode ter sido alcançado pelo efeito do gel contendo lasiodiplodana sobre os queratinócitos, estimulando uma resposta proliferativa destas células ao longo da margem da reepitelização (MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2016). Na avaliação da cicatrização de feridas em ratos diabéticos utilizando uma solução contendo (1→3)(1→6)- β -glucana ramificada a 2,5%, Yun, ku e kwon (2015), verificaram que a formulação contendo a glucana promoveu uma diminuição significativa no tamanho das feridas em comparação ao controle. A β -glucana também contribuiu para o aumento do número de vasos sanguíneos e a reepitelização nas feridas tratadas por estimulação da proliferação celular.

Figura 19 - Número de células em metáfase na extensão da epiderme após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com hidrogel contendo (1 →6)- β -D-glucana (lasiodiplodana). Tratamento com gel controle (■) e gel contendo lasiodiplodana (■)



*Diferenças estatística (n=6 p<0,05) entre as amostras controle e teste.

É possível observar ainda na Figura 19, que o gel contendo lasiodiplodana influenciou a proliferação de queratinócitos *in vivo* a partir do 4º dia e se manteve ao longo do 14º dia. Esses dados são compatíveis com a avaliação da reepitelização (Figura 15 e 17), refletindo na espessura da epiderme neoformada após a completa reepitelização. Análises histológicas de feridas após aplicação tópica de um produto obtido da curdlana (β -D-(1→3)-glucana) derivatizada, realizada por Berdal e colaboradores (2007), permitiram aos mesmos inferir que a glucana avaliada atuou no processo da formação do tecido de granulação, e um provável mecanismo envolve a estimulação de macrófagos. Medeiros et al. (2012) relataram que a aplicação tópica de hidrogel a base de carboximetilcelulose contendo β -(1→3)-glucana proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*, estimulou a cicatrização de úlceras venosas por modulação de fibroblastos.

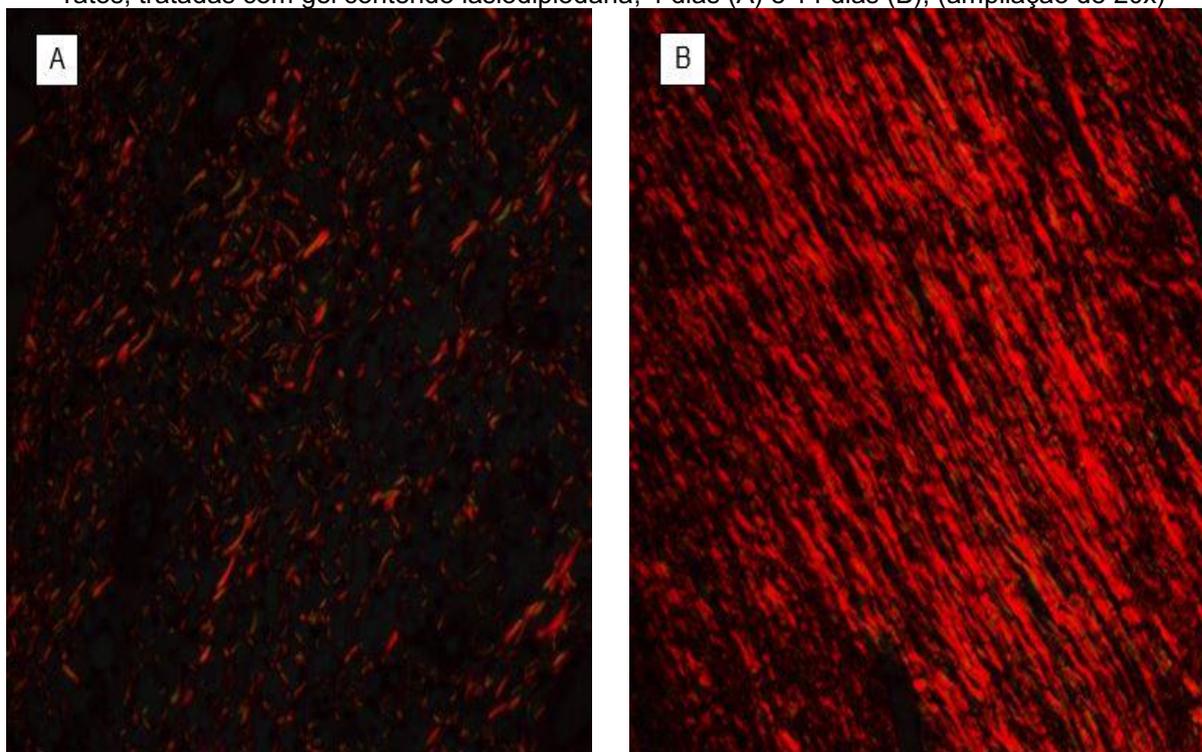
Estudo realizado por King, Barrett e Cutting (2017) demonstrou que a utilização de β -glucana em gel estimulou a cicatrização de feridas de difícil cicatrização em pessoas de diferentes etiologias. Tais autores avaliaram o tipo do tecido neoformado, a área da ferida e o nível de dor dos pacientes por um período de 12 semanas e verificaram que a bioatividade da glucana se deu por ativação de macrófagos, e que esta mostrou-se promissora não só na estimulação de cicatrização mas também como ferramenta de reativação de cicatrização de feridas crônicas.

A proliferação celular é um fenômeno chave no processo de reepitelização durante a cicatrização de feridas. Após a lesão, os queratinócitos das margens da ferida se multiplicam rapidamente formando um epitélio denso. Essas células, em seguida, migram para o leito da ferida, restaurando a função de barreira da epiderme (KRISHNASWAMY; KORRAPATI, 2014).

A síntese de colágeno começa horas após o ferimento, mas ela não se torna significativa até aproximadamente uma semana após a lesão. Wei et al. (2002) demonstraram que a glucana estimulou a biossíntese de colágeno, pela estimulação de queratinócitos e fibroblastos e formação do tecido de granulação. Yamamoto e Kimura (2013), em estudo *in vivo* avaliando a estimulação da cicatrização, observaram que a formulação contendo (1→3)(1→6)-β-glucana (1 mg/mL) de origem fúngica, aumentou significativamente a taxa de cicatrização em relação ao controle, por estimulação local da síntese de colágeno.

A técnica de Picrossírius é baseada na birrefringência natural que o colágeno possui, e permite a diferenciação dos tipos de colágeno quando visualizado por microscopia de polarização (Figura 20), é possível avaliar a quantidade de colágeno tipo I e III e a evolução do processo cicatricial. Gradativamente os feixes de fibras colágenas tornam-se mais espessos, resultando em uma configuração mais regular, que está diretamente relacionada às forças mecânicas as quais o tecido está sujeito durante a atividade normal. Assim, a lesão torna-se mais resistente após o colágeno ter sofrido maturação (tipo I) (OLIVEIRA; DIAS, 2012). Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparecem, observando-se a apoptose de fibroblastos e células endoteliais, formando o tecido cicatricial (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Figura 20 - Fotomicrografias de cortes histológicos com coloração Picrossírius para a quantificação de colágeno tipo I (verde) e tipo III (vermelho) da derme neoformada de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas com gel contendo lasiodiplodana, 4 dias (A) e 14 dias (B), (ampliação de 20x)



Fonte: Autoria própria (2019).

O cálculo do índice de maturação do colágeno (Tabela 4) evidenciou o predomínio de colágeno tipo I ou III na derme das feridas. Em ambos os grupos, tratados com gel contendo lasiodiplodana e com gel base (controle negativo), houve predominância do colágeno tipo I, o índice de maturação (ImaC) foi maior que 1 (um), predizendo essa condição.

Tabela 4 - Índice de maturação do colágeno das feridas tratadas com gel controle (controle negativo) e com gel contendo lasiodiplodana

		Colágeno tipo I*	Colágeno tipo III*	ImaC#
Feridas tratadas com gel controle	4 dias	7,657	0,073	104,184
	7 dias	6,174	0,029	212,638
	10 dias	8,125	0,024	336,726
	14 dias	11,558	0,021	542,652
Feridas tratadas com gel contendo lasiodiplodana	4 dias	7,118	0,071	100,063
	7 dias	9,182	0,052	174,407
	10 dias	10,364	0,052	195,807
	14 dias	15,009	0,008	1914,115

Fonte: Autoria própria (2019).

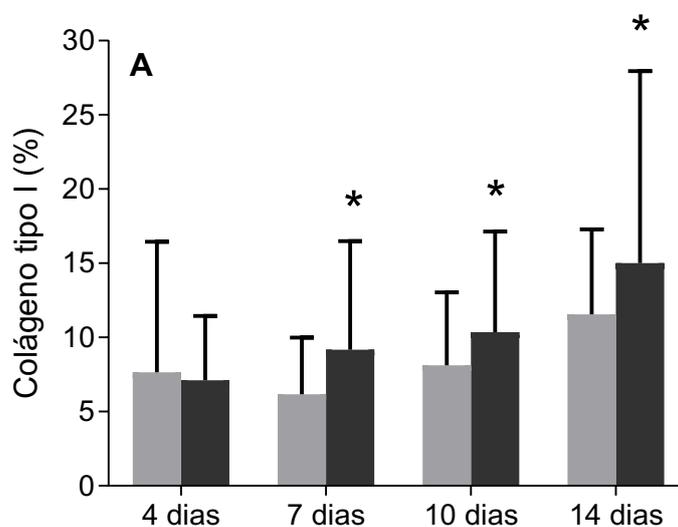
ImaC: razão entre tipo I e tipo III; * Média da porcentagem.

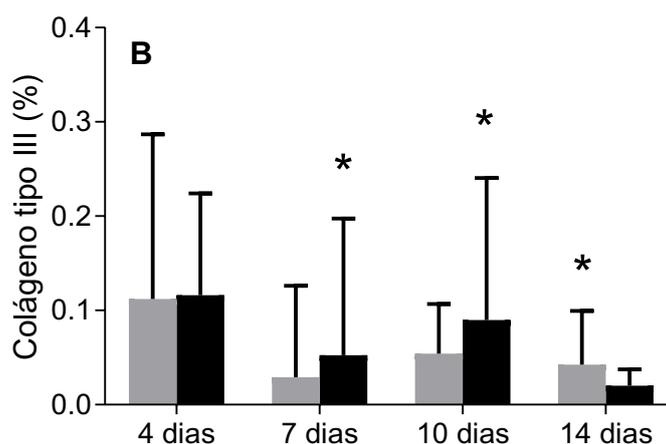
A formação de colágeno tipo I e III no 4º dia não apresentou aumento biológico na ferida tratada com gel contendo lasiodiplodana quando comparado com a tratada

com gel controle, no início do tratamento não houve diferença significativa ($p < 0,05$). Comparando o 7º, 10º e 14º dia (Figura 21A), para o colágeno tipo I essa a diferença foi significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com gel contendo lasiodiplodana e gel controle. Para o colágeno tipo III nos dias 7, 10 e 14 de tratamento (Figura 21B), também houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$), porém no 14º dia, a porcentagem deste estava maior ($p < 0,05$) para as feridas que receberam o tratamento com gel controle. Estas alterações podem ser avaliadas pelas Figuras 20A e 20B.

De acordo com vários autores, o colágeno é a proteína mais abundante do tecido conjuntivo em fase de cicatrização (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a; MEDEIROS; DANTAS FILHO, 2015; STEINER et al., 2019). A ativação dos fibroblastos para sintetizar o colágeno é derivada de fatores de crescimento e das próprias condições metabólicas da ferida (OLIVEIRA et al., 2010; BARROS et al., 2014).

Figura 21 - Comparação da área percentual de colágeno tipo I (A) e tipo III (B) após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com hidrogel contendo (1 →6)- β -D-glucana (lasiodiplodana). Tratamento com gel controle (■) e gel contendo lasiodiplodana (■)





*Diferenças estatística (n=6, *p<0,05) entre as amostras controle e teste.

Na derme, as fibras colágenas começam a se formar no tecido de granulação de forma desorganizada, com presença do colágeno tipo III no início da cicatrização, sendo posteriormente degradado e substituído pelo colágeno tipo I, mais denso e organizado (BALBINO; PEREIRA; CURTI, 2005). Na Figura 21 (A e B), é possível verificar a substituição do colágeno tipo III pelo tipo I quando comparado o 14º dia de tratamento para as feridas tratadas com gel contendo lasiodiplodana, pode-se verificar um decréscimo do colágeno tipo III e um respectivo aumento do colágeno tipo I, esse efeito pode ter sido estimulado pela ação da lasiodiplodana sobre os fibroblastos e queratinócitos, estimulando a maturação e organização das fibras colágenas.

Em estudo realizado por Nair, Ramam e Doble (2016), quantidades de 0,75% de (1→3)(1→6)-β-glucana proveniente de *Bradyrhizobium japonicum* foram incorporadas em hidrogel. O potencial do hidrogel na indução da cicatrização em excisões causadas em ratos Wistar foi avaliado, sendo verificada uma aceleração na cicatrização das feridas por promoção da reepitelização, remodelamento do tecido e deposição do colágeno. Os autores ainda destacam que o colágeno presente nas feridas tratadas com a glucana, era mais organizado e mais denso, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho.

As feridas apresentaram maior quantidade de fibras de colágeno do tipo I do que o tipo III, em ambos os tratamentos, havendo amadurecimento das fibras colágenas tipo III em tipo I em todos os períodos de tratamento, permitindo a formação de um tecido de reepitelização com um aspecto organizado. Quando comparados os

tratamentos, pode-se verificar que as feridas tratadas com gel contendo lasiodiplodana tiveram um efeito significativo em relação as tratadas com gel controle.

6 CONCLUSÕES

Um hidrogel contendo (1 →6)- β -D-glucana (lasiodiplodana), como princípio ativo, para uso tópico no tratamento de feridas foi desenvolvido. O hidrogel apresentou pH adequado para uso tópico, estabilidade físico-química e qualidade microbiológica. Também foi verificado potencial antioxidante da formulação especialmente em relação à capacidade de eliminação de radicais hidroxilas (OH•). O hidrogel contendo a β -glucana apresentou atividade indutora de cicatrização, pela estimulação da reepitelização e síntese de colágeno.

A bioatividade apresentada pela (1→6)- β -D-glucana (lasiodiplodana) evidencia o potencial dessa β -glucana na área farmacológica e sugere estudos posteriores voltados ao desenvolvimento de produtos para uso clínico e dermatocósméticos.

REFERENCIAS

ALMEIDA, L.; JAVOLOY, S.; FERNANDES, L. J.; LÓPES, R. J., Compararison between the tristimulus measurements Y_{xy} and $L^* a^* b^*$ to evaluate the colour of young red wines. **Food Chemistry**, n. 53, p. 321-327, 1995.

AKRAMIENĖ, D.; KONDROTAS, A.; DIDŽIAPETRIENĖ, J.; KĖVELAITIS, E.; Effects of β -glucans on the immune system. **Medicina (Kaunas)**, v. 43(8), p. 597-606, 2007.

ANDOLFI, A.; MADDAU, L.; CIMMINO, A.; LINALDEDDU, B. T.; BASSO, S.; DEIDDA, A.; SERRA, S.; EVIDENTE, A. Lasiolasmonates A–C, three jasmonic acid esters produced by *Lasiodiplodia sp.*, a grapevine pathogen. **Phytochemistry**, v. 103, p. 145–153, 2014.

AOAC. ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 14^a ed. Arligny: Sidney Willians, 1984.

AOAC. ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16^a ed. Washington D.C.: AOAC, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR: 21148: Cosméticos-Microbiologia: instruções gerais para pesquisa microbiológica**. Rio de Janeiro, p 21. 2008.

ALLEN JUNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9^o ed. Porto Alegre: ARTMED, 2013.

BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE JUNIOR, C. R.; PINTO, C.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E. P. G.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 44, p. 233-248, 2008.

BAI, Y.; LIU, L.; ZHANG, R.; HUANG, F.; DENG, Y.; ZHANG, M. Ultrahigh pressure-assisted enzymatic extraction maximizes the yield of longan pulp polysaccharides and their acetylcholinesterase inhibitory activity *in vitro*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 214–222, 2017.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p.27-51, 2005.

BARROS-FILHO, B. A.; NUNES, F. M.; OLIVEIRA, M. C. F.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; GONZALO, G.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; GOTOR, V. Bioreduction of prochiral ketones by growing cells of *Lasiodiplodia theobromae*: Discovery of a versatile biocatalyst for asymmetric synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, p. 37-40, 2010.

BARROS, E.M.L.; LIRA, R.S.R.; LEMOS, S.I.A.; BARROS, T.L.; RIZO, M.S.. Estudo do creme de buriti (*Mauritia flexuosa* L.) no processo de cicatrização. **ConScientiae Saúde**, v.13, n.4, p.603-610, 2014.

BERDAL, M.; APPELBOM, H. I.; EIKREM, J. H.; LUND, A.; ZYKOVA, S.; BUSUND, L. T.; SELJELID, R.; JENSSEN, T. Aminated beta-1,3-D-glucan improves wound healing in diabetic db/db mice. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, n. 6, p. 825-32, 2007.

BESSON, J. C. F.; HERNANDES, L.; CAMPOS, J. M.; MORIKAWA, K. A.; BERSANI-AMADO, C. A.; MATIOLI, G. Insulin complexed with cyclodextrins stimulates epithelialization and neovascularization of skin wound healing in rats. **Injury**, v. 48, n. 11, p.2417-2425, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopéia Brasileira**, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.

BUENO, F. G.; MOREIRA, E. A.; MORAIS, G. R.; PACHECO, I. A.; BAESSO, M. L.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. Enhanced cutaneous wound healing in vivo by standardized crude extract of *Poincianella pluviosa*. **Plos One**, v.11, p.1-13, 2016.

BORGUETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 531-537.

CHEN, X.; XU, X.; ZHANG, L.; ZENG, F. Chain conformation and anti-tumor activities of phosphorylated (1→3)-β-D-glucan from *Poria cocos*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 581-587, 2009.

CHEN, Y.; LI, X.; ZHOU, L.; LI, W.; LIU, L.; WANG, D.; ZHANG, W.; HUSSAIN, S.; TIAN, X.; LU, Y. Structural elucidation of three antioxidative polysaccharides from *Tricholoma lobayense*. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 484–492, 2017.

CHENG, H.; FENG, S.; JIA, X.; LI, Q.; ZHOU, Y.; DING, C. Structural characterization and antioxidante activities of polysaccharides extracted from *Epimedium acuminatum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 63-68, 2013.

COELHO, M. C. O.; REZENDE, C. M. F.; TENORIO, A. P. M. Contração de feridas após cobertura com substitutos temporários de pele. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 297-303, 1999.

CORRADI DA SILVA, M. L.; FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; MATIAS, A. C.; MONTEIRO, N. K.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; CARBONERO, E. R. Structural characterization of the cell wall D-glucans from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 793–798, 2008.

CORREA-NETO, M. P.; CAMPOS, A. C. L.; BRANCO, A. B.; MATIAS, J. E. F. Efeito da suplementação dietética de arginina na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 7-14, 2009.

CUNHA, M. A. A.; ALBORNOZ, S. L.; QUEIROZ SANTOS, V. A.; SÁNCHEZ, W. N.; BARBOSA-DEKKER, A.M.; DEKKER, R.F.H. Structure and biological functions of D-glucans and their applications. In: Atta-ur-Rahman, F.R.S. (Org.). **Studies in natural products chemistry**. Karachi: Elsevier, 2017. cap. 9, p. 309-338.

CUNHA, M. A. A.; TÚRMINA, J. A.; IVANOV, R. C.; BARROSO, R. R.; MARQUES, P. T.; FONSECA, E. A. I.; FORTES, Z. B.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, E. N.; BARBOSA, A. M. Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)-β-D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 1179-1188, 2012.

CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, p. 799-806, 2007.

DAMASCENO, M. P.; CREDA, G. M.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 411-414, 2003.

DANTAS, I. M. F. S. **Óleo da borra do café: determinação do EHL, ação promotora de absorção de fármacos e efeito hidratante na pele humana**, 2016. 112f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Farmácia) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPN, Recife.

DAUER, D. J.; FERRARO B.; SONG, L.; YU, B, MORA L; BUETTNER, R.; ENKEMANN, S.; JOVE, R; HAURA, E. B. Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. **Oncogene**, v. 24, n. 21, p. 3397-4408, 2005.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951-962, 2012.

FERREIRA, A. O. **Guia prático da farmácia magistral**. 4ª ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

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

GIESE E.C.; GASCON, J.; ANZELMO, G.; BARBOSA, A. M.; CUNHA, M. A. A.; DEKKER, R.F. H. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other β-D-glucans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p.1908-1914, 2015.

GUIDI, A. **Atividade cicatrizante do extrato bruto de *Poincianella pluviosa* incorporado a hidrogéis**, 2017, 106f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Farmácia) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá (UEM). Maringá.

GUO, S.; DIPIETRO, L.A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v.89, p.219- 229, 2010.

GUPTA, A.; KOWALCZUKB, M.; HEASELGRAVEB, W.; BRITLANDC, S. T.; MARTIND, C.; RADECKAB, I. The production and application of hydrogels for wound management: a review. **European Polymer Journal**, v. 111, p. 134-151, 2019.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, p. 314-321, 2008.

HEMMATI, A.A.; AGHEL, N.; RASHIDI, I.; GHOLAMPUR-AGHDAMI, A. Topical grape (*Vitis vinifera*) seed extract promotes repair of full thickness wound in rabbit. **International Wound Journal**, v.8, p.514-520, 2011.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CEREAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Official methods of the International Association of Cereal Science and Technology**. Schwechat, 1995.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; REGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v.89, p.125- 131, 2010.

JONG-SEOK, P.; YOUN-MOOK, L.; JAE, B.; JIN-OH, J.; SUNGJUN, A.; SUNG-IN J.; HUI-JEONG, G.; MYUNG-SEOB, K. Preparation and evaluation of *B*-glucan hydrogel prepared by the radiation technique for drug carrier applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 333-339, 2018.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAGIMURA, F. Y.; DA CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F.H.; MALFATTI, C. R. M. Biological activities of derivatized β -glucans: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 588-598, 2015a.

KAGIMURA, F. Y.; CUNHA, M. A. A.; THEIS, T. V.; MALFATTI, C. R. M.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; TEIXEIRA, S. D.; SALOMÉ, K. Carboxymethylation of (1→6)- β -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**. V. 127, p. 390–399, 2015b.

KING, B.; BARRETT, S.; CUTTING, K.F. Clinical evaluation of a bioactive beta-glucan gel in the treatment of 'hard-to-heal' wounds. **J. Wound Care**, v. 26, p. 58-63, 2017.

KORELO, R. I. G.; OLIVEIRA, J. J. J.; SOUZA, R. S. A.; HULLEK, R. F.; FERNANDES, L. C. Gerador de alta frequência como recurso para tratamento de úlceras por pressão: estudo piloto. **Fisioterapia em Movimento**, Curitiba, v. 26, n. 4, p. 715-724, 2013.

KNORST, M. T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) Compositae - marcela**, 1991. 228 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre.

KRISHNASWAMY, V.R.; KORRAPATI, P.S. Role of Dermatopontin in re-epithelialization: Implications on keratinocyte migration and proliferation. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, 9, 2014.

LEI, N.; WANG, M.; ZHANG, L.; XIAO, S.; FEI, C.; WANG, X.; ZHANG, K.; ZHENG, W.; WANG, C.; YANG, R.; XUE, F. Effects of Low Molecular Weight Yeast β -Glucan on Antioxidant and Immunological Activities in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 21575-21590, 2015.

LESAGE, G.; BUSSEY, H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 70, p.317-343, 2006.

LIMA, G. C.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A.; PIANNOVSKI, R. R.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; MUSIS, C. R. MACHADO, S. R. P. FERRARI, M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya olifera*). **Rev. Bras. Farm.** v.89, n.3, p.239-245, 2008.

LIU, J.; CHEN, J.; DONG, N.; MING, J.; ZHAO, G. Determination of degree of substitution of carboxymethyl starch by Fourier transform mid-infrared spectroscopy coupled with partial least squares. **Food Chemistry**, V. 132, p. 2224–2230, 2012.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; SUN, Y.; LU, Z.; ZENG, X. Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 275–281, 2009.

LIU, W.; WANG, H.; PANG, X.; YAO, W.; GAO, X. Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, p. 451–457, 2010.

LOCATELLI, M.; GINDRO, R.; TRAVAGLIA, F.; COÏSSON, J. D.; RINALDI, M.; ARLORIO, M. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 889–897, 2009.

MA, L.; CHEN, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, N.; FU, L. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 371-378, 2012.

MACKAY, D.; MILLER, A.L. Nutritional support for wound healing. **Alternative Medicine Review**, v.8, p.359-377, 2003.

MAITY, P.; NANDI, A. K.; MANNA, D. K.; PATTANAYAK, M.; SEM, I. K.; BHANJA, S. K.; SAMANTA, S.; PANDA, B. C.; PALOI, S.; ACHARYA, K.; ISLAM. Structural characterization and antioxidante activity of a glucana from *Meripilus giganteus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1237-1245, 2017.

MAJTAN, J.; JESENAK, M. β -Glucans: multi-functional modulator of wound healing-review. **Molecules**, v. 23, n. 806, p. 1-15, 2018.

MALFATTI, C. R. M. SANTOS, F. S.; WOUK, J.; SILVA, L.A.; MICHEL, R. G.; SNAK, A. L.; CZERVINSKI, T.; CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. Intracerebroventricular administration of the (1 \rightarrow 6)- β - d -glucan (lasiodiplodan) in male rats prevents d -penicillamine-induced behavioral alterations and lipoperoxidation in the cortex. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1289–1294, 2017.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, p.393-410, 2003a.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, p.525-542, 2003b.

MEDEIROS, A. C; DANTAS FILHO, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of Surgery and Clinical Research**, v.7, n.2, p.87-102, 2016.

MEDEIROS, W. S.; OLIVEIRA, B. G. R. B.; GRANJEIRO, J. M. Biomateriais e o corpo *in* FIGUEIREDO, N.M.A.; MACHADO, W.C.A. **Corpo e saúde: condutas clínicas do cuidar**. Rio de Janeiro: Águia Dourada, 2009.

MEDEIROS, S. D. V.; CORDEIRO, S.L.; CAVALCANTI, J. E.C.; MELCHUNA, K. M.; LIMA, A. M. S.; ARAUJO-FILHO, I.; MEDEIROS, A. C.; ROCHA, K. B. F.; OLIVEIRA, E. M.; FARIA, E. D. B.; SASSAKI, G. L.; ROCHA, H. A. O.; SALES, V. S. F. Effects of purified *Saccharomyces cerevisiae* (1 \rightarrow 3)- β -glucan on venous ulcer healing. **International Jornal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 8142-8158, 2012.

MEDINA-CÓRDOVA, N.; REYES-BECERRIL, M.; ASCENCIO, F.; CASTELLANOS, T.; CAMPA-CÓRDOVA, A. I.; ANGULO, C. immunostimulant effects and potential application of β -glucans derived from marine yeast *debaryomyces hansenii* in goat peripheral blood leucocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 116, p. 599-606, 2018.

MELLO, M. B.; MACHADO, C.S.; RIBEIRO, D. L.; AISSA, A. F.; CUNHA, M. A. A.; BARCELOS, G. R. M.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Protective effects of the exopolysaccharide Lasiodiplodan against DNA damage and inflammation induced by doxorubicin in rats: Cytogenetic and gene expression assays. **Toxicology**, v. 376, p. 66-74, 2017.

MENG, M.; CHENG, D.; HAN, L.; CHEN, Y.; WANG, C. Isolation, purification, structural analysis and immunostimulatory activity of water-soluble polysaccharides from *Grifola Frondosa* fruiting body. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1134–1143, 2017.

MITTERER-DALTOÉ, M. L.; PETRY, F. C.; WILLE, D. F.; TREPTOW, R. O.; MARTINS, V. M. V.; QUEIROZ, M. I. Chemical and sensory characteristics of meat from Nellore and Crioulo Lageano breeds. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2092-2100, 2012.

NAIR, A.V.; RAMAN, M.; DOBLE, M. Cyclic β -(1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) glucan/carrageenan hydrogels for wound healing applications. **RSC Adv.**, v. 6, p. 98545–98553, 2016.

NANDI, A. K.; SAMANTA, S.; MAITY, S.; SEN, I. K.; KHATUA, S.; DEVI, K. S.; ACHARYA, K.; ISLAM, S. S. Antioxidant and immunostimulant β -glucan from edible mushroom *Russula albonigra* (Krombh.) Fr. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 774–82, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NOVAK, M.; SYNITSYA, A., GEDEON, O.; SLEPICKA, P.; PROCHAZKA, V.; SYNITSYA, A.; BLAHOVEC, J.; HEJLOVA, A., COPIKOVA, J. Yeast β (1,3),(1,6)-D-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2496-2504, 2012.

OLIVEIRA, K. S. M.; BASTIANI, M.; CORDEIRO, L. M. C.; COSTA, M. F.; TOLEDO, K. A.; IACOMINI, M.; BABOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. (1 \rightarrow 6)-and (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -glucans from *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: Structural characterization and pro-inflammatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 539-546, 2015.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.

OLIVEIRA, A. F.; BATISTA, J. S.; PAIVA, E. S.; SILVA, A. E.; FARIAS, Y. J. M. D.; DAMASCENO, C. A. R.; BRITO, P. D.; QUEIROZ, S. A. C.; RODRIGUES, C. M. F.; FREITAS, C. I. A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p.302-310, 2010.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter Bases da Histologia**. 1^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier. 2008.

PARK, E.; LEE, S.M.; JUNG, I.K.; LIM, Y.; KIM, J.H. Effects of genistein on early-stage cutaneous wound healing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.410, p.514-519, 2011.

PINTO, S.; BUENO, F. G.; PANIZZON, G. P.; MORAIS, G.; DOS SANTOS, P. V.; BAESSO, M. L.; LEITE-MELLO, E. V.; MELLO, J. C. Stryphnodendron adstringens: clarifying wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **Planta Medica**, v. 81, n. 12/13, p.1090-1096, 2015.

RAKHSHAEI, R.; NAMAZI, H. A potential bioactive wound dressing based on carboxymethyl cellulose/ZnO impregnated MCM-41 nanocomposite hydrogel. **Mater. Sci. Eng.**, v.73 p.456-464, 2017.

RAVICHANDIRAN, V.; MANIVANNAN, S. Wound healing potential of transdermal patches containing bioactive fraction from the bark of *Ficus racemosa*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.7, p.326-332. 2015.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. In: (Ed.). 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005. cap. 3, p.91-124.

RODRIGUES, L. M.; OLIVEIRA, B. G. R. B.; CASTILHO, S. R. FUTURO, D. O. Safety and efficiency of carboximethylcellulose hydrogel 2% in leg ulcers. **J. res.: fundam. care**, v. 5, p.690-695, 2013.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas em correlação com biologia celular e molécula**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cell Research**, v.304, p.274-286, 2005.

SARANGI, I.; GHOSH, D.; BHUTIA, S. K.; MALLICK, S. K.; MAITI, T. K. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **International immunopharmacology**, v. 6, n. 8, p. 1287–1297, 2006.

SEHN, E.; HERNADES, I.; FRANCO, S. L.; GONÇALVES, C. C. M.; BAESSO, M. L. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 1, p.115-120, 2009.

SILVA, C. R. L.; FIGUEIREDO, N. M. A.; MEIRELES, I. B. **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem**. São Caetano do Sul (SP): Yendis Editora; 2007.

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELUTTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1. p. 85-92, 2006.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v.341, p.738-746, 1999.

STADELMANN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v.176, p. 26S-38S, 1998.

STEINER, D.; BOSCARATO, A. G.; ORLANDINI, C. F.; JARDIM, G. F.; ALBERTON, L. R. Considerações sobre o processo de cicatrização em feridas dermais em equinos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, p. 524-538, 2019

THEIS, T. V.; SANTOS, V.A.Q.; APPELT, P. DEKKER, A. M. B.; VETVICKA, V.; DEKKER, R. F. H. CUNHA, M. A.A. Fungal Exocellular (1-6)- β -D-glucan: Carboxymethylation, Characterization, and Antioxidant Activity. **Int J Mol Sci.** v. 20, n. 9, p. 2337, 2019.

TOLEDO, L. A. S.; BAVATO, M. I.; ROSSETO, H. C.; CORTESI, R.; BRUSCHI, M. L. Pharmaceutical films made from the waste material from the preparation of propolis extracts: development and characterization. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 4, p. 847-859, 2015.

TONDOLO, J. S. M.; LEDUR, P. C.; LORETO, E. S.; VERDI, C. M.; BITENCOURT, P.E. R.; JESUS, F. P. K.; ROCHA, J. P.; ALVES, S. H.; SASSAKI, G. L.; SANTURIO, J. M. Extration, characterization and biological activity of a (1,3)(1,6)- β -D-glucan from the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 719-727, 2017.

TÚRMINA, J. A; CARRARO, E.; CUNHA, M. A. A, DEKKER, R. F. H., BARBOSA, A. M., SANTO, F. S., SILVA, L. A. Malfatti, C. R. M. Toxicological Assessment of β -(1 \rightarrow 6)-Glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. **Molecules**, v. 17, p. 14298-14309, 2012.

USKOKOVIĆ, A.; MIHAILOVIĆ, M.; DINIĆ, S.; GRDOVIC, N.; POZNANOVIĆ, G.; ARAMBAŠIĆ, J.; MARKOVIĆ, J.; VIDA KOVIC, M. Administration of a β -glucan-enriched extract activates beneficial hepatic antioxidant and anti-inflammatory mechanisms in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1966–1974, 2013.

VASCONCELOS A. F. D; MONTEIRO, N. K.; DEKKER R. F. H; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; SASSAKI, G. L.; SILVA, R.; SILVA, M. L. C. Three exopolysaccharides of the β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan type and a β -(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2481-2485, 2008.

VASCONCELOS, A. F. D.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; CARBONERO, E. R.; SILVEIRA, J. L. M.; GLAUSER, B.; PEREIRA, M. S.; SILVA, M. L. C. Sulfonation and Anticoagulant Activity of Fungal Exocellular β -(1 \rightarrow 6)-D-Glucan (Lasiodiplodan). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1908-1914, 2013.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre Artmed, 2000.

VOGEL, H. J. A convenient growth médium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-47, 1954.

WANG, J.; WANG, Y.; LIU, X.; YUAN, Y.; YUE, T. Free radical scavenging and immunomodulatory activities of *Ganoderma lucidium* polysaccharides derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 33-38, 2013.

WEI, D.; ZHANG, L.; WILLIAMS, D. L.; BROWDER, I. W. Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis a nuclear factor-1 dependent mechanism.

Wound Repair and Regeneration, v. 10, p. 161-168, 2002.

WU, C.; CHEN, T.; XIN, Y.; ZHANG, Z.; REN, Z.; LEI, J.; CHU, B.; WANG, Y.; TANG, S. Nanofibrous asymmetric membranes self-organized from chemically heterogeneous electrospun mats for skin tissue engineering. **Biomed. Mater.**, v. 11, n.3, p. 1-13, 2016.

XIAO, C.; GAO, Y. Preparation and properties of physically crosslinked sodium carboxymethylcellulose/poly (vinyl alcohol) complex hydrogels. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, p. 1568-1572, 2008.

YAMAMOTO, K.; KIMURA, T. Orally and topically administered *Sparassis crispa* (hanabiratake) improved healing of skin wounds in mice with streptozotocin-induced diabetes. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 77, p. 1303–1305, 2013.

YOUNG, A.; McNAUGHT, C. The physiology of wound healing. **Surgery** (Oxford), v.29, p.475-479, 2011.

YOUNG, B.; LOWE J. S.; STEVENS, A.; HEATH, J. W. **Wheater: histologia funcional** – texto e atlas em cores. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier – Churchill Livingstone. 2007.

YUN, S.; KU, S.K.; KWON, Y.S. Effect of β -glucan from *Aureobasidium* on dermal wound healing in diabetic C57BL/KsJ-db/db mouse model. **J. Biomed. Res.**, v. 16, p.140–145, 2015.

ZHENG, P.; FAN, W.; WANG, S.; HAO, P.; WANG, Y.; WAN, H.; HAO, Z.; LIU, J.; ZHAO, X. Characterization of polysaccharides extracted from *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A.DC. affecting activation of chicken peritoneal macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v 96, p. 775–785, 2017.

ZHOU, T.X.; JUNG, J.H.; ZHANG, Z.F.; KIM, I.H. Effect of dietary β -glucan on growth performance, fecal microbial shedding and immunological responses after lipopolysaccharide challenge in weaned pigs. **Animal Feed Science and Technology**. v. 179, p. 85-92, 2013.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 275-288, 2016.

ANEXOS

ANEXO 1 - Folha de aprovação do CEUA.



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da atividade cicatrizante de um hidrogel contendo (1-6)-?-D-g (IASIODIPLODANA)", protocolada sob o CEUA nº 6010040418 (ID 001688), sob a responsabilidade de **Eneri Vieira de Souza Leite Mello e equipe; Ana Carolina Guidi; Letícia Sala de Oliveira; Candida Nissola; Camila Giroto da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 15/05/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the wound healing activity of a hydrogel containing (1-6) -Beta-D-g (IASIODIPLODANA).", utilizing 24 Heterogenics rats (24 males), protocol number CEUA 6010040418 (ID 001688), under the responsibility of **Eneri Vieira de Souza Leite Mello and team; Ana Carolina Guidi; Letícia Sala de Oliveira; Candida Nissola; Camila Giroto da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 05/15/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)Vigência da Proposta: de [08/2018](#) a [08/2019](#)Área: [Dcm-Ciências Morfológicas](#)Origem: [Biotério Central da UEM](#)Espécie: [Ratos heterogênicos](#)sexo: [Machos](#)idade: [50 a 60 dias](#)N: [24](#)Linhagem: [Wistar](#)Peso: [200 a 250 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Histotécnica Animal (Bloco H-79 UEM), Biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas (Bloco H-79 UEM), Palafito - Laboratório de Experimentação de Toxicologia Animal (Bloco T22).

Maringá, 15 de maio de 2018

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Dr. Claudemir Martins Soares
Coordenador Adjunto da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá