



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LARISSA CIAPPINA DE CAMARGO

**CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS E BIOACÚMULO DE PRATA
EM RATOS WISTAR TRATADOS TOPICAMENTE COM O
ANTIMICROBIANO NANOPARTÍCULA DE PRATA**

Londrina
2020

LARISSA CIAPPINA DE CAMARGO

**CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS E BIOACÚMULO DE PRATA
EM RATOS WISTAR TRATADOS TOPICAMENTE COM O
ANTIMICROBIANO NANOPARTÍCULA DE PRATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Katsuko Takayama Kobayashi.

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L323 Camargo, Larissa Ciappina.
Cicatrização de feridas e bioacúmulo de prata em ratos Wistar tratados topicamente com o antimicrobiano nanopartículas de prata biogênicas / Larissa Ciappina Camargo. - Londrina, 2020.
59 f.

Orientador: Renata Katsuko Takayama Kobayashi.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Nanopartícula - Tese. 2. Antimicrobiano - Tese. 3. Cicatrização - Tese. I. Katsuko Takayama Kobayashi, Renata. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

LARISSA CIAPPINA DE CAMARGO

**CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS E BIOACÚMULO DE PRATA
EM RATOS WISTAR TRATADOS TOPICAMENTE COM O
ANTIMICROBIANO NANOPARTÍCULA DE PRATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata K. T. Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Audrey A. Stinghen Garcia Lonni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2020.

“Faça aquilo que gosta, valorize aquilo que tem. Tudo flui na nossa vida quando há empenho.”

(André Suhanov)

AGRAECIMENTOS

À Deus, a quem devo minha vida e às grandes oportunidades, sem a Sua presença nada disso seria possível. Obrigada por sua proteção, por estar sempre comigo e permitir que eu tivesse força e coragem para enfrentar todos os desafios que encontrei no decorrer do caminho.

Aos meus pais, Celia e Carlos, por todo o apoio e suporte para que esse sonho pudesse ser realizado. Agradeço a vocês por me incentivarem a estudar e sempre apoiarem minhas decisões. A vocês minha eterna gratidão e amor!

Ao meu irmão, Lucas Ciappina, agradeço pelo apoio ao longo desta jornada. Você é uma pessoa maravilhosa, em quem confio plenamente e desejo toda a felicidade.

À professora Renata Kobayashi, minha orientadora, obrigada por confiar na minha capacidade e no meu trabalho. Por ter aberto as portas de seu laboratório e me acolhido desde o primeiro ano da minha graduação. Obrigada por compartilhar sua sabedoria e toda a sua história comigo. Você é inspiradora, um exemplo de profissional, agradeço a Deus por colocar você no meu caminho.

Ao professor Gerson Nakazato por compartilhar seu conhecimento e ajudar com o desenvolvimento desta dissertação. Obrigada por ser essa pessoa otimista e engraçada, que deixa nosso ambiente de trabalho tão divertido.

Aos professores, Fábio Goulart de Andrade, Audrey Alesandra Stinghen Garcia Lonni, Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia, Claudia Bueno dos Reis Martinez, pelo auxílio nos diversos experimentos apresentados nesta dissertação.

A todos amigos e companheiros do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da UEL (NIP3), em especial Sara Scandorieiro, Vanessa Koga, Heloisa Martins, Érica Peregrini e Giovana Nicolete, vocês são sensacionais!

Aos colegas da turma, por todas as experiências vividas e compartilhadas. Especialmente ao Guilherme Bartolomeu, Daniela Fernandes, Caroline Moreira e Giovana Nicolete pelas risadas e várias horas de convivência, sempre me ajudaram a superar os obstáculos da pós-graduação e da vida. Lembro que chegamos a pensar que esse sonho não seria possível.

Aos meus queridos amigos, Camila Orlandelli, Francine Aquino, Ivo Locateli, Bruna, Renato, Julia, Amanda, Guilherme e Luana. Obrigada pelas muitas

horas que passamos juntas, serão momentos compartilhados que vou levar comigo para o resto da vida.

Aos professores que me deram aula na pós-graduação e contribuíram muito para meu aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia pela oportunidade de trabalhar com excelentes profissionais, que sem dúvida alguma fazem efetivamente parte da minha formação.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio e suporte financeiro para realização deste estudo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho! Muito obrigada!

CAMARGO, L. C. **Cicatrização de feridas e bioacúmulo de prata em ratos Wistar tratados topicamente com o antimicrobiano nanopartículas de prata biogênicas.** 2020. 57 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Infecções nas feridas dos pacientes com queimaduras, pós-operatório, entre outros, são umas das mais temidas complicações, pois o ferimento atua como um meio de cultura ideal para a colonização e proliferação de microrganismos. Nesses casos a pele que normalmente serve como uma barreira física contra micróbios encontra-se lesionada e precisa ser reparada de forma rápida e adequada. Devido a essa problemática o objetivo do presente trabalho foi formular géis contendo nanopartículas de prata (bio-AgNP) obtidas a partir da biomassa de *Fusarium oxysporum*, e avaliar a sua atividade antibacteriana, cicatrizante e verificar a ocorrência do bioacúmulo da prata no organismo. Para o teste de cicatrização, foram usados 60 ratos adultos, da raça Wistar, nos quais foi feita uma lesão na região dorsal. As feridas foram tratadas diariamente com as formulações (F250 e F500), a base do produto (componentes da formulação sem bio-AgNP), a sulfadiazina de prata (controle positivo) e com solução fisiológica (controle negativo) de acordo com o grupo experimental. Registros da avaliação macroscópica e coleta do tecido epitelial da lesão foram feitos nos dias: 1°, 5°, 9° e 17° dias após a cirurgia, para avaliação histológica. Os animais tratados tiveram coletados o cérebro, um dos rins, o fígado, testículo, baço e sangue para quantificação de prata por espectrofotometria de absorção atômica. Para a verificação da atividade antimicrobiana dos produtos desenvolvidos foi realizada a técnica de curva de sobrevivência e morte. Os microrganismos testados foram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. O resultado do ensaio *in vitro* mostrou que as formulações com bio-AgNP tiveram ação antimicrobiana, assim como o controle positivo (sulfadiazina de prata - SD). Referente à cicatrização, não foram observadas variações significativas entre as médias das áreas das lesões tratadas com as diferentes formulações em relação à solução fisiológica (CTL) e a SD. Quanto ao acúmulo de prata nos diversos órgãos e no sangue, não houve diferença significativa entre o grupo CTL e os grupos experimentais após 17 dias de tratamento, o que indica que os tratamentos com os produtos formulados não ocasionam acúmulo de prata no organismo. O produto formulado contendo nanopartículas de prata biológicas apresentou potente proteção contra microrganismos, pois diminuiu a carga microbiana na lesão no decorrer dos dias de tratamento. Além disso, mostrou que não interferiu no processo de cicatrização e não resulta em acúmulo de prata nos órgãos estudados, sendo uma alternativa para o tratamento de pacientes com feridas.

Palavras-chave: cicatrização; infecção; *in vivo*; acúmulo de prata; antibacteriano.

CAMARGO, L. C. **Wound healing and bioaccumulation of silver in Wistar rats topically treated with antimicrobial biogenic silver nanoparticles.** 2020. 57 p. Qualifying defense (Master's Degree in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Wound infections are one of the most feared complications, because it becomes an ideal culture medium for a colonization and proliferation of microorganisms. In these cases, the skin that normally serves as physical barrier against microbes is injured and have to be repaired quickly and appropriately as possible. The objective of the present study was to formulate products, containing and silver nanoparticles (bio-AgNP) obtained from the biomass of *Fusarium oxysporum*, to evaluate the antibacterial, cicatrizing activity and occurrence of silver bioaccumulation in the organism. For the cicatrization test, 60 adult Wistar rats were used, in which a lesion was made on the dorsal region. The wounds were treated daily with formulated products, with the base of the product (formulation components without bio-AgNP), silver sulfadiazine (positive control) and saline (negative control). Records of the macroscopic evaluation and collection of the epithelial tissue of the lesion were done on days 1, 5, 9 and 17 after surgery for histological evaluation. From the treated animals, were collected the brain, one of the kidneys, liver, testis, spleen and blood for quantification of silver by atomic absorption spectrophotometry. To verify the antimicrobial activity of the developed products, a survival curve technique was used. The microorganisms tested were *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. The result of the antibacterial activity showed that the formulations containing bio-AgNP had antimicrobial action, as well as the sulfadiazine of silver (SD). Concerning healing, no significant variations were observed between the mean areas of the lesions treated with the different formulations in relation to the physiological solution (CTL) and SD. Atomic absorption spectrophotometry analysis showed that there was no significant difference between the CTL group and the experimental groups after 17 days of treatment, which indicates that the treatment formulated products do not cause silver accumulation in the body. The formulated product containing biological silver nanoparticles showed potent protection against microorganisms, as it decreased the microbial load on the lesion over the course of the treatment days. In addition, it has been shown not to interfere with the healing process and does not result in silver accumulation, being an alternative for treating wounded patients.

Keywords: healing; infection; *in vivo*; accumulation of silver; antibacterial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01** – Esquema fase inflamatória do processo de cicatrização.....17
- Figura 02** – Esquema fase proliferativa do processo de cicatrização.....19
- Figura 03** – O quadro clínico da colonização e infecção de ferida21
- Figura 04** – Múltiplo mecanismo de ação de nanopartículas de prata contra células microbianas.....23
- Figura 05** – As propriedades das nanopartículas de prata que trazem a ferida mais próxima à pele normal. As nanopartículas de prata desempenham um papel na prevenção da infecção, diminuindo a carga bacteriana na ferida por suas propriedades antimicrobianas. Juntamente com as propriedades acima, as potentes propriedades antiinflamatórias mediadas através da modulação de citocinas.....25

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais mediadores da fase inflamatória da cicatrização18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos para indicar desvio padrão
µL	Microlitros
µm	Micrometros
β	Beta
α	Alfa
°C	Graus Celsius
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BASE	Formulação Base (gel)
Bio-AgNP	Nanopartículas de prata biogênica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTL	Controle negativo (solução salina 0,9%)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
F250	Gel contendo 250 Mm de nanopartícula de prata biogênica
F500	Gel contendo 500 Mm de nanopartícula de prata biogênica
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
g	Gramas
h	Hora
kg	Kilogramas
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
min	Minuto
mg	Miligramas
mL	Mililitros
N	Normal
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
SD	Sulfadizida de prata
TGF-α	Fator de transformação do crescimento alfa
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta

UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
v/v	Porcentagem em volume (volume/volume)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	PELE.....	15
2.2	CICATRIZAÇÃO	16
2.3	INFECÇÕES EM FERIDAS	20
2.4	TRATAMENTO DE INFECÇÕES EM FERIDAS	21
2.5	ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS	22
2.6	NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	23
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	ARTIGO	32
5	CONCLUSÃO	57

1 INTRODUÇÃO

Infecções nas feridas de pacientes com queimaduras durante o tratamento são uma das mais temidas complicações, devido ao fato de que na ausência de cuidados adequados, o ferimento torna-se um meio de cultura ideal para a colonização e proliferação de todos os tipos de microrganismos endógenos e exógenos. A pele é uma barreira física contra microrganismos, mas quando se encontra lesionada, o indivíduo fica susceptível à invasão microbiana (SAAIQ; AHMAD; ZAIB, 2015).

O imunocomprometimento dos pacientes com queimaduras, a ausência da barreira da pele, a longa estadia no hospital e as intervenções invasivas são fatores que contribuem para a ocorrência de infecções. Como medida profilática, o tratamento com antibióticos é iniciado imediatamente após a suspeita de infecções. Porém, o aumento da resistência aos antimicrobianos é o maior obstáculo para o combate à infecção, sendo necessário uma terapia empírica com conhecimento prévio da prevalência de bactérias comuns e seu padrão de resistência aos antimicrobianos (PERWEN; PRAKASH; SADDIQUI, 2015; MIGUEL, 2019).

Jasim e colaboradores (2016) analisaram 150 amostras de feridas de pacientes com queimaduras que apresentaram infecção, mostrando que *Pseudomonas aeruginosa* foi a bactéria mais encontrada (27,6%), seguido por *Staphylococcus aureus* (23,8%), *Klebsiella spp.* (19%), *Proteus spp.* (17,1%), *Escherichia coli* (11,4%) e *Acinetobacter spp.* (0,9%). Quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, Imipenem e Ciprofloxacina foram consideradas os fármacos mais eficazes contra a maioria dos isolados, seguidos por Amicacina, Doxiciclina, Tetraciclina e Azitromicina; Gentamicina e Oxacilina foram os antibióticos menos eficazes contra os microrganismos analisados. Esse estudo demonstrou a prevalência dos microrganismos que comumente causam infecções em pacientes e também a presença de microrganismos resistentes a diversos antibióticos.

A presença de bactérias na ferida gera uma competição por oxigênio e nutrientes com as células normais. Além disso, bactérias e produtos bacterianos, como endotoxinas e metaloproteinasas, podem causar prejuízos em todas as fases de cicatrização de feridas (WARRINER; BURRELL, 2005) prolongando o tempo de internação do paciente e aumentando os custos da internação (ESUVARANATHAN; KUAN; KUMARASINGHE, 1992; LÓPEZ-JÁCOME, 2019).

Portanto, na década de 1960 foram introduzidos os antibióticos de uso

tópico em pacientes com queimadura. Primeiramente foi utilizada a Mafenida e posteriormente a Sulfadiazina de Prata que é utilizada até hoje. Com a adoção do uso de antibióticos tópicos, a ocorrência de infecções sistêmicas e mortalidade diminuiu significativamente (CHIPP; MILNER; BLACKBURN, 2010; D'AVIGNON et al., 2011).

Porém, durante as décadas seguintes começaram a ser relatados casos de resistência à sulfadiazina de prata (MCHUGH et al. 1975; DESHPANDE; CHOPADE, 1994; ATIYEH et al., 2007). Também existem relatos de cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes queimados de vários países, sensíveis a sulfadiazina de prata *in vitro*, mas quando realizados testes em camundongos e ratos queimados, as cepas foram resistentes à terapia tópica com este antimicrobiano (MODAK; FOX JR, 1981).

Devido aos problemas da resistência bacteriana à sulfadiazina de prata, novos estudos para alternativas no tratamento de feridas, são necessários. Dentre eles, podemos destacar o uso da nanotecnologia (TIAN et al, 2007; BIU; PARK; LEE, 2017).

Os resultados de Scandorieiro e colaboradores (2016) demonstraram o potente efeito antibacteriano das nanopartículas de prata sintetizadas biologicamente (Bio-AgNP) pelo fungo *Fusarium oxysporum* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas multirresistentes. Portanto, os objetivos desse trabalho foram formular um produto contendo Bio-AgNP, avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos mesmos, e por fim sua atividade cicatrizante *in vivo* a fim de utilizá-los no controle microbiano principalmente no cuidado de pacientes com queimaduras.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PELE

O indivíduo adulto encontra-se revestido por aproximadamente 2 m² de pele, com aproximadamente 2 mm de espessura (DYER; ROBERTS, 1990; BORGES, 2001; ROTH; HUGHES, 2004), suas características fazem da pele o maior órgão do corpo humano (CHURCH et al., 2006; LIMA, 2008; BELDA; CHIACCHIO; CRIADO, 2010; GRAFANAKI, 2018). A pele desempenha várias funções no organismo, como: barreira física contra microrganismos, proteção contra traumas, termorregulação, além de possuir componentes celulares e humorais do sistema imunológico que atuam na defesa contra agentes invasores (SAMPAIO; RIVITTI, 2001; DEBOER; O'CONNOR, 2004; DANGELO; FATTINI, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; SILVERTHORN, 2017;).

A pele é formada por duas camadas fundidas, a epiderme e a derme (HIROBE, 2014). A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e apresenta cinco camadas vista da derme para a superfície: camada basal, que separa a derme da epiderme, esta é a camada mais importante para o processo de regeneração da pele, pois é rica em células troncos e é responsável pela constante renovação da epiderme; em seguida encontram-se as camadas espinhosa, granulosa, lúcida e cornéa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Na epiderme estão localizadas três células importantes para a homeostase da pele, são elas: melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Os melanócitos são responsáveis pela síntese da melanina que protege a pele contra radiações ultravioleta (HEARING, 2005; HIROBE, 2014). As células de Langerhans são importantes nas respostas imune, pois são capazes de realizar a apresentação de antígenos aos linfócitos T, desencadeando uma resposta imune celular (MALISSEN; TAMOUTOUNOUR; HENRI, 2014). As células de Merkel são mecanoreceptores (sensibilidade a estímulos táteis) (WOO; LUMPKIN; PATAPOUTIAN, 2015).

A derme é muito mais espessa do que a epiderme, e é constituída por duas camadas, de limites pouco definidos: a camada papilar, formada por tecido conjuntivo frouxo, que apresenta pequenos vasos sanguíneos; e a camada reticular, formada por tecido conjuntivo denso, onde se encontram vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, glândulas e os folículos pilosos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

As células que compõem o tecido conjuntivo da derme são principalmente os fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, neutrófilos. Os fibroblastos são responsáveis pela síntese de proteínas de colágeno e elastina, além dos glicosaminoglicanos, proteoglicanos que farão parte da matriz extracelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). As demais células, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, neutrófilos, exercem a função de defesa imunológica. (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017).

Além das células, o tecido conjuntivo é composto por três tipos principais de fibras, são elas: elásticas, colágenas e reticulares (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2017). As fibras elásticas são responsáveis pela elasticidade do tecido, prendendo a pele aos músculos subjacentes; as fibras colágenas dão resistência a nossa pele, evitando que ela se rasgue quando esticada; e as fibras reticulares formam um trançado firme que liga o tecido conjuntivo aos tecidos vizinhos.

2.2 CICATRIZAÇÃO

Após uma lesão, ocorre uma sequência de eventos que levam ao reparo tecidual e à restauração da superfície da pele (ROSSATO, 2016). O reparo desse tecido lesado pode ocorrer de duas formas, pela regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido ou pela cicatrização com restabelecimento da homeostasia, porém com perda da sua atividade funcional pela formação de cicatriz (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). A regeneração tecidual ocorre por meio da proliferação de células residuais (não lesadas) e da proliferação das células troncos teciduais residentes na camada basal da epiderme (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2017).

O processo de cicatrização é dividido em três fases principais: inflamatória, proliferação e remodelamento da cicatriz (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; RODRIGUES, 2018).

A fase inflamatória (Figura 1) inicia-se após o aparecimento da lesão, com a ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de seus constituintes. No primeiro momento, a resposta local será voltada para a contenção desse extravasamento, portanto inicia-se a cascata de coagulação, na qual as plaquetas sofrem ativação e liberam uma série de mediadores encontrados em seus grânulos (tromboxano A2, fibrinogênio, fibronectina e trombospondina – Quadro 1) afim de

que outras plaquetas circulantes sofram aderência ao tecido conjuntivo exposto da parede do endotélio no local da lesão, levando à formação de um tampão plaquetário relativamente instável que pode estancar ou diminuir o sangramento (LEFKOVITS et al., 1995; BOLOGNIA; JORIZZO; RAPINI, 2011). A agregação plaquetária estimula a enzima circulante conhecida como fator XII de Hageman a iniciar a coagulação com a converção de pró-trombina em trombina, que por sua vez, converte fibrinogênio em fibrina, formando um tampão plaquetário estável (BOLOGNIA; JORIZZO; RAPINI, 2011).

FASE INFLAMATÓRIA (3 DIAS)

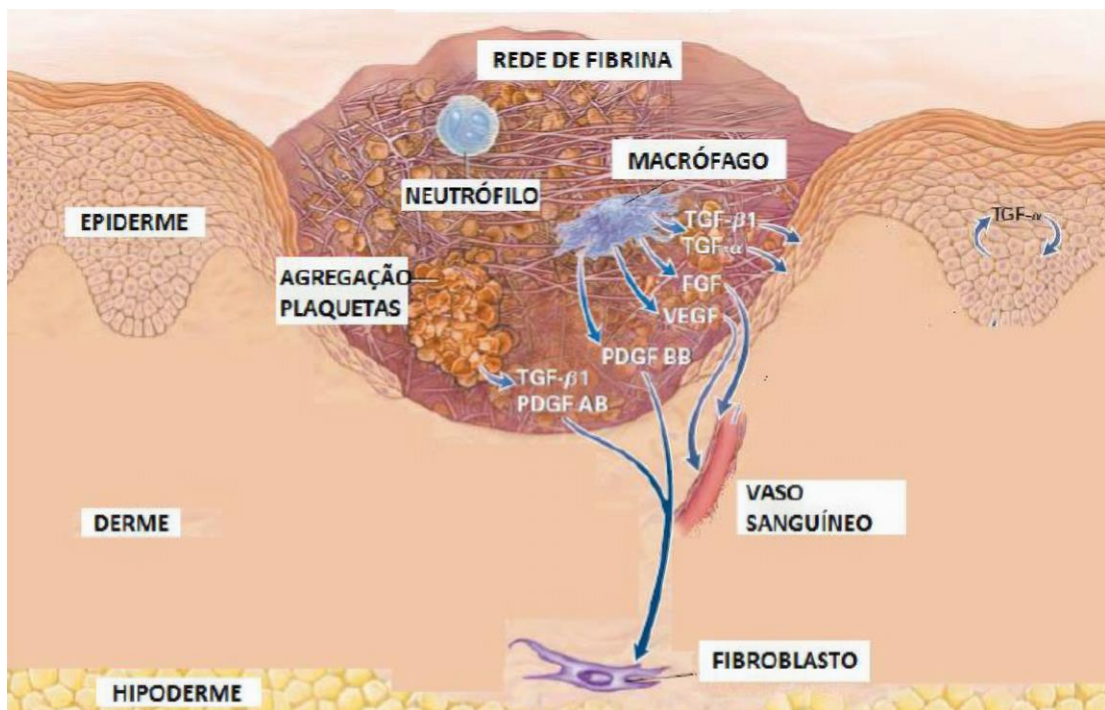


Figura 1. Esquema da fase inflamatória do processo de cicatrização da pele. TGF- β (Fator de transformação do crescimento beta). TGF- α (Fator de transformação do crescimento alfa). FGF (fator de crescimento fibroblástico). VEGF (**fator de crescimento** endotelial vascular). PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas). Fonte: adaptado de SINGER; RICHARD; CLARK, 1999.

As plaquetas também promovem a liberação local de mediadores inflamatórios que requisitam neutrófilos e macrófagos, responsáveis pela digestão dos tecidos necrosados e microrganismos (SINGER; RICHARD; CLARK, 1999). Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do organismo, sendo essenciais no combate contra agentes infecciosos, são observados principalmente na primeira

semana após a lesão e podem persistir caso houver infecção da ferida. Já os macrófagos, além de atuarem na defesa do organismo contra agentes infecciosos, também realizam a síntese e a secreção de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) e fator de transformação de crescimento alfa (TGF- α) (SINGER; RICHARD; CLARK, 1999; BOLOGNIA; JORIZZO; RAPINI, 2011). Essas citocinas (Quadro 1) são importantes para a indução de migração e proliferação celular, assim como a produção de matriz.

Quadro 1. Principais mediadores químicos da fase inflamatória da cicatrização.

Mediadores inflamatórios	Função
Tromboxano A ₂	Vasoconstrição e agregação plaquetária
Fibrinogênio	Agregação plaquetária
Fibronectina	Agregação plaquetária
Trombospondina	Agregação plaquetária
PDGF	Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos
FGF	Proliferação de fibroblastos
VEGF	Migração e mitose de células endotélias do vaso sanguíneo
TGF- β	Regula produção de matriz extracelular
TGF- α	Regula produção de matriz extracelular

Fonte: adaptado SINGER; RICHARD; CLARK, 1999.

Na fase proliferativa (Figura 2) ocorre o predomínio da atividade celular e a formação e proliferação do tecido de granulação, o qual apresenta macrófagos, fibroblastos, colágeno, componentes neovasculares e matriz (ROSSATO, 2016). A produção e liberação de mediadores químicos produzidos por macrófagos (PDGF, FGF principalmente), intensifica a migração e ativação de fibroblastos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; PRATSINIS; MAVROGONATOU; KLETSAS, 2018). O aumento do número de fibroblastos ativados faz com que a produção de colágeno no local seja intensificada e conseqüentemente a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo (KNIGHTON et al., 1981).

Concomitante a essa deposição de colágeno no local da ferida, ocorre o processo de angiogênese, que se refere ao crescimento de novos vasos

(neovascularização). A formação de novos vasos é importante nesse estágio pois permite o transporte de oxigênio e nutrientes para o local da lesão (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; BOLOGNIA; JORIZZO; RAPINI, 2011; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2017).

Após o reestabelecimento do fluxo sanguíneo e a migração e proliferação dos fibroblastos no local da lesão, inicia-se a contração das bordas da ferida devido ao entrelaçamento das fibras de colágeno, esse processo é realizado pelos miofibroblastos (TRINDADE, 2019).

FASE PROLIFERATIVA (5 DIAS)

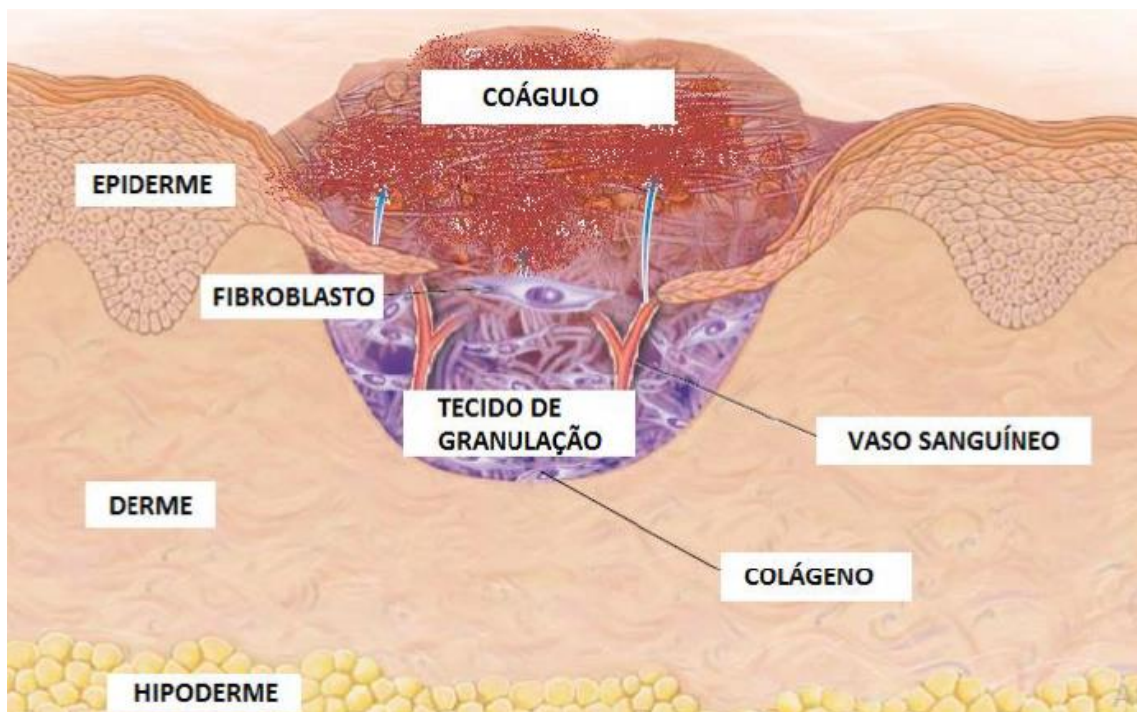


Figura 2. Esquema da fase proliferativa do processo de cicatrização da pele.

Fonte: adaptado de SINGER; RICHARD; CLARK, 1999.

A última etapa do processo de cicatrização é o remodelamento da cicatriz. Por volta do décimo dia, a ferida está completamente preenchida pelo tecido de granulação (GUIDUGLI-NETO, 1987; RODRIGUES 2019). Com a evolução do processo, e conforme ocorre o aumento da deposição de colágeno, a maioria dos macrófagos, neutrófilos e fibroblastos desaparecem, formando finalmente a cicatriz. Atualmente, a ferida é considerada concluída após a total maturação da matriz extracelular, e esse processo pode levar muitos meses ou até anos para acontecer. Ao final dessa etapa, os anexos da pele (folículos pilosos e glândulas) sofrem

regeneração limitada e a coloração da pele no local permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente (JOHNSTON, 1990), além das cicatrizes serem pouco vascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares.

2.3 INFECÇÕES EM FERIDAS

As feridas abertas, por apresentarem a ausência de um epitélio intacto, se tornam um ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos (EDWARDS; HARDING, 2004; SAAIQ; AHMAD; ZAIB, 2015).

Inicialmente, ocorre a contaminação da ferida (Figura 3), que é definida como a presença de organismos não replicativos dentro de uma ferida. Posteriormente, ocorre a colonização (Figura 3), ou seja, a presença de microrganismos replicantes aderentes à ferida na ausência de dano tecidual (DOW; BROWNE; SIBBALD, 1999; WYSOCKI, 2002).

Primeiramente, as feridas são colonizadas por bactérias Gram-positivas comensais da pele, no decorrer dos dias e meses ocorre no leito da ferida a colonização por várias espécies patogênicas diferentes, incluindo a microbiota anaeróbica (SAPICO; CANAWATI; WITTE, 1990; DOW; BROWNE; SIBBALD, 1999). Estudos de NASSER et al (2003) em pacientes com queimaduras observaram o predomínio de bactérias Gram positivas (55,7%) na primeira semana de internação em relação às bactérias Gram negativas (40,3%) e após a primeira semana, essa predominância altera com 72,7% de Gram-negativas e 22,7% de bactérias Gram-positivas (22,7%).

A progressão da colonização da ferida para a infecção depende não apenas da contagem bacteriana ou das espécies presentes, mas também da resposta imune do hospedeiro, do número de diferentes espécies presentes, da virulência dos organismos e das interações sinérgicas entre as diferentes espécies (EDWARDS; HARDING, 2004; JOHNSON et al. 2018).

O processo inflamatório estimulado pela presença de bactérias nas feridas pode impactar adversamente os resultados da cura devido ao aumento da abundância de proteases, espécies reativas de oxigênio e outras substâncias bioativas que atrasam a cicatrização de feridas (JOHNSON et al. 2018).

O cuidado com as infecções de feridas é essencial para promover uma boa resposta de cura, pois a infecção causa um retardamento no processo de

cicatrização. Além disso, a morbidade e mortalidade são significativas em pacientes com infecções de feridas.



Figura 3. O quadro clínico da colonização e infecção de ferida.

Fonte: adaptado de EDWARDS; HARDING ,2004.

2.4 TRATAMENTOS DE INFECÇÕES EM FERIDAS

Para selecionar o tratamento tópico apropriado é necessário avaliar a capacidade de penetração da barreira cutânea. Em termos didáticos é possível classificar os produtos tópicos em três níveis de penetração cutânea: contactação, quando o produto atinge apenas a camada mais externa da pele; permeação, quando chega até a camada lúcida da epiderme; e absorção, quando o produto tem acesso livre na pele e pode alcançar facilmente a derme e a corrente sanguínea. Em geral, produtos polares e com partículas menores possuem mais facilidade de penetração em relação aos produtos apolares e com partículas maiores (BELDA; CHIACCHIO; CRIADO, 2010).

Uma fórmula farmacêutica é composta basicamente por princípio ativo, veículo e excipientes. O princípio ativo é a substância a desenvolver a atividade terapêutica; o veículo é o constituinte presente em maior quantidade na fórmula; e os excipientes são os demais componentes, estes são responsáveis pela estabilidade, aparência e também segurança do produto (BELDA; CHIACCHIO; CRIADO, 2010).

O medicamento utilizado mundialmente para o tratamento de feridas, principalmente em pacientes com queimadura é o creme de sulfadiazina de prata.

Introduzida no mercado em 1968, contém em sua formulação a prata combinada a um antibiótico, a sulfadiazina (STANFORD; RAPPOLE; FOX, 1969).

A prata obteve sucesso no tratamento de feridas devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana, incluindo leveduras, fungos, filamentosos e até mesmo bactérias resistentes aos antibióticos, como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e enterococos resistentes a vancomicina (VRE) (RUSSEL, 1994; MARGARET, 2006; MIJNENDONCKX, 2013). A prata tem ação bactericida, pois inibe a cadeia respiratória, além de interferir no transporte de elétrons (WRIGHT; LAM; BURRELL, 1998; KHUNDKAR; MALIC; BURGE, 2010), também inibe a replicação do DNA (RUSSELL; HUGO, 1994) e altera a permeabilidade da membrana celular (ATIYEH et al., 2007).

Uma vez que a prata apresente atividade antimicrobiana de amplo espectro, especialmente contra organismos resistentes aos antibióticos convencionais, há uma série de novos produtos à base de prata para tratamento de feridas que possuem atividade antimicrobianas e cicatrizantes (MURPHY; EVANS, 2012).

No entanto, um problema do uso da sulfadiazina de prata é o fato de ser absorvida apenas na camada epidérmica da pele, o que limita sua eficácia em alguns pacientes com lesões graves. Para combater esse problema, hoje está sendo utilizada a combinação de nitrato de cério e sulfadiazina de prata (GARNER; HEPPELL, 2005A, GARNER; HEPPELL, 2005B). Além disso, devido ao tratamento extensivo de feridas de queimaduras agudas com sulfadiazina de prata, existe a preocupação com a potencial toxicidade desse composto (TROP et al., 2006).

2.5 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

Durante os últimos anos vários estudos sobre cicatrização e produtos alternativos estão sendo desenvolvidos. Alguns dos estudos recentes envolvem o uso da nanotecnologia, como: nanopartículas de prata (TIAN, 2007; CHALOUPKA; MALAM; SEIFALIAN, 2010; ADHYA et al. 2015) nanopartículas de ouro (CHEN et al. 2012; LEU et al. 2012; YANG et al, 2017), nanopartículas de cobre (THAKAR et al. 2014), nanopartículas de dióxido de titânio (SANKAR et al. 2014), entre outras.

2.6 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Com o advento da nanotecnologia, começaram a surgir diversos estudos com as nanopartículas de prata (CARDOZO et al., 2013; SCANDORIEIRO et al., 2016; FANTI et al. 2018, BOCATE et al. 2019). Nanopartículas metálicas apresentam propriedades físicas, químicas e biológicas diferentes em comparação ao metal convencional, devido a sua maior superfície de contato (HERMAN; HERMAN, 2014).

O mecanismo pelo qual as nanopartículas de prata exercem sua atividade antibacteriana ainda não está totalmente esclarecido. Estudos indicam (Figura 4) que nanopartículas de prata aumentam a permeabilidade da membrana celular, inativam enzimas, interferem nos níveis de ATP intracelular, causam dano ao DNA e induzem formação de espécies reativas de oxigênio (FENG et al., 2000; DIBROV et al., 2002; LOK et al., 2006; LI et al., 2010; KIM et al., 2011). Porém, o estudo de GRAVES et al. (2015) mostrou que os microrganismos podem desenvolver resistência à nanopartícula de prata por alterações genéticas.

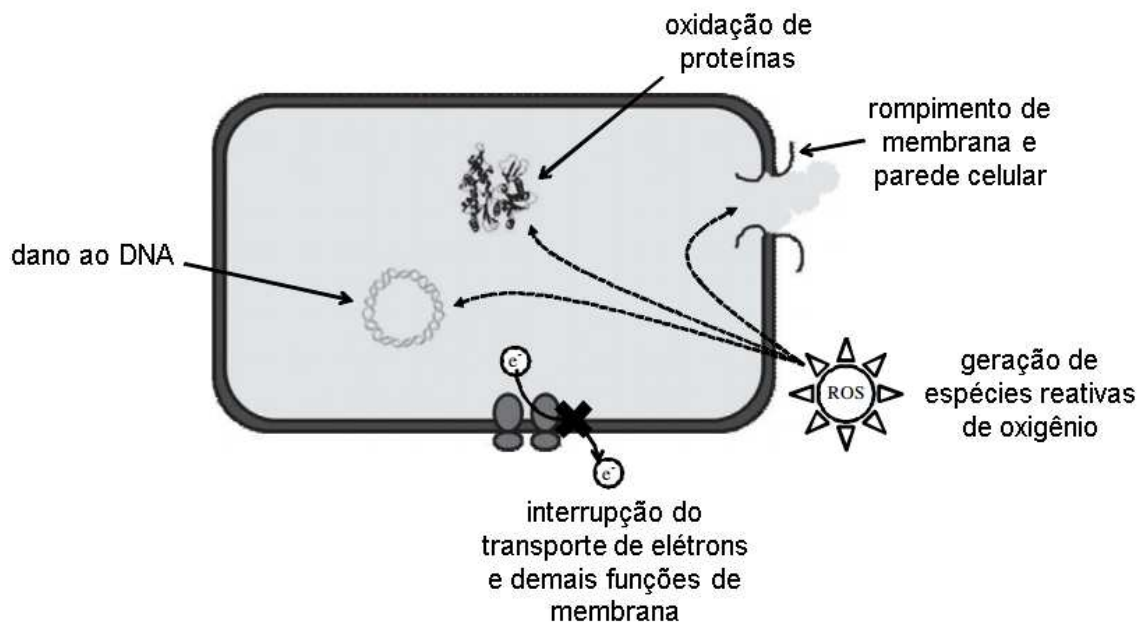


Figura 4 – Múltiplo mecanismo de ação de nanopartículas de prata contra células microbianas. Estudos sugerem que antimicrobianos à base de prata danificam membrana, DNA bacteriano, oxidam proteínas e enzimas, além de contribuírem para a geração de espécies reativas de oxigênio nas células bacterianas.

Fonte: adaptado de Li et al. (2008)

O recente avanço da nanotecnologia e o desenvolvimento das nanopartículas de prata proporcionou uma nova modalidade terapêutica para o tratamento de feridas. No entanto, os efeitos benéficos das nanopartículas de prata na cicatrização de feridas permanecem desconhecidos.

TIAN e colaboradores (2007) mostraram que as nanopartículas de prata exercem efeitos positivos na cicatrização devido a sua propriedade antimicrobiana, antiinflamatória e por modular citocinas. Eles investigaram a concentração de IL-6 nas áreas de ferida tratadas com nanopartículas de prata e observaram sua diminuição ao longo do processo de cicatrização, o que indica uma redução do processo inflamatório, já que essas interleucinas são pró-inflamatórias. Além disso, a concentração de TGF- β 1 permanece baixa durante a última fase de cicatrização, favorecendo a diminuição da formação de fibroses. A concentração de VEGF permaneceram maiores no grupo de nanopartículas de prata em relação ao grupo controle, portanto a formação de vasos sanguíneos é favorecida durante o processo de cicatrização, o que é benéfico para a cura da ferida.

LEE et al. (2010) investigaram o efeito de nanopartículas de prata em contração dérmica e reepitelização epidérmica durante a cicatrização de feridas e sugeriram que as nanopartículas de prata poderiam aumentar a taxa de fechamento da ferida. Por outro lado, as nanopartículas de prata poderiam estimular a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, promovendo assim a contração da ferida.

Finalmente, as nanopartículas de prata (Figura 5) desempenham um papel na prevenção da infecção e na diminuição da carga bacteriana na ferida por suas propriedades antimicrobianas de amplo espectro. Juntamente com as propriedades acima, a capacidade de modular citocinas levam a uma melhor direção terapêutica no tratamento de feridas (GUNASEKARAM; NIGUSSE; DHANARAJU, 2011).

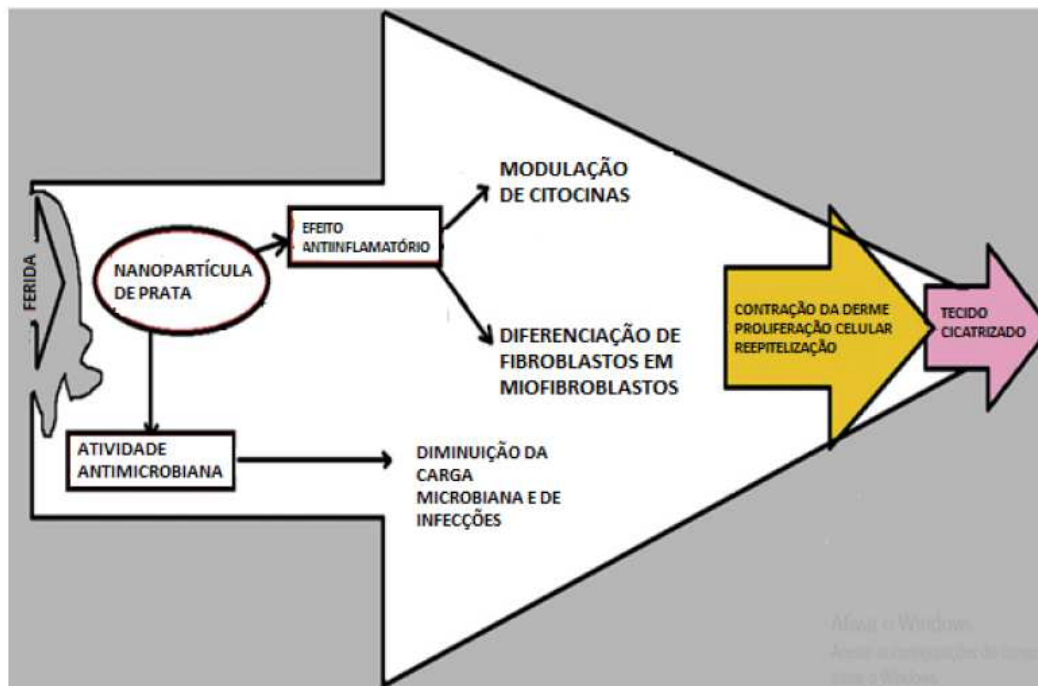


Figura 5. As propriedades das nanopartículas de prata que trazem a ferida mais próxima à pele normal. As nanopartículas de prata desempenham um papel na prevenção da infecção, diminuindo a carga bacteriana na ferida devido a suas propriedades antimicrobianas. Além disso, as nanopartículas possuem potentes propriedades antiinflamatórias mediadas através da modulação de citocinas.
 Fonte: adaptado de GUNASEKARAN; NIGUSSE; DHANARAJU, 2011.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Cellular and Molecular Immunology** 9 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2017.

ADLHYA, A. et al. Healing of burn wounds by topical treatment: A randomized controlled comparison between silver sulfadiazine and nano-crystalline silver. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v.6, p. 29-34, 2015.

ATIYEH, B.S. et al. Effect of silver on burn wound infection control and healing: Review of the literature. **Burns**, v. 33, p.139-148, 2007.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BELDA, J.R.; DI CHIACCHIO, N.; CRIADO, P.R. **Tratado de dermatologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

BOCATE, K. T.; REIS, G. F.; SOUZA, P. C., et al. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, n. 16, p. 79-86, 2011.

BOLOGNIA, J. L.; JORIZZO, J. L.; RAPINI, R. P. **Dermatologia**. 2ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

BORGES, E. L. et al. **Feridas como tratar**. Belo Horizonte: Coopmed, 2001.

BUI, V.K.H; PARK, D.; LEE, Y.C. chitosan combined with ZnO, TiO₂ and ag nanoparticles for antimicrobial wound healing applications: a mini review of the research trends. **Polymers** v. 9, p. 21, 2017.

CHALOUPKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. **Trends Biotechnology**, v. 28, p. 580-588, 2010.

CHEN, S. et al. Topical treatment with antioxidants and Au nanoparticles promote healing of diabetic wound through receptor for advanced glycation end-products. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 875-883, 2012.

CHIPP, E.; MILNER, C.S.; BLACKBURN, A.V. Sepsis in burns: a review of current practice and future therapies. **Annals of Plastic Surgery**, v. 65, p. 228-236, 2010.

CARDOZO, V. F. et al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 12, n. 12, 2013.

CHURCH, D. et al. Burn Wound Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 403-434, 2006.

D'AVIGNON, L.C et al. Prevention of Combat-Related Infections Guidelines Panel Prevention of infections associated with combat-related burn injuries. **Journal Trauma**, v. 71, p. 282-289, 2011.

DANGELO, J.G; FATTINI, C.A. **Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007.

DEBOER, S.; O'CONNOR, A. Pre hospital and emergency department burn care. **Journal of Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 16, p. 61-73, 2003.

DESHPANDE, L.M.; CHOPADE, B. A. Plasmid mediated silver resistance in *Acinetobacter baumannii*. **BioMetals**, v. 7, n.1, p. 49-56, 1994.

DIBROV, P. et al. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag + in *Vibrio cholerae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2668-2670, 2002.

DOW, G.; BROWNE, A. SIBBALD, R. G. Infection in chronic wounds: controversies in diagnosis and treatment. **Ostomy/Wound Manage**, v. 45, p. 23-40, 1999.

DYER, C.; ROBERTS, D. Thermal trauma. **Journal of The Nursing Clinics of North America**, v.25, p. 85-117, 1990.

EDWARDS, R.; HARDING K. G. Bacteria and wound healing. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.17, p. 91-96, 2004.

ESUVARANATHAN, K.; KUAN, Y. F.; KUMARASINGHE, G. A study of 245 infected surgical wounds in Singapore. **Journal of Hospital Infection**, v. 21, p. 23-240, 1992.

FANTI, J. R. et al. Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death *in vitro*. **Acta Tropica**, v. 178, p. 46-54, 2018.

FENG, Q. L. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 4, p. 662-668, 2000.

GARNER, J. P.; HEPPELL, P. S. The use of Flammacerium in British burns units. **Burns**. v. 31, p. 379-382, 2005A.

GARNER, J. P.; HEPPELL, P. S. Cerium nitrate in the management of burns. **Burns**, v. 31, p. 539-547, 2005B.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue I: quantitative study of the vascular volume. **Revista Odontologia Universidade de São Paulo**, v. 1, p. 6-8, 1987.

GUNASEKARAN, T.; NIGUSSE, T.; DHANARAJU, M. D. Silver Nanoparticles as Real Topical Bullets for Wound Healing. **The Journal of the American College of Clinical Wound**, v. 3, n. 4, p. 82-96, 2011.

GRAFANAKI, K. et al. Translation regulation in skin cancer from a tRNA point of view. **Epigenomics**, v. 11, n. 2, 2018.

GRAVES, J. L. et al. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. 42, p. 1-13, 2015.

HEARING, V. J. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. **Journal of Dermatological Science**, v. 37, n. 1, p. 3-14, 2005.

HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Nanoparticles as antimicrobial agents: their toxicity and mechanisms of action. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 946-957, 2014.

HIROBE, T. Keratinocytes regulate the function of melanocytes. **Dermatologica Sinica**, v. 32, p. 200-204, 2014.

JASIM, S.Y.; MSHIMESH, B.A.R.; ELEWI, I.H. Identification and susceptibility test for bacteria isolated from burn wound infections. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p.7-10, 2016.

JOHNSTON, D. E. Wound healing in skin. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 20, n.1, p. 1-25, 1990.

JUNQUEIRA, L.C.U; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2017.

KIM, S.H. et al. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 39, n.1, p. 77-85. 2011.

KHUNDKAR, R.; MALIC, C.; BURGE, T. Use of Acticoat dressings in burns: what is the evidence? **Burns**, v. 36, n.6, p. 751-758, 2010.

KNIGHTON, D. R.; SILVER, I.; HUNT, T. K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery**, v.90, p. 262-270, 1981.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J.C. **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

LEE, P. Y.; HO, C. M.; LUI, V. C. H. Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. **ChemMedChem**, v. 5, p. 468-475, 2010.

LEFKOVITS, J.; PLOW, E. F.; TOPOL, E. J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **The New England Journal of medicine**, v. 332, p. 1553-1559, 1995.

LEU J. et al. The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and lipoic acid. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, p. 767-775, 2012.

LI, W. R. et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 4, p. 1115-71122, 2010.

LI, Q. et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. **Water Research**, v. 42, n. 18, p. 4591–4602, 2008.

LIMA, J. R. et al. **Tratado de queimaduras no paciente agudo**. 2ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

LOK, C. N. et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 4, p. 916-924, 2006.

LÓPEZ-JÁCOME, et al. Microbiology and infection profile of electric burned patients in a referral burn hospital in Mexico City. **Journal of Burn Care & Research**, 2019.

MALISSEN, B.; TAMOUTOUNOUR, S.; HENRI, S. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 417-428, 2014.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E, P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARGARET I., et al. Antimicrobial activities of silver dressings: na *in vitro* comparison. *Journal of Medical Microbiology*, v. 55, p. 59–63, 2006.

MCHUGH, G.L. et al. *Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. **The Lancet**, v. 1, n. 7901, p. 235-240, 1975.

MIGUEL, S. P. et al. Production and characterization of a novel asymmetric 3D printed construct aimed for skin tissue regeneration. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, p. 994-1003, 2019.

MIJNENDONCKX, K., et al. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals*, v. 26, p. 609–621, 2013.

MODAK, S.M.; FOX JR, C.L. Sulfadiazine Silver-Resistant *Pseudomonas* in Burns New Topical Agents. **Archives eSurgery**, v. 116, p. 857-857, 1981.

MURPHY, P. S.; EVANS, A. R. D. Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. **Plastic Surgery International**, v. 2012, p.8, 2012.

NASSER, S.; MABROUK, A.; MAHER, A. Colonization of burns wounds in Ain Shams University Burn Unit. **Burns**, v. 29, n.3, p. 229-233, 2003.

PERWEN, S.; PRAKASH, K.; SADDIQI, O. Multi Drug Resistant *Klebsiella* Isolates in Burn Patients: A Comparative Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.9, DC14-DC16, 2015.

PRATSINIS, H.; MAVROGONATOU, E.; KLETSAS, D. Scarless wound healing: From development to senescence. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018.

RODRIGUES, M. et al. Wound healing: a cellular perspective. **Physiology Review**, v. 99, p. 665–706, 2019.

ROSSATO, B.M.C. Efeito da ledterapia no processo de cicatrização de feridas em ratos. Monografia. 2016.

ROTH, J. J.; HUGHES, W. B. **The essential burn unit handbook**. Quality Medical Publishing, 2004.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W.B. Antimicrobial activity and action of silver. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 31, p. 351-370, 1994.

SAAIQ, M.; AHMAD, S.; ZAIB, M.S. Burn Wound Infections and Antibiotic Susceptibility Patterns at Pakistan Institute of Medical Sciences. **World Journal of Plastic Surgery**, v.4, p. 9-15, 2015.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2ª ed. São Paulo. Artes Médicas, 2001.

SANKAR, R. et al. Wound healing activity of *Origanum vulgare* engineered titanium dioxide nanoparticles in Wistar Albino rats. **The Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.25, p. 1701-1708, 2014.

SAPICO, F.; CANAWATI, H.; WITTE, J. Quantitative aerobic and anaerobic bacteriology of infected diabetic feet. **Journal Clinical of Microbiology**, v.12, p. 413-420, 1980.

SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrugresistant bacterial strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 760, 2016.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana - Uma abordagem integrada**. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGER, A. J.; RICHARD, A. F.; CLARK, M.D. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

STANFORD, W.; RAPPOLE, B.W.; FOX, C. L. Clinical experience with silver sulfadiazine, a new topical agent for control of pseudomonas infections in burns. **Journal of Trauma**, v. 9, n.5, p. 377-388, 1969.

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

TIAN, J. et al. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. **ChemMedChem Journal**, v.2, p.129-136, 2007.

TRIDADE, L. C. T. et al. Diferenciação de miofibroblastos em feridas após uso tópico do metronidazol: estudo experimental. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 46, n.1, 2019.

TROP, M. et al. Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. **Journal of Trauma**, v. 60, n.3, p. 648-652, 2006.

YANG, X. et al. Pharmaceutical Intermediate-Modified Gold Nanoparticles: Against Multidrug-Resistant Bacteria and Wound-Healing Application *via* an Electrospun Scaffold. **American Chemical Society Nano**, v. 11, n. 6, p. 5737-5745, 2017.

WARRINER, R.; BURRELL, R. Infection and the chronic wound: a focus on silver. **Advances in skin & wound care**, v. 18, p. 2-12, 2005.

WOO, S.H.; LUMPKIN, E. A.; PATAPOUTIAN, A. Merkel cells and neurons keep in touch. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 2, p. 74-81, 2015.

WRIGHT, J.B.; LAM, K.; BURRELL, R.E. Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: a role for topical silver treatment. **American Journal of Infection Control**, v. 26, n.6, p. 572-577, 1998.

WYSOCKI, A. B. Evaluating and Managing Open Skin Wounds: Colonization Versus Infection. **AACN Clinical Issues**, v. 13, n. 3, p. 382-397, 2002.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO

Os resultados e discussão, juntamente com a metodologia necessária ao desenvolvimento deste trabalho de mestrado, foram apresentados na forma de artigo, seguindo as normas de formatação da revista para qual foi submetido (com modificações para se adequar ao presente manuscrito).

Resumo

Infecções nas feridas são uma das mais temidas complicações, devido ao fato do ferimento se tornar um meio de cultura ideal para a colonização e proliferação de microrganismos, aumentando o custo do tratamento e a mortalidade dos pacientes. Devido a essa problemática o objetivo do presente trabalho foi formular géis contendo nanopartículas de prata obtidas a partir da biomassa de *Fusarium oxysporum* (bio-AgNP), e avaliar a sua atividade antibacteriana, interferências na cicatrização e verificar o bioacúmulo de prata nos animais após o tratamento. Para o teste de atividade antimicrobiana, os microrganismos testados foram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e a técnica realizada foi a curva de sobrevivência e morte bacteriana. No teste para avaliar a cicatrização, foram usados 60 ratos adultos, da raça Wistar, nos quais foi feita uma lesão na região dorsal. As feridas foram tratadas diariamente de acordo com o grupo experimental. Para avaliação histopatológica, registros da avaliação macroscópica e coleta do tecido epitelial da lesão foram feitos nos dias: 1°, 5°, 9° e 17° após a cirurgia. Dos animais tratados foram coletados: cérebro, um dos rins, fígado, testículo, baço e sangue para quantificação de prata por espectrofotometria de absorção atômica. No teste de curva de sobrevivência e morte bacteriana, foi constatado que as formulações que continham bio-AgNP tiveram potente ação antimicrobiana. Referente à cicatrização, não foram observadas variações significativas entre as médias das áreas das lesões tratadas com as diferentes formulações em relação aos controles. Quanto ao acúmulo de prata nos diversos órgãos e no sangue, não houve diferença significativa entre os grupos controles e os grupos experimentais nos dias 1 e 17 após o tratamento, o que indica que os tratamentos com os produtos formulados não ocasionam acúmulo de prata no organismo. O produto formulado contendo bio-AgNP apresentou potente ação antimicrobiana, sem interferir na cicatrização, não resultando em acúmulo de prata, sendo uma alternativa para o tratamento de pacientes com feridas.

Palavras-chave: Cicatrização. Infecção. *In vivo*. Acúmulo de prata. Antibacteriano.

introdução

Infecções nas feridas de pacientes com queimaduras durante o tratamento são uma das mais temidas complicações, devido ao fato que na ausência de cuidados adequados, o ferimento torna-se um meio de cultura ideal para a colonização e proliferação de todos os tipos de microrganismos. A pele é uma barreira física contra micróbios, mas quando se encontra lesionada, o indivíduo fica susceptível à invasão microbiana¹.

O estado imunodeprimido dos pacientes com queimaduras, a ausência da barreira da pele, a longa estadia no hospital e as intervenções invasivas são fatores que contribuem para a ocorrência de infecções. Como medida profilática o tratamento com antibióticos é iniciado imediatamente após a suspeita de infecções. Porém o aumento da resistência é o maior obstáculo para o combate à infecção, sendo necessário uma terapia empírica com conhecimento prévio da prevalência de bactérias comuns e seu padrão de resistência a antibióticos nessa área².

A presença de bactérias na ferida gera uma competição por oxigênio e nutrientes com as células normais. Além disso, bactérias e produtos bacterianos, como endotoxinas e metaloproteinases, podem causar prejuízos em todas as fases de cicatrização de feridas³, prolongando o tempo de internação do paciente⁴ e aumentando os custos da internação⁵.

A adoção do uso de antibióticos tópicos, ocasionou diminuição significativa na ocorrência de infecções sistêmicas e na mortalidade dos pacientes⁶⁻⁸. Porém, são relatados casos de resistência à sulfadiazina de prata, produto utilizado para a prevenção de infecções em feridas⁹⁻¹¹. Devido aos problemas da resistência bacteriana à sulfadiazina de prata, novos estudos para alternativas no tratamento de feridas, são necessários. Dentre os novos estudos, podemos destacar o uso da nanotecnologia¹².

Os resultados de Scandorieiro e colaboradores¹⁷ demonstraram o potente efeito antibacteriano das nanopartículas de prata sintetizadas biologicamente pelo fungo *F. oxysporum* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas multirresistentes. Portanto, os objetivos desse trabalho foram formular um produto contendo bio-AgNP, avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos mesmos, sua atividade cicatrizante *in vivo* e por fim verificar se o tratamento tópico ocasiona acúmulo de prata nos órgãos dos animais tratados, viabilizando a utilização deste

composto no controle microbiano de feridas, principalmente no cuidado de pacientes com queimaduras.

Materiais e Métodos

Biossíntese das nanopartículas de prata

A biossíntese de nanopartículas foi realizada de acordo com a metodologia de Duran¹⁵, depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) (Pedido de registro de patente, 2006, PI 0605681-4A2; <http://www.inpi.gov.br>). Bio-AgNP foram obtidas após redução de prata iônica pelo *Fusarium oxysporum*, cepa 551, procedente da coleção de culturas do Laboratório de Genética Molecular da ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, Brasil). Finalmente, as nanopartículas de prata foram caracterizadas, sendo que o diâmetro foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern), e a medida do potencial zeta foi realizada utilizando o mesmo instrumento.

Preparação da formulação

O produto formulado nesse trabalho foi em gel, sendo o veículo dessa formulação uma fase líquida (água) e uma fase sólida (agentes gelificantes). Os produtos formulados foram: BASE (Gel contendo a fase líquida e a fase sólida, sem a presença de Bio-AgNP); F250 (Gel contendo 250 µM bio-AgNP); F500 (Gel contendo 500 µM bio-AgNP); os controles utilizados foram: CTL (solução fisiológica 0.9 %) e SD (Sulfadiazina de prata 1 %); O potencial hidrogênio iônico (pH) das formulações fora medido e estabilizado entre 5,5 e 6,5, que corresponde ao pH ideal da pele¹⁶.

Amostras Bacterianas

As amostras testadas foram: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. As amostras estocadas em meio BHI (Brian Heart Infusion) com 20% de glicerol e armazenados à -20 °C, foram reativadas após semeadura em ágar BHI e incubação à 36,5°C por 18 h.

Curva de Sobrevivência e Morte

Primeiramente, foram adicionados 500 mg dos produtos na placa de Petri para os testes e 500µL de salina na placa de controle negativo, em seguida utilizando a alça de Drigalski o produto foi distribuído por toda a placa formando uma camada homogênea. Posteriormente, 10^8 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro) foram estimadas utilizando a escala 0,5 de McFarland e feita uma diluição de 1:10 em PBS adquirindo um inóculo de 10^7 UFC/mL. Então 100 µL de bactérias 10^7 UFC/mL foram inoculadas, utilizando Drigalski, em todas as placas, inclusive no controle negativo. Nos tempos 0 h, 30 min, 2 h, 8 h e 24 h foram feitas lavagens utilizando 1 mL de PBS para recuperação das células bacterianas. A carga bacteriana recuperada foi diluída em soro fisiológico e semeada em ágar nutriente para determinar UFC/mL.

Atividade Cicatrizante

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso médio de 250 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram acondicionados no biotério, em gaiolas individuais, em ambiente de luz (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura controladas ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), e receberam livre acesso à água potável e ração. O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEL, protocolo n° 22730.2015.98.

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em 5 grupos de 12 animais. Estes foram subdivididos de acordo com o período de morte (1° dia, 5° dia, 9° dia e 17° dia) com 3 animais em cada subgrupo¹⁷⁻¹⁹. Os grupos experimentais foram: CTL (Controle negativo – solução salina 0,9%); SD (Sulfadiazina de Prata - AZICERIO®); BASE (Gel contendo a fase líquida e a fase sólida, sem a presença de Bio-AgNP); F250 (Gel contendo 250 µM bio-AgNP) e F500 (Gel contendo 500 µM bio-AgNP).

Os animais tiveram a ração suspensa por quatro horas antes dos procedimentos cirúrgicos, porém permaneceram com ingestão de água liberada. Depois, os ratos foram pesados para a determinação da quantidade de solução anestésica a ser empregada em cada animal, e em seguida os mesmos foram anestesiados via intraperitoneal com associação de ketamina (45 mg/mL) e xilazina (7 mg/mL) em associação na dose de 0,16 mL/100 g de peso corpóreo, quando atingido o plano anestésico, foram posicionados sobre prancha cirúrgica, em

decúbito ventral e imobilizado por fita elástica. Primeiramente, foi realizada a depilação da região dorso costal em área de aproximadamente 6 cm² ¹⁷⁻²⁰.

Para a técnica operatória foi utilizado um bisturi contendo lâmina cortante na extremidade inferior. O procedimento cirúrgico consistiu na excisão total da pele com 4 cm² no centro da área depilada até a exposição da fáscia muscular dorsal. A hemostasia foi feita por meio de compressão, utilizando-se gazes ¹⁷⁻²⁰.

Concluído o ato operatório, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais e as primeiras aplicações tópicas foram realizadas. No Grupo controle negativo foram aplicados 500 µL de salina 0,9%, nos demais grupos foram aplicados 500mg de produto formulado de acordo com o delineamento experimental. Os animais receberam o analgésico paracetamol (200 mg/mL), dose 200 mg/Kg de peso corpóreo, por 5 dias via gavagem com o objetivo de aliviar as dores, reduzindo o desconforto e o estresse a que foram submetidos ¹⁷⁻²¹.

Todos os animais, após o término dos protocolos experimentais foram eutanasiados por decapitação. Imediatamente após a decapitação, o sangue foi coletado em tubos contendo heparina para quantificação do acúmulo de prata. Amostras de fígado, baço, cérebro e rins dos animais dos grupos CTL, SD, Fbio-AgNP1 e Fbio-AgNP2, foram retiradas após a decapitação, para quantificação do acúmulo de prata.

Os animais tiveram suas lesões fotografadas por câmera digital Moticam (Motic, Xiamen, China). Os dados obtidos diariamente foram registrados e posteriormente submetidos ao programa computacional MOTIC® [Moticam (Motic, Xiamen, China)] no qual o objeto a ser mensurado foi determinado e medido.

Análise Histopatológica

Os órgãos coletados foram fixados em solução de Bouin por 48 h e seguida foi realizada a desidratação e inclusão dos órgãos. As peças incluídas foram fixadas em cassetes apropriados e destinadas à microtomia. Foram realizados cortes de 7 µm de espessura em micrótomo (CUT 5062, SLEE MAINZ®). Os cortes obtidos foram colocados em lâmina histológica de vidro. As lâminas foram submetidas a coloração de Hematoxilina e Eosina. As observações e a análise histológica foram realizadas em sistema de captura de imagens Moticam (Motic, Xiamen, China) acoplado ao fotomicroscópio (Motic, Xiamen, China).

A partir da análise em aumento de 100 vezes, apurou-se a quantidade de vasos sanguíneos e de células inflamatórias presentes em cada corte. No momento da captura, foram demarcados quadrantes com área de 250 μm^2 , sendo utilizada uma área total de 1000 μm^2 para a contagem de células inflamatórias por animal, utilizando quadrantes que não foram contabilizados vasos sanguíneos. A partir do plug-in 'Cell Counter' do software ImageJ 1.50i²² contabilizou-se o número de células inflamatórias total, diferenciando-as de outros tipos celulares a partir das características do núcleo.

Colonização das feridas

Nos dias 1°, 5°, 9° e 17° após a injúria foram coletadas amostras de *swab* das feridas, afim de avaliar a colonização das feridas nos diferentes tratamentos. Todas as amostras foram coletadas através de *swab* estéril, umedecido com solução salina 0,85%, sendo então semeadas em placas de Petri contendo BHI ágar, e cultivadas 24 h em estufa incubadora a 36,5 °C. Após crescimento foi determinada a UFC/mL.

Bioacúmulo de prata

As amostras de fígado, cérebro, baço, rim, testículo e células sanguíneas foram secas em estufa (60 °C) e posteriormente digeridas à 60 °C, durante 48 h, em solução de ácido nítrico 5N. Após a digestão, o material foi centrifugado (20 min à 1000 r.c.f) e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da quantidade de prata²³ por Espectrofotômetro de Absorção Atômica (AAAnalyst 700, PerkinElmer®).

Análise Estatística

A estatística foi realizada pelo ANOVA um fator e teste de Tukey, com auxílio do *software* R, versão 3.1.0 (*Foundation for Statistical Computing*, Viena, Áustria). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

As nanopartículas de prata apresentaram faixa de diâmetro de 81,25 nm. A faixa de potencial Zeta foi de - 36,4 mV, indicando boa estabilização da suspensão metálica.

Na curva de sobrevivência e morte, os controles bacterianos não tratados mostraram que as células microbianas estavam viáveis, havendo manutenção

populacional com o decorrer do tempo de incubação. Além disso, para todas as amostras testadas a BASE não apresentou redução significativa na quantidade de bactérias ($p > 0,05$), já que não possui nenhuma substância com atividade antibacteriana. Para a bactéria *E. coli* ATCC 25922 (Figura 1), SD apresentou atividade bactericida após 8 h de tratamento, já a formulação F250 inibiu totalmente o crescimento em 24 h e a formulação F500 apresentou atividade bactericida em 8h. Para a bactéria *S. aureus* ATCC 25923 (Figura 2), a SD reduziu totalmente a população bacteriana em 2 h, já a composição F250 apresentou redução significativa na densidade celular ($p < 0,05$) em 8 h e por fim a F500 apresentou total inibição de viabilidade celular em 8 h. Para a bactéria *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Figura 3), a SD reduziu 5,2 log da população bacteriana ($p < 0,05$) entre 2 h e 8 h, e levou a total eliminação de células viáveis no tempo de 8h, já a formulação F250 inibiu completamente o crescimento bacteriano em 24 h e F500 apresentou atividade bactericida em 8 h.

Referente ao processo de cicatrização, não foram observadas variações significativas ($p > 0,05$) entre as médias das áreas das lesões nos diferentes grupos BASE, F250 e F500 em relação à CTL e a SD (Tabela 1 e Figuras 4 e 5). A partir dos resultados obtidos, as formulações F250 e F500 demonstraram diminuição da área da ferida similar a SD, produto utilizado hoje no tratamento de feridas em pacientes com queimaduras. Os grupos CTL e SD apresentaram em média uma redução de 3,69 cm² para 0,20 cm² (94,54 %) e 4,32 cm² para 0,21 cm² (95,14 %) respectivamente. A retração do tamanho da área das feridas dos animais do grupo BASE foi em média de 4,97 cm² para 0,26 cm² (94,76 %), e por fim os grupos F250 e F500 apresentaram redução média de 3,65 cm² para 0,07 cm² (97,87 %) e 4,94 cm² para 0,20 cm² (95,95 %) (Tabela 1 e Figuras 4 e 5).

Referente à análise histopatológica (Figura 6, 7 e 8), no primeiro dia após a injúria, todos os grupos mostraram a predominância de células inflamatórias, e a presença de poucos vasos sanguíneos. No quinto dia, houve uma dominância de células inflamatórias e o início do aumento do número de vasos sanguíneos (Figura 9). No nono dia, todos os grupos mostraram decréscimo no número de células inflamatórias e o aumento na quantidade de vasos sanguíneos (Figura 9). No décimo sétimo dia, ocorreu a redução no número de células inflamatórias e vasos sanguíneos (Figura 9). Quantitativamente pode ser considerada a presença de efeitos cicatrizante nos diferentes tratamentos, devido as seguintes observações:

proliferação vascular aumentada a partir do 5 dia após o início do tratamento e com o pico ocorrendo no 9º dia; e presença de infiltrado inflamatório aumentado no primeiro dia e no quinto dia após tratamento, reduzindo nos dias subsequentes. Não foi observada diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

A cultura bacteriana da ferida (Figura 10) apresentou crescimento de microrganismos desde o primeiro dia após a lesão nos grupos CTL, SD, BASE, F250 e F500. O crescimento bacteriano no grupo CTL foi de aproximadamente 10^3 e 10^4 UFC/mL; no grupo SD o crescimento ficou entorno de 10^2 UFC/mL no início e aumentando no decorrer dos dias de experimento; os animais do grupo F250 tiveram cultura positiva da ferida próxima a 10^4 UFC/mL no início e apresentou decréscimo para 10^2 UFC/mL, apresentando desempenho inferior a SD no começo do tratamento; porém o grupo F500 apresentou crescimento próximo a 10^2 UFC/mL durante os primeiros dias, e 10 UFC/mL nos dias 9 e 17 após a lesão, mostrando ser a melhor alternativa no que se refere a proteção da ferida contra microrganismos.

A quantificação de prata foi realizada nos animais do grupo CTL, SD, F250 e F500 após 1 e 17 dias de tratamento (Figura 11). Em nenhum dos casos foi constatada concentrações de Ag significativamente maiores ($p > 0,05$), em relação ao CTL. Os ratos do grupo CTL no primeiro dia de tratamento apresentaram maior acúmulo de Ag no rim, seguido do fígado, baço, testículo, cérebro e sangue, variando de 0,059 a 0,340 μg de Ag por grama de tecido. Já no 17º dia de tratamento, os animais do grupo CTL apresentaram maior acúmulo de Ag no fígado, no baço, no cérebro, no testículo, no rim e no sangue, apresentando em média 0,024 a 0,228 μg de Ag por grama de tecido. No grupo SD após 1 dia de tratamento houve em média um acúmulo de 0,1549 a 0,420 μg de Ag por grama de tecido, sendo que o maior acúmulo ocorreu no fígado. Após 17 dias de tratamento verificou em média um acúmulo de 0,083 a 0,300 μg de Ag por grama de tecido, e o fígado o órgão com maior quantidade desse metal. Os animais do grupo F250 apresentaram em média uma variação de 0,357 a 0,080 μg de Ag por grama de tecido no início do tratamento, o que não obteve grandes alterações após 17 dias de tratamento, cuja a média foi 0,191 a 0,0455 μg de Ag por grama de tecido. Os animais do grupo F500 apresentaram em média uma variação de 0,223 a 0,049 μg de Ag por grama de tecido (Figura 11) no início do tratamento, o que não obteve grandes alterações

após 17 dias de tratamento, cuja a média foi 0,177 a 0,061 µg de Ag por grama de tecido.

Discussão

A nanotecnologia é um campo importante da pesquisa moderna que se refere ao projeto, síntese e manipulação de estruturas de partículas que variam de aproximadamente 1-100 nm. A síntese de nanopartícula de prata pode ser realizada por métodos químicos, físicos e biológicos. Os métodos químicos envolvem o uso de produtos químicos tóxicos que poluem o meio ambiente e são prejudiciais para os animais²⁴. Por outro lado, os métodos físicos não envolvem produtos químicos tóxicos e geralmente envolvem procedimentos rápidos, no entanto, uma grande desvantagem é o alto consumo de energia para a sua produção. Já na síntese biológica de nanopartícula de prata, a grande vantagem é que os agentes redutores e estabilizadores tóxicos são substituídos por moléculas não-tóxicas (proteínas, carboidratos, antioxidantes, etc.) produzidas por organismos vivos, incluindo bactérias, fungos, leveduras e plantas²⁶.

No método de Curva de sobrevivência e morte bacteriana, a formulação BASE não apresentou diminuição significativa da densidade populacional bacteriana, apresentando comportamento similar ao controle negativo, uma vez que nessa formulação não havia nenhum composto com ação antimicrobiana.

A SD apresentou diminuição significativa da densidade populacional bacteriana, pois a sulfadiazina de prata é o agente antibiótico tópico mais comumente usado para a profilaxia de infecções nas feridas de pacientes ambulatoriais e hospitalizados com queimadura. Este agente é uma combinação de sulfadiazina de sódio e nitrato de prata. O íon de prata se liga ao ácido nucleico do microrganismo, liberando a sulfadiazina, que então interfere com o metabolismo do microbiano²⁷. A sulfadiazina de prata tem excelente cobertura antibacteriana, porém já foram relatados casos de resistência²⁸.

Os produtos que continham em sua formulação bio-AgNP tiveram potente ação antimicrobiana, resultados que corroboram com Scandorieiro¹⁴. O mecanismo pelo qual as nanopartículas de prata exercem sua atividade antibacteriana ainda não está totalmente esclarecido. Estudos indicam que nanopartículas de prata aumentam a permeabilidade da membrana celular, inativam enzimas, interfere nos níveis de

ATP intracelular, causam danos ao DNA e induzem formação de espécies reativas de oxigênio²⁹⁻³³.

Referente à cicatrização, não foram observadas variações significativas entre as médias das áreas das lesões tratadas com BASE, F250 e F500 em relação ao CTL e a SD, portanto nesse aspecto, os produtos não interferiram na cicatrização e tiveram ação similar com SD, produto utilizado hoje na profilaxia contra infecção em pacientes com feridas.

O tratamento com a BASE apresentou redução igual a todos os outros grupos de tratamento, isso ocorreu devido à grande hidratação que o gel forneceu a pele, ressaltando a importância da hidratação das feridas³⁴. Os grupos F250 e F500 apresentaram uma tendência a reduzir o tempo de cicatrização das feridas, como mostram outros estudos que relatam que a nanopartícula de prata é um curativo ideal, já que atua como uma barreira para microrganismos, remove excesso de exsudato, não é tóxica, não causar alergia, é fácil remoção e promotor da cicatrização³⁵.

O processo de cicatrização é dividido em três fases principais: inflamatória, proliferação e remodelamento da cicatriz³⁶⁻³⁸.

A fase inflamatória inicia-se após o aparecimento da lesão, com a ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de seus constituintes. No primeiro momento, a resposta local é voltada para a contenção desse extravasamento, liberação local de mediadores inflamatórios que requisitaram neutrófilos e macrófagos³⁹⁻⁴¹. As células inflamatórias constituem a primeira linha de defesa do organismo, sendo essenciais no combate contra agentes infecciosos, são observados principalmente na primeira semana após a lesão e podem persistir caso houver infecção da ferida. Em nosso trabalho o processo inflamatório, é muito evidenciado em todos os grupos no primeiro dia e quinto dia de tratamento. Esse resultado condiz com o processo de recuperação de feridas, que se inicial com a fase inflamatória^{17,19,45}.

Na fase proliferativa ocorre o processo de angiogênese, que se refere ao crescimento de novos vasos (neovascularização). A formação de novos vasos é importante nesse estágio pois permite o transporte de oxigênio e nutrientes para o local da lesão³⁷. Em nosso trabalho o processo de neovascularização começou a ficar evidente a partir do quinto dia de lesão e teve seu ápice no nono dia da lesão, conforme a lesão evoluía para a cura a evidência de vasos reduziu.

As feridas abertas por apresentarem ausência de um epitélio intacto se tornam um ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos^{1,46}. Em nosso trabalho, a FbioAgNP1 e 2 apresentaram contagem bacterianas da ferida inferiores ao CTL e SD, mostrando minimizar a presença bacteriana da ferida, evitando e prevenindo a contaminação e colonização das feridas. Finalmente, as nanopartículas de prata desempenham um papel na prevenção da infecção e na diminuição da carga bacteriana na ferida por suas propriedades antimicrobianas de amplo espectro⁴⁷, característica evidenciada nos resultados da colonização da ferida.

Quanto ao acúmulo de prata nos diversos órgãos e no sangue, não houve diferença significativa entre o grupo CTL e os grupos experimentais nos dias 1 e 17 após o tratamento, o que indica que o tratamento com SD e os produtos formulados com bio-AgNP não ocasionaram acúmulo de prata no organismo quando usado pelo período de 17 dias. Bulzulokov e colaboradores⁴⁸ utilizaram a administração intragástrica de nanopartícula de prata e verificaram o bioacúmulo no fígado, rim, baço, coração, gônadas, cérebro e sangue, sendo o maior conteúdo de nanopartícula de prata encontrado no fígado. Segundo os autores, apesar da detecção de nanopartícula de prata nos órgãos e tecidos, o conteúdo de Ag encontrado está abaixo da concentração considerada citotóxica. Porém nosso trabalho é o primeiro relato de quantificação de Ag pela técnica de espectrofotometria de absorção atômica em vários órgãos quando a nanopartícula é administrada por via tópica, e ficou evidenciado não ocorrer o acúmulo de Ag quando a nanopartícula é utilizada pelo período de 17 dias.

Os produtos formulados contendo bio-AgNP são uma possível alternativa ao tratamento de feridas, uma vez que apresentam ótima atividade antibacteriana, podendo auxiliar no combate a infecção em pacientes com feridas; além disso não interferem no processo de cicatrização e não geram acúmulo de prata na corrente sanguínea, fígado, rim, cérebro e testículo dos animais tratados.

References

1. M. Saaq, S. Ahmad, and M. S. Zaib, Burn Wound Infections and Antibiotic Susceptibility Patterns at Pakistan Institute of Medical Sciences, Islamabad, Pakistan. *World Journal of Plastic Surgery*. 4, 9-15 **(2015)**.
2. N. Perween, S. K. Prakash, and O. Siddiqui, Multi Drug Resistant Klebsiella Isolates in Burn Patients: A Comparative Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 9, DC14-DC16 **(2015)**.
3. R. Warriner, and R. Burrell, Infection and the Chronic Wound: A Focus on Silver. *Advances in skin & Wound care*. 18, 2-12 **(2005)**.
4. L. J. Bessa, P. Fazii, M. Di Giulio, and L. Cellini, Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *International Wound Journal*. 12, 47-52 **(2015)**.
5. C. V. Pollack Jr, A. Amin, W. T. Ford Jr, R. Finley, K. S. Kaye, H. H. Nguyen, et al. Acute bacterial skin and skin structure infections (ABSSSI): practice guidelines for management and care transitions in the emergency department and hospital. *The Journal of Emergency Medicine*. 48, 508-519 **(2015)**.
6. T. P. L. H. Brown, L. C. Cancio, A. T. McManus, and A. D. Mason, Survival Benefit Conferred by Topical Antimicrobial Preparations in Burn Patients: A Historical Perspective. *The Journal of Trauma® Injury, Infection, and Critical Care*. 56, 863-866 **(2004)**.
7. E. Chipp, C. S. Milner, and A. V. Blackburn, Sepsis in Burns: A Review of Current Practice and Future Therapies. *Annals Plastic Surgery*. 65, 1-9 **(2010)**.
8. L. C. D'Avignon, K. K. Chung, J. R. Saffle, E. M. Renz, and L. C. Cancio, Prevention of Infections Associated with Combat-Related Burn Injuries. *The Journal of Trauma® Injury, Infection, and Critical Care*. 71, 282-289 **(2011)**.
9. J. P. Heggors, and M. C. Robson, The emergence of silver sulphadiazine resistant pseudomonas aeruginosa. *Burns*. 5, 184-187 **(1978)**.
10. S. M. Modak, and C. L. Fox, Sulfadiazine Silver-Resistant Pseudomonas in Burns New Topical Agents. *Archives of Surgery*. 116, 854-857 **(1981)**.
11. A. Japoni, M. Hayati, A. Alborzi, S. Farshad, and S. A. Abbasian, In vitro Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from a Burn Center to Silver Sulfadiazine and Silver Nitrate in Shiraz, South of Iran. *Iran Journal Medical Science*. 30, 63-67 **(2005)**.

12. J. Tian, K. K. Y. Wong, C. M. Ho, C. N. Lok, W. Y. Yu, C. M. Che, et al. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. *ChemMedChem Journal*. 2, 129-136 (2007).
13. A. E. Krausz, B. L. Adler, V. Cabral, M. Natavi, M. S. Doerner, R. Charafeddine, et al. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 11, 195-206 (2015).
14. S. Scandorieiro, L. C. Camargo, C. A. Contreras, S. F. Yamada-Ogatta, C. V. Nakamura, A. G. O. Junior, et al. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug resistant bacterial strains. *Frontiers in Microbiology*. 7, 760. (2016).
15. N. Durán, P. D. Marcato, O. L. Alves, G. I. H. Souza, and E. Esposito, Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of Nanobiotechnology*. 3, 8 (2005).
16. C. Prakash, P. Bhargava, S. Tiwari, B. Majumdar, and K. Bhargava, Skin surface pH in acne vulgaris: Insights from an observational study and review of the Literature. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 10, 33-39 (2017).
17. I. D. Garros, A. C. L. Campos, E. M. Tâmbara, S. B. Tenório, O. J. M. T. Torres, M. A. Agulham, et al. Extract from *Passiflora edulis* on the healing of open wounds in rats: morphometric and histological study. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 21, 55-65 (2006).
18. E. Amorim, J. E. F. Matias, J. C. U. Coelho, A. C. L. Campos, H. J. Stahlke Jr, J. R. R. T. Timi, et al. Topic use of aqueous extract of *Orbignya phalerata* (babassu) in rats: analysis of it's healing effect. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 21, 67-76 (2006).
19. M. K. H Okamoto, Estudo das atividades cicatrizante e antimicrobiana do extrato glicólico e gel de *Psidium guajava* L. e estudo da estabilidade do gel [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; (2010).
20. C. O. M. Fernandes, C. S. Lima, T. V. Lopes, S. R. Félix, S. V. Schons, C. G. Fernandes, et al. Utilização do óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) em feridas cutâneas de ratos Wistar. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 8, 147-159 (2014).
21. G. V. Schirato, O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. *Revista de Ciência Rural*. 36, 149-154 (2006).

22. Labno C. Two Ways to Count Cells with ImageJ. Disponível em: <https://www.unige.ch/medecine/bioimaging/files/3714/1208/5964/CellCounting.pdf>, Acesso em: 10 set de 2017.
23. C. R. B. Nascimento, W. E. Risso, and C. B. R. Martinez, Lead accumulation and metallothionein content in female rats of different ages and generations after daily intake of Pb-contaminated food. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 48, 272-277 (2016).
24. H. P. Borase, B. K. Salunke, R. B. Salunke, C. D. Patil, J. E. Hallsworth, B. S. Kim, et al. Plant Extract: A Promising Biomatrix for Ecofriendly, Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles. *Applied biochemistry and biotechnology*. 173, 1-29 (2014).
25. L. We, J. Lu, H. Xu, A. Patel, Z. Chen, G. Chen. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*. 20, 595-601 (2014).
26. S. Iravani, H. Korbekandi, S. V. Wirmohammadi, and B. Zolfaghari, Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research Pharmaceutical Sciences*. 9, 385-406 (2014).
27. A. B. Lansdown, Silver: Its antibacterial properties and mechanism of action. *Journal Wound Care*. 11, 125–130 (2002).
28. J. J. Gallagher, N. Williams-Bouyer, C. Villarreal, J. P. Heggors, and D. Herndon, Treatment of infections in burns. *Total burn care*. 136-176 (2007).
29. Q. L. Feng, L. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, and J. O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*. 52, 662-668 (2000).
30. P. Dibrov, J. Dzioba, K. K. Gosink, and C. C. Häse, Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46, 2668–2670 (2002).
31. C. N. Lok, C. M. Ho, R. Chen, Q. Y. He, W. Yu, H. Sun, et al. Proteomic Analysis of the Mode of Antibacterial Action of Silver Nanoparticles. *Journal of Proteome Research*. 5, 916-924 (2006).
32. W. R. Li, X. B. Xie, Q. S. Shi, H. Y. Zeng, Y. S. Yang, and Y. B. Chen, Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85, 1115–1122 (2010).
33. S. H. Kim, H. S. Lee, D. S. Ryu, S. J. Choi, and D. S. Lee, Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean Journal Microbiology Biotechnology*. 39, 77–85 (2011).

34. K. Ousey, K. F. Cutting, A. A. Rogers, and M. G. Rippon, The importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective. *Journal of Wound Care*. 25, 124-130. **(2016)**.
35. M. Konop, T. Damps, A. Misicka, and L. Rudnicka, Certain Aspects of Silver and Silver Nanoparticles in Wound Care: A Minireview. *Journal of Nanomaterials*. 2016, 1-10 **(2016)**.
36. S. H. Mandelbaum, E. P. Di Santis, and M. H. S. Mandelbaum, Cicatrization: current concepts and auxiliary resources. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 78, 393–410 **(2003)**.
37. C. A. Balbino, L. M. Pereira, and R. Curi, Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 41, 27-51 **(2005)**.
38. M. P. Rowan, L. C. Cancio, E. A. Elster, D. M. Burmeister, L. F. Rose, S. Natesan, et al. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical Care*. 19, 243 **(2015)**.
39. A. J. Singer, A. F. Richard, and M. D. Clark, Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*. 341, 738-746 **(1999)**.
40. J. Lefkovits, E. F. Plow, and E. J. Topol, Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptors in Cardiovascular Medicine. *The New England Journal of Medicine*. 332, 1553–1559 **(1995)**.
41. D. E. A. Komi, K. Khomtchouk, and P. L. Santa Maria, A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08729-w>. **(2019)**.
42. X. Liu, P. Lee, C. Ho, V. C. H. Lui, Y. Chen, C. Che, et al. Silver Nanoparticles Mediate Differential Responses in Keratinocytes and Fibroblasts during Skin Wound Healing. First published: <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900502> **(2010)**.
43. H.C. Wen, Y. N. Lin, S. R. Jian, S. C. Tseng, M. X. Weng, Y. P. Liu, et al. Observation of Growth of Human Fibroblasts on Silver Nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*. 61, 445–449 **(2007)**.
44. M. V. D. Z. Park, A. M. Neigh, J. P. Vermeulen, L. J. J de la Fonteyne, H. W. Verharen, J. J Briedé, et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*. 32: 36, 9810-9817 (2011).

45. H. Sorg, D. J. Tilkorn, S. Hager, J. Hauser, and U. Mirastschijski, Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*. 58, 81–94 **(2017)**.
46. R. Edwards, and K. G. Harding, Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 17,91-96 **(2004)**.
47. T. Gunasekaran, T. Nigusse, and M. D. Dhanaraju, Silver Nanoparticles as Real Topical Bullets for Wound Healing. *The Journal of the American College of Clinical Wound*. 3, 82-96 **(2011)**.
48. I. P. Buzulukov, E. A. Arianova, V. F. Demin, I. V. Safenkova, I. V. Gmoshinskiĭ, and V. A. Tutel'ian, Bioaccumulation of silver and gold nanoparticles in organs and tissues of rats by neutron activation analysis. *Izv Akad Nauk Ser Biol*. 3, 286-95 **(2014)**.

Figuras e Tabelas

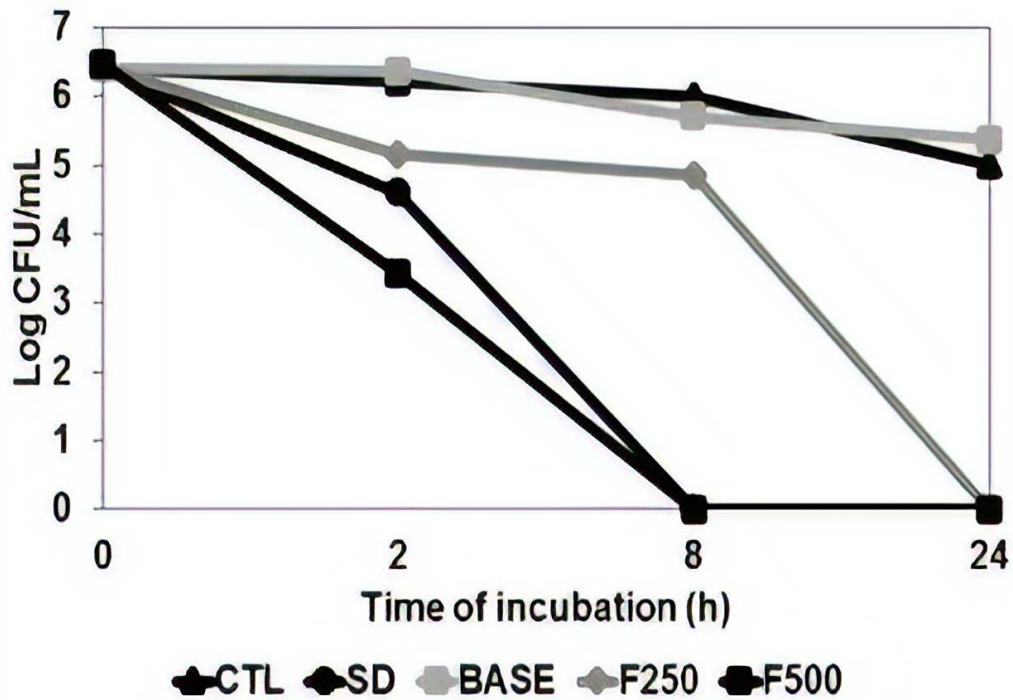


Figura 1. Efeito da atividade antibacteriana dos produtos formulados frente a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922. Não houve diferença significativa entre os resultados encontrados ($p > 0.05$).

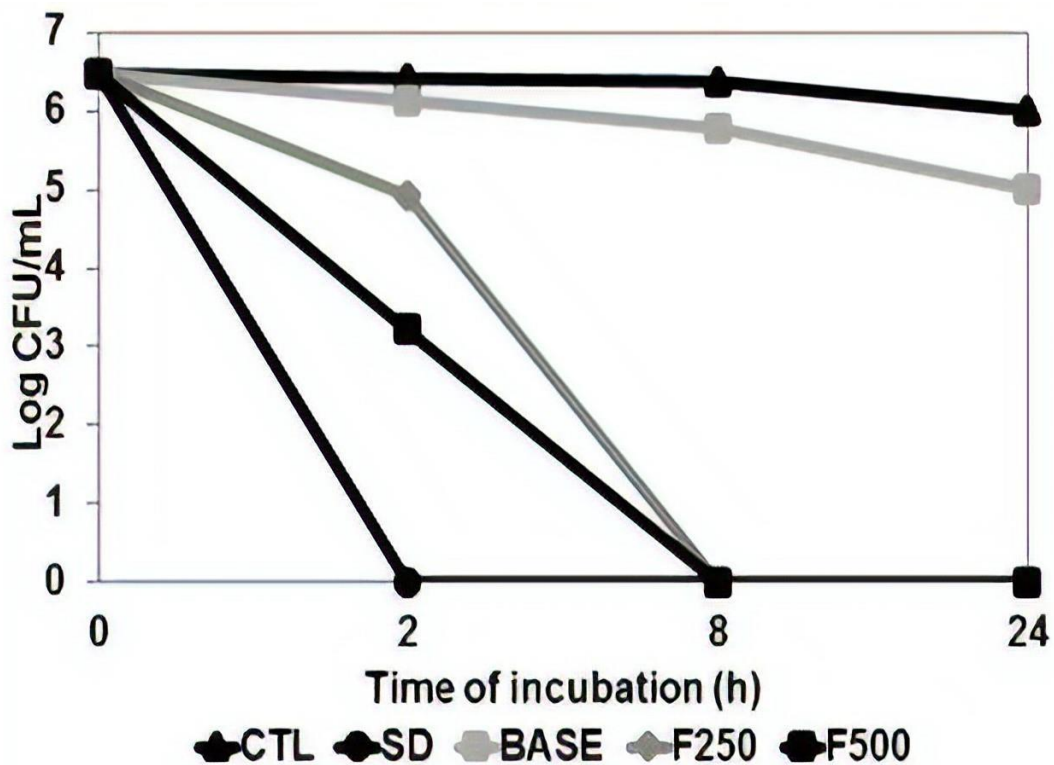


Figura 2. Efeito da atividade antibacteriana dos produtos formulados frente a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Não houve diferença significativa entre os resultados encontrados ($p > 0.05$).

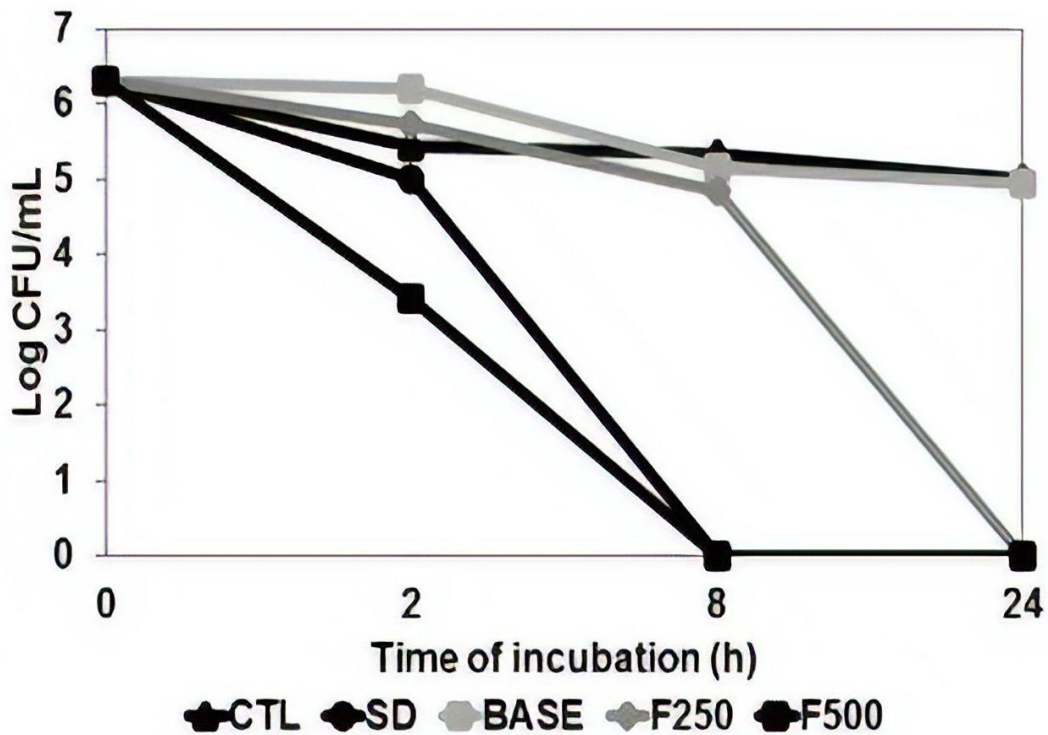


Figura 3. Efeito da atividade antibacteriana dos produtos formulados frente a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Não houve diferença significativa entre os resultados encontrados ($p > 0.05$).

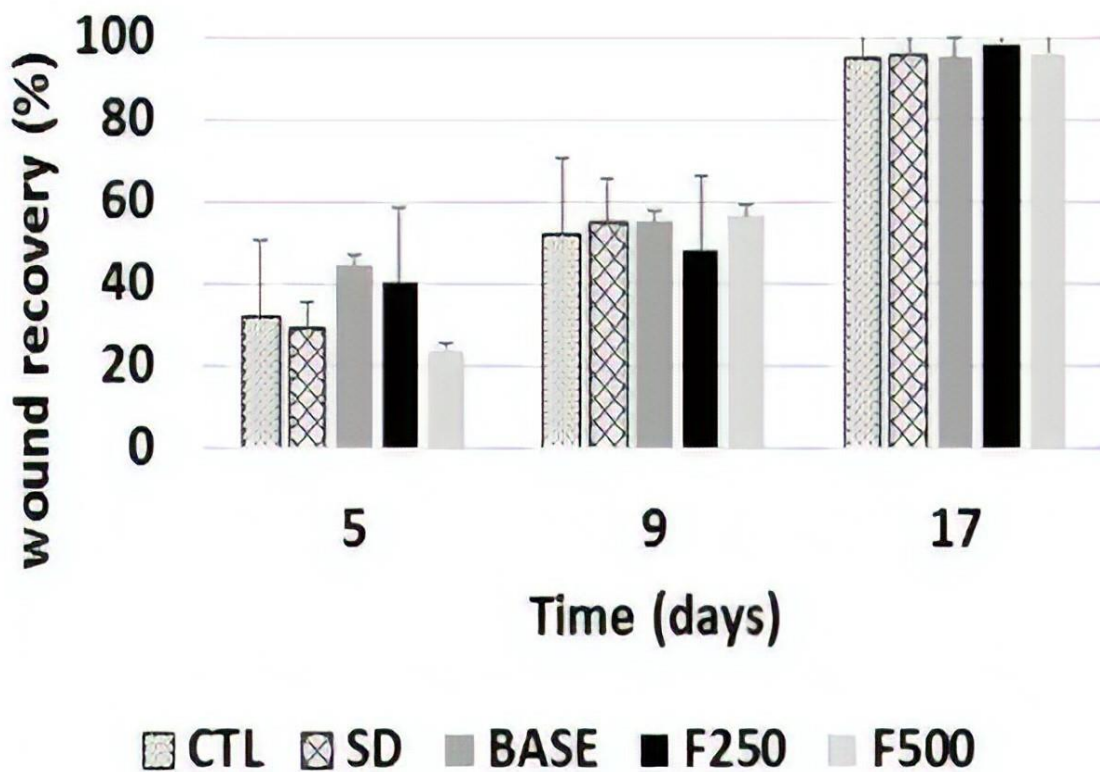


Figura 4. Recuperação da lesão em porcentagem de acordo com o tamanho inicial da ferida nos dias 1, 5, 9 e 17 de tratamento. Não houve diferença significativa entre os resultados encontrados ($p > 0.05$).

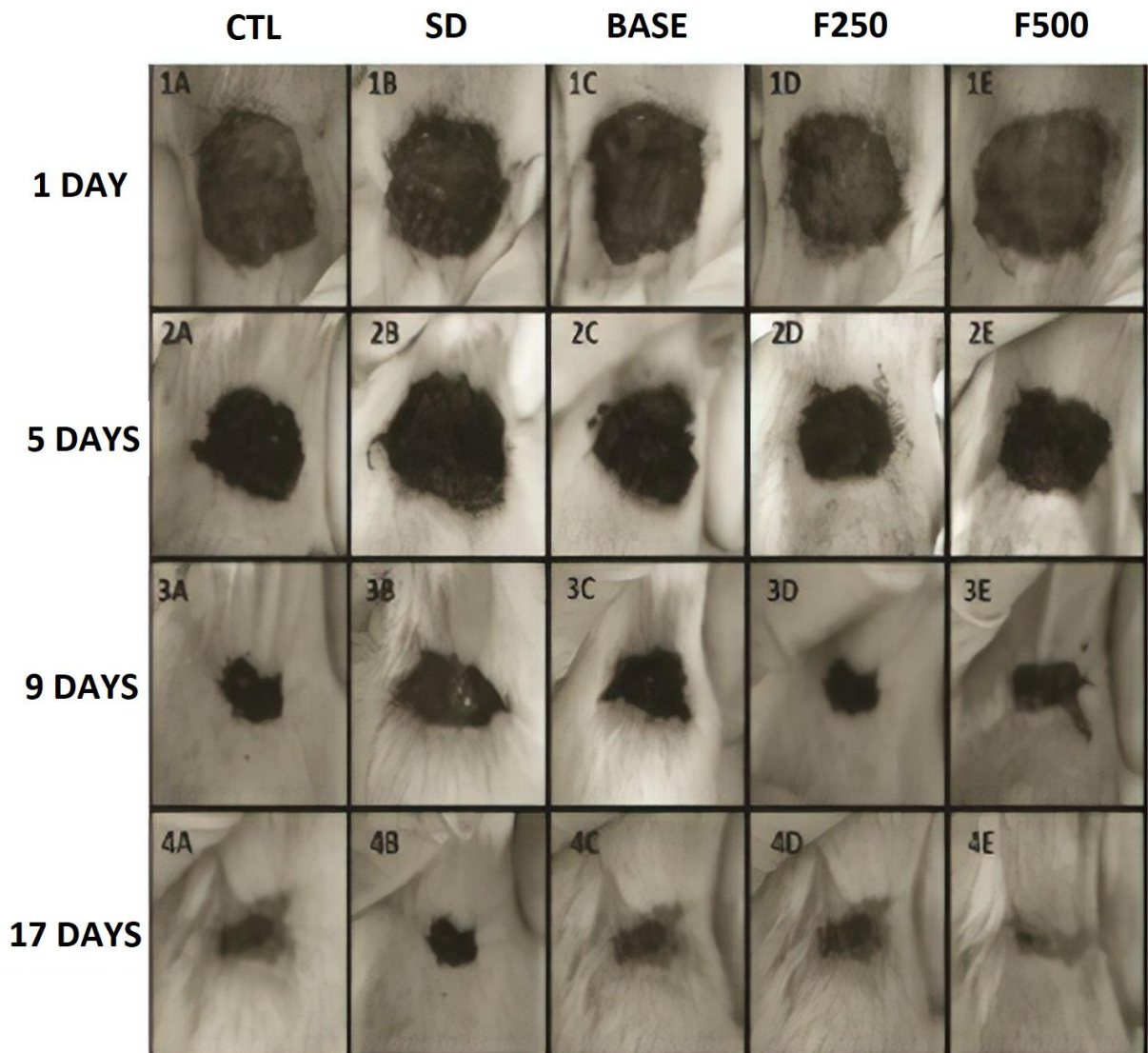


Figura 5. Tamanho da lesão em ratos, após incisão dorsal e tratamento. 1A, 2A, 3A 4A. Tamanho da lesão após tratamento com SD durante 1 dia, 5 dias, 9 dias e 17 dias respectivamente. 1B, 2B, 3B e 4B. Tamanho da lesão após tratamento com SD durante 1 dia, 5 dias, 9 dias e 17 dias respectivamente. 1C, 2C, 3C e 4C. Tamanho da lesão após tratamento com BASE durante 1 dia, 5 dias, 9 dias e 17 dias respectivamente. 1D, 2D, 3D e 4D. Tamanho da lesão após tratamento com F250 durante 1 dia, 5 dias, 9 dias e 17 dias respectivamente. 1E, 2E, 3E e 4E. Tamanho da lesão após tratamento com F500 durante 1 dia, 5 dias, 9 dias e 17 dias respectivamente.

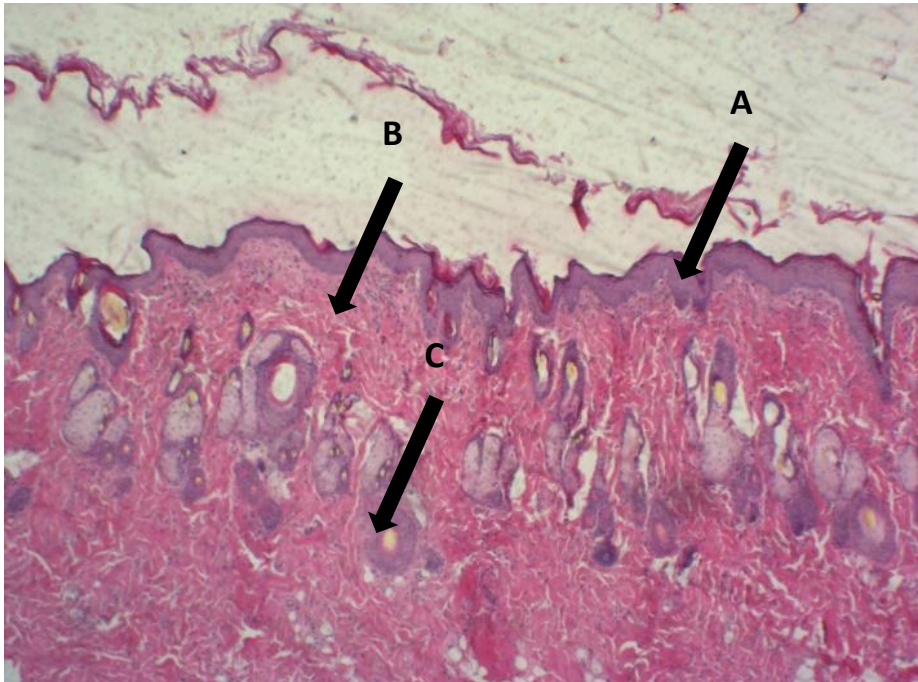


Figura 6. Eosina e hematoxilina no grupo CTL. A. Epiderme; B. Derme; C. Vasos sanguíneos.

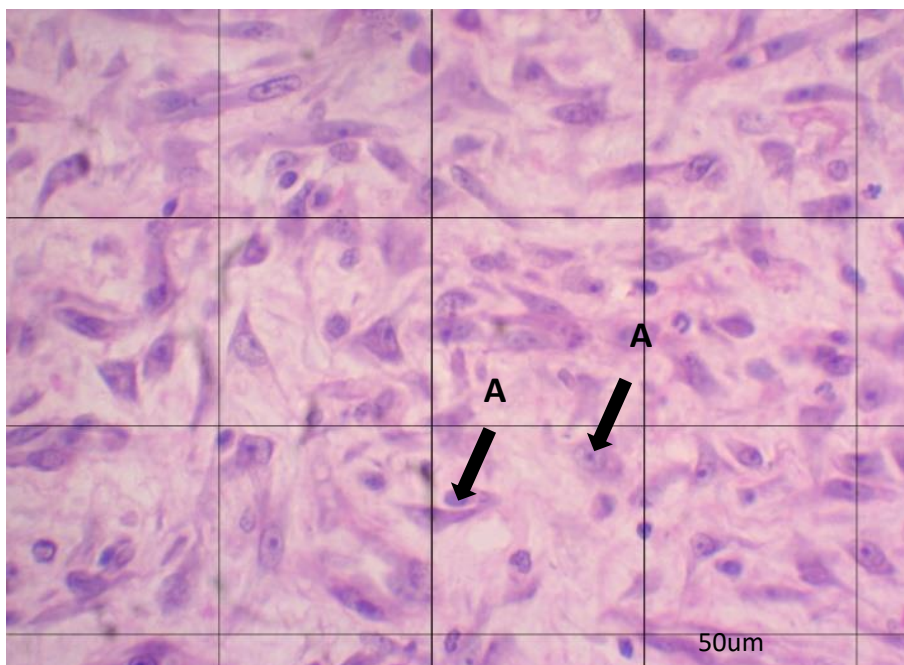


Figura 7. Eosina e hematoxilina no grupo CTL (40x). A. Células inflamatória.

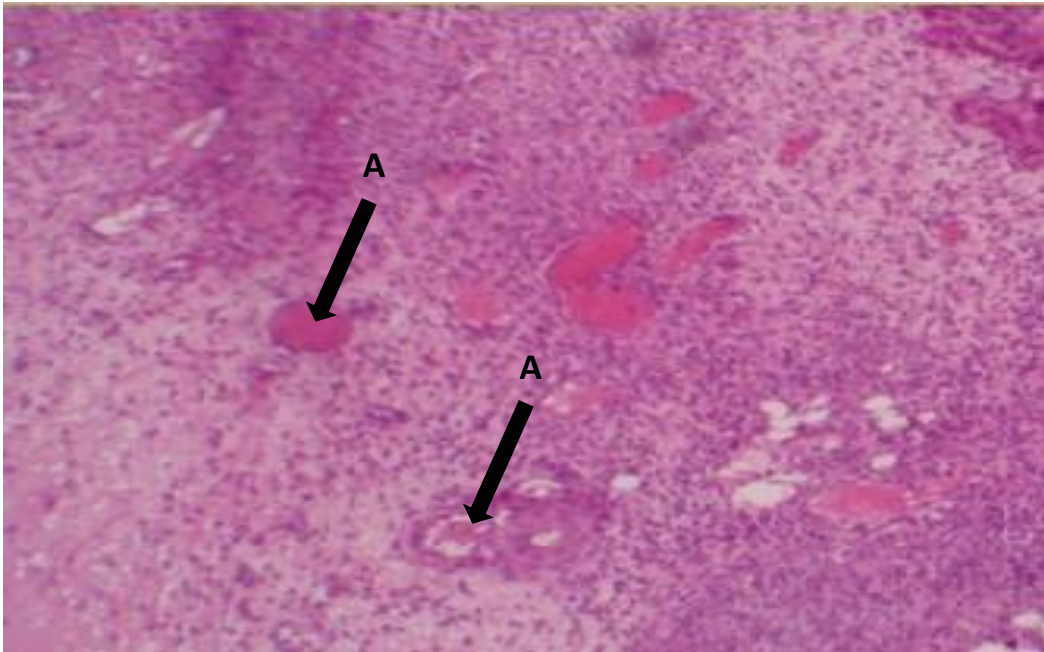


Figura 8. Eosina e hematoxilina no grupo CTL. A. Vasos Sanguíneos.

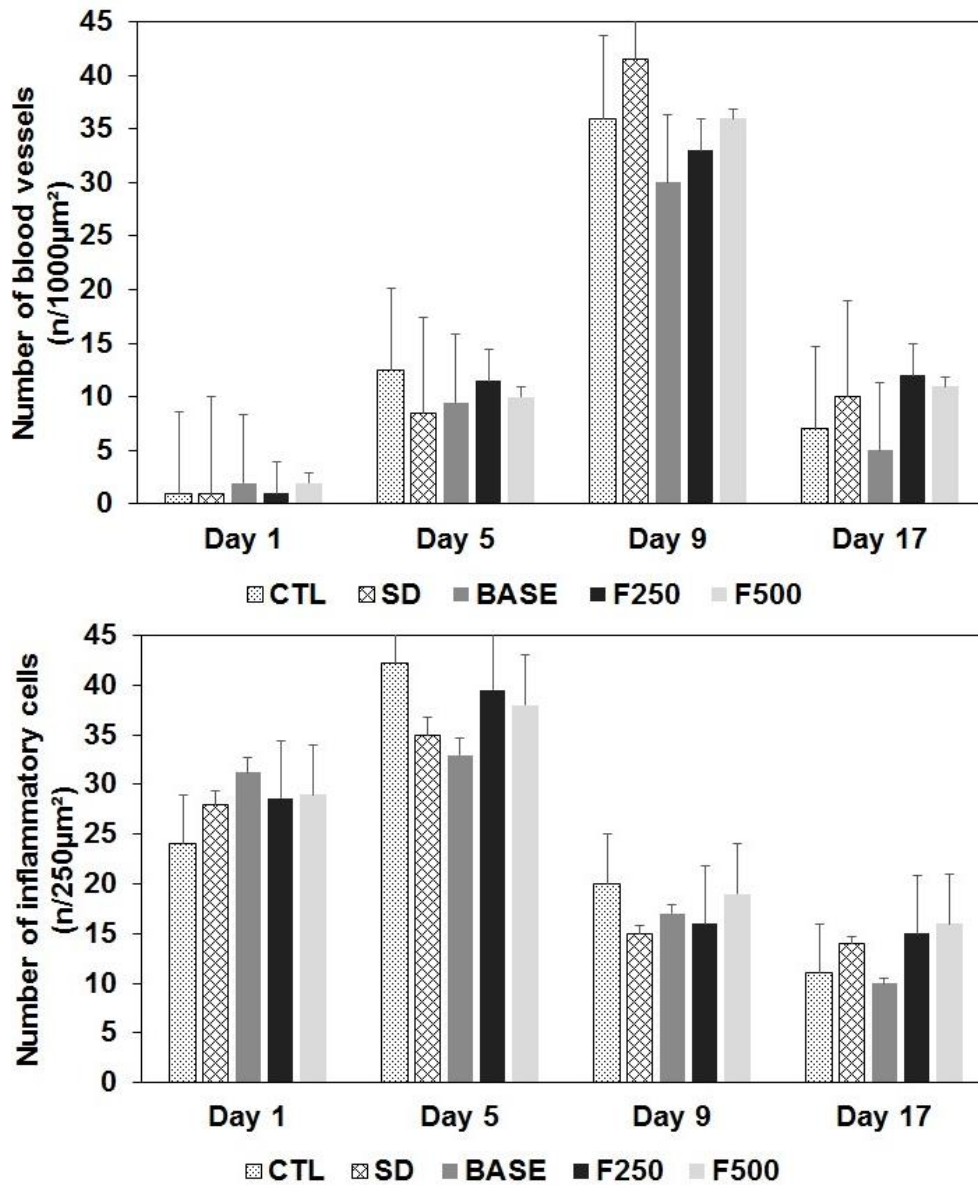


Figura 9. Resultados da quantificação de prata por espectrofotometria de absorção atômica nos diferentes grupos durante os dias 1 e 17 de tratamento. Resultados expressos em nanograma por grama de tecido.

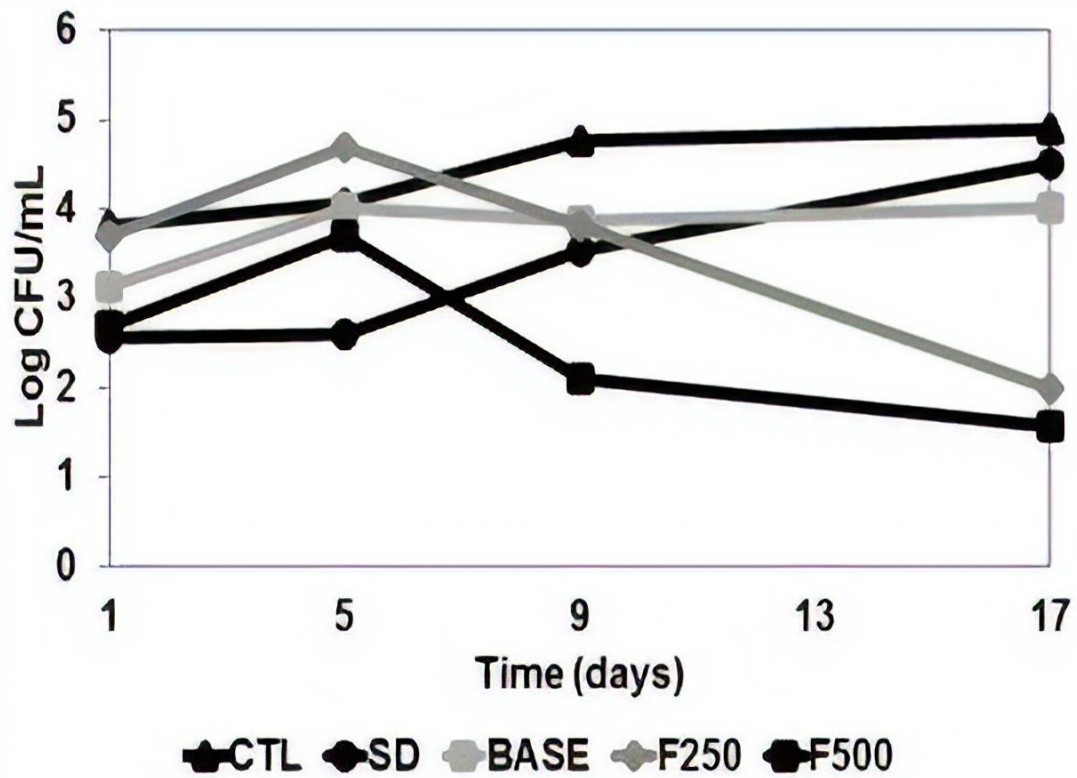


Figura 10. Presença de microrganismos nas feridas durante os 17 dias de tratamento. Não houve diferença significativa entre os resultados encontrados ($p > 0.05$).

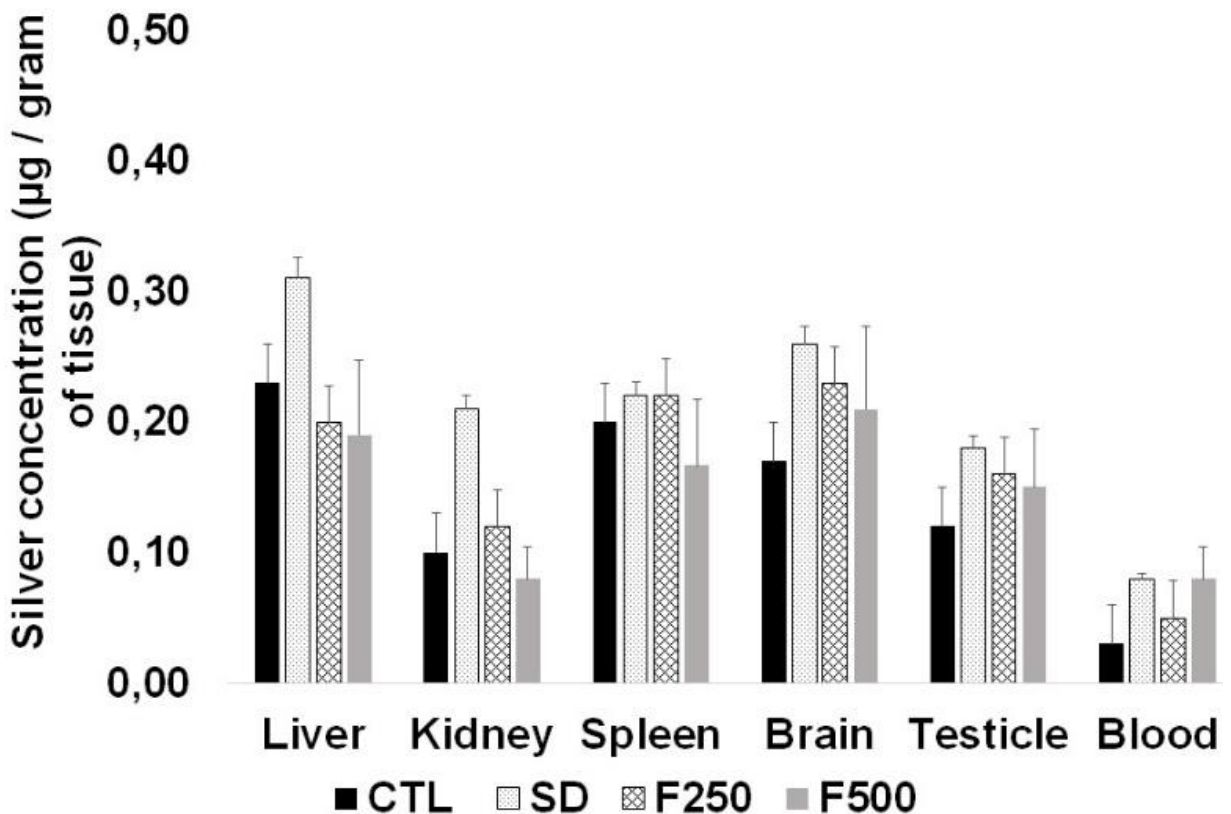


Figura 11. Resultados da quantificação de prata por espectrofotometria de absorção atômica nos diferentes grupos durante os dias 1 e 17 de tratamento. Resultados expressos em nanograma por grama de tecido. Não houve diferença significativa entre os resultados encontrados ($p > 0.05$).

Group	Mean (cm ²) + Standard Deviation			
	Day 1	Day 5	Day 9	Day 17
CTL	3.69 ± 0.61	2.51 ± 0.37	1.21 ± 0.38	0.20 ± 0.08
SD	4.32 ± 0.51	3.83 ± 0.45	1.73 ± 0.21	0.21 ± 0.02
BASE	4.97 ± 0.75	2.75 ± 0.25	1.23 ± 0.01	0.26 ± 0.05
F250	3.65 ± 0.14	2.19 ± 0.16	1.14 ± 0.36	0.07 ± 0.03
F500	4.94 ± 0.42	3.71 ± 0.28	1.58 ± 0.19	0.20 ± 0.01

CTL (Negative control - saline solution 0.9% m/v); SD (Silver Sulfadiazine); BASE (Gel without Bio-AgNP); F250 (Gel containing bio-AgNP at 250 µM) and F500 (Gel containing bio-AgNP at 500 µM). Results are expressed as mean + Standard Deviation.

Tabela 1. Tamanho da lesão em ratos, após 1 dia, 5 dias, 9 dias e 17 dias de tratamento com CTL, SD, BASE, F250 e F500. Resultados expressos em média + SD (desvio padrão). (Não houve diferença significativa entre os resultados encontrados ($p > 0.05$)).

CONCLUSÃO

A nanopartícula de prata quando incorporadas à formulação apresentam atividade antibacteriana contra todas as cepas testadas, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

O efeito antimicrobiano das nanopartículas de pratas foi observado na diminuição da carga microbiana das feridas no decorrer do tempo de tratamento. Além disso, ficou evidente que as nanopartículas de prata não interferem no tempo da cicatrização, não ocasionam alteração na quantidade de células inflamatórias, vasos sanguíneos e na produção de colágeno durante o tratamento.

Por fim, o uso do produto formulado não ocasionou acúmulo de prata na corrente sanguínea, fígado, rim, baço, cérebro e testículo dos animais tratados, o que sugere baixa toxicidade da formulação.

Os géis formulados são uma alternativa ao tratamento de feridas, uma vez que apresentam ótima atividade antibacteriana, podendo auxiliar no combate a infecção em pacientes com feridas; além disso não interferem no processo de cicatrização e não geram bioacúmulo de prata. Porém, são necessário mais estudos para elucidar o mecanismo que as nanopartículas de prata atuam no processo de cicatrização e avaliar a toxicidade desse composto quando aplicados em feridas de maior extensão e por um período maior de tempo.