

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Daniel Vargas

**INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DE HIDROGEIS CONTENDO  
NANOCÁPSULAS DE INDOL-3-CARBINOL NA FASE AGUDA DA  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS**

Santa Maria, RS  
2021

**Daniel Vargas**

**Influência da aplicação tópica de hidrogeis contendo nanocápsulas de indol-3-carbinol na fase aguda da cicatrização de feridas cutâneas de ratos**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Cirurgia e Clínica de Pequenos Animais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof. Dr. Daniel Curvello De Mendonça Müller

Santa Maria, RS

2021

VARGAS, DANIEL  
INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DE HIDROGEIS CONTENDO  
NANOCÁPSULAS DE INDOL-3-CARBINOL NA FASE AGUDA DA  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS / DANIEL  
VARGAS.- 2021.  
51 p.; 30 cm

Orientador: Daniel Curvello de Mendonça Müller  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. cicatrizante 2. hidrogél 3. Indol-3-carbinol 4.  
indólico 5. estresse oxidativo I. Curvello de Mendonça  
Müller, Daniel II. Título.

**Daniel Vargas**

**INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DE HIDROGEIS CONTENDO  
NANOCÁPSULAS DE INDOL-3-CARBINOL NA FASE AGUDA DA  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Cirurgia e Clínica de Pequenos Animais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**

**Aprovado em 23 de fevereiro de 2021:**

---

**Daniel Curvello De Mendonça Müller, Dr. (UFSM)**  
**(Presidente/Orientador)**



---

**Dalila Moter Benvegnú, Dra. (UFFS)**

---

**Luís Felipe Dutra Corrêa, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2021

## **AGRADECIMENTOS**

*A UFSM, por meio do PPGMV, ao CNPQ e CAPES, que viabilizaram o programa de pós-graduação.*

*Agradeço minha família: Rosalina, Vilmar, Luana, Daniela, Ana Larissa, Maria Luiza e Hecson. Eles conhecem o preço e me ajudaram muito a ser o primeiro da família a chegar até aqui.*

*Agradeço meu orientador, Dr. Daniel, pelo exemplo, humildade, paciência, conhecimentos e didática repassados durante o mestrado, e por me guiar na realização de um sonho e confiar no meu trabalho.*

*Meus animais de estimação: Bendi, Perseu, Salomé, Dior e Dóris - que me acompanharam em tantos momentos.*

*Meus amigos que estiveram presentes nos bons e maus momentos, impossível agradecer a todos nominalmente.*

*À Universidade Pública e as pessoas que conheci pertencentes a Universidade Federal de Santa Maria, Universidade Federal de Santa Catarina, Universidade de Passo Fundo, Universidade Federal da Fronteira Sul, Universidade do Oeste do Paraná. Nestes locais, um agradecimento especial aos professores que são inspiradores e por todo o aprendizado teórico, técnico e humano somaram para minha vida e qualificação.*

*Agradeço aos profissionais parceiros, fundamentais para viabilizar a execução do projeto, principalmente a equipe do Farmatox e Labtec:*

*Dr Hecson, Dra Karine, Ms.Mailini, Ms. Vinícius. Dra Marilise, Dra. Letícia, Dra. Cristina, e Dra. Patrícia.*

*Aos estagiários, residentes, técnicos, docentes, mestrandos, doutorandos que atuam no HVU/UFSM, especialmente os colegas do GCOR. Agradeço também aos pacientes que ao longo destes 5 anos, diariamente nos ensinam.*

*Aos animais experimentais...*

*Feliz daquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina  
(Cora Coralina).*

## RESUMO

### INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DE HIDROGEIS CONTENDO NANOCÁPSULAS DE INDOL-3-CARBINOL NA FASE AGUDA DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS.

AUTOR: Daniel Vargas

ORIENTADOR: Daniel Curvello De Mendonça Müller

A incidência de ferimentos cutâneos é alta e a cicatrização da área lesionada é essencial, uma vez que o tecido tegumentar constitui uma barreira corporal física contra os agentes lesivos. A integridade da pele, favorece a manutenção da homeostasia corpórea pois este tecido possui mecanismos de defesas antioxidantes para reduzir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres. Os tratamentos tópicos contendo agentes cicatrizantes se destacam por ser de fácil adesão, aplicação e diminuído risco de toxicidade, além de apresentar vantagens no processo de cicatrização. Para obtenção de cicatrização ideal, novas apresentações medicamentosas que melhorassem a qualidade e que não causem danos oxidativos ao tecido de granulação são atuais objetos de estudo. Os hidrogéis entre as formas farmacêuticas, destacam-se por sua habilidade de favorecer a cicatrização, além do amplo espectro de indicação. Agindo como carreadores de substâncias ativas, as nanocápsulas promovem a estabilidade, a liberação sustentada e a modulação da permeação cutânea do princípio ativo. Sendo assim, a associação de hidrogéis a ativos nanoencapsulados de maneira tópica mostra-se benéfica, pelo menor risco de citotoxicidade e por apresentar menores concentrações do fármaco. O indol-3-carbinol (I3C) é obtido através da hidrólise da glicobrassicina e possui atividade antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva já validadas cientificamente, entretanto a verificação de sua atividade cicatrizante, sobretudo em estruturas nanoencapsuladas, não foi elucidada até o presente momento. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da aplicação tópica de formulações de hidrogéis contendo I3C livre e nanoencapsulado na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. Foram utilizados 37 ratos *Wistar* adultos machos, distribuídos em cinco grupos experimentais (n=7-8): I) Controle; II) Alantoína 1%, III) I3C livre; IV) Nano-branca (NB) e V) Nanocápsula de I3C (N-I3C). Após o período de aclimação, foi realizada excisão cutânea de área total de 2 cm<sup>2</sup>, na pele da região dorsal, entre as escápulas. Posteriormente, os diferentes tratamentos tópicos foram aplicados na área excisada durante cinco dias experimentais. Nos dias 1(basal), 3 e 6 a área da ferida foi mensurada para avaliação da regressão (em % do basal). No sexto dia experimental os animais foram eutanasiados para análises do perfil oxidativo. Foi observado aumento do tamanho da ferida no 3º dia experimental, sendo menor nos grupos tratados, em relação ao controle. Ao 6º dia, a regressão foi menor no grupo I3C livre. O grupo que recebeu N-I3C apresentou menores níveis de peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e espécies reativas em relação ao controle e reduzida atividade da catalase e níveis de glutathione reduzida. Conclui-se que feridas tratadas com I3C nanoencapsulado apresentam menores danos oxidativos na fase inflamatória e proliferativa.

**Palavras-chave:** Indólico, Estresse Oxidativo, Antioxidante, cicatrizante.

## ABSTRACT

### INFLUENCE OF TOPICAL APPLICATION OF HYDROGELS CONTAINING INDOL-3-CARBINOL NANOCAPSULES ON RAT WOUNDS.

AUTHOR: Daniel Vargas

ADVISOR: Daniel Curvello De Mendonça Müller

The incidence of cutaneous wounds is high and the healing of the injured area is essential, since the integumentary tissue constitutes a body barrier against the harmful agents. The integrity of the skin, favors the maintenance of body homeostasis because this tissue has an antioxidant defense mechanism to reduce the harmful effects generated by free radicals. Treatments containing healing agents stand out for being easy to adhere to, application and reduced risk of toxicity, in addition to presenting advantages in the healing process. To obtain optimal healing, new drug presentations that improve quality and do not cause oxidative damage to granulation tissue are current objects of study. Among the pharmaceutical formulas, hydrogels stand out for their ability to promote healing and be indicated for various types of wounds. On the other hand, acting as carriers of active substances, such as nanocapsules, promote stability, sustained release and modulation of skin permeation of the active principle. Therefore, an association of hydrogels with nanoencapsulated actives is highly beneficial, due to the lower risk of cytotoxicity and because it has smaller edges of the drug. Indole-3-carbinol (I3C) is superior through the hydrolysis of glycoabracin and has antitumor, antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activity that have already been scientifically validated, however the verification of its healing activity, especially in nanoencapsulated structures, has not been elucidated so far. Thus, the aim of this work was to study the effect of topical application of hydrogel formulations containing free and nanoencapsulated I3C on the healing of skin wounds in rats. There were 37 adults male Wistar rats, distributed in 5 experimental groups (n = 7-8): I) Control; II) 1% allantoin, III) free I3C; IV) Nano-blank (NB) and V) I3C nanocapsule (N-I3C). After the acclimatization period, a cutaneous excision of a total area of 2 cm<sup>2</sup> was performed on the skin of the dorsal region, between the scapulae. Subsequently, the different topical treatments were applied to the excised area for 5 experimental days. On days 1 (baseline), 3 and 6 the wound area was measured to assess regression (in% of baseline). On the sixth experimental day, the animals were euthanized for analysis of the oxidative profile. An increase in the size of the wound was observed on the 3rd experimental day, being lower in the treated groups, compared to the control. On the 6th day, regression was lower in the free I3C group. The group that received N-I3C showed lower levels of lipid peroxidation, protein carbonylation and reactive species in relation to the control and reduced catalase activity and reduced glutathione levels. It is concluded that wounds treated with nanoencapsulated I3C present less oxidative damage in the early stages of the healing process.

**Key-words:** Indole, Oxidative Stress, Antioxidant.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1– Corte histológico da pele demonstrando a camada córnea (mais externa), epiderme e derme.....	16
Figura 2- Estrutura química do I3C.....	21
Figura 3- Esquema da estrutura de uma nanocápsula. Na figura são apresentadas as três principais partes constituintes da nanocápsula: A membrana polimérica, o Núcleo oleoso e o Fármaco.....	23
Figura 4 - Estrutura química da goma de alfarroba.....	25

### MANUSCRITO

Figura 1 - Efeitos dos hidrogeis contendo I3C livre e nanocápsulas de I3C sobre a área de regressão das feridas, em relação ao dia 1 (basal).....	44
Figura 2 – Efeito dos hidrogeis contendo I3C livre e nanocápsulas de I3C sobre parâmetros de danos oxidativos em feridas cutâneas de ratos. (A) Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); (B) Níveis de proteína carbonilada (PC); (C) Geração de espécies reativas (ER); (D) Atividade da Catalase (CAT); (E) níveis de NPSH; (F) Níveis de Vitamina C (VIT C).....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

Al: Alantoína;

CAT: Catalase;

DCFH-DA: 2',7'-diclorofluoresceína diacetato;

DMSO: Dimetilsulfóxido;

DNPH: Dinitrofenilhidrazina;

DTNB: 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico;

ER: Espécies reativas;

EVFG: Fator de crescimento derivado do endotélio (*do inglês endothelial vascular fator growth*);

GPx: Glutaciona peroxidase;

GSH: Glutaciona reduzida;

HCl: Ácido clorídrico;

Hg: Hidrogeis;

I3C: Indol-3-carbinol;

MDA: Malondialdeído;

NaOH: Hidróxido de sódio;

NB: Nanocápsula branca;

N-I3C: Nanocápsula de indol-3-carbinol;

NPSH: Tiois não proteicos;

PC: Proteína Carbonil;

pH: Potencial hidrogeniônico;

SOD: Superóxido dismutase;

TBA: Ácido tiobarbitúrico;

TBARS: Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (*do inglês: Thiobarbituric acid reactive substances*);

TCM: triglicerídeo de cadeia média;

VIT C: Vitamina C.

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
3.1. FISILOGIA DA PELE.....	16
3.2. FERIDAS CUTÂNEAS E O PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	17
3.3. DEFESAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO EM FERIDAS CUTÂNEAS .....	19
3.4. INDOL-3-CARBINOL.....	20
3.5. SISTEMAS NANOESTRUTURADOS: NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS.....	22
3.6. USO DE HIDROGEIS COMO VEÍCULO PARA OS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS .....	24
<b>4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....</b>	<b>25</b>
4.1. MANUSCRITO.....	26
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>LISTA DE REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação está estruturada em seções dispostas da seguinte forma: Introdução; Objetivos; Desenvolvimento (Referencial Teórico, Manuscrito Científico); Conclusão e Referências.

Os itens Material e Métodos, Resultados, Discussão dos resultados e Referências encontram inseridos no manuscrito na seção “Produção Científica” e representam a íntegra desse estudo.

A “Lista de Referências” se refere ao referencial utilizado nos itens anteriores ao manuscrito, e o item “Referências” refere-se às referências utilizadas no manuscrito.

## 1. INTRODUÇÃO

As feridas são alterações na integridade física do tecido tegumentar, normalmente oriundas de traumas físicos, químicos, mecânicos ou desencadeado por uma afecção clínica (FARIA, 2010). O tratamento correto das feridas é importantíssimo, pois abordagens inadequadas e tratamento ineficazes aumentam os riscos de infecções e custos, e pode gerar a necessidade de hospitalização (PIRES et al., 2020). Neste sentido, na tentativa de minimizar os danos oxidativos gerados, a pele possui um elaborado sistema de defesas antioxidantes que neutralizam espécies reativas e reduzem danos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos celulares (KATIYAR et al., 2001; LARSSON et al., 2005; SHINDO et al., 1993), contribuindo para a manutenção e integridade da membrana celular. No entanto, em algumas injúrias cutâneas, como nas feridas por exemplo, a geração de espécies reativas (ER) excede a capacidade antioxidante e gera um quadro denominado de estresse oxidativo que desempenha papel importante no agravamento de processos inflamatórios (WAGENER; CARELS; LUNDEVIG, 2013).

O correto manejo da ferida, principalmente em suas fases iniciais, é de fundamental importância. Um dos grandes dilemas da medicina atualmente é tratar feridas nas quais, a cicatrização só é possível por segunda intenção. Nesses casos, o paciente está exposto à diversas complicações, como dificuldades de cicatrização, infecções, perda de fluídos, entre outros (SANTOS, 2019). Por isso pesquisadores investem esforços em novas propostas que auxiliem a cicatrização das feridas, com a finalidade de minimizar os danos e efeitos colaterais. Nos últimos anos, as suspensões de nanocápsulas surgiram como alternativas promissoras para a liberação de substâncias através da pele, devido à sua capacidade de controlar a liberação de drogas e melhorar sua estabilidade (PEGORARO et al., 2017). O emprego desta tecnologia é amplo, atuando desde produtos de consumo como fotoprotetores, inovações em cosméticos, tratamento de doenças inflamatórias, antisepsia e assepsia; fototerapia, tratamento de doenças das glândulas sebáceas, tratamento de doenças do couro cabeludo, nanobiotecnologia no combate ao câncer (NASIR; FRIEDMAN; WANG, S., 2013).

Em relação aos compostos que possuem capacidade de serem nanoencapsulados, surge o indol-3-carbinol (I3C), cuja origem é natural, encontrado em vegetais crucíferos. Este composto, em forma nanoencapsulada já possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antinociceptiva previamente descritas (BANERJEE et al., 2011; GEHRCKE et al., 2018; JIANG et al., 2013; LEE, et al., 2018; MARCHIORI et al., 2017; ROSTOKA et al.,

2010; TAYLOR, 2012). No entanto, até o presente momento, sua atividade cicatrizante cutânea ainda não foi demonstrada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Estudar o efeito da aplicação tópica de formulações de hidrogéis contendo I3C livre e nanoencapsulado na cicatrização de feridas cutâneas de ratos.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

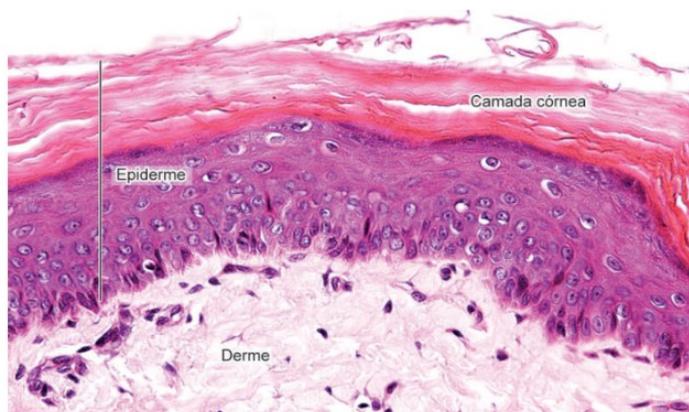
- a. Avaliar os efeitos do tratamento tópico de hidrogéis, contendo nanocápsulas de I3C, sobre o parâmetro biofísico de percentual de regressão das feridas de ratos;
- b. Avaliar o perfil oxidativo do tecido das feridas, cutâneas de ratos, que receberam o tratamento tópico com nanocápsulas de I3C;

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1.FISIOLOGIA DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo e desempenha naturalmente a função de proteção dos órgãos internos e forma uma barreira eficaz contra os efeitos nocivos do ambiente e agentes xenobióticos (NICHOLS e KATIYAR, 2010). Histologicamente a pele é dividida em duas camadas unidas entre si, a epiderme, mais externa e a derme, mais interna (Figura 1) (ABLA; ISHIZUKA, 1995; SANTOS, 2000).

Figura 1: Corte histológica da pele demonstrando a camada córnea (mais externa), epiderme e derme.



Fonte: (Junqueira & Carneiro, 2018).

A epiderme organiza-se em várias camadas que vão amadurecendo e envelhecendo extrinsecamente até serem eliminadas por descamação natural. A primeira é a germinativa, que faz limite com a derme, seguida pela espinhosa, granulosa, lúcida e por último pela camada córnea, que é constituída por células escamosas que contém queratina e forma uma barreira contra a ação e de microrganismos e água (ARNOLD et al.,1994). A derme é uma camada espessa de tecido conjuntivo. Ela alberga os anexos cutâneos, vasos sanguíneos e linfáticos e nervos. É também dividida em camadas. A papilar, mais externa e a reticular, mais interna. Entre os tipos de células encontrados na derme, destacam-se os fibroblastos, fibrócitos, macrófagos, mastócitos e alguns leucócitos. É uma camada importante, pois fornece uma base firme para a epiderme e anexos cutâneos. Para auxiliar a sustentação do tecido, as fibras de colágeno exercem grande força de tensão, enquanto que as elásticas asseguram flexibilidade à pele (ARNOLD et al., 2004; JUNQUEIRA & CARNEIRO; 2018)

### 3.2. FERIDAS CUTÂNEAS E O PROCESSO INFLAMATÓRIO

Entre os eventos que podem afetar a fisiologia da pele, destacam-se as feridas, que são alterações na integridade física do tecido tegumentar, normalmente oriundas de traumas físicos, químicos, mecânicos ou desencadeado por uma afecção clínica (FARIA, 2010). O tratamento correto das feridas é muito importante tendo em vista que uma abordagem inadequada e o tratamento ineficaz aumenta os riscos de infecções e custos e pode aumentar a necessidade de hospitalização (PIRES et al., 2020).

Feridas como queimaduras, incisões cirúrgicas, abrasões e lacerações, podem ser superficiais, envolvendo a epiderme e a derme ou de espessura total, em que a camada subcutânea também é comprometida. Dessa forma, a cicatrização de feridas restaura a integridade física das estruturas corporais internas ou externas e envolve interações entre as células e outros fatores (ALIMOHAMMD et al., 2007). A cicatrização de feridas cutâneas é um evento fisiológico essencial que consiste na colaboração de muitas células e seus produtos (GONZALEZ et al., 2016). O processo de cicatrização ocorre sob a forma de cascata de interações celulares, bioquímicas e moleculares coordenados para haver regeneração tecidual e, é gerado a partir da síntese, fixação e degradação do colágeno, sendo classificado em três fases: inflamatória, proliferação ou granulação e remodelação ou maturação (PIRES et al., 2020).

Para manter sua integridade, a primeira resposta do organismo frente a agressão corresponde a uma resposta vascular, onde o vaso lesado se contrai e o sangue extravasado coagula. Um agregado de trombócitos e plaquetas em uma rede de fibrina culminam na formação de um coágulo, contando com a ação de fatores específicos através da ativação e agregação destas células. A rede de fibrina atua como uma matriz temporária necessária para a migração celular, estabelecendo homeostasia e barreira contra microorganismos. Este meio permite as células migrarem para o microambiente da lesão e a estimulação de proliferação de fibroblastos (GONZALEZ et al., 2016).

As células inflamatórias desempenham um papel fundamental nas feridas por contribuir com a liberação de enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigênio e facilitam a limpeza de debris celulares (MEDRADO et al., 2003). A inflamação é uma resposta localizada protetora do tecido que é desencadeada pela lesão, causando destruição de tecidos e de proteínas úteis (GONZALEZ et al., 2016).

Neutrófilos maduros contribuem para a primeira linha de defesa contra patógenos invasores na resposta inflamatória aguda. O recrutamento de leucócitos da microvasculatura para o local da inflamação é um processo fundamental na resposta inflamatória e é seguido de segunda onda de monócitos inflamatórios forçando a reação inflamatória (UHL et al., 2016). Eles são recrutados para a ferida, em resposta à ativação do complemento, a degranulação das plaquetas e a produtos da degradação bacteriana e desempenham um papel de limpeza tecidual e morte de agentes invasores (GURTNER et al., 2008). Também expressam diversas citocinas pró-inflamatórias e uma grande quantidade de substâncias altamente ativas substâncias antimicrobianas, como espécies reativas de oxigênio, peptídeos catiônicos e proteases no local da lesão (GONZALEZ et al., 2016).

Após a fase inflamatória, inicia-se o estágio proliferativo que visa a formação de um tecido novo. Para a formação deste novo tecido, ocorre a migração de queratinócitos e fibroblastos para o local lesado, também as células inflamatórias presente no sítio lesivo, os macrófagos, secretam fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado do endotélio (*do inglês endotelial vascular fator growth- EVFG*). Em resposta a esses fatores de crescimento, ocorre a angiogênese, que visa a nutrição e oxigenação do tecido (GURTNER et al., 2008). O objetivo da fase proliferativa é diminuir a área de lesão do tecido, por contração e fibroplasia, estabelecendo um epitélio viável. Esses processos começam no microambiente da lesão nas primeiras 48 horas e pode se desdobrar até o 14º dia após o início da lesão (GONZALEZ et al., 2016). A fase proliferativa é a responsável pela formação do tecido de granulação, que recebe este nome devido seu aspecto róseo, e granular (devido à deposição de fibras colágenas na forma frouxa e desordenada) (CALIN; COMAN; CALIN, 2016).

A terceira fase da cura consiste na remodelação, que começa duas a três semanas após o início da lesão e pode durar por um ano ou períodos superiores. O objetivo central da fase de remodelação é alcançar a resistência máxima à tração por meio de reorganização, degradação, e ressíntese da matriz extracelular. Nesta fase final da cicatrização da lesão, uma tentativa de recuperar a estrutura normal do tecido ocorre, e o tecido de granulação é gradualmente remodelado, formando tecido cicatricial com menor celularidade e vascularização e que exibe um progressivo aumento de depósito de fibras colágenas tipo I (KIRSNER, 2016; LI; CHEN).

Apesar de ser um processo sistêmico, a reparação do tecido lesionado requer condições que favoreçam a viabilidade do processo fisiológico no local. Por isso, torna-se imprescindível a introdução da terapia tópica de feridas, que compreende etapas de limpeza (remoção de tecidos necróticos e corpos estranhos do leito da ferida, identificação e eliminação de processos infecciosos) e a oclusão, por meio de curativos biocompatíveis e biodegradáveis, serem capazes

de manter a umidade no leito da ferida, absorver o excesso de exsudato, promover o isolamento térmico, permitir a troca gasosa necessária para o processo de reparação e proteger o ferimento contra traumas e invasão bacteriana (ARCHANA et al., 2013).

Um dos grandes dilemas da medicina atualmente é tratar feridas nas quais, a cicatrização só é possível por segunda intenção. Dessa forma, o paciente está exposto a uma série de complicações como dificuldades de cicatrização, infecções, perda de fluídos, entre outros. As feridas cutâneas são as lesões comumente atendidas nas rotinas clínicas e/ou cirúrgicas. Especificamente as lesões de pele, que acabam por ter uma cicatrização por segunda intenção decorrente a lesões extensas e contaminadas, limitando o paciente a um tratamento cirúrgico efetivo ( SANTOS, 2019).

### 3.3. DEFESAS ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO EM FERIDAS CUTÂNEAS

A pele possui mecanismo de defesa antioxidante para reduzir os efeitos nocivos gerados pelos radicais livres (BRIGANTI; PICARDO, 2003; NICHOLS; KATIYAR, 2010). Tais mecanismos evitam a peroxidação lipídica e proteica (KATIYAR et al., 2001; LARSSON et al., 2005; SHINDO et al., 1993), contribuindo para a manutenção e integridade da membrana celular. Para tanto, o sistema antioxidante da pele é constituído por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (BRIGANTI; PICARDO, 2003). Entre os antioxidantes enzimáticos, a glutathione peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) desempenham um papel central. Os antioxidantes não enzimáticos presentes nas células da epiderme são o  $\alpha$ -tocoferol, a ubiquinona, o  $\beta$ -caroteno, o ácido ascórbico e a glutathione (GSH) (BRIGANTI; PICARDO, 2003). Os sistemas de defesa antioxidantes da pele, possuem a função de contribuir com o balanço redox celular através da neutralização e eliminação de espécies radicalares e não radicalares (HALLIWELL, 2006, ASHOK et al., 2021).

Quando ocorre aumento da geração de ER que excede a capacidade antioxidante do organismo, se instala um quadro denominado estresse oxidativo, que desempenha papel importante no agravamento de processos inflamatórios (WAGENER; CARELS; LUNDTVIG, 2013). Isso ocorre devido à intensa agressão que as ER exercem sobre macromoléculas de proteínas e lipídios que compõe as células (WAGENER; CARELS; LUNDTVIG, 2013). Os peróxidos lipídicos e seus produtos de metabolismo, como o malondialdeído (MDA), podem afetar direta ou indiretamente muitas funções essenciais para a homeostase das células e dos tecidos. Como consequência, o aumento da peroxidação da membrana lipídica pode evocar uma resposta imune e inflamatória, ativar a expressão gênica, a proliferação celular ou iniciar a

apoptose. Conseqüentemente, há uma estreita relação entre a produção de radicais livres, o dano peroxidativo da membrana e os processos inflamatórios ou patológicos degenerativos (BRIGANTI; PICARDO, 2003, FLORES et al., 2014).

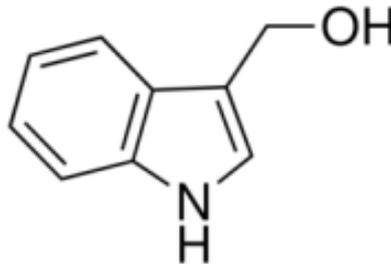
O processo de cicatrização de feridas cutâneas é minuciosamente regulado por uma grande quantidade de eventos que envolvem os fatores de crescimento que são secretados por células teciduais e leucócitos (macrófagos) que migram até o local lesado (SCHAFER; WERNER, 2007; WERNER; GROSE, 2003). No sítio da lesão ocorre a geração de ER de oxigênio e nitrogênio, tais moléculas desempenham um papel fundamental na regulação do processo inflamatório. Eles atuam como agentes bactericidas e impedem a contaminação da ferida e também, a geração de ER em baixas quantidades são essenciais para sinalização da angiogênese (CLARK, 1996; D'AUTREAU; TOLEDANO, 2007; ROY et al., 2006). No entanto, a produção excessiva de ER, no sítio da ferida pode ser deletéria para macromoléculas como proteínas e lipídeos de membrana (ER, TSAI, WU, 2007).

Um estudo conduzido por Xueqing et al. (2021), demonstrou que o tratamento com resveratrol, um composto antioxidante, reduziu danos oxidativos e melhorou o processo de cicatrização de feridas cutâneas. Também, esses autores afirmam que o estresse oxidativo suprime a proliferação e migração de células endoteliais e também reduz a re-epitelização tecidual, dificultando o processo de cicatrização. Outros autores demonstram que as ações das ER, em excesso, são fatores que levam à cronificação do processo inflamatório (BRYAN et al., 2012), por isso o organismo conta com as defesas antioxidantes, que controlam os níveis de ER no sítio da ferida e conseqüentemente auxiliam no processo de reparo tecidual e controlam o processo inflamatório. Em alguns casos a administração de compostos antioxidante exógenos é de grande valia, para auxiliar no controle da geração das ER, e conseqüentemente, minimizar os danos às macromoléculas e melhorar o reparo (XUEQING, et al. 2021).

### 3.4. INDOL-3-CARBINOL

O I3C (Figura 2) é um alcalóide, produto de decomposição do composto contendo enxofre da dieta natural glucobrassicina (3-indolilmetil glucosinolato), que é encontrado em vegetais crucíferos como o brócolis, repolho e couve-flor, quando estes são mastigados ou picados, a plantenzima mirosinase, que normalmente é separada da glicobrassicina em células vegetais intactas, é liberada e rapidamente converte a glicobrassicina em I3C (AMARE et al., 2020).

Figura 2: Estrutura química do I3C



Fonte: (Vieira, 2015).

Este composto possui capacidade antioxidante na sua forma livre (MARCHIORI et al., 2017), e é um potente inibidor da inflamação induzida por isquemia/reperfusão (AMPOFO et al., 2017) e efeitos preventivos do câncer (ASHOK et al., 2021). Também, sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antinociceptiva (BANERJEE et al., 2011, GEHRCKE et al., 2018; JIANG et al., 2013; LEE, et al., 2018; ROSTOKA et al., 2010; TAYLOR, 2012) em sistemas nanoestruturados já foram validadas cientificamente. Sua atividade antimicrobiana, atividade antiviral, efeito do I3C na obesidade e doenças crônicas também foram relatados (ASHOK et al., 2021).

O I3C, é um composto de peso molecular igual a 147,18 g/mol, é praticamente insolúvel em água mas com boa solubilidade em solventes orgânicos. Ele está disponível em já está disponível em preparações comerciais como suplemento alimentar (ASHOK et al., 2021), cuja administração diária de I3C nas doses de 400 e 800 mg, equivalente a 7 e 14 mg/kg de peso corporal por dia, respectivamente, é tolerado sem danos (REED et al., 2005). As concentrações testadas não excedem a dose diária por animal de 100mg/kg.

Após ser administrado pela via oral, o I3C é rapidamente absorvido a nível intestinal e é distribuído para os demais órgãos, sendo encontrado em maiores concentrações no tecido hepático. A biotransformação do I3C consiste na geração de outros 3 metabólitos, que também são ativos (ANDERTON et al., 2004). Ainda que o I3C é um agente ativo, e exerça diversas ações farmacológicas, sua estabilidade é baixa e pode sofrer reações de oxidação, principalmente quando submetido ao contato com radiação ultravioleta ou ambientes ácidos (GROSE; BJELDANES, 1992; LUO et al., 2013).

Neste sentido, alguns autores já estudaram métodos para melhorar a estabilidade do I3C e aumentar o seu poder farmacológico. Os estudos mostram melhor liberação controlada do

composto e aumento da estabilidade frente a radiação UV (LUO et al., 2013); redução da formação dos metabólitos secundários e melhor vetorização do fármaco (SONG, et al., 2014); melhor atividade antioxidante (JEONG et al., 2015). Também nestes estudos o I3C foi incorporado em diferentes tipos de sistemas nanoestruturados como, nanocápsulas e lipossomas.

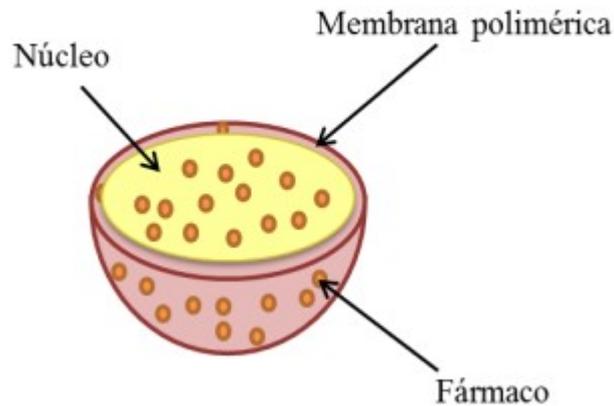
### 3.5. SISTEMAS NANOESTRUTURADOS: NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

A palavra nano tem origem grega cujo significado remete a “anão”, e é um indicador de medidas que consiste na nona potência da unidade de medida padrão. A nanotecnologia consiste em uma ciência que caracteriza, manipula e organiza as substâncias em escala nanométrica (nm). É uma tecnologia que se aplica em vários campos da pesquisa (LEE, 2004; DURÁN et al, 2006). Materiais em escala nanométrica apresentam propriedades físico-químicas, físicas e químicas diferentes daquelas apresentadas em escalas superiores (WORLD NANOTECHNOLOGY MARKET, 2005). Os materiais em escala nanométrica podem revelar características peculiares como alteração na condutividade elétrica, elasticidade, cores diferentes, maior área de contato (GRUPO ETC, 2005). Dessa maneira, a nanotecnologia visa criar novos materiais através de técnicas que possibilitem ver e manipular átomos, para conseguir materiais com características precisas e individualizadas (BARBASTEFANO et al, 2005; ASHOK et al., 2021).

Na área da tecnologia farmacêutica, os sistemas nanoestruturados consistem em dispersões coloidais aquosas que compreendem estruturas como: lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, entre outros (KAUR et al., 2014; MATTHEOLABAKIS; RIGAS; CONSTANTINIDES. 2012). O emprego desta tecnologia é amplo, atuando desde produtos de consumo como fotoprotetores, inovações em cosméticos, tratamento de doenças inflamatórias, antissepsia e assepsia; fototerapia, tratamento de doenças das glândulas sebáceas, tratamento de doenças do couro cabeludo, nanobiotecnologia no combate ao câncer (NASIR; FRIEDMAN; WANG, S., 2013).

O conceito de nanocápsulas poliméricas abrange partículas vesiculares menores que 1  $\mu\text{m}$ , e são compostas por um núcleo oleoso rodeado por uma parede polimérica ultrafina que é estabilizada por surfactantes ou agentes estéricos e um fármaco disperso no núcleo oleoso (Figura 3). Espera-se que o uso de transportadores em escala nanométrica na entrega de drogas aumente especificidade dos medicamentos e, assim, reduzir os efeitos colaterais diminuindo o dose de medicamentos administrados (GUPTA, SANJEEV et al., 2013).

Figura 3: Esquema da estrutura de uma nanocápsula. Na figura são apresentadas as três principais partes constituintes da nanocápsula: A membrana polimérica, o Núcleo oleoso e o Fármaco.



Fonte: (Adaptado de Gehrcke, 2016).

O núcleo oleoso da nanocápsula desempenha um papel fundamental na formulação, visto que ele é responsável pela solubilização do princípio ativo, melhora na estabilidade das formulações, aumenta a eficiência da encapsulação e promove sustentação na liberação do fármaco. Os óleos que compõem o núcleo das nanocápsulas não devem ser tóxicos, não apresentarem incompatibilidade com o fármaco e não degradar outras estruturas da nanocápsula (COUVREUR et al., 2002). Os triglicerídeos de cadeia média (TCM) formam um óleo amplamente utilizados no preparo de nanocápsulas, devido a sua capacidade altamente solubilizante e baixa incompatibilidade com outras regiões da nanocápsula, como os polímeros de revestimento (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Como polímero de revestimento, pode-se citar o Eudragit 100<sup>®</sup> que é insolúvel em água e pH fisiológico, possuindo baixa permeabilidade, promovendo assim um potencial de liberação sustentada do fármaco (NIKAM, et al., 2011).

Nos últimos anos, as suspensões de nanocápsulas surgiram como alternativas promissoras para a liberação de substâncias através da pele, devido à sua capacidade de controlar a liberação de drogas e melhorar sua estabilidade (PEGORARO et al., 2017). A interação celular das nanocápsulas com o tecido cutâneo a um nível subatômico, promete transformar o diagnóstico e o tratamento de enfermidades. O tecido epitelial representa um veículo adequado para investigação de materiais oriundos da nanotecnologia, assim como a

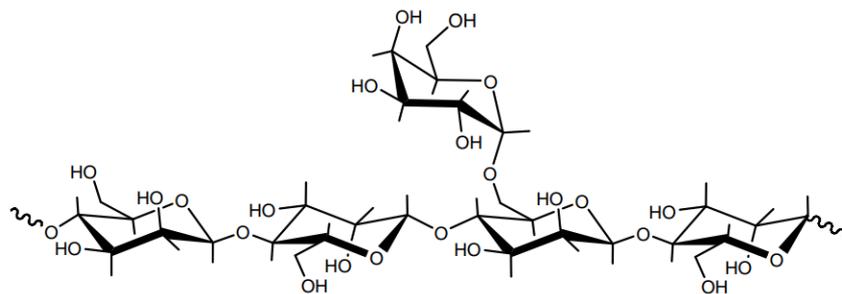
aplicação tópica é o modo preferido devido à maior adesão e satisfação do paciente (GUPTA, SANJEEV et al., 2013).

### 3.6. USO DE HIDROGEIS COMO VEÍCULO PARA OS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

Um produto eficaz no tratamento de feridas deve possuir facilidade de aplicação e remoção, promoção de conforto, não-exigência de trocas frequentes, manter as áreas periféricas secas e protegidas com o leito da ferida com umidade ideal e adaptabilidade às diversas conformação de partes do corpo (MANDELBAUM; SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Neste contexto, as formulações de hidrogéis promovem alívio, proporcionam conforto, possuem pouca contra-indicação e são indicadas para aplicação tópica em feridas secas ou com pouco exsudato, com necrose (pois auxilia na remoção de crostas), áreas doadoras e receptoras de enxerto, úlceras arteriais, venosas e mistas e queimaduras de primeiro e segundo grau. Além disso, exercem ação de quimiotáxica leucocitária, favorecem a angiogênese, promovem desbridamento autolítico e mantém o meio úmido ideal, podendo ser usados em várias fases da cicatrização sem danificar o tecido de granulação (MANDELBAUM, 2003; MARCHIORI et al, 2017).

A goma de alfarroba (Figura 4) é um polissacarídeo de alto peso molecular obtido da semente da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua L.*), que possui propriedades estabilizantes, espessantes, e gelificantes (COVIELLO, et al., 2015; COVIELLO; TOMMASINA et al., 2007). O galactomanano de alfarroba possui uma cadeia linear de unidades  $\beta$ -D-manopiranosil ligadas (1  $\rightarrow$  4) com resíduos de  $\alpha$  D-galactopiranosil ligados (1  $\rightarrow$  6) como cadeias laterais (LAHA et al., 2019).

Figura 4: Estrutura química da goma de alfarroba



Fonte: (Coviello, 2007).

Estudos demonstraram resultados satisfatórios na obtenção de hidrogéis de goma de alfarroba em sistemas nanoestruturados, na concentração de 3%. Neste sentido, o hidrogel tendo como base a goma de alfarroba, é um potencial veículo para o carreamento de sistemas nanoestruturados, visto que as formulações testadas apresentaram tamanho na faixa nanométrica muito semelhante à suspensão original, indicando que não houve alteração de tamanho após o espessamento das formulações (GIULIANI, 2019).

#### **4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

Os resultados inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de manuscrito científico, o qual se encontra aqui estruturado. Os itens Material e Métodos, Resultados e discussão, conclusão e referências, encontram-se no próprio artigo (Item 4).

#### 4.1. MANUSCRITO

Influência da aplicação tópica de hidrogeis contendo nanocápsulas de indol-3-carbinol  
na fase aguda da cicatrização de feridas cutâneas de ratos

Daniel Vargas, Hecson Jessor Segat, Mailine Gehrcke, Vinícius Prado, Karine Roversi,  
Letícia Cruz, Marilise Escobar Burger, Daniel Curvello de Mendonça Müller

Status: Artigo submetido para a revista Ciência Rural

ISSN Eletrônico: 1678-4596

1 **Influence of topical application of hydrogels containing indol-3-carbinol**  
2 **nanocapsules on rat wounds**

3 **Influência da aplicação tópica de hidrogeis contendo nanocápsulas de indol-3-**  
4 **carbinol na fase aguda da cicatrização de feridas cutâneas de ratos**

5 **Daniel Vargas<sup>1</sup>, Hecson Jesser Segat<sup>2</sup>, Mailine Gehrcke<sup>3</sup>, Vinícius Prado<sup>3</sup>, Karine**  
6 **Roversi<sup>4</sup>, Parícia Severo do Nascimento <sup>4</sup>, Letícia Cruz<sup>3</sup>, Marilise Escobar Burger<sup>4</sup>,**  
7 **Daniel Curvello de Mendonça Müller<sup>1\*</sup>**

8 **ABSTRACT**

9 The current study evaluated the effects of topical application of hydrogels containing Indol-3-  
10 carbinol (I3C) nanoencapsulated and in its free form, in an animal model of skin wounds.  
11 Suspensions of empty nanocapsules and containing I3C with an oily base of medium chain  
12 triglycerides were prepared and incorporated into locust bean gum hydrogels. Each formulation  
13 was topically applied, for five days to the cutaneous wounds of rats. The animals were divided  
14 into five groups, and on days 1, 3 and 6 the wound area was measured to verify the % of  
15 regression. At the sixth experimental day, the animals were euthanized for analysis of the  
16 oxidative profile. An increase in the size of the wound was observed on the 3rd experimental  
17 day, being lower in the treated groups, compared to the control. On the 6th day, regression was  
18 lower in the free I3C group. The group that contains I3C nanocapsules showed lower levels of  
19 lipid peroxidation, protein carbonylation and reactive species in relation to the control group  
20 and reduction of catalase and reduced glutathione levels. Our study revealed that the wounds  
21 treated with nanoencapsulated I3C reduced oxidative damage, with possible healing activity of  
22 the nanoencapsulated I3C.

23 **Keywords:** Indole, Oxidative Stress, Antioxidant.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Departamento de Clínica de Pequenos Animais – Universidade Federal de Santa Maria.

<sup>2</sup>Departamento de Patologia – Universidade Federal de Santa Maria.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Departamento de Farmácia Industrial – Universidade Federal de Santa Maria.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Universidade Federal de Santa Maria.

\*Autor para correspondência: e-mail: mullerdc@gmail.com

## 1 RESUMO

2 O presente trabalho avaliou os efeitos cicatrizantes da aplicação tópica de hidrogeis contendo  
3 Indol-3-carbinol (I3C) nanoencapsulado e na sua forma livre, em modelo animal de feridas  
4 cutânea. Foram preparadas suspensões de nanocápsulas branca e contendo I3C com base oleosa  
5 de triglicerídeos de cadeia média, que foram incorporadas em hidrogeis de goma de alfarroba.  
6 Cada formulação foi aplicada topicamente, por cinco dias nas feridas cutâneas de ratos. Os  
7 animais foram distribuídos em cinco grupos, onde nos dias 1, 3 e 6 a área da ferida foi  
8 mensurada para verificação da % de regressão e no sexto dia experimental foram eutanasiados  
9 para análises do perfil oxidativo. Foi observado aumento do tamanho da ferida no 3º dia  
10 experimental, sendo menor nos grupos tratados, em relação ao controle. Ao 6º dia, a regressão  
11 foi menor no grupo I3C livre. O grupo que recebeu nanocápsulas de I3C apresentou menores  
12 níveis de peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e espécies reativas em relação ao  
13 controle e reduzida atividade da catalase e níveis de glutathione reduzida. Conclui-se que feridas  
14 tratadas com I3C nanoencapsulado apresentam menores danos oxidativos, com possível  
15 atividade cicatrizante dessa substância.

16 **Palavras-chave:** Indólicos, Estresse Oxidativo, Antioxidante.

17

## 18 INTRODUÇÃO

19 O tecido tegumentar é o maior órgão do corpo e naturalmente desempenha a função de  
20 proteção dos órgãos internos, formando barreira eficaz frente aos efeitos nocivos (NICHOLS;  
21 KATIYAR, 2010). A descontinuidade do tecido tegumentar é definida como ferida, e possui  
22 como causa, os traumas físicos, químicos, térmicos, imunológicos, e microbianos, ocorrendo  
23 ruptura na integridade epitelial, anatômica e funcional do tecido vivo (MASSON-MEYERS et  
24 al., 2020). Desse modo, o tratamento de feridas visa reduzir o tempo de cicatrização e deve  
25 apresentar baixos efeitos colaterais (BOYKO; LONGAKER; YANG, 2017). Formulações

1 contendo nanocápsulas poliméricas são promissoras quando adicionadas aos tratamentos  
2 tópicos (MARQUEZ et al., 2019), pois no tecido cutâneo promovem a vetorização de  
3 substâncias ativas. São capazes de aumentar a penetração e a estabilidade dos princípios ativos,  
4 proporcionando liberação sustentada e homogênea do fármaco. Os efeitos adversos sistêmicos  
5 são reduzidos, assim como a dose e frequência de administração (BENVEGNÚ, D. M. et al.,  
6 2011; NASIR; FRIEDMAN; WANG, S., 2013b).

7 O indol-3-carbinol (I3C) é presente em vegetais crucíferos, como brócolis, repolho e  
8 ervilhas, obtido através da hidrólise da glicobrassicina, e possui ação antioxidante, anti-  
9 inflamatória, antiviral, antitumoral e antinociceptiva (ASHOK et al., 2021). Entretanto, não há  
10 dados suficientes na literatura científica que sustentem sua possível ação cicatrizante, tanto na  
11 forma livre, quanto nanoestruturada. Uma vez que a estabilidade do I3C foi significativamente  
12 melhorada após sua encapsulação em nanopartículas (GEHRCKE et al., 2018; LUO et al.,  
13 2013), aliado aos benefícios já demonstrados, tanto do I3C como dos sistemas  
14 nanoestruturados, o presente estudo avaliou o perfil oxidativo de feridas cutâneas de ratos,  
15 tratadas topicamente com hidrogeis contendo I3C na forma livre e nanoestruturada. (N-I3C).

16

## 17 2. MATERIAL E MÉTODOS

18 As nanocápsulas carregadas com I3C foram preparadas pela técnica de deposição  
19 interfacial de polímero pré-formado (GEHRCKE et al., 2018). Uma fase orgânica constituída  
20 por Eudragit® RS 100 (0,100 g), acetona (27 mL), Span 80® (0,077 g) e TCM (0,300 g) foi  
21 mantida sob agitação magnética moderada a 40°C durante 60 min. Após a solubilização de  
22 todos os componentes, I3C (0,0050 g) foi adicionado a esta fase orgânica e mantida sob agitação  
23 magnética por 5 min. Em seguida, a solução de acetona foi injetada em 53 mL de uma dispersão  
24 aquosa de Tween 80® (0,077 g), previamente alcalinizada com NaOH 0,2 M até pH 9,5, sob  
25 agitação magnética à temperatura ambiente. Após 10 min, o solvente orgânico e parte da água

1 foram eliminados por evaporação sob pressão reduzida para atingir um volume final de 10 mL,  
2 correspondente a 0,5 mg / mL de I3C. Após a evaporação do solvente, o pH das formulações  
3 foi ajustado para 8,5 com NaOH 0,2 M. Esta formulação foi denominada N-I3C. Para fins de  
4 comparação, formulações sem o I3C também foram preparadas, nanocápsulas brancas (NB).

5 Os hidrogéis de goma de alfarroba (Hg) contendo nanocápsulas foram preparados, com  
6 auxílio de almofariz e pilão, por meio da dispersão da goma em 10 mL de suspensões de  
7 nanocápsulas na concentração de 3%. O Hg contendo I3C não nanoencapsulado (I3C livre) foi  
8 preparado dispersando a goma de alfarroba (0,3 g) em 9 mL de água destilada seguindo-se a  
9 incorporação deste composto solubilizado em 1 mL de DMSO. Para fins de comparação, o  
10 veículo hidrogel (veículo Hg) foi preparado da mesma forma, mas sem I3C.

11 Foram utilizados 37 ratos Wistar albinos machos (60 dias), com a média de peso entre  
12 250 a 350g, mantidos em gaiolas próprias para a espécie. Durante a fase experimental, os  
13 animais foram mantidos em gaiolas individuais com cama de jornal e permaneceram em sala  
14 com temperatura controlada (23°C) e ciclo claro/escuro de 12h. A alimentação e água foram  
15 oferecidas *ad libitum* durante todas as fases experimentais. O protocolo executado foi aprovado  
16 pelo Comitê de Ética em Animais (Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, sob o nº  
17 2055300919), que é filiado ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

18 O modelo experimental foi realizado de acordo com a metodologia descrita por (FLORES  
19 et al., 2014; MARQUEZ et al., 2019), onde após a contenção física, os animais foram  
20 anestesiados com cetamina (50 mg / kg, i.m.) e xilazina (10 mg / kg, i.m.). Após obtenção de  
21 anestesia geral dissociativa, a região dorsal do animal foi tricotomizada. A antissepsia cirúrgica  
22 foi realizada com solução hidroalcoólica contendo clorexidine 3% e álcool 70%.

23 A excisão cutânea de espessura total, com 4cm<sup>2</sup>, em formato quadrado (2x2 cm) foi  
24 realizada na região dorsal, entre as duas escápulas. Para garantir a espessura total da excisão, e  
25 o tecido foi elevado até a inserção da fáscia muscular adjacente, mantendo o subcutâneo intacto.

1 No período pré-operatório, e no pós operatório (para fins analgésicos) foi empregado o  
2 cloridrato de tramadol 10 mg / kg BID, SC, associado a dipirona sódica 25 mg / kg, s.c., nas  
3 primeiras 72 horas (FLORES et al., 2014; PICOLLO et al., 2012).

4 Os animais foram randomicamente divididos em cinco grupos experimentais (n = 7-8): I)  
5 Controle (Cont): recebeu somente hidrogel; II) Alantoína (Al 1%): hidrogel contendo 1% de  
6 alantoína (controle positivo); III) I3C: Hg contendo I3C na sua forma livre (I3C); IV) Hg  
7 contendo nanocápsulas brancas (NB) e V) Hg contendo nanocápsulas de I3C (N-I3C). Cada  
8 grupo recebeu a respectiva formulação por aplicação tópica, na quantidade de  
9 aproximadamente 0,5g, por 5 dias consecutivos, duas vezes ao dia. As feridas foram  
10 fotografadas a distância de 25cm nos dias experimentais 1, 3, e 6 (imediatamente antes da  
11 eutanásia). As áreas das excisões dorsais cutâneas foram determinadas com auxílio do software  
12 ImageJ®. Os resultados foram convertidos em perceptual (%) de regressão da área de excisão  
13 dorsal cutânea dos dias experimentais 3 e 5 em relação ao dia experimental 1(basal).

14 No sexto dia experimental, individualmente, a região da ferida (granulação) foi  
15 fotografada para mensurar o parâmetro biofísico, excisada, coletada e homogeneizada em  
16 solução tampão apropriada para análises bioquímicas.

17 A peroxidação lipídica foi avaliada pela técnica de TBARS que consiste em aquecer o  
18 material biológico com o ácido tiobarbitúrico (TBA), em meio ácido e medir a formação de um  
19 produto de cor rósea, espectrofotometricamente, segundo metodologia de OHKAWA 1979. Os  
20 resultados foram expressos em nmol malondialdeído (MDA) /g de tecido.

21 A carbonilação de proteínas foi quantificada pelo método de YAN et al. 1995. A proteína  
22 solúvel foi incubada com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH; 10mM em HCl 2M) ou HCl 2M à  
23 temperatura ambiente durante 1h. O tampão desnaturação (150mM de tampão de fosfato de  
24 sódio, pH 6,8, com sulfato de dodecil de sódio a 3%), etanol (99,8%) e hexano (99,5%) foram  
25 adicionados, misturados por agitação e centrifugados. A proteína isolada a partir da interface

1 foi lavada com acetato de etila / etanol, na proporção 1:1 (v / v) e suspensa em tampão de  
2 desnaturação. Cada amostra foi lida a 370nm em espectrofotômetro contra a correspondente  
3 amostra de HCl (em branco) e os resultados expressos em nmol de proteína carbonil/g de tecido.

4 Os níveis de espécies reativas (ER) nos homogenatos cutâneos foram quantificados  
5 utilizando a mensuração da oxidação da diclorofluoresceína, determinada a 488nm para  
6 excitação e 525nm para emissão (HEMPEL et al., 1999). As amostras (20µL) foram  
7 adicionadas ao meio tampão Tris-HCl (0,01mM; pH 7,4) e 2',7'-diclorofluoresceína diacetato  
8 (DCFH-DA) (10µM). Após, foram incubadas no escuro durante 1h a 37°C, até a medição da  
9 fluorescência. Os níveis ER foram expressos como percentagem (%) dos valores de controle.

10 A atividade de CAT foi quantificada espectrofotometricamente através do método de  
11 AEBI (1984), que envolve um acompanhamento do desaparecimento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na presença de  
12 homogeneizado celular (pH 7 a 250 °C) a 240nm durante 120s. A atividade enzimática é  
13 expressa em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/g de tecido.

14 O GSH foi determinado de acordo com a metodologia proposta por ELLMAN (1959). A  
15 coloração amarela desenvolve-se pela reação da glutathiona reduzida (GSH) com o reagente de  
16 cor 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), detectada a 412nm, após modificações  
17 (JACQUES-SILVA et al., 2001). Os níveis são expressos em nmol de NPSH/g tecido.

18 Para determinar a vitamina C, segundo GALLEY et al. (1996) e modificada por JACKES-  
19 SILVA (2001), o ácido deidrosascórbico é acoplado ao 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e,  
20 quando tratado com ácido sulfúrico, forma um composto laranja-avermelhado que é medido em  
21 520nm. O resultado será expresso em µg VIT C/g de tecido.

22 Os dados foram submetidos a Análise de Variância de uma via, seguida pelo teste *post-*  
23 *hoc* de Duncan. Foi utilizado o Software package Statistic 8.0 para Windows, para a realização  
24 das análises e para a elaboração das figuras, utilizou-se o GraphPad Prism® (versão 5.01). Os

1 valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Valores foram  
2 considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

3

### 4 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

5        Demonstramos a influência benéfica das nanocápsulas contendo I3C tanto nos  
6 parâmetros biofísicos (% de regressão), quanto nas análises de perfil oxidativo das feridas  
7 cutâneas de ratos. Foi observado que no dia experimental 3, houve aumento da área das feridas  
8 em relação ao basal, sendo menos representativo nos grupos A1 1%, I3C, NB e N-I3C, quando  
9 comparados ao grupo controle. O grupo tratado por hidrogéis de I3C na forma livre também  
10 demonstrou aumento da ferida, quando comparado ao grupo A1 1%. No entanto, no dia 6 não  
11 foram observadas diferenças entre os grupos (Figura 1), exceto o grupo de I3C, que mostrou  
12 menor percentual de retração em relação ao grupo controle e controle positivo. O aumento da  
13 área da ferida, no terceiro dia, pode ter ocorrido devido à massiva degradação de proteínas úteis  
14 na formação do tecido de granulação. Ademais, as primeiras fases do processo cicatricial são  
15 constituídas pela contração de bordas e aumento da resistência do tecido neoformado,  
16 ocorrendo de forma centrípeta (das bordas da lesão para o centro) (WINKLE, VAN, 1967).  
17 Esse evento é provocado pela contração dos filamentos de miofibroblastos e rearranjo de  
18 moléculas de colágeno (ANDERSON, 1996).

19        Os resultados de regressão das feridas, corroboram com os achados do perfil oxidativo  
20 das feridas cutâneas. Naturalmente o organismo produz, ER, para conferir proteção contra  
21 patógenos, tais espécies são rapidamente neutralizadas pelos sistemas de defesas antioxidantes  
22 (WAGENER; CARELS; LUNDTVIG, 2013). No entanto, quando ocorre aumento da geração de  
23 ER, que excede a capacidade antioxidante do organismo, se instala um quadro denominado  
24 estresse oxidativo, que desempenha papel importante no agravamento de processos  
25 inflamatórios (WAGENER; CARELS; LUNDTVIG, 2013). Isso ocorre devido à intensa

1 agressão que as ER exercem sobre macromoléculas de proteínas e lipídios que compõe as  
2 células (WAGENER; CARELS; LUNDEVIG, 2013). No presente estudo, foi demonstrado que os  
3 tratamentos, sobretudo no grupo N-I3C, conferem maior proteção ao tecido cicatricial frente  
4 aos danos oxidativos que ocorreram na fase inflamatória e proliferativa. Tal proteção ocorreu  
5 pois houve redução significativa dos níveis na peroxidação lipídica nos grupos NB e N-I3C  
6 quando comparados aos grupos controle, Al 1% e I3C (Fig. 2A). Também houve redução nos  
7 níveis de PC nos grupos Al 1%, I3C, NB e N-I3C em relação ao grupo controle, e grupo N-I3C  
8 apresentou acentuada redução nos níveis de PC em relação aos outros tratamentos (Fig. 2B). O  
9 grupo N-I3C apresentou menor geração de ER quando comparado aos grupos Al 1% e I3C (Fig  
10 2C). Nossos resultados em conjunto fornecem base para demonstrar a geração de ER promove  
11 danos às proteínas e lipídios da área lesionada, provocando danos que podem dificultar as fases  
12 iniciais do processo cicatricial. Embora no sexto dia após a lesão não se observasse alterações  
13 significativas na regressão da ferida, percebe-se menor intensidade dos danos oxidativos no  
14 grupo N-I3C do que no grupo controle.

15        Em relação aos parâmetros antioxidantes, observou-se redução da atividade da CAT em  
16 todos os grupos tratados quando comparados ao controle, e se observou que o grupo N-I3C,  
17 apresentou menor atividade da CAT em relação aos outros três tratamentos (Al 1%, I3C e NB)  
18 (Fig 2D). Os níveis de NPSH foram menores em todos os tratamentos quando comparados ao  
19 grupo controle. Os grupos I3C, NB e N-I3C também apresentaram menores níveis desse  
20 antioxidante, quando comparado ao grupo Al 1% (Fig 2E). Não foram encontradas diferenças  
21 entre nenhum grupo em relação aos níveis de VIT C (Fig 3F). O sistema de defesa antioxidante  
22 cutâneo é formado por compostos de origem enzimática (como a CAT, superóxido dismutase  
23 e glutathione peroxidase) e de origem não enzimática como a glutathione reduzida e vitamina C  
24 (HALLIWELL 2006; SILVEIRA et al. 2011; SAHU et al. 2021) e possuem a função de

1 contribuir com o balanço *redox* celular através da neutralização e eliminação de espécies  
2 radiculares e não radiculares (HALLIWELL, 2006).

3         Corroborando com nossos resultados, SILVEIRA et al. 2011, demonstraram que o  
4 tratamento a laser no reparo de feridas cutâneas, reduziram os níveis de RS, TBARS e PC. Esses  
5 autores relataram redução na atividade da CAT, quando da utilização do laser. Desse modo, a  
6 redução nas defesas antioxidantes (CAT e NPSH), observada no corrente trabalho, pode ter  
7 ocorrido devido à menor intensidade de processo inflamatório em consequência da menor  
8 produção de ER, visto que o I3C nanoencapsulado possui atividades anti-inflamatórias e  
9 antioxidantes descritas (CHOI et al., 2012; EL-NAGA; AHMED; ABD AL HALEEM, 2014;  
10 LUO et al., 2013). Destaca-se que a aplicação tópica de compostos antioxidantes, representa  
11 estratégia interessante na proteção cutânea contra o estresse oxidativo.

12         O grupo N-I3C apresentou melhor status oxidativo do que o grupo I3C. Esse fato ocorre  
13 pois o I3C é fotossensível (LUO et al., 2013), e a nanoencapsulação protege o fármaco da  
14 fotodegradação. Este dado já foi relatado em estudos anteriores (GEHRCKE et al., 2017, 2018).  
15 Também, em alguns parâmetros (TBARS, PC, CAT e NPSH), foi demonstrada a atividade do  
16 grupo NB, *per se*. Esses achados podem ser explicados, uma vez que as nanocápsulas  
17 empregadas no presente trabalho possuem como núcleo oleoso os TCM, e já é comprovado a  
18 atividade cicatrizante da aplicação tópica desses ácidos graxos (sem estarem envolvidos em  
19 sistemas nanoestruturados), em feridas cutâneas (MAGALHÃES et al., 2008). Destacamos  
20 também que no presente estudo a alantoína foi utilizada como controle positivo, pois oferece  
21 riscos insignificantes ao tecido e estimula a formação de granulação, já sendo empregada  
22 clinicamente como agente cicatrizante (CARRICONDE, 1997).

23

## 1 CONCLUSÃO

2           Demonstramos uma possível atividade cicatrizante do I3C nanoencapsulado em gel de  
3 goma de alfarroba e núcleo de TCM. Nossos resultados fornecem evidências de que a  
4 incorporação do I3C em nanocápsulas poliméricas é promissora e segura, destacando a  
5 formulação como benéfica no processo cicatricial quanto à redução de danos oxidativos na fase  
6 aguda e proliferativa.

7

## 8 AGRADECIMENTOS

9           Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
10 (CNPq, Brasil); CAPES, Brasil; e PRPGP-UFSM (PROAP) pelas bolsas e apoio financeiro.

11

## 12 DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

13           Os autores declaram que não existe conflito de interesse.

14

## 15 CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

16           Os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito.

17



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Federal de Santa Maria

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INFLUÊNCIA DE HIDROGÉIS CONTENDO NANOCÁPSULAS DE INDOL-3-CARBINOL NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS", protocolada sob o CEUA nº 2055300919 (ID 002897), sob a responsabilidade de **Daniel Curvello de Mendonça Müller e equipe; Letícia Cruz; Hecson Jesser Segat; Daniel Vargas; Mailine Gehrcke; Raquel Cristine Silva Barcelos; Marilise Escobar Bürger** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 24/03/2020.

We certify that the proposal "INFLUENCE OF HYDROGELS CONTAINING INDOLE-3-CARBINOL NANOCAPSULES IN HEALING OF RAT CUTANEOUS WOUND", utilizing 72 Heterogenics rats (72 males), protocol number CEUA 2055300919 (ID 002897), under the responsibility of **Daniel Curvello de Mendonça Müller and team; Letícia Cruz; Hecson Jesser Segat; Daniel Vargas; Mailine Gehrcke; Raquel Cristine Silva Barcelos; Marilise Escobar Bürger** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 03/24/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 01/2020 a 12/2020

Área: [Departamento de Clínica de Pequenos Animais](#)

Origem: [Biotério externo](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [55 a 60 dias](#)

N: [72](#)

Linhagem: [Winstar](#)

Peso: [220 a 280 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (FARMATOX) prédio 21

Santa Maria, 31 de janeiro de 2021

Profa. Dra. Patrícia Severo do Nascimento  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

## 1 REFERENCIAS

- 2           AEBI, H. [13] Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, 1984. v. 105, n. C, p. 121–  
3 126.
- 4           AMARE, D. E. et al. Acid condensation products of indole-3-carbinol and their in-vitro  
5 (anti)estrogenic, (anti)androgenic and aryl hydrocarbon receptor activities. **Arabian Journal**  
6 **of Chemistry**, 2020. v. 13, n. 9, p. 7199–7211. Disponível em:  
7 <<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.08.002>>.
- 8           AMPOFO, E. et al. Indole-3-carbinol is a potent inhibitor of ischemia/reperfusion-  
9 induced inflammation. **Journal of Surgical Research**, 2017. Disponível em:  
10 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2017.03.019>>.
- 11          ANDERSON, D. **Wound management in small animal practice. In Practice.**
- 12          ASHOK, A. et al. Biomedical application of Indole-3-carbinol : A mini-review. 2021.  
13 v. 41, n. February, p. 49–54.
- 14          BANERJEE, S. et al. Attenuation of multi-targeted proliferation-linked signaling by  
15 3,3'-diindolylmethane (DIM): From bench to clinic. **Mutation Research - Reviews in**  
16 **Mutation Research**, 2011. v. 728, n. 1–2, p. 47–66. Disponível em:  
17 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.06.001>>.
- 18          BENVEGŪ, D. et al. Estudo da Ação Antipsicótica e efeitos colaterais do haloperidol  
19 nanoencapsulado em ratos. **Elsevier**, 2012. Disponível em:  
20 <[http://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/3842/BENVEGŪ%2C  
21 MOTER.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/3842/BENVEGŪ%2C%20DALILA%20MOTER.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>.
- 22          BENVEGŪ, D. M. et al. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric  
23 nanocapsules increase its efficacy in the antipsychotic treatment in rats. **European Journal of**  
24 **Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2011.
- 25          BOYKO, T. V.; LONGAKER, M. T.; YANG, G. P. **Laboratory Models for the Study**

1 **of Normal and Pathologic Wound Healing. Plastic and Reconstructive Surgery.**

2 CHOI, Y. et al. Indole-3-carbinol prevents diet-induced obesity through modulation of  
3 multiple genes related to adipogenesis, thermogenesis or inflammation in the visceral adipose  
4 tissue of mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2012.

5 CRISTINA, A.; GONZALEZ, D. O. Wound healing - A literature review \*. [s.d.]. n.  
6 Figure 1, p. 614–620.

7 EL-NAGA, R. N.; AHMED, H. I.; ABD AL HALEEM, E. N. Effects of indole-3-  
8 carbinol on clonidine-induced neurotoxicity in rats: Impact on oxidative stress, inflammation,  
9 apoptosis and monoamine levels. **NeuroToxicology**, 2014. v. 44, p. 48–57. Disponível em:  
10 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2014.05.004>>.

11 ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**,  
12 1959. v. 82, n. 1, p. 70–77.

13 FLORES, F. C. et al. Hydrogels Containing Nanocapsules and Nanoemulsions of Tea  
14 Tree Oil Provide Antiedematogenic Effect and Improved Skin Wound Healing. **Journal of**  
15 **Nanoscience and Nanotechnology**, 2014. v. 15, n. 1, p. 800–809.

16 GALLEY, H. F.; DAVIES, M. J.; WEBSTER, N. R. Ascorbyl radical formation in  
17 patients with sepsis: Effect of ascorbate loading. **Free Radical Biology and Medicine**, 1996.

18 GEHRCKE, M. et al. Enhanced photostability, radical scavenging and antitumor  
19 activity of indole-3-carbinol-loaded rose hip oil nanocapsules. **Materials Science and**  
20 **Engineering C**, 2017. v. 74, p. 279–286. Disponível em:  
21 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.006>>.

22 \_\_\_\_\_ et al. Nanocapsules improve indole-3-carbinol photostability and prolong its  
23 antinociceptive action in acute pain animal models. **European Journal of Pharmaceutical**  
24 **Sciences**, 2018. v. 111, p. 133–141. Disponível em:  
25 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.050>>.

- 1           GUPTA, Sanjeev et al. Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological  
2 treatments. **Indian Dermatology Online Journal**, 2013. v. 4, n. 4, p. 267.
- 3           HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are now? **J.**  
4 **Neurochem**, 2006. v. v.97, p. p.1634-1658.
- 5           HEMPEL, S. L. et al. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular  
6 oxidants: Comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-  
7 dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radical Biology and**  
8 **Medicine**, 1999.
- 9           JACKES-SILVA, M. C. Et Al. Dhiphenyldiselenide and ascorbic acid changes  
10 deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **PharmacolToxicol**, 2001.  
11 v. V.88, p. P. 119-125.
- 12           JIANG, J. et al. Indole-3-carbinol inhibits LPS-induced inflammatory response by  
13 blocking TRIF-dependent signaling pathway in macrophages. **Food and Chemical**  
14 **Toxicology**, 2013. v. 57, p. 256–261. Disponível em:  
15 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.040>>.
- 16           LUO, Y. et al. Encapsulation of indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane in  
17 zein/carboxymethyl chitosan nanoparticles with controlled release property and improved  
18 stability. **Food Chemistry**, 2013. v. 139, n. 1–4, p. 224–230. Disponível em:  
19 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.113>>.
- 20           MAGALHÃES, M. S. F. et al. Effect of a combination of medium chain triglycerides,  
21 linoleic acid, soy lecithin and vitamins A and E on wound healing in rats. **Acta Cirurgica**  
22 **Brasileira**, 2008.
- 23           MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, É. P. Di; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização  
24 conceitos atuais e recursos auxiliares. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2003. v. 78, n. 4,  
25 p. 393–410. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-)

- 1 05962003000500002&lng=pt&tlng=pt>.
- 2 MARCHIORI, M. C. L. et al. Nanoencapsulation Improves Scavenging Capacity and  
3 Decreases Cytotoxicity of Silibinin and Pomegranate Oil Association. **AAPS PharmSciTech**,  
4 2017. v. 18, n. 8, p. 3236–3246.
- 5 MARQUEZ, A. et al. Materials Science & Engineering C Chitosan hydrogels  
6 containing nanoencapsulated phenytoin for cutaneous use : Skin permeation / penetration and  
7 efficacy in wound healing. 2019. v. 96, n. March 2018, p. 205–217.
- 8 MASSON-MEYERS, D. S. et al. Experimental models and methods for cutaneous  
9 wound healing assessment. 2020. n. January, p. 1–17.
- 10 NASIR, A.; FRIEDMAN, A.; WANG, S. Nanotechnology in dermatology.  
11 **Nanotechnology in Dermatology**, 2013a. v. 9781461450, n. 1, p. 1–291.
- 12 \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. **Nanotechnology in dermatology**. [S.l.]: [s.n.], 2013b.
- 13 NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-  
14 inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological**  
15 **Research**, 2010. v. 302, n. 2, p. 71–83.
- 16 OHKAWA, H. Et Al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid  
17 reaction. **Anal. Biochem.**, 1979. v. V.95, p. P.351-358.
- 18 PEGORARO, N. S. et al. Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate  
19 protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. **Colloids and Surfaces B:**  
20 **Biointerfaces**, 2017. v. 150, p. 32–40. Disponível em:  
21 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.013>>.
- 22 PICOLLO, C. et al. Hemodynamic and thermoregulatory effects of xylazine-ketamine  
23 mixture persist even after the anesthetic stage in rats. **Arquivo Brasileiro de Medicina**  
24 **Veterinaria e Zootecnia**, 2012.
- 25 PIRES, J. et al. Healing of dermal wounds property of Caryocar brasiliense oil loaded

1 polymeric lipid-core nanocapsules: formulation and in vivo evaluation. **European Journal of**  
2 **Pharmaceutical Sciences**, 2020. v. 150, n. April.

3 SAHU, A. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Prussian blue  
4 nanozyme promotes full-thickness skin wound healing. **Materials Science and Engineering**  
5 **C**, 2021.

6 SANTOS, A. CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO DE FERIDAS  
7 CUTÂNEAS EM RATOS WISTAR COM USO DE Stryphnodendron adstringens. **Journal of**  
8 **Chemical Information and Modeling**, 2019. v. 53, n. 9, p. 1689–1699.

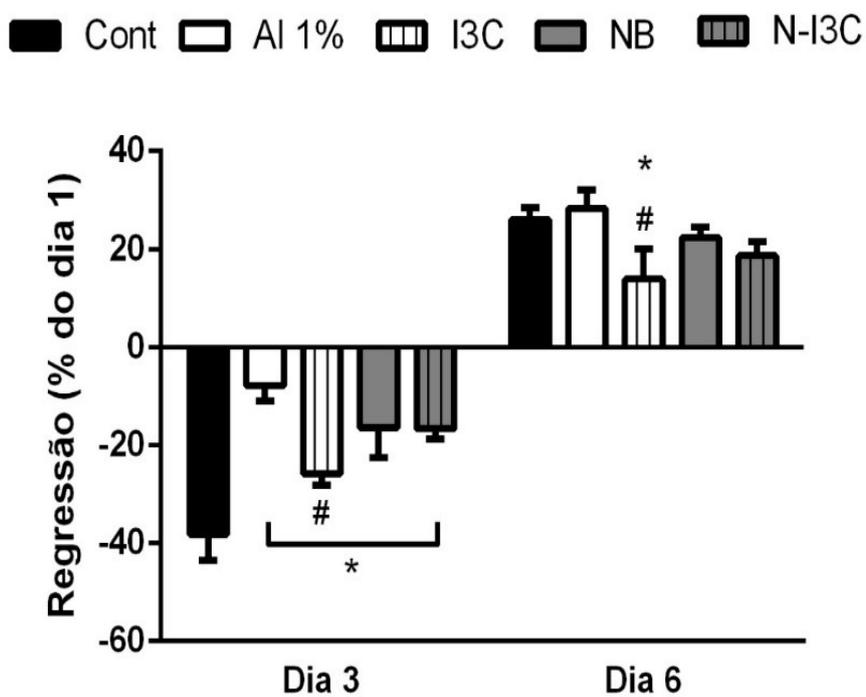
9 SILVEIRA, P. C. L. et al. Effects of low-power laser irradiation (LPLI) at different  
10 wavelengths and doses on oxidative stress and fibrogenesis parameters in an animal model of  
11 wound healing. **Lasers in Medical Science**, 2011.

12 WAGENER, F. A. D. T. G.; CARELS, C. E.; LUNDVIG, D. M. S. **Targeting the redox**  
13 **balance in inflammatory skin conditions. International Journal of Molecular Sciences.**

14 WINKLE, W. VAN. **Wound contraction. Surgery Gynecology and Obstetrics.**

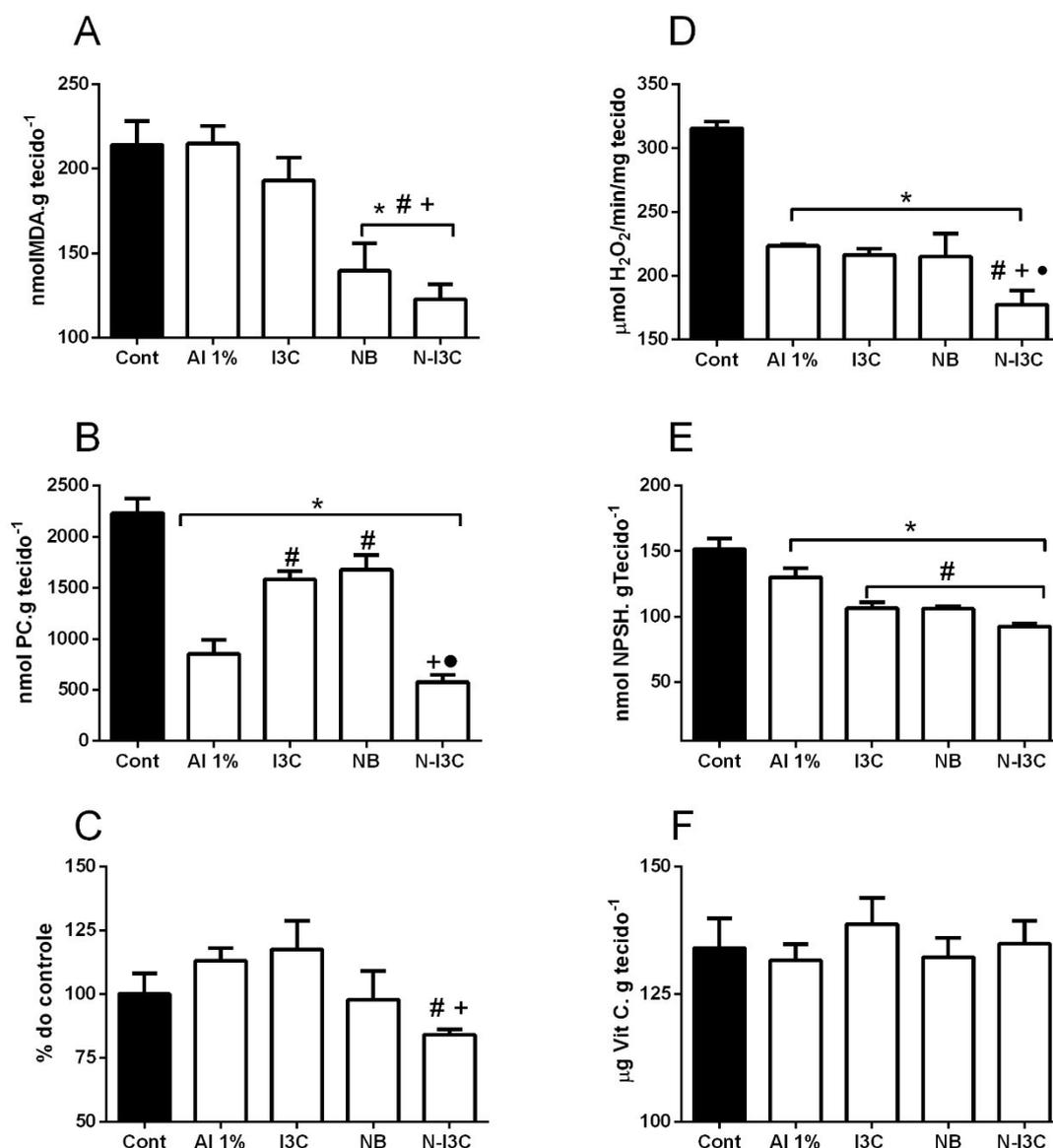
15 YAN, L. J.; TRABER, M. G.; PACKER, L. Spectrophotometric method for  
16 determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density  
17 lipoproteins. **Analytical Biochemistry**, 1995.

18



1

2 Figura 1 - Efeitos dos hidrogeis contendo I3C livre e nanocápsulas de I3C sobre a área de  
 3 regressão das feridas, em relação ao dia 1 (basal). Valores foram expressos em média  $\pm$  E.P.M.  
 4 \* indica diferença para o grupo controle, # indica diferença para o grupo Al 1%, quando  $p < 0,05$ .



1

2 Figura 2 - Efeito dos hidrogéis contendo I3C livre e nanocápsulas de I3C sobre parâmetros de  
 3 danos oxidativos em feridas cutâneas de ratos. (A) Níveis de espécies reativas ao ácido  
 4 tiobarbitúrico (TBARS); (B) Níveis de proteína carbonilada (PC); (C) Geração de espécies  
 5 reativas (ER); (D) Atividade da Catalase (CAT); (E) níveis de NPSH; (F) Níveis de Vitamina  
 6 C (VIT C). Valores foram expressos em média  $\pm$  E.P.M. (\*) indica diferença para o grupo  
 7 controle, (#) indica diferença para o grupo AI 1%, (+) indica diferença para o grupo I3C livre e  
 8 (•) indica diferença para o grupo NB, quando  $p < 0,05$ .

9

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesta dissertação, podemos propor que:

- ✓ Todos tratamentos aplicados topicamente impediram o aumento da área da ferida que aconteceu no dia 3, mostrando uma atividade contratora das formulações;
- ✓ As feridas tratadas com nanocápsulas de I3C, tendo como veículo o hidrogel de goma de alfarroba (na espécie, concentração e intervalo testados), apresentaram menores danos oxidativos na fase aguda e proliferativa da cicatrização;
- ✓ O tratamento com nanocápsulas de I3C apresentou reduzida capacidade antioxidante no tecido cicatricial, possivelmente em decorrência de um menor processo inflamatório.
- ✓ A incorporação do I3C em nanocápsulas poliméricas é promissora como agente cicatrizante em feridas cutâneas.

## LISTA DE REFERÊNCIAS

ABLA, L.E.F.; ISHIZUKA, M.M.A. Fisiopatologia das Feridas. In: Ferreira LM. **Manual de cirurgia plástica.**, p. 5-11, 2005.

ALIMOHAMMAD, A. et al. A study of the effect of magnesium hydroxide on the wound healing process in rats. **Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences**, v.16(4), p.165-170, 2007.

AMARE, D. E. et al. Acid condensation products of indole-3-carbinol and their in-vitro (anti)estrogenic, (anti)androgenic and aryl hydrocarbon receptor activities. **Arabian J Chem**, v. 13, n. 9, p. 7199–7211, 2020.

ANDERTON, M. J. et al. Pharmacokinetics and tissue disposition of índole-3-carbinol and its acid condensation products after oral administration tom ice. **Clin Cancer Res**, v. 10, p. 5233-5241, 2004.

ARCHANA, D., DUTTA, J., DUTTA, P.K. Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 57, p. 193–203, 2013.

ARNOLD, J.R. et al. A pele: estrutura básica e função. Doenças básicas da pele de Andrews. **Dermatol Clin**, p. 1-14, 1994.

ASHOK, A. et al. Biomedical application of Indole-3-carbinol : A mini-review. v. 41, p. 49–54, 2021.

BANERJEE, S. et al. Attenuation of multi-targeted proliferation-linked signaling by 3,3'-diindolylmethane (DIM): **From bench to clinic. Mutation Research - Reviews in Mutation Research.**, v. 728, n. 1–2, p. 47–66, 2011.

BARBASTEFANO, R. G. et al. Nanotecnologia e Nanobiotecnologia: estado da arte, perspectivas de inovação e investimentos. **In XXV Encontro Nacional de Engenharia de Produção**, 2005, Porto Alegre, RS, Brasil. ENEGEP ABEPRO, 2005.

BRIGANTI, S.; PICARDO, M. S. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 17, p. 663-669, 2003.

BRYAN, N. et al. Reactive oxygen species (ROS)—A family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. **Eur. Cells Mater.** v. 24, p.249–265, 2012.

CALIN, M.A.; COMAN, T.; CALIN, M.R. The effect of low level laser therapy on surgical wound healing. **Rom Rep in Phys**, v 62, p. 217-627, 2016.

CLARK, R.A.F. Wound repair: overview and general considerations. **Plenum Press.** p. 3–50, 1996.

COTRAN, R.S. et al. Robbins & Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592 p.

COUVREUR, P. et al. Nanocapsule technology: a review. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 19, p. 99-134, 2002.

COVIELLO, Tommasina et al. Two galactomannans and scleroglucan as matrices for drug delivery: Preparation and release studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**,. v. 66, n. 2, p. 200–209, 2007.

D'AUTREAU, B.; TOLEDANO, M.B. Ros as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ros homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, p. 813–824, 2007.

DURÁN, N.; DE AZEVEDO, M. M. M. O que é nanobiotecnologia? Atualidades e perspectivas. Instituto de Química, Laboratório de Química Biológica, Unicamp, Campinas, 2004.

ER, T.K.; TSAI, S.M.; WU, S.H.; Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. **Clin Biochem**, v. 40(13-14), p. 1015-1019, 2007.

FARIA, M.M.P. Prevalência, perfil clínico e sócio-demográfico dos portadores de feridas, usuários do Sistema Único de Saúde, internados em um hospital geral no Tocantins. 2010. 113p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília,2010.

GEHRCKE et al. Nanocapsules improve indole-3-carbinol photostability and prolong its antinociceptive action in acute pain animal models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**v. 111, p. 133–141, 2018.

GEHRCKE, M. Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas contendo indol-3-carbinol e avaliação biológica das formulações. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, 2016.

GIULIANI, L. M. Hidrogéis de goma de alfarroba contendo compostos indólicos nanoencapsulados com ação anti-inflamatória em desordens cutâneas induzidas em camundongos. 2019, p. 110. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2019.

GONZALEZ, A. C. D. O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614–620, 2016.

GROSE, K. R.; BJELDANES, L.F. Oligomerization of indole-3-carbinol in aqueous acid. **Chemical Research in Toxicology**, v.5, p. 188-193, 1992.

GRUPO ETC – Grupo de Ação Sobre Erosão, Tecnologia e Informação (Org). Nanotecnologia: os riscos da tecnologia do futuro: saiba sobre produtos invisíveis que já estão no nosso dia-dia e o seu impacto na alimentação e na agricultura. Porto Alegre: L&pm, 2005. 197 p.

GUPTA, Sanjeev et al. Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 4, n. 4, p. 267, 2013.

GURTNER, G.C. et al. Wound Repair and Regeneration. **Nature**, v.453, p.314-321, 2008.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are now? **J. Neurochem**, v. 97, p. 1634-1658, 2000

JEONG, J. H. et al. Protective effects of indole-3-carbinol-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles against glutamate-induced neurotoxicity. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 10, p. 7922–7928, 2015.

JIANG, J. et al. Indole-3-carbinol inhibits LPS-induced inflammatory response by blocking TRIF-dependent signaling pathway in macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 256–261, 2013.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica: texto e atlas. 13. ed. - [Reimpr.]. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KATIYAR, S. K. et al. Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 176, n. 2, p. 110–117, 2001.

KAUR, M. et al. Current nanotechnological strategies for effective delivery of bioactive drug molecules in the treatment of tuberculosis. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 31, p. 49-88, 2014.

LAHA, B. et al. Smart karaya-locust bean gum hydrogel particles for the treatment of hypertension: Optimization by factorial design and pre-clinical evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 210, p. 274–288, 2019.

LARSSON, P. et al. Ultraviolet A and B affect human melanocytes and keratinocytes differently. A study of oxidative alterations and apoptosis. **Exp. Dermatol.**, v.14, p. 117-123, 2005.

LEE, C. M. et al. Indole-3-Carbinol Induces Apoptosis in Human Osteosarcoma MG-63 and U2OS Cells. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–13, 2018.

LEE, V. H. L. Nanotechnology: challenging the limit of creativity in targeted drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p.1527-1528, 2004.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol**, v. 25, p. 9-18, 2007.

LUO, Y. et al. Encapsulation of indole-3-carbinol and 3,3-diindolymethane in zein/carboxymethyl chitosan nanoparticles with controlled release property and improved stability. **Food Chemistry**, v. 139, p. 224-230, 2013.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, É. P. Di; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização conceitos atuais e recursos auxiliares. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393–410, 2003.

MARCHIORI, M. C. L. et al. Nanoencapsulation Improves Scavenging Capacity and Decreases Cytotoxicity of Silibinin and Pomegranate Oil Association. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 8, p. 3236–3246, 2017.

MATTHEOLABAKIS, G.; RIGAS, B.; CONSTANTINIDES, P.P. Nanodelivery strategies in câncer chemotherapy: biologicval rationale and pharmaceutical perspectives. **Nanomedicine**, v. 7, p. 1577-1590, 2012.

MEDRADO, A. R. A. P. et al. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 32, n. 3, p. 239–244, 2003.

MORA-HUERTAS, C.E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

NASIR, A.; FRIEDMAN, A.; WANG, S. Nanotechnology in dermatology. **Nanotechnology in Dermatology**, v. 9781461450, n. 1, p. 1–291, 2013.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Arc. Dermatol. Res.**, v. 302, p. 71-83, 2010.

NIKAM V.K. et al. Eudragit, a versatile polymer : a Review. **Pharmacology Online**, v. 1, p. 152, 2011.

PEGORARO, N.S. et al. Nanoencapsulation of coenzyme Q10 and vitamin E acetate protects against UVB radiation-induced skin injury in mice. **Colloids and surfaces b-biointerfaces**, v. 150, p. 32-40, 2017.

PIRES, J. et al. Healing of dermal wounds property of Caryocar brasiliense oil loaded polymeric lipid-core nanocapsules: formulation and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 150, n. April, 2020.

REED, G.A. et al. A phase I study of indole-3-carbinol in women: tolerability and effects. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14(8), p.1953-1960, 2005.

ROSTOKA, E. et al. Effects of lycopene, indole-3-carbinol, and luteolin on nitric oxide  
ROY, S. et al. Dermal wound healing is subject to redox control. **Mol Ther**, v.13, p. 211–220, 2006.

SANTOS, A. Cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas em ratos wistar com uso de *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2019.

SANTOS, V.L.C.G. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: Duarte YAO, M.J.D. Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico. São Paulo: Atheneu; p.265-306, 2000.

SCHAFFER, M.; WERNER, S. Transcriptional control of wound repair. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 23, p. 69–92, 2007.

SHINDO, Y.; WITT, E.; PACKER L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. **J Invest Dermatol**, v. 100(3), p. 260-265, 1993.

SONG, J.M. et al. Intranasal delivery of liposomal indole-3-carbinol improves its pulmonary bioavailability. **Int. J. Pharm**, v. 477, p. 96–101, 2014.

TAYLOR-HARDING, B. et al. Indole-3-carbinol synergistically sensitises ovarian cancer cells to bortezomib treatment. **Br J Cancer**, v. 106(2), p. 333-343, 2012.

UHL, B. et al. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. **Blood**, v. 128(19), p. 2327-2337, 2016.

VIEIRA, V.B.C. Estudo da influência da morfologia de nanopartículas mesoporosas de silicatos na liberação do anticancerígeno indol-3-carbinol. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ceilândia, 2015.

WAGENER, F. A. D. T. G.; CARELS, C. E.; LUNDVIG, D. M. S. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 9126-9167, 2013.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Ver**, v.;83, p. 835–870, 2003.

WORLD NANOTECHNOLOGY MARKET. An industry update. RNCOS. p.1-60, 2005.

XUEQING, Z. et al. Resveratrol accelerates wound healing by attenuating oxidative stress-induced impairment of cell proliferation and migration. **BURNS**, v. 47, p. 133-139, 2021.