



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

FLAVIANE MARIA FLORÊNCIO MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO TÓPICO DE LESÕES
CUTÂNEAS COM FILMES OBTIDOS DO POLISSACARÍDEO
DA GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale L.*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Ciência Veterinária

Orientação:

Prof^ª Dr^ª Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientação:

Prof^ª Dr^ª Ana Maria dos Anjos C. Leão
Prof^ª Dr^ª Maria das Graças Carneiro da Cunha

Conselheira:

Prof^ª Dr^ª Maria Cristina Oliveira Cardoso
Coelho

Recife, 2006



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

FLAVIANE MARIA FLORÊNCIO MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO TÓPICO DE LESÕES
CUTÂNEAS COM FILMES OBTIDOS DO POLISSACARÍDEO
DA GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L.)**

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO

Recife-PE
Março, 2006

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

M775a Monteiro, Flaviane Maria Florêncio
Avaliação do tratamento tópico de lesões
cutâneas com filmes obtidos do polissacarídeo da
goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) /
Flaviane Maria Florêncio Monteiro . -- 2006.
163 f. il.

Orientadora : Ana Lúcia Figueiredo Porto
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Univer-
sidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento
de Medicina Veterinária.

Inclui bibliografia, anexo e apêndice

CDD 636.089 6

1. Cicatrização
 2. *Anacardium occidentale*
 3. Tripsina
 4. Imobilização
 5. Biomaterial
 6. Filme polimérico
- I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo
II. Título

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu amado marido, Aldrin Ederson Vila Nova Silva e a nosso tão sonhado filho, André Felipe Monteiro Vila Nova Silva, o meu muito obrigada pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos.

Dedico com muito carinho e reconhecimento por todo apoio e paciência as minhas Orientadoras Ana Lúcia Figueiredo Porto, Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão e Maria das Graças Carneiro da Cunha, minha ETERNA gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha saúde, família e amigos.

À minha mãe, Dorinha e irmãos pelo constante apoio e carinho.

Aos meus sogros Pedro Salvador Alves da Silva e Djardiére Vila Nova Silva, por todo apoio e principalmente por ajudarem a cuidar do Andrezinho durante esses dois últimos anos.

Às minhas orientadoras Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, Dra Maria das Graças Carneiro da Cunha por terem me dado a oportunidade de trabalhar neste projeto, dispensando-me inestimável colaboração, apoio e paciência.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária, que durante esses quatro anos me concedeu apoio e condições para o desenvolvimento das minhas atividades científicas.

À secretária do Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária, Edna Chérias, pela amizade, apoio e constante colaboração.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, pelo acesso às instalações do laboratório e todo o suporte concedido; as secretárias Conceição, Ilma e Izabel, por toda ajuda prestada.

A Carmelita de Lima Cavalcante e Mário Melo Júnior, do Setor de Patologia do LIKA, pela colaboração no histopatológico.

À Germana Silva, Joana Firmino e Juciene Rodrigues, pela importante colaboração para o desenvolvimento deste trabalho, com as quais divido todos os méritos.

À Michele Moreira, Cristiane Moutinho, Chirleanny Mendes, Éricka Albuquerque, Graça Paiva e, com especial carinho, Giuliana Schirato, pela amizade e todo apoio prestado.

Às irmãs Camila e Tatiana Porto, pela inestimável colaboração para o desenvolvimento dos artigos, vocês são um exemplo.

A todos do setor de Bioquímica do LIKA, em especial ao prof^o Dr Luiz de Carvalho, a prof^a Maria da Paz e aos pós-graduandos Givanildo, Ian Porto, Katarina e Jaqueline, pelas sugestões e apoio no desenvolvimento da tese.

A prof^a Dr^a Vanda pela disponibilização do laboratório de Cultura de Tecidos para o preparo das membranas, apoio e sugestões.

Aos funcionários do Biotério do LIKA, Maria Helena Madruga e Luiz Felipe Viegas, pela disponibilização e manutenção dos animais ao longo dos experimentos *in vivo*.

À Maria Inês Cavalcanti, veterinária do Biotério do Ageu Magalhães pela amizade, apoio e ajuda na aquisição de animais.

Ao Prof. Dr. Romildo Nogueira, pelo auxílio na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Arquimedes de Melo pelos muitos ensinamentos e apoio.

À Prof^a Dr^a Maria de Mascena Diniz Maia (Mana), pelo exemplo de profissionalismo, apoio e valorosas sugestões para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, em especial à Belmira, Reginaldo e Valdir, pelo apoio, compreensão e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley pelo apoio e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do setor de Biotecnologia do LIKA, que colaboraram com a realização deste trabalho: Taciana, Rosangela Frade, Neide, Keila, DanielaViana, Daniela Bruneska, Alessandro, Flavio, Pabyton e Roberto

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que colaboraram de forma direta ou indiretamente na concretização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. CICATRIZAÇÃO	3
2.2. BIOMATERIAIS	12
2.3. POLISSACARÍDEOS	15
2.3.1. POLISSACARÍDEOS UTILIZADOS COMO BIOMATERIAL	15
2.3.2. POLISSACARÍDEOS DE AÇÃO CICATRIZANTE	17
2.4. PROTEASES	21
2.5. IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
4. OBJETIVOS	45
5. ARTIGO 1	46
Avaliação do efeito cicatrizante do filme polimérico obtido do polissacarídeo do <i>Anacardium occidentale</i> L. sobre o processo cicatricial de lesões cutâneas experimentais	
6. ARTIGO 2	75
Imobilização de tripsina em filmes de polissacarídeo do <i>Anacardium occidentale</i> L. e sua aplicação como curativo em lesões cutâneas	

7. ARTIGO 3	94
Utilização de planejamento experimental para obtenção das melhores condições de enclausuramento de tripsina em filmes do polissacarídeo do <i>Anacardium occidentale</i> L. como curativo	
8. ARTIGO 4	119
Aplicação de filme de POLICAJU contendo tripsina enclausurada como curativo oclusivo primário em lesões cutâneas experimentais	
9. CONCLUSÕES FINAIS	144
10. ANEXOS	145
11. APÊNDICES	162

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1- Representação esquemática dos eventos do processo cicatricial (SCHIRATO, 2006).....5

Artigo 1: Avaliação do efeito cicatrizante do filme polimérico obtido do polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. sobre o processo cicatricial de lesões cutâneas experimentais

Figura 1- Frequência relativa de edema (%). (A) grupos Controle AA (ácido acético 4%) e Grupo POLICAJU/AA (POLICAJU/ Ácido acético) e (B) grupos Controle NaCl (NaCl 0,15M) e POLICAJU/NaCl (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v)..... 62

Figura 2- Frequência relativa de 1ª crosta (%). (A) grupos Controle AA (ácido acético 4%) e Grupo POLICAJU/AA (POLICAJU/ Ácido acético) e (B) grupos Controle NaCl (NaCl 0,15M) e POLICAJU/NaCl (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v).....63

Figura 3- Frequência relativa de 2ª crosta (%). (A) grupos Controle AA (ácido acético 4%) e Grupo POLICAJU/AA (POLICAJU/ Ácido acético) e (B) grupos Controle NaCl (NaCl 0,15M) e POLICAJU/NaCl (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v).....64

Figura 4- Frequência relativa de exsudato (%). (A) grupos Controle AA (ácido acético 4%) e Grupo POLICAJU/AA (POLICAJU/ Ácido acético) e (B) grupos Controle NaCl (NaCl 0,15M) e POLICAJU/NaCl (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v).....65

Figura 5- Evolução das áreas das lesões após tratamento utilizando ácido acético 4% (Controle AA), POLICAJU/AA (A) e NaCl 0,15M (Controle NaCl), POLICAJU/NaCl (B).....66

Figura 6 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo (fase inflamatória), após 48 horas. Coloração Tricrômico de Masson. Ampliação original 100x. A, NaCl 0,9%; B, Ácido Acético 4%; C, POLICAJU-NaCl; D, POLICAJU-Ácido Acético.....67

Figura 7 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo (fase inflamatória), após 7 dias. Coloração Tricrômico de Masson. Ampliação original 200x. A, NaCl 0,9%; B, Ácido Acético 4%; C, POLICAJU-NaCl; D, POLICAJU-Ácido Acético.....68

Figura 8 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo (fase inflamatória), após 12 dias. Coloração Tricrômico de Masson. Ampliação original 200x. A, NaCl 0,9%; B, Ácido Acético 4%; C, POLICAJU-NaCl; D, POLICAJU-Ácido Acético.....69

Artigo 2: Imobilização de tripsina em filmes de polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. e sua aplicação como curativo em lesões cutâneas.

Figura 1- Cinética de liberação da tripsina no DEI, em solução tampão citrato-fosfato 0,2M, pH 5,0 a 25°C.....82

Figura 2- Efeito do pH sobre a atividade da enzima livre (◆) e no DEI (■). Soluções tampão pH 5,0-5,4 (citrato-fosfato, 0,2M), pH 6,2-6,8 (fosfato de sódio, 0,2M), pH 7,2-9,0 (Tris-HCl, 0,2M) e pH 9,0-10,2 (glicina-NaOH, 0,2M)......83

Figura 3- Atividade relativa da enzima livre (◆) e do DEI (■) em função da temperatura.84

Figura 4- Efeitos do pH na estabilidade do DEI após 60 minutos a 25°C. Soluções Tampão: pH 5.0 (0.2M citrato-phosphato), pH 6.2 (0.2Mfosfato de sódio), pH 7.2-9.0 (0.2M Tris-HCl) and pH 9.4-10.2 (0.2M glycina-NaOH). A atividade inicial em cada pH testado foi considerada como 100%.....85

Figura 5- Estabilidade térmica do DEI após 60 min. A atividade inicial foi considerada 100%.....86

Figura 6- Estabilidade da tripsina imobilizada (1000µg/ml) em POLICAJU/AA ao longo de 28 dias de armazenamento a temperatura ambiente 25±3°C..... 87

Figura 7- Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo após tratamento de 2 (A, B e C) e 12dias (D, E e F) com curativos contendo, respectivamente NaCl 0,15M; Ácido Acético 4%; POLICAJU/AA Tripsina (1000µg/ml). Coloração Tricrômico de Masson. Ampliação original 100x.....89

Artigo 3: Utilização de planejamento experimental para obtenção das melhores condições de enclausuramento de tripsina em filmes do polissacarídeo do *Anacardium occidental* L. como curativo.

Figura 1- Gráfico de Pareto dos efeitos principais sobre a atividade específica da tripsina imobilizada (erro puro = 0.103).....104

Figura 2- Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos do planejamento 2², sobre a atividade específica da tripsina para analisar a concentração de tripsina em função da temperatura de imobilização.....105

Figura 3- Relação da concentração de tripsina e da temperatura sobre a atividade específica da tripsina imobilizada em POLICAJU.....106

Figura 4- Efeito do pH na atividade da enzima livre e no DEI. Soluções tampão 0,2M: pH 5,0-5,4 (citrato-fosfato), pH 6,2-6,8 (fosfato de sódio), pH 7,2-9,0 (Tris-HCl) e pH 9,4-10,2 (glicina-NaOH). (♦) Enzima livre (□) tripsina imobilizada.....107

Figura 5- Efeito da temperatura sobre a atividade da tripsina livre e imobilizada. A atividade específica máxima (100%) da tripsina livre e do DEI na temperatura de 55°C foi, respectivamente, $0,620 \pm 0,032$ e $0,236 \pm 0,025$ U/m/L. (♦)Enzima livre e (□) DEI.....108

Figura 6- Efeito do pH sobre a estabilidade da tripsina imobilizada (DEI) durante 60 min. A atividade inicial (0 min) da tripsina imobilizada em cada valor de pH (Citrato-fosfato pH 5,0, Citrato-fosfato pH 6.2, Fosfato de Sódio pH 7.2, Tris-HCl pH 7.8, Tris-HCl pH 9.0, Glicina-NaOH pH 9.4, Glicina-NaOH pH 10.2) foi considerada como 100 %.....109

Figura 7- Efeito da temperatura sobre a estabilidade da tripsina imobilizada durante 60 min. A atividade inicial (0 min.) da tripsina imobilizada em cada valor de temperatura foi considerada como 100%.....110

Figura 8- Estabilidade da tripsina imobilizada em POLICAJU/NaCl ao longo de 28 dias de armazenamento a temperatura ambiente ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$).....111

Figura 9 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo após tratamento por 2dias (A e B) e 12dias (C e D) com curativos contendo, respectivamente NaCl 0,15M; POLICAJU-NaCl Tripsina (100µg/mL). Coloração Tricrômico de Masson. Ampliação original 100x.....112

Artigo 4: Aplicação de filme de POLICAJU contendo tripsina enclausurada como curativo oclusivo primário em lesões cutâneas experimentais.

Figura 1- Frequência relativa de edema (%). (A) Grupo C (NaCl 0,15M) e Grupo POLICAJU/NaCl/T (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v). (B) Grupo Controle AA (ácido acético 4%), AAT (ácido acético 4%, 1000µg/ml) e Grupo POLICAJU/AA/T (POLICAJUT/ Ácido acético m/v).....131

Figura 2- Frequência relativa de 1^a crosta. (A) Grupo C (NaCl 0,15M) e Grupo POLICAJU/NaCl/T (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v). (B) Grupo Controle AA (ácido acético 4%), AAT (ácido acético 4%, 1000µg/ml) e Grupo POLICAJU/AA/T (POLICAJUT/ Ácido acético m/v).....132

Figura 3- Frequência relativa de 2^a crosta (%). (A) Grupo C (NaCl 0,15M) e Grupo POLICAJU/NaCl/T (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v). (B) Grupo Controle AA (ácido acético 4%), AAT (ácido acético 4%, 1000µg/ml) e Grupo POLICAJU/AA/T (POLICAJUT/ Ácido acético m/v).....133

Figura 4- Frequência relativa de exsudato (%). (A) Grupo C (NaCl 0,15M) e Grupo POLICAJU/NaCl/T (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v). (B) Grupo Controle AA (ácido acético 4%), AAT (ácido acético 4%, 1000µg/ml) e Grupo POLICAJU/AA/T (POLICAJUT/ Ácido acético m/v).....134

Figura 5- Evolução das áreas das lesões dos Grupos (A) Controle NaCl (NaCl 0,15M) e POLICAJU/NaCl/T (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v); (B) Controle AA (ácido acético 4%), Controle AAT (ácido acético 4%, 1000µg/ml) e Grupo POLICAJU/AA/T (POLICAJUT/ Ácido acético m/v).....135

Figura 6 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo (fase inflamatória), após 48 horas. Coloração Tricrômico de Masson. A, Controle Ácido Acético 4% (Ampliação original 100x); ; B, Controle Ácido Acético – Tripsina (Ampliação original 40x);C, NaCl 0,9% (Ampliação original 100x); ; D, POLICAJU Tripsina – Ácido Acético (Ampliação original 100x); E, POLICAJU Tripsina – NaCl (Ampliação original 100x).....136

Figura 7 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo (fase inflamatória), após 7 dias. Coloração Tricrômico de Masson. A, Controle Ácido Acético 4% (Ampliação original 100x); B, Controle Ácido Acético – Tripsina (Ampliação original 100x); C, NaCl 0,9% (Ampliação original 200x); D, POLICAJU Tripsina – Ácido Acético (Ampliação original 200x); E, POLICAJU Tripsina – NaCl (Ampliação original 100x).....137

Figura 8 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo (fase inflamatória), após 12 dias. Coloração Tricrômico de Masson. A, Controle Ácido Acético 4% (Ampliação original 100x); B, Controle Ácido Acético – Tripsina (Ampliação original 200x); C, NaCl 0,9% (Ampliação original 200x); D, POLICAJU Tripsina – Ácido Acético (Ampliação original 200x); E, POLICAJU Tripsina – NaCl (Ampliação original 100x).....138

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1 – Principais eventos da cicatrização (adaptado de STADELMAN et al., 1998).....4

Artigo 3: Utilização de planejamento experimental para obtenção das melhores condições de enclausuramento de tripsina em filmes do polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. como curativo.

Tabela 1- Níveis das variáveis de controle utilizados nos estudos do DEI.....99

Tabela 2- Imobilização da tripsina utilizando o planejamento fatorial completo (2^2) + 2 pontos centrais (C).....99

Tabela 3- Resultados dos ensaios de imobilização da tripsina no POLICAJU conforme planejamento estatístico (2^2).....102

LISTA DE ABREVIATURAS

ADAMS - desintegrina metaloproteinase

ANOVA - análise de variância

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DEI – Derivado enzimático imobilizado

EGF - Fator de Crescimento Epidermal

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos

GAGs - glicosaminoglicanos

IL - interleucina

LIKA- Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

MEC - matriz extracelular

MMP - metaloproteinases de matriz

MRB - Modificador da resposta biológica

NO - óxido nítrico

P.O.- pós-operatório

PA - ativadoras de plasmonogênio

PARs - receptores ativadores de proteases acoplados a proteína G

PGDF - Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

PMN - leucócitos polimorfonucleares

POLICAJU- Polissacarídeo do cajueiro (*Anacardium occidentale*)

TGF- β - Fator de Crescimento Transformante β

TIMPs - inibidores de metaloproteinases teciduais

TNF - Fator de Necrose Tumoral

U- unidade de atividade

RESUMO

Os efeitos do tratamento do filme polimérico preparado com o polissacarídeo extraído da goma do *Anacardium occidentale* L. foram avaliados em lesões cutâneas excisionais em camundongos albino *Swiss*, através do acompanhamento da evolução do processo cicatricial cutâneo, sob os aspectos clínicos e histopatológicos. Após a realização do procedimento cirúrgico, 4 grupos (n=15/grupo) foram formados de acordo com o tratamento empregado: 1, NaCl (NaCl 0,15M); 2, AA (ácido acético 4% v/v); 3, POLICAJU/AA (filme polimérico contendo POLICAJU 10% m/v em ácido acético 4% v/v) e 4, POLICAJU/NaCl (filme polimérico contendo POLICAJU 10% m/v em NaCl 0,15M). Amostras de tecido foram fixadas e coradas (Tricrômico de Masson) e analisada no 2º, 7º e 12º dias P.O.. No grupo POLICAJU/AA foi observado diminuição dos sinais flogísticos representados por presença de edema, crosta e exsudato. Do ponto de vista histopatológico, os grupos tratados com POLICAJU apresentaram reepitelização parcial e tecido de granulação fibroso, especialmente no grupo POLICAJU/NaCl. Assim, conclui-se que os filmes poliméricos contendo POLICAJU, aplicados como curativos oclusivos, foram eficazes no processo de reparo tecidual cutâneo. A utilização de filmes obtidos do POLICAJU como matriz para imobilização de tripsina (DEI), por enclausuramento, e sua aplicação como curativo em lesões cutâneas foi avaliada. O DEI demonstrou uma liberação constante da tripsina, pH e temperatura ótimos de 8,6 e 55°C, nas condições analisadas e mostrou-se estável nas condições do meio, retendo cerca de 80% (28 dias a 25°C) da sua atividade inicial. As lesões tratadas com o DEI apresentaram padrão morfológico mais organizado quando comparado aos controles (NaCl 0,15M e ácido acético 4% v/v). Estes resultados demonstram que o POLICAJU pode ser utilizado como matriz para imobilização de tripsina e um potencial biomaterial. Um planejamento experimental (2º) foi aplicado para determinação das melhores condições de enclausuramento da tripsina em filmes de POLICAJU. Para esse estudo foram analisados os efeitos da concentração de tripsina e da temperatura sobre sua atividade. Observou-se que dos parâmetros analisados a menor concentração de tripsina (100µg/mL) foi a melhor condição de imobilização. Este sistema foi avaliado quanto a influência do meio (pH e temperatura) e aplicação tópica. Os valores ótimos de pH e a temperatura foram 9,0 e 55°C, demonstrando estabilidade a ampla faixa de temperatura (25-65°C), quanto ao armazenamento o DEI reteve cerca de 30% de sua atividade (28 dias). Os resultados das avaliações histopatológicas demonstraram uma aceleração do processo cicatricial. A partir dos resultados da imobilização de tripsina enclausurada em POLICAJU/NaCl e POLICAJU/AA, o DEI foi aplicado como curativo oclusivo no tratamento de lesões cutâneas sendo avaliado seus efeitos sob os aspectos clínicos e histopatológico. Após o procedimento cirúrgico 5 grupos foram formados de acordo com o tipo de tratamento (n=15/grupo): 1, NaCl; 2, AA; 3, AAT; 4, POLICAJUT/AA e 5, POLICAJUT/NaCl. Amostras de tecido foram fixadas e coradas (Tricrômico de Masson) nos 2º, 7º e 12º dias após a cirurgia. As lesões tratadas com POLICAJUT/NaCl quanto aos parâmetros clínicos e histopatológicos apresentaram uma melhor evolução quando comparado aos demais grupos. Os resultados obtidos a partir de todos os estudos de imobilização e aplicação biológica demonstram a eficácia do filme POLICAJUT/NaCl com curativo oclusivo.

ABSTRACT

The effect of the treatment of the polymeric film preparation with the extracted polysaccharide of the gum of the *Anacardium occidentale* L. was evaluated in excisional cutaneous injuries in mice albino Swiss, through the accompaniment of the evolution of the healing cutaneous process, under the clinical and histopathological aspects. After the accomplishment of the surgical procedure, 5 groups (n=15/grupo) had been formed in accordance with the employed treatment: 1. NaCl (NaCl 0,15M); 2. AA (acetic acid 4% v/v); 3. POLICAJU/AA (polymeric film I containing acetic POLICAJU 10% m/v in acid 4% v/v) and 4, POLICAJU/NaCl (polymeric film I containing POLICAJU 10% m/v in NaCl 0,15M). Tissue samples had been fixed and staining (Tricrômico de Masson) and analyzed in 2nd, 7th and 12th post-surgical (P.S.) days. In group POLICAJU/AA it was observed reduction of the inflammatory signals represented by presence of edema, crust and exudate. Histopathological point of view, the groups treatment with POLICAJU had presented partial reepithelization and soft granulation tissue, specially in the POLICAJU/NaCl group. Thus, it is concluded that the polymeric films I containing POLICAJU, applied as occlusive dressings, had been efficient in the process of cutaneous tissue repair. The use of films obtained of the POLICAJU for trypsin immobilization (DEI), by entrapment, and its application as dressing in cutaneous injuries was evaluated. DEI it demonstrated it to a constant release of the trypsin optimal pH and temperature of 8,6 and 55°C, in the analyzed conditions and revealed stability stored in the conditions retained about 80% (28 days 25°C) of its initial activity. The wound treatment with DEI it had more presented organized morphologic standard when compared with the controls (NaCl 0,15M and acetic acid 4% v/v). These results demonstrate that the POLICAJU can be used as matrix for trypsin immobilization and a biomaterial potential. An experimental design (2) was applied for determination of the best conditions of entrapment of the trypsin in POLICAJU films. For this study the effect of the concentration of trypsin and the temperature on its activity had been analyzed. It was observed that of the analyzed parameters the lesser concentration of trypsin (100ug/mL) was the best condition of immobilization. This system was evaluated how much it influences environmental (pH and temperature) and topic application. The best values of pH and the temperature had been 9,0 and 55C, demonstrating to stability the range of temperature (25-65C), how much to the storage DEI it retained 30% of its activity (28 days). The results of the histopathological evaluations had demonstrated an acceleration of the healing process. From the results of the immobilization of trypsin entrapment in POLICAJU/NaCl and POLICAJU/AA, DEI it was applied as occlusive dressing in the treatment of cutaneous wounds being evaluated its effect under the clinical aspects and histopathology. After the surgical procedure 5 groups had been formed in accordance with the type of treatment (n=15/grupo): 1. NaCl; 2. AA; 3. AAT; 4. POLICAJUT/AA and 5, POLICAJUT/NaCl. Tissue samples had been fixed and staining (Tricrômico of Masson) in the 2nd, 7th and 12th days after the surgery. The wound treatment with POLICAJUT/NaCl how much to the clinical and histopathology parameters they had presented one better when comparative evolution to the too much groups. The results gotten from all the studies of immobilization and biological application demonstrate the effectiveness of the POLICAJUT/NaCl film with occlusive dressing.

1. INTRODUÇÃO

O processo de reparo existe para restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido, sendo a cura de uma ferida, uma sucessão complexa de eventos bioquímicos e celulares em resposta à lesão tecidual. Para que um ferimento seja curado com êxito, os eventos devem se suceder numa seqüência apropriada, e o resultado final, geralmente uma cicatriz de tecido conjuntivo, representa o somatório desse processo (CARVALHO, 2002; SANTORO & GAUDINO, 2005). Assim, se a ferida constitui a solução de continuidade anátomo-fisiológica da área lesada, a cicatriz corresponde à tentativa biológica a qual o organismo recorre para restaurar sua integridade (COHEN et al., 1992).

A cicatrização é uma complexa resposta orgânica a uma lesão tecidual que envolve alterações locais e sistêmicas (TOGNINI et al, 1998; BIONDO-SIMÕES, 2000; KAPPOR & APPLETON, 2006). Portanto, o entendimento dos fatores que influenciam cada uma das etapas do processo de reparo permite otimizar a avaliação clínica, definir rumos para decisões de natureza terapêutica e desenvolver produtos que otimizem a resolução do processo. Nesse contexto, o alto índice de perdas cutâneas que acometem os animais justificam a ampliação das pesquisas no campo de novos medicamentos (COELHO et al., 2001).

Atualmente, é grande o interesse das indústrias farmacêuticas pelo uso da biodiversidade como fonte de novos medicamentos. O uso de produtos naturais como ponto de partida para o desenvolvimento de novos princípios ativos oferece vantagens: a existência de uma grande variedade de estruturas químicas (bi e tridimensionais), possibilidade de utilização como um “banco de moléculas” para *screenings*, economia, fonte de novas moléculas para alvos moleculares complexos, considerando-se ainda o

fato de serem uma fonte biológica renovável, cuja obtenção racional não causará efeitos sobre o meio ambiente. Entretanto, uma das tarefas mais difíceis no estudo farmacológico de princípios ativos isolados de produtos naturais, refere-se ao esclarecimento de seu mecanismo de ação, o que requer a articulação de técnicas de biologia molecular e celular, bioquímica e estudos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* (CALIXTO, 2001). Alguns relatos têm mencionado que elementos existentes na natureza poderiam constituir fontes de materiais alternativos para o tratamento local das feridas, já que os curativos disponíveis, sintéticos ou biossintéticos, utilizados tanto no homem como em outras espécies são onerosos (SILVA et al., 2000; NAGAPPA, 2001).

Um aspecto relevante a ser considerado diz respeito à reputação de eficácia e segurança dos produtos naturais, uma vez que muitos têm sido usados sem testes científicos de validação farmacológica/farmacêutica rigorosos e sendo de qualidade extremamente variável (CAPASSO et al., 2000).

No presente trabalho, é importante considerar que o filme polimérico proposto foi elaborado a partir de um polissacarídeo do cajueiro, uma árvore amplamente distribuída em regiões litorâneas do Nordeste brasileiro e pertencente ao gênero *Anacardium*. Várias espécies de *A. occidentale* apresentam casca resinosa contendo uma goma que é constituída principalmente por um heteropolissacarídeo ramificado ácido (POLICAJU), cujas características físico-químicas previamente determinadas (MENESTRINA et al., 1998) permitem a sua utilização inclusive na área médica, no processo de reabilitação de lesões cutâneas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CICATRIZAÇÃO

A cicatrização de lesões cutâneas é um processo biológico dinâmico bem ordenado, onde a lesão tecidual acarreta rompimento e extravasamento de vasos sanguíneos. Para estudo, este processo pode ser didaticamente dividido nas seguintes fases: hemostasia, fase inflamatória, fase proliferativa ou de granulação e de remodelação da matriz extracelular (BRANSKI et al., 2005, SHIMIZU, 2005), como apresentado na Tabela 1 e na Figura 1. Logo após o tecido ser lesionado, uma cobertura primária composta por fibrina restabelece a homeostase e fornece um ambiente transitório para as plaquetas secretarem fatores de crescimento (FCs), citocinas e matriz extracelular (MEC). Estes mediadores do processo inflamatório recrutam macrófagos e neutrófilos que secretam diversos fatores específicos que orquestram as fases seguintes do processo de reparação tecidual (SANTORO & GAUDINO, 2005).

Durante a evolução do processo de cicatrização podem ser sequencialmente evidenciadas a fase inicial ou inflamatória, a de fibroplasia ou proliferativa e a de maturação ou contração da lesão (KUMAR et al., 2005). Cada fase apresenta uma célula ou substância característica sem a qual o processo não evolui normalmente. Uma grande variedade de fatores pode interferir em qualquer fase da cicatrização e os principais fatores locais incluem sangramento, tensão de oxigênio e bactérias (ARAÚJO et al., 1998; MENSAH et al., 2001).

Tabela 1 – Principais eventos da cicatrização (adaptado de STADELMAN et al., 1998)

Eventos imediatos	Hemostasia
	Geração de estímulos para a inflamação
Inflamação	Vasodilatação
	Aumento da vasopermeabilidade
	Infiltração de leucócitos
	Morte bacteriana
	Estimulação de macrófagos (proliferação celular e síntese protéica)
Migração e proliferação celular (síntese do tecido de granulação)	Fibroblastos
	Angiogênese
	Reepitelização (início)
Síntese molecular	Colágeno
	Proteoglicanos
Polimerização do colágeno	Aumento da força tênsil do tecido neoformado
Remodelação do colágeno	Colagenólise
	Alteração nas características mecânicas do tecido
	Remodelação vascular
Contração da ferida	

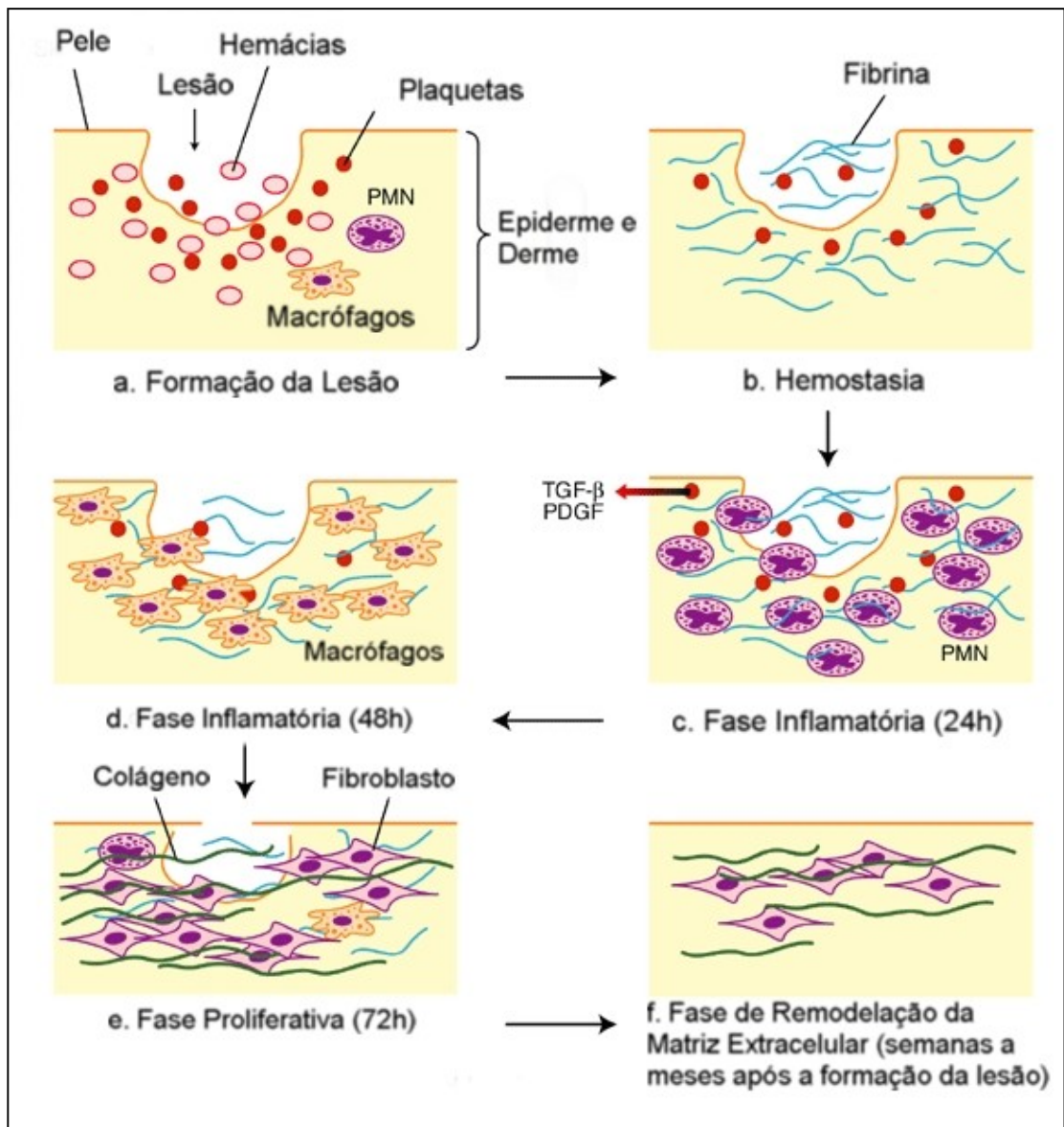


Figura 1- Representação esquemática dos eventos do processo cicatricial (SCHIRATO, 2006)

A fase inflamatória inicia-se logo após a lesão (WRIGHT et al., 1992) e é caracterizada pela vasodilatação local com o desenvolvimento de edema, calor, rubor e dor (MODOLIN, 1992). Esta vasodilatação permite o afluxo de sangue, proteínas séricas, fatores de coagulação e plaquetas, que, ao serem ativadas, iniciam o processo de coagulação e liberam substâncias como: fatores de crescimento, fibrinogênio e fibronectina, que promovem a migração de células para a ferida (KOOPMAN, 1995). No sítio do foco inflamatório, tais células recrutadas se acumulam e tornam-se ativas.

Em seguida, os macrófagos removem a fibrina remanescente, a MEC danificada e restos celulares tendo, portanto, um papel fundamental na transição entre o processo inflamatório e a fibroplasia, uma vez que possuem fatores de crescimento que atraem fibroblastos para a ferida e estimulam a sua proliferação e posterior síntese de colágeno (WRIGHT et al., 1992). O prolongamento da fase inflamatória influencia a fase de fibroplasia, e assim, quanto mais prolongada essa fase, mais tardiamente começa a deposição dos fibroblastos na região (ARAÚJO et al., 1998).

A resposta inflamatória ocorre no tecido conjuntivo vascularizado, inclusive no plasma, nas células circulantes, nos vasos sanguíneos e nos componentes extravasculares do tecido conjuntivo. As células circulantes incluem neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas (COTRAN et al., 1996). Assim, a resposta celular é caracterizada, entre outros fatores, pela migração seqüencial de leucócitos para a ferida. No prazo de 24 horas, a lesão apresenta predominância de leucócitos polimorfonucleares (PMN), seguidos pelos macrófagos (COHEN et al., 1992). Os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao sítio da lesão. O papel principal destas células é prevenir a infecção do tecido agredido, bem como eliminar detritos da MEC e corpos estranhos. Os macrófagos se destacam por comandarem as demais células durante os eventos que determinam o reparo tecidual, devido à capacidade de produzirem numerosas citocinas como: Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PGDF), Fator de Crescimento Transformante β (TGF- β), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), entre outras. As citocinas produzidas por macrófagos e linfócitos provocam o influxo de neutrófilos, bem como a migração e proliferação de células endoteliais, fibroblastos e células indiferenciadas que começarão a repopular o sítio da

lesão. Assim, pode-se ressaltar o papel central desempenhado pelos macrófagos entre o reparo e a inflamação (RICHES, 1996; DANTAS, 2000).

Depois de 1 ou 2 dias, monócitos teciduais entram no local da lesão e se diferenciam em macrófagos que participam e concluem o processo inflamatório e realizam debridamento no local da lesão. Seu efeito antimicrobiano ocorre através de fagocitose e pela liberação de radicais livres, tais como oxigênio, óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (SCHÄFFER et al., 1996). O debridamento é facilitado pela fagocitose e pela produção de enzimas proteolíticas, como a colagenase e elastase (PARK e BARBUL, 2004; SZPADERSKA e DIPIETRO, 2005).

A duração do estágio inflamatório depende de vários fatores, como a intensidade da contaminação, a extensão do tecido lesado e a presença de infecção. Uma ferida limpa, na qual não há agentes microbianos presentes, pode ser caracterizada por atingir o pico de resposta inflamatória em 3-4 dias. A progressão da regeneração é acompanhada pela diminuição gradual e contínua das células inflamatórias (BANKS, 1991).

A fase fibroplásica consiste principalmente na formação de tecido de granulação, reepitelização e contração da ferida. É caracterizada pelo aumento do número de fibroblastos, que iniciam a síntese e secreção de componentes da MEC (principalmente glicosaminoglicanos-GAGs e colágenos tipo I e III), seguida pela proliferação celular e angiogênese (STEED, 1997; COTRAN et al., 2000).

Há no local do trauma um afluxo de fibroblastos que se depositam, multiplicam e sintetizam substâncias. Ocorre intensa proliferação endotelial, de maneira que se forma um tecido denominado de granulação, o qual devido a sua capacidade contrátil diminui a área de superfície cruenta das feridas, facilitando a epitelização. O tecido de granulação formado durante a fase fibroplásica, por volta do quarto dia após a lesão, é

rico em vasos, tem um aspecto úmido e sua função primordial é preencher o espaço deixado pela ferida, servindo também como barreira a microorganismos (GUIDUGLI- NETO, 1987; MADRI et al., 1990; MODOLIN, 1992). A MEC começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico, com a ativação de macrófagos na ferida e com a elaboração de fatores de crescimento específicos (CARVALHO, 2002).

O colágeno é o principal componente da cicatriz de tecido conjuntivo maduro. Na ferida em processo de cura, fibroblastos produtores de colágeno são recrutados na margem da ferida e induzidos a sintetizar essa proteína num processo conhecido como fibroplasia. Ocorre neovascularização concorrentemente com a fibroplasia, de modo que novos capilares brotam dos tecidos viáveis na borda da ferida, migrando centripetamente (CARVALHO, 2002).

Os fenômenos da contração e da reepitelização contribuem para o fechamento da lesão. Uma das primeiras etapas do processo cicatricial é a infiltração por fibroblastos na área lesionada, estes se proliferam e diferenciam-se em miofibroblastos, os quais possuem função primordial na formação neodermal e contração, estas células alinham as margens da lesão, unindo-as (THOMAS et al., 1995; MOULIN et al., 2000; GOMATHI et al., 2003). Os miofibroblastos foram inicialmente identificados como um fibroblasto modificado que possuía características de uma célula muscular lisa, através de microscopia eletrônica no tecido de granulação de feridas cicatrizadas (DESMOULIÈRE, CHAONNIER e GABBIANE, 2005). A conversão de fibroblastos em miofibroblastos é realizada por fatores de crescimento como o TGF- β 1, expressando α -actina do músculo liso e tornando-se células musculares lisas capazes de realizar grandes forças contráteis (MARTIN, 1997).

Depois da migração em direção à ferida, os fibroblastos começam a síntese da MEC. O abastecimento da matriz extracelular é gradualmente substituído por matriz colagenosa. Uma vez que a matriz colagenosa abundante tenha sido depositada na ferida, os fibroblastos param de produzir colágeno e o tecido de granulação rico em fibroblastos é substituído por uma cicatriz relativamente acelular (CLARK et al., 1995; DESMOULIÈRE, 1995, SINGER, 1999). Quando a ferida está preenchida pelo tecido de granulação, a angiogênese cessa e muitos dos vasos desintegram-se como resultado de apoptose (ILAN et al., 1998). Assim, na fase proliferativa, o leito da ferida está preenchido por tecido de granulação, uma rede de capilares neoformados atravessa o leito da ferida e a rede linfática começa a se regenerar. Lentamente, o tecido de granulação adquire mais fibras colágenas e começa a ter aparência de cicatriz, por acúmulo de massa fibrosa (GUIDUGLI-NETO, 1987).

A fase de maturação ou contração da ferida é marcada pela remodelagem dos tecidos no sentido de restaurar a forma e a função do tecido lesado. Caracteriza-se pela deposição, agrupamento e remodelação do colágeno associado à regressão endotelial, apresentando tecido conectivo, fibras colágenas e poucos vasos sanguíneos (MODOLIN, 1992).

A contração da ferida faz com que suas margens se aproximem mais e, se o tecido original estava revestido por uma superfície epitelial, a reepitelização ocorre (CARVALHO, 2002). Este processo envolve uma interação orquestrada complexa de células, matriz celular e citocinas. Durante os primeiros dias, é a crosta que contrai, consistindo principalmente de fibrina seca, formando-se quando o exsudato escapa da mesma, coagulando e ressecando. Isto ocorre porque o coágulo é exposto ao ar atmosférico. A função dessa crosta é selar a ferida, isolando-a do meio ambiente, não

permitindo a penetração de bactérias. A crosta pode reduzir a superfície de uma ferida pequena aberta (PEACOCK, 1984; DANTAS, 2000).

A remodelação do colágeno durante a transição do tecido de granulação à cicatriz é dependente da síntese e catabolismo de colágeno em velocidade baixa. A degradação do colágeno na ferida é controlada por muitas enzimas proteolíticas designadas metaloproteinases (MMPs), as quais são secretadas pelos macrófagos, células epidermais, assim como fibroblastos. Esse evento de remodelação do colágeno é responsável pelo aumento da força de tensão e da diminuição do tamanho da cicatriz. O resultado normal da fase de remodelação da cicatrização é uma cicatriz com aproximadamente 80% da força de tensão da pele íntegra (MIGNATTI et al., 1996; FAZIK et al., 2000).

A remodelação ocorre durante a fase final do processo reparatório e pode continuar durante alguns meses, onde a matriz extracelular (MEC) é sintetizada, depositada, contraída e remodelada. Os fibroblastos são as “células-chave” neste processo; estes migram até o local da lesão e esta migração depende da ativação de enzimas proteolíticas e de componentes das enzimas ativadoras de plasmonogênio (PA)–sistema plasmina e MMPs.

As MMPs são enzimas proteolíticas da família das zinco-endopeptidases e desempenham importante função da remodelação proteolítica da matriz extracelular em vários processos fisiológicos, incluindo a morfogênese tecidual, reparação tecidual e angiogênese (KAHARI e SAARIALHO-KERE, 1997; WONG et al., 2002), além de facilitar a migração dos fibroblastos através da MEC e leito da lesão (PILCHER et al., 1999; GRINNELL, 2003). A MMP-2 e a MMP-9 são duas proteases gelatinolíticas mais atuantes no processo de cicatrização de lesões (KAHARI e SAARIALHO-KERE, 1997; ARMSTRONG e JUDE, 2002).

As proteases exercem um papel ainda pouco conhecido, porém precoce e mantido ao longo das fases de fibroplasia (angiogênese) e remodelação da matriz extracelular. Em geral, são estabelecidas referências sobre a regulação positiva e/ou negativa da angiogênese, assim como a degradação da membrana basal do endotélio e proteínas da matriz extracelular, liberando fatores angiogênicos, favorecendo o processamento de citocinas, fatores de crescimento e seus receptores, além da produção de inibidores endógenos. Entre as proteases presentes na matriz extra-celular, podem ser citadas cisteína e serina-proteases, como MMP (metaloproteinases de matriz), ADAMs (desintegrina metaloproteinase), ADAMTS (desintegrina e metaloproteinase com características estruturais semelhantes à trombospondina) e catepsina e serina-proteases (ROY et al., 2006).

Em muitos estudos experimentais foram avaliados aspectos morfológicos, histológicos, microbiológicos, imunohistológicos e biomecânicos da cicatrização de feridas cirúrgicas de primeira e segunda intenção relacionadas a variados tratamentos, possibilitando o entendimento do processo e a escolha da terapêutica adequada a cada tipo de animal e lesão. No entanto, uma busca antiga e incessante reside na pesquisa de drogas que acelerem o processo cicatricial normal (ARAÚJO et al., 1998).

Danos extensos necessitam de tratamento imediato para reparar e regenerar a pele com o intuito de restabelecer a sua função de normal. Entretanto, essas injúrias de pele são eventos traumáticos pelos quais raramente são acompanhados de completa restauração estrutural e funcional do tecido original. Pesquisas na área da cicatrização de pele têm focado três aspectos principais. Primeiramente, a melhoria do processo cicatricial por fatores que aceleram o processo e reduzam a cicatrização. Secundo, o desenvolvimento de substitutos de pele como equivalentes funcionais. Em terceiro

lugar, identificar tratamentos que induzam a cura através do processo de regeneração em lugar da reparação tecidual (BALASUBRAMANI et al, 2001).

2.2. BIOMATERIAIS

No tratamento de feridas agudas, crônicas, ou mais extensas, pode ser usada normalmente uma variedade de substitutos de pele, inclusive vários revestimentos sintéticos e naturais. O principal efeito da maioria dos substitutos de pele é promover a cicatrização estimulando a produção de várias citocinas. Estas substâncias promovem a cicatrização estimulando a produção de componentes na membrana basal, prevenindo desidratação e inflamação, e promovendo a formação de tecido de granulação. Assim, a secreção de citocinas e fibroblastos representa um importante papel na geração do novo tecido (LEE et al, 2003).

Substâncias biologicamente ativas capazes de modificar a resposta imune (FIELDS & KOELLER, 1993) têm sido estudadas objetivando melhorar a resposta às enfermidades. Definidos como modificadores da resposta biológica (MRB) alguns tipos de biomateriais têm sido amplamente utilizados devido aos seus efeitos anti-tumorais (MITCHELL, 1988), a exemplo dos polissacarídeos que são capazes de estimular o sistema imune, produzindo respostas a nível celular (STUELP-CAMPELO et al., 2002; SENEL & MCCLURE, 2004; NERGARD et al., 2005; SCHEPETKIN & QUINN, 2006; WITTAYA-AREEKUL & PRAHSARN, 2006; WU et al., 2006).

O uso de biomateriais poliméricos para regeneração de órgãos e tecidos tem sido bastante difundido, entretanto, estes possuem outras importantes aplicações como sistema de liberação de drogas, encapsulação de células, regeneração dos tecidos

musculares estriados e cardíacos, regeneração de válvulas cardíacas, e reconstrução de tendão (SEAL et al., 2001).

É grande a quantidade de diferentes materiais poliméricos que os químicos podem sintetizar e esta diversidade proporciona aos cientistas e engenheiros, a oportunidade de escolher os melhores polímeros que mais se adequem aos tecidos de interesse. Particularmente, em relação à pele, fatores mecânicos e biológicos devem ser considerados para a projeção de novos polímeros. Uma das principais propriedades biológicas destes polímeros é a biocompatibilidade, onde o material não deve ser atacado imediatamente ou encapsulado pelo corpo. Assim, esses parâmetros desempenham um importante papel na adesão, proliferação, diferenciação celular, e na secreção de moléculas da MEC. Portanto, é necessário compreender as propriedades desta matriz e a biologia dos sistemas, uma vez que os componentes matriciais são temporariamente substituídos, de forma que as células do corpo possam ser induzidas a substituir o material polimérico temporário com componentes teciduais nativos (SEAL et al., 2001).

A expansão da engenharia tecidual aumentou a demanda de materiais que são biocompatíveis, biodegradáveis e possuem propriedades mecânicas semelhantes aos tecidos nativos. O controle a nível molecular da atividade biológica também é um fator altamente considerável. Muitos biomateriais precisam possuir microestruturas porosas que permitam o crescimento do tecido *in vivo* ou criar um modelo que direcione o crescimento do tecido *in vitro* (CHUPA et al., 2000). Esta tecnologia usa uma combinação de biomateriais e moléculas biologicamente ativas ou células, para manipular vários tipos de tecidos promovendo a sua reparação ou regeneração. O tratamento envolve a incorporação de células do próprio paciente em uma matriz suporte biodegradável, onde as células proliferam e produzem um novo tecido que

gradualmente substituem a matriz suporte. Essa tecnologia tem sido avaliada na regeneração de cartilagem, reparação de nervos e defeitos de pele, como as que ocorrem em queimaduras (LLOYDB et al., 1998).

Suportes poliméricos têm muitas funções no campo de engenharia tecidual. Eles são aplicados como agentes de preenchimento de espaço, como veículos de liberação de moléculas bioativas, e como estruturas tridimensionais que organizam células e direcionam a formação do tecido desejado. Muito do sucesso dos suportes poliméricos depende em achar um material apropriado para se guiar o processo biológico inerente a cada aplicação. Assim, o campo da engenharia tecidual desenvolveu-se para satisfazer as necessidades de desenvolvimento de órgãos e tecidos. De uma maneira geral, a engenharia tecidual busca fabricar, repor estruturas do corpo, principalmente órgãos e tecidos para transplante (DRURY & MOONEY, 2003).

Recentemente, a engenharia tecidual tem aplicado métodos para criar tecidos que servem de base e guiam a regeneração de tecidual. No entanto, para alcançar regeneração próspera de órgãos ou tecidos danificados baseado no conceito da engenharia tecidual vários elementos críticos devem ser considerados, inclusive o suporte do biomaterial que servem como um apoio mecânico para o crescimento de células, células do progenitor que podem ser diferenciadas em tipos de células específicas, e fatores de crescimento indutivos que podem modular atividades celulares. Assim, o biomaterial apresenta um importante papel nas estratégias para criação de tecidos, uma vez que pode servir como um substrato sobre o qual populações de células podem se aderir e migrar, ser implantado combinado com células servindo como um veículo de liberação de células, como também pode ser usado um portador de droga para ativar um função celular específica em determinadas regiões (SHIN et al, 2003).

2.3. POLISSACARÍDEOS

2.3.1. POLISSACARÍDEOS UTILIZADOS COMO BIOMATERIAL

Os polissacarídeos são constituídos por longas cadeias contendo centenas ou milhares de unidades de monossacarídeos unidas entre si por ligações glicosídicas, podendo ser classificados como homopolissacarídeos (contendo um único tipo de unidade monomérica) ou heteropolissacarídeos (contendo mais de um tipo de unidade monomérica). Eles diferem entre si na identidade de suas unidades monossacarídicas, no tipo de ligação que une as cadeias e no comprimento e grau de ramificação das suas cadeias (LEHNINGER et al., 2000). As unidades monossacarídicas que os compõem podem ser neutras, básicas, ácidas ou combinadas e, conseqüentemente, o polissacarídeo pode ser um polímero básico, ácido neutro ou misto possuindo uma carga que varia de acordo com os resíduos de monossacarídeos pelos quais está composto e do ambiente (LLOYDB et al.,1998).

Componentes de quase todos os seres vivos, os polissacarídeos fazem parte da estrutura das paredes celulares de plantas superiores ou algas marinhas (celulose), fungos (quitina) e do exoesqueleto de insetos e crustáceos (quitina e quitosana), reservas metabólicas animais (amido, glicogênio); constituintes de cápsulas, envoltórios de microrganismos; e como componentes da MEC e da cartilagem em animais (BARROS, 2002).

O uso de polissacarídeos como biomateriais é vantajoso, uma vez que tais substâncias apresentam livre administração, simplicidade de operação, evita o uso de antibióticos para animais e diminui os custos de produtos (SHIGEMASA & MINAMI, 1995). Estas substâncias e os seus derivados apresentam variadas aplicações nos

campos da indústria têxtil e de papel; indústria de alimentos e de cosméticos; indústria química e farmacêutica (GERESH et al., 2000).

Apesar das vantajosas características de uso dos polissacarídeos, novas apresentações terapêuticas, como sistemas de liberação controlada, vêm sendo utilizadas com o objetivo de aumentar a eficácia do produto e reduzir os efeitos colaterais (GADELHA, 2001). Os sistemas de liberação programada de um agente através de um meio específico por um período prolongado foram criados com o objetivo de se atingir uma resposta ótima, efeitos colaterais mínimos e eficácia controlada da droga a ser utilizada. Essas formas de dosagem com liberação controlada aumentam a segurança e eficácia da terapia regulando a taxa de liberação e reduzindo a frequência de administração (KUMAR, 2000).

Membranas com características adequadas de permeabilidade e excelentes propriedades adesivas para a célula são essenciais para o desenvolvimento da biologia tecidual e órgãos biohíbridos. Entretanto, não só o material de suporte é importante como também a interação deste com o tecido é fortemente influenciada pelas propriedades físico-químicas da superfície. Embora muitos esforços já tenham sido realizados, ainda não está totalmente estabelecido quais as propriedades que podem ser críticas para o tipo ideal de suporte. Vários pesquisadores já reportaram o aumento da adesão celular sobre superfícies hidrofílicas. A presença de grupos funcionais específicos, proteínas adesivas imobilizadas, carga e morfologia da superfície também foram apontados como fatores reguladores. Muitos polímeros utilizados na prática biomédica não serviram de suporte para o crescimento e adesão celular, evidenciando que as propriedades da membrana como estabilidade mecânica ou características de permeabilidade são muitas vezes convenientes para sua aplicação, mas não para sua

biocompatibilidade. Assim, inúmeras técnicas físicas e biofísicas têm sido utilizadas para modificar a superfície de materiais poliméricos (HAMERLI et al., 2003).

A atual geração de pesquisas no campo da engenharia tecidual está baseada no cultivo de células em matrizes porosas poliméricas biodegradáveis. Um fator primário está na viabilidade de um bom biomaterial que sirva como uma matriz temporária. Esses biomateriais devem ser capazes de serem preparados de forma porosa para oferecerem um canal para migração de células dentro da matriz, permitindo o crescimento dentro do tecido análogo e serem biodegradáveis dentro de produtos não tóxicos (KHOR & LIM, 2003). Assim, a introdução da porosidade em uma matriz polimérica permite uma importante utilização para sistema de liberação de drogas e engenharia tecidual (SHASTRI et al., 2003).

2.3.2. POLISSACARÍDEOS DE AÇÃO CICATRIZANTE

A utilização de polissacarídeos com fins medicinais data de tempos remotos (BONONI et al, 1995). Pesquisas têm sido realizadas no sentido de explorar as atividades inerentes aos biopolímeros com ação cicatrizante. Neste campo de pesquisa, têm sido estudados polissacarídeos neutros (glucanas, celulose, dextrana), ácidos (alginato, ácido hialurônico) e básicos (quitina e quitosana). Estes últimos são os mais amplamente estudados, tendo demonstrado influência em todos os estágios das feridas (OKAMOTO, 1995; DIEGELMANN, 1996; LLOYDB et al., 1998).

Nos últimos anos, tratamentos alternativos foram realizados para estudar uso de polissacarídeos extraídos da película da cana-de-açúcar (GALEGO et al., 1997; MONTEIRO et al., 2000), do cajueiro (*Anacardium occidentale*) (PAIVA, 2003, SCHIRATO et al., 2006), de cogumelos *Pleurotus ostreartus* (BONONI et al., 1995),

do *Aloe vera* (FEMENIA et al., 1999; WU et al., 2006), da *Opuntia ficus-indica* L. (TROMBETTA et al., 2005) e *Coelarthum opuntia* (RAM et al., 2000) no tratamento de feridas cutâneas.

A aplicação tópica da sacarose para tratamento de feridas está descrita desde a antigüidade. O efeito do açúcar no tratamento de feridas infectadas ou não, é mais comumente atribuído à ação bactericida, verificadas para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiela* ou bacteriostática, observado em relação ao *Bacillus subtilis*; à oferta de nutrientes às células lesadas, à diminuição do edema local pela ação liposcópica, à estimulação dos macrófagos e à formação rápida do tecido de granulação. Estes achados devem-se ao baixo pH e à hipertonicidade provocadas no meio pela presença da sacarose. Considera-se que esta pode interferir no crescimento bacteriano e forma uma película estável, que em contato com fluidos da ferida, capaz de controlar o meio e ocasionar uma hiperosmolaridade, a qual é considerada como um fator positivo para o processo cicatricial por estimular a granulação. Conseqüentemente, a sacarose é capaz de acelerar a cicatrização nas fases iniciais do processo, diminuindo o índice de contaminação bacteriana e a formação do tecido de granulação precoce em feridas topicamente tratadas, sendo considerado um tipo de tratamento economicamente viável para várias camadas sociais (COELHO et al., 2001).

A quitina é um polissacarídeo natural encontrado em abundância em material de suporte de crustáceos, insetos e em fungos sendo também é encontrada como um subproduto da indústria de pescado. Formada por unidades de 2-acetamida-2deoxi- β -D-glucose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4), possui características semelhantes às da celulose, principalmente, em relação a estrutura e solubilidade. A quitosana é um derivado N-deacetilado da quitina e ambas são polímeros naturais com excelentes propriedades

como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e propriedades adsorptivas que podem atuar benéficamente acelerando a reparação de feridas (MAJETI, 2000; BOCHARD & JUNGINGER, 2001; HOWLING et al., 2001; YOSHIDA, 2001; SENEL & MCCLURE, 2004; WITTAYA-AREEKUL & PRAHSARN, 2006).

A quitina funciona naturalmente como um polissacarídeo estrutural, é altamente hidrofóbica, insolúvel em água e em solventes orgânicos, sendo solúvel em hexafluoroisopropanol, hexafluoroacetona, cloroalcol em conjugação com soluções aquosas de ácidos minerais e dimetilacetamida contendo 5% de lítio clorado. A quitosana, o produto deacetilado da quitina, é solúvel em ácidos diluídos tais como o ácido acético, fórmico, entre outros (MAJETI, 2000).

A quitosana promove granulação e organização do tecido cicatricial, principalmente pelo aumento das células inflamatórias, agindo positivamente nas feridas abertas de grandes animais. Desta forma, ela atua sobre os leucócitos polimorfonucleares (PMN), na produção de osteopontina e leucotrieno B₄; sobre os macrófagos, estimulando a produção de interleucina (IL)-1 e a transformação do fator de crescimento β 1 e do fator de crescimento derivado das plaquetas e nos fibroblastos, atuam na produção de IL-8 (UENO et al., 2001). Segundo, SENEL & McCLURE (2004), na medicina veterinária a quitosana tem atuado como agente cicatrizante, antimicrobiano, hemostático e analgésico.

A utilização dos polissacarídeos como biomateriais é vantajosa, pois interferem favoravelmente na resposta imune, assim como no processo cicatricial. KWEON et al. (2003), avaliando o efeito do tratamento com o complexo hidrossolúvel quitosana/heparina em feridas cutâneas em ratos, observaram que no 15º dia de pós-operatório, as feridas estavam completamente cicatrizadas com aspecto similar à pele normal. Entre outros fatores, o efeito da quitosana pode ser atribuído à estimulação de citocinas (IL-1,

IL-6 e TNF- α) que auxiliam no processo de reparação tecidual (UENO et al., 2001). Foi relatado também que o polissacarídeo de *Angelica sinensis* possui efeito cicatrizante em úlceras gástricas experimentais em ratos Sprague-Dawley, além de possuir efeito estimulante *in vitro* de proliferação de células epiteliais gástricas (YE et al., 2003).

O Cajueiro (*Anacardium occidentale*), pertence a família das Anacardiaceae, e apresenta uma goma que é constituída por um heteropolissacarídeo ramificado (MENESTRINA et al, 1998) cujas propriedades reológicas demonstram que ela possui alta viscosidade, comparável à goma arábica, apresentando múltiplas possibilidades de industrialização na indústria farmacêutica, cosméticos, aglutinante de cápsulas e comprimidos e na indústria de alimentos, e ainda como estabilizante de sucos, cerveja e sorvetes (PAULA & RODRIGUES, 1995).

O heteropolissacarídeo proveniente de *A. occidentale* (POLICAJU) vem sendo utilizado em diversas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, potencializando, em estudos preliminares, o processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos (PAIVA, 2003; SCHIRATO et al., 2006), apresentando atividade antitumoral *in vitro* frente a células Hela (MENESTRINA et al., 1998) e inibindo o crescimento do Sarcoma 180 (MENESTRINA et al., 1996), apresentando-se como uma importante molécula de uso terapêutico.

Planta tropical, o cajueiro (*Anacardium occidentale*) ocupa importante lugar entre as plantas frutíferas do Brasil, devido a crescente comercialização dos seus produtos principais obtidos da castanha (amêndoa e líquido do mesocarpo) (BANDEIRA, 1991). Além disso, trata-se de um recurso natural, renovável que pode ser explorado sem agressões ambientais, já que o acesso à matéria-prima para elaboração do seu princípio ativo (POLICAJU) é favorecido pelo amplo cultivo do cajueiro no Nordeste (400.000-450.000 hectares), considerando ainda que cada árvore

produz 178 a 2000 g/ano de goma, com um valor médio de 700 g/ano (GADELHA, 2001). Assim, a facilidade de acesso a sua matéria-prima e sua relatada atividade biológica, são fatores que viabilizam o uso do polímero obtido da goma do cajueiro como biomaterial, despertando o interesse científico-tecnológico para o desenvolvimento de fórmulas farmacêuticas para o uso em lesões cutâneas.

Produtos obtidos do cajueiro (*Anacardium occidentale*) são bastante populares na medicina popular. O extrato da casca tem sido empregado no tratamento de doenças inflamatórias na Nigéria, sendo constatado em bovinos redução da síntese de prostaglandinas (90%) na vesícula seminal (OLAJIDE et al., 2004).

2.4. PROTEASES

As proteases, também denominadas de enzimas proteolíticas ou peptidases, representam uma classe única de enzimas que ocupam uma importante posição em relação às suas aplicações fisiológicas e no campo comercial. São enzimas proteolíticas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas. Avanços em técnicas analíticas têm demonstrado que as proteases promovem uma alta especificidade e modificações seletivas de proteína bem como a ativação de formas zimogênicas de enzimas pela limitada proteólise, coagulação sanguínea e lise do coágulo de fibrina e processo secretório e transporte de proteínas através da membrana (RAO et al., 1998).

Dependendo do local de ação na cadeia polipeptídica, as proteases podem ser subdivididas em dois grandes grupos: exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases atuam próximo das extremidades das cadeias polipeptídicas e podem ser classificadas como amino e carboxipeptidases, em função do seu sítio de ação na extremidade N- ou C- terminal, respectivamente. As carboxipeptidases podem ser

subdivididas em serino, metalo e cisteíno-carboxipeptidases enquanto as aminopeptidases, em função do número de resíduos de aminoácidos removidos, são classificadas em aminopeptidases (um resíduo), aminodipeptidases (dois resíduos) ou aminotripeptidases (três resíduos). As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas e são subdivididas em quatro grupos: serino-protease, aspartato-protease, cisteíno-protease e metalo-protease (BARRETT, 1994).

As proteases são responsáveis por processos complexos envolvidos na fisiologia normal da célula, bem como em condições fisiopatológicas e têm uma longa história de aplicações na indústria alimentícia e de detergentes (RAO et al., 1998).

Cerca de 50% das enzimas industriais são proteases (GUIZANI et al., 1991; De VECCHI & COPPES, 1996). Na indústria alimentícia, as proteases são usadas nos processos de fermentação, na produção de gelatina hidrolisada e de leite de soja. Também são utilizadas na clarificação de sucos, devido à hidrólise das proteínas solúveis neles contidas em altas concentrações, as quais provocam turbidez e formação de sedimentos indesejáveis durante a estocagem (DAWES et al., 1994). Na fabricação de pães, as proteases são utilizadas para produzir uma massa macia, como resultado da hidrólise do glúten. Na produção de queijo, as proteases são empregadas para maturação e desenvolvimento da textura e do sabor. Na indústria química, as proteases são amplamente utilizadas na formulação de detergentes, na produção de papel (STEELE & STOWERS, 1991; DONAGHY & MACKAY, 1993), na indústria de couro (GEORGE et al., 1995), na recuperação de prata dos filmes de raio-x (KUMAR & TAKAGI, 1999) e na indústria farmacêutica (RAO et al., 1998).

As proteases de origem animal mais conhecidas são a tripsina pancreática, quimiotripsina, pepsina e renina. A tripsina é a principal enzima intestinal responsável pela hidrólise de proteínas alimentares. É uma serina protease que hidrolisa ligações

peptídicas, nas quais os grupos carboxil são constituídos por resíduos de lisina e arginina. A tripsina tem limitada aplicação na indústria alimentar, visto que as hidrolases protéicas geralmente tem um sabor amargo. Esta protease é usada na preparação de meios bacterianos e em algumas preparações médicas específicas (RAO et al., 1998).

Existe substancial evidência que certas proteases, como a trombina e a tripsina, podem regular células alvo pela clivagem e ativação de receptores ativadores de proteases acoplados a uma família de proteína G (PARs) aos quais tem sido implicado um papel no sistema de inflamação, sendo sugerido que estes podem contribuir para a defesa do corpo em resposta a injúria ou invasão patogênica. Em relação a reparação tecidual, a trombina promove aumento da neovascularização, deposição de colágeno e cicatrização. Vários estudos sugerem que esses efeitos são mediados pela ativação de PAR₁. Assim, os efeitos estimulatórios da trombina sobre o colágeno e produção de fator do crescimento do tecido conectivo podem ser mediados pelos PAR₁ (VERGNOLLE et al., 2001).

A degradação proteolítica da MEC é um passo essencial para a reparação e subseqüentes estágios da remodelação que ocorrem geralmente através da ação da metalo-proteinase de matriz (MMP), implicando na renovação da MEC bem como na ativação de fatores de crescimento latentes, migração celular, angiogênese e cicatrização (PRAGAPATI et al, 2000).

As MMPs incluem um número de proteases responsáveis pela degradação de componentes da MEC como colágeno, fibronectina, laminina, proteoglicanos e elastina. Assim, um passo essencial na degradação da MEC é a secreção extracelular da MMP. Estudos *in vitro* e em animais têm mostrado o importante papel das proteases na cicatrização normal, mas os níveis e duração da expressão das proteases é limitado e

finamente controlado pela ativação de plasmina ou pela presença de inibidores de metaloproteinases teciduais (TIMPs). A degradação controlada da MEC é requerida para a remoção de componentes danificados e para permitir a migração celular e a angiogênese. A reestruturação da MEC também é requerida para permitir a aderência celular e destruir a membrana basal. Essas funções são essenciais durante a cicatrização normal, entretanto, o excesso na produção de MMPs frente aos TIMPs, pode contribuir para a destruição da matriz (THENGOVE et al, 1999).

2.5. IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

A imobilização de moléculas biologicamente ativas disputa um importante papel na moderna ciência biológica, sendo particularmente efetiva na aplicação de bio-reconhecimento; conseqüentemente, imobilizar substâncias afins é um pré-requisito para técnicas como cromatografia de afinidade e todas as suas aplicações como por exemplo, determinação em tempo real constantes de afinidades, de diagnóstico, imobilização de enzimas, e mais recentemente, manipulação de proteínas e peptídeos, também conhecido com “biochip” de proteína (WILCHEK & MIRON, 2003).

O processo de imobilização foi definido por TREVAN (1980) como sendo a “separação física entre o catalisador e o seu meio de reação, de forma que as moléculas do substrato e do produto possam difundir-se facilmente entre as duas fases”, permitindo a recuperação de biomoléculas, visando a sua reutilização. Os custos econômicos dos processos industriais em comparação com os biosistemas solúveis e imobilizados demonstraram ser reduzidos pelo emprego da imobilização (KENNEDY et al., 1989).

As metodologias utilizadas para promover a imobilização podem ser agrupadas em quatro grandes classes: adsorção, enclausuramento numa matriz semipermeável ou no interior de polímeros, reações cruzadas, através do uso de reagentes multifuncionais ou bifuncionais, e ligação covalente a suportes poliméricos, via grupamentos químicos (POWELL, 1990; SILMAN & KATCHALSKI, 1996).

A utilização de enzimas como catalisadores em reações sintéticas em meio orgânico não é recente; as primeiras são do início do século XX. As enzimas apresentavam pouca utilidade em síntese orgânica devido, principalmente, à idéia de que somente o meio aquoso era propício para manter a conformação estrutural cataliticamente ativa. Entretanto, sabe-se atualmente que muitas enzimas são cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos, com eficiência similar àquela encontrada em soluções aquosas. Acredita-se que as enzimas sejam cataliticamente ativas em meio orgânico porque permanecem na sua forma original, e não se desdobram em meio não-aquoso. Esta característica deve-se, em parte, ao aumento das interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima em solventes orgânicos e à baixa constante dielétrica da maioria deles e, também, ao aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalizador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo. A imobilização pode inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima, porém não existe uma regra que prediga a manutenção destes parâmetros após o processo de imobilização (GANDHI, 1997; SOARES et al., 1999).

Quando um biocatalisador ou uma preparação enzimática é selecionado para determinada reação, o tipo de solvente, a quantidade de água e a solubilidade dos substratos e produtos devem ser avaliadas e otimizadas. A água é, talvez, o componente mais importante quando o biocatalisador é utilizado em meio orgânico, estando bem documentado na literatura que uma quantidade mínima de água, que é dependente do tipo de solvente e das características do suporte utilizado, é absolutamente necessária para a solvatação da enzima ou dos substratos e produtos. Entretanto, o excesso de água pode favorecer a reação de hidrólise e não a de síntese. As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte. A água contribui ainda para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, e pode também limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

A influência da natureza do solvente tem sido interpretada em termos de vários fenômenos, tais como a mudança na rigidez da enzima causada por solventes com alta constante dielétrica e interações iônicas na proteína. O solvente pode estabilizar as cargas no estado de transição através da modificação da polaridade do sítio ativo, bem como a variação da energia livre total, que estão associadas com diferentes energias de solvatação do solvente (LANG, et al., 1996).

Os suportes adequados para imobilização protéica devem possuir algumas características como uma grande área de superfície, permeabilidade, caráter hidrofílico, insolubilidade, estabilidade química, mecânica e térmica, resistência contra o ataque microbiano e regenerabilidade (ROSEVEAR et al., 1987).

O uso de suportes porosos é vantajoso porque a enzima é adsorvida no interior dos poros. A eficiência depende também da concentração da enzima. A quantidade de

enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação. Este processo, em geral, é realizado à temperatura constante e isotermas de adsorção são obtidas, as quais seguem as equações de Langmuir ou Freundlich (SOARES et al., 1999).

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em "confinar" uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos, se difundem enzima (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, C.F.R.; SOUZA FILHO, Z.A. de; GRECA, F.H.; GUERREIRO, M.M.C.P.M.; LEITE, L.A.; MANSUR, A.E.C.; KANTOR, D.C.; NASSIF, A.E. Efeitos do Agarol ® e do Trigliceril ® sobre a cicatrização de pele, estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 13, n .4, p. 232 – 237, 1998.

ARMSTRONG, D. G.; JUDE, E. B. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 92, p. 12-18, 2002.

BALASUBRAMANI A, M; KUMAR, T.R.; BABU, M. Skin substitutes: a review, **Burns**, v. 27, p. 534–544, 2001.

BANDEIRA, C. T. Relatório técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - **EMBRAPA - CNPCa**, v. 6, p. 1-2, 1991.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**, 2. ed., São Paulo: Manole, 1991. p. 103-424.

BARRET, A. J. Classification of peptidases. **Methods in Enzymology**. v. 244, p.1-59, 1994.

BARROS, Y. V. R. Utilização de levana como suporte para imobilização de gentamicina. **Tese de Mestrado em Bioquímica**, UFPE, 2002.

BIONDO-SIMÕES, M.L.P, PANTE, M.L., MACEDO, V.L., GARCIA, R.F., BOELL, P.,MORAES T.H.C. O hormônio de crescimento e a concentração de colágeno na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v15, p.78-82, 2000.

BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E. Modern drug delivery applications of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews.** v52, p. 103-, 2001.

BONONI, V. L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R. **Cultivo de cogumelos comestíveis.** São Paulo: Ícone, 1995. p.206.

BRANSKI, R. C.; ROSEN, C. A.; VERDOLINE, K.; HEBDA, P. A. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. **Journal of Voice**, v. 19, n.2, p. 283-289, 2005.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. (eds.) **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna.** Chapecó: Argos, 2001. p. 77-99.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p. 858 – 865, 2000.

CARVALHO, P. T. C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos.** 2002. 72 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos/

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2002.

CLARK, R.A F.; NIELSEN, L. D.; WELCH, M. P.; McPHERSON, J. M. Collagen matrices attenuate the collagen – synthetic response of cultured fibroblasts to TGF- β . **J Cell Sci**, v. 108, p. 1251-61, 1995.

COELHO, COC, CARRAZONI, PG, MONTEIRO, VLC, MELO FAD, MOTA A, Filho FT. Biopolímero produzido a partir da cana-de-áçúcar para cicatrização cutânea. **Acta Cir Bras**; v. 17 p.11-13, 2001.

COHEN, J.K. DIEGELMANN, R.F.; LINDBLAD, W.J. **Wound healing: biochemical and clinical aspects**. Philadelphia: Saunders, 1992.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 47-51.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Neoplasia. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.(eds.). **Pathologic basis of disease**.6 ed., Philadelphia: Saunders, 2000.

CHUPA, J.M.; FOSTER, A.M.; SUMNER, S.R.; MADIHALLY, S.V.; MATTHEW, H.W.T. Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations. **Biomaterials**, v. 21, p. 2315-2322, 2000.

DANTAS, C.J.S. Reparação Tecidual. In: **Mecanismos Celulares e Musculares da Inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. cap.17, p.197-225.

DAWES, H.; STRUEBI, P.; KEENE, J. Kiwifruit juice clarification using a fungal proteolytic enzyme. **Journal of Food Science**, v.59, n.4, p. 858-861, 1994.

DE VECCHI, S.; AND COPPES, Z. Marine fish digestive proteases – relevance to food industry and the South-west Atlantic region – a review. **Journal of Food Biochemistry**, v.20, p. 193-214, 1996.

DESMOULIÈRE, A ; REDARP, M.; DARBY, J.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transitions between granulation tissue and scar. **Am.J. Pathol.**, v.146, n.1, p.56-66, 1995.

DESMOULIÈRE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANE, G. Tissue repair, contraction and the myofibroblast. **Wound repair and Regeneration**, v. 13, p. 7-12, 2005.

DIEGELMANN, R.F.; DUNN, J.D.; LINDBALD, W.J.; COHEN, J.K. Analysis of the effects of chitosan on inflammation, angiogenesis, fibroplasia and collagen deposition in polyvinyl alcohol sponge implements in rat wounds. **Wound Rep Reg**, v. 4, p. 48-52, 1996.

DRURY,J.L. AND MOONEY,D.J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications **Biomaterials**, v. 24, p.4337-4351, 2003.

FAZIK, M. J.; ZITE, J.A ; GOSLEN, J.B. Cicatrização das Feridas. In: COLEMAN, W.P. & HANKE, W. **Cirurgia Cosmética Princípios e Técnicas**, 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, cap.3, p. 18-38, 2000.

FEMENIA, A.; SÁNCHEZ,E. S.; SIMAL,S.; ROSSELLO C. Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 109 - 117, 1999.

FIELDS, S. M., KOELLER, J. M. **Biologic agents**. In: WEISS, G. R. Clinical Oncology. New Jersey: Prentice Hall, p. 119-128, 1993.

GADELHA, M. M. S. **Encapsulação de polissacarídeo de *Anacardium occidentale* (P-JU) em lipossomas e aplicação biológica**. 2001. 50p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Recife. 2001.

GALEGO, G. N.; SILVEIRA, P.; d'ACAMPORA, A. J.; SOUZA, R. A. V.; CANELA, R. P. Avaliação da glicemia no tratamento de feridas cirúrgicas com açúcar, em ratas. **Acta Cir. Bras.**, v.12, p.174-177, 1997.

GEORGE, S.; RAJU, V.; KRISHAN, M. R.; SURAMANAIN, T.V.; JAYARAMAN, K. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its applications in unhairing of hides and skins. **Process Biochemistry**, v. 305, p. 457-462, 1995.

GANDHI, NN. Applications of lipases, **J Am Oil Chem Soc**, v.74, 621–634, 1997.

GERESH, S.; DAWADI, R. P.; ARAD, S. M. Chemical modification of biopolimeres: quaternization of the extracellular polysaccharide of the red microalga *Porphyridium sp.*, **Carbohydrate polymers**, v. 63, p. 75-80, 2000.

GOMATHI, K.; GOPINATH,D.; AHMED, M.R.; JAYAKUMAR, R. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. **Biomaterials**, v. 24, n. 16, p. 2767-2772, 2003.

GRINNELL, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. **Trends in Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 264-269, 2003.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue in quantitative study of the vascular volume. **Rev. odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.1, p. 6-8, 1987.

GUIZANI, N.; ROLLE, R.S.; MARSHALL, M.R.; WEI, C. I. Isolation, purification and characterization of a trypsin from the pyloric caeca of mullet (*Mugil cephalus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 98 (B), n. 4, p. 517-521, 1991.

HAMERLI, P.; WEIGEL, TH.; GROTH, TH.; PAULD. Surface properties of and cell adhesion onto allylamine-plasma-coated polyethylenterephtalat membranes **Biomaterials**, v. 24, n. 22, p. 3989-3999, 2003.

HOWLING, G. I.; DETTMAR, P. W.; GODARD, P. A.; HAMPSON, F. C.; DORNISH, M.; WOOD E. J. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of

human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Biomaterials**. n. 22, p. 2959 – 2966, 2001.

ILAN, N.; MAHOOTI, S. MADRI, J. A. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of *in vitro* angiogenesis. **J. Cell. Sci.**, n.11, p. 3621 –31, 1998.

KAHARI, V. M.; SAARIALHO-KERE, V. Matrix metalloproteinases in skin. **Experimental Dermatology**, v. 6, p. 199-213, 1997.

KAPOOR, M.; APPLETON, I. Wound healing: Abnormalities and future therapeutics targets. **Current Anesthesia and Critical Care**. In Press, 2006.

KENNEDY, J.F.; MELO, E. H. M.; WHITE, C. A. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. **Newcastle**, v.7, p. 297, 1989.

KHOR, E. & LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials** v. 24, n. 13, p. 2339-2349, 2003.

KOOPMANN, C. Cutaneous wound healing. **Otolaringologic Clin.**, v. 28. n. 5, p. 835-45. 1995.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**. v. 17, n.17, p. 561-594, 1999.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N., ROBBINS, S. L. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 1592 p, 2005.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

KWEON, D.K.; SONG, S.B.; AND PARK, Y.Y. Preparation of water-soluble chitosan/ heparin complex and its application as wound healing accelerator. **Biomaterials**, v.24, p.1595–1601, 2003.

LANG D, HOFMANN B, HAALCK L, HECHT HJ, SPENER F, SCHMID RD, SCHOMBURG D. Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 **J. Mol. Biol.**, v.259, p.704-717.1996.

LEE, S.B.; JEON ,H.W.; LEE, Y.W.; LEE,Y.M.; SONG, K.W.; PARK, M.H.; NAM, Y.S.; AHN, H.C. Bioartificial skin composed of gelatin and (13), (16)- glucan **Biomaterials** v. 24, n. 14, p. 2503-2511, 2003.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2000.

LLOYDB, J.F.; KENNEDYA, P.; METHACANONA, M.; PATERSONH; KNILLA, C.J. Carbohydrate polymers as wound management aids. **Carbohydrate polymers**, v.37, n. 3, p. 315-322, 1998.

MADRI, J. A. ; KOCHER, O. ; MERWIN, J.R.; BELL, L.; TUCKENS, A. Interaction of vascular cells with transforming growth factors β . **Ann Ny Acad. Sci.**, v. 593, p. 243-258, 1990.

MAJETI, N.V.; KUMAR, R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & functional polymers**, v.46, p1-27, 2000.

MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 74-81, 1997.

MENESTRINA, J. M., CARNEIRO LEÃO, A. M. A., STUELP, P. M., MACHADO, M. J., IACOMINI, M., GORIN, P. A. J. **Partial characterization and anti-tumoral activity of the polysaccharide from cashew gum**. XXV SBBq, n° L-57, p. 116, 1996.

MENESTRINA, J. M., IACOMINI, M., JONES, C., GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

MENSAH, A. Y.; SAMPSON, J.; HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J.; DUNN, M.; HUGHES, M.A.; CHERRY, G. W. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 219-226, 2001.

MIGNATTI, P.; RIFKIN, D.B.; WELGUS, H.G.; PARKS, W.C. Proteinases and tissue remodeling. In: CLARK, R A F. **The molecular and cellular biology of wound repair** New York: Plenum, p. 171-194, 1996.

MITCHELL, M. S. Combining chemotherapy with biological response modifiers in treatment of cancer. **J. Natl. Cancer Inst.** v. 80, p. 1445-1450, 1988.

MODOLIN, M. Biologia da cicatrização dos tecidos. In: Melega, J., Zanini, S., Psillakis, J. **Cirurgia Plástica Reparadora e Estética**. 2 ed. São Paulo: MEDSI, p. 9-25, 1992.

MONTEIRO, V. L. C. Avaliações microbiológicas e histopatológicas de feridas infectadas utilizando-se película de cana-de-açúcar e tratadas por 2^a ou 3^a intenção. In: **Congresso de Iniciação científica X**, 27 a 30 novembro de 2000, p. 169-170.

MOULIN, V.; AUGER, F. A.; GARREL, D.; GERMAIN, L. Role of wound repair myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. **Burns**, v. 26, p. 3-12, 2000.

NAGAPPA, A. N., CHERIYAN, B. Wound healing activity of the aqueous extract of *Thespesia polpunea*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 503-506, 2001.

NERGARD, C. S.; MATSUMOTO, T.; INNGJERDINGEN, M.; INNGJERDINGEN, K.; HOKPUTSA, S.; HARDING, S. E.; MICHAELSEN, T. E.; DIALLO, D; KIYOHARA, H.; PAULSEN, B. S.; YAMADA, H. Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. (Asteraceae). **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 115-130, 2005.

OKAMOTO, Y.; SHIBAZAKI, K.; MINAMI, S.; MATSUHASHI, A.; TANIUCA, S.; SHIGEMASA, Y. Evaluation of chitin and chitosan in open wound healing in dogs. **J. Vet. Med. Sci**, v. 57, p. 851-854, 1995.

OLAJIDE, O.A. et al. Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on *in vivo* inflammatory models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 139 - 142, 2004.

PAIVA, M.G. **Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em cicatrização experimental**. 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PARK, J. E., BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v. 187, p. 11S-16S, 2004.

PAULA, R. C. M., RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew trees gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydr. Polym.**, v. 26, p. 177-181, 1995.

PEACOCK, E.E. **Wound repair**- 3ed. Philadelphia: Saunders, 1984.

PILCHER, B. K.; WANG, M.; QIN, X. J.; PARKS, W. C.; SENIOR, R. M.; WELGUS, H.G. Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 878, p.12-24, 1999.

POWELL, L. W. In: FOGARTY, W. M., KELLY, C. T. (eds.) **Microbial Enzymes and Biotechnology**, 2 ed, London: Elsevier Science Publishers, 369p, 1990.

PRAGAPATI, R.T.; CHAVALLY-MISS, B.; HERBAGE, D.; EASTWOOD, M.; BROWN, R. A. Mechanical loading regulates proteases production by fibroblasts in three-dimensional collagen substrates. **Wound Pep Reg.** v. 8, p. 226-237, 2000.

RAM, M.; VIJAYARAGHAVAN, M. R.; BABBAR, S. B. Wound response and regeneration in *Coelarthrum opuntia*. **Aquatic Botany**, v. 68, p. 345–351, 2000.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESPHANDE, V. V. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 596-635, 1998.

RICHES, D.W.H. Macrophages involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R A F. **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum, p. 95-141, 1996.

ROSEVEAR, A.; KENEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. **Immobilised Enzymes and Cells**. Bristol: Adam Hilger, p. 248, 1987.

ROY, R., ZHANG, B., MOSES, M. A. Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 608-622, 2006

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

SCHÄFFER, M. R.; TANTRY, V.; GROSS, S. S.; WASSERKRUG, H. L.; BARBUL, A. Nitric oxide regulates wound healing. **Journal of Surgical Research**, v. 63, p. 237-240, 1996.

SCHEPETKIN, I, A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**. v. 6, p. 317 – 333, 2006.

SCHIRATO, G. V. **Avaliação da atividade cicatrizante das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea violácea* em camundongos.** 2006. 122 folhas
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, Recife-PE, 2006.

SCHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO; A.L.F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.149-154, 2006

SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration materials. **Science and Engineering Reports**, v. 34, p.147-230, 2001.

SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.1467–1480, 2004.

SHASTRI, V.P.; HILDGEN, P.; LANGER, R. In situ pore formation in a polymer matrix by differential polymer degradation Venkatram Prasad. **Biomaterials**, v. 24, issue 18, p. 3133-3137, 2003.

SHIGEMASA, Y., MINAMI, S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.**, v. 13, p. 383-420, 1995.

SHIMIZU, T. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 37, p. 65-73, 2005.

SHIN, H.; JO, S.; MIKOS, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. **Biomaterials** v.24, p. 4353-4364, 2003

SILMAN, I. H.; KATCHALSKI, E. **Annual Review of Biochemistry**, 35, 837, 1966.

SINGER, A. J.; CLARK, R. Cutaneous wound healing. **New England J. Med.**, v. 341, p.739-746, 1999.

SOARES CM, DE CASTRO HF, DE MORAES FF, ZANIN GM. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica **Appl Biochem Biotechnol.** v77-79, p.745-57, 1999.

STADELMAN, 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.

STEED, D. L. Papel dos fatores de crescimento na cicatrização das feridas. In: BARBUL, A. **Clínica Cirúrgica da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997, v. 3, p. 571-582.

STEELE, D. B.; STOWERS, M. K. **Annual Review of Microbiology** v. 45, p. 89-106, 1991.

STUELP-CAMPELO, P. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, I. Effect of a soluble alfa-D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 691-698, 2002.

STUELP, P. M. **Atividade anti-coagulante de α - e β -D-glucanas extraídas do líquen *Ramalina celastri* modificadas quimicamente**. 1997. 114 p. Tese (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SZPADERSKA, A. M.; DIPIETRO, L. A. Inflammation in surgical wound healing: Friend or foe? **Surgery**, v. 137, p. 571-573, 2005.

TRENGOVE, N.J.; STACE, M.C.; MACAULEY, S.; BENNETT, N.; GIBSON, J.; BURSLEM, F.; MURPHY, G., SCHULTZ, G. Analysis of the acute and chronic wound

environmentes: the role of proteases and their inhibitors. **Wound Rep Reg.**, v7, p442-452. 1999.

THOMAS, D. W.; O'NEILL, I. D.; HARDING, K. G.; SHEPHERD, J. P. Cutaneous wound healing: a current perspective. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 53, p.442-447, 1995.

TOGNINI, J.R.F., FAGUNDES, D.J., NOVO, N.F., JULIANO, Y. Estudo biomecânico e morfológico da cicatrização da parede abdominal de ratos sob ação de meloxicam. **Acta Cir. Bras.**, v15, 2000.

TREVAN, M. D. **Immobilized Enzymes: An Introduction and Applications in Biotechnology** New York: John Wiley & Sons. 1980.

TROMBETTA, D.; PUGLIA, C.; PERRI, D.; LICATA, A.; PERGOLIZZI, S.; LAURIANO, E.R.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A.; BONINA, F.P. Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. **Phytomedicine**. 2005.

UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 105 - 115, 2001.

VERGNOLLE, N.; WALLACE, J.L.; BUNNETT, N.W.; HOLLENBERG, M.D. Protease-activated receptors in inflammation, neural signaling and pain. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.22, n. 3, p. 146 – 152, 2001.

WILCHEK, M. & MIRON, T. Oriented versus random protein immobilization. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. v.55, p67-70, 2003.

WITTAYA-AREEKUL, S., PRAHSARN, C. Development and in vitro evaluation of chitosan-polysaccharides composite wound dressings. **International Journal of Pharmaceutics**, in press, 2006

WONG, T. T. L.; SETHI, C.; DANIELS, J. T.; LIMB, G. A.; MURPHY, G.; KHAW, P. T. Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. **Survey of Ophthalmology**, v. 47, n. 3, 2002.

WRIGHT, N. A., TURNER, N. C., ALISON, M. R. The response to injury. In: MC GEE, J. O. D., ISAACSON, P. G., WRIGHT, N. A. Oxford Textbook of Pathology, Vol. 1 Principles of Pathology. Oxford University Press, 792 p., 1992.

WU, J. H., XU, C., SHAN, C. Y., TAN, R. X. Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of APS-1, a polysaccharide from *Aloe vera* var. *chinensis*. **Life Sciences**, v. 78, p. 622-630, 2006.

YE, Y.N. et al. Effect of polysaccharide from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. **Life Sciences**, v. 72, p. 925-932, 2003.

YOSHIDA, T. Synthesis of polysaccharides having specific biological activities. **Progress in Polymer Science**. v. 26, p. 379 – 441, 2001.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar o efeito do tratamento tópico com filmes obtidos a partir do polissacarídeo extraído da goma do *Anacardium occidentale* sobre a evolução do processo cicatricial de lesões cutâneas experimentais em camundongos.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Desenvolver filmes a partir do polissacarídeo da goma do cajueiro (POLICAJU).
2. Imobilizar proteases (tripsina) nas formulações tópicas a base de POLICAJU.
3. Tratar as lesões cutâneas experimentais com filmes de POLICAJU
4. Tratar as lesões cutâneas experimentais com filmes de POLICAJU com tripsina imobilizada.
5. Avaliar a atividade cicatrizante das formulações tópicas sobre as feridas cutâneas dos camundongos, sob o ponto de vista clínico e histopatológico.

Avaliação do efeito cicatrizante do filme polimérico obtido do polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. sobre o processo cicatricial de lesões cutâneas experimentais

Monteiro, F. M. F.^{1,2}; Schirato, G. V.²; Araújo, J. F.²; Silva, J. B. R.²; Porto, C.S.²; Bezerra, C. L.²; Nogueira, R. A.^{2,4}; Lima-Filho, J. L.^{2,3}, Carneiro-da-Cunha, M. G.³; Carneiro-Leão, A. M. A.^{2,4}, Porto, A. L. F.^{2,4}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária - UFRPE; ² Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE; ³ Departamento de Bioquímica - UFPE; ⁴ Departamentos de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Resumo

A aplicação tópica do filme polimérico preparado com o polissacarídeo extraído da goma do *Anacardium occidentale* L. foi avaliada em lesões cutâneas excisionais em camundongos albino *Swiss*, através do acompanhamento da evolução do processo cicatricial cutâneo, sob os aspectos clínicos e histopatológicos. Após a realização do procedimento cirúrgico asséptico, os animais (n=15/grupo) foram aleatoriamente tratados por via tópica uma única vez: 1, NaCl (NaCl 0,15M); 2, AA (ácido acético 4% v/v); 3, POLICAJU/AA (filme polimérico contendo POLICAJU 10% m/v em ácido acético 4% v/v) e 4, POLICAJU/NaCl (filme polimérico contendo POLICAJU 10% m/v em NaCl 0,15M). Amostras de tecido foram fixadas em formaldeído 4% (v/v) e coradas pelo Tricrômico de Masson 2, 7 e 12 dias após a cirurgia. Entre os animais do grupo POLICAJU/AA, ocorreu redução de 10% na frequência do edema a partir do 7^o dia, desaparecendo completamente ao 11^o dia. Quanto ao aparecimento da primeira crosta, no 1^o primeiro dia, as feridas tratadas com AA e POLICAJU/AA apresentaram menores índices quando comparados ao NaCl e ao POLICAJU/NaCl (20%, 45%, 86,7% e 76,9%, respectivamente). Os animais dos grupos tratados apresentaram 2^a crosta a partir do sétimo dia (10% do Grupo POLICAJU/NaCl) e, no 12^o dia, 100% dos animais de ambos os grupos testes apresentaram esta característica. Do ponto de vista histopatológico, os grupos tratados com POLICAJU apresentaram reepitelização parcial e tecido de granulação fibroso, especialmente no grupo POLICAJU/NaCl. Assim, conclui-se que os filmes poliméricos contendo POLICAJU, aplicados como curativos oclusivos, foram eficazes no processo de reparo tecidual cutâneo.

Palavras-chave: cicatrização, biomateriais, polissacarídeo, *Anacardium occidentale* L., goma do cajueiro, filme polimérico.

Introdução

A cicatrização pode ser compreendida como uma seqüência regulada de eventos celulares e bioquímicos, orquestrados para restaurar a integridade do tecido após a lesão (PARK & BARBUL, 2004). Este processo está didaticamente organizado em três fases (inflamatória, fibroblástica e remodelativa) seqüenciais e sobrepostas, constituindo-se em um fenômeno harmônico, único e contínuo (TOGNINI et al., 1998), envolvendo a migração de células inflamatórias, a síntese do tecido de granulação, a deposição e remodelação de colágeno e de proteoglicanos (BIONDO-SIMÕES, 2000).

A participação das células do sistema imune na cicatrização tem sido longamente suspeitada, considerando a migração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos em direção à ferida. Ainda que o seu mecanismo de ação não esteja completamente elucidado, sabe-se que essas células são vitais para a regulação do processo cicatricial através da secreção de moléculas sinalizadoras como citocinas e fatores de crescimento (PARK & BARBUL, 2004).

A avaliação clínica de uma ferida é uma aproximação, o mais detalhada possível, de um conjunto de fenômenos celulares e bioquímicos, os quais devem culminar com a recuperação morfológica e funcional do tecido lesado, ou seja, a cicatrização. Esta compreensão está baseada nos processos moleculares subjacentes aos sinais/sintomas clínicos e estão em um estado contínuo de evolução, capazes de incorporar e se adequar a novas situações impostas durante o processo de reparo e tratamento da ferida (SCHULTZ et al., 2005; KAPPOR & APPLETON, 2006).

LEE et al. (2003) relatam que no tratamento de feridas agudas, crônicas, ou mais extensas, podem ser usadas uma variedade de substitutos de pele de natureza sintética ou natural, cujo principal efeito sobre a pele é promover a cicatrização estimulando a produção de várias citocinas, as quais promovem a cicatrização estimulando a produção

de componentes na membrana basal, prevenindo a desidratação e minimizando possíveis danos da fase inflamatória, além de promover a formação de tecido de granulação. Assim, o desenvolvimento de novos produtos a partir de materiais interativos capazes de estabelecer uma afinidade apropriada com os tecidos vizinhos sem indução de uma resposta adversa do hospedeiro (RATNER & BRYANT, 2004) e que também reúnam atividade imunomoduladora, caracterizando-o como um modificador da resposta biológica (MRB), são de potencial interesse biotecnológico (DIALLO et al., 2001; UENO et al., 2001; KWEON et al., 2003; SENEL & MCCLURE, 2004).

Os polissacarídeos são capazes de atuar seja como biomateriais, seja como MRB, estimulando o sistema imune *in vitro* e *in vivo*, e contribuindo favoravelmente no processo cicatricial. A quitina e a quitosana são exemplos clássicos de polissacarídeos utilizados como biomateriais (KUMAR, 2000; SENEL & MCCLURE, 2004; WITTAYA-AREEKUL & PRAHSARN, 2006), enquanto polissacarídeos como o APS-1 de *Aloe vera* (WU et al., 2006), a arabinogalactana péctica de *Vernonia kotschyana* (NERGARD et al., 2005) e outros polissacarídeos de origem vegetal (SCHEPETKIN & QUINN, 2005) apresentam atividade imunomoduladora.

Entre esses, pode-se citar o heteropolissacarídeo extraído da goma do *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) que tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios frente ao processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos e caprinos (MONTEIRO et al., 2004; PAIVA, 2003; SCHIRATO et al., 2006). O cajueiro (*Anacardium occidentale*) pertence à família Anacardiaceae e exuda uma goma constituída por um heteropolissacarídeo ramificado. Trata-se de uma arabinogalactana ácida, com massa molecular de $1,1 \times 10^4$, cuja cadeia principal é constituída por uma β -(1 \rightarrow 3)-galactana, substituída em O-6 por várias cadeias laterais: 1. β -D-GlcA-(1 \rightarrow 6)-

beta-D-Gal-(1→6)-β-D-Gal; 2. α-D-Gal-(1→6)-D-Gal-; e, 3. α-L-Ara-(1→6)-D-Gal (MENESTRINA et al., 1998). As propriedades reológicas desta goma demonstram que ela apresenta viscosidade comparável à goma arábica, apresentando múltiplas possibilidades de uso na indústria farmacêutica, de cosméticos, como aglutinante de cápsulas e comprimidos e também na indústria de alimentos, como estabilizante de sucos, cerveja e sorvetes (PAULA & RODRIGUES, 1995).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a evolução do processo cicatricial cutâneo, sob os aspectos clínicos e histopatológicos, do tratamento tópico de lesões cutâneas tratadas com filmes poliméricos preparados com o POLICAJU.

Materiais e Métodos

Animais

Camundongos fêmeas, (*Mus musculus*) *Swiss* (n=60) foram utilizados, com 11 a 13 semanas de vida e pesando 35,0±5,0g, os quais foram criados e mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, permanecendo em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura 23±2°C e umidade 55±10%) com fornecimento de água e ração *ad libitum*.

Obtenção do polissacarídeo da goma do *Anacardium occidentale*

A goma de *Anacardium occidentale* L. foi coletada no litoral sul do Estado de Pernambuco (Praia de Tamandaré), Brasil. O POLICAJU foi obtido de acordo com o método de Menestrina et al (1998).

Preparação dos filmes de POLICAJU (Curativos Oclusivos)

Os filmes (curativos) foram obtidos empregando-se a metodologia de Carneiro-da-Cunha (1999), modificada. Após a solubilização do POLICAJU na concentração de 10% (m/v), separadamente em ácido acético 4% (v/v POLICAJU/AA) e NaCl 0,15M POLICAJU/NaCl); as soluções foram submetidas a agitação constante durante 16 horas a 25°C, e seu pH ajustado para 5,0 com solução de NaOH 1M. Após este procedimento, 200µl das soluções esterilizadas teste (POLICAJU/ AA e POLICAJU/NaCL) e controle (ácido acético 4% e NaCl 0,15M) foram colocados sobre a superfície suporte celulósico (1,0 cm²), preparado de forma asséptica, uma vez que foram expostos à luz ultravioleta em câmara de fluxo laminar por 30 minutos antes da adição as respectivas soluções, e os curativos foram secos em estufa a 50±5°C.

Para verificar o preparo asséptico dos curativos, três amostras foram coletadas aleatoriamente de cada tipo de curativo e submersas em caldo nutriente por 24h em estufa microbiológica a 37°C. A turvação do meio de cultura evidenciava contaminação e o lote era imediatamente descartado. Os curativos foram conservados e transportados em placas de Petri esterilizadas.

Avaliação da atividade cicatrizante

Para realização do procedimento cirúrgico experimental, os camundongos foram previamente anestesiados com cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10% (10 mg/Kg e 115 mg/Kg, respectivamente), por via intraperitoneal (HALL & CLARKE, 1991). Após a anestesia, foram realizadas a tricotomia e a anti-sepsia da região dorsal torácica com iodopovidona e solução salina estéril NaCl 0,15M. A pele foi demarcada com caneta dermatográfica, usando-se um paquímetro para delimitar a área (1,33 ± 0,2

cm²) e a ferida cutânea foi produzida pela incisão da pele através de lâmina de bisturi número 15 e a tela subcutânea foi divulsionada com tesoura de pontas tipo fina/fina e pinça de dissecação, até sua completa ressecção. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (ofício nº 28/05).

Após a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram aleatoriamente organizados em 4 grupos (n = 15/grupo), de acordo com o tipo de curativo aplicado: 1, NaCl (NaCl 0,15M); 2, AA (ácido acético 4% v/v); 3, POLICAJU/AA (filme polimérico contendo POLICAJU 10% em ácido acético 4% v/v) e 4, POLICAJU/NaCl (filme polimérico contendo POLICAJU 10% em NaCl 0,15M). Imediatamente após a realização das feridas cirúrgicas os curativos foram aplicados topicamente, uma única vez, nas feridas cirúrgicas de acordo com o grupo, e o processo cicatricial ocorreu por segunda intenção.

As feridas foram avaliadas diariamente até o 12^o dia de pós-operatório (P.O.) sob o ponto de vista clínico, evidenciando-se sinais como edema, presença de crosta e exsudato, além da mensuração da área, com auxílio de um paquímetro. A contração da lesão foi avaliada através do cálculo da área da ferida, utilizando-se da equação descrita por Prata et al. (1988): $A = \pi \cdot R \cdot r$, onde “A” representa a área, “R” o raio maior e “r” o raio menor da ferida. O cálculo do grau de contração da ferida foi expresso como percentual, assim como o índice de cicatrização, utilizando-se as equações propostas por Ramsey et al. (1995): $100 \times (W_0 - W_i) / W_0 = M \pm DP$, onde W_0 = área inicial da ferida; W_i = área da ferida no dia da biópsia (2^o, 7^o e 12^o dias).

Análises histopatológicas

Após os camundongos anestesiados, conforme previamente descrito, amostras do tecido lesionado foram coletadas nos tempos 2^o, 7^o e 12^o dias P.O. (pós operatório), com o objetivo de realizar a análise histopatológica. Em cada um desses tempos, cinco animais foram retirados aleatoriamente dos grupos experimentais e após a realização da biópsias, foram submetidos à eutanásia por superdosagem de Pentobarbital sódico (200 mg/Kg) por via intraperitoneal. Para a obtenção dos fragmentos de biópsia, com o auxílio de bisturi e tesoura com ponta fina, a pele e tela subcutânea foram incididas e divulsionadas ao redor da ferida (\pm 0,5 cm) obtendo-se um fragmento que apresentava pele íntegra, área de transição entre pele íntegra e ferida e leito da ferida. As amostras de tecido foram fixadas em formaldeído 4% (v/v) preparado em PBS 0,01M, pH 7,2. Estas amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina. Após microtomia, os cortes foram corados pelo Tricrômico de Masson (MICHALANY, 1991).

Análises estatísticas

Os dados paramétricos (áreas das feridas) foram expressos como média \pm desvio padrão ($M \pm dp$), submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey, aceitando como estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de 5%. Os dados categorizados (características clínicas) foram testados quanto à possibilidade de interveniência do tratamento utilizado, utilizando-se o teste do Qui-quadrado, sendo aceitos como estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de 5%.

Resultados

Avaliação clínica

Ao longo dos 12 dias do período pós-operatório, avaliações macroscópicas do processo cicatricial foram realizadas diariamente, a partir de um protocolo clínico e registro fotográfico, observando-se a ocorrência de sinais flogísticos, como edema, hiperemia e características exsudativas, além de formação de crosta e da mensuração das áreas das lesões.

Na Figura 1(A e B) estão representados os efeitos dos tratamentos das lesões cutâneas com curativos preparados com as soluções de ácido acético 4% (v/v), POLICAJU/AA (Figura 1A) e NaCl 0,15M; POLICAJU/NaCl (Figura 1B) frente ao desenvolvimento de edema na região das lesões.

O edema foi observado ao longo de todo o experimento (12 dias), com exceção do grupo POLICAJU/AA que só o apresentou até o 10^o do P.O. (Figura 1A). No primeiro dia de avaliação o grupo Controle AA apresentou uma redução de 20% de edema, a qual foi estatisticamente significativa quando comparada ao grupo POLICAJU/AA ($p \leq 0,05$). No 3^o dia de P.O., 100% dos animais apresentaram edema; no entanto, a partir do 6^o dia, observou-se uma redução deste sinal flogístico nos grupos Controle AA (Figura 1A), assim como nos grupos Controle NaCl e POLICAJU/NaCl (Figura 1B), na ordem de 10%. Entre os animais do grupo POLICAJU/AA, ocorreu redução de 10% na frequência dos edemas a partir do 7^o dia, desaparecendo completamente ao 11^o dia (Figura 1A).

A observação da hiperemia e do tecido de granulação neoformado nos grupos controles e tratados estava prevista no protocolo experimental. No entanto, a natureza oclusiva do curativo associada à presença de crostas ao longo do experimento dificultou

a observação e análise destes dados, sendo apenas possível observar a hiperemia pelas margens do curativo e visualizar o tecido de granulação após o desprendimento das crostas.

A presença de crostas foi um evento marcante desde o primeiro dia de avaliação (Figura 2A e 2B). Na fase inflamatória, estas eram inicialmente secas, finas e transparentes nas primeiras 24h, quando passaram a apresentar uma coloração rosada e um aspecto opaco a partir do 3^o dia. Na fase fibroblástica, por volta do 6^o dia de avaliação, apresentava-se seca, escura, espessa e irregular, com características exuberantes em alguns animais. Este aspecto foi mantido até o final do período de avaliações. Diferenças foram observadas em relação ao aparecimento da primeira crosta: no primeiro dia do P.O., os animais dos grupos Controle/AA e POLICAJU/AA, apresentaram respectivamente, 20,0% e 44,4% de aparecimento de primeira crosta. A partir do 8^o dia os animais do grupo POLICAJU/AA apresentaram desprendimento progressivo da 1^a crosta (Figura 2A) e conseqüente aparecimento da segunda crosta (Figura 3A), evidenciando-se ao 12^o dia 0,0% de 1^a crosta e 100,0% de aparecimento de 2^a crosta, sugerindo-se uma maior reepitelização e aceleração do processo cicatricial. Nas Figuras 2B e 3B, observa-se padrão semelhante de resposta do grupo POLICAJU/NaCl e Controle NaCl em relação ao desprendimento da 1^a crosta e aparecimento da 2^a crosta.

As características exsudativas (Figura 4A e 4B) foram acompanhadas durante o experimento; sendo visualizado no grupo POLICAJU/NaCl no 1^o dia P.O. (Figura 4A) uma significativa presença de exsudato na fase inflamatória ($p \leq 0,05$) com índice de cerca de 70%. Um aspecto a ser ressaltado é a característica macroscópica da exsudação visualizada, a qual é comumente encontrada na fase inflamatória, apresentando um

aspecto sero-sanguinolento. Nenhuma lesão experimental dos grupos analisados apresentou infecção com secreção purulenta.

A evolução macroscópica do processo cicatricial foi acompanhada pela mensuração das áreas das lesões ao longo de 12 dias pós-cirúrgicos (Figura 5A e 5B), pois a mensuração da área de uma ferida consiste em um indicador direto e simples para avaliar a evolução do processo (SCHULTZ et al., 2005). Até o 7^o dia, os grupos tratados apresentam uma evolução semelhante aos grupos controles. Entretanto, o período compreendido entre o 8^o ao 12^o dias foi marcado por reduções de área mais evidentes quando comparados aos controles. No último dia de avaliação, as lesões tratadas com POLICAJU/NaCl (Figura 5B) apresentaram maior percentual de contração (92,85%). Neste mesmo período, apresentou área média das lesões deste era de $0,11 \pm 0,03$.

Do ponto de vista macroscópico, pode-se observar a aparente eficácia do tratamento com a filme polimérico POLICAJU/NaCl comparada aos demais grupos analisados. Aos 12 dias, não houve diferença significativa nas respostas dos tratamentos que utilizaram ácido acético 4% (v/v), POLICAJU/AA e NaCl, em relação à área da lesão.

Análises histopatológicas

A análise histopatológica do grupo NaCl 0,15M ilustra a evolução normal do processo reparativo. O 2^o dia P.O. (Figura 6) é caracterizado pela presença de crosta eosinofílica, exsudato, infiltrado de polimorfonucleares e angiogênese. Os grupos tratados apresentaram características histopatológicas semelhantes ao grupo controle, ressaltando-se a presença de um tecido menos desenvolvido e mais friável nos grupos AA e POLICAJU/NaCl neste período.

Durante o 7^o dia pós-operatório (Figura 7), as lesões do grupo controle/AA apresentaram tecido de granulação com padrão vascular, poucas fibras colágenas na matriz extracelular e resíduos de infiltrado inflamatório. Os grupos tratados com POLICAJU caracterizaram-se por apresentar reepitelização parcial e uma grande quantidade de fibroblastos é observada na “derme” do grupo POLICAJU/NaCl

No 12^o dia (Figura 8), o grupo tratado com NaCl apresentou reepitelização total e um tecido de granulação fibroso, compatível com a evolução do processo (período cicatricial). Nos grupos tratados com ácido acético é observado um tecido de granulação fibrovascular, organizado em um padrão diferenciado em camadas; ou seja, estes animais apresentaram uma camada fibrosa com fibras colágenas, sugerindo remodelação e abaixo da mesma, um tecido de granulação de características fracamente vasculares. O grupo POLICAJU/NaCl apresentou um padrão mais evoluído, uma vez que observou-se neste grupo: reepitelização completa, presença de uma delgada camada de queratina sobre a epiderme neoformada, tecido colagenoso e presença de brotos de anexos cutâneos.

Discussão

As tentativas de intervir no processo de cicatrização das feridas, acidentais ou provocadas como parte da realização de procedimentos, remontam à Antigüidade, demonstrando que desde então já se reconhecia a importância de protegê-las de forma a evitar que se complicassem e repercutissem em danos locais ou gerais para o paciente (Mandelbaum et al.,2003).

Segundo Ayello et al. (2003), o sucesso no tratamento de feridas depende mais do conhecimento dos profissionais envolvidos, de sua capacidade de avaliar e selecionar adequadamente técnicas e recursos, do que da disponibilidade de recursos e tecnologias

sofisticadas. Uma intervenção efetiva no processo cicatricial, com o objetivo de favorecê-lo implica na necessidade de estabelecer metas realistas, que considerem diversos fatores, como o diagnóstico preciso do tipo de lesão, de seu estágio de evolução, fatores intervenientes a partir de critérios clínicos e técnicos. Assim, quaisquer decisões para direcionar esse processo devem ser fundamentadas em uma acurada avaliação clínica, identificando-se cuidadosamente o estágio do processo cicatricial, de forma sistemática e periódica, a partir de critérios e protocolos de avaliação bem estabelecidos.

De acordo com Schlutz et al. (2005), a rotina de acompanhamento de uma ferida é um elemento crítico para o diagnóstico e monitoramento do tratamento, o qual pode ser utilizado, em alguns casos, para prever o resultado final. Um outro aspecto ainda a ser considerado, segundo Bryant (2000), é que um protocolo clínico adequadamente proposto e aplicado não requer equipamentos dispendiosos nem técnicas complicadas. Deste modo, alguns parâmetros simples podem ser usados para monitorar o progresso geral do reparo tecidual, como localização, tempo de evolução, medida da área, profundidade, vitalidade do leito e dos tecidos circunvizinhos, presença de secreção e necrose, coloração do leito da ferida, sensibilidade cutânea e presença de crostas, entre outros.

Estudos anteriores têm avaliado o efeito dos tratamentos tópicos diários com emulsões e pomada contendo POLICAJU e aplicadas em camundongos (Paiva, 2003; Schirato et al, 2006) e caprinos (Monteiro, 2003).

Paiva (2003) utilizou diferentes concentrações de emulsões POLICAJU/ácido ascórbico em lesões cutâneas excisionais em camundongos, para avaliar a progressão do processo reparativo (até o 12^o dia), evidenciando sinais flogísticos menos intensos nos grupos tratados comparados aos controles (tratados com NaCl 0,15M). No 7^o dia de

pós-operatório, também observou a presença de tecido de granulação de padrão fibrovascular e intensa angiogênese especialmente no grupo tratado com a emulsão contendo POLICAJU na concentração de 150mg/mL. No 12^o dia de pós-operatório, foi observada a formação de tecido de granulação fibrovascular e a presença de tecido fibroso com pobre organização de fibras colágenas nos grupos tratados com solução salina e ácido ascórbico (controles). Já as feridas tratadas com a emulsão POLICAJU 150mg/ml, demonstraram, neste período, tecido de granulação com fibras colágenas bem organizadas e reepitelização completa.

Schirato et al. (2006) avaliaram o efeito de emulsões de POLICAJU (150mg/mL) quanto à fase inflamatória do processo de reparação, sob os aspectos clínicos, morfométricos e histopatológicos. A avaliação macroscópica das feridas permitiu evidenciar sinais flogísticos menos acentuados no grupo tratado quando comparados aos dos grupos controle. Quanto à evolução da área das lesões não observou diferenças significativas em relação aos grupos controles. O aspecto histopatológico das feridas foi semelhante em todos os grupos entre o 1^o e 5^o dias, apresentando aspecto característico do processo inflamatório. Ao 6^o dia, foi observado tecido de granulação fibrovascular e presença de trabéculas de tecido conjuntivo, ocasionando áreas de tensão no tecido.

Pomada à base de POLICAJU e lanolina 33% (p/p) foi aplicada em feridas cirúrgicas de caprinos por Monteiro (2003). A análise clínica da aplicação desta formulação, realizada no período de 28 dias, também demonstrou no grupo tratado diminuição dos sinais flogísticos como edema e exudação, e não promoveu redução significativa das áreas de lesões comparando ao grupo controle. A análise dos aspectos histopatológicos aos 28 dias de tratamento revelou um tecido fibrovascular com fibras colágenas organizadas e remodeladas.

A aplicação do POLICAJU na forma de curativo oclusivo demonstra vantagens em relação às apresentações em forma de emulsão e pomada uma vez que estas formas de curativos são capazes de criar um ambiente que mantém a umidade normal da ferida, também servindo como uma barreira a infecções. Os achados clínicos referentes à aplicação das emulsões e pomada a base de POLICAJU, corroboram com os nossos resultados, uma vez que os grupos tratados com POLICAJU apresentaram minimização dos sinais flogísticos, principalmente do edema, quando comparados aos grupos controles. No entanto, o grupo POLICAJU/NaCl apresentou áreas estatisticamente menores ($p \leq 0,05$) aos 12 dias de avaliação, evidenciando-se que esta formulação é capaz de favorecer o fechamento da lesão, apresentando um efeito acelerador sobre o processo cicatricial. Esse efeito também é observado na análise histopatológica das lesões aos 12 dias, onde este grupo apresenta reepitelização completa, uma delgada camada de queratina sobre a epiderme neoformada, tecido colagenoso e presença de brotos de anexos cutâneos, padrão este mais evoluído que o tecido com característica fibrovascular apresentado aos 12 dias com os tratamentos utilizando emulsão e pomada a base de POLICAJU.

O uso de curativos oclusivos convencionais promove uma proteção passiva do leito da ferida, de forma que um importante objetivo a ser atingido é o desenvolvimento de meios que possam efetivamente favorecer o microambiente necessário à cicatrização, remover o excesso de exsudato e permitir um processo de reconstrução tecidual contínuo. O curativo ideal deve apresentar as seguintes propriedades: (1) proteger a lesão de infecções secundárias; (2) manter a hidratação do meio; (3) prover isolamento térmico; (4) remoção sem causar traumas ao leito da ferida; (5) remover *debris* celulares; (6) estar livre de produtos tóxicos e particulados e (7) promover o processo de reconstrução tecidual (Wittaya-Areekul & Prahsarn, 2006). Diante dos resultados

observados, podemos sugerir que o curativo com POLICAJU/ NaCl, apresenta muitas das características de um curativo oclusivo ideal como: proteção de lesões de infecções secundárias; hidratação do meio; estar livre de produtos tóxicos e promover o processo de reconstrução tecidual, podendo ser aplicado como um biomaterial.

Rezende et al. (2005) relatam que filmes densos e porosos de polímeros absorvíveis são obtidos com o intuito de servirem como um substrato para que células isoladas possam fixar-se e crescer até formar o tecido. Este suporte pode agir tanto como apoio físico, quanto como um substrato aderente para as células isoladas durante a cultura celular *in vitro* ou subsequente implante para promover a regeneração natural de tecidos. Kapoor & Appleton (2006), citam a utilização de filmes poliméricos semi-permeáveis, curativos de alginato, revestimento de carboximetil–celulose no tratamento de feridas crônicas. Schultz et al. (2005), relatam que curativos oclusivos têm sido usados em feridas crônicas para criar melhores condições para reepitelização, servindo também como barreira à infecção.

Conclusão

Neste contexto, o desenvolvimento de filmes poliméricos a partir de POLICAJU e sua utilização como curativo oclusivo surgiu para melhorar sua aplicação como biomaterial, aproveitando suas características de MRB. Este benefício é comprovado quando comparados os seus efeitos cicatrizantes com formulações terapêuticas como emulsões e pomadas veiculando este biomaterial. No entanto, vale ressaltar que para avaliação da melhor forma de tratamento de lesões cutâneas com diferentes formulações, foi avaliado o conjunto de dados coletados através da avaliação dos parâmetros clínicos, morfométricos e histopatológicos, considerando que tais

aspectos são individualmente importantes, mas complementares na decisão da melhor conduta terapêutica no tratamento dessas lesões.

Agradecimentos

Aos órgãos de fomento FACEPE, CNPq e CAPES.

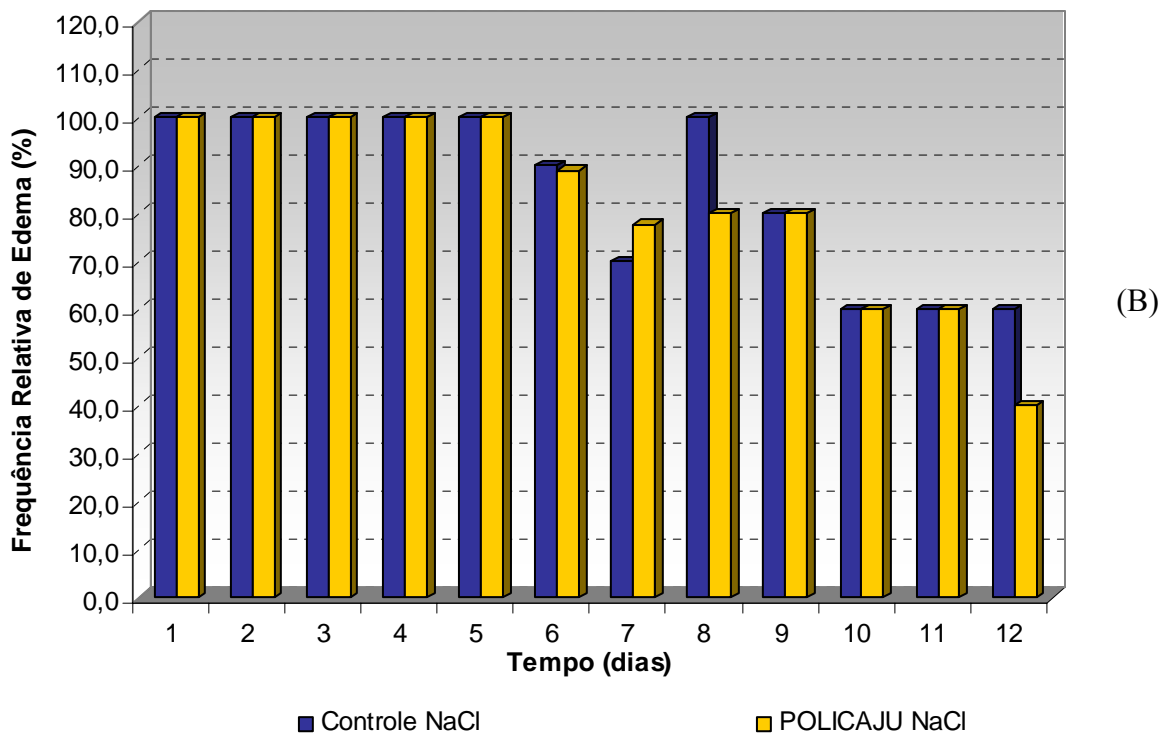
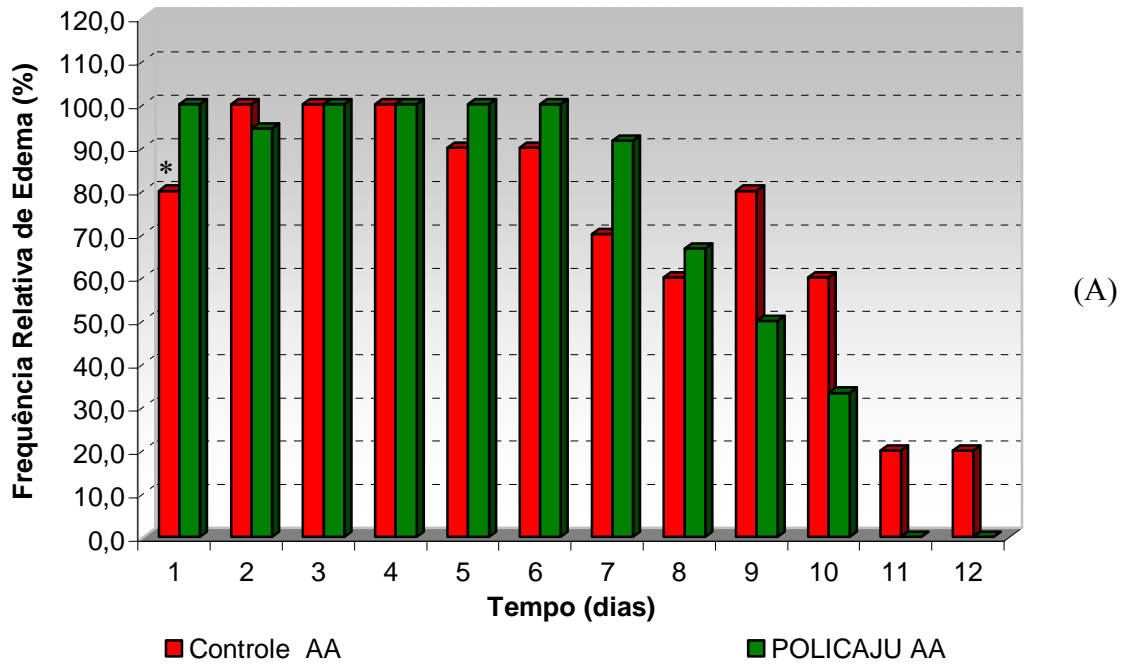


Figura 1- Frequência relativa de edema (%). (A) grupos Controle AA (ácido acético 4%) e Grupo POLICAJU/AA (POLICAJU/ Ácido acético) e (B) grupos Controle NaCl (NaCl 0,15M) e POLICAJU/NaCl (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v).

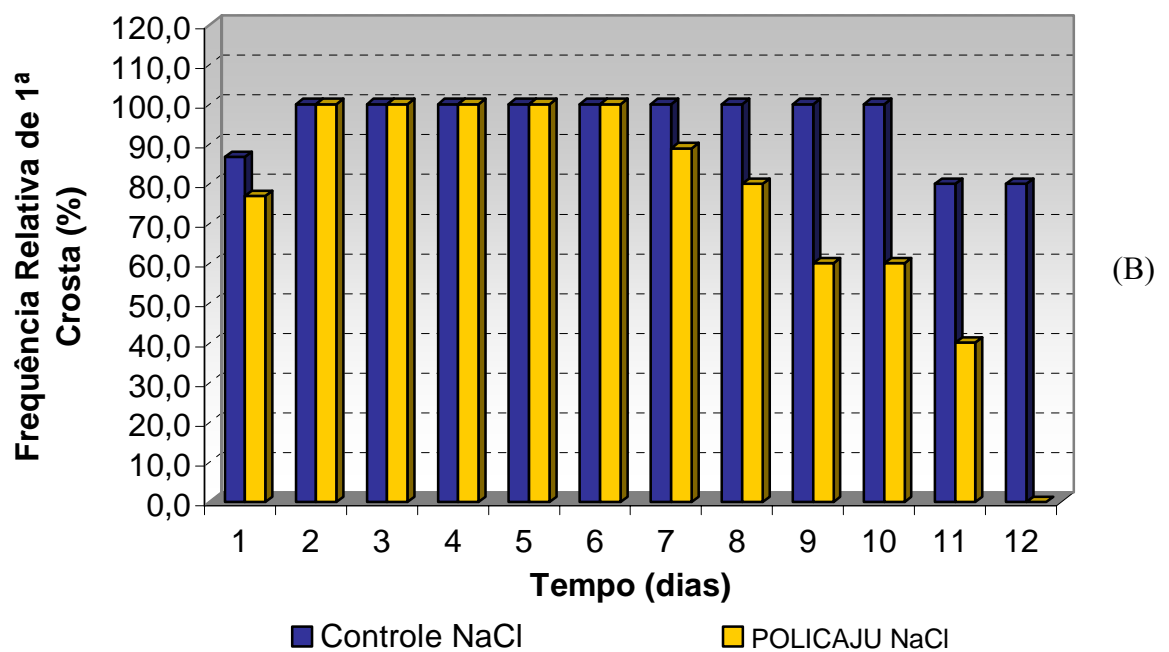
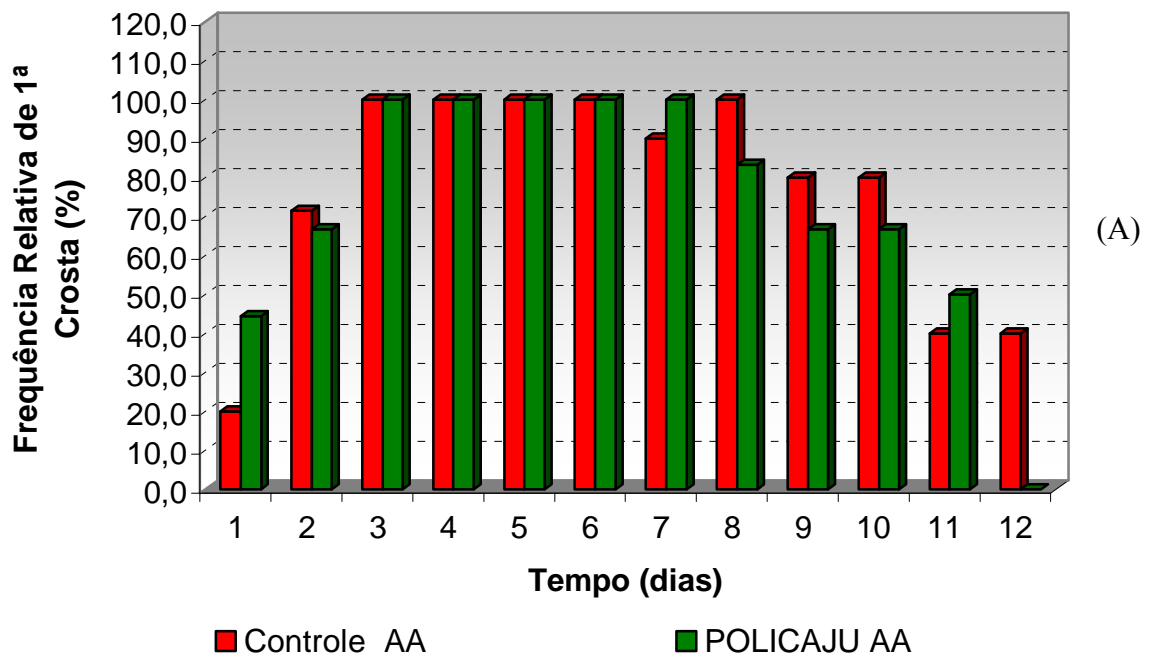


Figura 2- Frequência relativa de 1ª crosta (%). (A) grupos Controle AA (ácido acético 4%) e Grupo POLICAJU/AA (POLICAJU/ Ácido acético) e (B) grupos Controle NaCl (NaCl 0,15M) e POLICAJU/NaCl (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v).

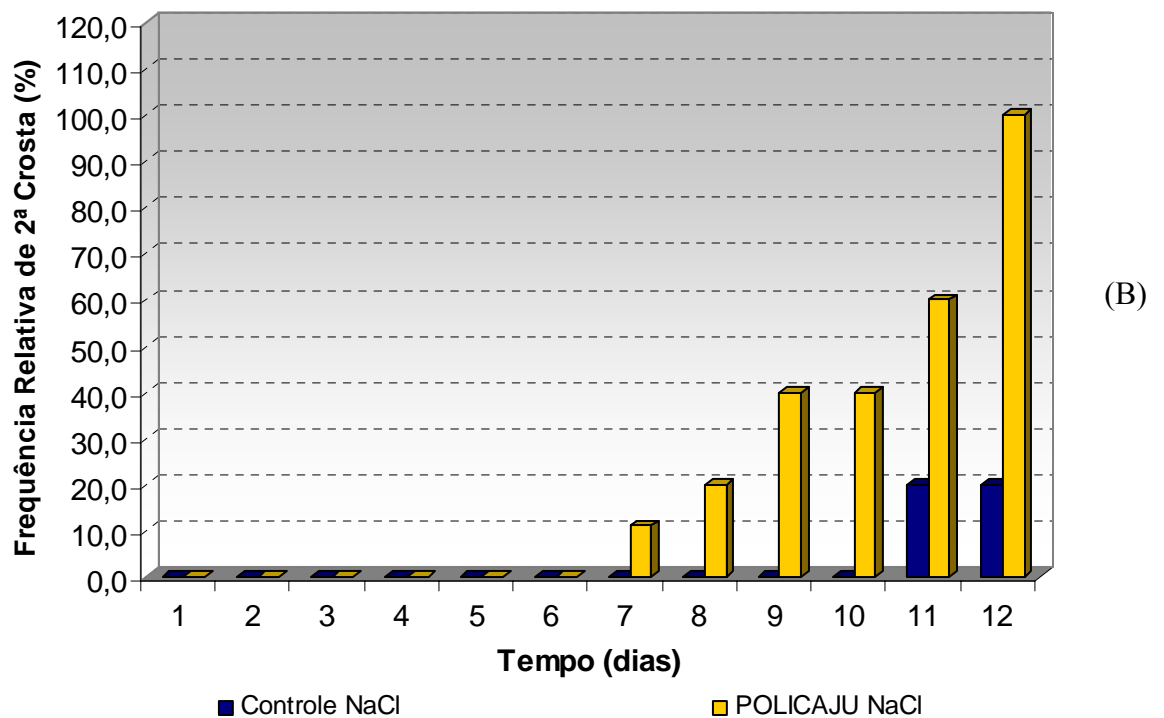
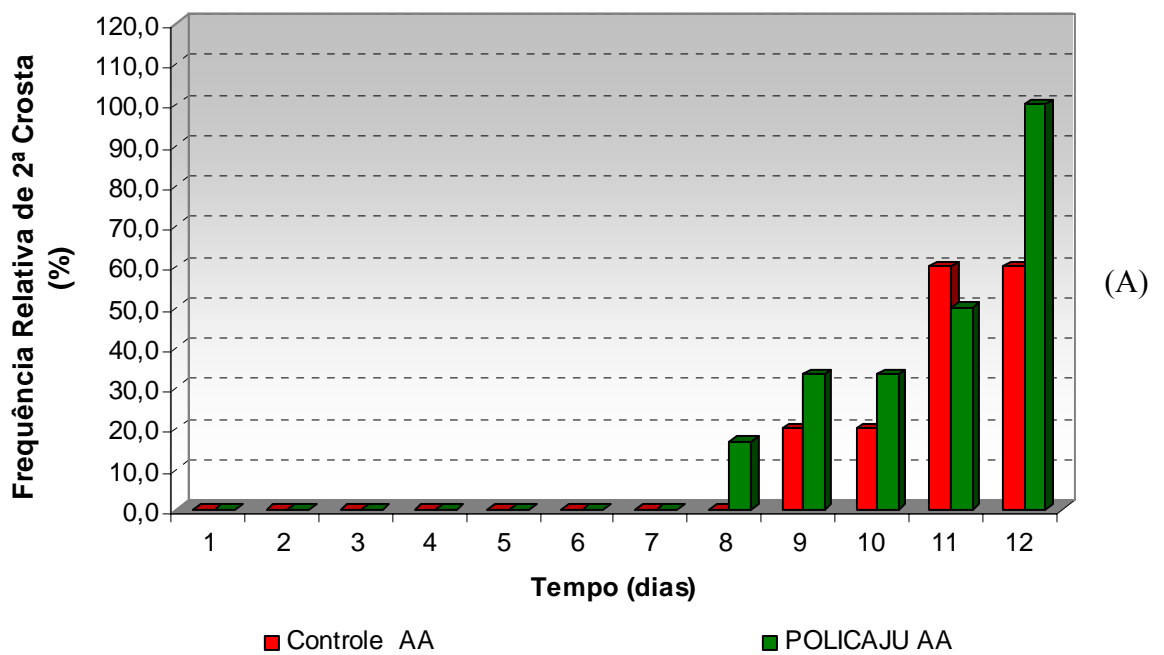


Figura 3- Frequência relativa de 2^a crosta (%). (A) grupos Controle AA (ácido acético 4%) e Grupo POLICAJU/AA (POLICAJU/ Ácido acético) e (B) grupos Controle NaCl (NaCl 0,15M) e POLICAJU/NaCl (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v).

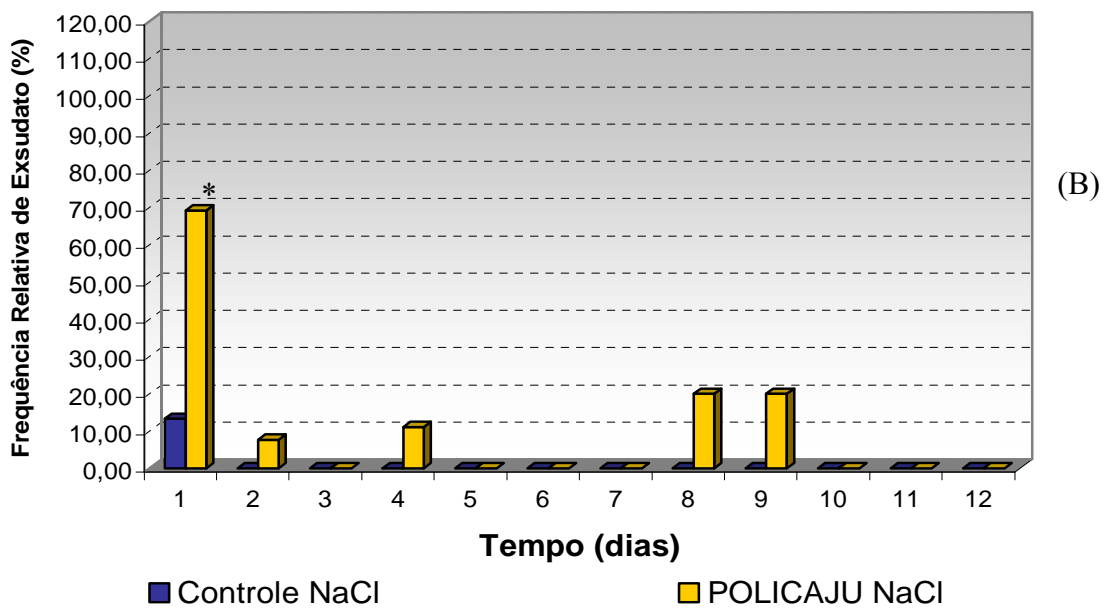
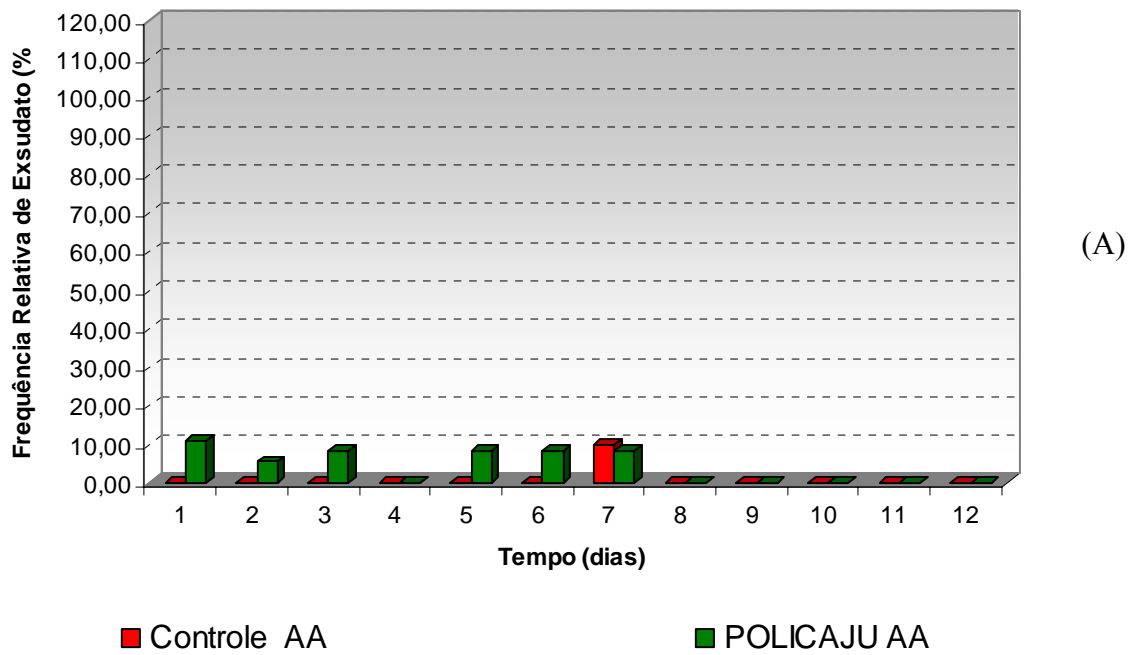


Figura 4- Frequência relativa de exsudato (%). (A) grupos Controle AA (ácido acético 4%) e Grupo POLICAJU/AA (POLICAJU/ Ácido acético) e (B) grupos Controle NaCl (NaCl 0,15M) e POLICAJU/NaCl (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v).

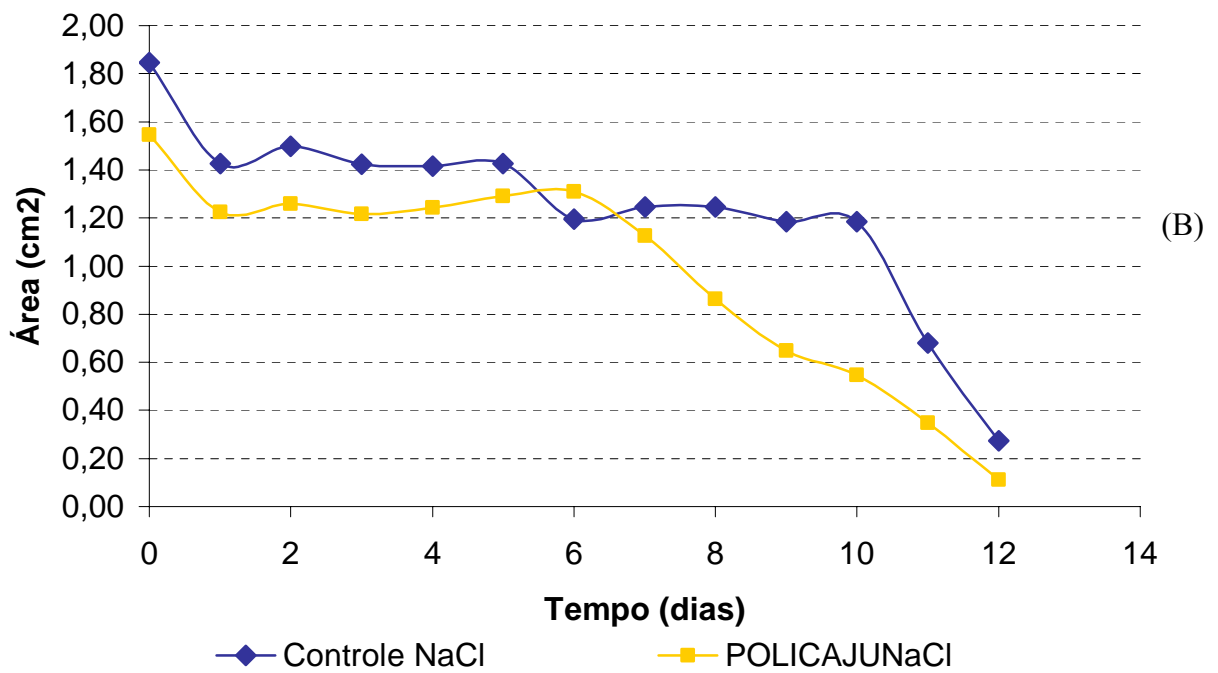
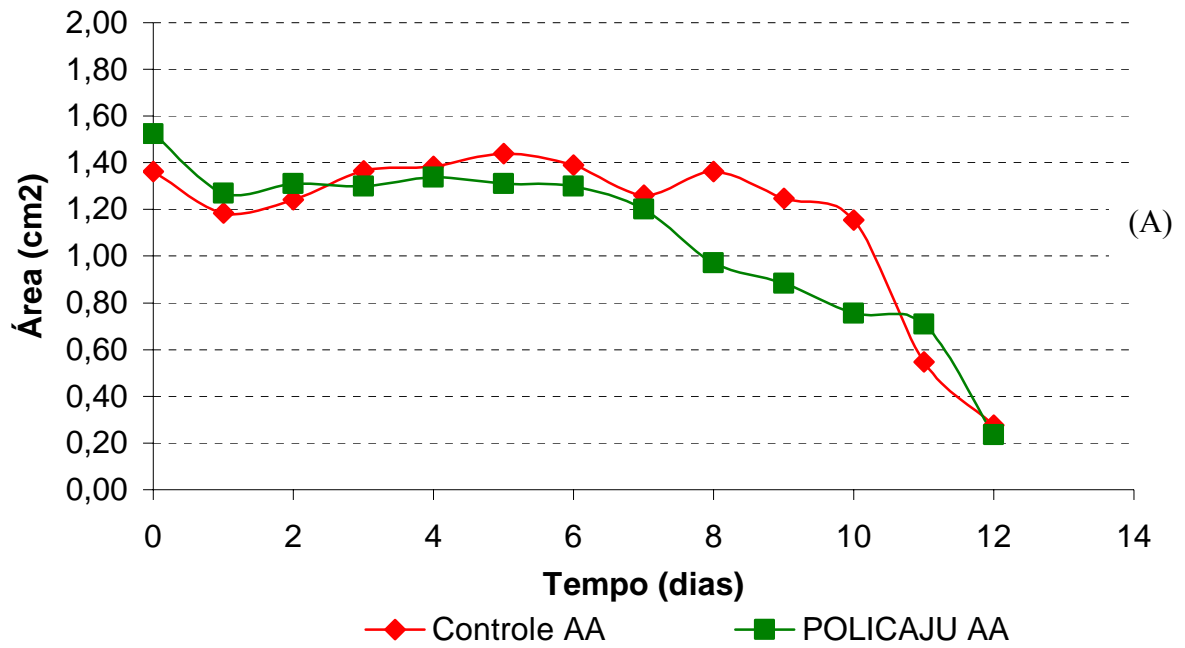


Figura 5- Evolução das áreas das lesões após tratamento utilizando ácido acético 4% (Controle AA), POLICAJU/AA (A) e NaCl 0,15M (Controle NaCl), POLICAJU/NaCl (B)

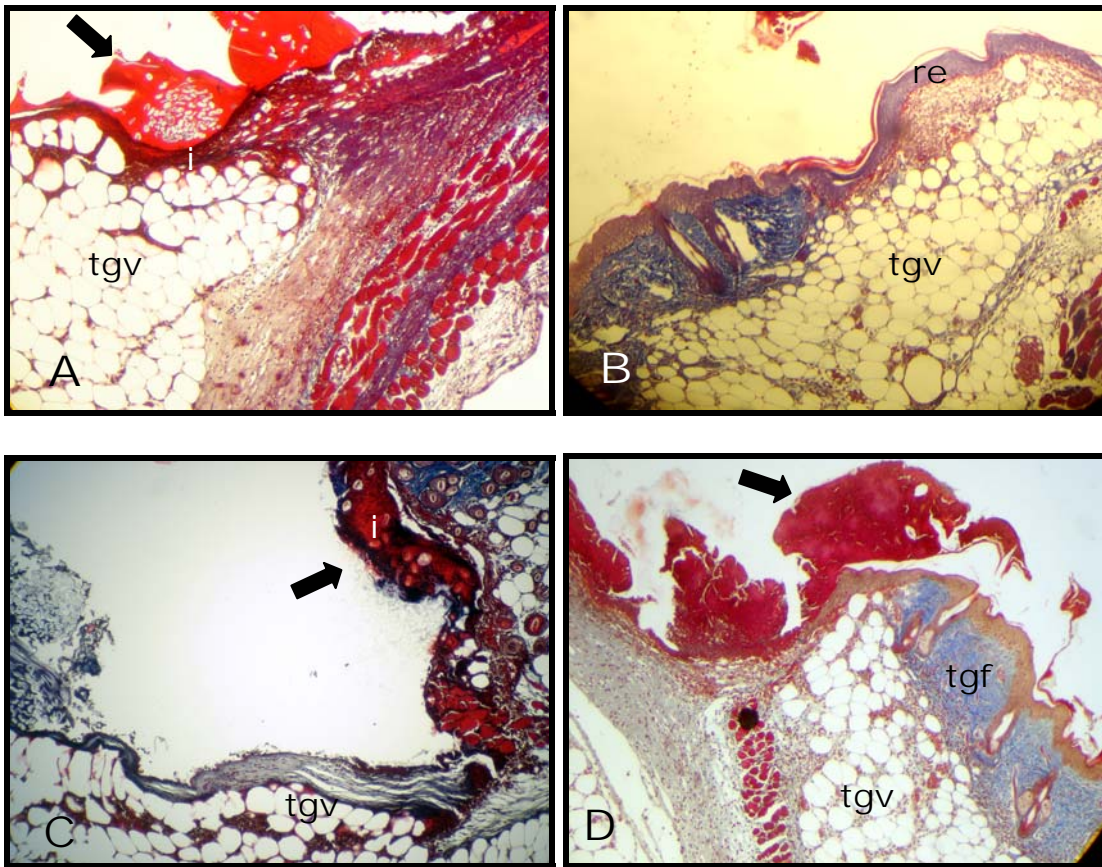


Figura 6 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo (fase inflamatória), após 48 horas. Coloração Tricrômico de Masson. Ampliação original 100x. A, NaCl 0,9%; B, Ácido Acético 4%; C, POLICAJU-NaCl; D, POLICAJU-Ácido Acético.

Seta larga – crosta; **re** – reepitelização; **tgv** – tecido de granulação de característica vascular; **tgf** – tecido de granulação de característica fibrosa; **at** - área de transição com a pele normal; **i** – infiltrado inflamatório.

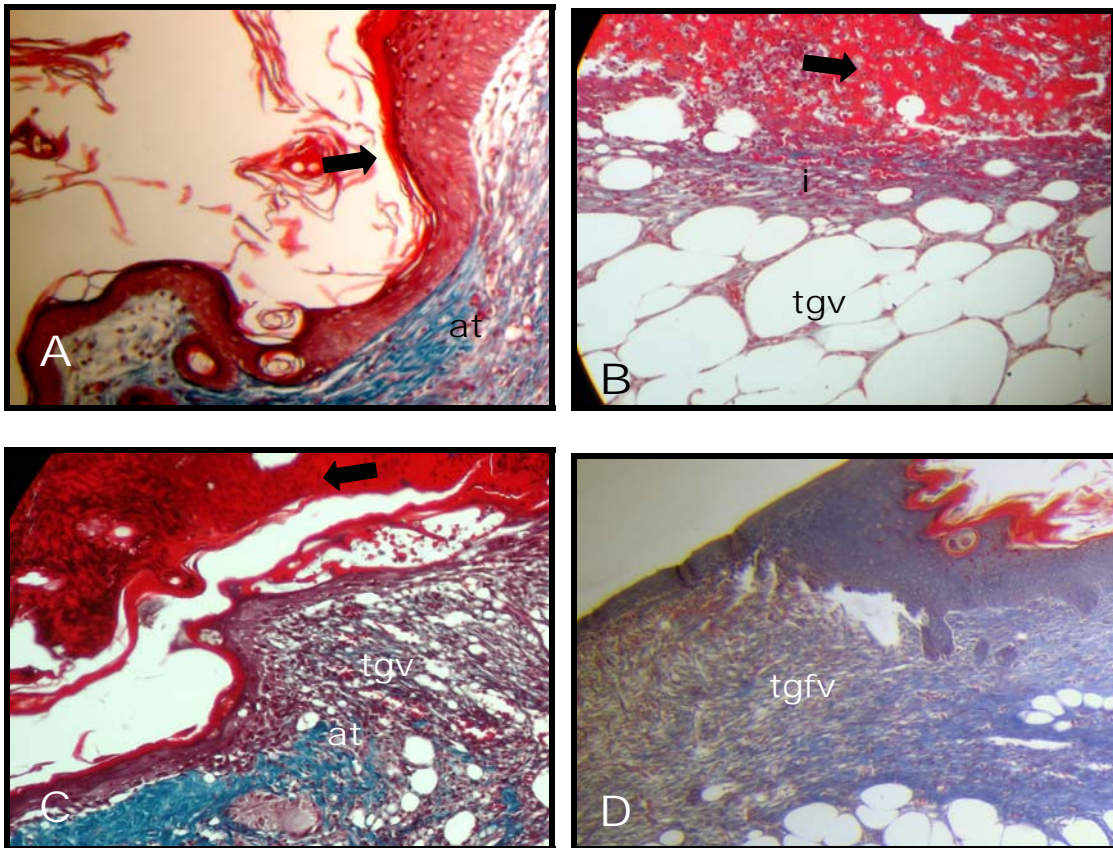


Figura 7 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo (fase inflamatória), após 7 dias. Coloração Tricrômico de Masson. Ampliação original 200x. A, NaCl 0,9%; B, Ácido Acético 4%; C, POLICAJU-NaCl; D, POLICAJU-Ácido Acético.

Seta larga – crosta; **re** – reepitelização; **tgv** – tecido de granulação de característica vascular; **tgfv** – tecido de granulação de característica fibrovascular; **at** - área de transição com a pele normal; **i** – infiltrado inflamatório.

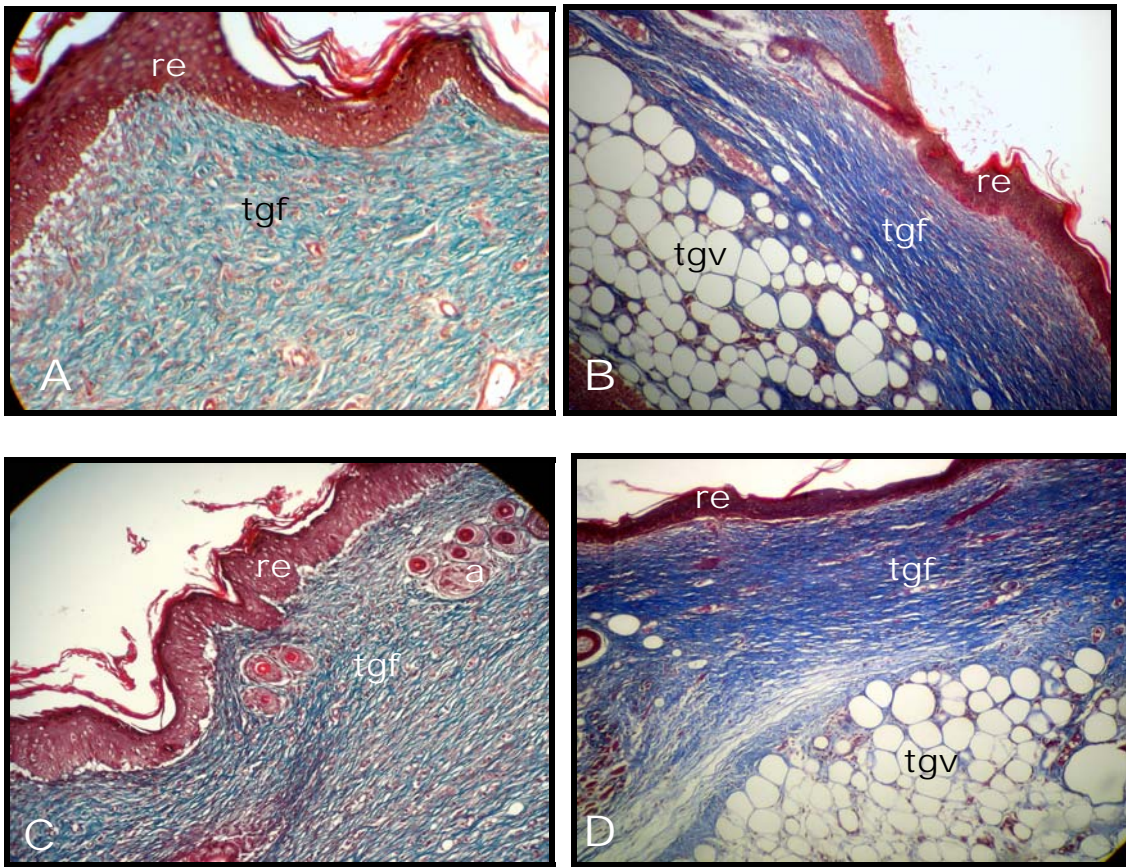


Figura 8 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo (fase inflamatória), após 12 dias. Coloração Tricrômico de Masson. Ampliação original 200x. A, NaCl 0,9%; B, Ácido Acético 4%; C, POLICAJU-NaCl; D, POLICAJU-Ácido Acético.

re – reepitelização; **tgv** – tecido de granulação de característica vascular; **tgf** – tecido de granulação de característica fibrosa; **fc** – presença de fibras colágenas; **a**- anexos.

Referencias Bibliográficas

AYELLO, E.; FRANZ, R. Pressure ulcer prevent and treatment: competency-based nursing curricula. **Dermatology Nursing**, v. 15, p. 44-65, 2003.

BIONDO-SIMÕES, M.L.P, PANTE, M.L., MACEDO, V.L., GARCIA, R.F., BOELL, P.,MORAES T.H.C. O hormônio de crescimento e a concentração de colágeno na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v15, p.78-82, 2000.

BRYANT, R. A. **Acute and chronic wounds**. Saint Louis, Mosby , 2^a ed., 2000.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; ROCHA, J. M. S.; GARCIA, F. A. P.; GIL, M. H. Lípase immobilisation on to polymeric membranes. **Biotechnology Techniques**. v. 13, p. 403-409, 1999.

DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.; LILJEBÄCK, T. H. A.; MICHAELSEN, T. E. Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 159-171, 2001.

HALL, L.W.; CLARKE, K.W. **Veterinary anaesthesia**. London: Ballière Tindall, 410p, 1991.

KAPOOR, M.; APPLETON, I. Wound healing: Abnormalities and future therapeutics targets. **Current Anesthesia and Critical Care**. In Press, 2006.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

KWEON, D.K.; SONG, S.B.; AND PARK, Y.Y. Preparation of water-soluble chitosan/ heparin complex and its application as wound healing accelerator. **Biomaterials**, v.24, p.1595–1601, 2003.

LEE, S.B.; JEON ,H.W.; LEE, Y.W.; LEE,Y.M.; SONG, K.W.; PARK, M.H.; NAM, Y.S.; AHN, H.C. Bioartificial skin composed of gelatin and (13), (16)- glucan **Biomaterials** v. 24, n. 14 , p. 2503-2511, 2003.

MANDELBAUM , S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização : Conceitos atuais- Parte I. Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 78, n.4 , p. 75-81, 2003

MENESTRINA, J. M., IACOMINI, M., JONES, C., GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligossaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 2. ed. São Paulo: Michalany, 277 p , 1991.

MONTEIRO,V.L.C. **Reparação Tecidual de Feridas cutâneas de caprinos tratados com polissacarídeo do cajueiro *Anacardium occidentale* L. Estudo Clínico, Bacteriológico e Histopatológico**. 2003. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.2003.

MONTEIRO, V. L. C. ; COELHO, M. C. O. C. ; ANDRADE, L. S. S. ; LEAO, A. M. A. C. . Reparação tecidual de feridas cutâneas de caprinos tratadas com polissacarídeo do cajueiro *Anacardium occidentale*. Aspectos macroscópicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 280-282, 2004.

NERGARD, C. S., MATSUMOTO, T., INNGJERDINGEN, M., INNGJERDINGEN, K., HOKPUTSA, S. E., HARDING, S., MICHAELSEN, T. E., DIALLO, D., KIYOHARA, H., PAULSEN, B. S., YAMADA, H. Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp. (Asteraceae). **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 115-130, 2005

PAIVA, M.G. **Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em cicatrização experimental**. 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PARK, J.E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of Surgery**, v. 187, p. 11S-16S, 2004.

PAULA, R. C. M., RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew trees gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydr. Polym.**, v. 26, p. 177-181, 1995.

PRATA, M., HADDAD, C., GOLDENBERG, S. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, v. 3, n. 2, p. 43-48, 1988.

RAMSEY, D. T., POPE, E. R., WAGNER-MANN, C., BERG, J. N., SWAIM, S. F. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **American journal of veterinary research**, v.56, n.7, p. 941-949, 1995.

RATNER, B.D.; BRYANT, S.J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.6, p. 41-75, 2004

REZENDE, C.A.; LUCHESI, C.; BARBO, M. L. P.; DUEK, E. A. R. Membranas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) como curativos para pele: degradação *in vitro* e *in vivo*. **Polímeros**, v. 15, n.3, p. 232-238, 2005.

SCHEPETKIN, I, A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**. v. 6, p. 317 – 333, 2006.

SCHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F.M. F.; SILVA, F. O.; LIMA- FILHO, J.L.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; PORTO; A.L.F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v.36, p.149-154, 2006.

SCHULTZ ,G. MOZINGO, D., ROMANELLI, M., et al. Wound healing and time; new concepts and scientific applications. **Wound Repair and Regeneration**. v. 13, n. 4, p. S1-S11, 2005

SENEL, S., MCCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine.

Advanced Drug Delivery Reviews, v. 56, p. 1467-1480, p. 2004

TOGNINI, J.R.F., FAGUNDES, D.J., NOVO, N.F., JULIANO, Y. Estudo biomecânico e morfológico da cicatrização da parede abdominal de ratos sob ação de meloxicam.

Acta Cir. Bras., v15, 2000.

UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 105 - 115, 2001.

WITTAYA-AREEKUL, S., PRAHSARN, C. Development and in vitro evaluation of chitosan-polysaccharides composite wound dressings. **International Journal of**

Pharmaceutics, in press, 2006

WU, J. H., XU, C., SHAN, C. Y., TAN, R. X. Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of APS-1, a polysaccharide from *Aloe vera* var. *chinensis*. **Life**

Sciences, v. 78, p. 622-630, 2006

Imobilização de tripsina em filmes de polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. e sua aplicação como curativo em lesões cutâneas

Flaviane Maria Florêncio Monteiro^{1,2}; Germana Michelle de Medeiros e Silva¹, Juciene Bezerra Rodrigues da Silva¹; Joana Firmino de Araújo¹; Camila Souza Porto¹; José Luiz de Lima Filho^{1,3}, Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão^{1,4}, Maria das Graças Carneiro-da-Cunha^{1,3}; Ana Lúcia Figueiredo Porto^{1,4}.

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE; ² Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária - UFRPE; ³ Departamento de Bioquímica - UFPE; ⁴ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Resumo

Filmes obtidos do polissacarídeo extraído da goma do *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) foram utilizados para imobilização de tripsina, por enclausuramento, e aplicados como curativo em lesões cutâneas. Ensaios foram realizados para avaliar a liberação *in vitro* da tripsina e os efeitos do pH e temperatura na atividade, estabilidade e tempo de armazenamento do derivado enzimático imobilizado (DEI). O estudo cinético de liberação da tripsina do DEI demonstrou que a partir das 48h houve uma liberação constante da enzima nas condições analisadas. O DEI apresentou um pH e temperatura ótimos de 8,6 e 55°C, respectivamente. A tripsina mostrou-se estável nas condições do meio, tais como alta temperatura e ampla faixa de pH, retendo cerca de 80% de sua atividade inicial durante 28 dias de armazenamento a 25°C. Os aspectos histopatológicos das lesões cutâneas tratadas com o DEI apresentaram padrão morfológico mais organizado quando comparado aos controles (NaCl 0,15M e ácido acético 4% v/v). Estes resultados demonstram que o POLICAJU pode ser utilizado como matriz para imobilização de tripsina e potencial aplicação como curativo dérmico.

Palavras chave: imobilização, tripsina, *Anacardium occidentale*, filmes poliméricos, cicatrização

Introdução

A formação de filmes de polissacarídeos sobre superfícies sólidas tem importância científica e tecnológica podendo ser empregado no desenvolvimento de biossensores, imunoenaios e membranas biológicas. Na área médica, estão sendo utilizados como fios de sutura e sistemas de liberação controlada de drogas, os quais devem ser biodegradáveis e biocompatíveis (FUJIMOTO et al. 2002; WATANABE et al, 2005).

Enzimas ligadas a filmes poliméricos têm sido usadas como modelo para estudar os efeitos do microambiente sobre o modo de ação da enzima nativa (Cavalcante et al., 2006). A estrutura tri-dimensional da enzima, sensível a alterações do pH do meio, aumento da temperatura e efeitos dos solventes, podem sofrer modificações na cadeia polipeptídica devido a tratamentos extremos que levam a perda da atividade catalítica. Assim, a imobilização dessas moléculas em suportes sólidos pode aumentar consideravelmente a sua estabilidade, permitindo ainda sua remoção do meio de reação e reuso (AMORIM et al., 2003; ZELENETSKII et al., 2003; CAVALCANTE et al., 2006).

O tipo de superfície e o método de imobilização têm profundos efeitos sobre a atividade biológica da enzima imobilizada. Assim, a imobilização enzimática visa obter um biocatalizador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre (ZANIN & MORAES, 2004)

Inúmeros métodos de imobilização têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas da instabilidade enzimática e otimizar suas aplicações (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Dentre esses, o método de enclausuramento é atrativo devido à sua simplicidade e por promover mínimos efeitos sobre a estrutura da enzima (RUCKA & TURKIEWICZ, 1990; DEY et al., 2003). Este método pode ser utilizado para incorporar enzimas em matrizes poliméricas através da formação de filmes, utilizando soluções contendo o polímero e a enzima (ZELENETSKII et al., 2003).

O polissacarídeo extraído da goma do *A. occidentale* (POLICAJU) é um heteropolissacarídeo ramificado ácido, utilizado como substituto da goma arábica em usos farmacêuticos. Este polissacarídeo com massa molecular de $1,1 \times 10^5$ Da, apresenta uma cadeia principal formada por unidades de D-Galp unidas por ligações glicosídicas β -(1→3), substituídos em O-6. É relatada a sua aplicação como potencial agente formador de filmes e espessantes (PAULA & RODRIGUES, 1995; MENESTRINA et al., 1998), além do seu comprovado efeito anti-tumoral (MENESTRINA et al., 1996), anti-parasitário (GADELHA et al., 2001) e cicatrizante (PAIVA, 2003; SCHIRATO et al., 2006). Assim, a facilidade de sua obtenção, sua relatada atividade biológica e suas propriedades reológicas são fatores que viabilizam seu potencial uso como suporte para imobilização.

As proteases são enzimas proteolíticas que ocupam uma importante posição em relação às suas aplicações fisiológicas e no campo comercial. Avanços em técnicas analíticas têm demonstrado que as proteases promovem uma alta especificidade e modificações seletivas de proteína bem como a ativação de formas zimogênicas de enzimas pela limitada proteólise, coagulação sanguínea, lise do coágulo de fibrina, processo secretório e transporte de proteínas através da membrana (RAO et al., 1998). As metaloproteinases de matriz exercem um importante papel no processo de degradação da matriz extracelular, e esta é uma importante característica para o desenvolvimento, morfogênese, reparação e remodelação do tecido (NAGASE et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi imobilizar tripsina pela técnica de enclausuramento em filmes de POLICAJU e avaliar os principais parâmetros que afetam a atividade enzimática tais como: pH, temperatura, concentração da enzima e estabilidade, e sua aplicação como curativo dérmico.

Materiais e Métodos

Materiais

O POLICAJU foi obtido da goma da árvore do *Anacardium occidentale* (cajuero), coletada no litoral sul de Pernambuco (Praia de Tamandaré), de acordo com o método descrito por Menestrina et al., (1998). A celulose (gaze) utilizada como suporte para o filme de POLICAJU foi obtida da Cremer®. A tripsina de pâncreas suíno (E.C. 3.4.21.4) e a azocaseína foram adquiridas da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). Os outros reagentes químicos usados foram de grau analítico.

Preparação do filme e imobilização da enzima por enclausuramento

O filme polimérico foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Carneiro-da-Cunha et al. (1999), modificada. Os filmes foram obtidos após a solubilização do POLICAJU na concentração de 10% (m/v) em ácido acético 4% (v/v), sob agitação constante durante 16 horas a 25°C, e seu pH foi ajustado para 5,0 com uma solução de NaOH 1M. A esta solução foi adicionada tripsina em pó na concentração de 1000µg/mL e solubilizada sob agitação por 1h. Após este procedimento, 200µL da solução foram colocados na superfície de 1,0 cm² de suporte celulósico, e os filmes foram obtidos a temperatura de 50 ± 5°C, sendo denominados de derivado imobilizado (DEI), contendo 200µg de tripsina.

Dosagem de proteína

A determinação protéica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando a albumina bovina sérica (0 - 100 µg/mL) como padrão.

Determinação da atividade enzimática

A atividade proteolítica foi realizada segundo o método de Leighton, (1973) utilizando-se como substrato a azocaseína 1% (m/v), solubilizada em solução tampão de Tris-HCl 0,2M, pH 7,2, contendo 0,1M de CaCl₂. Na determinação da enzima livre incubou-se 250µL de azocaseína 1% (m/v) com 150µL da amostra, por 1 hora a temperatura de 25± 2°C ao abrigo da luz. Para a dosagem no DEI (1 cm²), este foi imerso em 1000µL de azocaseína 1% (m/v) e incubado por 1h, 400µL foram coletados e processados para determinação da atividade enzimática. As absorbâncias foram medidas a 440nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, considerando-se a média para cada amostra. Foi definido como uma unidade de atividade (U) a quantidade de enzima que produz um aumento na densidade ótica de 1, a 440nm no período de 1h. A atividade específica foi obtida através da razão entre a atividade enzimática e a concentração de proteína em miligramas.

Cinética de Liberação da Enzima imobilizada

Os DEIs (1 cm²) foram incubados em 1ml de solução tampão de Citrato-fosfato 0,2M, pH 5,0 durante 72h, sendo a cada 24h coletadas amostras de 150µL do sobrenadante para a determinação da atividade proteolítica e da concentração protéica.

Efeito do pH e da temperatura na atividade da tripsina livre e do DEI

O efeito do pH na atividade da enzima livre e imobilizada na concentração de 1000µg/mL foi avaliado através da incubação das amostras com azocaseína 1% (p/v) solubilizada em soluções tampão 0,2M: pH 5,0-5,4 (citrato-fosfato), pH 6,2-6,8 (fosfato de sódio), pH 7,2-9,0 (Tris-HCl) e pH 9,4-10,2 (glicina-NaOH). O efeito da temperatura foi avaliado incubando as amostras nas temperaturas de 25°C, 35°C, 45°C, 55°C e 65°C.

Efeito do pH e temperatura na estabilidade da tripsina Imobilizada

No estudo da estabilidade ao pH, os DEI foram incubados 60 minutos a 25°C, em diferentes soluções tampão de acordo com o seu valor de pKa (pH 5,0 a 10,2). Após este período os filmes foram coletados e incubados por 1h, em solução de azocaseína 1% (m/v) em solução tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,2 a 25°C. Para a determinação da estabilidade térmica os DEIs foram incubados nas temperaturas de 25°C, 35°C, 45°C, 55°C e 65°C durante um período de 60 minutos, em seguida foram retirados e tiveram a sua atividade enzimática determinadas a 25°C.

Teste da estabilidade do DEI em condições de armazenamento

A estabilidade da tripsina imobilizada nos filmes de POLICAJU foi determinada após o seu armazenamento à temperatura de 25±3°C durante o período de 28 dias, com determinações nos períodos de 0, 2, 7, 14, 21 e 28 dias. Os filmes coletados nestes tempos foram incubados em 1mL de azocaseína 1% (m/v) em Tris-HCl pH 7,2 durante 1h a 25°C, seguindo-se a determinação da atividade enzimática.

Avaliação histopatológica da aplicação do DEI como curativo em modelo excisional cutâneo

No procedimento cirúrgico experimental, os camundongos foram previamente anestesiados com cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10% (10 mg/Kg⁻¹ e 115 mg/Kg⁻¹, respectivamente), por via intraperitoneal (Hall & Clarke, 1991) e tricotomizados. A anti-sepsia da região dorsal torácica foi feita com iodopovidona e solução salina estéril NaCl 0,15M. Uma ferida cutânea (1,33 ± 0,2 cm²) asséptica foi produzida por incisão da pele e divulsão da tela subcutânea. Após a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram aleatoriamente organizados em 2 grupos (n = 15/grupo), de acordo com o tratamento: Grupo

Controle AA (ácido acético 4%), Controle NaCl (NaCl 0,15M) e Grupo Teste (DEI-POLICAJU/ácido acético). Imediatamente após a cirurgia, os curativos foram aplicados, uma única vez sobre as feridas. Para realização do estudo histopatológico foram coletados fragmentos de pele de cinco animais, nos 2^o e 12^o dias do P.O. Após serem retirados os fragmentos de biópsia, os animais foram submetidos à eutanásia por superdosagem com Pentobarbital sódico (200mg/Kg⁻¹), por via intraperitoneal. As amostras continham pele íntegra, área de transição entre pele íntegra e ferida e leito da ferida, estas foram submetidas ao processamento histopatológico, incluídas em parafina e, após microtomia, os cortes foram corados por pelo Tricrômico de Masson (Michalany, 1991). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (ofício n° 28/05).

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo Teste de Tuckey, ao nível de significância de 5% e apresentados como média e desvio padrão.

Resultados e Discussão

Estudo Cinético da Liberação de Tripsina in vitro

A tripsina de pâncreas suíno foi imobilizada por enclausuramento nas concentrações de 1000 µg/mL de solução de POLICAJU. O estudo cinético de liberação da tripsina *in vitro* destes DEIs foi acompanhado por 72h no sobrenadante (Figura 1).

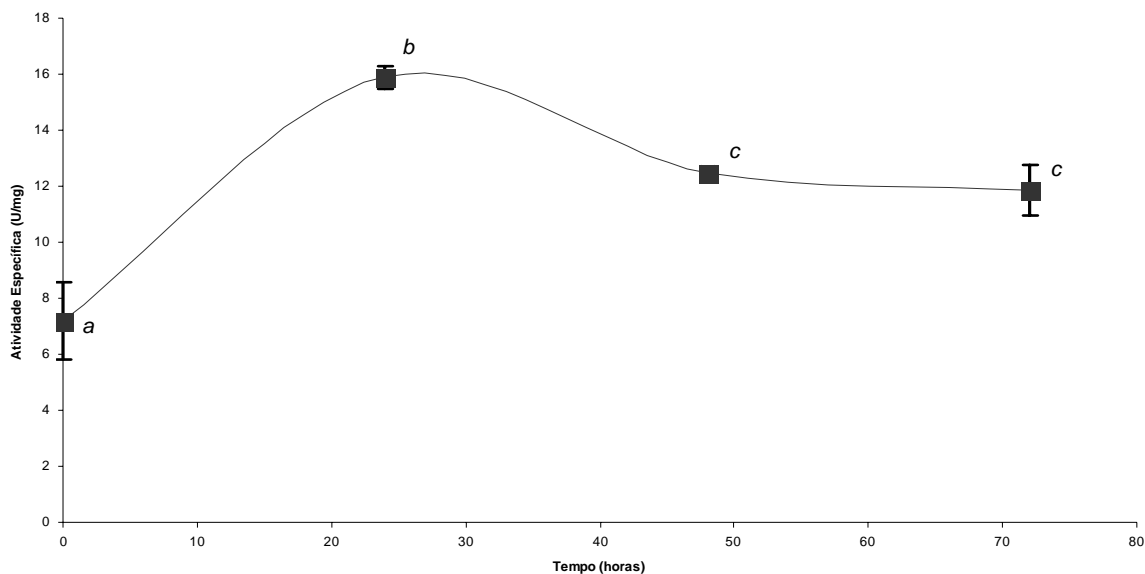


Figura 1- Cinética de liberação da tripsina no DEI, em solução tampão citrato-fosfato 0,2M, pH 5,0 a 25°C.

Observa-se pela Figura 1 que houve um aumento da atividade específica de 7,17 para 15,89 U/mg (121,7%) nas primeiras 24h, decrescendo em seguida, até às 54h e mantendo-se constante até o final do experimento (72h), apresentando ainda uma atividade de 12 U/mg. Este comportamento demonstra que a porosidade da membrana permitiu a passagem da enzima para o meio externo e que este aumento inicial deve-se provavelmente à liberação das moléculas de tripsina que se encontravam mais próxima da superfície do filme. A diminuição após 24h também pode ser explicada em decorrência da instabilidade ao baixo valor de pH do meio de ensaio (pH 5,0), valor este semelhante ao do ambiente de uma lesão (ferida), uma vez que a tripsina é uma enzima alcalina. Estes resultados demonstram que o sistema mostrou-se efetivo para a liberação da tripsina com um aumento da atividade de cerca de 70% em relação à atividade inicial no tempo zero, sugerindo a sua aplicação para auxiliar o processo cicatricial.

Efeito do pH e temperatura na atividade da tripsina livre e imobilizada

O efeito do pH na atividade da enzima livre e do DEI foi avaliado variando o pH na faixa de 5,0 a 10,2, usando diferentes sistemas de tampões de acordo com os seus pKas (Figura 2). Pode-se observar que o efeito do pH na atividade enzimática foi semelhante tanto para a enzima livre como para a imobilizada. O pH ótimo para a enzima livre foi pH 10,2 enquanto que para a enzima imobilizada foi o pH 8,6, obtendo para ambos os casos 100% de sua atividade enzimática. Observa-se, ainda, que a enzima imobilizada apresentou uma maior atividade em relação à enzima livre na faixa de pH entre 7,8 e 9,0, valores inferior ao ótimo da enzima livre. Perfis de atividade semelhantes foram reportados para tripsina imobilizada covalentemente em aminopropil-Celite e succinamidopropil-Celite (Huang et al., 1997) e em quitosana-silica gel (CTS-SiO₂) por diferentes agentes ativadores (Xi et al., 2005).

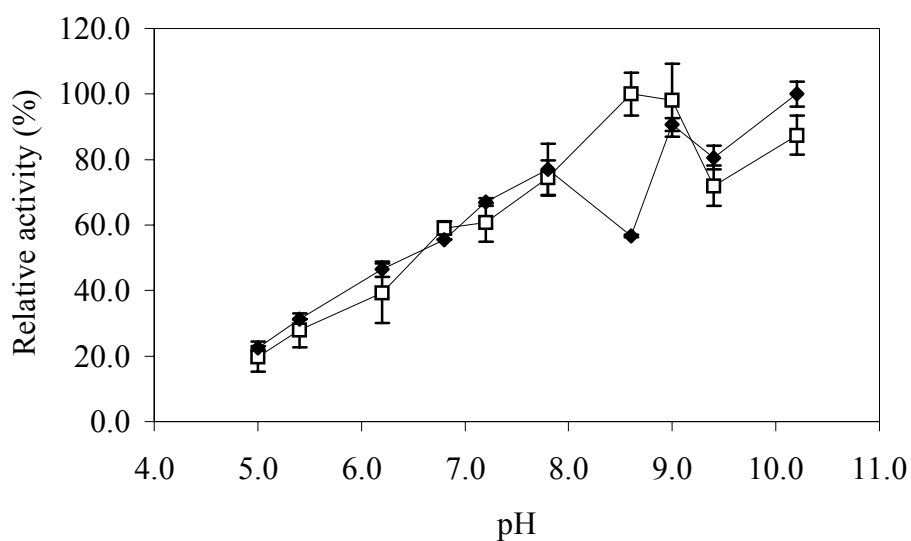


Figura 2- Efeito do pH sobre a atividade da enzima livre (◆) e no DEI (■). Soluções tampão pH 5,0-5,4 (citrato-fosfato, 0,2M), pH 6,2-6,8 (fosfato de sódio, 0,2M), pH 7,2-9,0 (Tris-HCl, 0,2M) e pH 9,0-10,2 (glicina-NaOH, 0,2M).

A Figura 3 ilustra o efeito da temperatura na atividade da enzima livre e no DEI, onde se verifica que a temperatura ótima da tripsina foi de 55°C para ambas as situações. Entretanto o DEI preservou uma maior atividade (92%) com o aumento da temperatura (65°C) quando comparada com a enzima livre (69%). Caso semelhante foi reportado por Xi et al. (2005) quando compararam a atividade da tripsina livre com a imobilizada covalentemente em quitosana-silica gel ativada por diazotização.

Fig

ura

3-

Ati

vid

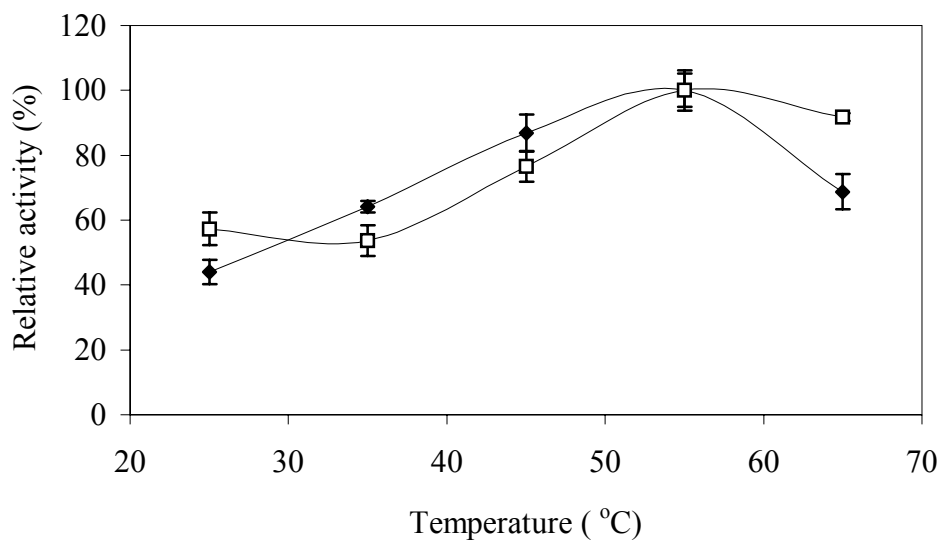
ade

rela

tiva

da

enz



ima livre (◆) e do DEI (■) em função da temperatura.

Estudos realizados por Markvichera et al. (2000) com tripsina bovina imobilizada por enclausuramento em polímero de PVCL-Ca alginato e PVCL-quitosana-quitosana sulfatada, ambos magnetizados, apresentaram uma diminuição na atividade relativa para 80% e 70%, respectivamente, quando comparadas com a atividade da enzima livre (100%). Estes autores justificam este comportamento pelos processos de enclausuramento utilizados. No nosso trabalho o uso do filme do POLICAJU como suporte para enclausurar a tripsina suína

permitiu uma melhor manutenção da atividade enzimática, demonstrando a eficiência do polímero e do processo empregado.

Estabilidade do DEI em função do pH e da temperatura

A estabilidade do DEI foi avaliada em função do pH (Figura 4) e da temperatura (Figura 5) ao longo do tempo. Foi observado que o DEI apresentou um comportamento semelhantes em todos os valores de pH testados. No pH 5,0 após 60 minutos o DEI apresentou 88,0% da sua atividade inicial. Este comportamento parece favorável para aplicação do DEI como curativo, uma vez que o pH da ferida se encontra em torno de pH 5,0.

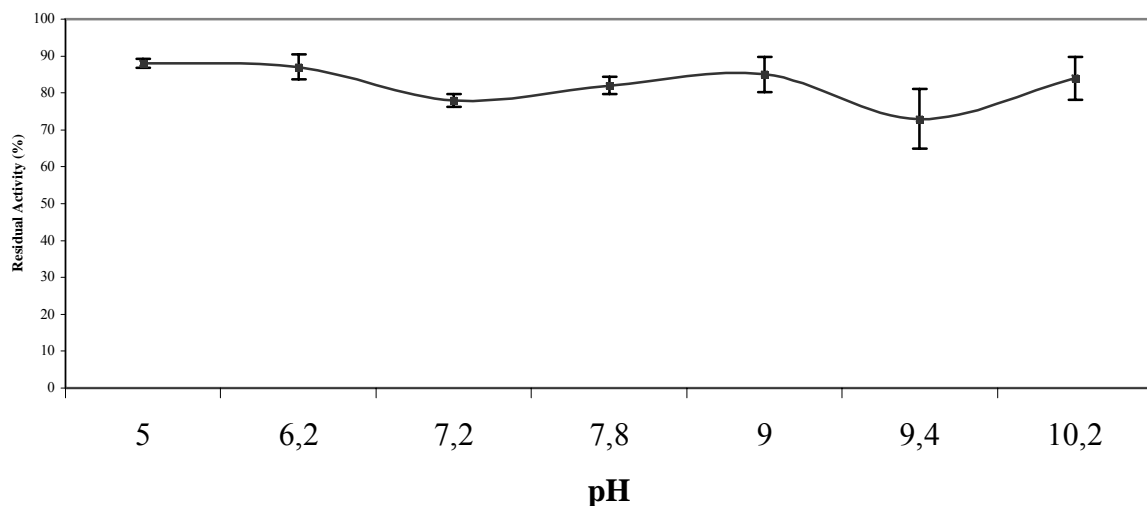


Figura 4- Efeitos do pH na estabilidade do DEI após 60 minutos a 25°C. Soluções Tampão: pH 5.0 (0.2M citrato-phosphato), pH 6.2 (0.2Mfosfato de sódio), pH 7.2-9.0 (0.2M Tris-HCl) and pH 9.4-10.2 (0.2M glycina-NaOH). A atividade inicial em cada pH testado foi considerada como 100%.

A estabilidade térmica do DEI é observada na Figura 5. Não há diferença marcante entre as atividades, no entanto, a 65°C o DEI apresentou 94% da sua atividade inicial, sendo

possível deduzir que o DEI é resistente a altas temperaturas. Observa-se ainda que a 45°C a enzima mostrou-se mais ativa (120%). Resultados obtidos com a tripsina imobilizada covalentemente tanto diretamente ou via BSA em membranas polissacarídicas de *Zoogloea* sp demonstraram uma retenção de cerca de 90 e 80% a 45°C por 15 minutos (Cavalcanti et al., 2006). Resultados apresentados por Amaral et al, 2006 demonstraram que a tripsina imobilizada covalentemente em Dacron ferromagnetizado apresentou-se estável a 40°C retendo cerca de 70% de sua atividade inicial após 30 minutos. Nossos resultados com a tripsina imobilizada por enclausuramento em filmes de POLICAJU demonstram ser superiores aos obtidos por outros métodos imobilização.

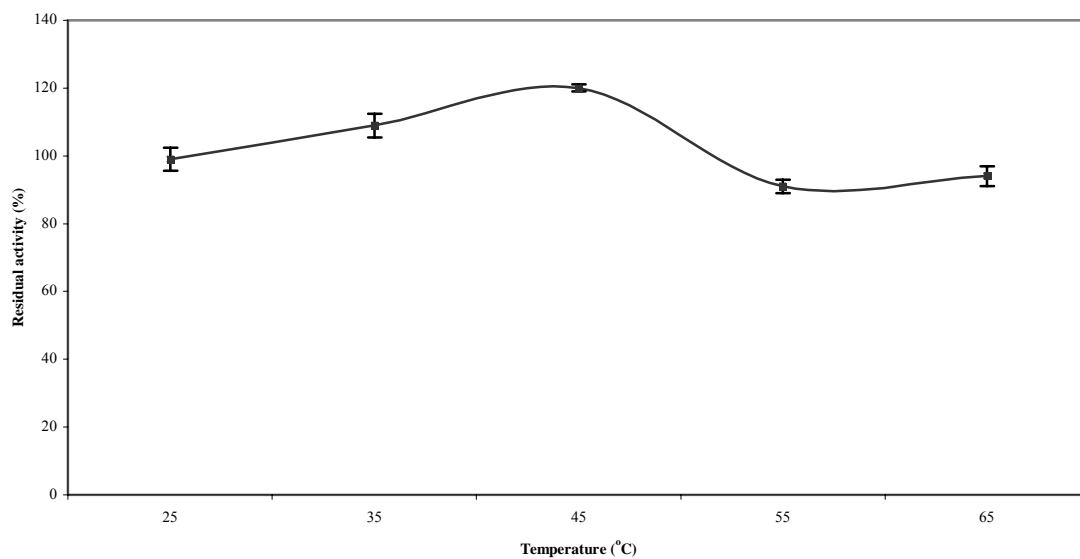


Figura 5- Estabilidade térmica do DEI após 60 min. A atividade inicial foi considerada 100%.

Estabilidade do DEI ao estoque (armazenamento)

A estabilidade do DEI foi avaliada quanto ao tempo de armazenamento durante um período de 28 dias a temperatura ambiente ($25\pm 3^{\circ}\text{C}$), sendo retiradas amostras nos intervalos

de 0, 2, 7, 14, 21 e 28 dias para determinação da atividade enzimática (Figura 6). Observa-se um decaimento da atividade enzimática em cerca de 20% nos primeiros 7 dias, mantendo-se estável sendo capaz de reter 80% da sua atividade ao longo de todo o período do ensaio. Cavalcante et al. (2006) avaliaram a estabilidade da tripsina imobilizada covalentemente diretamente ou via BSA em membrana polissacarídica produzida pela bactéria *Zoogloea* sp. ao longo de 54 dias e verificaram que os derivados enzimáticos imobilizados foram capazes de reter 89,17% e 99,12%, respectivamente. Mais uma vez os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que o DEI apresenta características para sua aplicação no processo cicatricial dérmico.

Fig

ura

6-

Est

abil

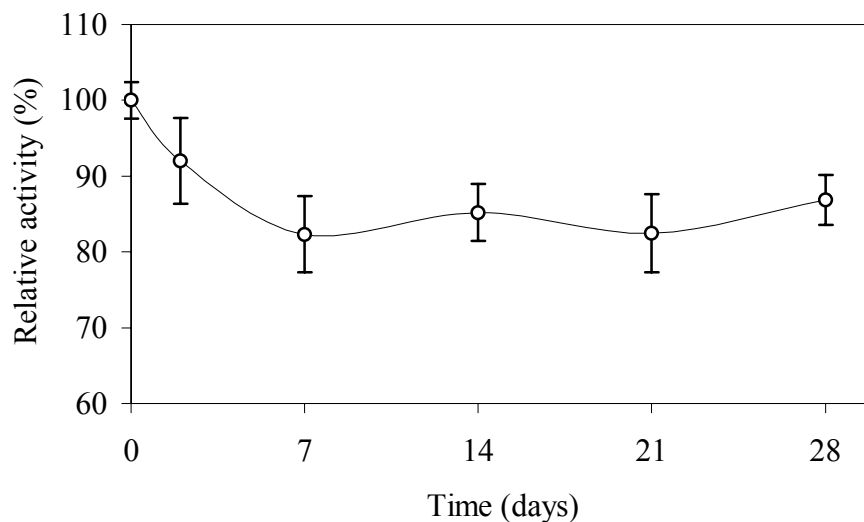
ida

de

da

trip

sin



a imobilizada (1000 μ g/ml) em POLICAJU/AA ao longo de 28 dias de armazenamento a temperatura ambiente $25\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Avaliação histopatológica da aplicação do DEI

O DEI foi aplicado como curativo em feridas cutâneas obtidas cirurgicamente em camundongos. Nos 2^o e 12^o dias de P.O., foram retirados fragmentos de biópsia de pele, os

quais foram processados e analisados histopatologicamente. Na Figura 7, são visualizados os aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo após tratamento por 2 dias (A, B e C) e 12 dias (D, E e F) com curativos contendo, respectivamente, NaCl 0,15M; Ácido Acético 4% e POLICAJU/AA Tripsina (1000µg/mL). Na avaliação do 2º dia, verifica-se a presença dos elementos típicos da fase inflamatória, no entanto o grupo POLICAJU/AA apresenta maior fragilidade tecidual com características de um processo menos evoluído. Após 12 dias de tratamento, os animais do grupo POLICAJU apresentaram um padrão tecidual mais evoluído, verificado pela grande quantidade de colágeno formado e pelo padrão de organização dessas fibras, sugerindo um processo remodelativo mais avançado que nos grupos controles AA e NaCl. Assim, verifica-se que o processo cicatricial foi favorecido quando a tripsina se encontrava imobilizada, demonstrando a eficácia do DEI no processo cicatricial. Markivicheva et al. (2000), verificando o efeito cicatrizante de filmes de hidrogel com tripsina enclausurada também observaram um padrão histopatológico mais evoluído nos animais analisados.

Conclusões

O polissacarídeo da goma do *Anacardium occidentale* pode ser utilizado como matriz para imobilização de tripsina e como um eficiente sistema de liberação de drogas, uma vez que permitiu uma liberação gradual da tripsina favorecendo o amadurecimento do tecido cicatricial de feridas cutâneas em grupos experimentais de camundongos, quando comparado ao grupo controle. Deste modo, o POLICAJU pode ser considerado como promissor curativo na utilização da terapia clínica de feridas cutâneas.

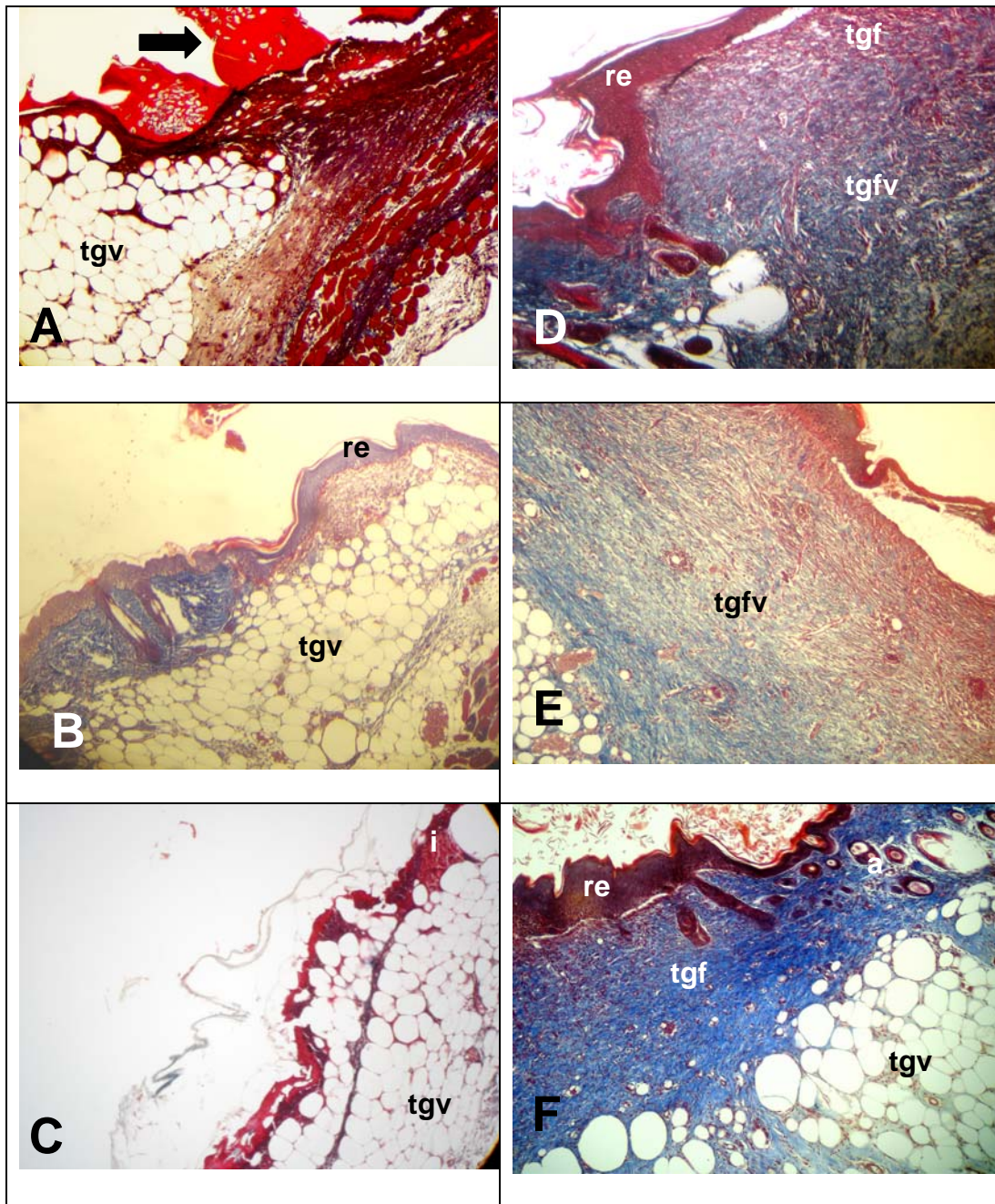


Figura 7- Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo após tratamento de 2 dias (A, B e C) e 12dias (D, E e F) com curativos contendo, respectivamente NaCl 0,15M; Ácido Acético 4%; POLICAJU/AA Tripsina (1000µg/ml). Coloração Tricrômico de Masson. Ampliação original 100x.

Seta larga – crosta; **re** – reepitelização; **tgfv** – tecido de granulação de característica vascular; **tgf** – tecido de granulação de característica fibrosa; **tgfv** – tecido de granulação de característica fibrovascular ; **i** – infiltrado inflamatório; **a** - anexos.

Referências Bibliográficas

AMORIM, R. V. S.; MELO, E. S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. et al. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 35-39, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248 - 254, 1976.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; ROCHA, J. M. S.; GARCIA, F. A. P.; GIL, M. H. Lípase immobilisation on to polymeric membranes. **Biotechnology Techniques**. v. 13, p. 403-409, 1999.

CAVALCANTE, A. H. M.; CARVALHO JR, L. B., CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. as a film support for trypsin immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, Artigo in press, 2006.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n.4, 2004.

DEY, G.; SINGH, B.; BANERJEE, R. Immobilization of α - amylase produce by *Bacillus circulans* GRS 313. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 46, n.2, Curitiba, mar 2003.

FUJIMOTO, J.; REIS, E. A. O.; PETRI, D. F. S. Formação de multicamadas de polissacarídeo e proteína. **Química Nova**, v. 25, n. 5, 757-761, 2002.

GADELHA, M. M. S. **Encapsulação de polissacarídeo de *Anacardium occidentale* (P-JU) em lipossomas e aplicação biológica.** 2001. 50p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Recife. 2001.

HALL, L. W. & CLARKE, K. W. **Veterinary Anaesthesia.** 9 ed. London: Ballière Tindall, p. 410, 1991.

HUANG, L. X.; CATIGNANI, G. L.; SWAISGOOD, H. E. Comparison of the properties of trypsin immobilized on 2 CeliteTM derivatives. **Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 21-27, 1997.

LEIGHTON, T. J. & DOR, R. H. The relationship of serine proteases activity to RNA polymerase Modification and Sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal Mol. Biol.** v. 76, p. 103 - 122, 1973.

MARKVICHEVA, E. A.; KUPTSOVA, S. V.; BURYAKOV, A. N. et al. Proteases entrapped in polymer composite hydrogels: preparation methods and applications. **Vestnik Moskovskogo Universiteta. Khimiya**, v. 41, n. 6, 54-57, 2000.

MENESTRINA, J. M., CARNEIRO LEÃO, A. M. A., STUELP, P. M., MACHADO, M. J., IACOMINI, M., GORIN, P. A. J. **Partial characterization and anti-tumoral activity of the polysaccharide from cashew gum.** XXV SBBq, n° L-57, p. 116, 1996.

MENESTRINA, J. M., IACOMINI, M., JONES, C., GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 2. ed. São Paulo: Michalany, 1991.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular Research**, v. 69, p.562 – 573, 2006.

PAIVA, M. G. **Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em cicatrização experimental**. 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PAULA, R. C. M. & RODRIGUES, J. F. Composition and rheological properties of cashew trees gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydr. Polym.**, v. 26, p. 177 - 181, 1995.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESPHANDE, V. V. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 596-635, 1998.

RUCKA, M.; TURKIEWICZ, B. Ultrafiltration membranes as carriers for lipase immobilization. **Enzyme Microbiologic Technology**, v. 12, p. 52 – 55, 1990.

SCHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p. 149 - 154, jan-fev, 2006.

WATANABE, J.; IWAMOTO, S.; ICHIKAWA, S. Entrapment of some compounds into biocompatible nano-sized particles and their releasing properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 42, p. 141 – 146, 2005.

XI, F.; WU, J.; LIN, X. Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 2833 - 2840, 2005.

Zanin & Moraes

ZELENETSKII, A. N.; AKAPOVA, T. A.; KILDEEVA, N. R. et al. Immobilization of trypsin on polysaccharides upon intense mechanical treatment. **Russian Chemical Bulletin, International Edition**, v. 52, n. 9, p. 2073 – 2077, 2003.

Utilização de planejamento experimental para obtenção das melhores condições de enclausuramento de tripsina em filmes do polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. como curativo

Flaviane Maria Florêncio Monteiro^{1,2}, Germana Michelle de Medeiros e Silva¹, Tatiana Souza Porto^{1,3}, Camila Souza Porto¹, Benício de Barros Neto⁴, José Luiz de Lima Filho^{1,5}, Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão^{1,6}, Maria das Graças Carneiro-da-Cunha^{1,5}, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{1,6}.

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE, ² Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária-UFRPE; ³ Programa de pós-graduação em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica-USP; ⁴ Departamento de Química Fundamental – UFPE; ⁵ Departamento de Bioquímica – UFPE; ⁶ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE.

Resumo

Um planejamento experimental (2²) foi aplicado para determinação das melhores condições de enclausuramento da tripsina em filmes de polissacarídeo *A. occidentale* L. (POLICAJU). Foram analisados os efeitos das variáveis de controle a concentração de tripsina e temperatura, tendo como variáveis de resposta às atividades volumétrica e específica da enzima. Observou-se que a temperatura de imobilização não influenciou significativamente

($p \leq 0,05$) a atividade da enzima, enquanto que a concentração da tripsina foi a variável que mais influenciou nas variáveis de resposta, sendo este efeito negativo. A interação entre as variáveis estudadas não apresentou efeito significativo, e a melhor condição da enzima imobilizada (DEI) foi obtida na concentração de 100µg/mL. Os valores de pH e temperatura ótimos da tripsina imobilizada foram de 9,0 e 55°C, respectivamente. O DEI demonstrou estabilidade na ampla faixa de temperatura testada (25-65°C), enquanto que só nos valores de pH 9,4 e 10,2 apresentou-se estável (cerca de 80% de atividade retida) durante o período de 1 hora. Quanto à estabilidade ao armazenamento em temperatura ambiente (25°C) o DEI reteve cerca de 30% de sua atividade ao final de 28 dias. Os resultados das avaliações histopatológicas da aplicação do DEI em lesões cutâneas demonstraram uma aceleração do processo cicatricial, sugerindo sua possível utilização como curativo dérmico.

Palavras chave: imobilização, filme polimérico, tripsina, planejamento estatístico, enclausuramento, *Anacardium occidentale*.

Introdução

No processo cicatricial, a degradação proteolítica da matriz extracelular (MEC) é uma etapa essencial para a reparação e os subseqüentes estágios de remodelação, que ocorrem geralmente através da ação de metaloproteinases de matriz (MMP). Estas enzimas são responsáveis pela degradação controlada de componentes da MEC como colágeno, fibronectina, laminina, proteoglicanos e elastina. Tal degradação controlada é necessária para permitir a remoção de elementos celulares e extracelulares danificados, favorecendo a migração celular, angiogênese, aderência celular e destruição da membrana basal, eventos essenciais para a cicatrização normal (PRAGAPATI et al, 2000). Entretanto, o desequilíbrio da expressão ou da atividade catalítica de MMPs pode contribuir para a destruição da matriz (TRENGOVE et al, 1999, NAGASE et al, 2006).

As proteases, nesse contexto, podem ser compreendidas como princípios ativos, sendo empregadas no tratamento de feridas e queimaduras (THANGAN & RAJKUMAR, 2002), além do debridamento de úlceras (SAID & PIETRO, 2004). Uma outra perspectiva é a imobilização dessas enzimas em suportes poliméricos para aplicação terapêutica em procedimentos clínico-cirúrgicos, envolvendo reparo cicatricial. O procedimento de imobilização por oclusão em géis ou membranas orgânicas corresponde ao confinamento do material biológico em uma matriz polimérica ou em uma membrana semipermeável, podendo o sistema ser revestido por uma membrana polimérica permeável, para reduzir a lixiviação do material biológico. As principais vantagens deste tipo de imobilização estão relacionadas à sua versatilidade, podendo ser aplicada a qualquer tipo de enzima e a não interação enzima-polímero, minimizando os efeitos sobre a estrutura protéica e a desnaturação. A lixiviação do material enzimático tradicionalmente considerada como uma desvantagem dessa metodologia (ALFAYA & KUBOTA, 2002; DALLA-VECCHIA et al, 2004) pode ser encarada na perspectiva de um sistema de liberação controlada do princípio ativo, uma vez que drogas

adsorvidas ou encapsuladas por polímeros apresentam uma difusão lenta e controlada através do material polimérico.

Entre os biopolímeros freqüentemente usados como suportes para enclausuramento (alginato, agarose, quitina e quitosana) os polissacarídeos e seus derivados tem sido usados na área médica para a fabricação de cápsulas biodegradáveis, materiais para sutura, substituição de tecidos e implantes diversos (GERESH et al. 2000; VAN de VELDE & KIEKENS, 2001). Além de apresentarem baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, podem ser utilizados em processos biotecnológicos, a exemplo dos sistemas de liberação controlada de drogas (KUMAR, 2000; ALSARRA et al, 2004). Um outro aspecto a ser considerado é a estimulação *in vitro* e *in vivo* do sistema imune, contribuindo favoravelmente no desenrolar do processo cicatricial, podendo ser utilizados como biomateriais (DIALLO et al., 2001; UENO et al., 2001; KWEON et al., 2003; SENEL & MCCLURE, 2004).

O heteropolissacarídeo extraído da goma do *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios frente ao processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos e caprinos (MONTEIRO, 2004; SCHIRATO et al., 2006). Trata-se de um recurso natural e renovável, passível de ser explorado sem impactos ambientais. Assim, a facilidade de acesso a sua matéria-prima e a sua relatada atividade biológica, são fatores que viabilizam o uso do polímero como biomaterial, despertando o interesse científico-tecnológico para o desenvolvimento de fórmulas farmacêuticas para uso em lesões cutâneas.

Uma vez que o método de imobilização pode promover alterações estruturais na enzima e em seu micro-ambiente, características físico-químicas como temperatura e pH ótimos, cinética enzimática, termoestabilidade, resistência à degradação proteolítica e desnaturação também podem ser modificadas (DREVON, 1997; KRAJEWKA 2004). Considerando estes fatores, é preferível que o método empregado para imobilização cause o

mínimo de alteração possível à enzima. Segundo DEY et al. (2003), o método de enclausuramento cumpre este critério, uma vez que ocorre pouca interação entre a enzima e o suporte.

A avaliação de fatores como: pH, temperatura, concentração enzimática, os quais influenciam no processo de imobilização, pode ser realizada através da utilização de planejamento estatístico de experimentos, os quais permitem realizar análises mais refinadas desses fatores por meio de modelagem das variáveis de resposta. Além disso, pode-se empregar planejamentos fatoriais, o que possibilita trabalhar com diversas variáveis, em diversos níveis, sem tornar o experimentos onerosos e reduzindo o tempo de execução dos mesmos (DAL MOLIN et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo determinar as melhores condições de imobilização da tripsina por enclausuramento em POLICAJU solubilizado em NaCl 0,15M, utilizando um planejamento estatístico para avaliar a influência do pH e da temperatura sobre a atividade da tripsina livre e imobilizada, e aplicar o filme com tripsina imobilizada como curativo em feridas cutâneas, bem como analisar histopatologicamente seus efeitos no processo cicatricial de lesões cutâneas experimentais em camundongos.

Material e Métodos

Materiais

O POLICAJU foi obtido da goma da árvore do *Anacardium occidentale* (cajueiro) de acordo com o método descrito por Menestrina et al. (1998), coletada no litoral sul de Pernambuco (Praia de Tamandaré). A celulose utilizada como suporte para o POLICAJU foi obtida da Cremer®. A tripsina de pâncreas suíno (E.C. 3.4.21.4) e o substrato azocaseína foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). Os demais reagentes químicos usados foram de grau analítico.

Enclausuramento da tripsina em filme de POLICAJU

O filme polimérico foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Carneiro-da-Cunha et al. (1999), modificada. O POLICAJU na concentração de 10% (m/v) foi solubilizado em NaCl 0,15M sob agitação constante durante 16 horas a 25°C. O pH foi ajustado para 5,0 com NaOH 1M, seguindo-se a adição da tripsina (100, 500 e 1000µg/mL), a qual foi solubilizada sob agitação constante, por 1h. Após este procedimento, 200µL da solução foram colocadas sobre a superfície de 1,0 cm² do suporte celulósico e o filme foi obtido a 50±5°C. Os ensaios foram realizados ainda a diferentes temperaturas de 25°C, 45°C, e 65°C. As variáveis, concentração de tripsina e temperatura de imobilização, foram aplicadas de acordo com o planejamento estatístico (Tabela 1).

Dosagem de proteínas

A determinação protéica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976), usando albumina bovina sérica (0 - 100 µg/mL) como padrão.

Determinação da atividade proteolítica

Foi empregado o método de Leighton (1973), utilizando-se como substrato a azocaseína 1% (m/v) solubilizada em solução tampão de Tris-HCl 0,2M, pH 7,2, contendo 0,1M de CaCl₂. A enzima livre (150µL) foi incubada com 250µL de azocaseína 1% (m/v) e o DEI (1cm²) com 1000µL, ao abrigo da luz por 1h, a temperatura de 25± 2° C, em seguida 400µL de cada ensaio foram aplicados para a determinação da atividade enzimática e a leitura das absorbâncias foram determinadas a 440nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, considerando a média para cada amostra. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento na densidade óptica de 1, a 440nm, no período de 1h. A atividade específica foi obtida através da razão entre a atividade enzimática e a concentração de proteína em miligramas.

Planejamento estatístico experimental

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentadas as matrizes contendo as condições do estudo, onde duas variáveis foram avaliadas em diferentes níveis, sendo realizado um planejamento fatorial completo com um total de 4 ensaios (estatisticamente representado por 2^2) e duas repetições no ponto central, em duplicata, totalizando 12 experimentos. O ponto central foi realizado para possibilitar o cálculo do erro experimental. Após a realização dos experimentos a análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA), considerando $p \leq 0,05$, utilizando o software *Statistica* 6.1. (Statsoft Inc., 2002). A melhor condição de imobilização foi definida como aquela que proporcionou a melhor combinação entre as respostas.

Tabela 1- Níveis das variáveis de controle utilizados nos estudos do DEI

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Temp. imobilização	25°C	45°C	65°C
[Tripsina]	100µg/mL	500µg/mL	1000µg/mL

Tabela 2- Imobilização da tripsina utilizando o planejamento fatorial completo (2^2) + 2 pontos centrais (C).

Ensaio	Temperatura °C	[Tripsina] µg/mL
1	25	100
2	65	100
3	25	1000
4	65	1000
5 C	45	500
6C	45	500
1'	25	100
2'	65	100
3'	25	1000
4'	65	1000
5°C	45	500
6°C	45	500

'os ensaios foram realizados em duplicatas.

Efeito do pH e da temperatura na atividade da tripsina livre e do DEI

O efeito do pH na atividade da enzima livre e imobilizada na concentração de 1000µg/mL foi avaliado através da incubação das amostras com azocaseína 1% (p/v) solubilizada em soluções tampão 0,2M: pH 5,0-5,4 (citrato-fosfato), pH 6,2-6,8 (fosfato de sódio), pH 7,2-9,0 (Tris-HCl) e pH 9,4-10,2 (glicina-NaOH). O efeito da temperatura foi avaliado incubando as amostras nas temperaturas de 25°C, 35°C, 45°C, 55°C e 65°C.

Efeito do pH e temperatura na estabilidade da tripsina Imobilizada

No estudo da estabilidade ao pH, os DEI foram incubados 60 minutos a 25°C, em diferentes soluções tampão de acordo com o seu valor de pKa (pH 5,0 a 10,2). Após este período os filmes foram coletados e incubados por 1h, em solução de azocaseína 1% (m/v) em solução tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,2 a 25°C. Para a determinação da estabilidade térmica os DEIs foram incubados nas temperaturas de 25°C, 35°C, 45°C, 55°C e 65°C durante um período de 60 minutos, em seguida foram retirados e tiveram a sua atividade enzimática determinadas a 25°C.

Estabilidade do DEI ao armazenamento

A estabilidade da tripsina imobilizada nos filmes de POLICAJU foi determinada após o seu armazenamento à temperatura de 25°C durante o período de 28 dias, com determinações enzimáticas nos períodos de 0, 2, 7, 14, 21 e 28 dias.

Avaliação histopatológica da aplicação do DEI como curativo em modelo excisional cutâneo

Os camundongos foram previamente anestesiados segundo Hall & Clarke (1991), utilizando cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10% (10 mg/Kg e 115 mg/Kg, respectivamente), por via intraperitoneal e tricotomizados. A anti-sepsia da região dorsal torácica foi realizada com iodopovidona e solução salina (NaCl 0,15M) esterilizada. Uma

ferida cutânea ($1,33 \pm 0,2 \text{ cm}^2$) asséptica foi produzida por incisão da pele e divulsão da tela subcutânea. Após a cirurgia, os animais foram aleatoriamente organizados em 2 grupos ($n = 15/\text{grupo}$), de acordo com o tratamento: Grupos Controle NaCl (NaCl 0,15M) e o Grupo Teste (POLICAJU/T/NaCl - POLICAJU 10% m/v em NaCl 0,15M contendo $100\mu\text{g/mL}$ Tripsina). Imediatamente após a cirurgia, os curativos foram colocados em aplicação única, sobre as feridas. Para realização do estudo histopatológico, foram coletados fragmentos de pele de 5 animais nos 2º e 12º dias de pós-operatório, após o que foram submetidos à eutanásia por superdosagem com Pentobarbital sódico (200mg/Kg), por via intraperitoneal. As amostras foram fixadas em formaldeído 4% em solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,01M, pH 7,2), submetidas ao processamento histopatológico de rotina para inclusão em parafina e, após microtomia os cortes foram corados pelo tricrômico de Masson (Michalany, 1991). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (ofício nº 28/05).

Resultados e Discussão

A determinação das melhores condições de imobilização da tripsina em filme do POLICAJU 10% (m/v), solubilizado em NaCl 0,15M, foi realizada baseando-se em um planejamento experimental fatorial proposto por Barros Neto et al. (2002), uma vez que existem diversas variáveis que interferem na imobilização de enzimas em suportes poliméricos, as quais podem ser analisadas para identificar o nível de significância e as suas interações frente à imobilização, com os respectivos erros experimentais.

O planejamento experimental (2^2) foi realizado para avaliar o efeito das variáveis de controle: temperatura de imobilização e concentração da enzima sobre as variáveis de

resposta: atividade volumétrica e atividade específica do DEI (Tabela 3). Devido a sua natureza protéica, as enzimas são sensíveis a estes fatores e seu estudo permite uma melhor utilização das suas propriedades catalíticas (Zanin & Morais, 2004).

Tabela 3- Resultados dos ensaios de imobilização da tripsina no POLICAJU conforme planejamento estatístico (2^2).

Ensaio	Temperatura	[Tripsina]	AV	AE
*	°C	µg/mL		
1	25	100	0,105	5,25
2	65	100	0,090	6,00
3	25	1000	0,415	2,08
4	65	1000	0,312	2,08
5C	45	500	0,255	2,55
6C	45	500	0,207	2,08
1'	25	100	0,072	3,63
2'	65	100	0,057	3,83
3'	25	1000	0,392	1,96
4'	65	1000	0,337	2,25
5'C	45	500	0,217	2,18
6'C	45	500	0,277	2,77

* Os ensaios de imobilização foram realizados aleatoriamente.

AV- atividade volumétrica; AE- atividade específica

O gráfico de Pareto (Figura 1) representa os efeitos estimados das variáveis de controle: concentração de tripsina e temperatura de imobilização (efeito principal ou de primeira ordem) e das interações entre estas variáveis (efeito de segunda ordem) frente a variável de resposta (atividade volumétrica e atividade específica) em ordem de magnitude. O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado da variável. A linha vertical pode ser usada para julgar os efeitos estatisticamente significantes, ou seja, as barras que se

estendem através desta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significantes com nível de confiança de 95%.

Observa-se na figura 1 o grau de significância das duas variáveis trabalhadas no planejamento, assim como as interações entre elas. Verifica-se ainda que, entre os efeitos principais a concentração da tripsina foi a variável que influenciou na atividade específica da enzima imobilizada. Este efeito foi negativo, significando que quanto menor a concentração de tripsina, maior será a atividade específica da enzima imobilizada.

Zanin & Moraes (2004) relatam que a imobilização de uma elevada quantidade de enzima pode levar à modificação da estrutura tridimensional da enzima, devido aos tipos de ligações formadas entre o suporte e a enzima, resultando em uma menor atividade. Além disso, podem ocorrer alterações na orientação e acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, reduzindo a sua atividade, ou ainda levando à redução aparente da especificidade ao substrato. Assim como pode haver também um acúmulo do produto próximo ao sítio ativo, o que pode afetar a cinética da reação. Cavalcante et al. (2006), avaliando os efeitos da concentração da tripsina suína, imobilizada covalentemente em membranas celulósicas produzidas pela *Zooglea* sp., observaram maiores atividades específicas relacionadas com as menores concentrações de tripsina imobilizada.

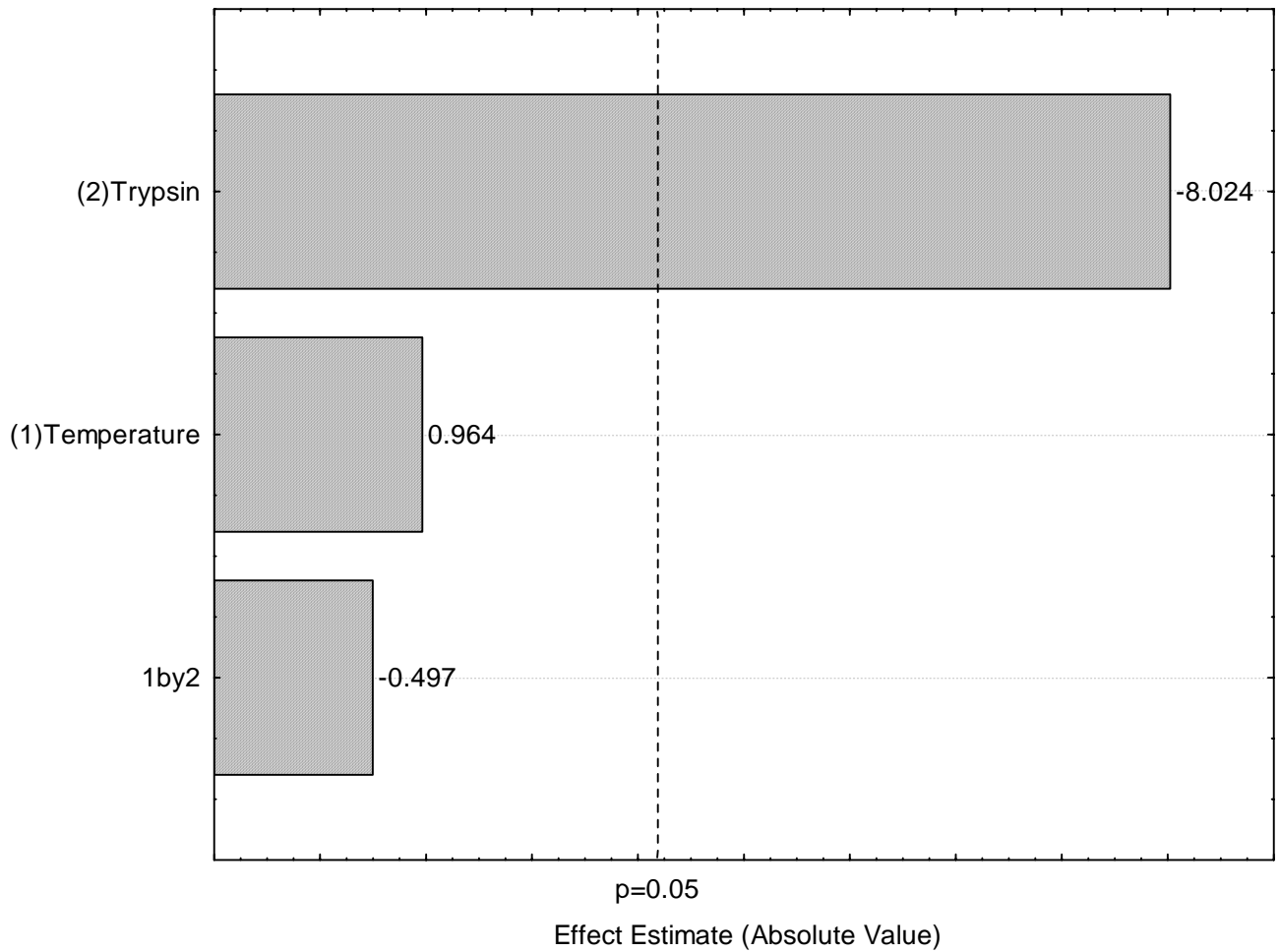


Figura 1- Gráfico de Pareto dos efeitos principais sobre a atividade específica da tripsina imobilizada (erro puro = 0.103).

A Figura 2 demonstra mais claramente o efeito das variáveis de controle, também apresentado na figura 1, sobre a atividade da tripsina no DEI, assim como a interação entre as variáveis estudadas, a qual não apresentou efeito significativo. O planejamento mostra que a temperatura de imobilização não influenciou de forma significativa à atividade da enzima nas concentrações testadas.

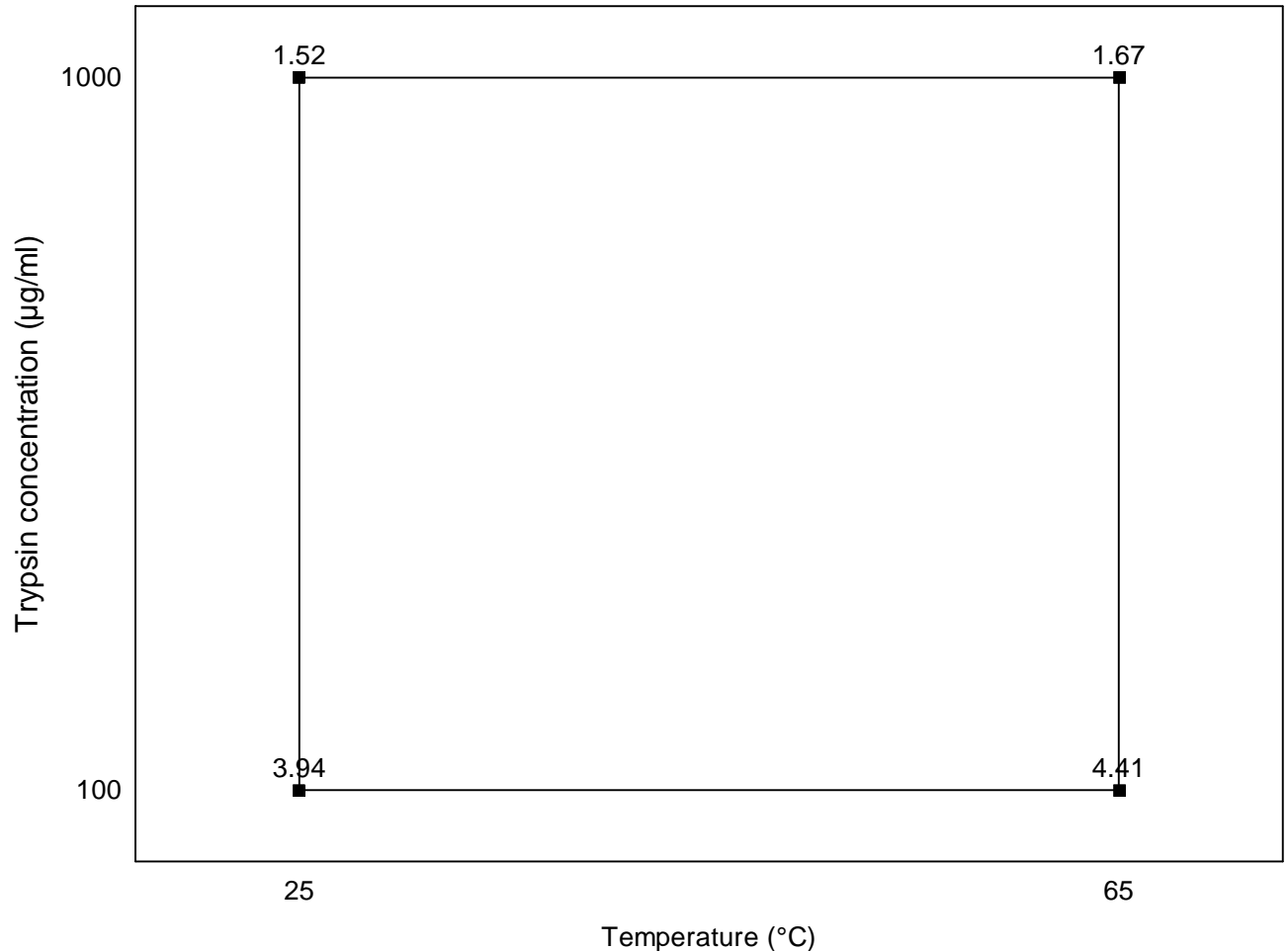


Figura 2- Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos do planejamento 2^2 , sobre a atividade específica da tripsina para analisar a concentração de tripsina em função da temperatura de imobilização.

A representação gráfica da relação entre as duas variáveis (concentração de tripsina, temperatura) sobre a atividade específica está apresentada na Figura 3. Nesta, observa-se que a melhor combinação das respostas é aquela apresentada pelos ensaios 1 e 2 (tabela2), cujos valores analisados estatisticamente estão representados na Figura 2, obtendo-se respectivamente 3,94 e 4,41U/mg de atividade específica, sendo este o melhor resultado da imobilização da tripsina em filme do POLICAJU para aplicação em lesões cutâneas experimentais.

Após a aplicação do planejamento estatístico e conseqüente obtenção da melhor condição de imobilização da tripsina em filme de POLICAJU, nas condições testadas, o DEI foi avaliado em relação aos efeitos de fatores ambientais como temperatura, pH e estocagem sobre a sua atividade catalítica, comparando alguns desses efeitos sobre a atividade da tripsina livre.

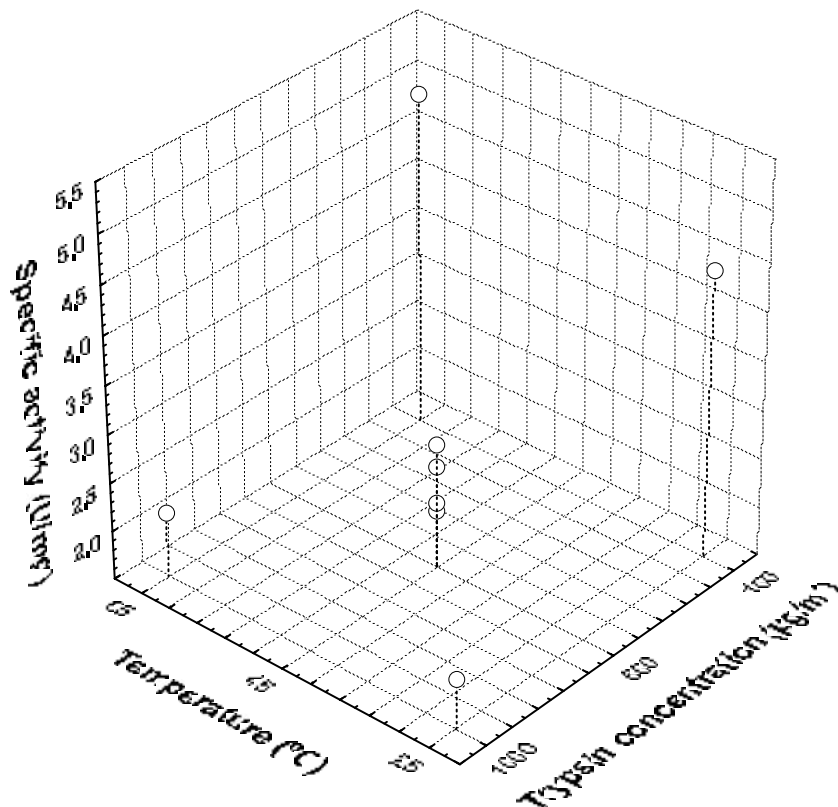


Figura 3- Relação da concentração de tripsina e da temperatura sobre a atividade específica da tripsina imobilizada em POLICAJU.

Na Figura 4 pode ser observado o efeito do pH na faixa de pH 5,0 - 10,2, sobre a atividade da tripsina livre e imobilizada. Verifica-se que tanto o DEI como a enzima livre apresentaram o mesmo comportamento aos diversos pH avaliados, no entanto o pH ótimo para o DEI foi menor (pH 9,0) quando comparado com o da enzima livre (pH 10,2), onde

obtiveram 100% da sua atividade enzimática. Estes resultados corroboram com os reportados por Amaral et al. (2006), os quais obtiveram um pH ótimo da tripsina imobilizada em dacron magnetizado menor (pH 7,0) que o da enzima livre (pH 8,0).

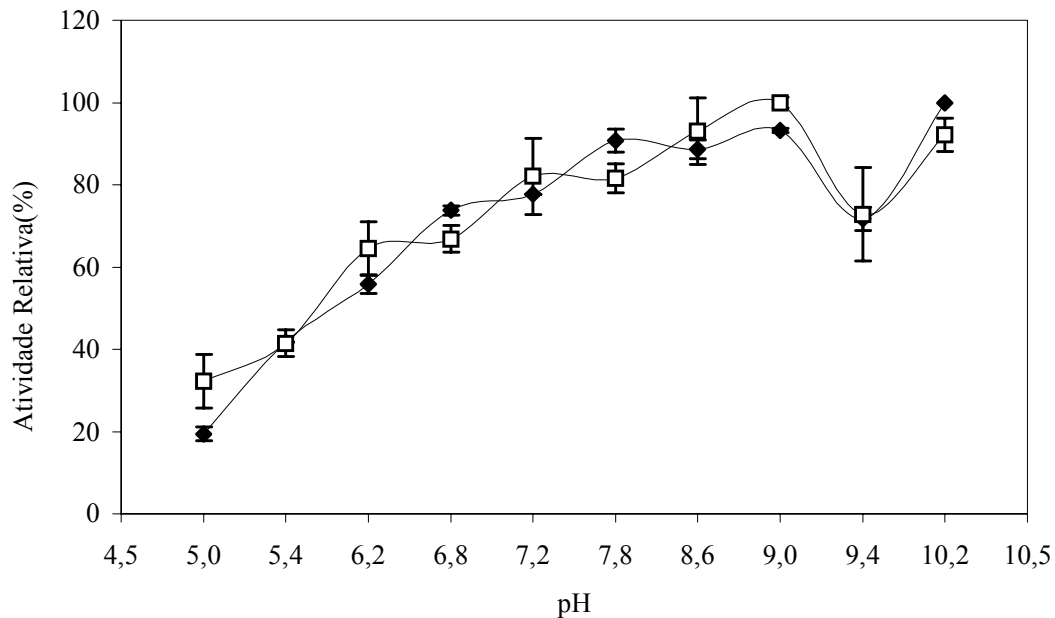


Figura 4- Efeito do pH na atividade da enzima livre e no DEI. Soluções tampão 0,2M: pH 5,0-5,4 (citrato-fosfato), pH 6,2-6,8 (fosfato de sódio), pH 7,2-9,0 (Tris-HCl) e pH 9,4-10,2 (glicina-NaOH). (◆) Enzima livre (□) tripsina imobilizada.

O efeito da temperatura na faixa de 25°C a 65°C sobre a atividade da enzima livre e do DEI está representado na Figura 5. Observa-se uma redução da retenção da atividade de cerca de 26% e 27%, respectivamente, nas temperaturas de 25°C e 35°C para o DEI quando comparada com a enzima livre. Nas temperaturas de 45°C e 55°C o comportamento para ambas as situações foram semelhantes, atingindo o máximo (100%) de retenção de atividade a 55°C. Para a temperatura de 65°C verifica-se que o DEI apresentou um aumento na atividade de 21,6% em relação a enzima livre, mostrando-se mais termoestável. Este comportamento

pode ser explicado devido à enzima encontrar-se no interior do filme, estando protegida dos efeitos térmicos que promovem alteração no grau de agitação molecular, podendo afetar a estrutura da enzima e conseqüentemente sua atividade catalítica. Segundo Zanin & Moraes (2004) o processo de imobilização de enzimas atua no sentido de aumentar a temperatura ótima da enzima, bem como a estabilidade térmica da mesma. De modo geral, a presença do substrato tem o efeito de aumentar a estabilidade térmica da enzima, pois, acredita-se que este ligando-se ao centro ativo ou parte dele, provoque uma mudança conformacional da estrutura enzimática conferindo-lhe maior resistência à temperatura.

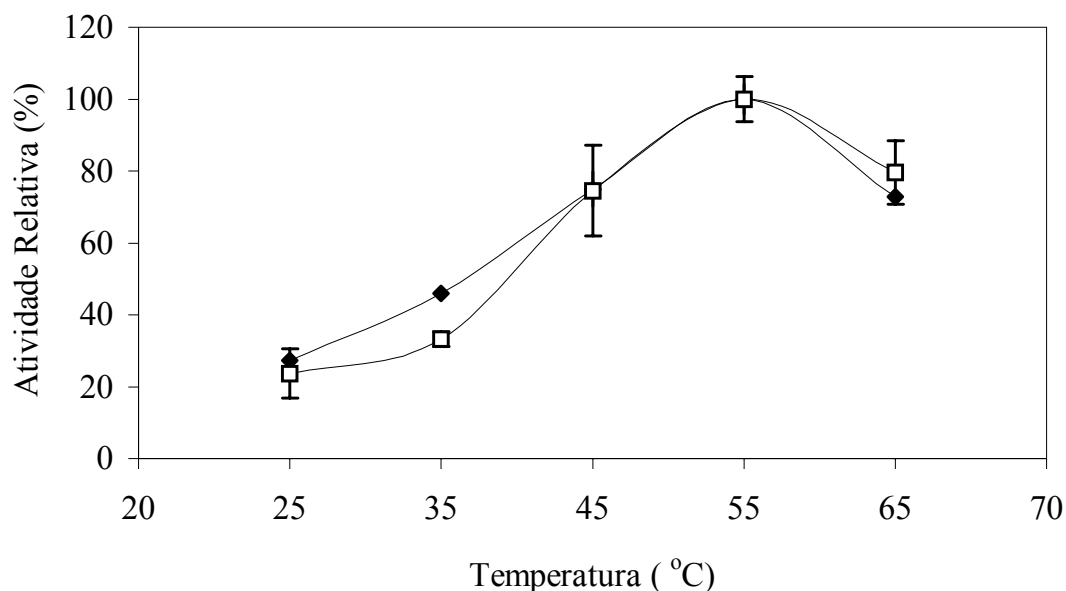


Figura 5- Efeito da temperatura sobre a atividade da tripsina livre e imobilizada. A atividade específica máxima (100%) da tripsina livre e do DEI na temperatura de 55°C foi, respectivamente, $0,620 \pm 0,032$ e $0,236 \pm 0,025$ U/m/L. (◆)Enzima livre e (□) DEI.

A Figura 6 ilustra o efeito do pH sobre a estabilidade da tripsina imobilizada ao longo de 60 minutos. Estes resultados demonstram que a tripsina imobilizada conseguiu preservar

uma boa estabilidade em valores de pH mais alcalinos, retendo em torno de 90% e 84% de atividade nos pH 9,4 e 10,2, respectivamente.

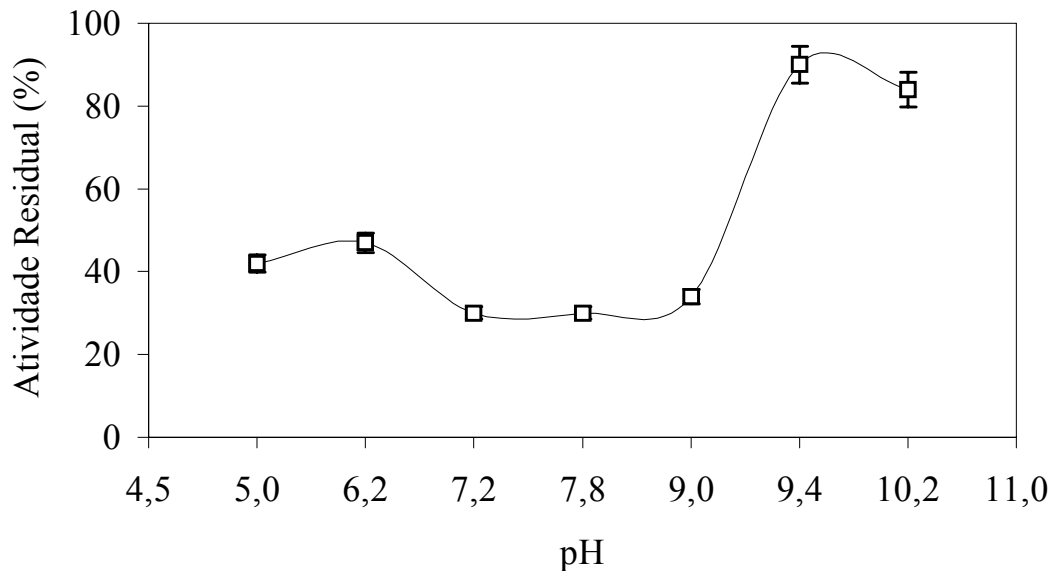


Figura 6- Efeito do pH sobre a estabilidade da tripsina imobilizada (DEI) durante 60 min. A atividade inicial (0 min) da tripsina imobilizada em cada valor de pH (Citrato-fosfato pH 5.0, Citrato-fosfato pH 6.2, Fosfato de Sódio pH 7.2, Tris-HCl pH 7.8, Tris-HCl pH 9.0, Glicina-NaOH pH 9.4, Glicina-NaOH pH 10.2) foi considerada como 100 %.

O efeito da variação da temperatura sobre a atividade da tripsina imobilizada foi analisado ao longo de 60 minutos (Figura 7). Foi observado um aumento da atividade enzimática para todas as temperaturas, exceto para 55°C (94%). Esses resultados demonstram que o processo de imobilização por enclausuramento foi favorável ao aumento da estabilidade térmica da tripsina imobilizada.

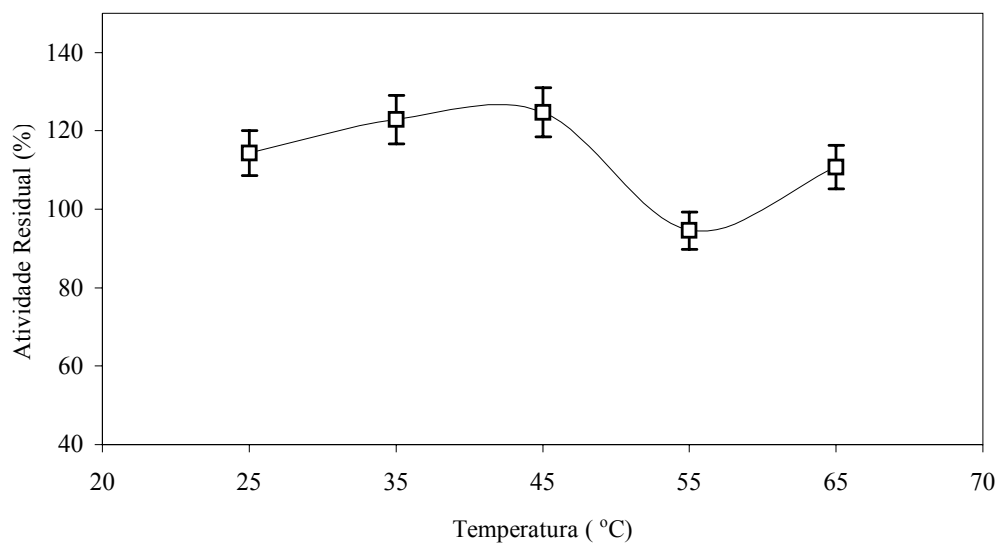


Figura 7- Efeito da temperatura sobre a estabilidade da tripsina imobilizada durante 60 min. A atividade inicial (0 min.) da tripsina imobilizada em cada valor de temperatura foi considerada como 100%.

A estabilidade ao armazenamento a temperatura de 25°C do DEI ao longo de 28 dias com determinações de atividade enzimática nos intervalos de 0, 2, 7, 14, 21 e 28 dias foi avaliada em vista de conhecer o seu comportamento para possível aplicação como curativo dérmico. Através da Figura 8, observa-se um decaimento da atividade ao 2º dia de armazenamento, mantendo-se estável até o final do 28º dia, onde o DEI (20 µg/cm²) foi capaz de reter cerca de 30% da atividade enzimática inicial. Caso semelhante foi reportado por Cavalcante et al. (2006) para um DEI onde 51,63 ± 5,09µg de tripsina foram imobilizadas covalentemente por cm² de membrana polissacarídica, produzida pela bactéria *Zoogloea* sp., a qual foi capaz de reter cerca de 40% de atividade após 28 dias de armazenamento com 3 reusos ao longo deste período. Os resultados aqui obtidos demonstram que o DEI foi capaz de preservar tripsina ativa no filme de POLICAJU indicando a sua potencial utilização no processo cicatricial.

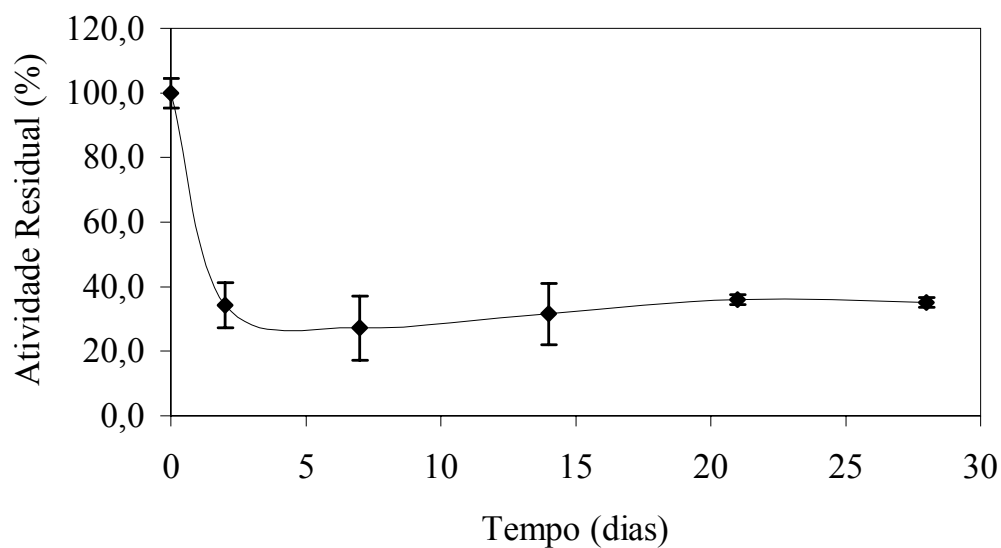


Figura 8- Estabilidade da tripsina imobilizada em POLICAJU/NaCl ao longo de 28 dias de armazenamento a temperatura ambiente ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$).

Avaliação histopatológica da aplicação do DEI

A aplicação do DEI como curativo dérmico foi avaliada em feridas cutâneas obtidas cirurgicamente em camundongos. Nos 2^o e 12^o dias de tratamento os camundongos foram eutanasiados e fragmentos de biópsia de pele foram retirados. Em seguida o material foi processado e analisado histopatologicamente. Na figura 9, são visualizados os aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo após tratamento por 2 dias (A e B) e 12 dias (C e D) com curativos contendo, respectivamente NaCl 0,15M e POLICAJU (Tripsina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Na avaliação do 2^o dia de tratamento observa-se que o grupo POLICAJU apresenta um padrão característico para a fase inflamatória semelhante ao dos controle NaCl. Após 12 dias de tratamento os animais do grupo POLICAJU apresentaram um padrão tecidual mais evoluído, verificado pelo colágeno neoformado, pelo padrão de organização dessas fibras e pela formação de anexos, evidenciando um processo remodelativo mais avançado quando a tripsina foi associada ao POLICAJU.

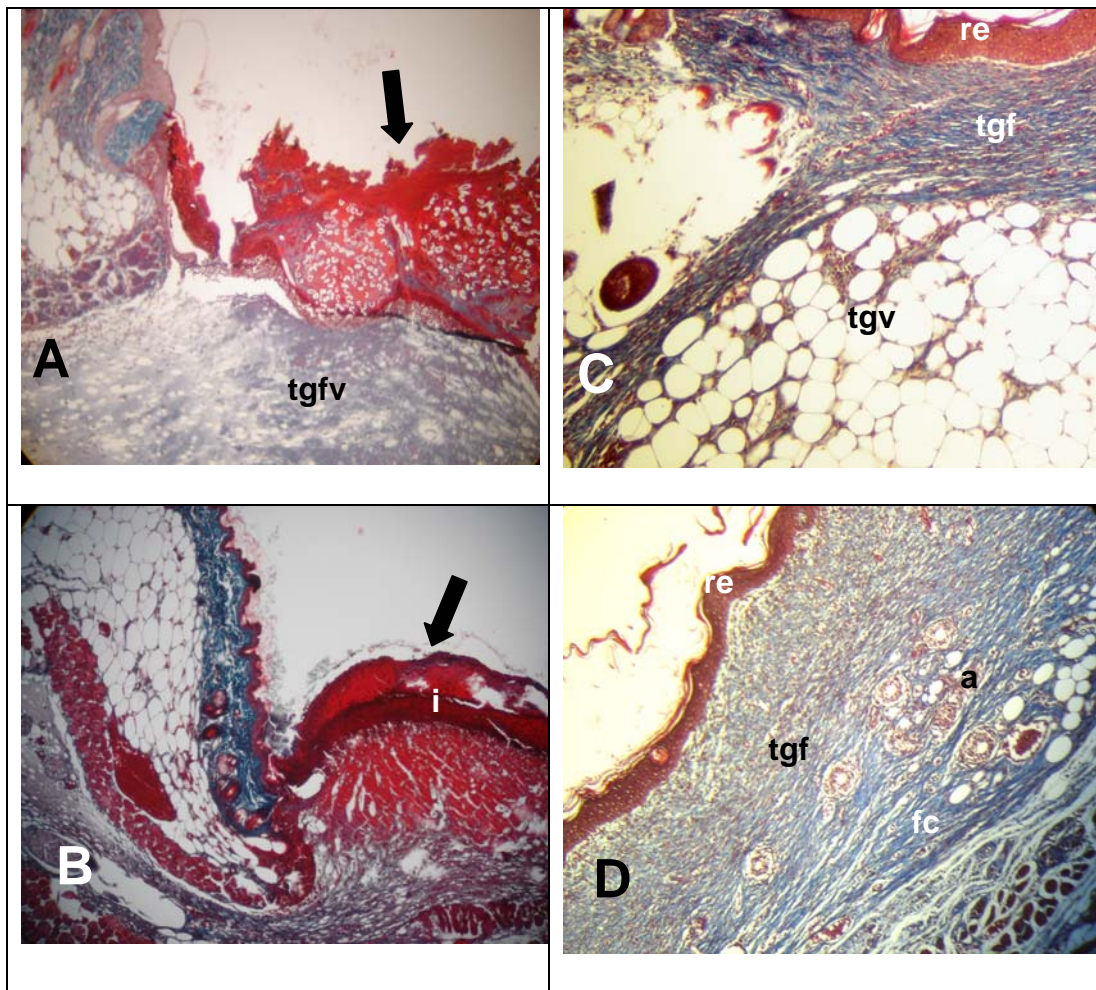


Figura 9 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo após tratamento por 2dias (A e B) e 12dias (C e D) com curativos contendo, respectivamente NaCl 0,15M; POLICAJU-NaCl Tripsina (100 μ g/mL). Coloração Tricrômico de Masson. Ampliação original 100x.

Seta larga – crosta; **re** – reepitelização; **tgv** – tecido de granulação de característica vascular; **tgf** – tecido de granulação de característica fibrosa; **tgfv** – tecido de granulação de característica fibrovascular ; **i** – infiltrado inflamatório; **a** - anexos; **fc** – fibras colágenas.

Conclusão

O planejamento estatístico foi uma importante ferramenta para o estudo das melhores condições de imobilização da tripsina em membranas de POLICAJU, permitindo uma rápida e eficiente obtenção de dados e servindo como um bom critério para determinação da aplicação dos melhores resultados. Nas condições avaliadas do planejamento apenas a concentração de tripsina influenciou na atividade específica, indicando que a menor concentração de tripsina (100 µg/mL) no processo de enclausuramento proporcionou a obtenção de um DEI mais estável. Este DEI apresentou maior estabilidade a temperatura e ao pH, sendo capaz de reter cerca de 30% da sua atividade após 28 dias de armazenamento. Quando aplicado a lesões experimentais, mostrou ser capaz de acelerar o processo cicatricial.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da CAPES, Universidade Federal de Pernambuco e Universidade Federal Rural de Pernambuco. FACEPE/CNPq.

Referências Bibliográficas

ALFAYA, A. A. S. & KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de Sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v.25, n.5, 2002.

ALSARRA, I. A.; NEAU, S. H.; HOWARD, M. A. Effects of preparative on the properties of chitosan hydrogel beads containing, *Candida rugosa* lipase. **Biomaterials**. v.25, p.2645-2655, 2004.

AMARAL, I. P. G.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CARVALHO JÚNIOR, L. B.; BEZERRA, R. S. Fish trypsin immobilized no ferromagnetic Dacron. **Process Biochemistry**, v. 41, p 1213-1216, 2006.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. C.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora da Universidade de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, 2^a ed., p. 401, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. **Analytical biochemistry** v. 72, p. 248-254, 1976.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; ROCHA, J. M. S.; GARCIA, F. A. P.; GIL, M. H. Lípase immobilisation on to polymeric membranes. **Biotechnology Techniques**. v. 13, p. 403-409, 1999.

CAVALCANTE, A. H. M.; CARVALHO JR, L. B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. as a film support for trypsin immobilisation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 29, p. 258 - 261, 2006.

DAL MOLIN, D. C. C.; KULAKOWSKI, M. P.; RIBEIRO, J. L. D. Contribuições ao planejamento de experimentos em projetos de pesquisa de engenharia civil. **Ambiente Construído**, Porto Alegre v.5, n.2, p.37-49, abr/ jun, 2005.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, n.4, 2004.

DEY, G.; SINGH, B.; BANERJEE, R. Immobilization of α - amylase produce by *Bacillus circulans* GRS 313. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 46, n.2, Curitiba, mar 2003.

DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.; LILJEBÄCK, T. H. A.; MICHAELSEN, T. E. Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 159-171, 2001.

DREVON, G. F. Enzyme immobilization into polymers and coatings. **Tese Ph. D.** University of Pittsburg, 2002.

GERESH, S.; DAWADI, R. P.; ARAD, S. M. Chemical modification of biopolimeres: quaternization of the extracellular polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp., **Carbohydrate polymers**, v. 63, p. 75-80, 2000.

HALL, L. W. & CLARKE, K. W. **Veterinary anaesthesia**. 9ed. London: Ballière Tindall, 1991. 410p

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p. 126 - 139, 2004.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

KWEON, D.K.; SONG, S.B.; AND PARK, Y.Y. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. **Biomaterials**, v.24, p.1595–1601, 2003.

LEIGHTON, T. J. & DOR, R. H. The relationship of serine proteases activity to RNA polymerase Modification and Sporulation in *Bacillus subtilis* **Journal Mol. Biol.**, v. 76, p. 103-122, 1973.

MENESTRINA, J. M., IACOMINI, M., JONES, C., GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 2. ed. São Paulo: Michalany, 1991.

MONTEIRO, V. L. C. ; COELHO, M. C. O. C. ; ANDRADE, L. S. S. ; LEAO, A. M. A. C. .

Reparação tecidual de feridas cutâneas de caprinos tratadas com polissacarídeo do cajueiro *Anacardium occidentale*. Aspectos macroscópicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 280-282, 2004.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs **Cardiovascular Research**, v.69, p. 562 - 573, 2006.

PRAGAPATI, R.T.; CHAVALLY-MISS, B.; HERBAGE, D.; EASTWOOD, M.; BROWN, R.A. Mechanical loading regulates proteases production by fibroblasts in three-dimensional collagen substrates. **Wound Pep Reg.**, v. 8, p. 226-237, 2000.

SAID, S. & PIETRO, C. L. R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Legies Summa, Ribeirão Preto, SP, 2004.

SCHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO; A. L. F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.149-154, 2006.

SENEL, S.; McCLURE, S. J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.1467 - 1480, 2004.

STATISTICA for Windows. StatSoft, Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104, USA, 2002.

THANGAM, E. B.; RAJKUMAR, G. S. Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 35, p. 149-154, 2002.

TRENGOVE, N. J.; STACE, M. C.; MACAULEY, S.; BENNETT, N.; GIBSON, J.; BURSLEM, F.; MURPHY, G., SCHULTZ, G. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. **Wound Rep Reg.**, v. 7, p. 442-452, 1999.

UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 52, p. 105 - 115, 2001.

VAN DE VELDE, K. & KIEKENS, P. Biopolimers: overview of several properties and consequences on their applications. **Polimer Testing**. v. 21, p. 433 - 442, 2001.

ZANIN & MORAES Enzimas Imobilizadas. In: SAID, S. & PIETRO, C. L. R. **Enzimas como Agentes Biotecnológicos**. Legies Summa, Ribeirão Preto, SP, 2004.

Aplicação de filme de POLICAJU contendo tripsina enclausurada como curativo oclusivo primário em lesões cutâneas experimentais

F. M. F. Monteiro^{a,b}; G. V. Schirato^b; J. F. Araújo^b; J. B. R. Silva; F. O. Silva^{a,b}, J. L. Lima-Filho^{b,c}; C. S. Porto^b; M.G.Carneiro-da-Cunha^c; A. M. A. Carneiro-Leão^{b,d}, A. L. F. Porto^{b,d,*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária –UFRPE; ^bLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA- UFPE; ^cDepartamento de Bioquímica –UFPE; ^dDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal- UFRPE

Resumo

Os filmes de POLICAJU contendo tripsina enclausurada foram aplicados como curativos oclusivos no tratamento de lesões cutâneas em camundongos. O acompanhamento da evolução do processo cicatricial cutâneo foi realizado sob os aspectos clínicos e histopatológicos. Após a realização do procedimento cirúrgico asséptico, os animais (n=15/grupo) foram aleatoriamente tratados por via tópica uma única vez: 1, NaCl (NaCl 0,15M); 2, AA (ácido acético 4% v/v); 3, AAT (ácido acético 4% v/v, tripsina 1000µg/ml); 4, POLICAJUT/AA (filme polimérico de POLICAJU 10% m/v em ácido acético 4% contendo 1000µg/ml Tripsina) e 5, POLICAJUT/NaCl (filme polimérico POLICAJU 10% m/v em NaCl 0,15M contendo 100µg/ml Tripsina). Amostras de tecido foram fixadas em formaldeído 4% (v/v) e coradas pela Hematoxilina-Eosina e por Tricrômico de Masson no 2º, 7º e 12º dias após a cirurgia. O comportamento das lesões tratadas com POLICAJUT/NaCl foi significativamente melhor quando comparado aos demais grupos, especialmente quanto aos parâmetros edema, segunda crosta e aspectos histopatológicos. Foi observado um padrão tecidual mais desenvolvido em relação aos demais grupos, com reepitelização completa, presença de uma delgada camada de queratina sobre a epiderme neoformada, tecido colagenoso modelado e presença de brotos de anexos cutâneos. Os resultados obtidos demonstram a eficácia do filme POLICAJUT/NaCl com curativo oclusivo.

Palavras-chave: cicatrização, biomateriais, polissacarídeo, *Anacardium occidentale* L., curativo oclusivo.

* Corresponding author: Tel.: + 55 81 21268484; fax: +55 81 21268485

E-mail address: analuporto@yahoo.com.br (A.L.F. Porto).

Introdução

Lesões são ferimentos onde há destruição total ou parcial de tecidos do organismo afetado em virtude da força de ação de um agente externo, de natureza física, química ou biológica, causando a ruptura morfológica e funcional da continuidade de um tecido (OEHMIMICHEN, 2004). Segundo SINGER & CLARK (1999) e KUMAR et al. (2005), o processo de reparo ocorre com o objetivo de restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido, passando por uma seqüência idêntica de eventos químicos e celulares, independentemente dos tecidos envolvidos e dos procedimentos clínico-cirúrgicos adotados, como uso de sutura ou tratamento por segunda intenção.

A cicatrização pode, então, ser compreendida como um processo biológico dinâmico e bem organizado (SANTORO & GAUDINO, 2005), que envolve a participação de componentes celulares e bioquímicos, os quais conduzem à recuperação morfológica e funcional do tecido lesado (KAPPOR & APPLETON, 2006). Este processo é organizado em três fases (inflamatória, fibroblástica e remodelativa) seqüenciais e sobrepostas, constituindo-se em um fenômeno harmônico, único e contínuo (TOGNINI et al, 1998). A evolução deste processo envolve a migração de células inflamatórias, a síntese do tecido de granulação, a deposição de colágeno e de proteoglicanos e sua maturação está associada com a remodelação do colágeno (BIONDO-SIMÕES, 2000).

Várias são as abordagens relacionadas ao processo de reparo, como a compreensão dos mecanismos celulares no processo (PARK & BARBUL, 2004), de mediadores químicos como o óxido nítrico (WITTE & BARBUI, 2002) e citocinas (STADELMAN et al., 1998). Devem-se ressaltar ainda aspectos direcionados para o diagnóstico e tratamento das afecções, enfatizando a importância da avaliação clínica (SCHULTZ et al., 2005), utilizando o modelo de cicatrização em investigações de

natureza etnofarmacológica (CHOI et al., 2003; PRIYA et al., 2004; LOPES et al., 2005; HOUGHTON et al., 2005) e desenvolvendo substitutos temporários de pele (BALASUBRAMANI et al., 2001; SUPP & BOYCE, 2005).

Entre as moléculas associadas à cicatrização, podem ser citadas as proteases, que são enzimas que têm papel fundamental na regulação da angiogênese. Em geral, as referências na literatura são feitas à associação entre proteases presentes na matriz extracelular (MMP: metaloproteinase de matriz; ADAM: desintegrina metaloproteinase; ADAMTS (desintegrina e metaloproteinase com características estruturais semelhantes à trombospondina) e serina-proteases com o processo de angiogênese (ROY et al., 2006) e à remodelação da matriz extra-celular neoformada (SCHULTZ et al., 2005).

Entretanto, ELDAD et al. (1998) relatam a possibilidade de realizar uma excisão precoce de áreas lesadas por queimaduras causadas por agentes químicos, pois estas apresentam um longo processo de cicatrização relacionada à contínua destruição do tecido na presença do agente no sítio da lesão. A proposta de tratamento em tais casos tem como objetivo minimizar os danos e reduzir o período e a intensidade da fase inflamatória. Isso pode ser obtido por via cirúrgica, por ablação a laser ou através do uso de proteases, usando tripsina imobilizada covalentemente em gaze.

Nesse contexto, propõe-se o desenvolvimento de um curativo oclusivo a partir de uma membrana polimérica contendo POLICAJU, a qual atua como matriz para enclausuramento de tripsina suína comercial. A vantagem desta proposta se justifica pelas características clínicas de um curativo oclusivo (WITTAYA-AREEKUL & PRAHSARN, 2006), o qual também apresenta características de biomaterial e modificador da resposta biológica (POLICAJU), além de funcionar como um sistema de liberação controlada do princípio ativo testado (tripsina). O objetivo deste trabalho é

avaliar o tratamento tópico da membrana polimérica POLICAJU-TRIPSINA frente à evolução clínica e histopatológica de lesões cutâneas excisionais em camundongos.

Materiais e métodos

Animais

No estudo experimental foram utilizados 60 camundongos (*Mus musculus*) *Swiss*, fêmeas, com 11 a 13 semanas de vida e pesando $35,0 \pm 5,0$ g, os quais foram criados e mantidos no biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram locados em gaiolas individuais, permanecendo em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade $55 \pm 10\%$) com fornecimento *ad libitum* de água e ração.

Obtenção do Polissacarídeo da goma do *Anacardium occidentale*

A goma de *Anacardium occidentale* L. foi coletada no litoral sul do Estado de Pernambuco (Praia de Tamandarê), Brasil. O POLICAJU foi obtido de acordo com o método de Menestrina et al. (1998).

Preparação do filme e imobilização da enzima por enclausuramento

O filme polimérico foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Carneiro-da-Cunha et al. (1999), modificada. Os filmes foram obtidos após a solubilização do POLICAJU na concentração de 10% (m/v) em ácido acético 4% (v/v) e NaCl 0,15M, sob agitação constante durante 16 horas a 25°C , e seu pH foi ajustado para 5,0 com uma solução de NaOH 1M. A esta solução foi adicionada, separadamente tripsina em pó na concentração de $100\mu\text{g/ml}$ (POLICAJUT/NaCl) e $1000\mu\text{g/ml}$

(POLICAJUT/AA), solubilizada sob agitação por 1h. Após este procedimento, 200 µl de cada da solução foi, separadamente, colocada na superfície de 1,0 cm² de suporte celulósico, e os filmes foram obtido por secagem a temperatura de 50 ± 5 °C, sendo denominados de derivado enzimático imobilizado (DEI).

Preparação dos curativos

Os curativos foram preparados de forma asséptica. O suporte celulósico de 1,0 cm² foi exposto à luz ultravioleta em câmara de fluxo laminar por 30 minutos, em seguida foi adicionado em cada fragmento de celulose 200µl das respectivas soluções esterilizadas: NaCl 0,15M; ácido acético 4% (v/v), AAT (ácido acético 4% v/v, tripsina 1000µg/mL), POLICAJUT/AA e POLICAJUT/NaCl. Em todas as soluções o pH foi ajustado para 5,0 com a solução de NaOH 1M e os curativos foram secos em estufa a 50 ± 5°C. Para verificar o preparo asséptico dos curativos, três amostras foram coletadas aleatoriamente de cada tipo de curativo e submersas em caldo nutriente por 24h em estufa microbiológica a 37°C. A turvação do meio de cultura evidenciava contaminação e o lote era imediatamente descartado. Os curativos foram conservados e transportados em placas de Petri esterilizadas.

Avaliação da atividade cicatrizante

Para realização do procedimento cirúrgico experimental, os camundongos foram previamente anestesiados com cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10% (10 mg/Kg e 115 mg/Kg, respectivamente), por via intraperitoneal (Hall & Clarke, 1991). Após a anestesia, foram realizadas a tricotomia e a anti-sepsia da região dorsal torácica com iodopovidona e solução salina esterilizada NaCl 150 mM. A pele foi

demarcada com caneta dermatográfica, usando-se um paquímetro para delimitar a área ($1,33 \pm 0,2 \text{ cm}^2$) e a ferida cutânea foi produzida pela incisão da pele através de lâmina de bisturi número 15 e a tela subcutânea foi divulsionada com tesoura de pontas tipo fina/fina e pinça de dissecação, até sua completa ressecção. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (ofício nº 28/05).

Após a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram aleatoriamente organizados em 5 grupos ($n = 15/\text{grupo}$), de acordo com o tipo de curativo aplicado: 1, NaCl (NaCl 0,15M); 2, AA (ácido acético 4% v/v); 3, AAT (ácido acético 4% v/v, tripsina 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 4, POLICAJUT/AA (filme polimérico de POLICAJU 10% m/v em ácido acético 4% contendo 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tripsina) e 5, POLICAJUT/NaCl (filme polimérico POLICAJU 10% m/v em NaCl 0,15M contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tripsina). Imediatamente após a realização das feridas cirúrgicas, os curativos foram aplicados topicamente, uma única vez, de acordo com o grupo, e o processo cicatricial ocorreu por segunda intenção.

As feridas foram avaliadas diariamente até o 12º dia de pós-operatório (P.O.) sob o ponto de vista clínico, evidenciando-se os sinais flogísticos edema, presença de crosta e exsudato, além da mensuração da área, com auxílio de um paquímetro. A contração da lesão foi avaliada através do cálculo da área da ferida, utilizando-se da equação descrita por Prata et al. (1988): $A = \pi \cdot R \cdot r$, onde “A” representa a área, “R” o raio maior e “r” o raio menor da ferida. O cálculo do grau de contração da ferida foi expresso como percentual, assim como o índice de cicatrização, utilizando-se as

equações propostas por Ramsey et al. (1995): $100 \times (W_o - W_i)/W_o = M \pm DP$, onde W_o = área inicial da ferida; W_i = área da ferida no dia da biópsia (2^o, 7^o e 12^o dias).

Análises histopatológicas

Com os camundongos anestesiados, conforme previamente descrito, amostras do tecido lesionado foram coletadas no 2^o, 7^o e 12^o dias P.O., com o objetivo de realizar a análise histopatológica. Nestes tempos, cinco animais foram retirados dos grupos experimentais e após a realização das biópsias, foram submetidos à eutanásia por superdosagem de Pentobarbital sódico (200 mg/Kg) por via intraperitoneal. As amostras de tecido foram fixadas em formaldeído 4% (v/v) preparado em PBS 0,01M, pH 7,2. Estas amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina. Após microtomia, os cortes foram corados pelo Tricrômico de Masson (MICHALANY, 1991).

Análises estatísticas

Os dados paramétricos (áreas das feridas) foram expressos como média \pm desvio padrão ($M \pm sd$), submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey, aceitando como estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de 5%. Os dados categorizados (características clínicas) foram testados quanto à possibilidade de interveniência do tratamento utilizado, aplicando-se o teste do Qui-quadrado, sendo aceitos como estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de 5%.

Resultados

Avaliação clínica

A avaliação clínica macroscópica do processo cicatricial foi realizada durante 12 dias, registrando-se a frequência de sinais flogísticos como edema, formação de crosta e características exudativas das lesões.

O edema (Figura 1A e 1B), conseqüente ao acúmulo de fluido e proteínas plasmáticas no espaço extravascular, foi observado em todos os grupos estudados. No 2º dia de P.O., 100% dos animais apresentaram este sinal flogístico. No 9º e 10º dias de avaliação, foi observada uma redução significativa ($p \leq 0,05$) na frequência dos edemas do grupo controle AAT (60%) em relação ao grupo POLICAJU/ AA / T (100%). Ao 12º dia de avaliação os animais que apresentaram menores índices de edema (80%) foram dos grupos Controle AA e POLICAJU/NaCl/T.

Na Figura 2 (A e B) é observada a presença de 1ª crosta nos 12 dias avaliados. No 1º dia o grupo controle AA apresentou índices significativamente reduzidos ($p = 0,05$) em relação aos demais grupos analisados. A partir do 3º dia, após a realização das lesões experimentais, 100% das feridas em todos os grupos apresentaram formação de 1ª crosta. Na Figura 2B é observada uma redução progressiva da presença da 1ª crosta. A segunda crosta (Figura 3A e 3B) foi visualizada ao 7º dia em 10% dos animais dos grupos AAT e POLICAJUT/NaCl. No último dia de avaliação, 80% dos animais do grupo AAT apresentavam os maiores índices de 2ª crosta quando comparado aos grupos Controle AA (60,0%) e POLICAJU/AA/T (67%), sugerindo uma aceleração do processo cicatricial quando comparado aos demais grupos.

As características exudativas da fase inflamatória (Figura 4A e 4B) também foram acompanhadas durante os 12 dias de experimento. Os exsudatos apresentavam característica serosangüinolenta e foram observados no grupo AAT até o 10º dia das observações clínicas. Vale ressaltar, que no 1º e 2º dias de pós-operatório, observou-se uma frequência significativa ($p \leq 0,05$) de aparecimento de exsudato nas feridas dos

animais pertencentes aos grupos AAT quando comparados ao grupo AA. É importante ressaltar que não foi observada secreção purulenta em 100% das feridas estudadas, já que foram feridas limpas e realizadas cirurgicamente.

A evolução dos parâmetros morfométricos foram avaliados pela medida das áreas das lesões (Figura 5A e 5B). A partir do 1º dia de pós-operatório, foi observada uma diminuição gradual das áreas das lesões dos animais pertencentes a todos os grupos, ainda que no 12º dia de pós-operatório, a área média das lesões dos animais dos grupos teste apresentava-se maior que a dos controles. Este aumento foi significativo ($p \leq 0,05$) entre o grupo POLICAJUT/NaCl e os demais grupos, apresentando, conseqüentemente o menor percentual de contração (69,52%), em relação aos demais: NaCl (85,16%); AA (79,81%) ; AAT (86,99%) e POLICAJUT/AA (76,57%).

Análises histopatológicas

A análise histopatológica do grupo NaCl 0,15M ilustra um padrão normal de evolução do processo cicatricial. O 2º dia P.O. (Figura 6) é caracterizado pela presença de crosta eosinofílica, exsudato, infiltrado de polimorfonucleares e angiogênese. Os grupos tratados com apresentaram características histopatológicas semelhantes ao grupo controle, ressaltando-se a presença de um tecido menos desenvolvido e mais friável nos grupos AAT.

No 7º dia do período pós-operatório (Figura 7), as lesões do grupos AAT, POLICAJUT/AA e POLICAJUT/NaCl apresentaram um padrão fibrovascular mais evoluído que os grupos NaCl e AA. Os grupos tratados com POLICAJUT/AA caracterizaram-se por apresentar reepitelização parcial, e na derme podem ser visualizados maior número de fibroblastos e colágeno neoformado.

No 12^o dia (Figura 8), o grupo tratado com NaCl apresentou reepitelização total e um tecido de granulação fibroso, compatível com a evolução do processo (período cicatricial). Nos demais grupos foi observado um padrão morfológico característico: reepitelização parcial, associado a tecido de granulação fibrovascular (ou seja, tecido conjuntivo de aspecto fibroso, rico em fibras colágenas) apoiado sobre um tecido de granulação de características vasculares. Os grupos AAT e POLICAJUT/AA apresentaram-se qualitativamente mais evoluídos que as lesões AA, pois aparentavam possuir uma maior quantidade de fibras colágenas. As lesões tratadas com POLICAJUT/AA também apresentaram início da formação de anexos cutâneos. Enfim, no grupo POLICAJUT/NaCl pôde ser observado um padrão tecidual mais desenvolvido em relação aos demais grupos, pois se observou reepitelização completa, presença de uma delgada camada de queratina sobre a epiderme neoformada, tecido colagenoso modelado e presença de brotos de anexos cutâneos.

Discussão

No presente estudo foi avaliado o tratamento de feridas cutâneas com dois tipos de filmes poliméricos, utilizados como matriz para imobilização de tripsina, sendo empregados como curativos oclusivos nessas lesões, objetivando melhorar o processo cicatricial.

Os resultados das avaliações clínicas demonstraram um aumento nos sinais flogísticos (edema e exsudato) quando foi empregado o filme POLICAJUT/AA, sugerindo-se que este efeito pode estar relacionado à ação debridante das proteases.

Eldad et al. (1998) relatam que para promover o debridamento de tecidos não viáveis podem ser utilizadas formulações com enzimas proteolíticas. Para um

debridamento ideal, a formulação deve digerir apenas o tecido não viável, promovendo a limpeza da ferida e deixando o tecido receptivo para o tratamento tópico.

No processo cicatricial normal, a degradação controlada da matriz extracelular (MEC) é requerida para a remoção de tecidos danificados e para permitir a migração celular e a angiogênese. Essas funções podem ser desempenhadas por proteases extracelulares como serinoproteinasas e metaloproteinasas de matriz. No entanto, elevados níveis de proteases podem causar danos a MEC, interferindo no processo cicatricial normal (Tregrove et al., 1999). Diante disso, é razoável supor que a concentração de tripsina (1000 µg/ml) no curativo de POLICAJUT/AA promova um efeito debridante acima do esperado, aumentando os sinais flogísticos na fase inflamatória das lesões tratadas.

Na avaliação macroscópica, os animais do grupo POLICAJUT/NaCl apresentaram as maiores áreas de lesão e um aspecto histopatológico mais evoluído aos 12 dias, quando comparado aos demais grupos. Esses resultados sugerem que, entre as condições testadas, a concentração de tripsina imobilizada (100 µg/ml) foi ideal para promover o debridamento tecidual durante a fase inflamatória e possivelmente estimular a produção de colágeno pelos fibroblastos, uma vez que esses tecidos se apresentam mais organizados.

Markvicheva et al. (2000) avaliaram a ação da tripsina enclausurada em suporte magnetizado sobre o processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos e observaram uma aceleração desse processo, confirmado pela diminuição do tamanho das áreas das lesões. Esses reportam que a tripsina pode ativar receptores envolvidos com a proliferação de fibroblastos e neovascularização.

Além da tripsina como princípio ativo e da diversidade de funções a ela atribuídas durante o processo cicatricial, devem ser considerados outros aspectos

importantes: a natureza do POLICAJU, enquanto biomaterial e modificador da resposta biológica; a adaptabilidade do POLICAJU em formar membranas poliméricas e a adequação da metodologia de imobilização proposta (enclausuramento), o que permitiu que os sistemas de curativo testados funcionassem como sistemas de liberação controlada, minimizando possíveis danos teciduais, caso a tripsina fosse aplicada em altas concentrações na forma de uma solução.

A escolha do enclausuramento como metodologia de imobilização utilizando o POLICAJU como matriz, também contribuiu para a eficácia do tratamento, uma vez que esse sistema mantém a integridade conformacional da proteína e conseqüente atividade catalítica. Tal argumento torna-se mais relevante, especialmente ao comparar-se ao sistema proposto por Eldad et al. (1998), os quais utilizaram a tripsina imobilizada covalentemente em gaze, relatando a sua ineficácia no modelo biológico testado.

Schultz et al. (2005) ressaltam as vantagens do uso de curativos oclusivos quando comparados ao uso tradicional da gaze, pois favorecem a reepitelização por manter um nível ótimo de hidratação, além de reduzir a dor/desconforto e atuar como uma barreira contra invasões bacterianas.

Conclusão

Os presentes resultados demonstram que o curativo de POLICAJUT/NaCl com tripsina enclausurada melhora o processo cicatricial de lesões cutâneas experimentais podendo ser empregado como curativo oclusivo, apresentando potencial aplicação como um sistema de liberação de drogas.

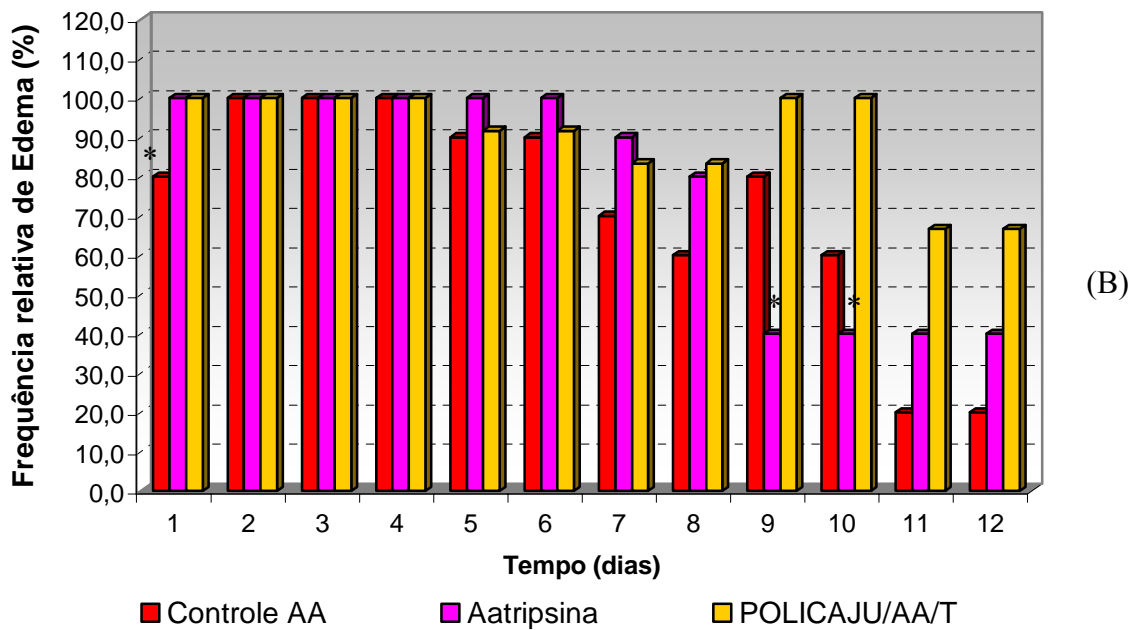
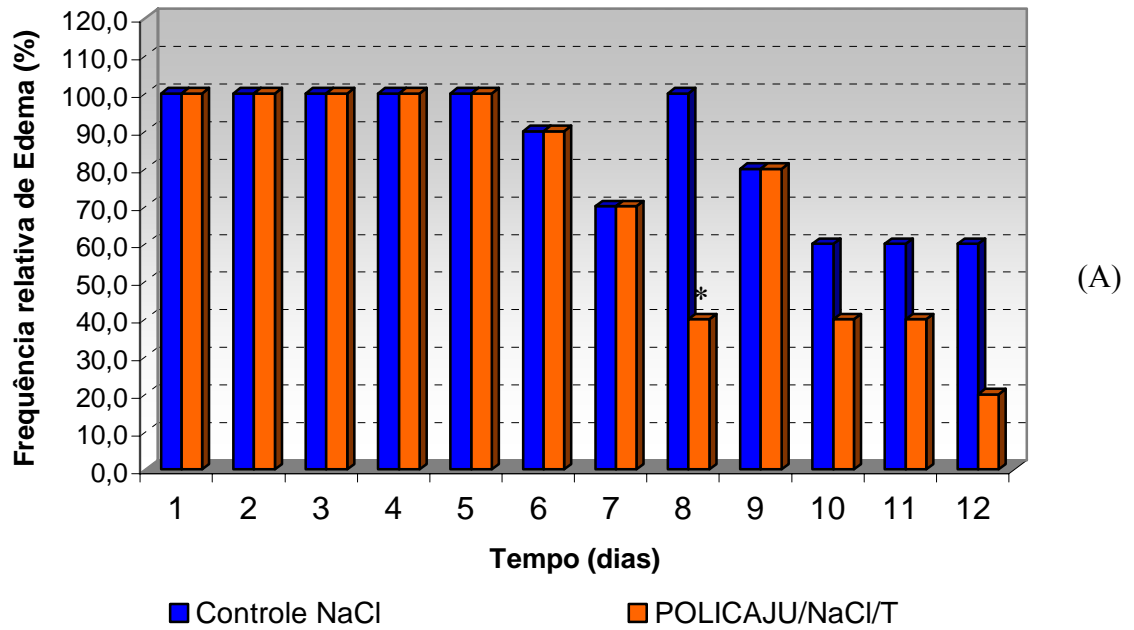


Figura 1- Frequência relativa de edema (%). (A) Grupo C (NaCl 0,15M) e Grupo POLICAJU/NaCl/T (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v). (B) Grupo Controle AA (ácido acético 4%), AAT (ácido acético 4%, 1000µg/ml) e Grupo POLICAJU/AA/T (POLICAJUT/ Ácido acético m/v).

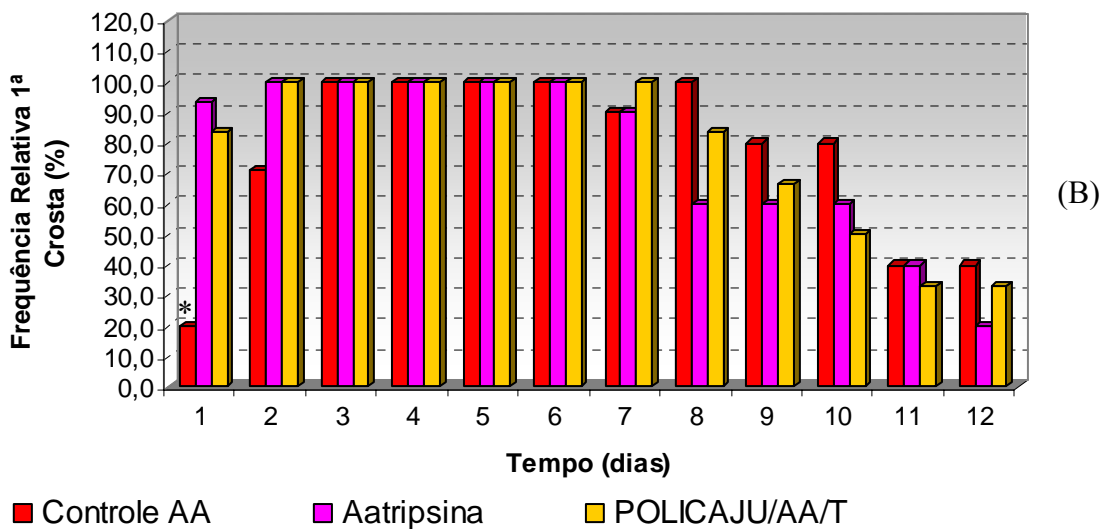
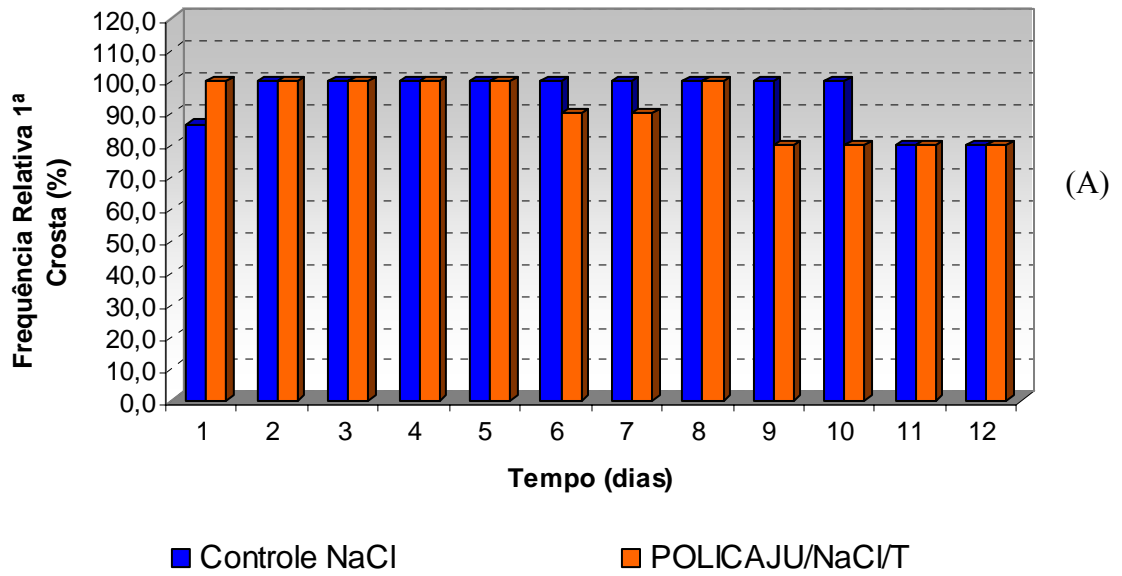


Figura 2- Frequência relativa de 1ª crosta. (A) Grupo C (NaCl 0,15M) e Grupo POLICAJU/NaCl/T (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v). (B) Grupo Controle AA (ácido acético 4%), AAT (ácido acético 4%, 1000µg/ml) e Grupo POLICAJU/AA/T (POLICAJUT/ Ácido acético m/v).

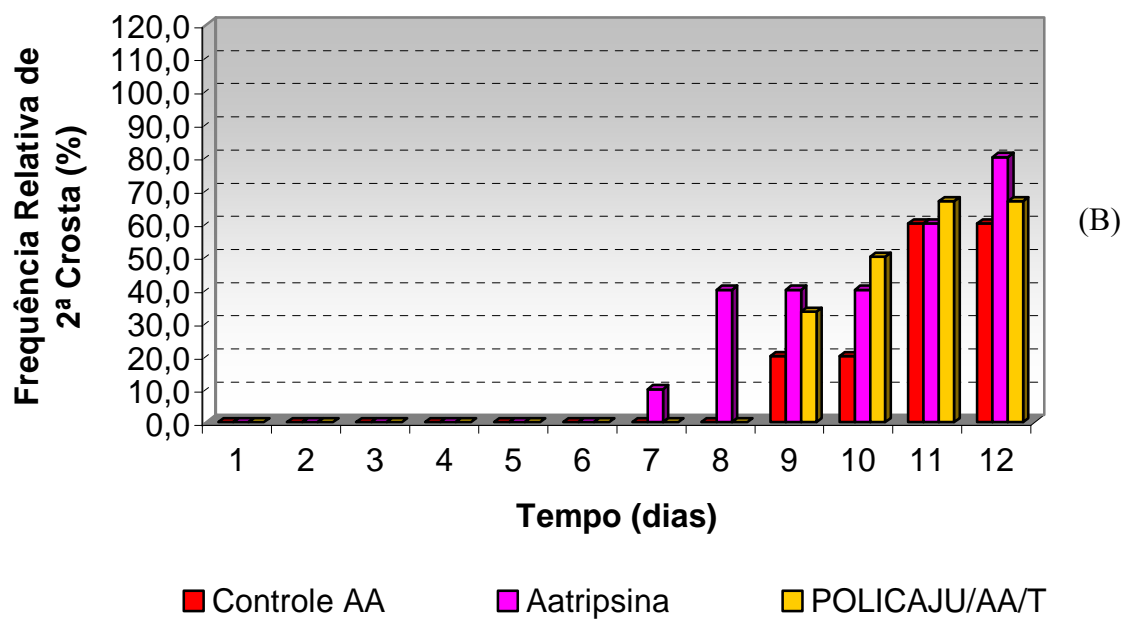
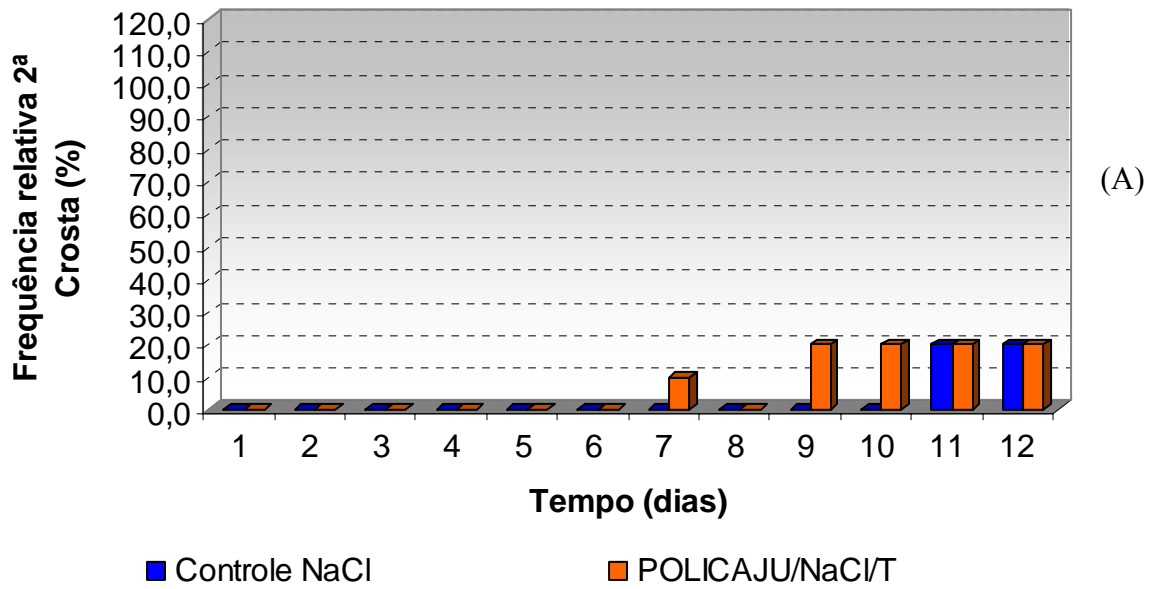


Figura 3- Frequência relativa de 2^a crosta (%). (A) Grupo C (NaCl 0,15M) e Grupo POLICAJU/NaCl/T (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v). (B) Grupo Controle AA (ácido acético 4%), AAT (ácido acético 4%, 1000µg/ml) e Grupo POLICAJU/AA/T (POLICAJUT/ Ácido acético m/v).

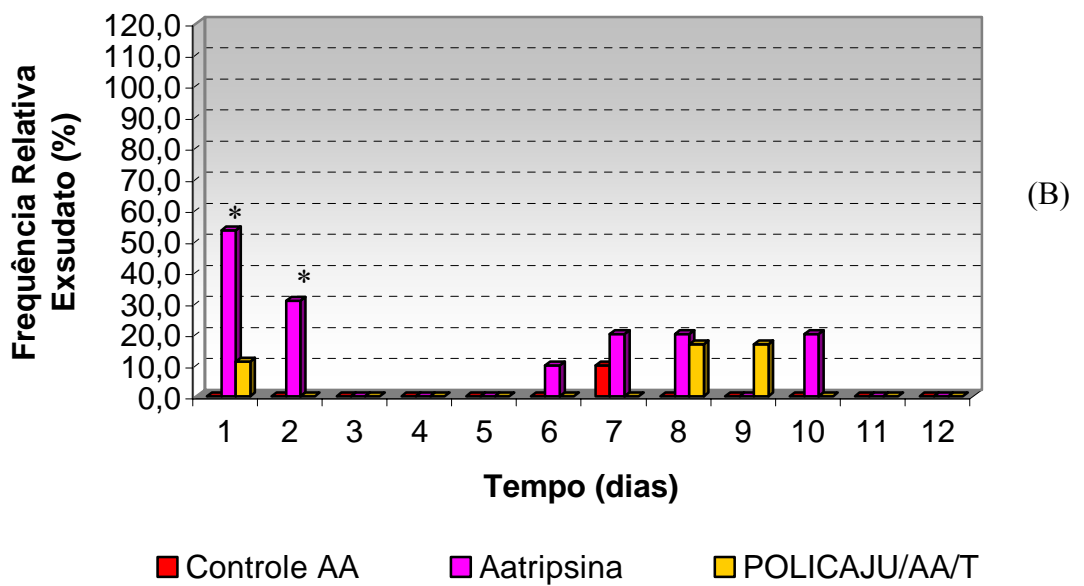
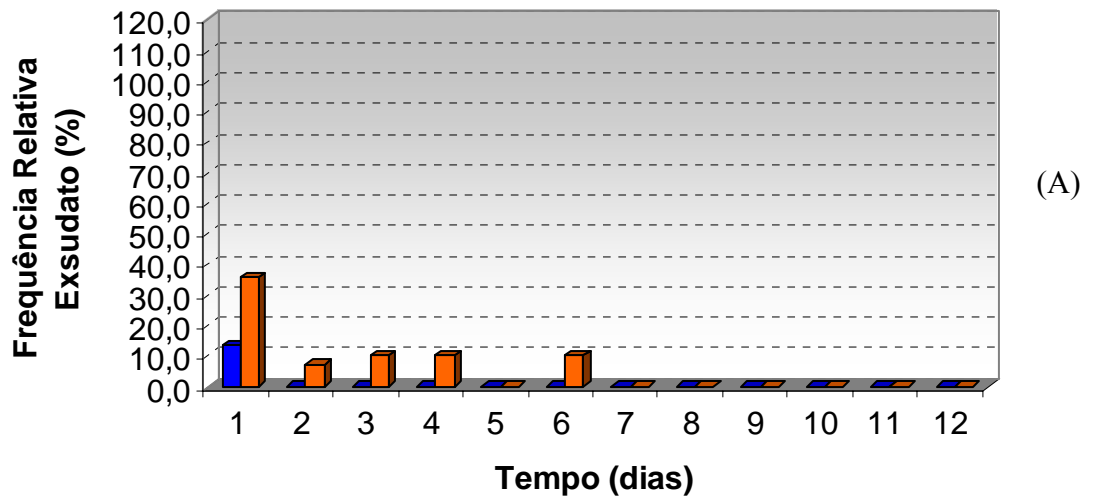
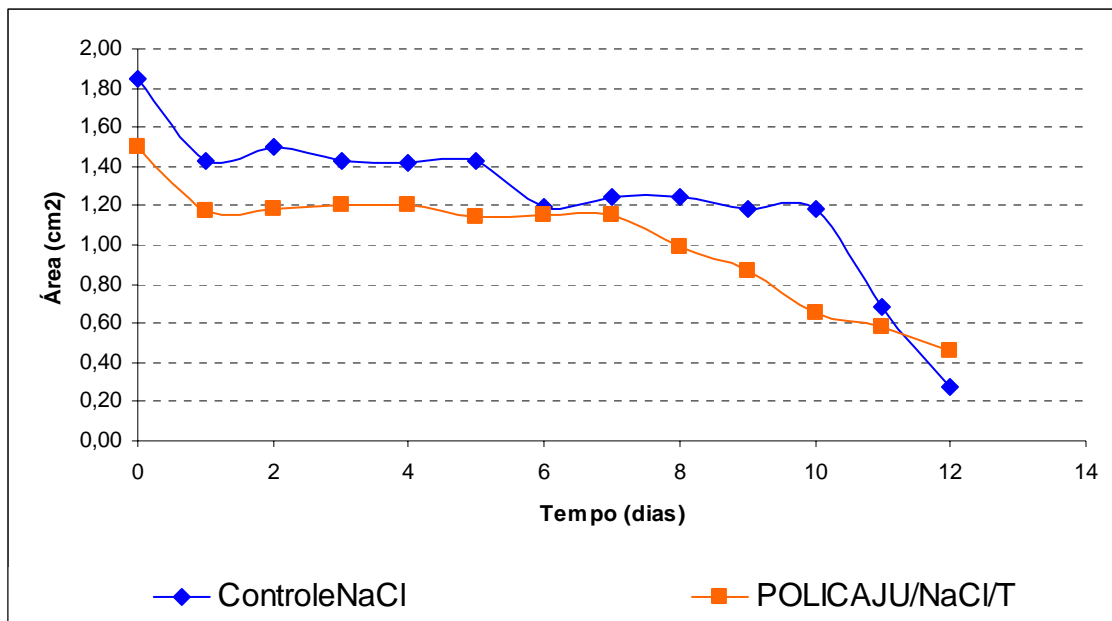
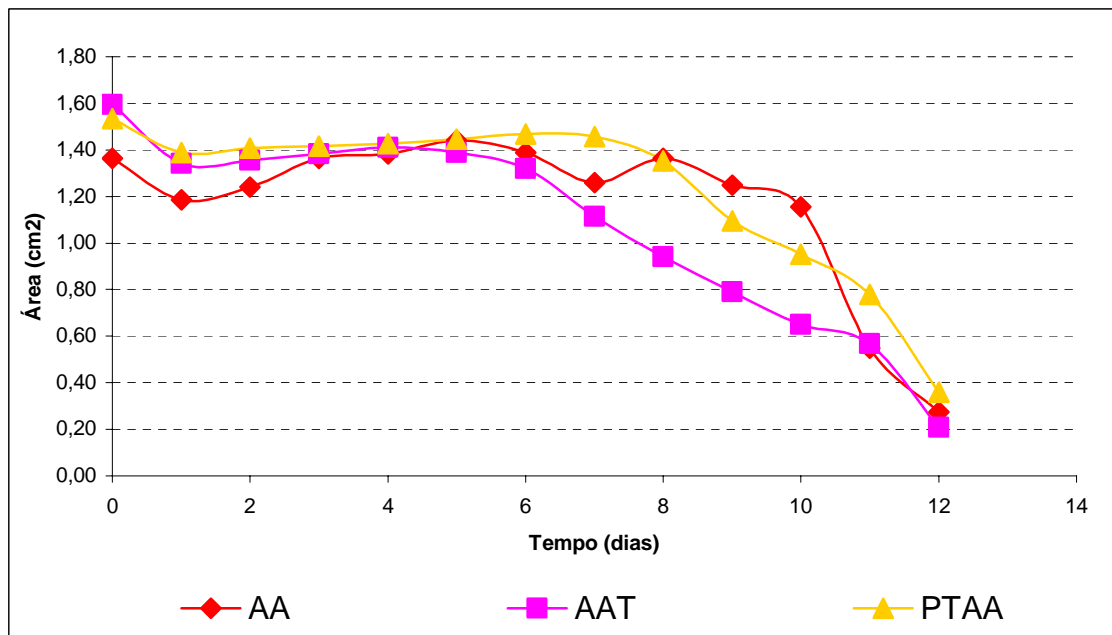


Figura 4- Frequência relativa de exsudato (%). (A) Grupo C (NaCl 0,15M) e Grupo POLICAJU/NaCl/T (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v). (B) Grupo Controle AA (ácido acético 4%), AAT (ácido acético 4%, 1000µg/ml) e Grupo POLICAJU/AA/T (POLICAJUT/ Ácido acético m/v).



(A)



(B)

Figura 5- Evolução das áreas das lesões dos Grupos (A) Controle NaCl (NaCl 0,15M) e POLICAJU/NaCl/T (POLICAJU/NaCl 0,15M m/v); (B) Controle AA (ácido acético 4%), Controle AAT (ácido acético 4%, 1000 μ g/ml) e Grupo POLICAJU/AA/T (POLICAJUT/ Ácido acético m/v).

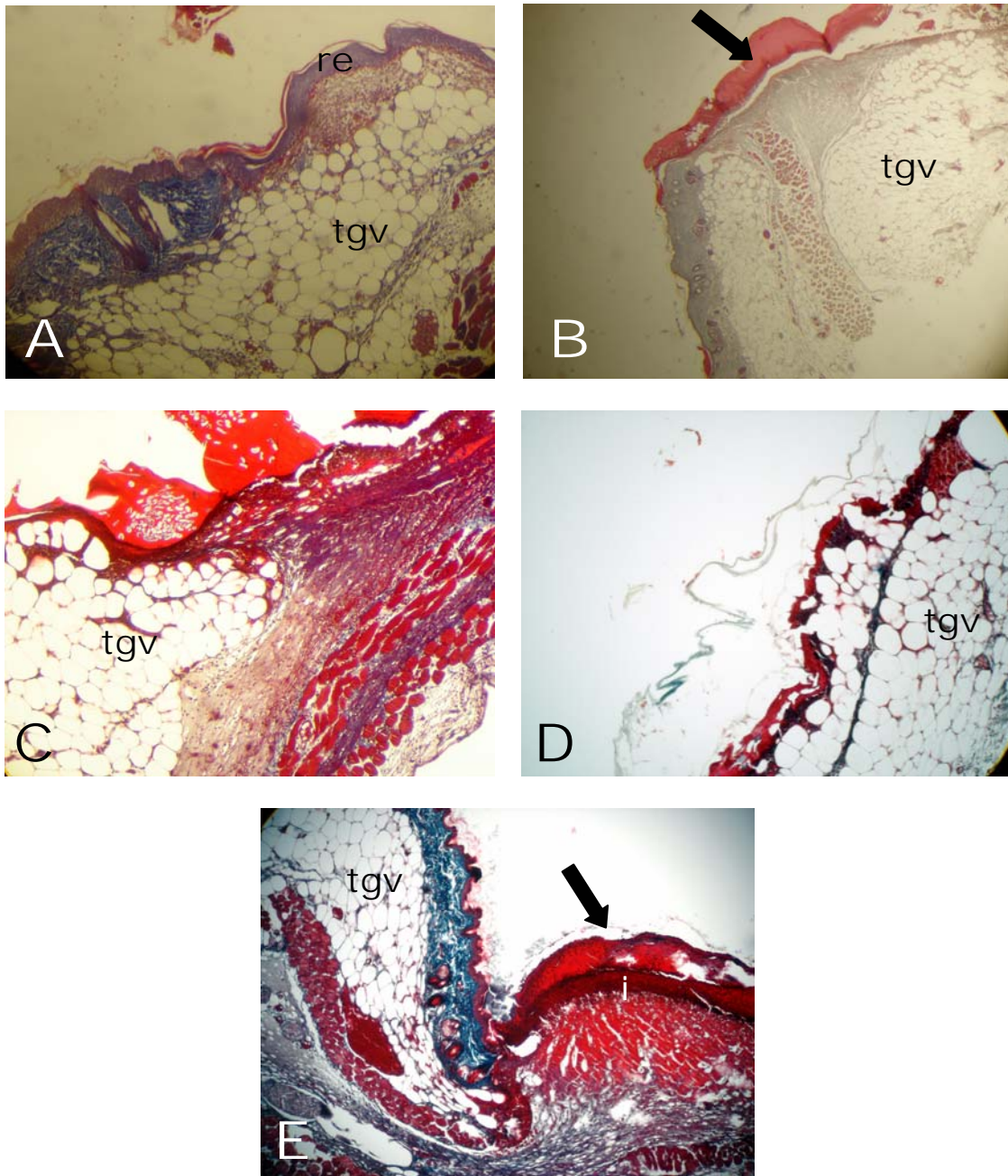


Figura 6 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo (fase inflamatória), após 48 horas. Coloração Tricrômico de Masson. A, Controle Ácido Acético 4% (Ampliação original 100x); ; B, Controle Ácido Acético – Tripsina (Ampliação original 40x);C, NaCl 0,9% (Ampliação original 100x); ; D, POLICAJU Tripsina – Ácido Acético (Ampliação original 100x); E, POLICAJU Tripsina – NaCl (Ampliação original 100x).

Seta larga – crosta; **re** – reepitelização; **tgv** – tecido de granulação de característica vascular; **i** – infiltrado inflamatório.

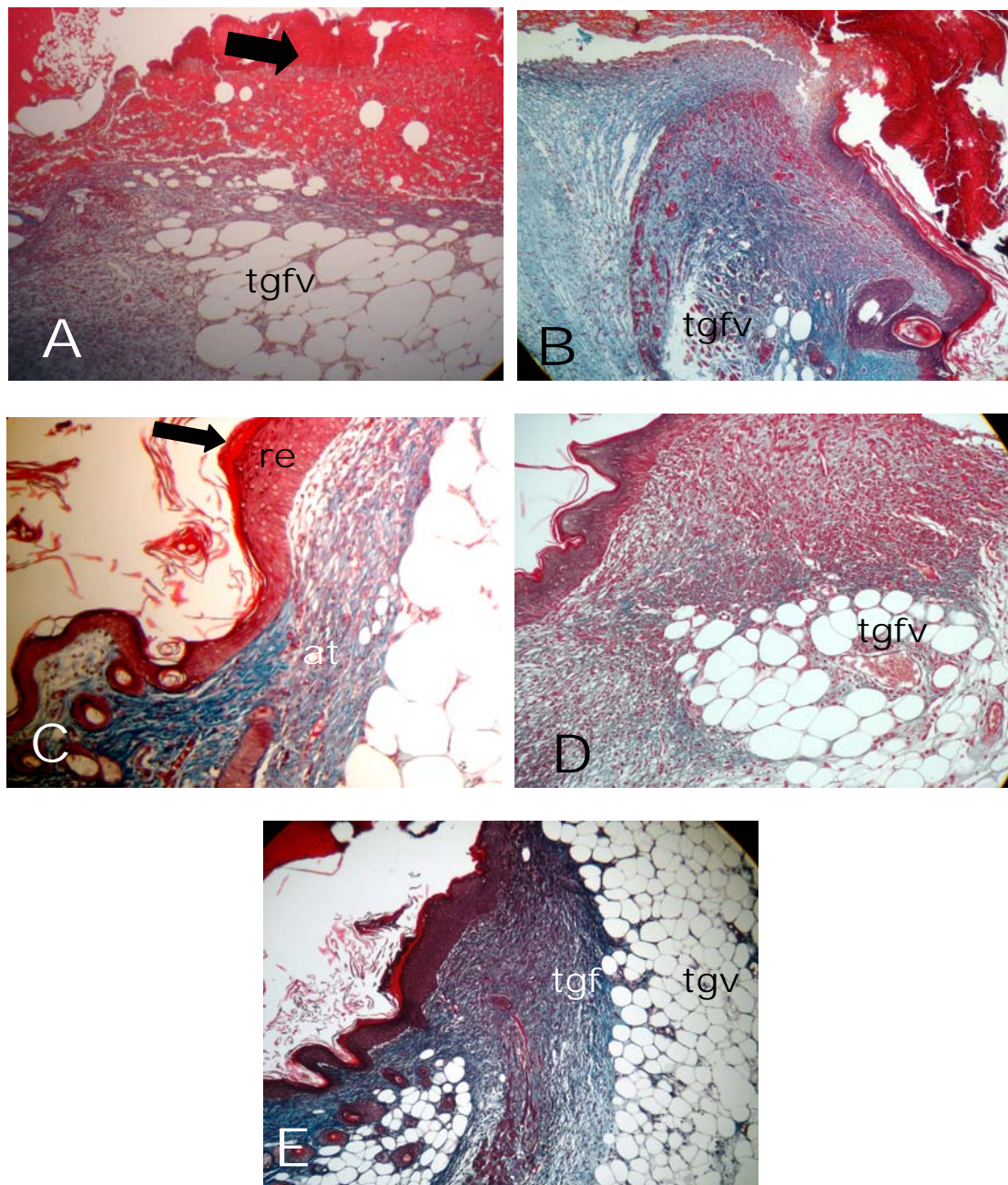


Figura 7 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo (fase inflamatória), após 7 dias. Coloração Tricrômico de Masson. A, Controle Ácido Acético 4% (Ampliação original 100x); B, Controle Ácido Acético – Tripsina (Ampliação original 100x); C, NaCl 0,9% (Ampliação original 200x); D, POLICAJU Tripsina – Ácido Acético (Ampliação original 200x); E, POLICAJU Tripsina – NaCl (Ampliação original 100x).

Seta larga – crosta; **re** – reepitelização; **tgv** – tecido de granulação de característica vascular; **tgf** – tecido de granulação de característica fibrosa; **tgfv** – tecido de granulação de característica fibrovascular; **a**- anexos.

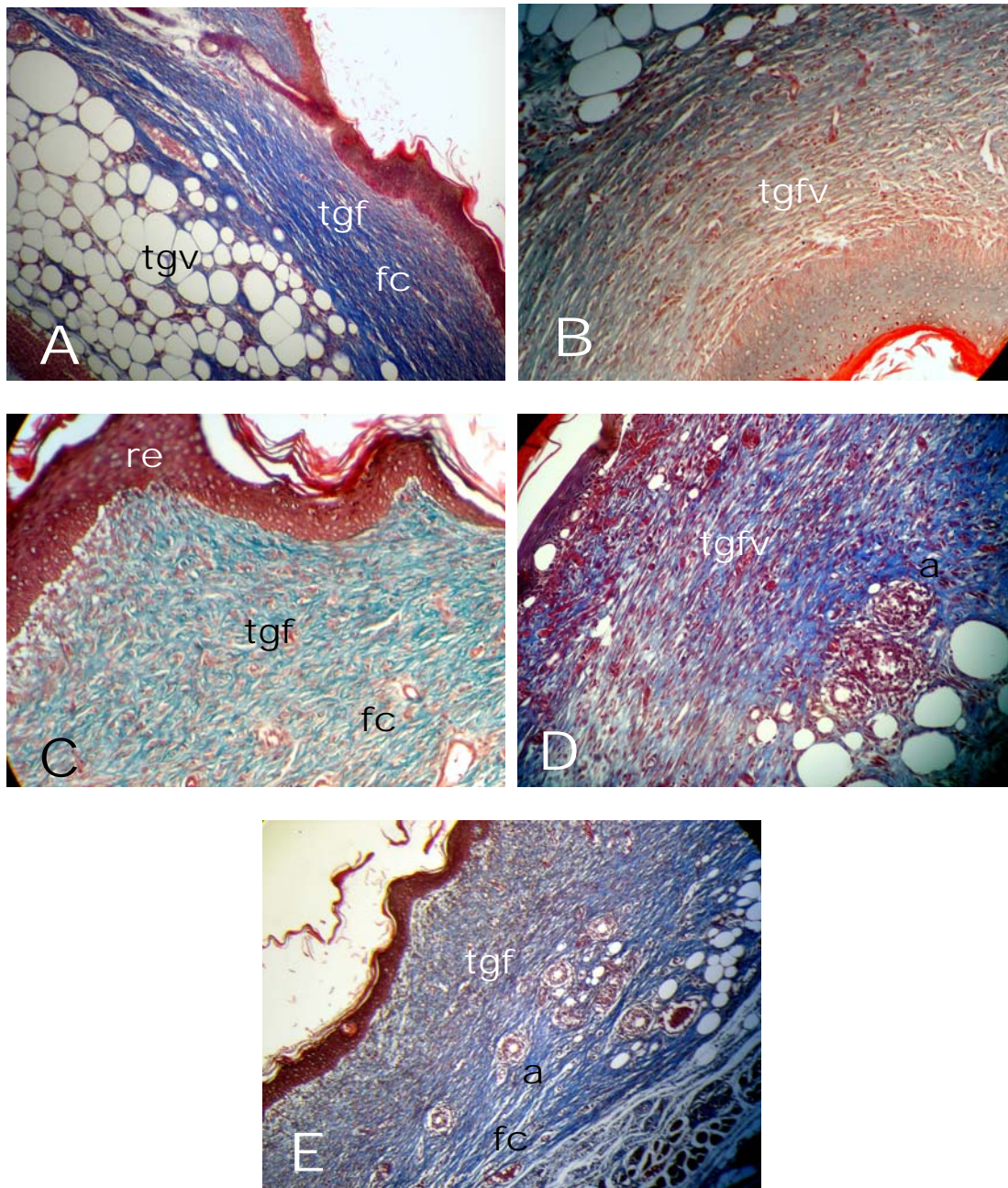


Figura 8 – Aspectos microscópicos da evolução do processo de reparo cutâneo (fase inflamatória), após 12 dias. Coloração Tricrômico de Masson. A, Controle Ácido Acético 4% (Ampliação original 100x); B, Controle Ácido Acético – Tripsina (Ampliação original 200x); C, NaCl 0,9% (Ampliação original 200x); D, POLICAJU Tripsina – Ácido Acético (Ampliação original 200x); E, POLICAJU Tripsina – NaCl (Ampliação original 100x).

Seta larga – crosta; **re** – reepitelização; **tgfv** – tecido de granulação de característica vascular; **tgfv** – tecido de granulação de característica fibrosa; **tgfv** – tecido de granulação de característica fibrovascular; **fc** – presença de fibras colágenas; **a**- anexos.

Referências Bibliográfica

BALASUBRAMANI A, M; KUMAR, T.R.; BABU, M. Skin substitutes: a review, **Burns**, v. 27, p. 534–544, 2001.

BIONDO-SIMÕES, M.L.P, PANTE, M.L., MACEDO, V.L., GARCIA, R.F., BOELL, P.,MORAES T.H.C. O hormônio de crescimento e a concentração de colágeno na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v15, p.78-82, 2000.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; ROCHA, J. M. S.; GARCIA, F. A. P.; GIL, M. H. Lípase immobilisation on to polymeric membranes. **Biotechnology Techniques**. v. 13, p. 403-409, 1999.

CHOI, S., CHUNG, M.-H. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. **Seminars in Integrative Medicine**, v. 1, p. 53-62, 2003

ELDAD, A., WEINBERG, A., BREITERMAN, S., CHAOUAT, M., PALANKER, D., BEN-BASSAT, H. Early nonsurgical removal of chemically injured tissue enhances wound healing in partial thickness burns. **Burns**, v. 24, p. 166-172, 1998.

HALL, L. W. & CLARKE, K. W. **Veterinary anaesthesia**. 9ed. London: Ballière Tindall, 1991. 410p

HOUGHTON, P. J., HYLANDS, P. J., MENSAH, A. Y., HENSEL, A., DETERS, A. M. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 100-107, 2005.

KAPOOR, M.; APPLETON, I. Wound healing: Abnormalities and future therapeutics targets. **Current Anesthesia and Critical Care**. In Press, 2006.

KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N., ROBBINS, S. L. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 1592 p, 2005.

LOPES, G. C., SANCHES, A. C. C., NAKAMURA, C. V., DIAS-FILHO, B. P., HERNADES, L., MELLO, J. C. P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 265-272, 2005

MARKVICHEVA, E. A.; KUPTSOVA, S. V.; BURYAKOV, A. N. et al. Proteases entrapped in polymer composite hydrogels: preparation methods and applications. *Vestnik Moskovskogo Universiteta*. **Khimiya**, v. 41, n. 6, 54-57, 2000.

MENESTRINA, J. M., IACOMINI, M., JONES, C., GORIN, P. A. J. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 715-721, 1998.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 2. ed. São Paulo: Michalany, 1991.

OEHMIMICHEN, M. Vitality and time course of wounds *Forensic Science International*, v. 144, p. 221-231, 2004

PARK, J. E., BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v. 187, p. 11S-16S, 2004

PRATA, M., HADDAD, C., GOLDENBERG, S., et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, v. 3, n. 2, p. 43-48, 1988.

PRIYA, K., ARUMUGAM, G., RATHINAM, B., WELLS, A., BABU, M. *Celosia argentea* Linn. leaf extract improves wound healing in a rat burn wound model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, p. 618-625, 2004

RAMSEY, D. T., POPE, E. R., WAGNER-MANN, C., BERG, J. N., SWAIM, S. F. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **American journal of veterinary research**, v.56, n.7, p. 941-949, 1995.

ROY, R., ZHANG, B., MOSES, M. A. Making the cut: protease-mediated regulation of angiogenesis. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 608-622, 2006

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

SCHULTZ ,G. MOZINGO, D., ROMANELLI, M., et al. Wound healing and time; new concepts and scientific applications. **Wound Repair and Regeneration**. v. 13, n. 4, p. S1-S11, 2005.

SINGER, A. J.; CLARK, R. Cutaneous wound healing. **New England J. Med.**, v. 341, p.739-746, 1999.

STADELMAN, 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.

SUPP, D. M., BOYCE, S. T. Engineered skin substitutes: practices and potentials. **Clinics in Dermatology**, v. 23, p. 403-412, 2005.

TOGNINI, J.R.F., FAGUNDES, D.J., NOVO, N.F., JULIANO, Y. Estudo biomecânico e morfológico da cicatrização da parede abdominal de ratos sob ação de meloxicam. **Acta Cir. Bras.**, v15, 2000.

TRENGOVE, N.J.; STACE, M.C.; MACAULEY, S.; BENNETT, N.; GIBSON, J.; BURSLEM, F.; MURPHY, G., SCHULTZ, G. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. **Wound Rep Reg.** v. 7, p. 442-452, 1999.

WITTAYA-AREEKUL, S., PRAHSARN, C. Development and in vitro evaluation of chitosan-polysaccharides composite wound dressings. **International Journal of Pharmaceutics**, in press, 2006

WITTE, M. B., BARBUL, A. Role of nitric in wound repair. **The American Journal of Surgery**, v. 183, p. 406-412, 2002

9. CONCLUSÕES FINAIS

- O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. mostrou-se efetivo para uso como matriz para imobilização de proteínas, na forma de filme polimérico.
- A tripsina enclausurada no filme polimérico de POLICAJU reteve sua atividade catalítica, demonstrando estabilidade à ampla faixa de pH e temperatura testadas, mantendo-se ativa após 28 dias de estocagem.
- A metodologia de planejamento estatístico experimental demonstrou ser uma ferramenta útil, rápida e econômica para determinar as melhores condições de imobilização da tripsina em filmes de POLICAJU.
- O filme de POLICAJU foi eficaz no tratamento de lesões cutâneas experimentais em camundongos sob os aspectos clínicos e histopatológicos.
- O tratamento tópico de lesões cutâneas excisionais utilizando o curativo oclusivo obtido pelo enclausuramento da tripsina (100 µg/mL) em filmes poliméricos de POLICAJU NaCl, demonstrou a melhor evolução clínica e histopatológica entre as condições testadas.

10. ANEXOS

Anexo 01: Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal.

Trabalhos gerados do trabalho de Tese de Doutorado

Anexo 02: Resumo expandido apresentado em anais de evento

Flaviane Maria Florêncio Monteiro, Flávio Oliveira Silva, Maria das Graças Paiva, Giuliana Viegas Schirato, Maria das Graças Carneiro da Cunha, Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão, Ana Lúcia Figueiredo Porto. **Avaliação *in Vitro* da Atividade Antimicrobiana de Diferentes Concentrações do Polissacarídeo obtido da Goma do *Anacardium occidentale* L.** Anais do IV SIMPÓS Qualidade e Desenvolvimento da Pós- Graduação da UFRPE –Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife/ PE, 11 e 12 de dezembro de 2003. 1 CD

Anexo 03: Resumo expandido apresentado em anais de evento

Flaviane Maria Florêncio Monteiro; Michele Moreira Martins de Oliveira; Ranilson de Souza Bezerra; Luiz Bezerra de Carvalho Junior; Maria Helena Gil; Maria das Graças Carneiro-da-Cunha; Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão; Ana Lúcia Figueiredo Porto. **Membrana de Celulose -Policaaju como Matriz para Enclausuramento de Tripsina** Anais do IV SIMPÓS Qualidade e Desenvolvimento da Pós- Graduação da UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife/ PE, 11 e 12 de dezembro de 2003. 1CD

Anexo 04: Resumo expandido apresentado em anais de evento

MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; SCHIRATO, G. V.; SILVA, G. M.; ARAÚJO, J. P. F.; SILVA, J. B. R.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-CUNHA, M. G.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F. **Avaliação da atividade cicatrizante do filme polimérico produzido com o polissacarídeo obtido da goma do *Anacardium occidentale* L.** V Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão - VI Simpósio de

Pós-Graduação, 2005, Recife. Anais da V Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão, 1CD.

Anexo 05: Resumo expandido apresentado em anais de evento

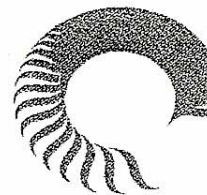
MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; SCHIRATO, G. V.; SILVA, G. M.; ARAÚJO, J. P. F.; SILVA, J. B. R.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-CUNHA, M. G.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F. **Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana das soluções utilizadas na confecção de curativos dérmicos testados como agentes cicatrizantes.** V Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão - VI Simpósio de Pós-Graduação, 2005, Recife. Anais da V Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão, 1CD.

Anexo 06: Trabalhos realizados no período de execução do doutorado

SCHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F.M. F.; SILVA, F. O.; LIMA-FILHO, J.L.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; PORTO; A.L.F. **O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas.** Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.1, p.149-154, jan-fev, 2006

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº28/05

Recife, 21 de junho de 2005

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
À : Profª Ana Lúcia Figueiredo Porto - LIKA/UFPE

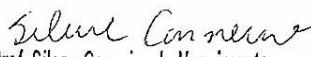

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO TÓPICO DE LESÕES CUTÂNEAS COM MEMBRANAS OBTIDAS DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DO CAJUEIRO *ANACARDIUM OCCIDENTALE L.*".

Concluíram que os procedimentos descritos para a utilização experimental com os animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos um PARECER FAVORÁVEL aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO POLISSACARÍDEO OBTIDO DA GOMA DO *Anacardium occidentale* L.⁽¹⁾

Flaviane Maria Florêncio Monteiro⁽²⁾; Flávio Oliveira Silva⁽³⁾; Maria das Graças Paiva⁽⁴⁾; Giuliana Viegas Schirato⁽⁵⁾; Maria das Graças Carneiro da Cunha^(6,9); Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão^(7,9); Ana Lúcia Figueiredo Porto^(8,9).

⁽¹⁾Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRPE; ⁽²⁾Bolsista/CAPES/UFRPE, e-mail: flavianedoutorado@yahoo.com.br; ⁽³⁾Graduando Medicina Veterinária/UFRPE; ⁽⁴⁾Professor/Fisioterapia/UFPE; ⁽⁵⁾Médica Veterinária/ Ageu Magalhães; ⁽⁶⁾Co-Orientadora/Departamento Bioquímica/UFPE; ⁽⁷⁾Co-Orientadora/DMFA/UFRPE; ⁽⁸⁾Orientadora/DMFA/UFRPE; ⁽⁹⁾Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA.

Introdução

Perdas teciduais são episódios frequentes em animais domésticos, agravadas por diferentes fatores etiológicos. Lesões extensas ou infectadas da pele e mucosas dificultam ou mesmo impossibilitam a aproximação das bordas das feridas, promovendo uma cicatrização por segunda intenção, a qual acarreta grandes cicatrizes (Calvin, 1998).

O alto custo, a geração de cepas resistentes e a interferência no processo cicatricial são fatores que contra-indicam o uso indiscriminado de antibióticos, tornando viável o estudo no campo dos medicamentos fitoterápicos e homeopáticos e a aplicação clínica de métodos alternativos e de baixo custo, capazes de proporcionar condições ideais para o tratamento local das feridas (Galego et al., 1997).

Os biomateriais são substâncias biologicamente ativas capazes de modificar a resposta imune (Fields & Koeller, 1993) que têm sido estudadas, objetivando melhorar a resposta às enfermidades. O uso de polissacarídeos como biomateriais é vantajoso, uma vez que tais substâncias apresentam livre administração, simplicidade de operação, evitam o uso de antibióticos para animais, diminuindo os custos de tratamento (Shigemasa & Minani, 1995).

O heteropolissacarídeo proveniente da goma de *A. occidentale* (POLICAJU) tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, potencializando o processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos (Schirato, 2003), e demonstrando atividade anti-tumoral (Menestrina et al., 1996), e anti-helmíntica (Gadelha et al., 2001), constituindo-se, assim, em um biomaterial de importante uso terapêutico.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o polissacarídeo obtido da goma do *A. occidentale* L. (POLICAJU) quanto a sua possível atividade antimicrobiana *in vitro*.

Material e Métodos

Bactérias dos gêneros *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., isoladas a partir de feridas cutâneas de cães, e crescidas em caldo BHI por 24h, foram utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana da emulsão contendo POLICAJU pelo método de difusão em poço. A goma de *A. occidentale* L. foi coletada na Praia de Tamandaré, litoral sul do Estado de Pernambuco. O POLICAJU foi obtido de acordo com o método de Millas et al. (1991). As emulsões contendo POLICAJU e ácido ascórbico foram preparadas de acordo com o método de Shigemasa & Minami (1995), obtendo-se emulsões de POLICAJU com concentrações finais de 75, 150 e 214,3 mg/ml. Após crescimento em caldo BHI, as colônias foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar Muller Hinton, através de swabs esterilizados. Em cada placa foram realizadas duas perfurações de 0,7cm, onde foram colocados 15 µl das respectivas soluções: controle (NaCl 150mM), ácido ascórbico (75mg/ml); Nitrofurazona 0,2% (p/v) e as emulsões de POLICAJU. Após este procedimento, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C, sendo medidos os halos de inibição nos tempos de 24h, 48h e 72h.

Resultados e Discussão

As placas contendo as soluções de NaCl 150mM, ácido ascórbico (75 mg/ml) e as diferentes emulsões de POLICAJU não apresentaram formação de halo de inibição. Entretanto, a nitrofurazona apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias dos gêneros *Enterobacter* (2,5cm), *E. coli* (4,7cm) e *Bacillus* sp. (3,2cm), com respectivos diâmetros após 24 horas.

A atividade antimicrobiana da solução de 20mg/ml do extrato da casca do *A. occidentale* foi

testada por Akinpelu (2001), o qual evidenciou largo espectro de atividade antimicrobiana sobre as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomona*, *Shigella* e *Staphylococcus*.

A diferença nos resultados citados pode estar relacionada à variedade do cajueiro utilizado, a época da colheita da casca, ou ainda estar relacionada com a parte da planta utilizada para testar a atividade antimicrobiana do POLICAJU.

A avaliação microbiológica *in vivo*, da emulsão de POLICAJU, em dose única de 150mg/ml, sobre a evolução da fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos foi realizada por Schirato (2003). Este evidenciou ausência de microorganismos patogênicos, sendo isolado das lesões apenas bactérias pertencentes a flora normal, observando-se menor contaminação das feridas tratadas em relação aos grupos controle, os quais receberam soluções de NaCl (150mM) e Ácido Ascórbico (75 mg/ml). Resultados semelhantes foram obtidos por Monteiro (2003), em feridas de caprinos tratados com o POLICAJU. Contudo, este observou que nos animais tratados com o POLICAJU formava-se uma película sobre a ferida. Este fato pode explicar as diferenças nos resultados *in vivo* e *in vitro* frente à droga testada, uma vez que a película de POLICAJU pode estar formando uma barreira física protetora dificultando a contaminação das feridas com agentes patogênicos.

Conclusão

As diferentes concentrações do polissacarídeo da goma do cajueiro em ácido ascórbico não apresentaram atividade antimicrobiana para as bactérias *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp.

Referências Bibliográficas

AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**, v. 72, p. 286 - 287, 2001.

CALVIN, M. Cutaneous wound repair. **Journal of Public Health Management.**, v. 10, n. 1, p. 12-32, 1998.

FIELDS, S. M.; KOELLER, J. M. Biologic agents. In: WEISS, G. R. **Clinical Oncology**. New Jersey: Prentice Hall, p. 119-128. 1993.

GADELHA, M. M. S.; PROCÓPIO, A. E. A.; ARAÚJO, R. V. S.; SANTANA, J. V.; MALAGEÑO, E.; IACOMINI, M.; MAGALHÃES, N. S. S.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; Effect of free and liposome encapsulated heteropolysaccharide from *Anacardium occidentale* L. Against experimental *S. mansoni* infection. In: PHARMATECH, 6., 2001, Recife. **Proceedings...** Recife: Sociedade Brasileira de Tecnologia Farmacêutica, 2001.

GALEGO, G. N.; SILVEIRA, P. ; d'ACAMPORA, A. J. ; SOUZA, R. A. V. ; CANELA, R. P. Avaliação da glicemia no tratamento de feridas cirúrgicas com açúcar, em ratos. **Acta Cirúrgica. Brasileira**. v.12, n.2, 174-177, 1997.

MENESTRINA, J. M.; CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; STUELP, P. M., MACHADO, M. J.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Partial characterization and anti-tumoral activity of the polysaccharide from cashew gum. In: XXV SBBq, 1996, Caxambu n. L-57, p. 116, 1996. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1996.

MILLAS, M.; GROOTE, R.A.M.C.; CURVELLO, A.A.S. **Polieletrólitos**. São Carlos: USP, 1991.

MONTEIRO, V.L.C. **Reparação Tecidual de Feridas cutâneas de caprinos tratados com polissacarídeo do cajueiro *Anacardium occidentale* L. Estudo Clínico, Bacteriológico e Histopatológico**. 2003. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2003.

SCHIRATO, G.V. **Efeito do polissacarídeo da goma de *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos**. 2003. 63f. Monografia do Estágio Supervisionado Obrigatório (Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2003.

SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.**, v. 13, p. 383-420, 1995.

MEMBRANA DE CELULOSE-POLICAJU COMO MATRIZ PARA ENCLAUSURAMENTO DE TRIPSINA ⁽¹⁾

Flaviane Maria Florêncio Monteiro⁽²⁾; Michele Moreira Martins de Oliveira⁽³⁾; Ranilson de Souza Bezerra⁽⁴⁾; Luiz Bezerra de Carvalho Junior⁽⁴⁾; Maria Helena Gil⁽⁵⁾; Maria das Graças Carneiro-da-Cunha^(6,9); Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão^(7,9); Ana Lúcia Figueiredo Porto^(8,9).

⁽¹⁾Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRPE; ⁽²⁾Bolsista/CAPES/UFRPE, e-mail: flavianedoutorado@yahoo.com.br; ⁽³⁾Doutoranda Medicina Veterinária/UFRPE; ⁽⁴⁾Professor/Departamento Bioquímica/UFPE; ⁽⁵⁾Professor/Departamento de Engenharia Bioquímica/ Universidade de Coimbra-Pt; ⁽⁶⁾Co-Orientadora/Departamento Bioquímica/UFPE; ⁽⁷⁾Co-Orientadora/DMFA/UFRPE; ⁽⁸⁾Orientadora/DMFA/UFRPE. ⁽⁹⁾Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA

Introdução

A pele é um importante órgão de proteção contra lesões externas. No tratamento de feridas, podem ser usados normalmente uma variedade de substitutos de pele, inclusive vários revestimentos sintéticos e naturais. Seu principal efeito é promover a cicatrização, favorecendo a produção de várias citocinas, as quais promovem a cicatrização por estimular a produção de componentes na membrana basal, prevenir a desidratação e a inflamação, e promover a formação de tecido de granulação, representando um importante papel na geração do novo tecido (Lee et al., 2003).

A degradação proteolítica da Matriz Extracelular (MEC) pelas proteases é um dos passos para a reparação e remodelação que ocorrem geralmente através da ação da protease metaloproteinase de matriz (MMP), implicando na renovação da MEC, bem como na ativação de fatores de crescimento latentes, migração celular, angiogênese e cicatrização (Pragapati et al., 2000).

Existe evidência que certas proteases, como a trombina e a tripsina, podem regular células alvo pela clivagem e ativação de receptores ativadores de proteases acoplados a uma família de proteína G (PARs) aos quais tem sido implicado um papel no sistema de inflamação, sendo sugerido que podem contribuir para a defesa do corpo em resposta a injúria ou invasão patogênica (Vergnolle et al., 2001).

A utilização de polissacarídeos com fins medicinais é antiga. Pesquisas têm sido realizadas no sentido de explorar as atividades inerentes aos biopolímeros com ação cicatrizante. Entre os polissacarídeos biologicamente ativos, a molécula obtida da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios auxiliando o processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos (Paiva, 2003).

Este trabalho objetivou desenvolver uma membrana composta por polissacarídeo extraído

da goma do *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU), com tripsina imobilizada.

Material e Métodos

A goma do *Anacardium occidentale* L. foi coletada na Praia de Tamandaré, litoral sul do Estado de Pernambuco. O polissacarídeo da goma do cajueiro (POLICAJU), isento de impurezas, foi obtido de acordo com o método de Millas et al. (1991).

As membranas do polissacarídeo do *Anacardium occidentale* foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Carneiro-da-Cunha et al. (1999), modificada, em que uma solução de POLICAJU 5% (p/v) foi preparada em ácido acético 0,4M, sob agitação constante, a 25°C, durante 24h. Após esse período, o pH da solução foi ajustado para 5,0 e foi acrescentada tripsina (1mg/ml) comercial (Sigma), mantendo-se a solução sob agitação constante por 3h. A solução foi, então, vertida sobre uma placa de Petri contendo celulose, sendo mantida em estufa a 60°C até total secagem. O ensaio de liberação de tripsina *in vitro* foi realizado através da submersão de fragmentos de 1cm² da membrana celulose-POLICAJU em solução tampão citrato-fosfato 0,2M, pH 5,0, sendo o sobrenadante coletado a cada 24h para determinação da atividade enzimática e concentração protéica, determinadas de acordo com Leighton (1973) e Bradford (1976), respectivamente.

Resultados e Discussão

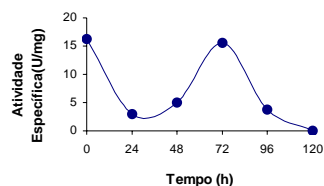
Uma fina película de POLICAJU com tripsina enclausurada foi formada sobre o suporte celulósico após total secagem em estufa a 60°C (Figura 1a).

Os ensaios de atividade proteásica e concentração protéica demonstraram que a tripsina foi liberada do filme de POLICAJU em

duas etapas. Nas primeiras 24h foi provavelmente liberada a tripsina adsorvida sobre o filme polimérico. A tripsina enclausurada no POLICAJU foi liberada por cerca de 120h, apresentando um pico de liberação máximo às 72h do experimento (Figura 1b).



(a)



(b)

Figura 1- a) Membrana de celulose-POLICAJU com tripsina imobilizada. b) Cinética de liberação de tripsina da membrana de celulose-POLICAJU.

O uso de polissacarídeos como biomaterial é vantajoso, uma vez que tais substâncias apresentam livre administração, simplicidade de operação, evita o uso de antibióticos para animais e diminui os custos de produtos (Shigemasa & Minami, 1995).

Sistemas de liberação programada de um agente através de um meio específico por um período prolongado é criado com o objetivo de se atingir uma ótima resposta, mínimos efeitos colaterais e eficácia controlada da droga a ser utilizada. Essas formas de dosagem com liberação controlada aumentam a segurança e eficácia da terapia regulando a taxa de liberação e reduzindo a frequência de administração do produto (Kumar, 2000).

Conclusão

As membranas de celulose-POLICAJU constituem materiais poliméricos capazes de enclausurar tripsina conservando a sua atividade catalítica e liberando-a lentamente, podendo ser utilizadas com um sistema de liberação de drogas. Assim, essas membranas podem ser testadas como possíveis aceleradores do processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos e cães.

Referências Bibliográficas

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. **Analytical Biochemistry** v.72, p. 248-254, 1976.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; ROCHA, J.M.S.; GARCIA, F.A.P.; GIL, M.H. Lipase immobilisation on to polymeric membranes. **Biotechnology Techniques** v.13, p. 403-409, 1999.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**. v. 17, n.17, p. 561-594, 2000.

LEE, S.B.; JEON, H.W.; LEE, Y.W.; LEE, Y.M.; SONG, K.W.; PARK, M.H.; NAM, Y.S.; AHN, H.C. Bioartificial skin composed of gelatin and (1-3), (1-6)- glucan **Biomaterials** v. 24, n.14, p. 2503-2511, 2003.

LEIGHTON, T.J.; DOR, R.H. The relationship of serine proteases activity to RNA polymerase Modification and Sporulation in *Bacillus subtilis* **Journal of Molecular Biology** v. 76, p.103-122, 1973.

MILLAS, M.; GROOTE, R.A.M.C.; CURVELLO, A. A. S. **Polieletrólitos**. São Carlos: USP, 1991.

PAIVA, M.G. **Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em cicatrização experimental**. 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2003.

PRAGAPATI, R.T.; CHAVALLY-MISS, B.; HERBAGE, D.; EASTWOOD, M.; BROWN, R.A. Mechanical loading regulates proteases production by fibroblasts in three-dimensional collagen substrates. **Wound Repair and Regeneration**. v.8, p. 226-237, 2000.

SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**., v. 13, p. 383-420, 1995.

VERGNOLLE, N.; WALLACE, J.L.; BUNNETT, N.W.; HOLLENBERG, M.D. Protease-activated receptors in inflammation, neural signaling and pain. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.22. n.3, p. 146-152, 2001.

AValiação DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO FILME POLIMÉRICO PRODUZIDO COM O POLISSACARÍDEO OBTIDO DA GOMA DO *Anacardium occidentale* L.⁽¹⁾

Flaviane Maria Florêncio Monteiro¹; Flávio Oliveira Silva²; Giuliana Viegas Schirato³; Germana Michelle Silva⁴, Joana Paula Firmino de Araújo⁴, Juciene Bezerra Rodrigues da Silva⁴; José Luiz de Lima Filho⁵; Maria das Graças Carneiro da Cunha⁶; Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão⁷; Ana Lúcia Figueiredo Porto⁸.

Introdução

A cicatrização é um processo biológico dinâmico de reparação de lesões que compreende as fases inflamatórias, proliferativas e de maturação. Fatores locais (sangramento, tensão de oxigênio), além de fatores extrínsecos (técnica cirúrgica, anti-sépticos tópicos e curativos) podem interferir neste processo, comprometendo seu resultado final (Araújo et al., 1998). Assim, a evolução do processo cicatricial envolve uma série de eventos que, em conjunto, representam uma tentativa de manter a estrutura anatômica e a função normal da região (Coelho, 2001). Feridas abertas, que cicatrizam por segunda intenção produzem um tecido cicatricial que permite sua quantificação. Elas permitem o estudo do colágeno, glicosaminoglicanos, células inflamatórias e tecido de granulação. Além disso, esses componentes podem ser avaliados quando se quer saber a influência de drogas de ação tópica. Este tipo de ferida também permite o estudo de contração da lesão (Araújo et al., 1998). Sinais flogísticos (edema, hiperemia, presença de exsudato e formação de crosta) característicos do processo cicatricial podem ser avaliadas clinicamente através de observações macroscópicas das lesões. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito de curativos contendo filme com POLICAJU sobre o processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos.

Material e Métodos

O POLICAJU foi obtido de acordo com o método de Millas et al (1991). As membranas foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Carneiro-da-Cunha et al (1999), modificada, onde uma solução de POLICAJU 10% (p/v) foi preparada em ácido acético 0,7M, sob agitação constante durante 16 horas a 25°C, e seu pH ajustado para 5,0 com solução de NaOH 3M. A solução foi então adicionada a fragmentos de celulose (1cm²), para a formação do biofilme, sendo mantidos em estufa a 50°C até secagem total. Camundongos Albinos suíços fêmeas, com 12 a 13 semanas de vida pesando 35,0 ± 5,0g foram submetidos à ressecção cirúrgica de um fragmento de pele de aproximadamente 1,0 cm² da região dorsal. As feridas do grupo controle (C) foram cobertas com curativos impregnados com Acido acético 0,7M e nas lesões do grupo Teste (T) foram aplicados curativos contendo o filme POLICAJU 10%. Estas lesões foram analisadas diariamente durante o período pós-operatório, avaliando-se os aspectos clínicos, a área das lesões e o percentual de contração. As bordas das lesões foram medidas empregando-se régua milimetrada (paquímetro) no T₀ (ao realizar a falha cutânea), e nos dias 2, 7 e 12 do pós-operatório. A contração da lesão foi determinada através do cálculo da área da ferida, utilizando-se da equação matemática descrita por Prata et al. (1988): $A = \pi \cdot R \cdot r$. O cálculo do grau de contração da ferida foi expresso em percentual, assim como o índice de cicatrização utilizando-se as equações matemáticas propostas por Ramsey et al. (1995): $100 \times (W_o - W_i) / W_o = M \pm DP$, onde W_o = área inicial da ferida; W_i = área da ferida no dia da biópsia (2^a, 7^a, e 12^a dias).

Resultados e Discussão

A avaliação clínica dos sinais flogísticos (edema, presença de exsudato e formação de crosta), durante o período de 12 dias, do grupo controle (Figura 1) e experimental (Figura 2) revelou a persistência de edema no grupo T até o 10^o dia de avaliação, havendo uma diminuição progressiva do edema do 7^o ao 10^o dia; no entanto, no grupo C o edema persistiu até o 12^o dia. Foi evidenciado o aparecimento de crosta no 2^o dia em 100% dos animais do grupo C e no 3^o dia no grupo T, as quais começaram a desprender a partir do 8^o dia de observação em ambos os grupos, período no qual foi melhor visualizado também o tecido de granulação. Secreções serosanguinolentas foram observadas até o 7^o dia de pós-operatório, em ambos os grupos com valores percentuais de 10,0 % no grupo C e 8,3% no T, não sendo visualmente detectado indício de contaminação das lesões com agentes patógenos no período observado. Paiva (2003) realizou avaliação clínica de camundongos tratados

¹ Doutoranda / Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

² Mestrando/ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

³ Mestranda/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas/ CCB/ UFPE

⁴ Estagiária/ LIKA/ UFPE

⁵ Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA/UFPE

⁶ Co-orientadora / Departamento de Bioquímica /UFPE

⁷ Co-orientadora / Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

⁸ Orientadora / Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

com emulsões formuladas com o POLICAJU nas concentrações 75, 150 e 214,3 mg/ml e ácido ascórbico. Esta observou sinais flogísticos mais intensos nos grupos controle e POLICAJU 75mg/ml. Schirato (2003), testando a emulsão de POLICAJU na concentração de 150 mg/mL, durante a fase inflamatória, observou que os sinais flogísticos eram menos intensos nos grupos tratados com exceção do edema que foi menor no grupo controle até o 3º dia de observação. Esses resultados clínicos comparados à aplicação tópica de curativos contendo filme com POLICAJU 10%, demonstra uma minimização dos sinais flogísticos do processo cicatricial. A análise morfométrica das feridas nos dias 0, 2, 7 e 12 do pós-operatório mostrou não haver diferenças nas área das feridas e nos % de contração dos tratados em relação aos controles (Figuras 3 e 4). No entanto, foi possível observar que houve a manutenção das área das feridas até o 7º dia, a partir do qual, observou-se uma grande diminuição dessas áreas. A análise desses dados, no 12º dia, revelou uma parcial reepitelização das feridas em ambos os grupos. Resultados semelhante foram obtidos por Schirato (2003).

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram a possível utilização clínica do filme do POLICAJU no processo cicatricial de lesões cutâneas.

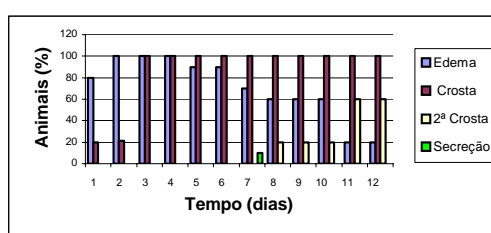


Figura 1: Análise percentual dos sinais flogísticos (edema, presença de exsudato e formação de crosta), durante o período de 12 dias, no grupo Controle.

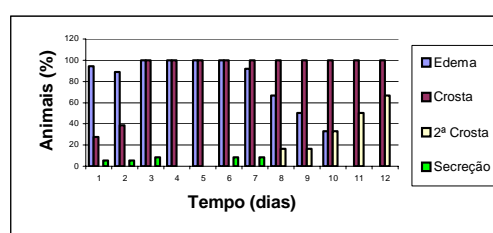


Figura 2: Análise percentual dos sinais flogísticos (edema, presença de exsudato e formação de crosta), durante o período de 12 dias, no grupo Teste.

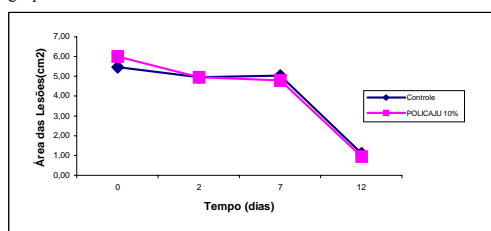


Figura 3: Área média das feridas experimentais dos grupos C e T

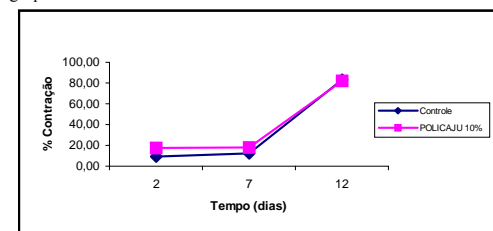


Figura 4: Percentual médio das feridas experimentais dos grupos C e T

Referências Bibliográficas

ARAÚJO, C.F.R.; SOUZA FILHO, Z.A. de; GRECA, F.H.; GUERREIRO, M.M.C.P.M.; LEITE, L.A.; MANSUR, A.E.C.; KANTOR, D.C.; NASSIF, A.E. Efeitos do Agarol® e do Trigliceril® sobre a cicatrização de pele, estudo experimental em ratos. *Acta Cir. Bras.*, v.13, n.4, p.232 – 237, 1998.

COELHO, COC, CARRAZONI, PG, MONTEIRO, VLC, MELO FAD, MOTA A, Filho FT. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cir Bras* 2001; 17 (supl. 1):11-13.

PAIVA, M.G. **Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em cicatrização experimental.** 2003. 56p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2003.

PRATA, M.; HADDAD, C.; GOLDENBERG, S. Uso tópico do açúcar em feridas cutâneas, estudo experimental em ratos, *Acta. Cir. Bras.*, v.3, n. 2, p. 43 - 48, 1988.

RAMSEY, D. T., POPE, E. R., WAGNER-MANN, C., BERG, J. N., SWAIM, S. F. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. *American journal of veterinary research*, v.56, n.7, p. 941-949, 1995.

SCHIRATO, G.V. **Efeito do polissacarídeo da goma de *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos.** 2003. 63p. Monografia/Estágio Supervisionado Obrigatório (Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2003.

AValiação *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS NA CONFEÇÃO DE CURATIVOS DÉRMICOS TESTADOS COMO AGENTES CICATRIZANTES

Flaviane Maria Florêncio Monteiro¹; Flávio Oliveira Silva²; Giuliana Viegas Schirato³; Germana Michelle Silva⁴, Joana Paula Firmino de Araújo⁴, Juciene Bezerra Rodrigues da Silva⁴, José Luiz de Lima Filho⁵; Maria das Graças Carneiro da Cunha⁶; Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão⁷; Ana Lúcia Figueiredo Porto⁸.

Introdução

A cicatrização é um processo biológico dinâmico de reparação de lesões que objetiva restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido lesado. O organismo pode sofrer injúrias causadas por agentes físicos, químicos ou por outros organismos, como vírus, bactérias, fungos e protozoários, podendo interferir no processo cicatricial (CALVIN, 1998). Na reabilitação de lesões podemos utilizar biomateriais, que é um material interativo apresentando afinidade apropriada com o tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa do hospedeiro. Os biomateriais são objeto de pesquisa científica pela disponibilidade na natureza e sua biodegradabilidade, e muitos podem ser conformados para utilização como dispositivos dérmicos impregnados ou não com princípios ativos com objetivo de repor tecidos doentes, lesados ou ausentes congenitamente, ou ainda, restaurar a função tecidual (Spector, 2001). O heteropolissacarídeo proveniente de *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) vem sendo utilizado em diversas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios em relação ao processo cicatricial em camundongos (Schirato et al., 2003; Paiva, 2003). O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das soluções de POLICAJU e tripsina, solubilizadas em ácido acético, utilizadas na preparação de curativos aplicados como agentes cicatrizantes de lesões experimentais em camundongos.

Material e Métodos

A goma de *A. occidentale* L. foi coletada na Praia de Tamandaré, litoral sul do Estado de Pernambuco. O POLICAJU foi obtido de acordo com o método de Millas et al. (1991). As soluções utilizadas foram respectivamente: C1 (Ácido acético 0,7M); C2 (ácido acético 0,7M/ tripsina 1mg/ml); solução padrão N (Nitrofurazona 0,2%), T1 (POLICAJU 10% /ac acético 0,7M); T2 (POLICAJU 10%/tripsina 1mg/ml). A solução de POLICAJU 10% (p/v) foi preparada em ácido acético 0,7M, sob agitação constante durante 16 horas a 25°C, e seu pH ajustado para 5,0 com solução de NaOH 3M. Às soluções C2 e T2 foi adicionado 1mg/ml de tripsina comercial (Sigma), mantendo-se a solução sob agitação constante por mais 1h. O método Grove e Randall (1995) foi empregado para determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*. Bactérias dos gêneros *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e *Streptococcus* sp. cresceram em caldo nutriente, em um agitador orbital (150 rpm) à temperatura 37°C por 24h. O inoculo inicial de todos os microrganismos testes foi padronizado de modo a iniciar com a leitura de D.O. (600nm) igual a 0,5, os quais foram homogeneizados em meio de cultura (Agar nutriente) e distribuído em placas de Petri (10ml). Após solidificação, foram feitos poços de 0,7 cm no meio de cultura com auxílio de um perfurador esterilizado onde foram colocados 20 µl das soluções Controle: C1 e C2; solução padrão, e Testes: T1 e T2. As placas foram incubadas durante 24h em estufa microbiológica a 37°C e após este período a avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através da medição do halo de inibição nos tempos de 24h, 48h e 72h.

Resultados e Discussão

As placas contendo as soluções C2, T1 e T2 não apresentaram formação de halo de inibição. No entanto, as placas contendo a solução C1 apresentaram um discreto halo, com um diâmetro de 1,0 cm. A nitrofurazona apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias dos gêneros *E. coli* (1,19cm) e *Bacillus* sp (1,97cm) após 24 horas. Monteiro et al., 2003 também testaram emulsões obtidas com o POLICAJU e ácido ascórbico com concentrações finais de 75, 150 e 214,3 mg/ml de POLICAJU, as quais não apresentaram atividade antimicrobiana frente bactérias dos gêneros *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp.. A avaliação microbiológica *in vivo*, da emulsão de POLICAJU e ácido ascórbico, em dose única de 150mg/ml, sobre a evolução da fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos foi realizada por

¹ Doutoranda / Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

² Mestrando/ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

³ Mestranda/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas/ CCB/ UFPE

⁴ Estagiaria/ LIKA/ UFPE

⁵ Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA/UFPE

⁶ Co-orientadora / Departamento de Bioquímica /UFPE

⁷ Co-orientadora / Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

⁸ Orientadora / Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias/ DMV /UFRPE.

Schirato (2003). Neste estudo foi evidenciada ausência de microorganismos patógenos, sendo isolado das lesões apenas bactérias pertencentes à flora normal, observando-se menor contaminação das feridas tratadas em relação aos grupos controle, os quais receberam soluções de NaCl (150mM) e Ácido Ascórbico (75 mg/ml). Resultados semelhantes foram obtidos por Monteiro (2003), em feridas de caprinos tratados com o POLICAJU. Contudo, este observou que nos animais tratados com o POLICAJU formava-se uma película sobre a ferida. Este fato pode explicar as diferenças nos resultados *in vivo* e *in vitro* frente à droga testada, uma vez que a película de POLICAJU pode estar formando uma barreira física protetora dificultando a contaminação das feridas com agentes patógenos. A atividade antimicrobiana da solução de 20mg/ml do extrato da casca do *A. occidentale* foi testada por Akinpelu (2001), o qual evidenciou largo espectro de atividade antimicrobiana sobre as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomona*, *Shigella* e *Staphylococcus*. A diferença entre a atividade antimicrobiana do POLICAJU e dos extratos da casca do *Anacardium occidentale* pode estar relacionada à variedade do cajueiro utilizado, a época da colheita da casca, ou ainda estar relacionada com a parte da planta utilizada, este comportamento pode ser explicado uma vez que o extrato é composto por diferentes substâncias químicas. A atividade antimicrobiana dos ácidos anacárdicos do óleo da casca da castanha de caju (CNSL) *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) foi estudada por Lima et. Al., (2000), sobre os microorganismos da cavidade bucal *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Candida utilis*. Os ácidos anacárdicos obtidos dos extratos etílicos do CNSL apresentaram atividade antibacteriana contra os microorganismos citados, porém a maior atividade inibitória ocorreu sobre a bactéria Gram positiva *Streptococcus mutans*, considerada predominante na cárie dentária. Segundo dados da literatura, estes pesquisadores relatam que os ácidos anacárdicos apresentam potente atividade antibacteriana sobre bactérias Gram positiva, principalmente *Streptococcus mutans*, maior do que em bactérias Gram negativas. Este fator pode estar relacionado aos ácidos anacárdicos poderem apresentar uma maior ou menor dificuldade em penetrar na membrana das células dos diferentes microorganismos.

Conclusões

As soluções de POLICAJU e tripsina, solubilizadas em ácido acético e utilizadas no preparo de curativos dérmicos, não apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* frente às bactérias dos gêneros testados.

Referências Bibliográficas

- AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**, v. 72, p. 286 - 287, 2001.
- CALVIN, M. Cutaneous wound repair. **Journal of Public Health Management.**, v. 10, n. 1, p. 12-32, 1998.
- GROVE, D.C.; RANDDAL, W. **Medical Enciclopedia**, p. 76-81, 1995.
- LIMA, C.A.A.; PASTORE, G.M.; LIMA, E.D.P.A. Estudo da Atividade Antimicrobiana dos Ácidos Anacárdicos do Óleo da Casca da Castanha de Caju (CNSL) dos clones de Cajueiro-Anão-Precoce CCP-76 e CCP-09 em cinco Estágios de Maturação sobre Microorganismos da Cavidade Bucal. **Ciênc. Technol. Aliment.** v.20 n.3, p. 358-362 2000.
- MILLAS, M.; GROOTE, R.A.M.C.; CURVELLO, A.A.S. **Polieletrólitos**. São Carlos: USP, 1991. b) RINAUDO, M., Comunicação pessoal.
- MONTEIRO, FMF.; SILVA, F.O.; PAIVA, M.G.; SCHIRATO, G.V.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A; PORTO, A.L.F. **Avaliação In Vitro da Atividade Antimicrobiana de diferentes concentrações do Polissacarídeo obtido da Goma do *Anacardium occidentale* L.** IV Simpósio de Pesquisa e Pós-graduação, dez. 2003, UFRPE.
- MONTEIRO, V.L.C. **Reparação Tecidual de Feridas cutâneas de caprinos tratados com polissacarídeo do cajueiro *Anacardium occidentale* L. Estudo Clínico, Bacteriológico e Histopatológico.** 2003. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2003.
- PAIVA, M.G. **Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) em cicatrização experimental.** 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- SCHIRATO, G.V. **Efeito do polissacarídeo da goma de *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos.** ESO, UFRPE, Recife. 2003.
- SPECTOR, M. **Biomaterials**. In: **Plastic Surgery: Indications, Operations, Outcomes.** Achauer B, Eriksson E, Guyuron B, et al. Mosby Year Book, Inc. St.Louis, 2000. Cap. 19, p 239-259.

O polissacarídeo de *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas

The polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing.

Giuliana Viegas Schirato¹ Flaviane Maria Florêncio Monteiro² Flávio de Oliveira Silva²
José Luis de Lima Filho³ Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão⁴
Ana Lúcia Figueiredo Porto⁴

RESUMO

O efeito do polissacarídeo de *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) foi avaliado na fase inflamatória do processo cicatricial em camundongos (*Mus musculus*) Swiss (n=90), organizados de acordo com o tratamento empregado: Grupo I (NaCl 150mM), Grupo II (ácido ascórbico 75mg.ml⁻¹) e Grupo III (emulsão contendo POLICAJU 150mg.ml⁻¹ preparado em ácido ascórbico 75mg.ml⁻¹). As lesões cutâneas foram realizadas assepticamente na região torácica dorsal e cada ferida foi tratada em dose única (200µl) imediatamente após a cirurgia. As feridas foram avaliadas diariamente sob o ponto de vista clínico e histopatológico até o 6º dia de pós-operatório (PO). No 5º dia PO, observou-se um menor percentual de edema e hiperemia no Grupo III em relação aos grupos controle, ao passo que os valores de área da ferida e do percentual de contração não foram estatisticamente significativos. A avaliação histopatológica do grupo tratado com POLICAJU demonstrou a presença de tecido de granulação fibrovascular no 6º dia PO, enquanto os grupos controle apresentavam tecido de granulação com padrão vascular. O tratamento proposto propiciou sinais flogísticos menos acentuados (edema e hiperemia) durante o período inflamatório, compatível com o processo de reparação mais avançado do ponto de vista histopatológico, sugerindo a possível utilização clínica da emulsão contendo POLICAJU.

Palavras-chave: cicatrização, inflamação, biomateriais, polissacarídeo, *Anacardium occidentale* L., goma do cajueiro.

ABSTRACT

The effect of the polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. gum (POLICAJU) was evaluated in the

inflammatory phase of the wound healing in Swiss mice (*Mus musculus*) (n=90), divided according to the employed treatment: Group I (NaCl 150mM), Group II (75mg.ml⁻¹ ascorbic acid) and Group III (emulsion containing 150mg.ml⁻¹ POLICAJU prepared in 75mg.ml⁻¹ ascorbic acid). An aseptic wound was produced in the dorsal thoracic area and each wound was treated in a single dose (200µl) soon after the accomplishment of the lesions. Daily, the wounds were submitted to the clinical and histopathological evaluation until the 6th day of postoperative (PO). In the 5th day PO, the Group III presented the signs oedema and hyperemia, in smaller percentile than the control groups. The results of area of the wound and percentile of contraction didn't obtain statistical significance. The histopathological evaluation revealed, in the 6th day PO, that the Group III presented fibrovascular granulation tissue, while the control groups presented vascular granulation tissue. The use of POLICAJU propitiated to the animals of the treated group inflammatory signs less accentuated (oedema and hyperemia) in the inflammatory period, compatible with the normal wound healing process under the point of view histopathological, suggesting the possible clinical employment of the POLICAJU emulsion.

Key words: wound healing, inflammation, biomaterials, polysaccharide, *Anacardium occidentale* L., cashew gum.

INTRODUÇÃO

O processo cicatricial envolve uma complexa seqüência de eventos celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade tecidual após o trauma. Este processo caracteriza-se pela homeostase,

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

³Departamento de Bioquímica/ Laboratório Imunopatologia Keizo Asami - LIKA (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (UFRPE). Rua Dom Manoel de Medeiros s/n - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil. CEP 52171-900. E - mail: analuporto@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

inflamação, formação de tecido de granulação, reepitelização e remodelação da matriz extracelular. Durante a fase inflamatória, são observados infiltrados celulares (neutrófilos, linfócitos e macrófagos), cuja participação é fundamental para regular o processo de reparação, pois secretam citocinas, linfocinas e fatores de crescimento, que atuam como sinalizadores moleculares. Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas, aparecendo aproximadamente 24 horas após a lesão, com funções de fagocitose e debridamento de tecidos necrosados, para minimizar a possibilidade de infecção ocasionada por patógenos (STEENKAMP, et al., 2004; PARK & BARBUL, 2004).

Os macrófagos migram ao local da ferida em cerca de 48 a 96 horas, tornando-se a população celular predominante antes da migração e proliferação dos fibroblastos. Sua ação antimicrobiana ocorre devido à geração de radicais reativos, como óxido nítrico e peróxido de oxigênio. Uma importante contribuição dos macrófagos para o processo cicatricial é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, os quais ativam e recrutam outras células envolvidas no processo cicatricial (outros macrófagos e linfócitos), regulam a quimiotaxia e a proliferação de fibroblastos, a síntese de colágeno, além da migração e replicação das células endoteliais, também envolvidas no processo de reparação tecidual (STEENKAMP, et al., 2004; PARK & BARBUL, 2004).

Para otimizar a reabilitação de lesões, pode-se utilizar biomateriais, compreendidos como materiais interativos capazes de estabelecer uma afinidade apropriada com o tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa do hospedeiro (RATNER & BRYANT, 2004). Os polissacarídeos estimulam o sistema imune *in vitro* e *in vivo* e contribuem favoravelmente no processo cicatricial, podendo ser utilizados como biomateriais (DIALLO, et al., 2001; UENO, et al., 2001; KWEON, et al., 2003; SENEL & McCLURE, 2004). O heteropolissacarídeo proveniente da goma do *Anacardium occidentale* L. (POLICAJU) vem sendo utilizado em diversas pesquisas e tem apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, potencializando, em estudos preliminares, o processo de cicatrização de lesões cutâneas em camundongos (SCHIRATO et al., 2003; PAIVA, 2003).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento tópico de lesões cutâneas, em dose única, utilizando-se a emulsão contendo POLICAJU na evolução da fase inflamatória do processo cicatricial cutâneo, do ponto de vista clínico e histopatológico.

MATERIAL E MÉTODOS

A goma de *Anacardium occidentale* L. foi coletada no litoral sul do Estado de Pernambuco (Praia de Tamandaré), Brasil. O POLICAJU foi obtido de acordo

com o método de MENESTRINA et al. (1998). A emulsão foi formulada adicionando-se ácido ascórbico (1500mg) e POLICAJU (3000mg) à água destilada estéril (10ml) e mantida sob agitação até completa solubilização. O pH da emulsão foi ajustado em pH 5,0 adicionando-se NaOH 1N. O volume final foi aferido, obtendo a emulsão de concentração final de 150mg.ml⁻¹ de POLICAJU.

Este estudo foi conduzido de acordo com as normas preconizadas pelo Canadian Council Animal Care (CCAC) e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização Animal do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Foram utilizados 90 camundongos (*Mus musculus*) *Swiss*, fêmeas, com 8 a 10 semanas de vida e pesando 30,0 ± 5,0g, procedentes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE), onde os mesmos foram mantidos e acompanhados durante os 6 dias de experimento em ambiente com temperatura, umidade e luminosidade controlados. Os animais foram alimentados com ração específica para roedores e água *ad libitum*.

Para realização do procedimento cirúrgico experimental, os camundongos foram previamente anestesiados com cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de cetamina 10% (10mg.Kg⁻¹ e 115mg.Kg⁻¹, respectivamente), por via subcutânea (HALL & CLARKE, 1991). Após a anestesia, realizaram-se a tricotomia e a anti-sepsia da região dorsal torácica com iodopovidona e solução salina estéril NaCl 150 mM. A pele foi demarcada usando-se um molde de papel adesivo (1cm²), previamente esterilizado e a ferida cutânea asséptica foi produzida por incisão da pele com lâmina de bisturi número 15 e a divulsão da tela subcutânea foi realizada com tesoura de pontas tipo romba/romba e pinça de dissecação, até sua total ressecção.

Após a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram aleatoriamente organizados em grupos (n = 30/grupo), de acordo com o tratamento: Grupo I (NaCl 150 mM), Grupo II (ácido ascórbico 75mg.ml⁻¹) e Grupo III (emulsão contendo POLICAJU 150mg.ml⁻¹). Imediatamente após a cirurgia cada ferida de cada grupo foi tratada, com aplicação tópica, em dose única de 200 µl da substância de acordo com o grupo, e o processo cicatricial ocorreu por segunda intenção.

As feridas foram avaliadas diariamente até o 6º dia de pós-operatório (PO) sob o ponto de vista clínico, evidenciando-se os sinais flogísticos edema, hiperemia, presença de crosta e exsudato, além da mensuração da área, com auxílio de um paquímetro. A contração da lesão foi avaliada através do cálculo da área da ferida, utilizando-se da equação descrita por PRATA et al. (1988): A = p. R. r, onde "A" representa a área, "R" o raio maior e "r" o raio menor da ferida. O

cálculo do grau de contração da ferida foi expresso como percentual, assim como o índice de cicatrização, utilizando-se as equações propostas por RAMSEY et al. (1995): $100 \times (W_0 - W_i)/W_0 = M \pm DP$, onde W_0 = área inicial da ferida; W_i = área da ferida no dia da biópsia (1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a e 6^a dias).

Para realização de estudo histopatológico, os fragmentos de pele foram coletados diariamente e, a cada dia de biópsia, cinco animais foram retirados dos grupos experimentais e, posteriormente, submetidos à eutanásia por superdosagem com Pentobarbital sódico (200mg.Kg⁻¹), via intra-peritonial. As amostras foram submetidas ao processamento histopatológico, incluídas em parafina e, após microtomia, os cortes foram corados por Hematoxilina Eosina e, alternativamente, pelo Tricrômico de Masson (MICHALANY, 1990).

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão ($M \pm dp$), submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey, aceitando-se como estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lesões experimentais dos camundongos foram avaliadas do ponto de vista clínico ao longo de seis dias de experimento. A avaliação macroscópica das feridas permitiu evidenciar sinais flogísticos menos acentuados no grupo tratado quando comparados aos dos grupos controle. O edema, conseqüente ao acúmulo de fluido e proteínas plasmáticas no espaço extravascular em resposta à ação de citocinas, foi observado em todos os grupos estudados. Entretanto, a sua freqüência foi menor nas lesões tratadas com POLICAJU (33%), especialmente no 4^o dia de avaliação clínica, comparada aos Grupos I e II (86,67% e 86,67%, respectivamente). De forma semelhante, a hiperemia foi observada ao longo de todo o período avaliado. Vale ressaltar que, no 5^o e 6^o dias de pós-operatório, foi evidenciado um menor percentual no Grupo III (60% e 40%, respectivamente). No mesmo período, as lesões nos camundongos do Grupo I, tratadas com solução salina, apresentaram hiperemia em 100% deles.

A partir de 24 horas após a realização das lesões experimentais, 100% das feridas em todos os grupos apresentaram formação de crosta. No último dia de avaliação, observou-se desprendimento de crosta em 20% dos animais pertencentes ao Grupo I, porém as lesões não se encontravam reepitelizadas, o que não foi evidenciado nos demais grupos estudados. No processo de reparação tecidual, normalmente, ocorre desprendimento da crosta quando a cobertura epitelial

está completa. No caso do Grupo I, o desprendimento pode ser atribuído a algum fator extrínseco, já que não havia reepitelização completa do local da lesão.

As características exsudativas da fase inflamatória também foram acompanhadas durante o experimento. No 1^o dia de pós-operatório, observou-se exsudato de característica serosangüinolenta em 24,14%; 13,79% e 20% das feridas dos animais pertencentes aos Grupos I, II e III, respectivamente. As feridas tratadas com solução salina apresentaram exsudato em suas lesões ao longo dos primeiros cinco dias de pós-operatório. No entanto, no 6^o dia de pós-operatório, apenas 20% dos animais do Grupo II (tratado com ácido ascórbico) apresentaram este sinal flogístico. É importante ressaltar que não foi observada secreção purulenta em 100% das feridas estudadas, já que foram feridas limpas e realizadas cirurgicamente.

A utilização dos polissacarídeos como biomateriais é vantajosa, pois interferem favoravelmente na resposta imune, assim como no processo cicatricial. Quando a atividade antitumoral de polissacarídeos (α -glucana de *Ramalina celastri* nativa e sulfatada quimicamente) foi testada *in vivo* frente ao Sarcoma 180, observou-se que o esquema de tratamento em doses fracionadas por 10 dias causou perda da atividade biológica, por desenvolvimento de tolerância ao princípio ativo (STUELP-CAMPELO, et al., 2002). Por esta razão, optou-se por utilizar uma única aplicação da emulsão de POLICAJU. Deve-se ainda ressaltar que o polissacarídeo ácido obtido de *Vernonia kotschyana* possui efeito estimulante dose-dependente da fixação do complemento em humanos, além de possuir efeito mitogênico *in vitro* (NERGARD, et al., 2004). KWEON, et al. (2003) avaliando o efeito do tratamento com o complexo hidrossolúvel quitosana/heparina em feridas cutâneas em ratos, observaram que no 15^o dia de pós-operatório, as feridas estavam completamente cicatrizadas com aspecto similar à pele normal. Entre outros fatores, o efeito da quitosana pode ser atribuído à estimulação de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) que auxiliam no processo de reparação tecidual (UENO, et al., 2001). Foi relatado também que o polissacarídeo de *Angelica sinensis* possui efeito cicatrizante em úlceras gástricas experimentais em ratos Sprague-Dawley, além de possuir efeito estimulante *in vitro* de proliferação de células epiteliais gástricas (YE, et al., 2003).

Alguns polissacarídeos, como a quitina e a quitosana, vêm sendo utilizados com fins terapêuticos em medicina veterinária, pois atuam como agente cicatrizante, antimicrobiano e hemostático, além de possuir efeito analgésico (SENEL & McCLURE, 2004). Produtos obtidos do cajueiro (*Anacardium*

occidentale) são bastante populares na medicina popular, sendo amplamente empregado no tratamento de doenças inflamatórias na Nigéria, causando redução da síntese de prostaglandinas (90%) na vesícula seminal em bovinos (OLAJIDE et al., 2004).

Quanto à evolução da área das lesões (Figura 1), no 1º dia de pós-operatório, as feridas dos animais dos Grupos I, II e III apresentavam a área média de $2,29 \pm 0,41\text{cm}^2$; $2,32 \pm 0,56\text{cm}^2$ e $2,45 \pm 0,43\text{cm}^2$, respectivamente. Entre o 2º e 3º dias de pós-operatório, foi observado aumento da área das lesões dos animais pertencentes a todos os grupos, possivelmente devido ao aparecimento de crosta e edema. A partir do 4º dia, observou-se redução gradativa das áreas das lesões. No 6º dia de pós-operatório, a área média das lesões dos animais dos Grupos I, II e III foi respectivamente; $2,15 \pm 0,82\text{cm}^2$; $2,07 \pm 0,57\text{cm}^2$ e $2,14 \pm 0,48\text{cm}^2$.

Quando os percentuais de contração das lesões foram analisados, observa-se não haver contração nas feridas do Grupo I (solução salina) entre o 1º e 4º dias de pós-operatório. Nesse grupo, 5 e 6 dias após a realização das lesões, o percentual de contração

foi, respectivamente, 2,20% e 15,10%. Nas lesões tratadas com ácido ascórbico (Grupo II), até o 5º dia de pós-operatório, não ocorreu contração; apenas no 6º dia de experimento foi evidenciada contração neste grupo (7,15%). Quando as lesões foram tratadas com a emulsão de POLICAJU, observou-se contração nos 5º e 6º dias de experimento, apresentando percentuais de 5,41% e 15,56%, respectivamente.

Os resultados de área da ferida e percentual de contração obtidos neste experimento não foram estatisticamente significativos (teste de Tukey), em relação ao tratamento utilizado nos grupos experimentais, o que pode ser explicado pela contração da área do tecido de granulação, a qual ocorre, em parte, devido aos miofibroblastos, reduzindo assim o tamanho da área lesada. (STEVENS & LOWE, 1996). SCHIRATO et al. (2002) não verificaram diferenças significativas de área das feridas tratadas com a emulsão contendo diferentes concentrações de POLICAJU até o 7º dia de pós-operatório. Tal fenômeno é esperado, pois na fase inflamatória do processo cicatricial não ocorre redução significativa de área e do percentual de contração da

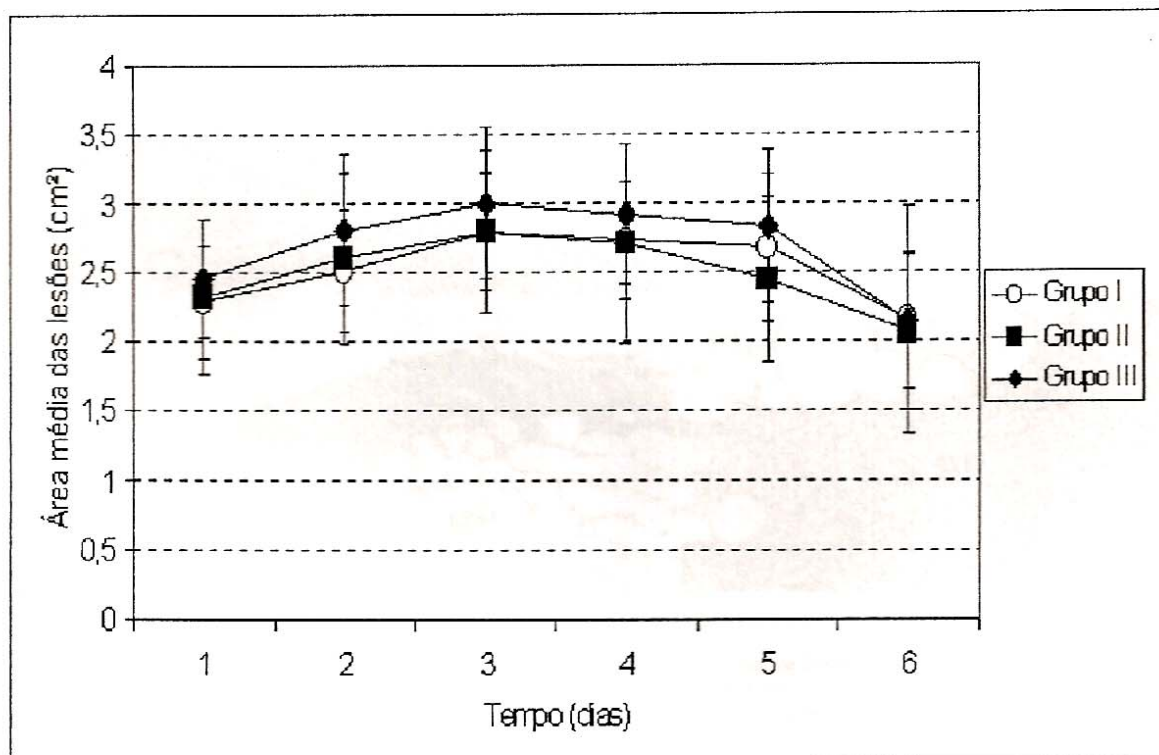


Figura 1 - Área média das feridas experimentais em camundongos dos grupos I (tratado com NaCl), II (tratado com ácido ascórbico 75 mg.ml⁻¹) e III (tratado com POLICAJU 150mg.ml⁻¹).

lesão, devido ao pequeno número de miofibroblastos no local da ferida.

O aspecto histopatológico das feridas foi semelhante em todos os grupos entre o 1º e 5º dias. O 1º dia foi caracterizado pela presença de infiltrados polimorfonucleares, ocorrência de angiogênese, além da existência de exsudato e da formação de crosta, ressaltando-se que as crostas dos animais tratados com a emulsão de POLICAJU eram mais delgadas se comparadas às crostas dos grupos controle (solução salina e ácido ascórbico) (Figuras 2A e 2B). No 2º dia

de pós-operatório (Figura 2C), evidenciou-se a presença de tecido de granulação vascular, presença de infiltrado de leucócitos polimorfonucleares, neovascularização e crosta. Entre o 3º e o 5º dias de pós-operatório, verificaram-se ainda inúmeros fibroblastos na derme e presença de neovascularização (Figura 2D).

As principais diferenças foram observadas no 6º dia quanto às características do tecido de granulação, o qual apresentava um padrão vascular nas feridas dos Grupos I e II. Nas feridas tratadas com emulsão contendo POLICAJU (Grupo III) observou-se a

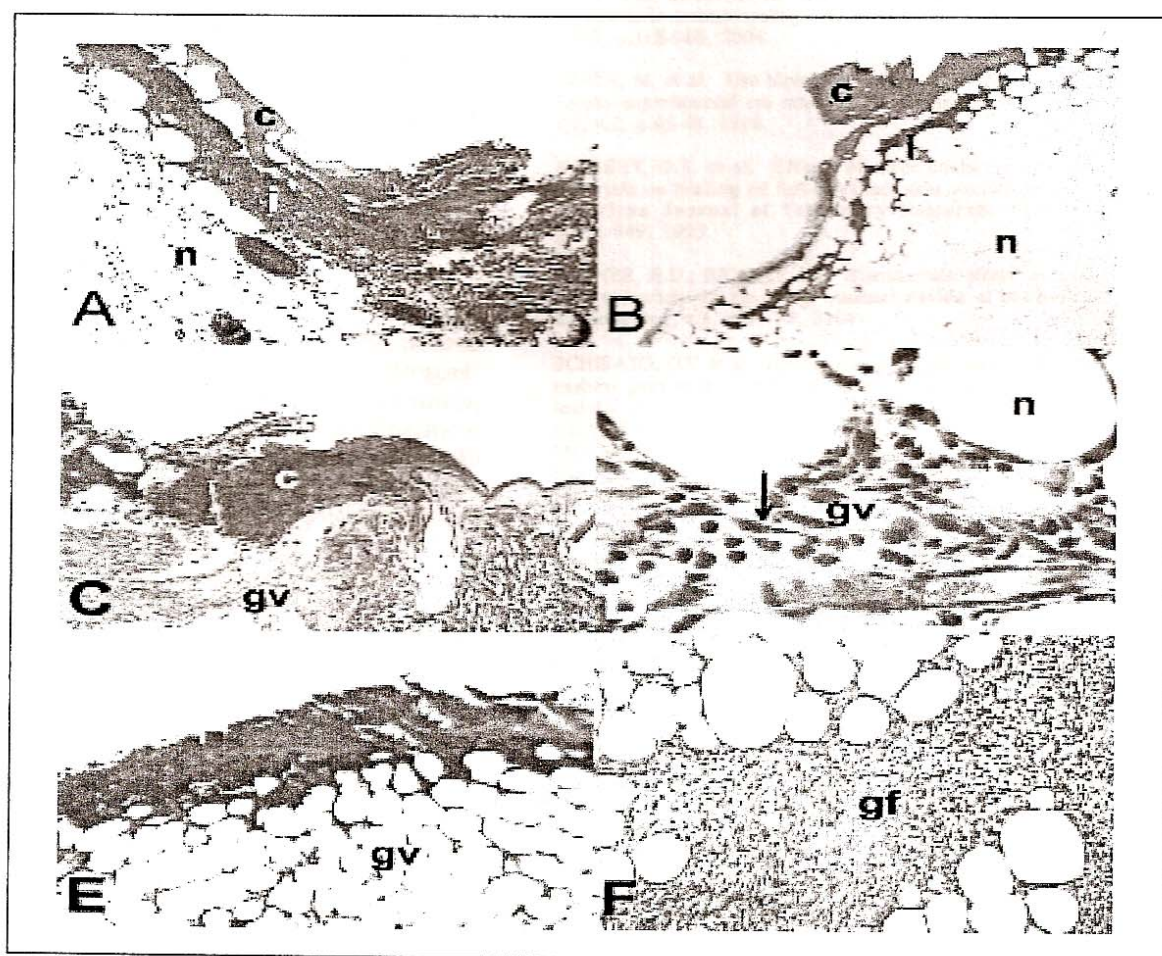


Figura 2 – Aspectos histopatológicos das feridas em camundongos. Tricrômico de Masson. A (100X), Grupo I (tratado com NaCl), 1º dia de pós-operatório (PO); B (40X), Grupo III (tratado com POLICAJU 150 mg.ml⁻¹), 1º dia de PO; C (100X), Grupo I, 2º dia de PO; D (400X), Grupo I, 3º dia de (PO); E (40X), Grupo II (tratado com ácido ascórbico 75 mg.ml⁻¹), 6º dia de PO e F (100X), Grupo III, 6º dia de PO. Percebe-se em A e B presença de neovascularização, crosta e infiltrado de leucócitos polimorfonucleares. Em C, há tecido de granulação de padrão vascular e crosta espessa. Em D e E evidencia-se tecido de granulação de padrão vascular, inúmeros fibroblastos na derme e neovascularização. Em F, nota-se presença de tecido de granulação fibrovascular, presença de trabéculas de tecido conjuntivo ocasionando áreas de tração no tecido. c - crosta; gv - tecido de granulação vascular; n - neovascularização; gf - tecido de granulação fibrovascular; i - infiltrado de leucócitos polimorfonucleares; → - fibroblasto.

existência de tecido de granulação fibrovascular e presença de trabéculas de tecido conjuntivo, ocasionando áreas de tensão no tecido (Figuras 2E e 2F).

PAIVA (2003), utilizando emulsões aplicadas de forma tópica, contendo diferentes concentrações de POLICAJU em lesões experimentais em camundongos, para avaliar a progressão do processo reparativo (até o 12º dia), evidenciou sinais flogísticos menos intensos nos grupos tratados comparados aos controles. No 7º dia de pós-operatório, também observou a presença de tecido de granulação de padrão fibrovascular e intensa angiogênese especialmente no grupo tratado com a emulsão contendo POLICAJU na concentração de 150 mg.ml⁻¹. No 12º dia de pós-operatório, foi observada a formação de tecido de granulação fibrovascular e a presença de tecido fibroso com pobre organização de fibras colágenas nos grupos tratados com solução salina e ácido ascórbico (controles). Já as feridas tratadas com a emulsão POLICAJU 150mg.ml⁻¹, demonstraram, neste período, tecido de granulação com fibras colágenas bem organizadas e total reepitelização.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a emulsão contendo POLICAJU 150mg.ml⁻¹ favorece a resolução do período inflamatório, considerando as características de sinais flogísticos menos intensos e a presença de tecido granulação fibrovascular e fibras colágenas, em relação aos grupos controle (tratados com NaCl e ácido ascórbico 75mg.ml⁻¹).

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento BNB, FACEPE, CNPq, FINEP e CAPES, pelo suporte financeiro.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PIBIC/ CNPq), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), por conceder a bolsa de iniciação científica a Giuliana Viegas Schirato no período de execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- DIALLO, D. et al. Polysaccharides from the roots of *Entada africana* Guill. et Perr., Mimosaceae, with complement fixing activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.74, p.159-171, 2001.
- HALL, L.W.; CLARKE, K.W. *Veterinary anaesthesia*. London: Ballière Tindall, 1991. 410p.
- KWEON, D.K. et al. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. *Biomaterials*, v.24, p.1595-1601, 2003.
- MENESTRINA, J.M. et al. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structure in gum of *Anacardium occidentale* L. *Phytochemistry*, v.47, p.714-721, 1998.
- MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica*. 2.ed. São Paulo: Michalany, 1990. 277p.
- NERGARD, C.S. et al. Isolation, partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *Journal of Ethnopharmacology*, v.91, p.141-152, 2004.
- OLAJIDE, O.A. et al. Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on *in vivo* inflammatory models. *Journal of Ethnopharmacology*, v.95, p.139-142, 2004.
- PAIVA, M.G. *Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (Anacardium occidentale L.) em cicatrização experimental*. 2003. 56f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco.
- PARK, J.E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American Journal of Surgery*, v.187, p.11S-16S, 2004.
- PRATA, M. et al. Uso tópico do açúcar em feridas cutâneas, estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.3, n.2, p.43-48, 1988.
- RAMSEY, D.T. et al. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.56, n.7, p.941-949, 1995.
- RATNER, B.D.; BRYANT, S.J. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v.6, p.41-75, 2004.
- SCHIRATO, G.V. et al. Application of the polysaccharide from cashew gum in the rehabilitation of experimental cutaneous lesions in mice. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLÓGICA MOLECULAR, 32., 2003, Caxambu, Minas Gerais. *Anais...* São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2003. p. 100.
- SCHIRATO, G.V. et al. Utilização do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) como biomaterial na reepitelização de lesões cutâneas experimentais em camundongos In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2., 2002, Recife, PE. *Anais...* Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2002. 1 CD.
- SENEL, S.; McCLURE, S.J. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.1467-1480, 2004.
- STEENKAMP, V. et al. Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, v.94, p.353-357, 2004.
- STEVENS, A.; LOWE, J. *Patologia*. São Paulo: Manole, 1996. 535p.
- STUELP-CAMPELO, P.M. et al. Effect of a soluble alfa-D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. *International Immunopharmacology*, v.2, p.691-698, 2002.
- UENO, H. et al. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.52, p.105-115, 2001.
- YE, Y.N. et al. Effect of polysaccharide from *Angelica sinensis* on gastric ulcer healing. *Life Sciences*, v.72, p.925-932, 2003.

11.APÊNDICES

Apêndice 01: Ficha de avaliação clínica.

