



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB
CAMPUS GAMA – FGA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

**ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO TECIDUAL APÓS O
USO COMBINADO DE LIPOSSOMAS COM CURCUMINA EM BIOMEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL E
LEDTERAPIA PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL EM PORTADORES DE ÚLCERA DIABÉTICA**

THAMIS FERNANDES SANTANA

ORIENTADOR: DRA. MARCELLA LEMOS BRETTAS CARNEIRO

COORIENTADOR: DRA. SUÉLIA DE SIQUEIRA RODRIGUES FLEURY ROSA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB

FACULDADE UNB GAMA – FGA



**ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO
TECIDUAL APÓS O USO COMBINADO DE LIPOSSOMAS COM CURCUMINA EM
BIOMEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL E LEDTERAPIA PARA REGENERAÇÃO
TECIDUAL EM PORTADORES DE ÚLCERA DIABÉTICA**

THAMIS FERNANDES SANTANA

ORIENTADOR: DRA. MARCELLA LEMOS BRETTAS CARNEIRO

COORIENTADOR: DRA. SUÉLIA DE SIQUEIRA RODRIGUES FLEURY ROSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM
ENGENHARIA BIOMÉDICA

PUBLICAÇÃO: 135A/2020

BRASÍLIA/DF, FEVEREIRO DE 2021

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
FACULDADE UNB GAMA - FGA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

**ANÁLISE DA INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO
TECIDUAL APÓS O USO COMBINADO DE LIPOSSOMAS COM CURCUMINA EM
BIOMEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL E LEDTERAPIA PARA REGENERAÇÃO
TECIDUAL EM PORTADORES DE ÚLCERA DIABÉTICA**

THAMIS FERNANDES SANTANA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

APROVADA POR:



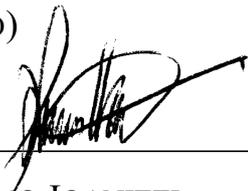
DRA. MARCELLA LEMOS BRETTAS CARNEIRO
(ORIENTADOR)



DRA. SUÉLIA DE SIQUEIRA RODRIGUES FLEURY ROSA
(COORIENTADOR)



DR. CRISTIANO JACQUES MIOSSO
(EXAMINADOR INTERNO)



DR. GRAZIELLA ANSELMO JOANITTI
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, FEVEREIRO DE 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

SANTANA, THAMIS FERNANDES

Análise da Inflamação e Estresse Oxidativo no Processo de Cicatrização Tecidual Após o Uso Combinado de Lipossomas com Curcumina em Biomembranas de Látex Natural e LEDterapia para Regeneração Tecidual em Portadores de Úlcera Diabética. [Distrito Federal], 2021.

User Field page_minus_preamble = 109p., 210 x 297 mm (FGA/UnB Gama, Mestrado em Engenharia Biomédica, 2021).

Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Faculdade UnB Gama, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

1. Cicatrização de feridas

2. Úlcera diabética

3. Biomembrana de látex natural

4. Curcumina

I. FGA UnB

II. Título (série)

REFERÊNCIA

Santana, Thamis Fernandes (2020). Análise da Inflamação e Estresse Oxidativo no Processo de Cicatrização Tecidual Após o Uso Combinado de Lipossomas com Curcumina em Biomembranas de Látex Natural e LEDterapia para Regeneração Tecidual em Portadores de Úlcera Diabética. Dissertação de mestrado em Engenharia Biomédica, Publicação 135A/2020, Programa de Pós-Graduação, Faculdade UnB Gama, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 109p.

CESSÃO DE DIREITOS

Autor: Thamis Fernandes Santana

Título: Análise da Inflamação e Estresse Oxidativo no Processo de Cicatrização Tecidual Após o Uso Combinado de Lipossomas com Curcumina em Biomembranas de Látex Natural e LEDterapia para Regeneração Tecidual em Portadores de Úlcera Diabética.

Grau: Mestre

Ano: 2021

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender essas cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos.

O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

thamisunb@gmail.com

Brasília, DF – Brasil

Agradecimentos

Agradeço

À Deus pelo dom da vida, pelas conquistas adquiridas até aqui, pelas pessoas que colocou em meu caminho, pela segurança e proteção, por toda força que me deu para que eu continuasse esse trabalho e por não ter me deixado desistir durante os desafios que a vida me trouxe.

À minha querida orientadora, Prof.^a Dra. Marcella Lemos Brettas Carneiro, pelas oportunidades, confiança, compreensão, dedicação e amizade. Obrigada pelos ensinamentos, pelo apoio nos momentos difíceis e por comemorar comigo cada conquista.

À minha coorientadora, Prof.^a Dra. Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa, por me permitir fazer parte da equipe Rapha e poder desenvolver um trabalho tão humanizado. Obrigada pelas oportunidades que me foram dadas e pelos desafios propostos, pois foram essenciais para o meu crescimento como pesquisadora.

Ao Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, especialmente à Prof.^a Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza, pela parceria e suporte na realização dos experimentos.

À querida Natália Carvalho Guimarães, pela parceria, por todo o apoio e ensinamentos com as análises de quantificação de espécies reativas de oxigênio. Obrigada pela partilha de conhecimento e força dada durante os momentos de dificuldade.

Ao Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica no Núcleo de Física Aplicada, especialmente o Prof. Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza, pela parceria e estrutura fornecida para a realização da quantificação de espécies reativas de oxigênio.

À Base Genética Inseminação Artificial, na pessoa do Ricardo Bonato, pelo fornecimento de nitrogênio líquido necessário para a realização da quantificação de espécies reativas de oxigênio.

À Franciéle de Matos da Silva e aos demais envolvidos na produção das biomembranas contendo curcumina.

Aos colegas médicos, enfermeiros e residentes do Ambulatório do Pé Diabético do HRAN, especialmente à Dr.^a Lilian, Dr.^a Luz Marina, Leandro e Breno. Vocês foram parte essencial durante a coleta das amostras, pois me permitiu a realização das coletas de forma tranquila e segura. Obrigada por todos os ensinamentos!

Aos participantes de pesquisa pois sem eles esse trabalho não teria se concretizado. Obrigada por toda confiança em mim e na equipe do Projeto Rapha, pela disposição e compromisso depositado em nós.

À toda equipe, colegas e professores do projeto Rapha pela oportunidade e auxílio durante a pesquisa.

À minha família, que sempre me apoiou na vida acadêmica e profissional. Aos meus pais, Suzemar e Noêmia, que sempre me incentivaram e nunca mediram esforços para permitir que eu continuasse meus estudos e chegasse onde eles não tiveram oportunidade de chegar.

Aos meus avós, Salvador (in memoriam) e Dorvalina, por sempre me incentivarem a buscar meus sonhos e comemorar comigo cada vitória.

Ao meu noivo Jean, pelo companheirismo, compreensão, força e por acreditar em mim. Obrigada por escutar todas minhas angústias, desesperos e alegrias e por zelar para que eu sempre mantivesse a calma. O suporte emocional que me deu durante todo o mestrado foi muito importante para que eu chegasse até aqui.

Aos meus sogros e cunhado, por sempre me acolherem com muito amor e carinho.

À Universidade de Brasília, por permitir minha formação e execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica e toda sua equipe pelo excelente trabalho realizado. Aos professores que contribuíram com a minha formação, muito obrigada!

Aos amigos com os quais o projeto Rapha me presenteou, em especial Luciene, Luciana, Rebecca e Ludmila. Cada uma de vocês tem um lugar especial em meu coração!

Aos membros da banca avaliadora, pela disponibilidade de contribuir e me avaliar.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa do Sabin Medicina Diagnóstica pelo financiamento dos exames hematológicos e bioquímicos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa fornecida e apoio financeiro durante a pesquisa.

A todos os colegas, amigos e professores que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A úlcera de pé diabético (UPD) é responsável pelos elevados índices de amputação dos membros inferiores de portadores de diabetes devido à cicatrização prejudicada causada pela inflamação prolongada associada ao estresse oxidativo ocasionado por espécies reativas de oxigênio (ERO). Dentre as abordagens terapêuticas destaca-se o sistema terapêutico Rapha®, que é baseado no uso concomitante de fototerapia com diodo emissor de luz (LED) e uma biomembrana de látex natural (BLN). Outra alternativa para o tratamento de UPD é o uso da curcumina, um biocomposto com propriedades cicatrizantes, como ação anti-inflamatória e antioxidante. Nossa hipótese é de que o tratamento com a BLN contendo curcumina e LED no comprimento de onda vermelho ($\lambda=695$ nm) promove melhor efeito na cicatrização das feridas reduzindo marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico da terapia Rapha® com a adição de lipossomas com curcumina na cicatrização de portadores de UPD. Essa avaliação teve por base a análise dos processos inflamatórios e de estresse oxidativo associados ao processo de cicatrização tecidual. A população de estudo foi composta por 15 participantes de pesquisa distribuídos igualmente entre os grupos GC (grupo controle), GE1 (grupo experimental 1) e GE2 (grupo experimental 2) que utilizaram respectivamente o tratamento padrão ouro utilizado no Sistema Único de Saúde (SUS), a BLN associada a LED (Rapha®) e BLN contendo lipossomas com curcumina e LED (Rapha® *plus*). Foram coletadas amostras de sangue venoso para análises hematológicas, bioquímicas e quantificação de ERO, e de tecido e sangue das feridas para quantificação de ERO. Além disso, realizou-se registro fotográfico e mediu-se a área das feridas ao longo do tratamento. As amostras foram coletadas no início (D0), meio (D22) e fim dos tratamentos (D45). Ao longo do tratamento, observou-se, apenas, alteração no valor de volume corpuscular médio (VCM) no GC. Contudo, alguns dos parâmetros hematológicos e bioquímicos estavam acima dos valores de referência. Em suma, encontrou-se valores elevados de proteína C-reativa, ureia e TGO em todos os grupos em algum momento do tratamento, enquanto que TGP esteve elevada no GC e GE2 e, creatinina, leucócitos e eosinófilos no GE1. Não houve variação significativa de ERO nas amostras de sangue e ferida nos três grupos experimentais ao longo do tratamento. Em relação à área da ferida não houve redução da área da ferida no GC (valor de $p > 0,05$). Todavia, no GE1 e GE2 notou-se significativa redução da área da ferida (valor de $p < 0,05$). Ao se comparar as áreas das feridas do início para o fim dos protocolos, os grupos GC, GE1 e GE2 apresentaram percentual médio de contração das úlceras de respectivamente $22\% \pm 45\%$, $41\% \pm 20\%$ e $89\% \pm 14\%$. A terapia Rapha® *plus* foi considerada a mais promissora para o tratamento da UPD, visto que apresentou o maior efeito na redução da ferida, com taxa de cicatrização quatro vezes maior que o GC e duas vezes maior que

o GE1, mesmo apresentando a maior área de ferida no início do tratamento. Inclusive, em 40% dos pacientes houve total cicatrização das úlceras crônicas no período entre 30 e 45 dias. Conclui-se que o tratamento utilizando BLN e LED (dispositivo Rapha®) foi mais eficaz para a cicatrização de úlceras de pé diabético do que a terapia utilizada no SUS. Sobretudo, o protocolo utilizando LED e BLN contendo lipossomas com curcumina demonstrou ser mais promissor visto que levou a maior redução da área das feridas. Porém, não foi identificada associação entre os marcadores inflamatórios (sistêmicos e locais) e de estresse oxidativo com o processo de cicatrização nos tempos analisados. Esses resultados podem estar relacionados à variável tempo de análise e diversidade individual dos participantes de pesquisa. Dessa forma, sugere-se que o processo de cicatrização e seus aspectos fisiopatológicos sejam avaliados em menores intervalos de tempo e em uma maior população amostral, a fim de se identificar em quais momentos ocorrem as variações nos marcadores inflamatórios e amenizar os vieses experimentais.

Palavras-chave: Úlcera de pé diabético, Fototerapia, Diodo emissor de luz, Biomaterial, Látex natural, Curcumina, Inflamação, proteína C-reativa, Espécies reativas de oxigênio, Cicatrização de feridas.

ABSTRACT

Diabetic foot ulcers (DFU) are responsible for the high rates of amputation of the lower limbs of patients with diabetes due to impaired healing caused by prolonged inflammation associated with oxidative stress caused by reactive oxygen species (ROS). Among the therapeutic approaches, the Rapha® therapeutic system stands out, which is based on the concomitant use of light-emitting diode (LED) phototherapy and a natural latex biomembrane (NLB). Another alternative for the treatment of DFU is the use of curcumin, a biocomposite with healing properties, as anti-inflammatory, and antioxidant action. Our hypothesis is that treatment with NLB containing curcumin and LED at the red wavelength ($\lambda = 695 \text{ nm}$) has a better effect on wound healing by reducing inflammatory and oxidative stress markers. Thus, this study aimed to evaluate the therapeutic potential of Rapha® therapy with the addition of liposomes with curcumin in the healing of patients with UPD. This assessment was based on the analysis of inflammatory processes and oxidative stress associated with the tissue healing process. The study population was composed of 15 research participants distributed equally among the CG (control group), EG1 (experimental group 1) and EG2 (experimental group 2) groups who respectively used the gold standard treatment used in the Unified Health System (UHS), NLB associated with LED (Rapha®) and NLB containing liposomes with curcumin and LED (Rapha® plus). Venous blood samples were collected for hematological, biochemical analysis, and quantification of ROS in tissue and blood of the wound. Also, a photographic record was performed, and the area of the wounds was measured throughout the treatment. Samples were collected at the beginning (D0), middle (D22), and end of treatments (D45). Throughout the treatment, only a change in the mean corpuscular volume (MCV) value was observed in the CG. However, some of the hematological and biochemical parameters were above the reference values. In short, high values of C-reactive protein, urea, and TGO were found in all groups at some point in the treatment, while TGP was elevated in CG and EG2 and, creatinine, leukocytes, and eosinophils in EG1. There was no significant variation in the level of ROS in the blood and wound samples in the three experimental groups throughout the treatment. Regarding the wound area, there was no reduction in the wound area in the CG ($p\text{-value} > 0.05$). However, in EG1 and EG2 there was a significant reduction in the wound area ($p\text{-value} < 0.05$). When comparing the areas of the wounds from the beginning to the end of the protocols, the groups CG, EG1, and EG2 presented an average percentage of ulcer contraction of $22\% \pm 45\%$, $41\% \pm 20\%$, and $89\% \pm 14\%$, respectively. Rapha® plus therapy was considered the most promising for the treatment of DFU, since it had the greatest effect on wound reduction, with a healing rate four times greater than the CG and two times greater than the EG1, even with the largest area wound at the start of treatment. In fact, in 40% of patients, there was complete healing of chronic

ulcers in the period between 30 and 45 days. It is concluded that the treatment using NLB and LED (Rapha® device) was more effective for the healing of diabetic foot ulcers than the therapy used in UHS. Above all, the protocol using LED and NLB containing liposomes with curcumin proved to be more promising since it led to a greater reduction in the area of wounds. However, no association was found between inflammatory markers (systemic and local) and oxidative stress with the healing process in the analyzed times. These results may be related to the variable time of analysis and individual diversity of the research participants. Thus, it is suggested that the healing process and its pathophysiological aspects be evaluated in shorter intervals and a larger sample population, to identify when the variations in inflammatory markers occur and to ease experimental biases.

Keywords: Diabetic foot ulcer, Phototherapy, Light-emitting diode, Biomaterial, Natural latex, Curcumin, Inflammation, C-reactive protein, Reactive oxygen species, Wound healing.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Contextualização e formulação do problema	1
1.2	Objetivos.....	3
1.2.1	Objetivo Geral	3
1.2.2	Objetivos Específicos	3
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
2.1	Diabetes Mellitus.....	4
2.1.1	Complicações da diabetes	6
2.1.2	Processo normal de cicatrização de feridas	7
2.1.3	Cicatrização de úlceras diabéticas	8
2.1.4	Relação entre inflamação e cicatrização em ambiente hiperglicêmico	10
2.1.5	Estresse oxidativo causado pela hiperglicemia	11
2.1.6	Tratamentos para úlcera diabética	12
2.1.7	Uso da fototerapia na cicatrização de feridas	15
2.1.8	Biomaterial à base de látex para regeneração tecidual.....	17
2.1.9	Associação da LEDterapia com a biomembrana de látex – Dispositivo Rapha®....	20
2.2	Fitoterapia Utilizando Curcumina para Cicatrização de Feridas	21
2.3	Nanotecnologia: Utilização de Lipossomas na Cicatrização de Feridas	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1	Materiais	27
3.2.1	Equipamento à base de LED	27
3.2.2	Biomembrana de látex natural.....	27
3.2	Métodos	28
3.2.1	Desenho do estudo.....	28
3.2.2	Critérios de inclusão e exclusão	31
3.2.3	Coleta e análise de dados.....	32
3.2.4	Análise estatística	39
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Análise clínica e demográfica	41
4.2	Análises hematológicas e bioquímicas	47
4.3	Cicatrização das feridas	64
4.4	Análise de espécies reativas de oxigênio (ERO)	74

5	DISCUSSÃO.....	77
6	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	89
8	PRODUÇÕES ACADÊMICAS	90
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
	ANEXOS.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Estatística descritiva para a variável área da ferida em cm ² no início (D0) dos protocolos de tratamento.....	36
Tabela 4.1. Características demográficas e clínicas da população estudada com as intervenções Protocolo utilizado no Sistema Único de Saúde – SUS - (GC), ou protocolos experimentais em que se utilizou curativo baseado em Látex e LED vermelho (GE1) ou Látex contendo curcumina e LED vermelho (GE2).....	42
Tabela 4.2. Caracterização da população estudada com as intervenções Protocolo utilizado no Sistema Único de Saúde – SUS - (GC), ou protocolos experimentais em que se utilizou curativo baseado em Látex e LED vermelho (GE1) ou Látex contendo curcumina e LED vermelho (GE2). 44	44
Tabela 4.3. Classificação das feridas da amostra populacional conforme o tipo e grau de acordo com a Classificação de Lesões por Diabetes da Universidade do Texas.	46
Tabela 4.4. Resultados de exames hematológicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram o protocolo SUS, látex e LED vermelho e látex contendo curcumina e LED vermelho para o tratamento de úlcera diabética no dia 0 dos protocolos.	48
Tabela 4.5. Resultados de exames hematológicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram o protocolo SUS para o tratamento de úlcera diabética.	50
Tabela 4.6. Resultados de exames hematológicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram látex e LED vermelho para o tratamento de úlcera diabética.	52
Tabela 4.7. Resultados de exames hematológicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram látex contendo curcumina e LED vermelho para o tratamento de úlcera diabética.	54
Tabela 4.8. Resultados de exames bioquímicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram o protocolo SUS, látex e LED vermelho e látex contendo curcumina e LED vermelho para o tratamento de úlcera diabética no dia 0 dos protocolos.	56
Tabela 4.9. Resultados de exames bioquímicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram o protocolo SUS para o tratamento de úlcera diabética.	58
Tabela 4.10. Resultados de exames bioquímicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram látex e LED vermelho para o tratamento de úlcera diabética.	60
Tabela 4.11. Resultados de exames bioquímicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram látex contendo curcumina e LED vermelho para o tratamento de úlcera diabética.	62
Tabela 4.12. Percentual de cicatrização das úlceras (PCU) que utilizaram o protocolo SUS, látex e LED vermelho e látex contendo curcumina e LED vermelho.	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1. Classificação de Lesões por Diabetes da Universidade do Texas. Fonte: [127].	9
Quadro 2.2. Coberturas utilizadas no SUS para o tratamento de úlceras nos pés de diabéticos de acordo com o tipo de tecido presente na ferida. Fonte: Adaptado de [22].	13
Quadro 3.1. Testes, valores de referência e métodos utilizados para hemograma e dosagens bioquímicas em portadores úlcera do pé diabético. Fontes: ^a Rosenfeld (2019) [161]; ^b Instituto Sabin (2019).	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Prevalência de diabetes em adultos (20 a 79 anos) nas regiões da Federação Internacional de Diabetes (IDF), por prevalência comparativa de diabetes ajustada por idade. Adaptado de [79]. .5
- Figura 2.2.** Cicatrização normal de feridas versus cicatrização de feridas diabéticas. Durante um processo normal de cicatrização, queratinócitos migram e proliferam para reepitelizar a ferida, fibroblastos auxiliam na formação da matriz extracelular e macrófagos controlam o processo inflamatório e a produção de fatores de crescimento. Também ocorre a formação de novos vasos sanguíneos, de tecido de granulação e conseqüente contração e epitelização da ferida durante a cicatrização. Em feridas diabéticas, queratinócitos e fibroblastos sofrem apoptose inadequada e a formação dos novos vasos sanguíneos é prejudicada. Ainda, os macrófagos não transitam do fenótipo inflamatório para o fenótipo de reconstrução, o que gera um excesso de macrófagos inflamatórios na ferida, processo inflamatório prolongado e escassez de fatores de crescimento. Ainda, os fibroblastos produzem metaloproteínases em excesso, promovendo degradação da matriz extracelular. Como a cicatrização da ferida não evolui, a lesão torna-se uma porta de entrada favorável para microrganismos patogênicos. Adaptado de [90]..... 9
- Figura 2.3.** Açafrão (*Curcuma longa*) (A) [207] e estrutura química da curcumina (B) [5]. 22
- Figura 2.4.** Lipossomas são constituídos por fosfolipídeos. Os fosfolipídeos se organizam de acordo com sua polaridade formando uma bicamada lipídica. Lipossomas apresentam um núcleo hidrofílico e um espaço intermembrana hidrofóbico. Lipossomas unilamelares possuem apenas uma bicamada fosfolipídica, enquanto lipossomas multilamelares possuem diversas camadas. Fonte: Adaptado de [16]..... 24
- Figura 3.1.** Equipamento à base de LEDs do sistema terapêutico Rapha®..... 27
- Figura 3.2.** Tipos de biomembranas de látex natural utilizadas neste estudo. A) Biomembranas de látex utilizadas no grupo GE1 (Biomembrana de látex + LED vermelho) – látex exclusivo e B) Biomembranas de látex contendo curcumina que foram utilizadas no grupo GE2 (Biomembrana de látex contendo curcumina + LED vermelho). 28
- Figura 3.3.** Desenho do estudo clínico. A equipe clínica que realizava o acompanhamento dos participantes de pesquisa era composta por médicos, enfermeiros e pesquisadores. Os participantes foram alocados em três grupos sendo GC, GE1 e GE2. GC é a sigla correspondente ao grupo controle e refere-se aos participantes que utilizaram o protocolo do SUS para o tratamento das úlceras diabéticas, sendo o tratamento/curativo realizado no ambulatório do pé diabético ao menos uma vez na semana. GE1 refere-se ao grupo dos participantes que utilizaram a biomembrana de látex e LED vermelho para o tratamento de suas feridas com troca diária do curativo em suas casas. Por fim, GE2 trata-se do grupo de feridas tratadas com biomembranas de látex contendo curcumina e LED vermelho, com troca de curativo diária na própria residência. 30
- Figura 3.4.** Aplicação do protocolo experimental. A) Úlcera diabética após limpeza com soro fisiológico 0,9%. B) Biomembrana de látex cortada e colocada sobre a úlcera conforme seu tamanho C) Aplicação do protocolo experimental utilizando biomembrana de látex e LEDterapia. D) Curativo finalizado utilizando a biomembrana de látex como cobertura primária e fechado com gaze e atadura. 31
- Figura 3.5.** Método utilizado para medição da área da ferida. Foram medidos o maior comprimento e a maior largura da ferida utilizando régua de papel descartável. 35
- Figura 3.6.** Seringas para análise de espécies reativas de oxigênio (ERO). A) Registro fotográfico da seringa utilizada para análise de espécies reativas de oxigênio no sangue venoso e da ferida e no tecido da ferida. Esquema demonstrando a composição da seringa para análise de ERO no (B) sangue venoso, (C) sangue da ferida e (D) no tecido da ferida, utilizando o sobrenadante. 38
- Figura 3.7.** Processo de montagem da seringa com amostras de sangue para análise de espécies reativas de oxigênio (ERO). Primeiramente, colocou-se 200 µL de água destilada e submergiu em

nitrogênio (N₂) líquido para congelar a água. Em seguida, adicionou-se a amostra de sangue e, novamente, congelou-se em N₂(l). Então, foram colocados mais 200 µL de água destilada na seringa, que também foi congelada e armazenada em N₂(l)..... 39

Figura 4.1. Diagrama de caixa indicando os valores de volume corpuscular médio (VCM) em fentolitro (fl) durante a realização dos tratamentos nos dias 0, 22 e 45 para os participantes que utilizaram o protocolo SUS, látex e LED e látex contendo curcumina e LED. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre os momentos avaliados (D0 – dia 0, D22 – dia 22 ou D45 – dia 45) num determinado grupo. Área do retângulo refere-se à faixa do valor de referência para o VCM. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento). 49

Figura 4.2. Diagramas de caixa indicando os valores de (A) transaminase oxalacética (TGO) e (B) transaminase pirúvica (TGP) em unidades por litro (U/L) durante a realização dos tratamentos nos dias 0, 22 e 45 para os participantes que utilizaram o protocolo SUS, látex e LED e látex contendo curcumina e LED. Letras minúsculas diferentes significam diferença estatística entre os grupos avaliados num dado momento do tratamento (D0 – dia 0, D22 – dia 22 ou D45 – dia 45). Área do retângulo refere-se à faixa dos valores de referência para TGO ou TGP. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento). 63

Figura 4.3. Diagramas de caixa indicando os valores de (A) hemoglobina corpuscular média (HCM) em picogramas (pg) e (B) quantidade de eosinófilos por mm³ durante a realização dos tratamentos nos dias 0, 22 e 45 para os participantes que utilizaram o protocolo SUS, látex e LED e látex contendo curcumina e LED. Letras minúsculas diferentes significam diferença estatística entre os grupos avaliados num dado momento do tratamento (D0 – dia 0, D22 – dia 22 ou D45 – dia 45). Área do retângulo refere-se à faixa do valor de referência para HCM ou eosinófilos. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento). 64

Figura 4.4. Evolução da área da ferida de acordo com o grupo e momento dos protocolos de tratamento. (A) Diagrama de caixa representando a área das feridas em cm² e (B) porcentagem de área das feridas (normalizadas com o dia inicial do protocolo) nos dias 0, 22 e 45 para os participantes que utilizaram o protocolo SUS ou protocolos experimentais utilizando o sistema Rapha®, látex e LED e látex contendo curcumina e LED. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre os grupos avaliados num dado momento do tratamento (D0 – dia 0, D22 – dia 22 ou D45 – dia 45), assim como asterisco (*) indica diferença em relação ao GE1. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística entre os dias em um mesmo grupo (GC – Protocolo SUS, GE1 – Látex + LED ou GE2 – Látex contendo curcumina + LED). Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento). 65

Figura 4.5. Registro fotográfico, respectiva área da ferida, percentual de contração das úlceras (PCU) e tipo da ferida, por participante, do grupo GC – Protocolo SUS, nos momentos D0 (dia 0), D22 (dia 22) e D45 (dia 45). 67

Figura 4.6. Registro fotográfico, respectiva área da ferida, percentual de contração das úlceras (PCU) e tipo da ferida, por participante, do grupo GE1 – Látex + LED, nos momentos D0 (dia 0), D22 (dia 22) e D45 (dia 45).	69
Figura 4.7. Registro fotográfico, respectiva área da ferida, percentual de contração das úlceras (PCU) e tipo da ferida, por participante, do grupo GE2 – Látex contendo curcumina + LED, nos momentos D0 (dia 0), D22 (dia 22) e D45 (dia 45).	71
Figura 4.8. Análise quantitativa de ERO (espécies reativas de oxigênio) realizada através da medição da concentração de CM* (3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil) em amostras de sangue venoso em participantes que utilizaram o protocolo SUS (GC), látex e LED (GE1) e látex contendo curcumina e LED (GE2) nos dias 0, 22 e 45. Dados representados como média ± erro padrão da média. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento).	74
Figura 4.9. Análise quantitativa de ERO (espécies reativas de oxigênio) realizada através da medição da concentração de CM* (3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil) em amostras de sangue da ferida em participantes que utilizaram o protocolo SUS (GC), látex e LED (GE1) e látex contendo curcumina e LED (GE2) nos dias 0, 22 e 45. Dados representados como média ± erro padrão da média. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento).	75
Figura 4.10. Análise quantitativa de ERO (espécies reativas de oxigênio) realizada através da medição da concentração de CM* (3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil) em amostras de tecido da ferida em participantes que utilizaram o protocolo SUS (GC), látex e LED (GE1) e látex contendo curcumina e LED (GE2) nos dias 0, 22 e 45. Dados representados como média ± erro padrão da média. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento).	76

LISTA DE NOMENCLATURAS E ABREVIações

AGEs	Produtos finais de glicação avançada, do inglês <i>Advanced glycation end-products</i>
ALT	Aminotransferase de alanine
AST	Aminotransferase de aspartate
ATP	Adenosina trifosfato, do inglês <i>Adenosine triphosphate</i>
BLN	Biomembrana de látex natural
CAEE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CM'	3-metoxicarbonil-proxil nitróxido
CMH	1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CP'	Nitróxido 3-carboxi-proxilo
DETC	Trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
eNOS	Óxido nítrico-sintase endotelial, do inglês <i>endothelial nitric oxide synthase</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GC	Grupo controle
GE1	Grupo experimental 1
GE2	Grupo experimental 2
HbA1c	Hemoglobina glicada
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HRAN	Hospital Regional da Asa Norte
IDF	Federação Internacional de Diabetes, do inglês <i>International Diabetes Federation</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida, do inglês <i>induced nitric oxide synthase</i>
KHB	Krebs HEPES
LASER	Amplificação de luz por emissão estimulada de radiação, do inglês <i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LED	Diodo emissor de luz, do inglês <i>Light emitting diode</i>
LEI	Laboratório de Engenharia e Inovação
MMPs	Metaloproteinases matriz, do inglês <i>Matrix metalloproteinases</i>

NF-κB	Fator nuclear kappa beta, do inglês <i>Nuclear factor kappa beta</i>
NMs	Nanomateriais
PCR	Proteína C-reativa
PCU	Percentual de cicatrização da úlcera
PKC	Proteína quinase C
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
RAGE	Receptor de produtos finais de glicação avançada, do inglês <i>Receptor for advanced glycation end-products</i>
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
SUS	Sistema único de saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β1	Transformador de fator de crescimento beta 1, do inglês <i>Transforming growth factor beta 1</i>
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TNF-α	Tator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>Tumor necrosis fator alpha</i>
UPD	Úlcera de pé diabético
VBTF	Vapor de baixa temperatura e formaldeído
VCM	Volume corpuscular médio
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>Vascular endothelial growth fator</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO E FORMULAÇÃO DO PROBLEMA

Diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia causada pela desordem na produção ou ação da insulina [167]. Segundo a Federação Internacional de Diabetes, a DM é um dos maiores problemas de saúde global e estima-se que o número de pacientes com a doença aumentará de 463 milhões (2019) para 700 milhões em 2045, em pessoas entre 20 e 70 anos [79]. A longo prazo, dentre as complicações da diabetes tem-se o risco de úlceras nos pés.

A úlcera do pé diabético (UPD) é uma importante causa de morbidade, motivo de grande parte da internação de pacientes com DM e é responsável por um elevado índice de amputação dos membros inferiores [202], visto que a cicatrização da ferida é prejudicada no pé diabético em decorrência da inflamação prolongada [19]. Durante o processo inflamatório, macrófagos e neutrófilos liberam grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) causando estresse oxidativo [137]. Níveis elevados de ERO podem prolongar o processo inflamatório, ativar vias proteolíticas e provocar danos no tecido [194].

Levando em consideração a dificuldade de cicatrização das úlceras diabéticas e seu estado inflamatório constante, uma terapia ideal para essas feridas deve suprimir a inflamação excessiva enquanto melhora a cicatrização.

Os curativos são parte fundamental para o tratamento de UPD, sendo amplamente utilizados para proteger a ferida e promover a cicatrização. A utilização de biomembrana de látex como cobertura primária (curativo) para feridas mostrou promover cicatrização e remodelagem tecidual em úlceras isquêmicas na perna [60] e em UPD em ser humano [151]. O látex é um composto natural extraído da seringueira (*Hevea brasiliensis*) que apresentou propriedades indutoras de neovascularização e regeneração tecidual em diversas espécies e tipos de tecidos [205], cicatrização e neoangiogênese e reconstrução conjuntival de coelhos [144], mostrando-se biocompatível de acordo com estes estudos.

A fotobiomodulação em terapias que utilizam luz de baixo nível levou a uma taxa aumentada de cicatrização [106] em diversos modelos de feridas [97]Essas terapias

demonstraram-se alternativas eficazes e seguras para o tratamento de UPD [177], visto que evidenciaram ótimo resultado de cura e não apresentaram feitos adversos [85,91,102,121].

Ainda, foi demonstrado que o uso combinado de um dispositivo de fototerapia, em que se utilizou diodo emissor de luz (LED, do inglês *light-emitting diode*), simultaneamente com uma biomembrana de látex natural (BLN) induziu o processo cicatricial por promover a neoformação vascular, proliferação celular e granulação tecidual na cicatrização de UPDs [151].

A BLN é um material biocompatível produzido com o látex da seringueira *Hevea brasiliensis* que tem sido estudado por nosso grupo para o tratamento de úlceras diabéticas apresentando biocompatibilidade [18,44,130] e propriedades indutoras da angiogênese, granulação e formação de colágeno sem causar feitos adversos [61]. Com isso, as propriedades cicatrizantes de BLN têm sido exploradas para uso como um promissor curativo para o tratamento de úlceras diabéticas.

Outra terapia com elevado potencial cicatrizante é a curcumina. Trata-se de um composto bioativo que demonstrou efeito anti-inflamatório, antioxidante, anticoagulante e antimicrobiano. Ainda, evidenciou propriedades para cura de feridas agindo na redução da resposta de oxidação e inflamação, formação de tecido de granulação, deposição de colágeno, remodelação tecidual e contração da ferida, o que mostra seu grande potencial para a cicatrização de úlceras diabéticas [5].

Na presente pesquisa foi proposto adicionar a curcumina a BLN a fim de se potencializar seu efeito cicatrizante e para ser utilizada concomitantemente com a fototerapia, visando aumentar a eficiência na neoformação tecidual. Para adicionar curcumina ao látex, utilizamos dos recursos provenientes da nanobiotecnologia.

A nanobiotecnologia é um campo que abrange a síntese, caracterização e aplicação de materiais em escala nanométrica aplicados às ciências da vida. Dentre esses materiais destacam-se os lipossomas, que são vesículas lipídicas amplamente empregadas como veículos para entrega de fármacos por possibilitar o carreamento de fármacos imiscíveis em água tais como curcumina [154].

Desta forma, neste trabalho será investigada a inflamação e estresse oxidativo com o efeito terapêutico da terapia combinada utilizando-se de diodo emissor de luz e biomembranas contendo lipossomas com curcumina na cicatrização de feridas em portadores de úlcera diabética. Nossa hipótese é de que o tratamento com a BLN contendo curcumina e LED no

comprimento de onda vermelho promove melhor efeito na cicatrização das feridas do que nos demais grupos e reduz marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo no sangue e na ferida.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito terapêutico do uso combinado de biomembranas de látex contendo lipossomas com curcumina com LEDterapia (dispositivo terapêutico Rapha®) bem como avaliar o processo de inflamação e estresse oxidativo associado ao processo de cicatrização tecidual em portadores de úlcera diabética.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar a amostra populacional quanto aos aspectos demográficos e clínicos.
2. Correlacionar parâmetros hematológicos (hemograma) e bioquímicos do sangue venoso com o processo de inflamação e cicatrização.
3. Relacionar os indicadores de inflamação local e sistêmica (ERO, hemograma e análises bioquímicas) com o processo de cicatrização.
4. Avaliar o processo de cicatrização das úlceras através de análises de imagem e mensuração das feridas.
5. Avaliar o processo de estresse oxidativo por meio da quantificação da formação de espécies reativas de oxigênio em amostras de sangue e tecido da ferida e de sangue venoso por ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DIABETES MELLITUS

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde [167], a Diabetes Mellitus (DM) é uma doença cuja principal característica é o elevado nível de açúcar no sangue, ou hiperglicemia. Essa hiperglicemia ocorre quando o pâncreas não produz a quantidade suficiente de insulina ou quando o organismo não consegue utilizar a insulina de forma efetiva na metabolização da glicose, o que pode levar a danos ao corpo e falha de diversos órgãos e tecidos [78].

A Federação Internacional de Diabetes (IDF – do inglês, *International Diabetes Federation*) estimou que, em 2019, aproximadamente 463 milhões de adultos estavam vivendo com DM e que esse número poderia chegar a 578 milhões em 2020 e 700 milhões em 2045, o equivalente a 8,3%, 9,2% e 9,6% da população mundial, respectivamente (Figura 2.1). Ainda, justifica que essa crescente prevalência é motivada por fatores socioeconômicos, demográficos, ambientais e genéticos, tornando essa doença um desafio para a saúde no século 21 [79]. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, a prevalência do diagnóstico de DM em 2010 foi de 6,3% da população [24] e em 2018 foi de 7,7% [23]. No Distrito Federal, essa prevalência cresceu de 4,4% em 2010 [24] para 6,7% em 2018 [23].

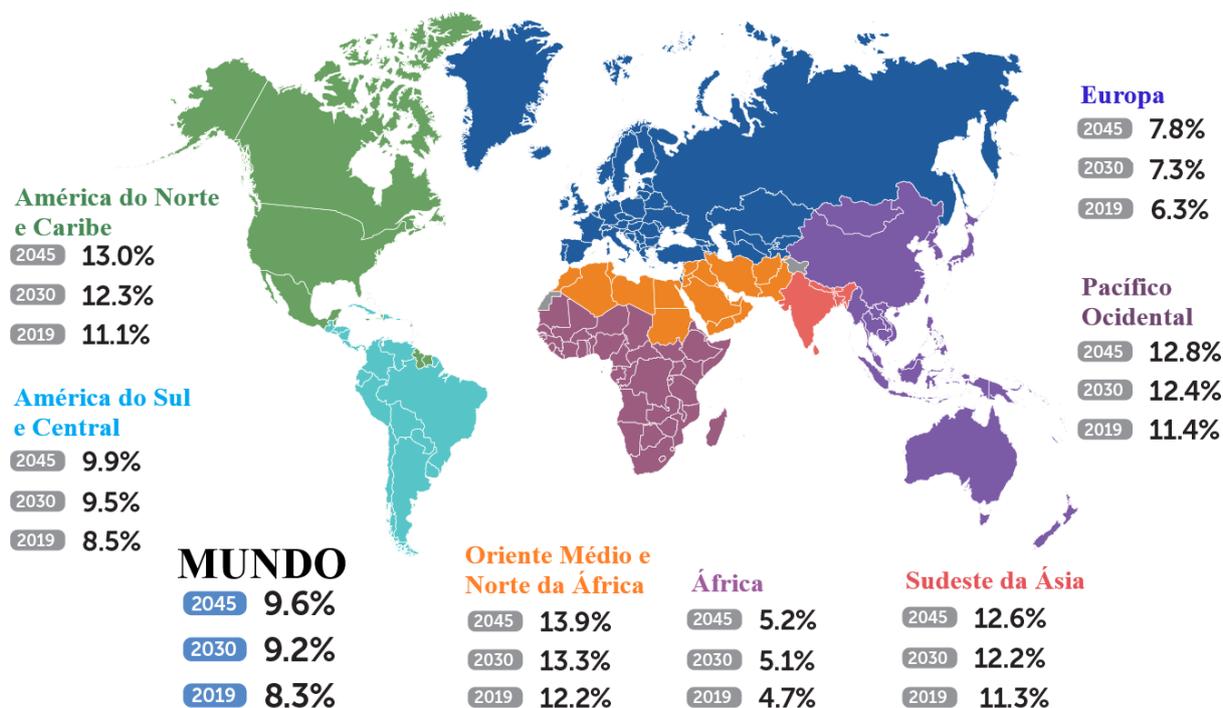


Figura 2.1. Prevalência de diabetes em adultos (20 a 79 anos) nas regiões da Federação Internacional de Diabetes (IDF), por prevalência comparativa de diabetes ajustada por idade. Adaptado de [79].

Para 2019, a IDF estimou que a DM foi responsável por 11,3% das mortes globais e que, em 2019, aproximadamente 4,2 milhões de adultos entre 20 e 79 anos morreram por causa dessa doença e de suas complicações, o equivalente a uma morte a cada oito segundos [79].

A DM é classificada em dois tipos (tipo 1 e tipo 2), de acordo com as causas de sua origem. DM tipo 1 (DM1) é responsável por 5% a 10% dos casos em todo o mundo e ocorre, geralmente, em pessoas mais jovens [140]. Na DM1, as células beta, produtoras de insulina, são atacadas pelo sistema imunológico através de uma reação autoimune. Esse ataque às células beta ocasiona a produção de pouca ou nenhuma insulina para o organismo e resulta em elevados níveis de açúcar no sangue [79]. No caso da DM tipo 2, responsável por 90% a 95% dos casos em todo o mundo [140], o corpo apresenta uma certa resistência à insulina, ou seja, não consegue utilizar a insulina que produz, causando hiperglicemia. Com os níveis de açúcar elevados, o corpo, que antes produzia insulina de forma adequada, promove um aumento na produção desse hormônio, sobrecarregando as células beta pancreáticas, resultando em sua falha [79].

A hiperglicemia, tanto crônica como aguda, pode ser a causa de diversas complicações da DM, como retinopatia diabética, nefropatia diabética e neuropatia [110]. Além da hiperglicemia e duração da doença, diversas variantes genéticas têm sido estudadas a fim de se

verificar se existe alguma suscetibilidade genética para patologias micro (retinopatia, neuropatia e nefropatia) e macrovasculares (doença cardiovascular) [11], tornando a DM uma das maiores causas de cegueira, insuficiência renal, ataque cardíaco, derrame e amputação de membros inferiores [196].

2.1.1 Complicações da diabetes

As complicações do pé diabético e dos membros inferiores afetam de 40 a 60 milhões de pessoas diabéticas no mundo [79], podendo levar ao aumento da morbidade geral dos pacientes [79,140]. A prevalência global de ulcerações no pé diabético é de 6,3% [203], afetando cerca de 2% da população portadora de diabetes [79].

As infecções e complicações associadas às úlceras diabéticas podem levar à amputação dos membros inferiores e graves problemas de saúde [196]. É estimado que 1% da população diabética sofre amputação de membros inferiores e que ocorre uma amputação a cada 30 segundos [79]. Esse tipo de ferida é uma das grandes causas de amputações dos membros inferiores [129] e da hospitalização de portadores de diabetes [139,179], estando, ainda associada a uma maior taxa de mortalidade [113]. A úlcera diabética é ocasionada por vários fatores, sendo os principais, neuropatia e doença arterial periférica, acarretando em isquemia e infecção [93].

A neuropatia periférica é uma complicação comum da DM devido aos danos que a hiperglicemia, tanto crônica quanto aguda, podem causar nos nervos por meio da diminuição da função nervosa, perda de fibras mielinizadas e não mielinizadas, degeneração Walleriana e redução da formação de fibras nervosas [40]. A presença de neuropatia é o principal fator causador de feridas nos pés de diabéticos, visto que a sensibilidade fica comprometida e pode gerar deformidades [181]. Devido à falta de sensibilidade é comum o diabético causar traumas no pé inconscientemente, visto que não sentirá incômodo ao calçar um sapato apertado ou ao usar um aquecedor, por exemplo [46]. No caso das deformidades nos pés, estas podem levar a alterações na carga do pé e tornozelo, na mobilidade e na marcha, promovendo a formação de calos e lesões no tecido [181]. Tanto a falta de sensibilidade quanto as deformidades causadas pela neuropatia promovem a formação de úlceras denominadas neuropáticas devido à sua origem [70].

A doença arterial periférica é uma consequência da DM caracterizada pelo estreitamento das artérias periféricas, reduzindo o fluxo sanguíneo para os membros inferiores [26]. É comum em pacientes diabéticos devido à idade avançada, duração da diabetes e hiperglicemia não

controlada [13]. É um fator de risco para o desenvolvimento de úlceras porque o fluxo sanguíneo deficiente resulta em progressão da infecção, degradação do tecido e *déficit* na entrega de oxigênio, nutrientes e antibióticos [13], implicando na evolução e cicatrização lenta da ferida, tornando-se um dos fatores determinantes para a amputação [168].

O atraso na cicatrização de úlceras diabéticas pode envolver diversos fatores, podendo ser complicações ao longo do processo de cicatrização, como infecção, isquemia ou trombose, os próprios fatores que causaram a ferida, como neuropatia e problemas vasculares, ou ainda, o fato de não seguir uma progressão ordenada no processo de cicatrização [53] como alterações na etapa inflamatória [120]. Para melhor compreender o que acontece em úlceras diabéticas, é importante entender o processo de cicatrização normal de uma ferida.

2.1.2 Processo normal de cicatrização de feridas

A cicatrização de feridas ocorre para que as células mortas e tecidos desvitalizados sejam substituídos por novas células e tecidos. Assim, o processo de cicatrização é um sistema dinâmico dependente de diversos processos de sinalização celular que são classificados em quatro fases sobrepostas e que ocorrem de maneira eficiente e coordenada: (i) hemostasia, (ii) inflamação, (iii) proliferação celular e (iv) remodelação da matriz extracelular [94].

O processo de cicatrização inicia-se logo nos primeiros momentos após a lesão com a hemostasia ou coagulação, na qual ocorre a agregação de plaquetas e vasoconstrição. Inicia-se uma cascata de coagulação, com a formação de um tampão de fibrinas, migração de leucócitos, hipóxia e liberação de fatores de crescimento e citocinas pró inflamatórias [53,94].

A fase subsequente à hemostasia é a inflamatória e pode durar de horas a dias. O tampão de fibrinas formado na fase anterior serve como um suporte para as células migratórias, como neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais. O tampão é então degradado para possibilitar a migração destas células [94,178]. Nessa fase, algumas substâncias quimiotáticas e produtos bacterianos estimulam a migração de neutrófilos para a lesão. Essas são as primeiras células a migrar e são responsáveis por limpar a ferida fagocitando patógenos e detritos teciduais, atuando contra infecções e fazendo o desbridamento da ferida. Em seguida, ocorre a migração dos macrófagos que, além de fagocitar bactérias e detritos teciduais, liberam reguladores biológicos para permitir o processo normal de cicatrização [94,178,182].

Conforme a etapa inflamatória é atenuada, inicia-se a fase de proliferação, que pode durar de dias a semanas. Nessa fase ocorre a migração de fibroblastos, formação da matriz

extracelular, angiogênese, formação do tecido de granulação, contração da ferida e epitelização [53,94]. Os fibroblastos migram para auxiliar na formação da matriz extracelular através da síntese de colágeno e de outras proteínas [94,178]. Nessa etapa também são produzidas outras proteínas como fibronectina e vitronectina, as quais devolverão função e integridade ao tecido. A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos e irá permitir o reabastecimento de oxigênio e nutrientes ao tecido. Os fibroblastos, o tecido de granulação e a matriz extracelular atuam juntos para promover a contração da ferida e acelerar seu fechamento [53]. Ao mesmo tempo, é realizado o processo de epitelização com a migração de células epiteliais para cobrir o tecido de granulação criando uma barreira celular [178,182].

A etapa final do processo de cicatrização é a remodelação tecidual e pode durar de semanas a meses. Ocorre maturação e rearranjo do colágeno e da matriz extracelular, onde o tecido cicatricial fica mais forte e rígido, adquirindo até 80% de resistência à tração da pele normal saudável [94,178,182].

Quando o processo de cicatrização de uma ferida não segue essas etapas de maneira ordenada, pode haver uma pausa na cicatrização ou esta pode progredir de forma inadequada, levando à uma ferida crônica como é o caso das úlceras diabéticas.

2.1.3 Cicatrização de úlceras diabéticas

De forma geral, o processo de cicatrização em úlceras diabéticas (Figura 2.2) é alterado pela angiogênese prejudicada, excesso de macrófagos inflamatórios e redução da atividade de fibroblastos e queratinócitos. O estado diabético pode levar à disfunção ou função alterada dessas células. Macrófagos não passam do estado inflamatório para o estado de reepitelização, prolongando o processo inflamatório na ferida, enquanto fibroblastos e queratinócitos sofrem apoptose inadequada. Além de apoptose indevida, os fibroblastos produzem metaloproteinases matriz (MMPs – do inglês, *matrix metalloproteinases*) em excesso, enzimas que irão degradar a matriz extracelular atrasando o processo de cicatrização. Todas essas alterações no ambiente lesionado levam a não formação ou má formação do tecido de granulação e conseqüente atraso no fechamento da ferida [90].

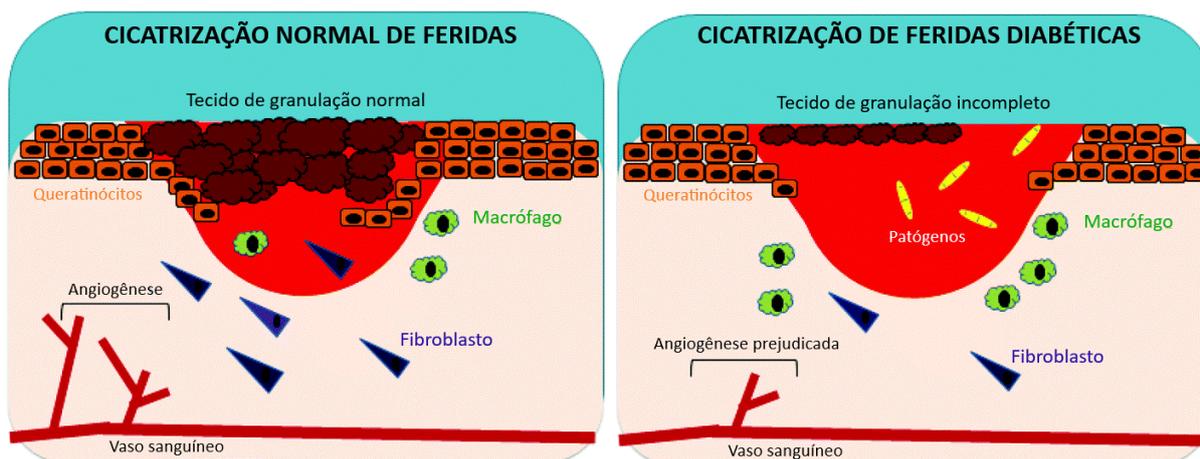


Figura 2.2. Cicatrização normal de feridas versus cicatrização de feridas diabéticas. Durante um processo normal de cicatrização, queratinócitos migram e proliferam para reepitelizar a ferida, fibroblastos auxiliam na formação da matriz extracelular e macrófagos controlam o processo inflamatório e a produção de fatores de crescimento. Também ocorre a formação de novos vasos sanguíneos, de tecido de granulação e consequente contração e epitelização da ferida durante a cicatrização. Em feridas diabéticas, queratinócitos e fibroblastos sofrem apoptose inadequada e a formação dos novos vasos sanguíneos é prejudicada. Ainda, os macrófagos não transitam do fenótipo inflamatório para o fenótipo de reconstrução, o que gera um excesso de macrófagos inflamatórios na ferida, processo inflamatório prolongado e escassez de fatores de crescimento. Ainda, os fibroblastos produzem metaloproteinases em excesso, promovendo degradação da matriz extracelular. Como a cicatrização da ferida não evolui, a lesão torna-se uma porta de entrada favorável para microrganismos patógenos. Adaptado de [90].

Ainda, nessas feridas, a progressão no processo de cicatrização é prejudicada por diversos fatores como neuropatia periférica, doença vascular e presença de biofilme [8] que leva à produção de citocinas inflamatórias e à suscetibilidade a infecções [141].

Existem diversos métodos para classificar as úlceras diabéticas e identificar seu estado e gravidade. Atualmente, o Sistema Único de Saúde (SUS) utiliza o sistema de classificação de lesões por diabetes da Universidade do Texas para as úlceras diabéticas (Quadro 2.1), um método que considera a profundidade, representada em graus, e presença de infecção, isquemia ou ambos, indicada por estágios [127].

Quadro 2.1. Classificação de Lesões por Diabetes da Universidade do Texas. Fonte: [127].

Escala	Grau			
	0	1	2	3
A	Lesão pré-ulcerativa ou pós-ulcerativa completamente epitelizada	Ferida superficial, não envolvendo tendão, cápsula ou osso	Ferida que atinge tendão ou cápsula	Ferida que atinge osso ou articulação
B	Com infecção	Com infecção	Com infecção	Com infecção
C	Com isquemia	Com isquemia	Com isquemia	Com isquemia
D	Com infecção e isquemia	Com infecção e isquemia	Com infecção e isquemia	Com infecção e isquemia

2.1.4 Relação entre inflamação e cicatrização em ambiente hiperglicêmico

A própria hiperglicemia pode alterar a morfologia e diminuir a proliferação celular [53] e desencadear um processo de inflamação anormal, pois induz, de forma indireta, a formação de moléculas inflamatórias que interferem na síntese de colágeno, prolongando a etapa inflamatória [73]. Além da hiperglicemia, outros fatores podem levar a uma resposta inflamatória exacerbada, como disfunções celulares e acumulação de produtos finais de glicação avançada (AGEs – do inglês, *advanced glycation end-products*).

Os neutrófilos são abundantes nos estágios iniciais do processo inflamatório da cicatrização. Em hospedeiros diabéticos, essas células apresentaram deficiência na função com produção prolongada de citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α – do inglês, *tumor necrosis factor alpha*) e morte celular reduzida. A disfunção dos neutrófilos poder ser causada por defeito nos macrófagos, células que fazem a limpeza dos detritos celulares, sugerindo uma grande contribuição dessas células para um estado de inflamação crônica em diabéticos [71].

Os macrófagos são células importantes para a passagem do estado pró-inflamatório para o anti-inflamatório durante a fase inflamatória do processo de cicatrização. No processo normal de cicatrização, eles removem os detritos celulares para dar seguimento para a fase de proliferação. No entanto, essas células estão comprometidas nas feridas diabéticas e acabam por liberar uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, criando uma carga celular aumentada e prolongando a fase inflamatória [33].

Os AGEs atuam sobre diversos fatores que interferem no processo de cicatrização através da inflamação crônica em feridas diabéticas. Ainda, estes produtos são compostos derivados da redução de açúcar em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos [200] e seu acúmulo é acelerado em condições hiperglicêmicas, oxidativas ou inflamatórias [173].

O acúmulo de AGEs em feridas diabéticas levou à expressão de algumas moléculas pró-inflamatórias como endotelina-1, TNF- α e MMPs. O TNF- α promove um aumento das MMPs que degradam a matriz extracelular e prejudicam a formação do tecido de granulação [4]. A presença desses compostos em um ambiente hiperglicêmico demonstrou agravar o processo inflamatório em úlceras diabéticas através de α -defensinas, promovendo a expressão de interleucina 8 (IL-8), sendo correlacionada com a má cicatrização dessas feridas [117].

O bloqueio da interação entre AGEs e seu receptor (RAGE – do inglês, *receptor for advanced glycation end-products*) demonstrou promover uma resposta inflamatória adequada

na fase inicial da cicatrização de feridas em ratos diabéticos. Isso ocorreu através da melhora na secreção de fatores inflamatórios, na infiltração de leucócitos inflamatórios e na limpeza dos detritos de neutrófilos pelos macrófagos. Com isso, promoveu melhor formação do tecido de granulação e a transição adequada entre a fase inflamatória e o progresso da cicatrização [190], visto que durante o processo inflamatório, macrófagos e neutrófilos liberam grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) causando estresse oxidativo [137]. Níveis elevados de ERO podem prolongar o processo inflamatório, ativar vias proteolíticas e provocar danos no tecido [194].

2.1.5 Estresse oxidativo causado pela hiperglicemia

O estresse oxidativo é um fator importante na fisiopatologia da DM e suas complicações [29], visto que a hiperglicemia crônica atua sobre diversos mecanismos moleculares causando inflamação e estresse oxidativo [195]. Esse estado acontece quando há maior liberação de moléculas oxidativas do que de defesas antioxidantes, ocasionando um desequilíbrio. Nesse cenário, o organismo não é capaz de eliminar os radicais livres formados que acabam atacando outras moléculas e tecidos adjacentes, causando uma resposta inflamatória enquanto o aumento de citocinas inflamatórias também eleva o estresse oxidativo [69,119].

Radicais livres são moléculas altamente reativas por possuírem um elétron no nível de valência, como espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem ser peróxido de hidrogênio, superóxido ou hidróxido [69,119]. ERO são formadas através de processos metabólicos essenciais que requerem oxigênio nas células, tecidos e órgãos, como geração de energia mitocondrial ou desintoxicação hepática [41], ou seja, quando mantidas nas concentrações celulares adequadas, desempenham importantes funções de sinalização celular [69].

Durante o processo de cicatrização de feridas, células inflamatórias produzem ERO logo após a lesão como defesa contra patógenos e estímulo para proteinases que irão atuar na remodelação da matriz extracelular [135]. Porém, em níveis elevados, as ERO podem causar danos aos lipídios, proteínas e DNA [41], sendo o estresse oxidativo uma das causas comuns para o atraso na cicatrização de feridas crônicas [43].

A hiperglicemia atua sobre vários mecanismos moleculares, como aumento do fluxo da via polioliol, aumento da formação de AGE, ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) e aumento do fluxo da via da hexosamina [28,42,195]. Esses mecanismos são responsáveis por

danos que podem causar doenças micro e macrovasculares e refletem na superprodução de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial [28,195].

ERO contribuem para a progressão dos distúrbios inflamatórios, de forma que o aumento da produção dessas moléculas por neutrófilos em locais inflamados pode causar lesões no tecido [69]. Elevados níveis de ERO em úlceras diabéticas atrapalham o processo de cicatrização por promoverem o aumento de metaloproteinase matriz 9 (MMP-9), enzima que, em níveis elevados, é prejudicial para a cicatrização de feridas [134]. E ainda, a superprodução desses radicais livres pode, além de perpetuar a inflamação, promover apoptose de fibroblastos em diabéticos, células essenciais no reparo tecidual [67].

O estresse oxidativo local em feridas crônicas pode estar relacionado com a produção de ERO associadas a neutrófilos, sugerindo que terapias visando a redução dessas moléculas podem melhorar a cicatrização de feridas [83].

Nosso grupo correlacionou a redução do estresse oxidativo em úlceras diabéticas com melhor cicatrização das feridas com o uso de terapia baseada na combinação de fototerapia e biomaterial à base de látex [108].

2.1.6 Tratamentos para úlcera diabética

O procedimento padrão para tratar úlceras diabéticas inclui desbridamento cirúrgico, escolha do curativo adequado, descarga da pressão plantar, avaliação vascular, controle de infecções, controle glicêmico e cuidados multidisciplinares, que incluem o acompanhamento de cirurgião (geral, vascular e ortopédico), podólogo, endocrinologista, fisioterapeuta e enfermeiro [51].

Quando se refere à escolha do curativo, o principal objetivo ao tratar uma úlcera é mantê-la limpa, úmida e coberta, a fim de favorecer a cicatrização. Os tratamentos tópicos visam fornecer um microambiente adequado no leito da ferida para que essa cicatrização ocorra, levando em consideração o tipo de tecido e a exigência ou necessidade da úlcera (umidade, desbridamento, entre outros) [22]. O Manual do Pé Diabético [22], criado pelo Ministério da Saúde, traz algumas das coberturas utilizadas no SUS para o tratamento de úlceras nos pés de diabéticos de acordo com o tipo de tecido e quantidade de exsudato presentes na ferida (Quadro 2.2).

Quadro 2.2. Coberturas utilizadas no SUS para o tratamento de úlceras nos pés de diabéticos de acordo com o tipo de tecido presente na ferida. Fonte: Adaptado de [22].

Cobertura	Indicação	Frequência de troca
Hidrocoloide	<p>Feridas epitelizadas.</p> <p>Feridas que apresentam tecido de granulação com nenhum ou pouco exsudato do tipo seroso sanguinolento.</p> <p>Tecido necrótico úmido ou esfacelo com pouco exsudato do tipo seroso, sanguinolento ou serossanguinolento.</p> <p>Tecido necrótico seco/escara com nenhuma exsudação.</p>	Até 7 dias
Ácidos graxos essenciais	Tecido epitelizado.	1 a 2 vezes por dia
Alginato de cálcio e sódio	<p>Feridas que apresentam tecido de granulação com exsudato do tipo seroso ou serossanguinolento de quantidade moderada a abundante.</p> <p>Feridas que apresentam tecido de granulação com exsudato do tipo sanguinolento de quantidade moderada a abundante.</p>	Até a saturação ou, no máximo, 7 dias
Sulfadiazina de prata	<p>Feridas que possuem granulação com colonização crítica ou infecção e exsudato seropurulento, purulento ou piosanguinolento de quantidade moderada a abundante.</p> <p>Tecido necrótico úmido ou esfacelo com exsudato do tipo seropurulento, purulento ou serossanguinolento em quantidade moderada a abundante.</p>	Até saturação

Nos últimos anos, houveram muitos avanços em pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de terapias alternativas para úlceras diabéticas. Dentre elas tem-se terapias utilizando novos curativos e agentes tópicos, utilização de oxigênio, terapia por pressão negativa, entrega de fatores de crescimento, enxertos de pele, terapias baseadas em energia, terapia sistêmica e desbridamento não cirúrgico da lesão [51].

Existem diferentes métodos para realizar o desbridamento não cirúrgico sendo os principais: desbridamento autolítico com hidrogéis, desbridamento enzimático, biocirurgia utilizando larvas e desbridamento mecânico com hidroterapia. Porém esses métodos não são recomendados devido à escassez de evidências em relação a outros métodos mais consolidados [51].

Recentemente, um estudo baseado em evidências analisou a utilização da oxigenoterapia hiperbárica no tratamento de úlceras do pé diabético (UPD) associadas à doença oclusiva arterial periférica. Essa técnica é utilizada como uma terapia adjuvante aos tratamentos convencionais para melhorar a oxigenação no tecido lesionado e promover a cicatrização. De acordo com análise realizada nesse estudo foi demonstrado que a oxigenoterapia hiperbárica adjuvante diminuiu a taxa de amputação mas não a cicatrização em pacientes com UPD e doença oclusiva arterial periférica, além de ter provocado efeitos adversos [27].

A terapia por pressão negativa também é uma terapia adjuvante, na qual coloca-se um curativo de espuma na ferida e submete-a a uma pressão negativa imposta por uma bomba a vácuo visando estimular a cicatrização [80]. Embora essa abordagem terapêutica apresente eficácia, segurança e bom custo-benefício, um recente trabalho de revisão sugeriu a realização de ensaios clínicos randomizados com incorporação de metanálise para comprovar sua eficácia [125].

Fatores de crescimento epidérmico participam de diversos eventos biológicos na cicatrização de feridas, promovendo a cura adequada da lesão [75]. Dessa forma, o uso dessas biomoléculas pode ser uma boa alternativa para o tratamento de úlceras diabéticas. Alguns estudos têm sido realizados a fim de se avaliar o efeito da aplicação tópica de fatores de crescimento epidérmico humano em UPD. Foi observado que fatores de crescimento podem promover a cicatrização de úlceras diabéticas, embora possam também causar efeitos adversos leves, necessitando de mais ensaios e que sejam mais bem projetados para analisar melhor essa terapia [201].

Terapias baseadas em energia também têm sido estudadas para promover a cicatrização de feridas diabéticas, a qual pode ser estimulada através de estimulação elétrica, ondas de choque, eletromagnetismo e fototerapia [51]. Em nossa pesquisa foi empregada a fototerapia e, portanto, essa modalidade terapêutica será apresentada a seguir com mais detalhes.

2.1.7 Uso da fototerapia na cicatrização de feridas

A fototerapia é também conhecida como fotobiomodulação e refere-se ao tratamento com luz para estimular processos celulares [76]. A fotobiomodulação envolve a aplicação de formas não ionizantes de luz, geralmente luz de baixo nível, como LASER (*light amplification by stimulated emission of radiation* – do inglês, amplificação de luz por emissão estimulada de radiação) e LED (*light emitting diode* – do inglês, diodo emissor de luz), na qual uma fonte de luz é colocada próxima ou em contato com a pele com o objetivo de provocar uma resposta biológica no indivíduo. Durante o tratamento, a energia da luz penetra o tecido e promove alterações na estrutura molecular, celular e em diferentes tecidos do corpo [14].

A fotobiomodulação utilizando as terapias que utilizam luz de baixo nível levou a uma taxa aumentada de cicatrização [106] de diversos modelos de feridas como feridas agudas, feridas com cicatrização comprometida e feridas crônicas [97]. Ainda, demonstraram-se eficazes e seguras para o tratamento de UPD [177], visto que notou-se resultados de cura e sem feitos adversos [85,91,102,121].

O LASER é uma fonte de luz coerente, monocromática e com largura de banda muito pequena, com frações de nanômetros (nm), enquanto o LED é incoerente, com maior largura de banda, variando entre 1 e 2 nm, e é policromática, apresentando-se em diversas cores através de diferentes comprimentos de onda [72]. Sua aplicação na cicatrização de feridas contribuiu para o reparo tecidual através dos efeitos anti-inflamatório e analgésico [52], promoção da proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno e angiogênese [107], modulação do processo inflamatório e melhora da organização das fibras de colágeno [111].

O LED possui algumas vantagens sobre o LASER como capacidade de irradiar grande área do corpo ao mesmo tempo e apresentar menor custo [72], maior segurança, a não emissão de luz térmica, não toxicidade e não invasividade [45], facilidade de uso doméstico e possibilidade de dispositivos vestíveis [72]. Essas características tornam a LEDterapia uma tecnologia mais acessível e aplicável na saúde do que outras modalidades de fototerapia.

A LEDterapia utiliza o LED como fonte luminosa terapêutica e tem sido aplicada com diversas finalidades que vão além da cicatrização de feridas, como rejuvenescimento da pele, redução da inflamação, psoríase, dentre outros [45].

Foi demonstrado que o LED no comprimento de onda vermelho e o LASER têm efeitos significativos na promoção da cicatrização de feridas em coelhos. Embora o LASER tenha apresentado melhor resultado do que o LED, foi discutido que a LEDterapia foi a mais indicada para o tratamento de feridas por possuir menor custo que o LASER, ser seguro e portátil, podendo ser utilizado em casa [65].

Foi demonstrado, em um estudo *in vitro*, que a irradiação com o LED aumenta a viabilidade e morfologia de fibroblastos através do aumento do nível de proteínas de choque térmico, responsáveis por modular a homeostase celular, auxiliar no reparo após o estresse celular e promover a cicatrização de feridas [38]. Apesar de ainda ser pouco utilizada em comparação ao LASER a terapia com LED tem sido empregada para promover a regeneração tecidual em diversos tipos e modelos de feridas e, recentemente, tem sido amplamente pesquisada para tratar feridas diabéticas [57,62,176].

Em coelhos, a terapia com LED estimulou a proliferação de queratinócitos na epiderme, bem como a deposição de colágeno na derme durante a fase de proliferação da cicatrização [105].

Em ratos diabéticos, a interação da fotobioestimulação do LED com o tecido promoveu um aumento no número de fibroblastos e o adequado fechamento da ferida 7 dias após a lesão tecidual [57]. Promoveu aumento de vasos sanguíneos e do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *vascular endothelial growth factor*) e redução da citocina pró-inflamatória COX-2 (ciclo-oxigenase-2), além de ter sido benéfico para a dinâmica energética mitocondrial [176]. Estes processos são relacionados diretamente à redução do estresse oxidativo tecidual [184]. No mesmo modelo de ferida, a irradiação por LED induziu redução significativa de células inflamatórias e da atividade da MMP-2, enzima que degrada a matriz extracelular, e aumento das fibras de colágeno durante o reparo muscular após lesão aguda [115].

Após ser utilizado concomitantemente com os tratamentos padrões para feridas crônicas, como desbridamento do tecido necrótico, manutenção do leito úmido da ferida e controle da infecção, a LEDterapia promoveu melhora significativa na cicatrização de feridas diabéticas crônicas. Além disso, preparou a ferida para outras opções de cobertura, visto que aumentou a

granulação no leito da ferida e reduziu a quantidade de fibrina e tecido necrótico sem apresentar efeitos adversos. Com isso, o uso do LED demonstrou ser uma opção de terapia adjuvante aos tratamentos convencionais para úlceras diabéticas [62].

Um estudo clínico, duplo-cego, randomizado foi realizado utilizando LED no comprimento de onda vermelho visível e infravermelho invisível para tratar úlceras diabéticas crônicas. Os grupos experimentais tratados com LEDterapia apresentaram maiores taxas de granulação e de cicatrização, com 58,3% das úlceras alcançando total cicatrização ao final de 90 dias, demonstrando melhores resultados quando comparados ao grupo placebo [121].

Os efeitos biológicos da LEDterapia na cicatrização de feridas são diversos. Um trabalho de revisão demonstrou que essa terapia promove diminuição de células pró-inflamatórias, aumento da proliferação de fibroblastos, estimulação por angiogênese, formação de tecido de granulação e aumento da síntese de colágeno. Esses efeitos foram semelhantes aos efeitos causados pelo LASER e dependem de alguns parâmetros como comprimento de onda, dose e propriedades ópticas do tecido [35].

Recentemente, as terapias com LASER e LED foram comparadas num ensaio clínico para promover a cicatrização de úlceras diabéticas. Ambos os tratamentos demonstraram promover reparo tecidual e melhorar os sinais e sintomas neuropáticos em pacientes com DM. Os resultados demonstraram taxa de cicatrização mais alta nas feridas tratadas com LED do que com LASER, mas ressaltaram que são necessários mais estudos para compreender a superioridade entre as terapias [188].

Os efeitos da fotobiomodulação promovida por LASER ou LED sobre a cicatrização de feridas são bem descritos na literatura. É relatado que estas terapias induzem taxa aumentada de cicatrização de feridas. Contudo, ainda são necessários estudos que utilizem a fototerapia em combinação com outras técnicas para encontrar métodos ainda mais eficazes para induzir a cicatrização completa da ferida [97]. Visando os efeitos benéficos do LED para o tratamento de feridas, foi projetado um sistema móvel para neoformação tecidual – Rapha® – associado a uma biomembrana de látex natural [185], para promover a cicatrização de feridas diabéticas como UPD [151].

2.1.8 Biomaterial à base de látex para regeneração tecidual

Biomateriais ou materiais biocompatíveis são definidos como materiais sintéticos ou de origem natural que são utilizados para substituir ou reparar qualquer tecido ou função de um

órgão do corpo [206]. Biomateriais sintéticos podem ser produzidos partir de metais, polímeros, cerâmicas ou compósitos, enquanto os biomateriais naturais têm origem animal, vegetal ou microbiana [17].

Existe uma enorme variedade de biomateriais que são utilizados para a cicatrização de feridas. Dentre eles destacam-se biopolímeros à base de alginato de cálcio [186], hidrogéis biocompatíveis e antioxidantes [199], biomateriais à base de quitosana [81], à base de seda [39], poliméricos naturais [148], matriz de colágeno [122], à base de celulose [32], entre outros. Cada um se destaca conforme suas inerentes propriedades físicas, químicas e biológicas.

Biomateriais para o tratamento de úlceras diabéticas têm sido fabricados tendo como base poli (ácido lático-co-ácido glicólico) ou PLGA, colágeno, ácido hialurônico, fibrina ou quitosana a fim de alcançar o benefício terapêutico. Para possuir maior eficácia, esses materiais são combinados com outras estruturas para fornecer agentes terapêuticos que visam suprir os *déficits* das feridas. Essas estruturas podem ser micro ou nanoparticuladas ou ainda apresentar-se como malhas nanofibras, hidrogéis ou bandagens. Com isso, o uso de biomateriais tem se tornado uma estratégia promissora para o tratamento de feridas diabéticas [90].

A biomembrana de látex natural (BLN) é um material biocompatível produzido com o látex da seringueira *Hevea brasiliensis* que tem sido estudado por nosso grupo para o tratamento de úlceras diabéticas. O látex natural é um sistema polidisperso que possui de 30-40% de moléculas de borracha (cis-1,4-polisopreno), 4-5% de proteínas, lipídios, carboidratos e açúcar e 50% de água [58]. Foi relatado que o soro de látex possui propriedades angiogênicas [58,116] as quais favorecem o aumento da permeabilidade vascular e acelera a cicatrização de feridas [116].

A biomembrana de látex de *Hevea brasiliensis* foi produzida na Universidade de São Paulo em 1994 e daí em diante, iniciou-se uma série de estudos para investigar os efeitos deste biomaterial no processo de regeneração tecidual. Este biomaterial é confeccionado através da centrifugação do látex natural, a fim de remover as proteínas alérgicas, e, posteriormente, passa por um processo de vulcanização a baixas temperaturas, formando o biomaterial na forma de biomembrana [130].

A BLN vem sendo utilizada para a cicatrização de diversos tipos de feridas. Ensaio utilizando BLN demonstraram que este material apresentou biocompatibilidade [18,44,130] e induziu a promoção do processo adequado de cicatrização em coelhos [130]. Foi realizado um

estudo de relato de caso em que se demonstrou o efeito de BLN na cicatrização relacionado a indução da angiogênese, formação de tecido de granulação e de colágeno em úlcera cutânea de origem flebopática crônica. Sem causar efeitos adversos, a terapia favoreceu boa aceitação do participante de pesquisa no tratamento com a BLN [61].

Em úlceras venosas, a BLN promoveu a organização do tecido cicatricial através da indução de fatores de crescimento como VEGF e TGF- β 1 (fator de crescimento transformante beta 1, do inglês *transforming growth factor beta 1*) e redução da expressão da enzima iNOS (óxido nítrico-sintase induzida, do inglês *induced nitric oxide synthase*), favorecendo a cicatrização [59].

Diante das propriedades cicatrizantes deste biomaterial, ele tem sido bem utilizado para tratar feridas diabéticas. Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração do látex foram analisados em úlceras cutâneas de ratos diabéticos e *in vitro*. Foi demonstrado que o biomaterial não foi tóxico aos fibroblastos e queratinócitos humanos. Ao contrário, a BLN influenciou na formação do tecido de granulação e potencializou a reepitelização através do aumento da expressão de VEGF e da enzima eNOS (óxido nítrico-sintase endotelial, do inglês *endothelial nitric oxide synthase*), ressaltando o uso do látex como agente cicatrizante [15]. Ainda, foi relatado que úlceras diabéticas, que não foram responsivas a tratamentos convencionais, foram tratadas com BLN e esse biomaterial promoveu formação de tecido de granulação, desbridamento, redução da dor, reepitelização, destruição da crosta e cicatrização completa da ferida [60].

Além de favorecer o processo de cicatrização, a BLN permite incorporar componentes em sua estrutura como antibiótico moxifloxacina [64], extrato da folha de Salicaceae (*Casearia sylvestris* Sw.), extratos arbóreos cujos componentes possuem atividades anti-inflamatórias e cicatrizantes [31] e extrato aquoso de própolis [96] além de fitoterápicos usados na cicatrização de feridas.

Diante das propriedades favoráveis à cicatrização, a BLN torna-se um curativo promissor para o tratamento de feridas de diversos tipos, especialmente as úlceras diabéticas, além de possuir relativo baixo custo de produção em relação a produtos importados com a mesma finalidade. Além disso, o uso de BLN é vantajoso visto que este biomaterial está em processo de fabricação no Brasil pela Pelenova Biotechnology S/A (Terenos/MS) [156].

2.1.9 Associação da LEDterapia com a biomembrana de látex – Dispositivo Rapha®

O sistema terapêutico composto pelo uso combinado da LEDterapia com a BLN é chamado Rapha®. Este sistema foi desenvolvido na Universidade de Brasília – consulta de patente (BR 102016019963-8 A2) – para aplicação direta em processos inflamatórios humanos internos e externos [157].

Levando em consideração a dificuldade de cicatrização das úlceras diabéticas e seu estado inflamatório constante, uma terapia ideal para essas feridas deve suprimir a inflamação excessiva enquanto melhora a cicatrização. Devido à gravidade das úlceras diabéticas, esse dispositivo tem sido largamente utilizado no processo de cicatrização desse tipo de ferida [108,138,151,155,158] por promover neoformação vascular e por estimular a proliferação, granulação e reepitelização tecidual.

Reis [151] e Nunes [138] avaliaram a utilização de uma palmilha cicatrizante, derivada do látex de *Hevea brasiliensis*, conjunta e simultaneamente com a irradiação por LED no tratamento de UPD. A palmilha era personalizada e individualizada para cada paciente, enquanto o LED no comprimento de onda vermelho era aplicado sobre uma BLN durante 35 minutos. A BLN era colocada sobre a região ulcerada e trocada diariamente. Em ambos os trabalhos, o tratamento com a fototerapia e o biomaterial látex promoveu melhor processo cicatricial com redução das úlceras em comparação ao tratamento convencional utilizado no SUS [138]. A terapia em que se empregou BLN e irradiação por LED promoveu a neoformação vascular, estímulo da proliferação e granulação tecidual e reepitelização [151]. Este sistema terapêutico foi considerado uma opção eficaz no tratamento de feridas diabéticas devido à praticidade de sua aplicação, baixo custo e alta potencialidade na indução da cicatrização.

A utilização do sistema terapêutico Rapha® promoveu formação de tecido de granulação; redução de tecidos não viáveis e contração e fechamento das bordas da ferida, promovendo o processo de cicatrização de úlceras diabéticas, quando comparado ao grupo controle que utilizou o tratamento padrão do SUS. Foi demonstrado que a biomembrana em contato com a ferida absorveu o exsudato e promoveu a umidade necessária à cicatrização. Ainda, promoveu melhora na qualidade de vida dos pacientes, visto que o tratamento podia ser realizado em casa, evitando transporte inconveniente e idas constantes ao hospital [158].

Um outro ensaio clínico examinou a correlação entre a formação de ERO e a ação cicatrizante de úlceras diabéticas nos membros inferiores utilizando o sistema composto por

LED e BLN comparado ao tratamento utilizado no SUS. Houve redução na formação de ERO no sangue da ferida e no sangue venoso ao final de todos os tratamentos. Logo, concluiu-se que o processo de cicatrização está relacionado a redução do processo inflamatório, ocasionado com a redução de ERO. O sistema terapêutico com LED e látex apresentou melhor desbridamento e aceleração do processo de cicatrização com a redução da inflamação e formação de tecido de granulação, sem provocar efeitos adversos [108].

Uma análise detalhada demonstrou que o sistema Rapha® é uma alternativa terapêutica de baixo custo e eficaz na cicatrização de úlceras diabéticas para ser implementada no SUS. A terapia pode prover, além da redução de gastos na saúde causados por esta mazela, esvaziamento dos centros de atendimento e melhora da autoestima, aumento na qualidade de vida, favorecimento do processo de socialização, reintegração ao mercado de trabalho e aumento da produtividade dos participantes de pesquisa/pacientes [155].

2.2 FITOTERAPIA UTILIZANDO CURCUMINA PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A fitoterapia refere-se ao campo da medicina que utiliza plantas para tratar ou prevenir doenças [55]. O uso de plantas para o tratamento de doenças é uma prática que atravessa milênios, estando historicamente presente na sabedoria do senso comum [142].

São comuns e frequentes os trabalhos abordando o uso de fitoterápicos para o tratamento de diversas comorbidades, inclusive para a cicatrização de feridas. Produtos de plantas comestíveis são estudados para este fim, acreditando-se ser seguros sem produzir efeitos adversos aos tecidos saudáveis [131]. Além de plantas comestíveis, plantas ornamentais e silvestres possuem componentes ativos que podem ser usados para induzir o processo de cicatrização de feridas e regeneração tecidual. Podem apresentar propriedades anti-inflamatórias, pró-proliferativas e favoráveis a formação de tecido de granulação e angiogênese, acelerando o processo de regeneração tecidual e fechamento da ferida [114]. Dentre os diversos fitoterápicos estudados para promover a cicatrização de feridas destaca-se a curcumina [5].

A curcumina (diferuloilmetano) (Figura 2.3) é o principal curcuminoide presente no açafrão (*Curcuma longa*), sendo uma planta bastante utilizada na Índia e na China como especiaria e planta medicinal para tratamento de diversas doenças como reumatismo, úlceras diabéticas, anorexia, tosse e sinusite [34]. Esse curcuminoide possui atividade anti-inflamatória

regulando diversas vias de sinalização celular, apresentando grande potencial terapêutico sobre doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, pulmonares, neoplásicas, autoimunes e metabólicas, incluindo a diabetes. Na DM, esse fitoterápico demonstrou atenuar a hiperglicemia e sintomas relacionados à doença [1].

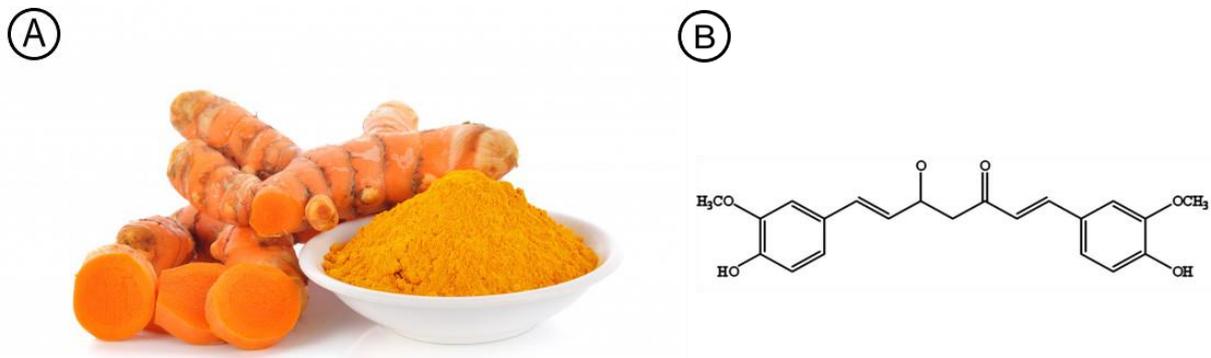


Figura 2.3. Açafão (*Curcuma longa*) (A) [207] e estrutura química da curcumina (B) [5].

A curcumina mostrou efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, anticoagulantes e anti-infecciosos. Adicionalmente, apresentou propriedades para cura de feridas agindo na redução da resposta de oxidação e inflamação, formação de tecido de granulação, deposição de colágeno, remodelação tecidual e contração da ferida, o que mostra seu grande potencial para a cicatrização de UPDs [5,66].

Esse fitoterápico possui, ainda, diferentes mecanismos antibacterianos [169], demonstrando reduzir significativamente o número de colônias de bactérias em feridas de ratos diabéticos que foram tratados com curcumina ou com curcumina e fototerapia, comparado aos grupos controle e placebo [174].

Na cicatrização de feridas, a curcumina reduz a oxidação e inflamação, promove a migração de fibroblastos, a formação do tecido de granulação e a deposição de colágeno. Ainda, controla a apoptose das células na ferida favorecendo-se a reepitelização, remodelação tecidual e contração da ferida [1].

Em ratos diabéticos, a administração da curcumina, tanto por via tópica ou oral, melhorou o reparo de feridas promovendo reepitelização, neovascularização aprimorada, migração aumentada de várias células, incluindo miofibroblastos dérmicos, fibroblastos e macrófagos para o leito da ferida e maior conteúdo de colágeno. Ainda, esse curcuminoide induziu aumento

no fator de crescimento transformador $\beta 1$ em feridas tratadas com curcumina em comparação com o grupo controle [171]. Diversos estudos foram realizados visando avaliar os efeitos da curcumina em feridas diabéticas, demonstrando que o fitocomposto, associado a nanofibras [118] ou na forma de gel [88,89], induziu atividade antioxidante e anti-inflamatória em ratos diabéticos, acelerando a cicatrização das feridas diabéticas.

Embora a curcumina demonstre promover o processo de cicatrização, inclusive em feridas diabéticas, ela apresenta algumas características desfavoráveis à sua utilização como agente fitoterápico, como baixa solubilidade em água, instabilidade química, metabolismo rápido no organismo e baixa biodisponibilidade [2,98]. Nesse contexto, uma alternativa é a utilização de nanotecnologia, o que possibilita encapsular diversos compostos químicos, inclusive a curcumina, visando aumentar sua solubilidade em água e, conseqüentemente, sua absorção e biodisponibilidade, além de aumentar sua estabilidade protegendo-a de degradação e volatilização [54].

2.3 NANOTECNOLOGIA: UTILIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A nanotecnologia envolve a aplicação de materiais em escala nanométrica, ou seja, nanomateriais. É uma tecnologia em constante expansão e com um amplo campo de aplicações, sendo pesquisada nas ciências animal, agrícola, nutricional, medicinal e farmacêutica e ambiental [133] e tem sido uma ferramenta utilizada para aprimorar a atividade de compostos bioativos [112].

Os nanomateriais (NMs) possuem diferentes formas, composições químicas, tamanhos e propriedades, o que os tornam materiais versáteis. Estas estruturas podem ser classificadas em NMs inorgânicos, NMs de ouro e prata, orgânicos, nanoplataformas de carbono e dendrímeros. Dentre os nanomateriais orgânicos têm-se os lipossomas [3], estruturas aplicáveis na cicatrização de feridas e regeneração tecidual [191].

Os lipossomas são nanopartículas orgânicas em formato esférico compostas por membranas de bicamada fosfolipídica em meio aquoso, podendo ser unilamelares ou multilamelares. A estrutura dos lipossomas (Figura 2.4) permite encapsular compostos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos. Compostos hidrofílicos ficam carregados no meio aquoso do lipossoma, enquanto compostos hidrofóbicos são incorporados na membrana lipídica [3].

Ainda, lipossomas são carreadores biocompatíveis e facilmente adaptáveis [145] e ainda apresentam potencial para utilização em sistemas de liberação sustentada. Outra vantagem interessante é que o uso de lipossomas pode favorecer a redução de efeitos adversos de agentes terapêuticos e, ainda, melhorar a estabilidade físico-química destes [36]. Embora lipossomas apresentem uma rápida degradação em meio biológico, esse problema pode ser resolvido com a incorporação de algumas substâncias a eles, como polioxietileno. O polioxietileno, por exemplo, impede a captação dos lipossomas por células do sistema imune e isso torna mais viável sua utilização em meios biológicos [3].

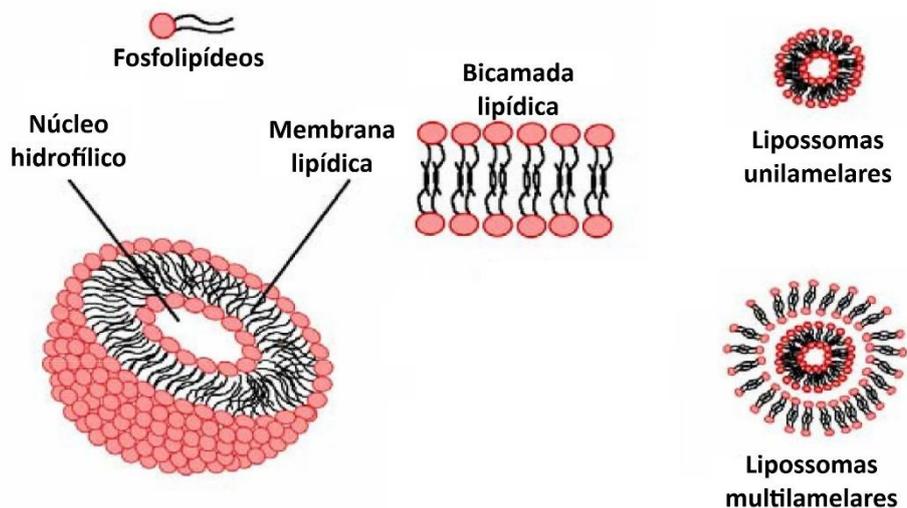


Figura 2.4. Lipossomas são constituídos por fosfolípideos. Os fosfolípideos se organizam de acordo com sua polaridade formando uma bicamada lipídica. Lipossomas apresentam um núcleo hidrofílico e um espaço intermembrana hidrofóbico. Lipossomas unilamelares possuem apenas uma bicamada fosfolipídica, enquanto lipossomas multilamelares possuem diversas camadas. Fonte: Adaptado de [16]

Lipossomas têm sido utilizados em diversas áreas em diferentes formas e para diversas aplicações na saúde. Um trabalho de revisão abordou o uso de lipossomas dispersos em gel. Foram relatados uso desse sistema nanoparticulado carregado com medicamentos para o tratamento de câncer, permitindo a liberação sustentada do medicamento. Na aplicação tópica, os lipossomas foram utilizados para tratar doenças na pele para atuar como analgésico e para prevenir ou tratar infecções, sendo uma opção vantajosa pois esses nanomateriais são permeáveis à pele [145].

Na engenharia tecidual, os lipossomas foram combinados com diferentes tipos de estruturas, como *scaffolds* (arcabouços), hidrogéis e fibras de eletrofição, visando promover a entrega de fármacos ou aprimorar essas estruturas. Essas composições tornaram-se

compostos multifuncionais e “sistemas inteligentes” no tratamento de feridas e regeneração de diferentes tipos de tecidos, visto que podem fornecer suporte mecânico à área da lesão e um microambiente adequado para a adesão e proliferação de células [36].

Em um estudo que relatou a utilização de nanogel contendo lipossomas com curcumina foi demonstrado que houve aumento da penetração e deposição da curcumina na pele, protegendo-a contra a degradação e aumentando sua biodisponibilidade. Ainda, acelerou o processo de cicatrização e reduziu a formação de cicatriz em um modelo de queimadura em ratos [49].

Uma busca sistemática por trabalhos relacionando o uso de lipossomas na promoção da cicatrização de úlceras diabéticas demonstrou que pesquisas nesse tema têm crescido substancialmente, mas que ainda existem poucos estudos na área, especialmente ensaios clínicos [165].

Em coelhos diabéticos, os lipossomas foram utilizados para encapsular adenosina trifosfato (ATP – do inglês, *adenosine triphosphate*) e, assim, permitir o fornecimento intracelular de energia. Dessa forma, demonstrou acelerar o processo de cicatrização de feridas diabéticas isquêmicas e não isquêmicas, sugerindo estar relacionado ao melhor suprimento de ATP intracelular [189].

A encapsulação de deferoxamina em lipossomas promoveu cicatrização mais rápida da ferida em ratos diabéticos em comparação com a formulação simples de deferoxamina, um composto que acelera a cicatrização de feridas através da neovascularização e redução da inflamação [146].

Lipossomas foram utilizados para encapsular diferentes compostos para emprego terapêutico em feridas de camundongos diabéticos. O uso de lipossomas associado com hemoglobina demonstrou acelerar a cicatrização das feridas diabéticas quando comparado com camundongos saudáveis promovendo melhor perfusão tecidual, inflamação atenuada e melhor metabolismo *in situ* [63].

Lipossomas também foram utilizados para associar bacteriófagos e tratar feridas diabéticas infectadas por bactérias colonizadas. Foi sugerido que os lipossomas podem aumentar a eficácia terapêutica de fagos melhorando sua estabilidade, permitindo a liberação oportuna de fagos no local da infecção e, conseqüentemente, levando a uma cicatrização mais rápida [37].

Lipossomas possuem características que tornam seu uso estratégico para o tratamento de feridas como permitir a entrega e formulação de fármacos e apresentar biocompatibilidade e biodegradabilidade [95], capacidade de proteger os compostos encapsulados de enzimas degradativas localizadas no epitélio e dentro da circulação e melhoria de absorção e meia-vida [74]. Isso permite a entrega de fitocomposto, via lipossomas, por possibilitar o carreamento de compostos imiscíveis em água tais como a curcumina [166].

Levando em consideração a cronicidade das úlceras diabéticas e a efetividade e custo-benefício do dispositivo Rapha®, neste estudo buscou-se aprimorar e avaliar os efeitos do tratamento desta terapia acrescentando um fitoterápico com enorme potencial terapêutico para o tratamento de feridas crônicas – a curcumina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.2.1 Equipamento à base de LED

Esse equipamento (Figura 3.1) contém uma placa com 30 LEDs de alta potência com comprimento de onda entre 635 e 640 nm (luz vermelha) em um rearranjo hexagonal para melhor homogeneidade e emissão de alta pureza. Ainda, este equipamento possui potência de 1800 mW e densidade de energia de 25 J/cm² na forma de pulsos de luz sequenciais, com um tempo de radiação programado de 35 minutos.



Figura 3.1. Equipamento à base de LEDs do sistema terapêutico Rapha®.

3.2.2 Biomembrana de látex natural

As biomembranas (Figura 3.2) utilizadas para a realização dos ensaios foram confeccionadas utilizando o látex natural bicentrifugado pré-vulcanizado (Du Latex Produtos Industriais Ltda, São Paulo, Brasil) e foram produzidas no Laboratório de Engenharia e Inovação da Universidade de Brasília (LEI – UnB). Para isso, foram utilizados equipamentos de proteção individual e seguida a Norma Regulamentadora do Ministério do Trabalho, Governo Brasileiro – NR 6 – Equipamento de Proteção Individual, de acordo com a metodologia descrita por Rosa et al. (2019).

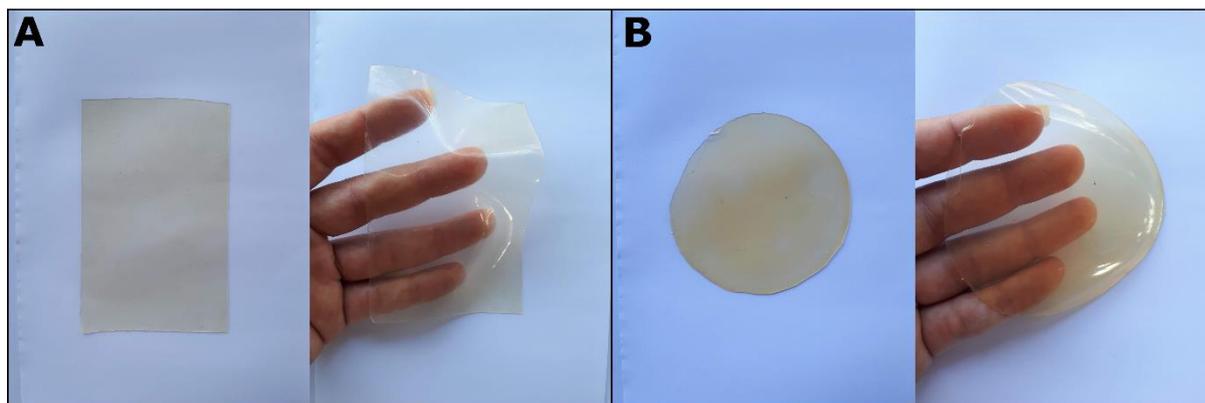


Figura 3.2. Tipos de biomembranas de látex natural utilizadas neste estudo. A) Biomembranas de látex utilizadas no grupo GE1 (Biomembrana de látex + LED vermelho) – látex exclusivo e B) Biomembranas de látex contendo curcumina que foram utilizadas no grupo GE2 (Biomembrana de látex contendo curcumina + LED vermelho).

Foram preparadas biomembranas de látex na ausência e presença de lipossomas contendo curcumina. Os lipossomas foram preparados pelo método de evaporação de solventes e hidratação do filme lipídico de acordo com metodologia descrita por [123]. Lipossomas com curcumina foram adicionadas antes do processo de vulcanização do látex por Silva e Rodrigues [172].

Todas as biomembranas foram enviadas para a empresa Sterimed Cedral Serviços de Esterilização Ltda (São Paulo, Brasil) e esterilizadas por vapor de baixa temperatura e formaldeído (VBTF). VBTF é um dos métodos de esterilização para produtos para saúde que são sensíveis ao calor e que indicou eficácia, rapidez e segurança [162].

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Desenho do estudo

O estudo, apresentado neste trabalho, trata de um ensaio clínico controlado, cujo protocolo foi previamente aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Saúde (Universidade de Brasília) e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (Conep) sob o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAEE) de número 94910718.5.0000.0030 (Anexo 1). O protocolo de intervenção proposto foi aplicado nas dependências do Ambulatório do Pé Diabético do Hospital Regional da Asa Norte (HRAN-DF) e nas residências dos participantes de pesquisa. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da participação na pesquisa.

A população foi composta por indivíduos portadores de úlceras diabéticas de membros inferiores com indicação de tratamento ambulatorial. Neste estudo, 15 participantes de pesquisa foram alocados em três grupos experimentais (descritos abaixo) sendo que cada grupo continha cinco participantes (n=5 por grupo).

- (i) Grupo Controle (GC): composto por participantes que utilizaram o protocolo adotado no SUS (de acordo com o Quadro 2.2, página 13) para o tratamento de úlceras diabéticas.
- (ii) Grupo Experimental 1 (GE1): participantes que utilizaram o protocolo experimental empregando biomembrana de látex natural em associação com irradiação por LED no comprimento de onda vermelho (entre 635 e 640 nm) (Rapha®).
- (iii) Grupo Experimental 2 (GE2): participantes que utilizaram o protocolo experimental empregando biomembrana de látex natural contendo lipossomas com curcumina em associação com irradiação por LED no comprimento de onda vermelho (entre 635 e 640 nm) (Rapha®).

Os participantes do grupo controle (GC) receberam os curativos e tratamento do protocolo SUS e este protocolo foi realizado pela equipe de saúde especializada do Ambulatório do Pé Diabético ao menos uma vez na semana. A realização do protocolo do grupo controle era escolhida de acordo com avaliação do enfermeiro do ambulatório para cada participante (Quadro 2.2, página 13). Os curativos mais comumente utilizados foram alginato de cálcio, hidrogel e carvão ativado com prata.

Os participantes dos grupos experimentais (GE1 e GE2) eram pacientes do Ambulatório do Pé Diabético. Sendo assim, todos eles utilizavam o tratamento aplicado no SUS antes de iniciar os protocolos experimentais. Os participantes dos grupos GE1 e GE2 realizaram tratamento em domicílio com uso da biomembrana e do equipamento à base de LED (dispositivo Rapha®). Os protocolos de ambos os grupos experimentais foram realizados de forma autônoma ou com auxílio de familiar, nos quais a troca do curativo era feita diariamente. Adicionalmente, os participantes dos grupos experimentais também receberam visitas domiciliares de membros do projeto de pesquisa, uma vez por semana. A visita da equipe do projeto não alterou a agenda dos participantes no ambulatório os quais estavam alocados. No grupo GE2 o uso da biomembrana com curcumina era intercalado com a biomembrana sem

curcumina, ou seja, um dia o participante utilizava a biomembrana com curcumina e no outro a biomembrana comum.

A equipe clínica era constituída por pesquisadores do grupo, enfermeiros e médicos, bem como os participantes de pesquisa. Todos envolvidos na equipe obtiveram primeiramente informações sobre o tratamento realizado e atestaram ciência por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Além disso, os participantes de pesquisa receberam treinamento prévio sobre como proceder ao tratamento. Na Figura 3.3 é apresentado um diagrama relacionado ao desenho do estudo.

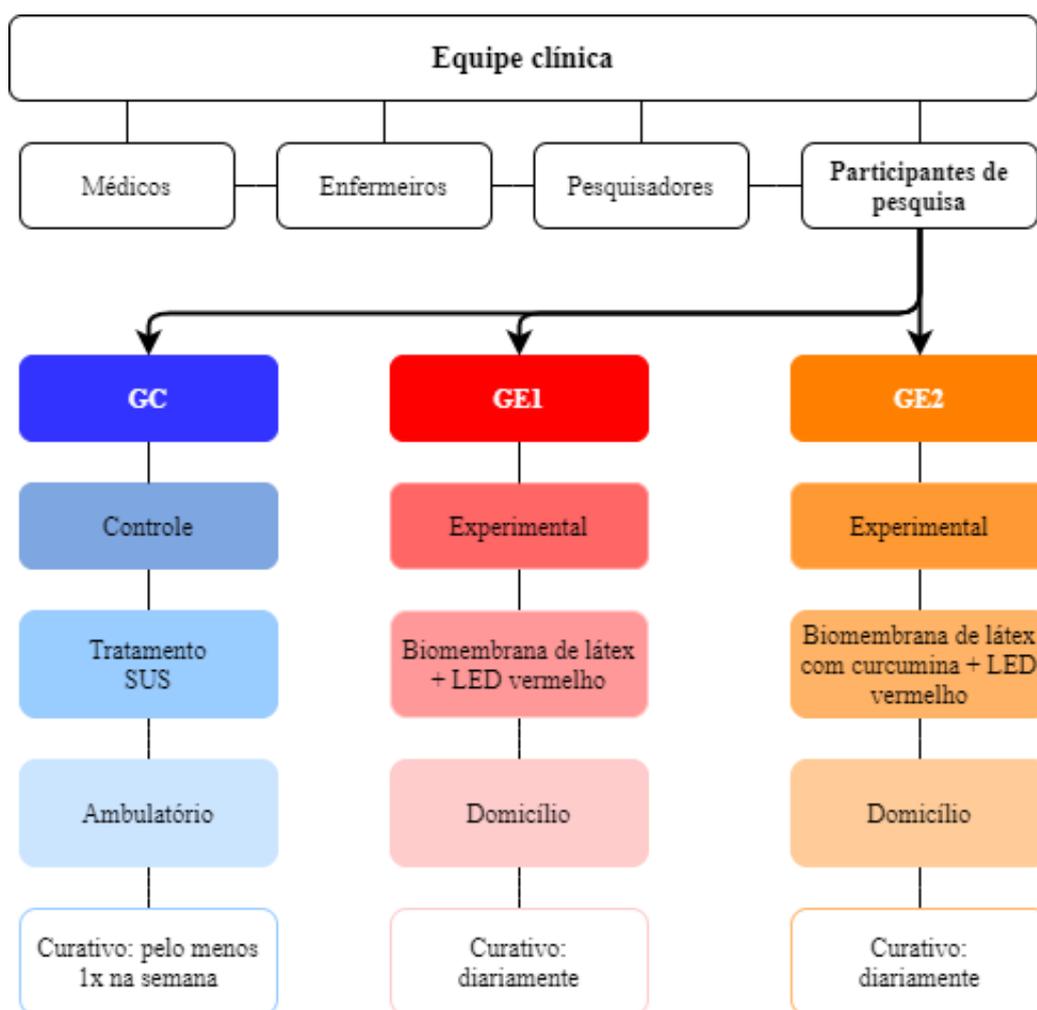


Figura 3.3. Desenho do estudo clínico. A equipe clínica que realizava o acompanhamento dos participantes de pesquisa era composta por médicos, enfermeiros e pesquisadores. Os participantes foram alocados em três grupos sendo GC, GE1 e GE2. GC é a sigla correspondente ao grupo controle e refere-se aos participantes que utilizaram o protocolo do SUS para o tratamento das úlceras diabéticas, sendo o tratamento/curativo realizado no ambulatório do pé diabético ao menos uma vez na semana. GE1 refere-se ao grupo dos participantes que utilizaram a biomembrana de látex e LED vermelho para o tratamento de suas feridas com troca diária do curativo em suas casas. Por fim, GE2 trata-se do grupo de feridas tratadas com biomembranas de látex contendo curcumina e LED vermelho, com troca de curativo diária na própria residência.

O protocolo experimental (Figura 3.4) consistia na limpeza da ferida com soro fisiológico (0,9%), colocação da biomembrana de látex como cobertura primária e exposição ao LED. A biomembrana de látex era cortada no formato da ferida, estendendo-se sobre toda a área ulcerada (Figura 3.4 B). Após a colocação da cobertura primária sobre a ferida, o equipamento à base de LED era posicionado sobre a biomembrana (Figura 3.4 C) e mantido ligado durante 35 minutos. Então, o curativo era finalizado com gaze e atadura (Figura 3.4 D).

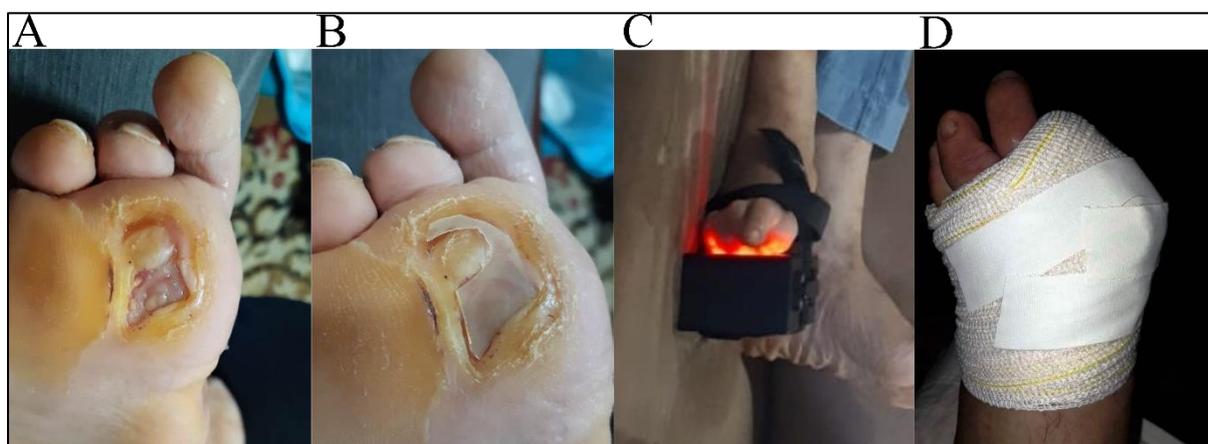


Figura 3.4. Aplicação do protocolo experimental. A) Úlcera diabética após limpeza com soro fisiológico 0,9%. B) Biomembrana de látex cortada e colocada sobre a úlcera conforme seu tamanho. C) Aplicação do protocolo experimental utilizando biomembrana de látex e LEDterapia. D) Curativo finalizado utilizando a biomembrana de látex como cobertura primária e fechado com gaze e atadura.

Diariamente, conforme era feita a troca do curativo, os participantes do grupo experimental realizavam o registro fotográfico da ferida e encaminhavam as fotos diariamente, via aplicativo Whatsapp, para equipe do projeto a fim de garantir a aplicação do protocolo e sanar eventuais dúvidas. Todos os participantes de pesquisa foram avaliados durante um total de quarenta e cinco dias.

3.2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Como critérios de inclusão para o estudo o participante deveria ter entre 18 e 75 anos de idade, ser portador de diabetes mellitus tipo I ou II, úlcera diabética em membro inferior com indicação de tratamento ambulatorial, histórico da ferida com, pelo menos, 3 semanas de duração, não possuir alergia ao látex, não ter comprometimento da autonomia mental e possuir telefone celular com capacidade para realizar fotografias e ter o aplicativo WhatsApp.

Foram excluídos da pesquisa os pacientes diabéticos que faziam uso irregular de medicação para outras doenças ou mesmo sem acompanhamento médico regular. Também se excluiu do estudo os pacientes que possuíam evidências de osteomielite ou gangrena, usuário

regular de bebidas alcoólicas e/ou drogas ilícitas, portador de doenças crônicas que comprometessem a pesquisa, lactantes ou participantes que já participaram de estudos clínicos em período inferior a um ano.

3.2.3 Coleta e análise de dados

ANAMNESE – ANÁLISE CLÍNICA E DEMOGRÁFICA

Com auxílio do médico e dos enfermeiros do ambulatório, foi realizada uma anamnese dos participantes de pesquisa a qual foi registrada em formulário. Foram coletados dados clínicos (histórico de diabetes, hipertensão, mobilidade, tabagismo, etilismo, peso, índice de massa corporal, glicemia, hemoglobina glicada) e demográficos (gênero, estado civil, de emprego, idade, altura) dos participantes, bem como informações a respeito da ferida (tipo e grau de acordo com a Classificação de Lesões por Diabetes da Universidade do Texas [127]).

AMOSTRAS

A coleta de amostras (sangue venoso, sangue e tecido da ferida e imagens das feridas) foi realizada antes (dia 0), durante (dia 22) e no final (dia 45) do tratamento, sempre antes de se realizar um novo curativo de acordo com o tratamento de cada grupo. As amostras foram coletadas com a finalidade de se avaliar a resposta inflamatória local (na ferida) e sistêmica (por meio do sangue venoso) e correlacionar com o progresso da cicatrização das feridas (mediante registro fotográfico).

Amostras de sangue venoso foram utilizadas para análises hematológicas e bioquímicas e para quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Amostras de tecido e sangue foram utilizadas para quantificação de espécies reativas de oxigênio na lesão.

Para as análises hematológicas e bioquímicas foram coletados aproximadamente 4 mL de sangue venoso. A mensuração da área da ferida foi realizada através do uso de régua descartáveis. Registros fotográficos digitais foram utilizados como técnica complementar para avaliar a lesão e, por conseguinte, evolução do processo de cicatrização. Foram utilizados cerca de 1 mL de sangue venoso para quantificação de ERO sistêmica. Para análise de ERO na ferida, foram utilizados cerca de 20 µL de sangue da ferida, coletados com seringas de 1 mL, e de dois a três pedaços de tecido, retirados com bisturi, medindo cerca de 2 mm² cada.

ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Amostras de sangue venoso foram coletadas por meio de uma seringa de 10 mL e transferidas para tubos à vácuo sendo que em um dos tubos continha anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*) para análise hematológica e outro continha ativador de coágulo (sílica) para análise bioquímica. Após as coletas, os tubos com fluido sanguíneo foram armazenados em caixa térmica contendo gelo reutilizável (Gelox) e levados ao Laboratório Clínico Sabin para realização de hemograma completo e análises bioquímicas.

As análises foram realizadas por meio de parceria com o Núcleo de Apoio à Pesquisa (NAP) do Instituto Sabin. O hemograma completo foi realizado por meio de citometria de fluxo fluorescente e impedância utilizando analisador hematológico automatizado XN 10-Sysmex (Sysmex Brasil). No Quadro 3.1 é mostrada a relação de testes realizados, valores de referência adotados pelo Sabin Medicina Diagnóstica e métodos utilizados para as análises.

Quadro 3.1. Testes, valores de referência e métodos utilizados para hemograma e dosagens bioquímicas em portadores úlcera do pé diabético. Fontes: ^a Rosenfeld (2019) [161]; ^b Instituto Sabin (2019).

Teste	Valores de referência	Método
Hemácias	3,9 a 5,8 milhões/mm ³ ^a	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Hemoglobina	11,5 a 16,9 g/dL ^a	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Hematócrito	35,3 a 52,0 % ^a	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Volume corpuscular médio (VCM)	81,0 a 100,6 (fL) ^a	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Hemoglobina corpuscular média (HCM)	26,3 a 32,6 (pg) ^a	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)	30,5 a 34,6 (g/dL) ^a	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW, do inglês <i>Red Cell Distribution Width</i>)	11,9 a 15,5 (%) ^a	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Leucócitos	3600 a 11000 /mm ³	Citometria de fluxo fluorescente e impedância

Segmentados	1480 a 7700 /mm ³	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Eosifófilos	0 a 550 /mm ³	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Basófilos	0 a 220 /mm ³	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Linfócitos	740 a 5500 /mm ³	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Monócitos	37 a 1500 /mm ³	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Plaquetas	130 a 450 x10 /mm ³	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Volume plaquetário médio (VMP)	6,8 a 12,6 fl ^b	Citometria de fluxo fluorescente e impedância
Glicose	> ou igual a 126 mg/dL ^b	Hexoquinase
Hemoglobina glicada - HbA1c	> 6,4 % ^b	Imunoensaio de inibição turbidimétrica
PCR-ultrassensível	< 0,5 mg/dL ^b	Imunoturbidimetria intensificada por Látex
Ureia	19 a 49 mg/dL ^b	Urease com GLDH
Creatinina	0,53 a 1,20 mg/dL ^b	Amidinohidrolase/Oxidase
Transaminase oxalacética TGO (AST)	< 34 U/L ^b	IFCC sem piridoxal fosfato
Transaminase pirúvica TGP (ALT)	10 a 49 U/L ^b	IFCC sem piridoxal fosfato
Fosfatase alcalina	46 a 116 U/L ^b	Cinético Colorimétrico
Bilirrubina total e frações	0 a 1,20 mg/dL ^b	Oxidação com vanadato
Albumina	3,2 a 4,8 g/dL ^b	Verde de Bromocresol
Cortisol	5,27 a 22,45 µg/dL ^b	Quimiluminescência

ANÁLISE DA ÁREA DA FERIDA

Para analisar a área da ferida durante a realização dos protocolos, foram utilizadas régua descartáveis para fazer a mensuração. Foram medidos o maior comprimento e a maior largura da ferida que, multiplicados, resultou na área estimada da superfície da ferida [136] (Figura 3.5).



Figura 3.5. Método utilizado para medição da área da ferida. Foram medidos o maior comprimento e a maior largura da ferida utilizando régua de papel descartável.

Com as medidas de área da ferida foram calculados os percentuais de contração/cicatrização das úlceras. O percentual de contração da úlcera (PCU) é dado por

$$PCU(\%) = \frac{(A_i - A_f)}{A_i} \times 100,$$

Sendo A_i e A_f as medidas de área inicial (dia 0) e área final (dia 45) da úlcera, respectivamente.

As médias das áreas iniciais das feridas para cada grupo são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Estatística descritiva para a variável área da ferida em cm² no início (D0) dos protocolos de tratamento.

	GC – Protocolo SUS			GE1 – Látex + LED			G2 – Látex curcumina + LED			Todos participantes		
	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV
Área (cm ²)	17±17,70	9	104%	8±9,86	4	117%	20±9,99	23	49%	15±13,15	9	86%

ANÁLISE DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Todas as soluções químicas para realização de análises de ERO foram preparadas imediatamente antes de cada experimento e mantidas resfriadas durante todo o experimento. O preparo das amostras de sangue venoso e da ferida foi realizado no próprio ambulatório, imediatamente após a coleta, enquanto que o das amostras de tecido da ferida foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas (LBQP – IB/UnB). As soluções foram feitas utilizando-se tampão Krebs HEPES (KHB) pH 7,4, dissolvido em água bidestilada e deionizada. Solução estoque de 10 mM do *spin probe* 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina (CMH) (NOX-2, Noxygen, Alemanha) foi dissolvida em KHB contendo 25 µM de deferoxamina (DF) (NOX-9, Noxygen, Alemanha), um quelante de ferro e 5 µM de trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio (DETC) (NOX-10, Noxygen, Alemanha), um quelante de cobre. Foram utilizadas seringas de 1 mL com os bicos cortados (Figura 3.6 A) para montar a estrutura contendo as amostras (Figuras 3.6 e 3.7) para leitura de ERO em equipamento de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).

Moléculas de *spin probe*, como CMH, associadas à alta sensibilidade de espectrômetros de RPE, permitem medir concentrações muito baixas de radicais e outras espécies paramagnéticas. Com a molécula de *spin probe* CMH é possível detectar vários radicais e espécies reativas de oxigênio, porém a principal molécula detectada é o íon superóxido e não ERO em geral. Contudo, a concentração de CM^* (3-metoxicarbonil-proxil nítróxido) formada através da oxidação de CMH é proporcional à concentração de ERO no tecido [21].

Para a quantificação indireta de ERO, através da concentração de CM^* , presentes no sangue venoso e no da ferida, foi preparada uma solução contendo CMH (400 µM) e heparina sódica (100 UI/mL). Foi adicionado sangue venoso ou da ferida à essa solução na proporção de 1:1 e 1:6, respectivamente. As amostras foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e, logo em seguida, foram preparadas as seringas para a análise.

Através do lado do bico da seringa, foram colocadas água e amostra de sangue (venoso ou da ferida) da seguinte forma: colocou-se 200 µL de água e logo congelou-se, em nitrogênio líquido – $N_2(l)$. Após foram adicionados 50 µL da amostra de sangue, que também foi congelada e seguiu-se para adição de mais 200 µL de água, congelando-se em seguida todo o conteúdo da seringa (Figura 3.7).

Os tecidos da ferida foram coletados e colocados em microtubos tipo Eppendorf e congelados imediatamente em $N_2(l)$. Posteriormente, foram lavados com 200 μL de tampão KHB por duas vezes. Após a lavagem, adicionou-se a cada tecido, 500 μL de solução contendo CMH 200 μM e heparina sódica 50 UI/mL. Incubou-se sob agitação a 37 °C por 1 h. Finalizada a incubação, colocou-se 450 μL do sobrenadante em seringa de 1 mL (Figura 3.6 D) e congelou-se imediatamente em $N_2(l)$. Os tecidos foram secos em *speed vac* em temperatura ambiente e pesados em balança de precisão (AB135-S/FACT, Mettler Toledo, EUA). Todas as amostras foram armazenadas a -80 °C até que as medidas em RPE fossem realizadas. As análises de ERO foram realizadas no Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica no Núcleo de Física Aplicada (IF/UnB).

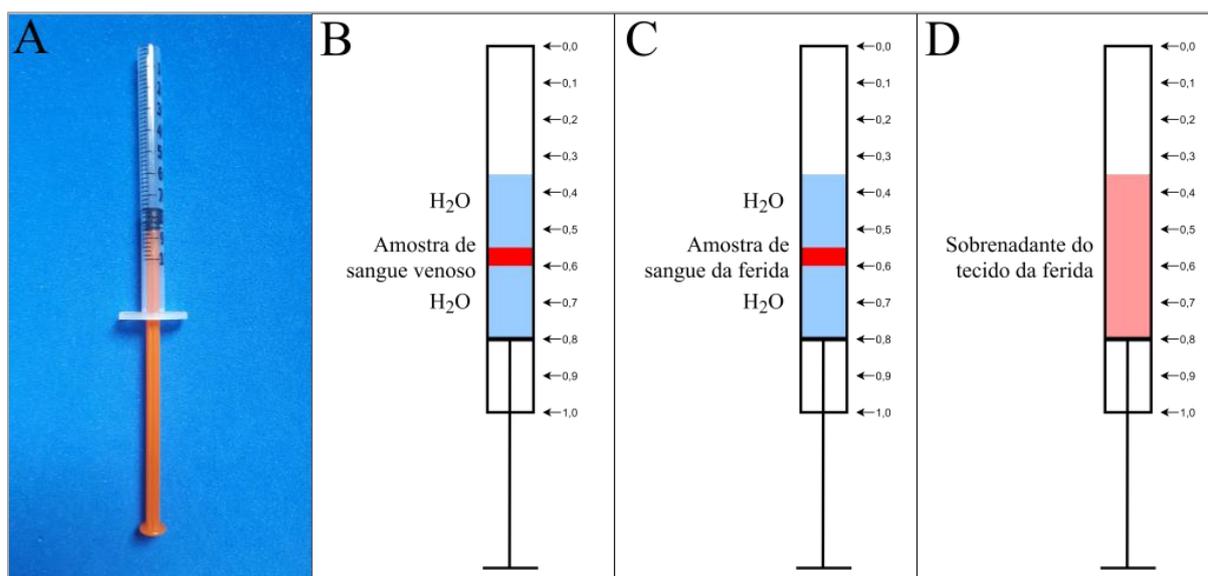


Figura 3.6. Seringas para análise de espécies reativas de oxigênio (ERO). A) Registro fotográfico da seringa utilizada para análise de espécies reativas de oxigênio no sangue venoso e da ferida e no tecido da ferida. Esquema demonstrando a composição da seringa para análise de ERO no (B) sangue venoso, (C) sangue da ferida e (D) no tecido da ferida, utilizando o sobrenadante.

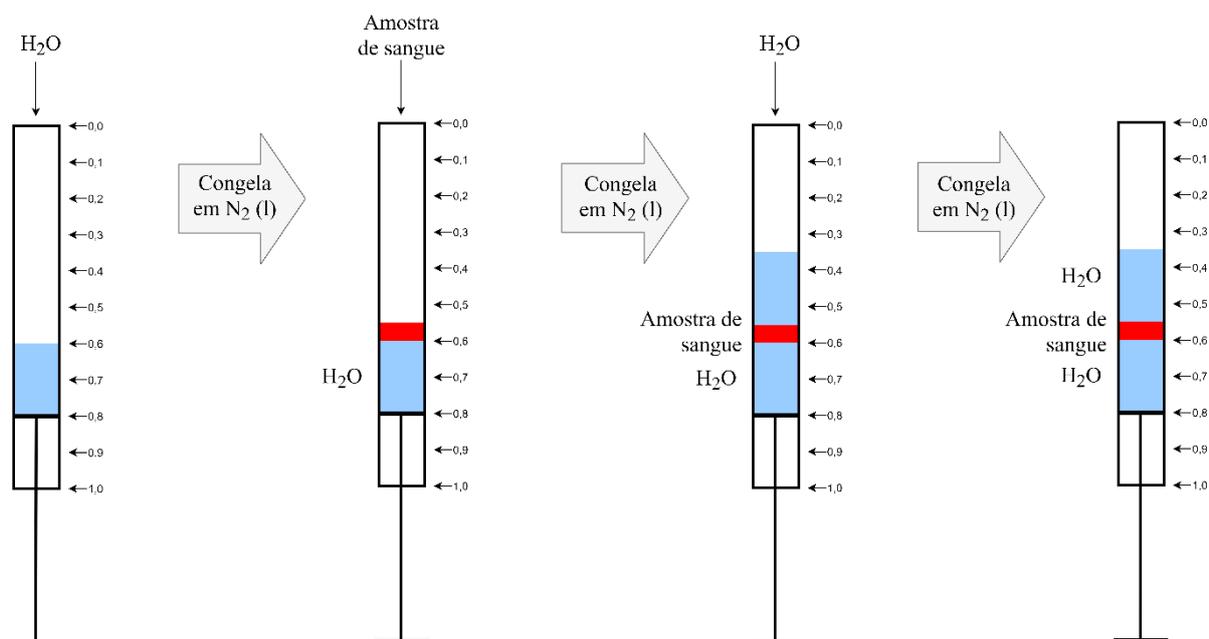


Figura 3.7. Processo de montagem da seringa com amostras de sangue para análise de espécies reativas de oxigênio (ERO). Primeiramente, colocou-se 200 µL de água destilada e submergiu em nitrogênio (N_2) líquido para congelar a água. Em seguida, adicionou-se a amostra de sangue e, novamente, congelou-se em $N_2(l)$. Então, foram colocados mais 200 µL de água destilada na seringa, que também foi congelada e armazenada em $N_2(l)$.

As medidas de RPE foram realizadas em espectrômetro EMX plus (Bruker, Alemanha) utilizando a banda X (9 GHz) e cavidade de alta resolução (ER 4119HS, Bruker, Alemanha). Para a detecção de CM^* , as amostras foram transferidas para um *dewar* com nitrogênio líquido e o espectro foi gerado a 77 K. Os parâmetros utilizados foram potência 2 mW, campo de modulação de 5 G, frequência de modulação 100 kHz e tempo de varredura de 10 s. Para a mensuração da amplitude foi utilizado o espectro da média de três varreduras com 200 G de largura de varredura.

A curva de calibração foi preparada usando o radical nitróxido 3-carboxi-proxilo (CP^*) preparado em KHB e diluído a concentrações de 0, 5, 10, 50 e 100 µM. Exatamente 450 µL das amostras de calibração foram transferidas para seringas de 1 mL e congeladas instantaneamente em $N_2(l)$.

3.2.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As variáveis comparadas foram área da ferida, concentração de CM^* no sangue venoso, sangue da ferida e tecido da ferida, além de variáveis sociodemográficas, hematológicas e bioquímicas. Estatísticas descritivas (média, mediana, desvio padrão e coeficiente de variação) foram

determinadas para dados demográficos e clínicos. Devido ao tamanho da amostra ser pequeno, foram utilizados testes não paramétricos [192] para as análises hematológicas, bioquímicas e concentração de CM* no sangue venoso e da ferida, e do tecido da ferida dos participantes. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para analisar possíveis diferenças entre os três grupos de estudo. Em seguida, foram realizados os pós-testes. Para analisar amostras dependentes, ou seja, variações dentro de um mesmo grupo de tratamento em momentos distintos de protocolo, foi utilizado o teste de Wilcoxon. O teste U de Mann-Whitney foi utilizado para analisar amostras independentes, isto é, na comparação entre os diferentes grupos de tratamento. A hipótese nula indicava que os grupos eram estatisticamente iguais. Foi considerada diferença estatística quando valor de $p < 0,05$, rejeitando-se a hipótese nula. As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software IBM SPSS Statistics* e os gráficos foram feitos utilizando-se o *software GraphPad Prism 8*.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE CLÍNICA E DEMOGRÁFICA

A caracterização da população amostral foi realizada através de uma análise clínica e demográfica dos participantes e de suas feridas. Nas Tabelas 4.1 e 4.2 são apresentados os dados clínicos e demográficos dos participantes, organizados por grupo experimental no momento inicial dos tratamentos (Dia 0).

Tabela 4.1. Características demográficas e clínicas da população estudada com as intervenções Protocolo utilizado no Sistema Único de Saúde – SUS - (GC), ou protocolos experimentais em que se utilizou curativo baseado em Látex e LED vermelho (GE1) ou Látex contendo curcumina e LED vermelho (GE2).

		GC – Protocolo SUS %	GE1 - Látex + LED %	GE2 - Látex curcumina + LED %	Todos os participantes %
<i>Sexo</i>	Mulher	20%	20%	20%	20%
	Homem	80%	80%	80%	80%
<i>Estado civil</i>	Solteiro	20%	20%	0%	13%
	Casado	60%	60%	80%	67%
	Divorciado	20%	20%	0%	13%
	Viúvo	0%	0%	20%	7%
<i>Ocupação</i>	Empregado	40%	40%	60%	47%
	Desempregado	40%	40%	0%	27%
	Aposentado	20%	20%	40%	27%
<i>Hipertensão</i>	Sim	60%	80%	60%	67%
	Não	40%	20%	40%	33%
<i>Tipo de tratamento</i>	Insulina	40%	80%	60%	60%
	Oral	60%	20%	40%	40%
<i>Obesidade</i>	Sim	40%	40%	20%	33%
	Não	60%	60%	80%	67%
<i>Mobilidade</i>	Independente	40%	60%	40%	47%
	Parcialmente dependente	40%	20%	40%	33%
	Dependente	20%	20%	20%	20%
<i>Tabagista</i>	Sim	0%	0%	20%	7%
	Não	100%	100%	80%	93%
<i>Etilista</i>	Sim	40%	20%	40%	33%
	Não	60%	80%	60%	67%
<i>Participantes</i>		5	5	5	15

Em suma, a amostra populacional foi composta, em sua maioria, por homens (80%). O estado civil e de emprego predominantes eram casado (67%) e empregado (47%), respectivamente. Além da diabetes, a maior parte da população era hipertensa, o que equivaleu a 67%. Uma minoria da população amostral era obesa (33%), tabagista (7%) e ingeria álcool (33%). No quesito mobilidade, 47% da amostra possuía mobilidade independente. Ainda, 60% dos participantes utilizavam insulina para o tratamento da diabetes.

Tabela 4.2. Caracterização da população estudada com as intervenções Protocolo utilizado no Sistema Único de Saúde – SUS - (GC), ou protocolos experimentais em que se utilizou curativo baseado em Látex e LED vermelho (GE1) ou Látex contendo curcumina e LED vermelho (GE2).

	GC – Protocolo SUS			GE1 – Látex + LED			GE2 – Látex curcumina + LED			Todos participantes		
	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV
Idade (anos)	57±9,92	59	17%	56±9,92	57	18%	63±9,92	60	16%	59±13,36	59	23%
Peso (kg)	84,94±17,90	75	21%	91±18,18	82	20%	74,24±16,74	75	23%	83,39±17,82	81,4	21%
Altura (m)	1,71±0,10	1,72	6%	1,74±0,12	1,68	7%	1,68±0,10	1,66	6%	1,71±0,10	1,69	6%
IMC (kg/m ²)	29±5,60	27	19%	30±2,43	30	8%	26±6,52	25	25%	28±5,00	27	18%
Duração da DM (anos)	12±9,09	13	77%	15±6,53	15	44%	9±7,64	7	89%	12±7,70	13	66%
Duração da úlcera (meses)	22±23,94	6	110%	33±49,30	12	149%	7±9,48	4	128%	21±31,64	6	153%
HbA1C (%)	7,8±1,74	8	22%	6,8±0,15	6,8	2%	8,7±2,72	7	31%	7,9±2,02	6,9	26%
Glicose (mg/dL)	226±158,29	186	70%	137±46,16	153	33%	137±34,19	146	25%	170±102,35	151	60%

Nota: DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação. Teste de Kruskal-Wallis para três amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento). Teste U de Mann-Whitney para duas amostras independentes.

Conforme mostrado na Tabela 4.2, as características clínicas dos três grupos de participantes foram semelhantes. A média de idade, peso e IMC dos participantes foram, respectivamente, 59 anos, 83,4 kg, e 28 kg/cm². Não se observou diferenças estatisticamente significativas em relação a idade (valor de $p = 0,68$), peso (valor de $p = 0,50$), altura (valor de $p = 0,79$), IMC (valor de $p = 0,29$), duração da diabetes (valor de $p = 0,40$), duração da úlcera (valor de $p = 0,32$), HbA1c (valor de $p = 0,69$) ou glicose (valor de $p = 0,59$). Os parâmetros duração da diabetes, duração da úlcera e glicose variaram marcadamente de um participante para o outro, cujas médias foram, respectivamente, 12 anos, 21 meses e 170 mg/dL.

A classificação das feridas na amostra populacional é apresentada na Tabela 4.3. Os protocolos foram testados em feridas dos tipos neuropática, venosa, traumática e neuroisquêmica, prevalecendo úlceras neuropáticas (67%). De acordo com a Classificação de Lesões por Diabetes da Universidade do Texas, a maioria das úlceras que receberam os tratamentos possuíam grau 1 (67%), ou seja, eram feridas superficiais que não envolviam tendão, cápsula ou osso, embora também tenham sido tratadas úlceras dos graus 2 (20%) e 3 (13%), envolvendo tendão ou cápsula e osso ou articulação, respectivamente.

Tabela 4.3. Classificação das feridas da amostra populacional conforme o tipo e grau de acordo com a Classificação de Lesões por Diabetes da Universidade do Texas.

		GC – Protocolo SUS	GE1 – Látex + LED	GE2 – Látex curcumina + LED	Todos os participantes
Tipo de ferida	Neuropática ^a	100%	60%	40%	67%
	Venosa ^b	0%	20%	20%	13%
	Traumática ^c	0%	0%	20%	7%
	Neuroisquêmica ^d	0%	20%	20%	13%
Grau segundo escala Texas	0	0%	0%	0%	0%
	1	60%	80%	60%	67%
	2	0%	20%	40%	20%
	3	40%	0%	0%	13%

Notas: ^a Úlcera causada pela falta de sensibilidade protetora ocasionada pela neuropatia periférica; ^b Úlcera causada pela estase venosa; [25] ^c Úlcera causada por algum trauma por lesão penetrante, exposição a alta ou repetitiva pressão; ^d Úlcera com caráter neuropático e que possui problemas vasculares (isquemia) [9].

4.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Exames de sangue complementares foram utilizados para avaliar o estado de saúde dos participantes imediatamente antes do início da terapêutica (Tabela 4.4). Os resultados dos exames hematológicos dos participantes de pesquisa dos GE, GE1 e GE2 realizados ao longo do tratamento são apresentados nas Tabelas 4.5, 4.6 e 4.7, respectivamente. Os resultados dos exames no D0 servem como linha de base para análise do processo de cicatrização das feridas. Os exames foram realizados no início (D0), meio (D22) e final (D45) do tratamento.

Tabela 4.4. Resultados de exames hematológicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram o protocolo SUS, látex e LED vermelho e látex contendo curcumina e LED vermelho para o tratamento de úlcera diabética no dia 0 dos protocolos.

DIA 0									
Parâmetros	GC – Protocolo SUS			GE1 – Látex + LED			GE2 – Látex curcumina + LED		
	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV
Hemácias (milhões/mm ³)	4,9±0,5	4,82	10%	4,48±0,6	4,41	14%	4,62±0,7	4,78	15%
Hemoglobina (g/dL)	13,68±2,1	14,4	15%	12,7±1,4	12,8	11%	13,28±1,9	13,7	14%
Hematócrito (%)	40,9±5,1	39,8	12%	38,33±5,1	39,0	13%	39,82±6,5	40,3	16%
VCM (fl)	83,28±2,8	83,6	3%	85,6±2,4	84,4	3%	86,34±5,3	86,7	6%
HCM (pg)	27,82±2,2	28,6	8%	28,43±1,0	29,0	3%	28,88±1,6	29,0	6%
CHCM (g/dL)	33,36±1,9	33,1	6%	33,2±1,0	32,8	3%	33,48±1,1	33,3	3%
RDW (%)	13,38±1,3	12,6	10%	13,7±1,3	14,2	10%	13,64±1,2	13,7	9%
Leucócitos (mm ³)	8660,0±1738,7	8.300,0	20%	9200,0±1479,9	8.500,0	16%	6840,0±1128,3	6.400,0	16%
Segmentados (mm ³)	5381,0±1671,2	5.146,0	31%	5539,0±1086,2	5.185,0	20%	3614,0±1069,8	3.256,0	30%
Eosinófilos (mm ³)	410,4±339,0	325,0	83%	477,0±247,8	340,0	52%	182,0±119,8^b	192,0	66%
Basófilos (mm ³)	67,2±41,0	78,0	61%	64,67±57,3	85,0	89%	57,2±33,2	64,0	58%
Linfócitos (mm ³)	2239,2±554,7	2.418,0	25%	2502,67±205,5	2.507,0	8%	2341,4±638,6	2.125,0	27%
Monócitos (mm ³)	562,2±72,4	581,0	13%	616,67±136,8	595,0	22%	645,4±241,5	595,0	37%
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	332,8±174,2	331,0	52%	289,0±97,9	252,0	34%	299,6±58,6	272,0	20%
Volume plaquetário médio – VMP (fl)	11,04±1,2	11,0	11%	11,0±1,5	10,7	13%	10,82±0,7	11,0	7%

Nota: DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação. ^b valor de p < 0,05 quando comparado ao grupo GE1. Teste de Kruskal-Wallis para três amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento). Teste U de Mann-Whitney para duas amostras independentes.

Os resultados de exames hematológicos dos participantes do grupo GC são mostrados na Tabela 4.5. Os parâmetros de todos os participantes se mantiveram dentro dos valores de referência ao longo do tratamento. Foi observada diferença estatística (valor de $p = 0,042$) para o parâmetro VCM (volume corpuscular médio) entre os momentos D0 e D22 (Figura 4.1).

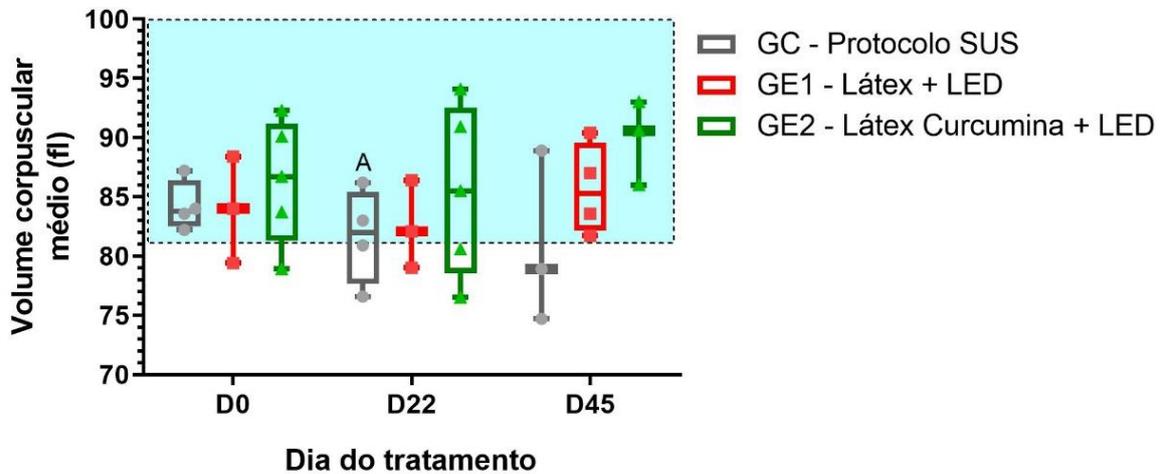


Figura 4.1. Diagrama de caixa indicando os valores de volume corpuscular médio (VCM) em fentolitro (fl) durante a realização dos tratamentos nos dias 0, 22 e 45 para os participantes que utilizaram o protocolo SUS, látex e LED e látex contendo curcumina e LED. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre os momentos avaliados (D0 – dia 0, D22 – dia 22 ou D45 – dia 45) num determinado grupo. Área do retângulo refere-se à faixa do valor de referência para o VCM. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento).

Tabela 4.5. Resultados de exames hematológicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram o protocolo SUS para o tratamento de úlcera diabética.

GC – PROTOCOLO SUS									
Parâmetros	D0			D22			D45		
	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV
Hemácias (milhões/mm ³)	4,9±0,5	4,82	10%	4,9±0,6	5,0	12%	5,3±0,3	5,1	6%
Hemoglobina (g/dL)	13,68±2,1	14,4	15%	13,4±1,9	14,2	14%	14,0±0,7	14,0	5%
Hematócrito (%)	40,9±5,1	39,8	12%	40,0±5,1	41,6	13%	42,4±2,4	42,0	6%
VCM (fl)	83,28±2,8	83,6	3%	81,1±3,7^a	80,9	5%	80,8±7,3	78,9	9%
HCM (pg)	27,82±2,2	28,6	8%	27,1±1,7	26,3	6%	26,7±0,9	26,2	3%
CHCM (g/dL)	33,36±1,9	33,1	6%	33,4±1,3	32,7	4%	33,1±2,0	33,3	6%
RDW (%)	13,38±1,3	12,6	10%	13,6±1,4	13,4	10%	13,5±0,4	13,7	3%
Leucócitos (mm ³)	8660,0±1738,7	8.300,0	20%	8280,0±2572,4	7.500,0	31%	7500,0±854,4	7.400,0	11%
Segmentados (mm ³)	5381,0±1671,2	5.146,0	31%	4937,0±2751,3	3.975,0	56%	3748,0±1129,5	3.256,0	30%
Eosinófilos (mm ³)	410,4±339,0	325,0	83%	444,6±501,0	288,0	113%	189,0±130,4	148,0	69%
Basófilos (mm ³)	67,2±41,0	78,0	61%	82,8±25,7	75,0	31%	75±8,5	74,0	11%
Linfócitos (mm ³)	2239,2±554,7	2.418,0	25%	2234,6±735,9	2.232,0	33%	2773,0±546,9	2.479,0	20%
Monócitos (mm ³)	562,2±72,4	581,0	13%	581,0±141,1	558,0	24%	715,0±180,0	756,0	25%
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	332,8±174,2	331,0	52%	330,6±179,2	383,0	54%	336,7±130,3	398,0	39%
Volume plaquetário médio - VMP (fl)	11,04±1,2	11,0	11%	11,1±1,2	11,9	10%	10,4±0,5	10,5	5%

Nota: Momentos do tratamento: **D0**: dia 0, **D22**: dia 22 e **D45**: dia 45. **DP**: desvio padrão, **CV**: coeficiente de variação. ^a valor de p < 0,05 quando comparado ao D0. Teste de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo).

Na Tabela 4.6 são apresentados os resultados do exame hematológico dos participantes que utilizaram o protocolo experimental com látex e LED (GE1) durante o tratamento. Nenhum participante apresentou alteração significativa nos resultados dos exames de sangue ao longo do tratamento. Contudo, a contagem média de leucócitos e eosinófilos mostrou-se acima do normal no D22, de 1% e 11%, respectivamente.

Tabela 4.6. Resultados de exames hematológicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram látex e LED vermelho para o tratamento de úlcera diabética.

GE1 – LÁTEX + LED									
Parâmetros	D0			D22			D45		
	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV
Hemácias (milhões/mm ³)	4,48±0,6	4,41	14%	4,5±0,5	4,3	11%	4,8±0,6	4,5	13%
Hemoglobina (g/dL)	12,7±1,4	12,8	11%	12,9±1,1	12,4	9%	13,9±1,9	13,6	14%
Hematócrito (%)	38,33±5,1	39,0	13%	37,6±3,5	36,9	9%	41,1±4,6	40,5	11%
VCM (fl)	85,6±2,4	84,4	3%	84,4±2,2	84,6	3%	86±3,4	87,0	4%
HCM (pg)	28,43±1,0	29,0	3%	28,9±0,7	29,0	2%	29,0±1,6	28,9	5%
CHCM (g/dL)	33,2±1,0	32,8	3%	34,3±0,7	34,3	2%	33,7±1,2	33,4	3%
RDW (%)	13,7±1,3	14,2	10%	13,4±0,9	13,8	7%	13,1±1,0	12,9	8%
Leucócitos (mm ³)	9200,0±1479,9	8.500,0	16%	11066,7±3350,1	10400,0	30%	9840,0±3159,6	10400,0	32%
Segmentados (mm ³)	5539,0±1086,2	5.185,0	20%	6781,3±2175,1	6.760,0	32%	6207,6±2457,4	6.344,0	40%
Eosinófilos (mm ³)	477,0±247,8	340,0	52%	616,7±357,1	416,0	58%	387,2±171,4	312,0	44%
Basófilos (mm ³)	64,67±57,3	85,0	89%	83,7±75,6	104,0	90%	80,6±54,8	104,0	68%
Linfócitos (mm ³)	2502,67±205,5	2.507,0	8%	2837,3±606,4	2.592,0	21%	2411,0±598,6	2.684,0	25%
Monócitos (mm ³)	616,67±136,8	595,0	22%	698,7±199,6	728,0	29%	753,6±218,3	832,0	29%
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	289,0±97,9	252,0	34%	301,7±141,5	224,0	47%	271,4±83,9	295,0	31%
Volume plaquetário médio – VMP (fl)	11,0±1,5	10,7	13%	11,0±1,5	10,3	14%	11,0±1,6	10,2	15%

Nota: Momentos do tratamento: **D0**: dia 0, **D22**: dia 22 e **D45**: dia 45. **DP**: desvio padrão, **CV**: coeficiente de variação. Teste de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo).

Na Tabela 4.7 estão representados os resultados dos exames hematológicos dos participantes que utilizaram o protocolo experimental com látex contendo curcumina e LED (GE2) durante o tratamento. Como no grupo tratado com látex e LED, nenhum participante apresentou alteração significativa nos resultados dos exames hematológicos ao longo do tratamento.

Tabela 4.7. Resultados de exames hematológicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram látex contendo curcumina e LED vermelho para o tratamento de úlcera diabética.

GE2 – LÁTEX CONTENDO CURCUMINA + LED									
Parâmetros	D0			D22			D45		
	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV
Hemácias (milhões/mm ³)	4,62±0,7	4,78	15%	4,4±0,9	4,5	21%	4,5±0,9	5,0	21%
Hemoglobina (g/dL)	13,28±1,9	13,7	14%	12,6±2,2	13,5	17%	13,3±2,5	14,6	18%
Hematócrito (%)	39,82±6,5	40,3	16%	37,6±6,2	41,1	17%	40,3±7,6	43,0	19%
VCM (fl)	86,34±5,3	86,7	6%	85,5±7,2	85,5	8%	89,9±3,6	90,6	4%
HCM (pg)	28,88±1,6	29,0	6%	28,7±1,8	28,6	6%	29,8±0,9	29,3	3%
CHCM (g/dL)	33,48±1,1	33,3	3%	33,6±1,2	33,2	4%	33,1±0,9	33,1	3%
RDW (%)	13,64±1,2	13,7	9%	13,8±1,2	13,7	8%	14,2±1,1	14,4	8%
Leucócitos (mm ³)	6840,0±1128,3	6.400,0	16%	7100,0±1407,1	7.600,0	20%	6800,0±692,8	6.400,0	10%
Segmentados (mm ³)	3614±1069,8	3.256,0	30%	4085,0±1093,6	4.576,0	27%	3644,0±992,8	3.136,0	27%
Eosinófilos (mm ³)	182,0±119,8	192,0	66%	164,4±110,0	176,0	67%	212,0±145,5	128,0	69%
Basófilos (mm ³)	57,2±33,2	64,0	58%	45,4±42,5	62,0	94%	68,0±6,9	64,0	10%
Linfócitos (mm ³)	2341,4±638,6	2.125,0	27%	2192,0±824,3	1.860,0	38%	2016,0±178,2	2.048,0	9%
Monócitos (mm ³)	645,4±241,5	595,0	37%	613,2±316,7	558,0	52%	860,0±284,1	1.024,0	33%
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	299,6±58,6	272,0	20%	248,0±86,5	215,0	35%	264±77,2	224,0	29%
Volume plaquetário médio – VMP (fl)	10,82±0,7	11,0	7%	11,2±0,6	11,2	5%	11,5±0,5	11,3	5%

Nota: Momentos do tratamento: **D0:** dia 0, **D22:** dia 22 e **D45:** dia 45. **DP:** desvio padrão, **CV:** coeficiente de variação. Teste de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo).

No início do tratamento, houve diferença significativa (valor de $p = 0,025$) na quantidade de eosinófilos entre o grupo GE1 e grupo GE2, embora todos os valores de ambos os grupos se enquadrassem dentro da referência (0 a 550 /mm³). Os demais parâmetros hematológicos analisados encontraram-se dentro dos valores de referência e não se observou diferenças significativas entre os grupos.

Os resultados de exames bioquímicos de todos os participantes no dia 0 (D0) de protocolo são apresentados na Tabela 4.8, enquanto que os resultados desses exames dos participantes de pesquisa do GC, GE1 e GE2 realizados ao longo do tratamento (D0, D22 e D45) são apresentados nas Tabelas 4.9, 4.10 e 4.11, respectivamente. Os únicos parâmetros em que houve diferença significativa foram de TGO (transaminase glutâmico oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico pirúvica) (valor de $p = 0,024$ e $0,025$, respectivamente) entre os grupos GC e GE1.

Tabela 4.8. Resultados de exames bioquímicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram o protocolo SUS, látex e LED vermelho e látex contendo curcumina e LED vermelho para o tratamento de úlcera diabética no dia 0 dos protocolos.

DIA 0									
Parâmetros	GC – Protocolo SUS			GE1 – Látex + LED			GE2 – Látex curcumina + LED		
	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV
Glicose (mg/dL)	226,4±158,3	186	70%	137±56,0	156	41%	137±34,2	146	25%
Hemoglobina glicada – HbA1c (%)	7,76±1,7	8	22%	6,77±0,2	6,8	2%	8,68±2,7	7	31%
PCR - Ultrassensível (mg/dL)	1,51±0,9	1,32	57%	0,95±1,2	0,46	124%	1,36±2,0	0,64	144%
Ureia (mg/dL)	49,6±10,8	49	22%	50,67±15,1	44	30%	54,6±56,2	33	103%
Creatinina (mg/dL)	0,85±0,2	0,83	22%	1,18±0,5	1,06	38%	1,01±0,7	0,79	68%
Transaminase oxalacética TGO (AST) (UL)	40,8±11,1	41	27%	19,00±3,5^a	17	18%	51,4±40,7	32	79%
Transaminase pirúvica TGP (ALT) (UL)	38,6±6,8	37	18%	17,67±4,2^a	19	24%	57,2±45,6	43	80%
Fosfatase alcalina (UL)	111,8±52,7	81	47%	80,33±44,1	59	55%	104±30,4	99	29%
Bilirrubina total (mg/dL)	0,42±0,2	0,32	54%	0,28±0,2	0,26	73%	0,41±0,1	0,38	34%
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,13±0,1	0,12	42%	0,09±0,1	0,08	55%	0,14±0	0,14	26%
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,29±0,2	0,21	62%	0,19±0,2	0,18	82%	0,28±0,1	0,25	43%
Albumina (g/dL)	4,4±0,6	4	15%	4,4±0,2	4,4	5%	4,06±0,3	4,2	7%
Cortisol (ug/dL)	15,65±6,0	11,95	38%	8,77±5,0	8,96	57%	11,75±3,4	10,95	29%

Nota: DP: desvio padrão, **CV:** coeficiente de variação. ^a valor de $p < 0,05$ quando comparado ao grupo GC. Teste de Kruskal-Wallis para três amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento). Teste U de Mann-Whitney para duas amostras independentes.

Na Tabela 4.9 são descritos os resultados dos exames bioquímicos do grupo GC. Observou-se que nenhum dos parâmetros apresentou mudança significativa ao longo do tratamento. Porém, alguns se apresentaram acima do valor de referência, foram eles: proteína C-reativa no D0, D22 e D45 (67%, 78% e 78%, respectivamente), ureia nos momentos D0 (1%) e D22 (3%), TGO nos momentos D0 (17%), D22 (8%) e D45 (30%) e TGP no momento D45 (22%).

Tabela 4.9. Resultados de exames bioquímicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram o protocolo SUS para o tratamento de úlcera diabética.

GC – PROTOCOLO SUS									
Parâmetros	D0			D22			D45		
	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV
Glicose (mg/dL)	226,4±158,3	186	70%	284,2±162,6	278	57%	274,0±103,0	272	38%
Hemoglobina glicada - HbA1c (%)	7,76±1,7	8	22%	9,0±3,6	7,6	40%	9,1±3,8	7,3	42%
PCR-Ultrassensível (mg/dL)	1,51±0,9	1,32	57%	2,3±3,3	1,1	143%	2,3±2,6	0,9	116%
Ureia (mg/dL)	49,6±10,8	49	22%	50,4±16,7	55	33%	45,7±19,1	53	42%
Creatinina (mg/dL)	0,85±0,2	0,83	22%	0,9±0,2	1	21%	0,9±0,3	0,9	36%
Transaminase oxalacética TGO (AST) (UL)	40,8±11,1	41	27%	37,0±26,4	31	71%	48,7±25,3	44	52%
Transaminase pirúvica TGP (ALT) (UL)	38,6±6,8	37	18%	48,2±46,1	33	96%	62,7±52,0	46	83%
Fosfatase alcalina (UL)	111,8±52,7	81	47%	107,0±54,7	81,5	51%	110,0±39,1	91	36%
Bilirrubina total (mg/dL)	0,42±0,2	0,32	54%	0,4±0,3	0,3	61%	0,5±0,1	0,5	23%
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,13±0,1	0,12	42%	0,1±0,1	0,1	56%	0,1±0	0,1	8%
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,29±0,2	0,21	62%	0,3±0,2	0,2	66%	0,4±0,1	0,4	29%
Albumina (g/dL)	4,4±0,6	4	15%	4,2±0,4	4,1	9%	4,4±0,3	4,2	8%
Cortisol (ug/dL)	15,65±6,0	11,95	38%	15,8±5,3	13,9	33%	12,8±5,1	10,8	40%

Nota: Momentos do tratamento: **D0:** dia 0, **D22:** dia 22 e **D45:** dia 45. **DP:** desvio padrão, **CV:** coeficiente de variação. Teste de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo).

Não houve diferença entre os exames bioquímicos do grupo GE1 (Tabela 4.10) ao longo do protocolo, dos quais a concentração de proteína C-reativa se manteve acima do valor de referência no início, meio e fim do protocolo (47%, 62% e 59%, respectivamente), de ureia no início (3%), meio (23%) e fim do tratamento (6%), concentração de creatinina esteve acima do normal no meio do tratamento (12%), e de TGO ao final (19%).

Tabela 4.10. Resultados de exames bioquímicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram látex e LED vermelho para o tratamento de úlcera diabética.

GE1 – LÁTEX + LED									
Parâmetros	D0			D22			D45		
	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV
Glicose (mg/dL)	137,0±56,0	156	41%	150,0±63,6	155	42%	150,4±58,3	143	39%
Hemoglobina glicada – HbA1c (%)	6,77±0,2	6,8	2%	6,9±0,4	7	6%	7,6±0,8	7,5	10%
PCR-Ultrassensível (mg/dL)	0,95±1,2	0,46	124%	1,3±1,2	1,2	95%	1,2±1,4	0,7	113%
Ureia (mg/dL)	50,67±15,1	44	30%	63,7±24,6	72	39%	52,4±18,3	45	35%
Creatinina (mg/dL)	1,18±0,5	1,06	38%	1,4±0,6	1,5	42%	1,0±0,3	1	31%
Transaminase oxalacética TGO (AST) (UL)	19,0±3,5	17	18%	18,0±2,6	17	15%	41,8±36,7	27	88%
Transaminase pirúvica TGP (ALT) (UL)	17,67±4,2	19	24%	19±2,0	19	11%	40,4±25,5	33	63%
Fosfatase alcalina (UL)	80,3±44,1	59	55%	88±48,4	69	55%	104,4±42,4	88	41%
Bilirrubina total (mg/dL)	0,28±0,2	0,26	73%	0,3±0,2	0,4	50%	0,5±0,2	0,4	45%
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,09±0,1	0,08	55%	0,1±0,1	0,1	47%	0,2±0,1	0,1	64%
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,19±0,2	0,18	82%	0,2±0,1	0,2	54%	0,3±0,1	0,3	38%
Albumina (g/dL)	4,4±0,2	4,4	5%	4,5±0,1	4,5	2%	4,5±0,4	4,4	8%
Cortisol (ug/dL)	8,77±5,0	8,96	57%	9,2±1,7	9,8	19%	11,4±2,5	12	22%

Nota: Momentos do tratamento: **D0:** dia 0, **D22:** dia 22 e **D45:** dia 45. **DP:** desvio padrão, **CV:** coeficiente de variação. Teste de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo).

A Tabela 4.11 representa os resultados dos exames bioquímicos dos participantes que utilizaram o protocolo experimental com látex contendo curcumina e LED (GE2) durante o tratamento. Nenhum participante apresentou alteração significativa nos resultados dos exames bioquímicos ao longo do tratamento.

Contudo, no GE2, o valor médio da proteína C-reativa esteve acima do valor de referência nos momentos D0 (63%), D22 (58%) e D45 (80%), de ureia nos dias D0 (10%) e D45 (16%), reduzindo do início para o meio do tratamento (D22) e aumentando novamente no final (D45). Os valores médios de TGO e TGP do grupo estavam acima do normal (34% e 14%, respectivamente) no início do tratamento (D0), mas passaram a ter valores normais no meio (D22) e no final (D45) do protocolo.

Tabela 4.11. Resultados de exames bioquímicos de diabéticos portadores de úlceras nos pés que utilizaram látex contendo curcumina e LED vermelho para o tratamento de úlcera diabética.

GE2 – LÁTEX CONTENDO CURCUMINA + LED									
Parâmetros	D0			D22			D45		
	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV
Glicose (mg/dL)	137,0±34,2	146	25%	138,0±43,4	155	31%	121,0±37,4	103	31%
Hemoglobina glicada – HbA1c (%)	8,68±2,7	7	31%	8,1±2,0	7	24%	7,8±2,6	6,4	33%
PCR-Ultrassensível (mg/dL)	1,36±2,0	0,64	144%	1,2±1,6	0,2	135%	2,4±2,1	3,5	86%
Ureia (mg/dL)	54,6±56,2	33	103%	47,0±45,2	29	96%	58,3±50,5	42	87%
Creatinina (mg/dL)	1,01±0,7	0,79	68%	1,0±0,6	0,8	64%	1,1±0,8	0,8	67%
Transaminase oxalacética TGO (AST) (UL)	51,4±40,7	32	79%	31,2±16,9	25	54%	29,0±11,3	23	39%
Transaminase pirúvica TGP (ALT) (UL)	57,2±45,6	43	80%	34,8±24,4	25	70%	25,7±9,3	30	36%
Fosfatase alcalina (UL)	104,0±30,4	99	29%	97,2±12,5	97	13%	96,0±6,9	92	7%
Bilirrubina total (mg/dL)	0,41±0,1	0,38	34%	0,5±0,2	0,5	38%	0,7±0,6	0,4	87%
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,14±0	0,14	26%	0,2±0,1	0,2	34%	0,2±0,2	0,1	72%
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,28±0,1	0,25	43%	0,4±0,2	0,4	43%	0,5±0,5	0,3	94%
Albumina (g/dL)	4,06±0,3	4,2	7%	4,1±0,4	4,1	10%	4,2±0,2	4,2	5%
Cortisol (ug/dL)	11,75±3,4	10,95	29%	11,5±5,1	11,4	44%	11,5±1,4	10,8	12%

Nota: Momentos do tratamento: **D0:** dia 0, **D22:** dia 22 e **D45:** dia 45. **DP:** desvio padrão, **CV:** coeficiente de variação. Teste de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo).

Alguns dos parâmetros analisados estavam acima dos valores de referência. O valor de TGO foi 17% e 34% maior que o valor de referência (> que 34 U/L) nos grupos GC e GE2, respectivamente (Figura 4.2). Para os valores de TGP, apenas o grupo GE2 apresentou valor fora da faixa de referência (14%). Outro parâmetro bioquímico em que se observou valores acima da referência foi a proteína C-reativa, estando com a concentração 67%, 47% e 63% acima do normal nos grupos GC, GE1 e GE2, respectivamente. Valores de ureia também foram maiores que o valor de referência (19 a 49 mg/dL) em todos os grupos experimentais, sendo de 1%, 3% e 10% nos grupos GC, GE1 e GE2, respectivamente.

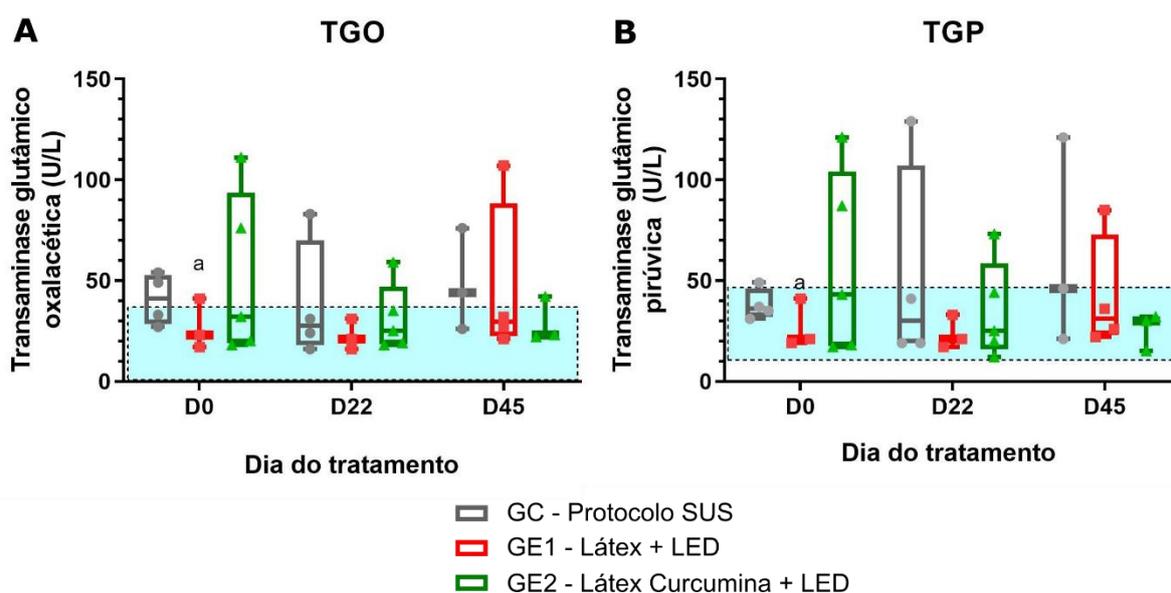


Figura 4.2. Diagramas de caixa indicando os valores de (A) transaminase oxalacética (TGO) e (B) transaminase pirúvica (TGP) em unidades por litro (U/L) durante a realização dos tratamentos nos dias 0, 22 e 45 para os participantes que utilizaram o protocolo SUS, látex e LED e látex contendo curcumina e LED. Letras minúsculas diferentes significam diferença estatística entre os grupos avaliados num dado momento do tratamento (D0 – dia 0, D22 – dia 22 ou D45 – dia 45). Área do retângulo refere-se à faixa dos valores de referência para TGO ou TGP. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento).

Além de comparar a evolução de cada grupo, em relação ao processo de cicatrização no decorrer do tratamento, foram comparados os resultados dos exames hematológicos e bioquímicos entre os grupos em momentos idênticos dos protocolos. Em relação aos valores de hemoglobina corpuscular média - HCM - (Figura 4.3 A) houve diferença entre os grupos GE2 e GC no momento D45 (valor de $p = 0,046$), apesar de os valores de HCM estarem dentro dos

padrões de referência. Por outro lado, não foi notada diferença entre os valores de HCM entre os grupos nos demais momentos dos protocolos ou nos momentos distintos em cada grupo.

A quantidade de eosinófilos foi significativamente menor para participantes do grupo GE2 do que do grupo GE1 nos momentos D0 e D22 (valor de $p = 0,025$), conforme mostrado na Figura 4.3 B.

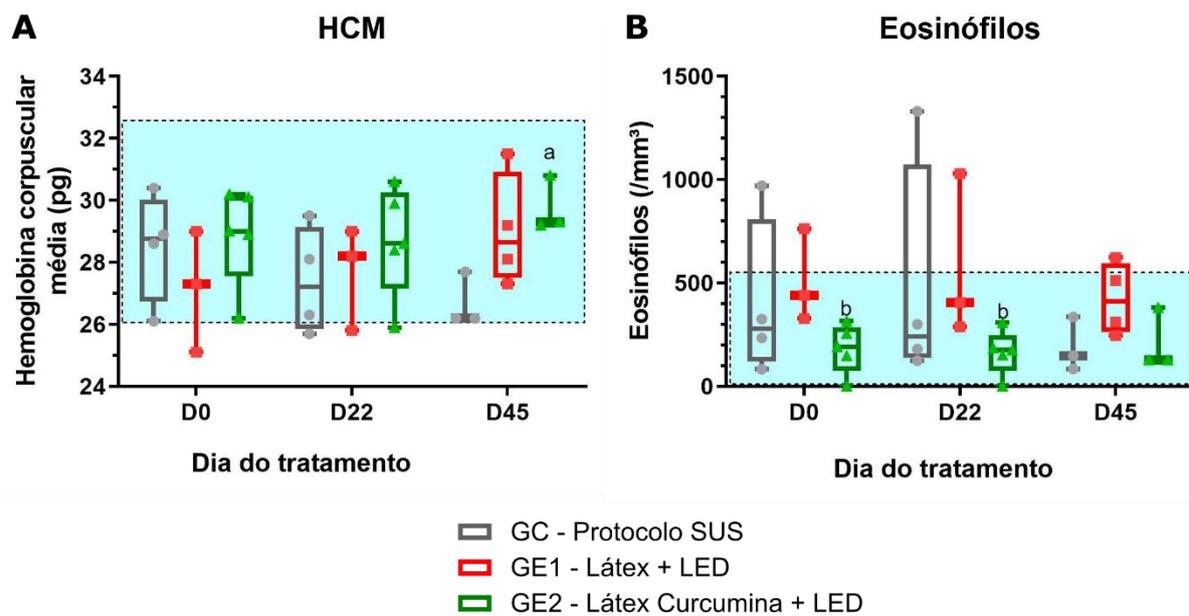


Figura 4.3. Diagramas de caixa indicando os valores de (A) hemoglobina corpuscular média (HCM) em picogramas (pg) e (B) quantidade de eosinófilos por mm³ durante a realização dos tratamentos nos dias 0, 22 e 45 para os participantes que utilizaram o protocolo SUS, látex e LED e látex contendo curcumina e LED. Letras minúsculas diferentes significam diferença estatística entre os grupos avaliados num dado momento do tratamento (D0 – dia 0, D22 – dia 22 ou D45 – dia 45). Área do retângulo refere-se à faixa do valor de referência para HCM ou eosinófilos. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento).

4.3 CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS

A avaliação macroscópica do processo de cicatrização das feridas foi realizada através da mensuração das suas áreas e do percentual de contração delas. Na Figura 4.4 são apresentadas as medidas de área das feridas em cm² e em porcentagem nos dias 0, 22 e 45 por grupo de tratamento.

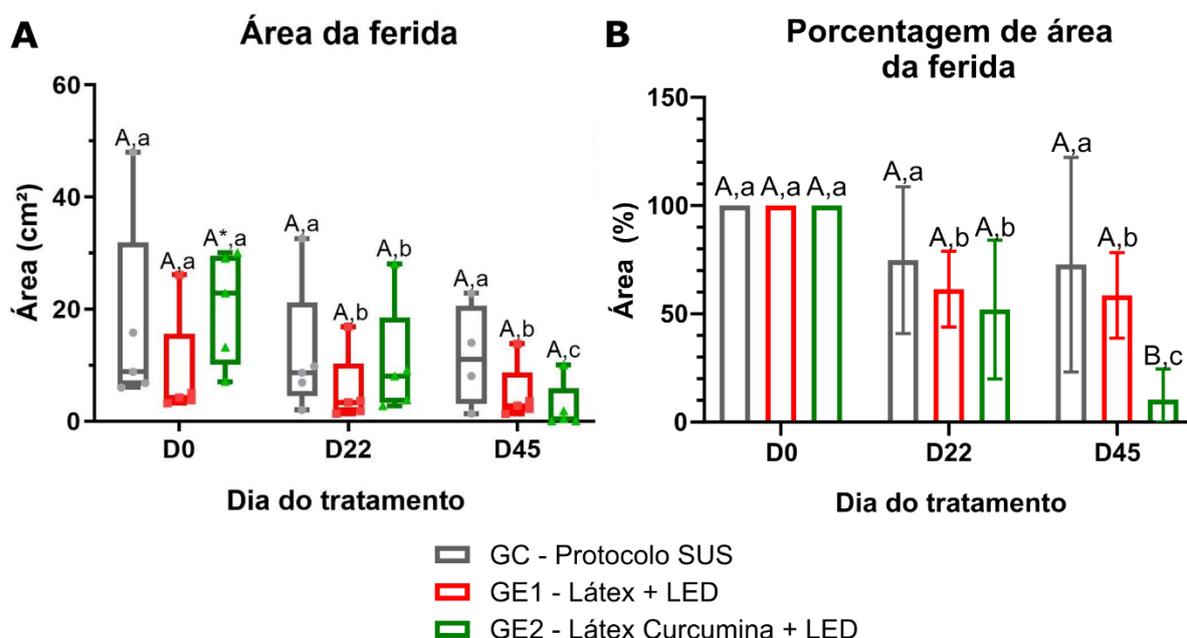


Figura 4.4. Evolução da área da ferida de acordo com o grupo e momento dos protocolos de tratamento. (A) Diagrama de caixa representando a área das feridas em cm² e (B) porcentagem de área das feridas (normalizadas com o dia inicial do protocolo) nos dias 0, 22 e 45 para os participantes que utilizaram o protocolo SUS ou protocolos experimentais utilizando o sistema Rapha®, látex e LED e látex contendo curcumina e LED. Letras maiúsculas diferentes significam diferença estatística entre os grupos avaliados num dado momento do tratamento (D0 – dia 0, D22 – dia 22 ou D45 – dia 45), assim como asterisco (*) indica diferença em relação ao GE1. Letras minúsculas diferentes denotam diferença estatística entre os dias em um mesmo grupo (GC – Protocolo SUS, GE1 – Látex + LED ou GE2 – Látex contendo curcumina + LED). Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento).

As feridas dos participantes do grupo GE2 foram estatisticamente maiores (valor de $p = 0,047$) que as feridas do grupo GE1 no momento D0, enquanto as áreas das feridas entre os grupos GC e GE1 não apresentaram diferença.

Ao longo da realização dos protocolos, não houve diferença estatística nos tamanhos de feridas em cm² (Figura 4.4 A) entre os grupos quando comparados em momentos iguais. Porém, ao compararmos os percentuais de área da ferida, o GE2 possuía uma porcentagem de área significativamente menor que os GC e GE1 (valor de $p = 0,027$ e $0,009$, respectivamente) no D45 (Figura 4.4 B).

O grupo que utilizou o protocolo SUS (GC) não apresentou diferença estatística significativa na área da ferida em cm² e percentual durante o tratamento.

Os participantes do grupo látex e LED (GE1) apresentaram redução significativa da área da ferida quando comparados os momentos D0 com D22 e D0 com D45 (valor de $p = 0,043$) (Figura 4.4 A), possuindo percentual médio de área de 62% e 59% no D22 e D45, respectivamente, apresentando significativa redução do percentual de área da ferida (valor de $p = 0,043$) em ambos os dias analisados, quando comparados à média inicial (100%) (Figura 4.4 B).

Foram observados resultados mais promissores no processo de cicatrização de úlceras em participantes do grupo GE2, ou seja, àqueles que receberam tratamento com látex contendo curcumina e LED. Houve significativa redução da área da úlcera durante todo o tratamento. Observou-se redução da ferida quando se comparou D0 com D22 (valor de $p = 0,043$); D0 com D45 (valor de $p = 0,043$) e D22 com D45 (valor de $p = 0,043$) (Figura 4.4 A). O percentual médio da área de feridas foi de $52\% \pm 32\%$ no D22 e de $11\% \pm 14\%$ no D45, quando comparados ao D0 (100%) (Figura 4.4 B). Assim, houve uma redução da área de ferida de cerca de 48% do início para o meio do tratamento e de quase 90% do início para o final do protocolo terapêutico. Os percentuais de área da ferida nos momentos D22 e D45 foram significativamente menores (valor de $p = 0,043$ e $0,042$, respectivamente) quando comparados ao D0. A redução observada do D22 para o D45 também foi estatisticamente significativa (valor de $p = 0,043$).

A partir das medidas de área das feridas, foi calculado o percentual de contração da úlcera no período de tratamento. O registro fotográfico das feridas tratadas com o protocolo SUS, suas áreas nos momentos D0, D22 e D45 e os percentuais de contração de cada uma aos 45 dias de tratamento são apresentados na Figura 4.5. Foi utilizado um código de identificação dos participantes em que o código P3 representa participante nº 3 e assim por diante.

Observou-se que o percentual de contração da ferida variou bastante entre cada uma das úlceras. Notou-se que os participantes P3 e P9 os quais receberam tratamento do SUS tiveram redução da área de ferida de 79% e 53%, respectivamente. O participante P11 apresentou redução da área da úlcera de apenas 11%, enquanto P12 não apresentou redução; pelo contrário, ocorreu um aumento no tamanho da úlcera. O P4 não compareceu ao ambulatório ao final do tratamento, sendo avaliado apenas nos momentos D0 e D22, onde, nesse período, sua úlcera reduziu apenas 1% no tamanho.

	D0	D22	D45	Contração da úlcera	Tipo de ferida
P3	 6,8 cm ²	 2,0 cm ²	 1,4 cm ²	79%	Neuropática
P4	 8,8 cm ²	 8,7 cm ²		1%	Neuropática
P9	 48,0 cm ²	 32,6 cm ²	 22,8 cm ²	53%	Neuropática
P11	 15,8 cm ²	 9,8 cm ²	 14,0 cm ²	11%	Neuropática
P12	 6,0 cm ²	 6,9 cm ²	 8,1 cm ²	-34%	Neuropática

Figura 4.5. Registro fotográfico, respectiva área da ferida, percentual de contração das úlceras (PCU) e tipo da ferida, por participante, do grupo GC – Protocolo SUS, nos momentos D0 (dia 0), D22 (dia 22) e D45 (dia 45).

As evoluções relativas ao processo de cicatrização das feridas do grupo GE1 são mostradas na Figura 4.6. Todos os participantes desse grupo apresentaram redução da área da ferida. Os participantes P8, P2 e P1 tiveram as feridas com maiores percentuais de contração sendo de 47%, 57% e 61%, respectivamente. Os demais participantes (P5 e P15) apresentaram uma leve redução da úlcera, com os menores percentuais de cicatrização (15% e 27%). Logo, observou-se que o tratamento com látex e LED induziu maior contração da úlcera do que o tratamento oferecido pelo SUS.

	D0	D22	D45	Contração da úlcera	Tipo de ferida
P1	 3,2 cm ²	 1,4 cm ²	 1,3 cm ²	61%	Neuropática
P2	 5,0 cm ²	 3,4 cm ²	 2,2 cm ²	57%	Neuropática
P5	 4,2 cm ²	 3,6 cm ²	 3,6 cm ²	15%	Venosa
P8	 26,1 cm ²	 16,9 cm ²	 13,8 cm ²	47%	Neuroisquêmica
P15	 3,8 cm ²	 1,8 cm ²	 2,8 cm ²	27%	Neuropática

Figura 4.6. Registro fotográfico, respectiva área da ferida, percentual de contração das úlceras (PCU) e tipo da ferida, por participante, do grupo GE1 – Látex + LED, nos momentos D0 (dia 0), D22 (dia 22) e D45 (dia 45).

As evoluções relativas ao processo de cicatrização das feridas do grupo GE2 são mostradas na Figura 4.7.

	D0	D22	D45	Contração da úlcera	Tipo de ferida
P6	 30,0 cm ²	 2,7 cm ²	 0,0 cm ²	100%	Traumática
P7	 13,2 cm ²	 8,0 cm ²	 1,8 cm ²	87%	Neuroisquêmica
P10	 29,0 cm ²	 28,0 cm ²	 10,0 cm ²	66%	Venosa
P13	 7,1 cm ²	 3,8 cm ²	 0,4 cm ²	95%	Neuropática
P14	 22,8 cm ²	 9,0 cm ²	 0,0 cm ²	100%	Neuropática

Figura 4.7. Registro fotográfico, respectiva área da ferida, percentual de contração das úlceras (PCU) e tipo da ferida, por participante, do grupo GE2 – Látex contendo curcumina + LED, nos momentos D0 (dia 0), D22 (dia 22) e D45 (dia 45).

Pôde-se perceber que houve uma expressiva melhora na cicatrização das feridas tratadas com látex contendo curcumina e LED, visto que todas as feridas tiveram redução da área inicial de mais de 60%. O PCU médio deste grupo ao longo do tratamento foi de $89,4\% \pm 14\%$, sendo estatisticamente diferente dos grupos GC e GE1 (Tabela 4.12), enquanto que não foi notada diferença significativa entre os grupos GC e GE1. As úlceras dos participantes de pesquisa P6 e P14, do grupo GE2, cicatrizaram totalmente até o final do tratamento. Ainda, os participantes de pesquisa P4 e P13 tiveram redução da ferida em 87% e 95%, respectivamente. Destaca-se que a ferida tratada com esta terapia que apresentou menor redução da área apresentou 66% de contração. Dessa forma, notou-se que este grupo experimental apresentou os maiores percentuais de redução de área da ferida quando comparado aos grupos GC e GE1.

Tabela 4.12. Percentual de cicatrização das úlceras (PCU) que utilizaram o protocolo SUS, látex e LED vermelho e látex contendo curcumina e LED vermelho.

	GC – Protocolo SUS			GE1 – Látex + LED			GE2 – Látex curcumina + LED		
	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV	Média ± DP	Mediana	CV
PCU	21,9%±45%	11%	204%	41,3%±20%	47%	48%	89,4%±14% ^{ab}	95%	16%

Nota: PCU: percentual de cicatrização das úlceras, DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação. Teste Kruskal-Wallis para três amostras independentes (amostras de diferentes grupos). Teste U de Mann-Whitney para duas amostras independentes. ^a valor de $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (GC). ^b valor de $p < 0,05$ comparado ao grupo Látex + LED (GE1).

4.4 ANÁLISE DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

A análise de ERO foi realizada no início (D0), meio (D22) e fim (D45) do tratamento para avaliar o estresse oxidativo no sangue venoso e nas feridas dos participantes, visto que é uma das causas comuns para o atraso na cicatrização de feridas crônicas. A quantificação de ERO é feita através da medição da concentração de CM^* , um radical estável formado através da oxidação de CMH.

A Figura 4.8 representa a concentração de CM^* encontrada nas amostras de sangue venoso dos participantes de pesquisa. Quando se comparou cada grupo experimental, ao longo do tratamento, não se observou diferença estatística na concentração de CM^* no sangue venoso dos participantes. Também se observou que nos momentos D0, D22 e D45 houve concentrações semelhantes de CM^* em todos os grupos experimentais.

Nos grupos controle e látex com curcumina e LED, notou-se uma redução média na concentração de CM^* ao longo do tratamento. No grupo Látex e LED, observou-se uma redução na concentração de CM^* do D0 para o D22, tornando a aumentar no fim do tratamento (D45).

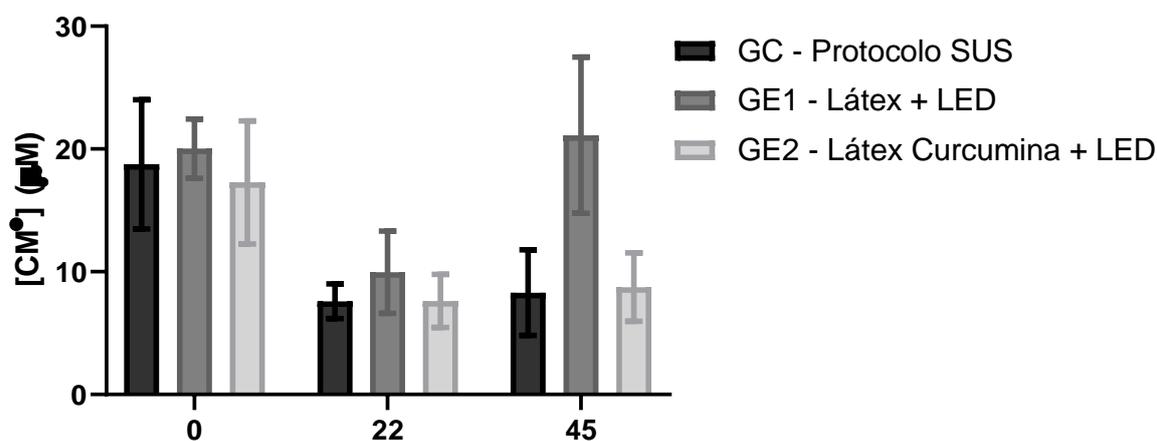


Figura 4.8. Análise quantitativa de ERO (espécies reativas de oxigênio) realizada através da medição da concentração de CM^* (3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil) em amostras de sangue venoso em participantes que utilizaram o protocolo SUS (GC), látex e LED (GE1) e látex contendo curcumina e LED (GE2) nos dias 0, 22 e 45. Dados representados como média \pm erro padrão da média. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento).

Na Figura 4.9 são apresentados os resultados da concentração de CM* no sangue da ferida dos participantes de pesquisa. Quando se comparou o tempo de tratamento, em cada grupo experimental, observou-se que os valores de concentração de CM* foram estatisticamente semelhantes nos dias 0, 22 e 45.

Em geral, antes do tratamento (D0) o grupo controle (GC) apresentou a maior concentração média de CM*. No meio do tratamento (D22), os grupos GC e látex e LED (GE1) apresentaram valores próximos para a concentração de CM*, enquanto o GE2 apresentou menor concentração média em relação a estes grupos. Ao final do protocolo de tratamento (D45) foi observada maior concentração média de CM* no GE1.

Além disso, observou-se que não houve diferença estatística entre a concentração de CM* ao longo dos tratamentos analisando-se cada grupo experimental. Em geral, ao observar-se os grupos, notou-se uma redução média na concentração de CM* do início (D0) para o meio (D22) e fim (D45) do tratamento no GC. No GE1, a concentração manteve-se semelhante ao longo do tratamento. No grupo GE2 observou-se uma pequena redução na concentração de CM* do início (D0) para o meio (D22) do protocolo de tratamento, com um leve aumento no D45.

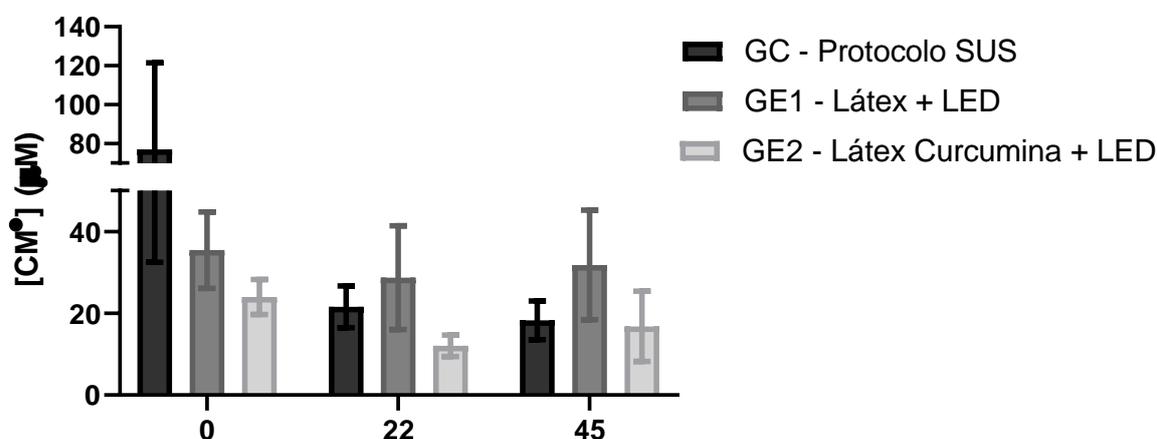


Figura 4.9. Análise quantitativa de ERO (espécies reativas de oxigênio) realizada através da medição da concentração de CM* (3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil) em amostras de sangue da ferida em participantes que utilizaram o protocolo SUS (GC), látex e LED (GE1) e látex contendo curcumina e LED (GE2) nos dias 0, 22 e 45. Dados representados como média \pm erro padrão da média. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento).

Na Figura 4.10 são apresentadas as concentrações de CM* nos tecidos da ferida dos participantes de pesquisa. Quando se comparou cada grupo experimental, nos três momentos

do tratamento, não se observou diferença significativa na concentração de CM* no tecido da ferida. No GE1, apesar de notar-se uma redução da concentração de CM* do D0 para o D22 e aumento no D45, as diferenças não foram significativas. No GE2, a concentração de CM* foi igual nos momentos D0 e D22 com aumento médio no D45.

Em relação a concentração média de CM* notou-se no momento D0 (antes do tratamento) que o GE1 apresentou maior concentração de CM* quando comparado aos grupos GC e GE1 e a concentração de CM* foi semelhante nestes dois grupos. No meio do tratamento (D22), os resultados foram semelhantes entre os três grupos analisados. No final do tratamento (D45), as concentrações para os grupos GE1 e GE2 foram semelhantes e ligeiramente maiores que no GC.

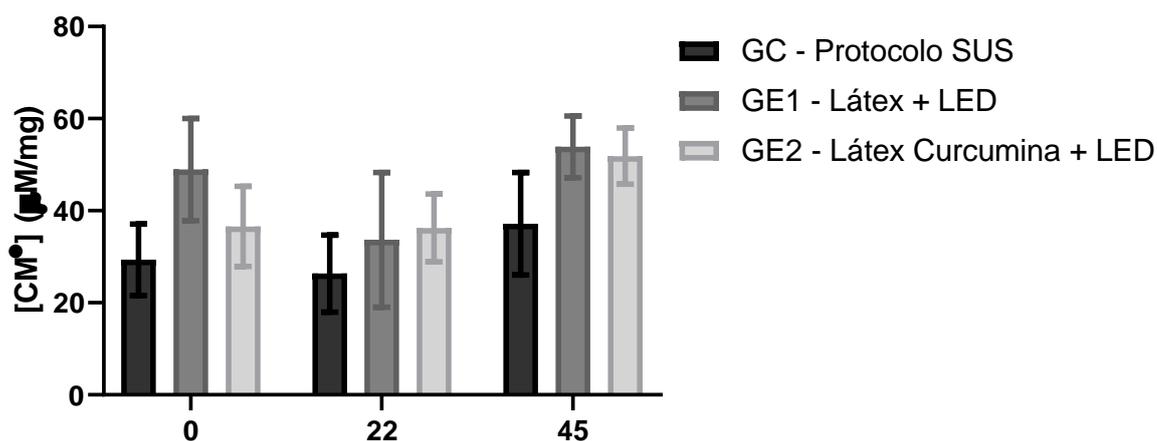


Figura 4.10. Análise quantitativa de ERO (espécies reativas de oxigênio) realizada através da medição da concentração de CM* (3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina-1-oxil) em amostras de tecido da ferida em participantes que utilizaram o protocolo SUS (GC), látex e LED (GE1) e látex contendo curcumina e LED (GE2) nos dias 0, 22 e 45. Dados representados como média \pm erro padrão da média. Significância atribuída a valor de $p < 0,05$. O teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os três grupos em cada momento do tratamento. Foram utilizados os pós-testes de Wilcoxon para amostras dependentes (amostras de um mesmo grupo em momentos distintos do protocolo) e teste U de Mann-Whitney para amostras independentes (amostras de diferentes grupos em cada momento do tratamento).

5 DISCUSSÃO

A UPD é responsável por um elevado índice de amputação dos membros inferiores [202], visto que a cicatrização da ferida é prejudicada em decorrência da inflamação prolongada [19]. Durante o processo inflamatório, macrófagos e neutrófilos liberam grande quantidade de ERO causando estresse oxidativo [137]. Níveis elevados de ERO podem prolongar o processo inflamatório, ativar vias proteolíticas e provocar danos no tecido [194]. Neste trabalho, investigamos o efeito terapêutico do uso combinado de biomembranas de látex contendo lipossomas com curcumina com LEDterapia (dispositivo terapêutico Rapha® *plus*) e sua relação com o processo inflamatório e estresse oxidativo associados ao processo de cicatrização tecidual em portadores de úlcera diabética.

De acordo com a análise demográfica (Tabela 4.1, página 42) verificou-se maior ocorrência de úlceras diabéticas em homens (80%). O mesmo foi observado nos estudos de [12,163,203]. Em um estudo retrospectivo foi relatado que os homens possuem 2,2 vezes mais chances de apresentar ulceração do que as mulheres, sugerindo que esse dado é atribuído ao envolvimento em atividade física pesada [128]. A proporção de homens empregados:desempregados era de 3:1, enquanto a de mulheres era de 2:1. Além disso, boa parte dos participantes de pesquisa que estava empregada trabalhava como segurança ou motorista, exigindo alguma pressão sobre determinadas regiões do pé, podendo existir alguma relação entre o desenvolvimento de úlcera e o trabalho realizado.

A amputação é um dos desfechos ocasionados pela UPD, acarretando prejuízos na mobilidade dos portadores dessa mazela [20]. Contudo, em nossa pesquisa, a maioria dos participantes possuía mobilidade preservada (independente) (47%), enquanto que a presença da úlcera era o motivo de alterações na mobilidade dos que possuíam mobilidade parcial ou totalmente dependente. Apesar de o tabagismo e etilismo prejudicarem o processo de regeneração tecidual [68], alguns participantes do GE2 que faziam uso de álcool (P7 e P10) e tabaco (P7) apresentaram melhora na cicatrização de suas feridas.

Índice de massa corporal elevado está associado a um pior prognóstico da cura de úlceras nos pés em diabéticos [10]. Contudo, apesar de nossos participantes de pesquisa apresentarem feridas de longa duração, a obesidade (IMC \geq 30) não foi prevalente em nossa amostra, visto

que uma pequena porcentagem dos participantes era obesa (33%), havendo no mínimo um e no máximo dois participantes obesos em cada grupo.

Ainda, a maioria dos participantes desse estudo era hipertensa (67%), estando em consonância com o relatado por [203] na qual uma revisão sistemática demonstrou que há maior porcentagem de hipertensos em portadores de UPD (63%) do que em quem não desenvolveu a doença (53%) [203], podendo a hipertensão estar associada ao desenvolvimento de UPD.

Além disso, diabetes de longa duração (> 10 anos) também está associada a piores resultados na cura da úlcera [164]. Nossa amostra apresentou duração média de DM (Tabela 4.2, página 44) de $12 \pm 7,70$ anos, o que demonstra uma forte relação entre duração da doença e cronicidade das feridas. O GE2 apresentou os melhores resultados de cicatrização das feridas (Figura 4.4), sendo também o grupo com menor valor médio de duração da DM ($9 \pm 7,64$ anos). Contudo, o GE1 tinha a maior média de duração da DM ($15 \pm 6,53$) e apresentou resultados mais promissores do que o GC (duração média da DM de $12 \pm 9,09$ anos). Assim, neste estudo, a terapia Rapha® mostrou ser mais efetiva que a terapia utilizada no SUS como padrão ouro.

Destaca-se que o período de duração das úlceras ($21 \pm 31,64$ meses) de todos os grupos experimentais desta pesquisa (Tabela 4.2, página 44) ressaltou sua cronicidade, visto que antes dos tratamentos nenhuma úlcera havia progredido no processo de cicatrização e alcançado a regeneração total e integridade do tecido [104].

A dosagem de HbA1c e a glicose no sangue são utilizadas para diagnosticar a DM, sendo considerada diabética a pessoa que possuir valor de HbA1c maior ou igual a 6,5% [48] e de glicose em jejum acima de 126 mg/dL [150]. Os valores médios de HbA1c ($7,9 \pm 2,02$) e glicose ($170 \pm 102,35$) (Tabela 4.2, página 44) confirmaram a característica de DM em todos os participantes deste estudo. No estudo de [198], pacientes com valor de HbA1c entre 7,0% e 8,0% apresentaram maiores taxas de cicatrização de feridas do que aqueles que possuíam HbA1c controlada em menos de 7% ou mais de 8%.

Neste trabalho, o GC possuiu maior valor médio para glicose ao longo do tratamento (Tabela 4.5, página 50) e menor – 22% – percentual médio de contração da ferida (Tabela 4.12, página 74). Por outro lado, o GE2 apresentou maior valor médio de HbA1c ($8,68\% \pm 2,7$) no início do tratamento (Tabela 4.2, página 44) e, ainda assim, o tratamento com BLN contendo curcumina e associado a fototerapia por LED (GE2) promoveu o maior percentual - entre 66 e 100% - de contração da úlcera (Figura 4.7, página 54). Nesse grupo, o percentual médio de

contração das feridas foi de $89\% \pm 14\%$ (Tabela 4.12, página 73), no qual duas feridas atingiram total cicatrização e uma ferida atingiu 95% de cicatrização. Os menores percentuais de contração no GE2 foram de 66% e 87%.

Um trabalho de revisão recente associou valores elevados de HbA1c e glicose ao maior risco de amputação em UPD, porém, não foi encontrada uma associação com a cicatrização das feridas nos trabalhos revisados [103]. Os estudos utilizam a amputação como desfecho de UPD, sendo escassas as pesquisas que utilizam as taxas de cicatrização como desfecho relacionado a um bom controle glicêmico [149].

Em nossa pesquisa, as análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas a fim de se investigar alguma resposta sistêmica aos tratamentos para úlcera diabética utilizados. Os parâmetros do hemograma dos participantes de todos os grupos estavam dentro dos valores de referência antes da realização dos protocolos de tratamento (D0) (Tabela 4.4, página 48). Os parâmetros que apresentaram diferença significativa são discutidos a seguir.

Foi demonstrado que valores maiores de VCM (volume corpuscular médio) atrapalham o processo de cicatrização de UPD. Em um relato de caso, a redução do VCM melhorou a microcirculação, resultando na melhora da angiogênese e cura de UPD induzida por hidroxiureia, uma terapia utilizada no tratamento de câncer [183]. Contudo, em nosso estudo, apesar de o VCM (Figura 4.1, página 49) ter reduzido significativamente no GC entre o D0 e D22, não se observou maior taxa de cicatrização nas feridas dos participantes de pesquisa do grupo controle.

Já foi demonstrado que VCM e HCM (hemoglobina corpuscular média) são aumentados com a hiperglicemia [7]. Foi também relatado, em outro estudo, que os níveis de glóbulos vermelhos entre diabéticos (tipo 2) com úlceras e sem úlceras não são diferentes [132]. Contudo, em nosso trabalho, foi encontrado um valor maior para HCM (Figura 4.3A, página 64) no GE2 comparado ao GC, no D45. Porém, o GE2 foi o grupo que apresentou o maior percentual médio de contração das úlceras enquanto no GC foi observado o menor percentual.

Os leucócitos incluem neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos, células do sistema imunológico que sinalizam a presença de um patógeno [6]. Após a lesão cutânea, durante o processo de cicatrização, ocorre uma fase inflamatória, da qual os leucócitos têm um importante papel. Durante a resposta inflamatória, os leucócitos presentes no sangue (circulação) e em tecidos adjacentes migram para o local da lesão para realizar a limpeza da ferida, eliminando micro-organismos patogênicos e resíduos celulares [92].

No leucograma dos participantes de pesquisa observou-se que o número de leucócitos foi similar entre os grupos e momentos avaliados (Tabelas 4.5, 4.6 e 4.7, páginas 50, 52 e 54, respectivamente). Porém, no GE1 a contagem média esteve acima dos valores de referência no período da metade do tratamento (D22). Esperava-se que houvesse variação no número e tipos de leucócitos, visto que esses migram do sangue circulante para o local da lesão de acordo com a evolução do processo cicatricial [147]. Assim, era esperado que a contagem de leucócitos no sangue reduzisse ao longo do tratamento, conforme redução do processo inflamatório e consequente cicatrização tecidual, especialmente no grupo GE2, que apresentou os melhores resultados de cicatrização das feridas.

Eosinófilos são um tipo de leucócito que desempenham diversas funções regulatórias e imunes no indivíduo atuando sobre o metabolismo da glicose, reparo tecidual, diferenciação epitelial [193] e na defesa contra infecções, sejam elas virais, fúngicas ou bacterianas [87]. A quantidade de eosinófilos (Figura 4.3B, página 64) foi significativamente maior no GE1 do que no GE2 antes do início do tratamento (D0) e no meio do tratamento (D22). Todavia, a contagem média no GE1 ficou acima (11%) do valor de referência no D22.

No processo normal de cicatrização de feridas, eosinófilos infiltram no local da ferida na fase proliferativa, atuando no reparo tecidual através da liberação de fatores de crescimento, que estimulam a proliferação e migração de fibroblastos para o local da ferida, dando sequência à fase de remodelação [175]. Contudo, o perfil dos eosinófilos no sangue durante a cicatrização de feridas ainda permanece inconclusivo, visto que os trabalhos geralmente enfatizam o perfil dos eosinófilos no local da ferida, não sendo avaliado sistemicamente. Aqui avaliamos a quantidade de eosinófilos no sangue venoso (Figura 4.3B, página 64) durante a utilização das terapias para regeneração tecidual, porém não foi possível observar sua relação com a cicatrização das feridas.

Um possível eosinofilia (1029 eosinófilos / mm^3) pode estar associada a uma disfunção renal observada em um dos participantes (P8) do GE1 no D22 (Tabela 4.10, página 61), visto que este participante apresentou valores elevados para as concentrações de ureia (83 mg/dL) e creatinina ($1,48$ mg/dL) nesse momento do tratamento. Um estudo realizado por [197] sugeriu que infiltração de eosinófilos no sangue está relacionado à nefropatia diabética. Assim, sugere-se que a eosinofilia observada nesse participante no D22 esteja relacionada a um possível problema renal, visto que a média de ureia e creatinina também se apresentou elevada.

Os valores elevados de ureia em todos os grupos desse estudo, no início dos protocolos (Tabela 4.8, página 56), podem estar associados à disfunção renal ou hepática. Essa observação baseia-se na avaliação dos exames de sangue, visto que não foram coletadas informações sobre comorbidades. O GC apresentou (Tabela 4.9, página 58), além da ureia, elevado nível de TGO nos D0 e D22 (17% e 8% acima, respectivamente), sugerindo função hepática prejudicada nesse grupo. No GE2 foi observado valores elevados de ureia, TGO e TGP (10%, 34% e 14% acima, respectivamente) antes do tratamento, o que poderia estar relacionado a dano hepático em participantes desse grupo experimental.

Em relação à função renal, essa se mostrou prejudicada no GE1 (Tabela 4.10, página 60) no meio do tratamento (D22) visto que se observou valores elevados de ureia e creatinina em relação à referência (22% e 12% acima, respectivamente). Era esperado que houvesse indivíduos com disfunção hepática e renal, visto que a hiperglicemia pode levar à complicações como doença hepática [170] e doença renal [50]. Em um estudo retrospectivo, as enzimas hepáticas ALT e AST não foram preditivos de resultados ruins na cura das úlceras [153]. Em um trabalho de revisão foi relatado que pacientes diabéticos com problemas renais, já em diálise, tinham acima de três vezes mais chances de ter úlcera no pé e sete vezes mais chances de sofrer amputação [86]. Assim, a menor taxa de cicatrização das feridas no GC pode estar associada aos danos renais identificados nos participantes deste grupo.

A proteína C-reativa, ou PCR, é um biomarcador da inflamação que tem sido associado a doenças de origem inflamatória como diabetes, obesidade, doenças cardiovasculares e outras [30]. Isso justifica os elevados níveis de PCR que observamos em todos os grupos experimentais ao longo dos protocolos de tratamento (Tabelas 4.9, 4.10 e 4.11, páginas 58, 60 e 62, respectivamente). Porém, esperava-se uma redução média nos níveis dessa citocina no grupo GE2, visto que níveis de PCR estão relacionados com redução da inflamação e cura da ferida [126]. Contudo, analisando-se individualmente cada participante, apenas P7 e P10 ainda apresentavam PCR acima do valor de referência (87% e 86% acima, respectivamente), sendo esses dois participantes os que possuíam menor percentual de cicatrização (87% e 66%, respectivamente) até o momento D45. Ainda, um desses participantes fazia uso de tabaco enquanto ambos eram etilistas, justificando o elevado nível dessa citocina nesse grupo nesse momento do protocolo.

Como não se identificou alterações nos parâmetros de inflamação supracitados sugere-se que as terapias utilizadas atuaram sobre os mecanismos de ação anti-inflamatória em momentos diferentes dos analisados.

Não foi identificada toxicidade nos participantes, visto que vários parâmetros de toxicidade renal ou hepática (TGO, TGP, ureia, creatinina) e sistêmicos (PCR e hemograma) não foram significativamente diferentes (valor de $p > 0,05$) no decorrer do tratamento em todos os grupos avaliados. É provável que estes resultados estejam relacionados com oscilações entre resultados individuais dos participantes. Nesse estudo foi avaliado um pequeno tamanho amostral ($n=5$ /grupo). Possivelmente, com um maior número amostra a particularidade de resposta individual poderia ser amenizada.

Durante o processo de cicatrização de feridas, na fase inflamatória, macrófagos e neutrófilos liberam grande quantidade de ERO [137], que atuam na defesa contra patógenos [135]. Porém, em níveis elevados, as ERO podem causar o estresse oxidativo, prolongando o processo inflamatório e causando danos aos tecidos [194] através do desequilíbrio entre moléculas oxidativas e defesas antioxidantes, sendo esse estado uma das causas comuns para o atraso na cicatrização de feridas crônicas [43].

Isso acontece especialmente em úlceras diabéticas, visto que a hiperglicemia atua sobre vários mecanismos moleculares [28,42,195] que irão refletir na produção de radicais superóxidos [28,195]. Em nossa pesquisa, não se identificou variações na quantidade de ERO no sangue venoso e da ferida e no tecido da ferida ao longo dos protocolos terapêuticos, mesmo nos grupos que apresentaram boa evolução na cicatrização das feridas (GE1 e GE2). Esperava-se uma redução significativa nos níveis de ERO na ferida ao longo do tratamento, nos grupos GE1 e GE2. Nossa hipótese era de que, conforme a ferida evoluísse nas fases da cicatrização, ocorreria uma redução nos níveis de ERO, considerando-se que o atraso na cicatrização da úlcera diabética está condicionado à inflamação prolongada.

Nossos dados são contrários aos achados de [108], visto que estes autores demonstraram um aumento de ERO na ferida no início e duas semanas após o tratamento com o dispositivo Rapha® em que se utilizou BLN e LED (semelhante ao grupo GE1). No estudo de [108] foi observado maior nível de ERO, no sangue venoso, no meio do tratamento (15 dias) enquanto houve uma redução significativa destas moléculas ao final do tratamento (30 dias). Esta variação do nível de ERO foi relacionada ao processo inflamatório que antecedeu a cura da ferida [108].

Em um processo normal de cicatrização de feridas, a fase inflamatória pode ocorrer do dia 0 ao dia 4 após a lesão, seguida da fase inflamatória que vai do dia 4 ao dia 21 e, por fim, a fase de remodelação tecidual, que pode se iniciar no dia 21 e durar até um ano [94].

Em nosso estudo, as coletas foram realizadas nos dias 0, 22 e 45, enquanto que no trabalho de [108] foi realizada nos dias 0, 15 e 30. Supõe-se que, em nossa pesquisa, o processo de produção de ERO tenha encaminhado para uma fase resolutive da inflamação até o D22 e, por isso, não foram encontradas alterações significativas [94]. Dessa forma, a não variação de ERO nos tempos analisados não indica que não ocorreu alteração na concentração dessas moléculas ao longo do tratamento.

Um estudo investigou mecanismos celulares e moleculares da cicatrização de feridas diabéticas induzidas por oxigenoterapia hiperbárica. Foi demonstrado que esse tratamento promoveu a proliferação e migração de fibroblastos e a geração de ERO por essas células sem afetar a cicatrização [77]. Levando em consideração que não houve variação significativa nos níveis de CM^* , supõe-se que a concentração de ERO estava dentro dos limites necessários para a cura das feridas e que os tratamentos não alteraram os níveis de ERO, não causando toxicidade ou dano ao tecido.

A sinalização redox promove um equilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, regulando diversos processos durante as fases inflamatória e proliferativa na cicatrização de feridas. Sendo assim, é importante que haja um equilíbrio entre a geração e eliminação de ERO para que a cicatrização da ferida seja eficiente [99].

Na DM, durante a fase inflamatória da cicatrização de feridas, células inflamatórias ficam no leito da ferida por um longo período, criando um ambiente rico em citocinas pró-inflamatórias e ERO, promovendo o estresse oxidativo [99]. O estresse oxidativo, ou seja, quando há um desequilíbrio redox, acontece quando há maior liberação de moléculas oxidativas, como ERO, do que de defesas antioxidantes.

Os participantes dos grupos GE1 e GE2 tiveram a comodidade de poder realizar o tratamento em sua residência evitando deslocamento até o centro de saúde. A adesão a estas abordagens terapêuticas foi excelente. A equipe pode acompanhar o processo de evolução diariamente. O acompanhamento dos participantes permitia passar orientações sobre a importância de praticar o autocuidado, manter a glicemia controlada, nutrir-se adequadamente, da ingestão de água, banho de sol, fazer o uso adequado das medicações, entre outras coisas. Além do acompanhamento do participante, o contato com a família promoveu maior

comprometimento dos participantes de pesquisa. Acredita-se que o acompanhamento dos participantes foi tomado como cuidado e atenção por parte deles, influenciando no aspecto psicológico, deixando-os mais dispostos a seguir com o tratamento, sendo essa atitude reforçada com a observação da cicatrização da ferida ao longo do tratamento. Dessa forma, acredita-se que o engajamento da equipe e educação em saúde relacionados à aplicação do protocolo diário nos grupos experimentais tenha favorecido o empenho dos participantes em cuidar de suas feridas e causado impacto sobre o autocuidado.

O sistema terapêutico Rapha®, utilizado no GE1, é uma terapia alternativa para o tratamento de úlceras diabéticas que permite a realização do curativo pelo próprio participante de pesquisa, promovendo melhora na qualidade de vida [160]. É considerado uma opção eficaz no tratamento de feridas diabéticas devido à praticidade de sua aplicação, baixo custo e alta potencialidade na indução da cicatrização [152].

Apesar de não termos observado variação nos marcadores inflamatórios no GE1, este grupo apresentou boa evolução na cicatrização das feridas, não havendo regressão na cura das úlceras. O PCU médio das feridas desse grupo foi de $41\% \pm 20\%$, com úlceras atingindo até 61% (P1) de cicatrização até o D45. Os maiores PCU foram para feridas do tipo neuropática, enquanto que o menor foi para úlcera venosa. Úlceras neuropáticas são causadas, geralmente, por traumas inconscientes sofridos por causa da sensibilidade prejudicada [46].

Nesse tipo de ferida, o tratamento consiste em tratar a causa subjacente da neuropatia, geralmente descarga da pressão, e a própria ulceração [47]. Enquanto que feridas venosas são lesões que apresentam insuficiência venosa crônica e são tratadas com terapia de compressão e tópica [101]. A insuficiência venosa prejudica a homeostase do tecido, o tráfego de células imunológicas e remoção de microrganismos [56]. Essa condição juntamente com a hiperglicemia pode dificultar a cicatrização dessas feridas. Em relação às ERO, essas foram avaliadas em úlceras diabéticas que utilizaram BLN e LED como terapia – semelhante ao GE1 – por López-Delis e uma redução dessas moléculas foi relacionada à melhor cicatrização das feridas [109].

Em um cenário com desequilíbrio redox, o organismo não é capaz de eliminar os radicais livres formados que acabam atacando outras moléculas e tecidos adjacentes, causando uma resposta inflamatória enquanto o aumento de citocinas inflamatórias também eleva o estresse oxidativo [69,119]. Kunkemoeller e Kyriakides [100] revisaram estudos pré-clínicos e uma terapêutica baseada em terapias antioxidantes e concluíram que terapias antioxidantes

representam uma estratégia eficaz para a cura de feridas diabéticas por promoverem equilíbrio redox, incluindo redução de ERO.

A curcumina é um composto natural que tem demonstrado melhora no processo de cicatrização de feridas através de sua atividade anti-inflamatória e antioxidante em ratos diabéticos [88,89,118]. A curcumina apresenta diversos benefícios terapêuticos como agente anticâncer, antibacteriano, antiulcerativo, antidepressivo e anti-inflamatório [204]. Contudo, esse biocomposto apresenta características como baixa solubilidade em água, instabilidade química, metabolismo rápido no organismo e baixa biodisponibilidade [2,98], sendo um desafio utilizá-la na prática clínica.

Com isso, diferentes estratégias têm sido adotadas para superar essas limitações do fitocomposto e otimizar seu uso visando sua melhor solubilização, proteção contra a inativação por hidrólise e liberação sustentada e lenta do fármaco na forma solubilizada. Foram realizadas diversas estratégias para suprimir as limitações da curcumina na aplicação tópica em cicatrização de feridas em modelos animais. Para aplicação tópica na cicatrização de feridas a curcumina foi incorporada em filmes, fibras, hidrogéis e nanoformulações. As nanoformulações para aplicação tópica da curcumina se destacaram por oferecer melhor dispersão, melhor biodisponibilidade e liberação sustentada do fitoterápico [124]. Em nosso estudo, utilizamos lipossomas para encapsular a curcumina e suprimir as limitações desse composto. Os lipossomas contendo curcumina foram ainda incorporados em uma biomembrana de látex natural e realizada aplicação tópica para promover a cicatrização.

Em uma revisão, foi relatado que a curcumina atua reduzindo a inflamação inibindo a produção de citocinas liberadas durante a fase inflamatória na cicatrização de feridas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1) e o fator de transcrição NF- $\kappa\beta$ [84]. Outro estudo demonstrou que a curcumina apresentou efeito protetor contra a peróxido de hidrogênio, uma espécie de ERO, inibindo o estresse oxidativo em queratinócitos e fibroblastos [143]. Alguns trabalhos demonstraram que a aplicação tópica de curcumina em feridas aumentou a regeneração epitelial, a proliferação de fibroblastos e a densidade vascular [171,180].

Apesar de ser bastante relatado que a curcumina age na cicatrização reduzindo a inflamação, foi demonstrado que a curcumina promoveu a cicatrização de feridas em camundongos através do aumento da síntese de óxido nítrico, colágeno e estímulo da fase inflamatória [82].

O tratamento utilizando BLN contendo curcumina e LED (dispositivo Rapha® *plus*, GE2) foi eficaz, pois promoveu a cicatrização tecidual acima de 66% e em 40% da amostra (n=2/5) houve cicatrização completa da ferida em até 45 dias e em 20% (n=1/5) houve 95% de cicatrização. Da mesma forma que no GE1, as feridas com maior PCU foram do tipo neuropática e a ferida com menor percentual foi do tipo venosa. Alguns participantes relataram que tinham a úlcera há mais de dois anos e que o tratamento realizado no SUS não teve eficácia. Todavia, com a aplicação da BLN contendo curcumina e aplicação do LED as úlceras evoluíram para tecido parcial ou totalmente cicatrizado a partir de trinta dias de protocolo clínico (P6, P13 e P14). Em um dos casos evitou-se a amputação do dedo (P6). Acredita-se que o sucesso na cicatrização das feridas desse grupo foi devido aos benefícios da curcumina para a regeneração tecidual.

Em nossa pesquisa foi constatado resultados mais promissores no grupo tratado com biomembrana de látex – BLN – contendo curcumina e LED (GE2) do que nos grupos que utilizamos BLN e LED (GE1) e o protocolo do SUS (GC). Contudo, foi demonstrado que os tratamentos realizados em todos os grupos não influenciaram na quantidade de ERO no local da ferida e/ou sistemicamente (sangue venoso). Além disso, não se observou variação significativa em marcadores inflamatórios sistêmicos, como leucócitos e proteína C-reativa (PCR). Em nosso estudo, não foi notada variação significativa nos níveis redox nos tempos analisados no grupo que recebeu o tratamento contendo curcumina. Porém, neste grupo (GE2) foi observado que houve apenas três participantes (P7, P10 e P13) com amostras de ERO coletadas no D45, visto que ainda possuíam ferida aberta ao final do tratamento. Destes participantes, dois (P7 e P10) faziam uso de álcool e/ou tabaco, o que pode ter influenciado nos níveis de ERO. Estes participantes foram os que apresentaram menor percentual de contração da úlcera ao longo do tratamento, sugerindo que seus hábitos podem ter influenciado o processo de cicatrização e inflamação [68].

Dentre alguns dos biomarcadores sistêmicos de inflamação encontrados em portadores de UPD destacam-se a composição e quantidade de leucócitos, níveis de PCR e de ERO. Com a evolução da cicatrização das feridas nos grupos GE1 e GE2, esperava-se que esses biomarcadores variassem ao longo dos tratamentos, especialmente no GE2, que apresentou os resultados mais promissores na cicatrização das feridas. Como essas variações não foram observadas nos tempos avaliados nesse trabalho, sugere-se que o processo inflamatório estaria em manutenção, visto que houve uma redução do processo inflamatório, já que houve

cicatrização das feridas. Assim, são necessárias novas investigações para avaliar a variação da concentração desses biomarcadores em menores intervalos de tempo, considerando-se que as úlceras crônicas possuem uma ou mais fases da cicatrização prejudicadas. Adicionalmente, sugere-se que as amostras da ferida sejam coletadas, também, logo após a aplicação da terapia, buscando-se identificar alterações imediatamente após a realização do protocolo.

Ainda, feridas crônicas podem apresentar defeito em alguma das fases da cicatrização. Apesar de estar consolidado que úlceras diabéticas estão estagnadas na fase inflamatória [73] é também relatado que a hiperglicemia pode impedir a cura afetando células cruciais em outras fases da cicatrização da ferida [90], dificultando a comparação pelo momento do tratamento. Essas diferenças podem ainda ser justificadas pela particularidade na resposta ao tratamento de cada participante, visto que os participantes podem ter várias comorbidades diferentes que influenciam na cicatrização. Outro fator que pode influenciar na prevenção e cicatrização da ferida é a prática do autocuidado pelo participante [187]. Além disso, os diferentes ambientes de pesquisa, equipe de projeto e profissionais da saúde podem impactar nos resultados obtidos. Isso pode ocorrer devido à forma de trabalho, práticas e experiências dos diferentes profissionais, por exemplo, ao desenvolver a educação em saúde, escolher a cobertura para a ferida e orientar sobre o autocuidado.

Durante a pesquisa, foi possível perceber o quanto essa mazela influenciava na qualidade de vida dos participantes, pois esses alegavam que a ferida os atrapalhava a trabalhar, passear, dirigir, caminhar, causava dependência de outras pessoas (física e financeiramente), estresse, entre outras coisas. Alguns participantes relataram ainda sobre os gastos que tinham para realizar as idas ao ambulatório para realizar as trocas de curativo. Alguns gastavam combustível, outros com passagens, outros ainda tinham gasto de tempo, pois moravam em outra cidade e tinham que sair muito cedo de casa para chegar a tempo da consulta. Foi possível perceber, através do acompanhamento dos participantes que as terapias proporcionadas pelo Rapha® (convencional e *plus*) são plenamente aplicáveis às pessoas de diferentes idades, níveis de escolaridade e classes sociais, desde que sejam instruídas adequadamente. A seguir são apresentadas algumas falas dos participantes de pesquisa do grupo GE2 (informação verbal).

“[...] foi impressionante e deixou todo mundo maravilhado. Foi muito rápida a cicatrização. No primeiro dia já senti uma melhoria incrível. No outro dia eu já estava sentindo a cura no meu pé.” (P6)

“Com esse projeto a minha ferida sarou rápido.” (P7)

“A minha ferida melhorou muito e estou muito feliz!” (P10)

“Em questão de 45 dias fechou totalmente a abertura. A abertura enorme ficou reduzida a uma pequena manchinha vermelha.” (P13)

Considerando os resultados do nosso estudo, o tratamento realizado com o GE2 (Rapha® *plus*) foi um sucesso, pois obtivemos resultados mais promissores do que com a terapia utilizada no SUS e que é considerada padrão ouro, além de termos percebido relatos dos participantes de pesquisa demonstrando boa aceitação e aplicabilidade da terapia. Destaca-se, ainda, que houve maior redução da úlcera no GE2 mesmo considerando que este grupo iniciou a pesquisa com a maior área média de ferida no D0 em relação aos demais grupos.

Isso foi notável tendo em vista que houve cicatrização total da ferida em dois de cinco participantes, e de 95% em um participante no GE2. Nos demais grupos, nenhum participante teve cicatrização completa. Ainda, no grupo tratado com Rapha® *plus* havia participantes que faziam uso de álcool e/ou tabaco, sendo os dois que apresentaram menor percentual de cicatrização, porém, ainda houve redução de mais de 60% de suas úlceras em 45 dias. Isso demonstra que a terapia com BLN, contendo lipossoma com curcumina, e LED foi mais efetiva do que quando se usou terapia de LED com apenas BLN. Provavelmente, o sucesso na cicatrização das feridas no grupo GE2 deve-se à presença de lipossomas com curcumina na BLN.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico da terapia Rapha® com a adição de lipossomas com curcumina na cicatrização de portadores de UPD. Essa avaliação teve por base a análise dos processos inflamatórios e de estresse oxidativo associados ao processo de cicatrização tecidual.

Neste trabalho não se identificou associação entre os parâmetros hematológicos e bioquímicos com o processo de inflamação e cicatrização das feridas nos tempos analisados. Também não foi encontrada relação entre os indicadores inflamatórios sistêmicos (leucócitos e subtipos, PCR e ERO) com o processo de cicatrização das feridas nos grupos experimentais.

Através das imagens e do cálculo de área da ferida, observou-se que o grupo tratado com BLN e LED (dispositivo Rapha®) promoveu uma cicatrização das feridas quase duas vezes maior do que o tratamento utilizado no SUS. Ainda, o grupo tratado com BLN contendo curcumina e LED (terapia Rapha® *plus*) induziu uma maior redução na área da ferida do que os demais grupos, sendo quatro vezes maior que o GC e duas vezes maior que o GE1, atingindo, em 40% dos casos, total cicatrização das úlceras crônicas.

Também não se observou relação entre nível de ERO no tecido e sangue da ferida com o processo de cicatrização nos momentos avaliados. Dessa forma, concluímos que o dispositivo Rapha® foi mais eficaz para a cicatrização de úlceras de pé diabético do que a terapia utilizada no SUS.

Como não foram observadas diferenças entre os marcadores inflamatórios nos tempos avaliados, sugere-se que novos estudos sejam feitos para investigar qual o mecanismo de ação da terapia combinada (látex contendo lipossomas com curcumina e LED) no processo de cicatrização de úlcera diabética. É importante que o processo de cicatrização e seus aspectos fisiopatológicos sejam avaliados em menores intervalos de tempo, sobretudo no começo dos tratamentos, e em uma maior população amostral. Ainda, sugere-se que as amostras da ferida sejam coletadas logo após a aplicação da terapia, buscando-se identificar alterações imediatamente após a realização do protocolo. Essas estratégias permitirão identificar em quais momentos ocorrem as variações nos marcadores inflamatórios e amenizar os vieses experimentais gerados pelas particularidades dos participantes, como comorbidades e hábitos de vida.

7 PRODUÇÕES ACADÊMICAS

- Protocolo de revisão sistemática publicado no Prospero (autora)
SANTANA, T. F.; LUZ, G. V. da S.; CASTRO GERMANO, E. L.; LOBO, G.; CARNEIRO, M. B. C. **Concomitant Use of Biomaterial, Phototherapy and Phytotherapy for Diabetics with Foot Ulcer: a Systematic Review.** 2019a. Disponível em: <https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?RecordID=126557>.
- Artigo científico submetido à revista *Research on Biomedical Engineering* (autora): *Dressing based in natural latex biomembranes has not changed their physical and chemical properties after exposure phototherapy*
- Artigo científico Ensaio Rapha – escrita em andamento (Revista *Annals of Biomedical Engineering*): *Regeneration of Diabetic Foot Ulcers Through Red LED Therapy and a Natural Latex Biomembrane from Hevea brasiliensis*
- Autora do capítulo do livro Interdisciplinaridade no contexto do pé diabético
SANTANA, T. F.; JOANITTI, G. A.; CASTRO GERMANO, E. L.; LEITE GERMANO, R. N.; ESPINDOLA, T. A.; FERREIRA, L. S.; LUZ, G. V. da S.; FLEURY ROSA, M. F.; ROSA, S. R. F.; CARNEIRO, M. L. B. *Rapha® – Sistema Móvel de Neoformação Tecidual.* In: **INTERDISCIPLINARIDADE NO CONTEXTO DO PÉ DIABÉTICO: Tratamentos Clínicos, Políticas Públicas e Tecnologias em Saúde.** [s.l: s.n.].
- Coautora no capítulo do livro Nanotecnologia: considerações em materiais, saúde e meio ambiente
CARNEIRO, M. B. C.; LUZ, G. V. da S.; QUIJIA, C. R. Q.; SANTANA, T. F.; CARVALHO, L. A. N.; BRASIL, L. M. Nanotecnologia aplicada para tratamentos de cicatrização e regeneração tecidual. In: EDITORA UNB (Ed.). **Nanotecnologia: Considerações Em Materiais, Saúde E Meio Ambiente. Parte II – Aplicações Em Saúde.** Brasília/DF.
- Participação e publicação de resumo em *5th International Conference on Nanoscience, Nanotechnology and Nanobiotechnology - 3NANO*
SANTANA, T. F.; LUZ, G. V. da S.; LÔBO, G. de C. N. B.; CARNEIRO, M. L. B. Liposomes use in diabetic wounds treatment: a systematic review. In: 5 TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON NANOSCIENCE, NANOTECHNOLOGY AND NANOBIO TECHNOLOGY 2019b, Brasilia. **Anais...** Brasilia Disponível em: <https://5e3e27d4-8c21-4c88-b189-b90119043acb.filesusr.com/ugd/faa1f9_b330877268c54fc38ecb1bdab11e3139.pdf>

- Minicurso ministrado: Pesquisa e gerenciamento de referências bibliográficas (Semana Universitária, setembro/2019)
- Monitoria na disciplina Fundamentos de Metodologia Científica do Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica (PPGEB)
- Participação no Ensaio Clínico Rapha 2019/2020.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] B.B. Aggarwal, K.B. Harikumar, Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 40–59.
- [2] B.B. Aggarwal, B. Sung, Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets, *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (2009) 85–94.
- [3] Z.P. Aguilar, Types of Nanomaterials and Corresponding Methods of Synthesis, in: Z.P.B.T.-N. for M.A. Aguilar (Ed.), *Nanomater. Med. Appl.*, Elsevier, 2013: pp. 33–82.
- [4] J. Ahmad, The diabetic foot, *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 10 (2016) 48–60.
- [5] D. Akbik, M. Ghadiri, W. Chrzanowski, R. Rohanzadeh, Curcumin as a wound healing agent, *LIFE Sci.* 116 (2014) 1–7.
- [6] A.N. Al-Shura, Immune System 1, in: *Hematol. Tradit. Chinese Med. Cardiol.*, Elsevier, 2014: pp. 29–31.
- [7] B.N. Alamri, A. Bahabri, A.A. Aldereihim, M. Alabduljabbar, M.M. Alsubaie, D. Alnaqeb, E. Almogbel, N.S. Metias, O.A. Alotaibi, K. Al-Rubeaan, Hyperglycemia effect on red blood cells indices, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 23 (2019) 2139–2150.
- [8] A. Alavi, R.G. Sibbald, D. Mayer, L. Goodman, M. Botros, D.G. Armstrong, K. Woo, T. Boeni, E.A. Ayello, R.S. Kirsner, Diabetic foot ulcers: Part I. Pathophysiology and prevention, *J. Am. Acad. Dermatol.* 70 (2014) 1.e1-1.e18.
- [9] A. Alavi, R.G. Sibbald, D. Mayer, L. Goodman, M. Botros, D.G. Armstrong, K. Woo, T. Boeni, E.A. Ayello, R.S. Kirsner, Diabetic foot ulcers: Part I. Pathophysiology and prevention, *J. Am. Acad. Dermatol.* 70 (2014) 1.e1-1.e18.
- [10] A. AlGoblan, I. Alrasheedi, K. Haider, O. Basheir, Prediction of diabetic foot ulcer healing in type 2 diabetic subjects using routine clinical and laboratory parameters, *Res. Reports Endocr. Disord.* (2016) 11.
- [11] S. Alkayyali, V. Lyssenko, Genetics of diabetes complications, *Mamm. Genome.* 25 (2014) 384–400.
- [12] L. Allen, G. Powell-Cope, A. Mbah, T. Bulat, E. Njoh, A Retrospective Review of Adverse Events Related to Diabetic Foot Ulcers., *Ostomy. Wound. Manage.* 63 (2017) 30–33.
- [13] N. Amin, J. Doupis, Diabetic foot disease: From the evaluation of the “foot at risk” to

- the novel diabetic ulcer treatment modalities, *World J. Diabetes.* 7 (2016) 153.
- [14] J.J. Anders, *Photobiomodulation*, (2016).
- [15] T.A.M. Andrade, *Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração do látex da seringueira Hevea brasiliensis na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos*, Universidade de São Paulo, 2012.
- [16] A.C. Apolinário, J. De Almeida Pachioni-Vasconcelos, A. Pessoa, C. De Oliveira Rangel-Yagui, *Polimerossomos Versus Lipossomos: A Evolução Da “bala Mágica,”* *Quim. Nova.* 40 (2017) 810–817.
- [17] P. Aramwit, *Introduction to biomaterials for wound healing*, in: M.S.B.T.-W.H.B. Ågren (Ed.), Woodhead Publishing, 2016: pp. 3–38.
- [18] M.M. Araujo, E.T. Massuda, M.A. Hyppolito, *Avaliação anatômica e funcional da timpanoplastia com a utilização de implante transitório de biomembrana natural de látex proveniente da seringueira Hevea brasiliensis*, *Acta Cir. Bras.* 27 (2012) 566–571.
- [19] D. Baltzis, I. Eleftheriadou, A. Veves, *Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights*, *Adv. Ther.* 31 (2014) 817–836.
- [20] N.R. Barshes, M. Sigireddi, J.S. Wrobel, A. Mahankali, J.M. Robbins, P. Koungias, D.G. Armstrong, *The system of care for the diabetic foot: Objectives, outcomes, and opportunities*, *Diabet. Foot Ankle.* 4 (2013).
- [21] K. Berg, M. Ericsson, M. Lindgren, H. Gustafsson, *A high precision method for quantitative measurements of reactive oxygen species in frozen biopsies*, *PLoS One.* 9 (2014).
- [22] Brasil. Ministério Da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica., *Manual do pé diabético: estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica / Diabetic foot manual: strategies for the care of the person with chronic disease.*, Brasília, 2016.
- [23] Brasil. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças, N. Transmissíveis., *Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*, Brasília, 2019.
- [24] Brasil. Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa., *Vigitel Brasil 2010: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*, Brasília, 2011.
- [25] M. da S.S. de P. de S.D. de A.B. BRASIL, *Manual de Conduas para Úlceras Neurotróficas e Traumáticas*, BRAsília: Ministério da Saúde, 2002.
- [26] D.W. Braza, J.N.Y. Martin, *Diabetic Foot and Peripheral Arterial Disease*, in: W.R. Frontera, J.K. Silver, T.D.B.T.-E. of P.M. and R. (Fourth E. Rizzo (Eds.), *Essentials Phys. Med. Rehabil. - Musculoskelet. Disord. Pain, Rehabil.*, 4th ed., Content

- Repository Only!, Philadelphia, 2020: pp. 719–723.
- [27] R.J. Brouwer, R.C. Laliou, R. Hoencamp, R.A. van Hulst, D.T. Ubbink, A systematic review and meta-analysis of hyperbaric oxygen therapy for diabetic foot ulcers with arterial insufficiency, *J. Vasc. Surg.* 71 (2020) 682+.
- [28] M. Brownlee, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*. 414 (2001) 813–820.
- [29] M. Brownlee, The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism, in: *Diabetes*, American Diabetes Association, 2005: pp. 1615–1625.
- [30] M.C. Calle, M.L. Fernandez, Inflammation and type 2 diabetes, *Diabetes Metab.* 38 (2012) 183–191.
- [31] F.A. Carvalho, H.S. Uchina, F.A. Borges, M.H. Oyafuso, R.D. Herculano, M.P.D. Gremião, A.G. Santos, Natural membranes of *Hevea brasiliensis* latex as delivery system for *Casearia sylvestris* leaf components, *Rev. Bras. Farmacogn.* 28 (2018) 102–110.
- [32] T. Carvalho, G. Guedes, F.L. Sousa, C.S.R. Freire, H.A. Santos, Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Materials for Wound Healing, Delivery Systems, and Tissue Engineering, *Biotechnol. J.* 14 (2019) 1900059.
- [33] S. Chaffee, A. Das, S. Santra, S. Roy, Diabetic Wound Inflammation, in: *Nutr. Ther. Interv. Diabetes Metab. Syndr.*, Elsevier, 2018: pp. 269–278.
- [34] I. Chattopadhyay, K. Biswas, U. Bandyopadhyay, R.K. Banerjee, *Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications*, 2004.
- [35] M.E. de A. Chaves, A.C.C. Piancastelli, A.R. de Araújo, M. Pinotti, Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED, *An. Bras. Dermatol.* 89 (2014) 616–623.
- [36] R. Cheng, L. Liu, Y. Xiang, Y. Lu, L. Deng, H. Zhang, H.A. Santos, W. Cui, Advanced liposome-loaded scaffolds for therapeutic and tissue engineering applications, *Biomaterials*. 232 (2020) 119706.
- [37] S. Chhibber, J. Kaur, S. Kaur, Liposome Entrapment of Bacteriophages Improves Wound Healing in a Diabetic Mouse MRSA Infection, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 561.
- [38] S. Choi, S. Chang, R. Biswas, P. Chung, S. Mo, M.Y. Lee, J.C. Ahn, Light-emitting diode irradiation using 660 nm promotes human fibroblast HSP90 expression and changes cellular activity and morphology, *J. Biophotonics*. 12 (2019).
- [39] D. Chouhan, B.B. Mandal, Silk biomaterials in wound healing and skin regeneration therapeutics: From bench to bedside, *Acta Biomater.* 103 (2020) 24–51.
- [40] C.M. Clark, D.A. Lee, Prevention and Treatment of the Complications of Diabetes Mellitus, *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 1210–1217.

- [41] Y.L. Colson, M.W. Grinstaff, Biologically Responsive Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery, *Adv. Mater.* 24 (2012) 3878–3886.
- [42] A. Dasgupta, K. Klein, Diabetes and Oxidative Stress, in: A. Dasgupta, K.B.T.-A. in F. Klein Vitamins and Supplements (Eds.), Elsevier, San Diego, 2014: pp. 151–166.
- [43] J. Dissemond, M. Goos, S.N. Wagner, Die bedeutung von oxidativem stress in der genese und therapie chronischer wunden, *Hautarzt.* 53 (2002) 718–723.
- [44] A.L.A. Domingos, S. Tucci, S.B. Garcia, J. de Bessa, A.J. Cologna, A.C.P. Martins, Use of a latex biomembrane for bladder augmentation in a rabbit model: Biocompatibility, clinical and histological outcomes, *Int. Braz J Urol.* 35 (2009) 217–226.
- [45] J. Dong, D. Xiong, Applications of Light Emitting Diodes in Health Care, *Ann. Biomed. Eng.* 45 (2017) 2509–2523.
- [46] N. Duarte, A. Gonçalves, A. De Revisão, Pé diabético Diabetic foot, 2011.
- [47] D.M. Eastman, M.A. Dreyer, Neuropathic Ulcer, in: StatPearls [Internet], StatPearls Publishing, 2020.
- [48] A.M. Egan, S.F. Dinneen, What is diabetes?, *Med. (United Kingdom).* 47 (2019) 1–4.
- [49] W.M. El-Refaie, Y.S.R. Elnaggar, M.A. El-Massik, O.Y. Abdallah, Novel curcumin-loaded gel-core hyalurosomes with promising burn-wound healing potential: Development, in-vitro appraisal and in-vivo studies, *Int. J. Pharm.* 486 (2015) 88–98.
- [50] M. Evans, A.R. Morgan, D. Patel, K. Dhatariya, S. Greenwood, P. Newland-Jones, D. Hicks, Z. Yousef, J. Moore, B. Kelly, S. Davies, U. Dashora, Risk Prediction of the Diabetes Missing Million: Identifying Individuals at High Risk of Diabetes and Related Complications, *Diabetes Ther.* (2020) 1–19.
- [51] E. Everett, N. Mathioudakis, Update on management of diabetic foot ulcers, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1411 (2018) 153–165.
- [52] H.S.C. Fabre, R.L. Navarro, P.V.P. Oltramari-Navarro, R.F. Oliveira, D.A.A. Pires-Oliveira, R.A.C. Andraus, N. Fuirini, K.B.P. Fernandes, Anti-inflammatory and analgesic effects of low-level laser therapy on the postoperative healing process, *J. Phys. Ther. Sci.* 27 (2015) 1645–1648.
- [53] V. Falanga, Wound healing and its impairment in the diabetic foot, *Lancet.* 366 (2005) 1736–1743.
- [54] D.Q. Falcão, A.P. Oliveira, B.G. Lima, A.C.A. Cardoso, K.B. Almeida, T.C. Santos, L.M. Nascimento, G.C. Desmarais, P.S. Sanches, E.M. Araújo, S.C. Mourão, Nanotechnology in phytotherapy: Current challenges of lipid-based nanocarriers for the delivery of natural products, in: A.M.B.T.-L.N. for D.T. Grumezescu (Ed.), *Lipid Nanocarriers Drug Target.*, William Andrew Publishing, 2018: pp. 139–174.

- [55] C.C. Falzon, A. Balabanova, *Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine*, *Prim. Care Clin. Off. Pract.* 44 (2017) 217–227.
- [56] A.P. Fernandez, M. Mitiva, B. Roberts, C. Ricotti, P. Rouhani, P. Romanelli, Histopathologic analysis of dermal lymphatic alterations in chronic venous insufficiency ulcers using D2-40, *J. Am. Acad. Dermatol.* 64 (2011) 1123.e1-1123.e12.
- [57] C.L.R. Ferreira, R.A. Nicolau, M.A. de Oliveira, D.R. Costa, A.C.G.P. Júnior, Efeito da terapia LED ($\lambda = 945 \pm 20$ nm) de baixa intensidade sobre tecido epitelial de ratos diabéticos em processo de reparo, *Rev. Bras. Eng. Biomed.* 29 (2013) 404–413.
- [58] M. Ferreira, R.J. Mendonça, J. Coutinho-Netto, M. Mulato, Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*, *Brazilian J. Phys.* 39 (2009) 564–569.
- [59] M.A.C. Frade, Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*, Universidade de São Paulo, 2003.
- [60] M.A.C. Frade, I. Brum Cursi, F. Fortes Andrade, J. Coutinho Netto, F. Magalhães Barbeta, N.T. Foss, Management of Diabetic Skin Wounds with a Natural Latex Biomembrane Manejo de úlceras cutâneas diabéticas com a biomembrana natural de látex, 2004.
- [61] M.A.C. Frade, R.V. Valverde, R.V.C. de Assis, J. Coutinho-Netto, N.T. Foss, Chronic phlebopathic cutaneous ulcer: a therapeutic proposal, *Int. J. Dermatol.* 40 (2001) 238–240.
- [62] I. Frangež, T. Nizič-Kos, H.B. Frangež, Phototherapy with LED Shows Promising Results in Healing Chronic Wounds in Diabetes Mellitus Patients: A Prospective Randomized Double-Blind Study, *Photomed. Laser Surg.* 36 (2018) 377–382.
- [63] T. Fukui, A.T. Kawaguchi, S. Takekoshi, M. Miyasaka, H. Sumiyoshi, R. Tanaka, Liposome-Encapsulated Hemoglobin Accelerates Skin Wound Healing in Diabetic dB/dB Mice, *Artif. Organs.* 41 (2017) 319–326.
- [64] B.C. Garms, F.A. Borges, N.R. de Barros, M.Y. Marcelino, M.N. Leite, M.C. Del Arco, S.L. de Souza Salvador, G.S. Pegorin, K.S.M. Oliveira, M.A.C. Frade, R.D. Herculano, Novel polymeric dressing to the treatment of infected chronic wound, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2019) 4767–4778.
- [65] M. Ghaemi, D. Sharifi, S. Mokmeli, G. Kowsari, P. Mortazavi, P. Golmai, Y. Hospital, Comparison and Evaluation of the Low-Level Laser and the Red and Blue LED Effects on Wound Healing in Rabbit, *Laser Appl. Med. Sci. Res. Cent.* 10 (2019) 189–193.
- [66] K. Gowthamarajan, V. Venkata Satyanarayana Reddy Karri, S.M. Kumar, R. Malayandi, Multiple Biological Actions of Curcumin in the Management of Diabetic Foot Ulcer Complications: A Systematic Review, (2015).

- [67] D.T. Graves, R. Liu, M. Alikhani, H. Al-Mashat, P.C. Trackman, Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis--impact on periodontal pathology., *J. Dent. Res.* 85 (2006) 15–21.
- [68] S. Guo, L.A. DiPietro, Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing, *J. Dent. Res.* 89 (2010) 219–229.
- [69] M. Halim, A. Halim, The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes), *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 13 (2019) 1165–1172.
- [70] R.L. Hamm, P. Scarborough, Neuropathic Ulcers, in: M.H. Cameron, L.G.B.T.-P.R. Monroe (Eds.), *Phys. Rehabil. Evidence-Based Exam. Eval. Interv.*, W.B. Saunders, Saint Louis, 2007: pp. 803–827.
- [71] F. Hanses, S. Park, J. Rich, J.C. Lee, Reduced neutrophil apoptosis in diabetic mice during staphylococcal infection leads to prolonged Tnfa production and reduced neutrophil clearance, *PLoS One.* 6 (2011).
- [72] V. Heiskanen, M.R. Hamblin, Photobiomodulation: Lasers: vs. light emitting diodes?, *Photochem. Photobiol. Sci.* 17 (2018) 1003–1017.
- [73] P.J. Hennessey, E.G. Ford, C.T. Black, R.J. Andrassy, Wound collagenase activity correlates directly with collagen glycosylation in diabetic rats, *J. Pediatr. Surg.* 25 (1990) 75–78.
- [74] J.D. Hoekman, P. Srivastava, R.J.Y. Ho, Aerosol-Stable Peptide-Coated Liposome Nanoparticles: A Proof-of-Concept Study with Opioid Fentanyl in Enhancing Analgesic Effects and Reducing Plasma Drug Exposure, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 2231–2239.
- [75] J.P. Hong, H.D. Jung, Y.W. Kim, Recombinant Human Epidermal Growth Factor (EGF) to Enhance Healing for Diabetic Foot Ulcers, *Ann. Plast. Surg.* 56 (2006) 394–398.
- [76] N.N. Houreld, Shedding Light on a New Treatment for Diabetic Wound Healing: A Review on Phototherapy, (2014).
- [77] X. Huang, P. Liang, B. Jiang, P. Zhang, W. Yu, M. Duan, L. Guo, X. Cui, M. Huang, X. Huang, Hyperbaric oxygen potentiates diabetic wound healing by promoting fibroblast cell proliferation and endothelial cell angiogenesis, *Life Sci.* 259 (2020) 118246.
- [78] International Diabetes Federation, International Diabetes Federation - What is diabetes, IDF. (2018).
- [79] International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas 9th edition 2019, Int. Diabetes Fed. Diabetes Atlas, Ninth Ed. (2019) 1–176.
- [80] A.L. Isaac, D.G. Armstrong, Negative Pressure Wound Therapy and Other New Therapies for Diabetic Foot Ulceration: The Current State of Play, *Med. Clin. North*

- Am. 97 (2013) 899–909.
- [81] M.M. Islam, M. Shahruzzaman, S. Biswas, M. Nurus Sakib, T.U. Rashid, Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications-A review, *Bioact. Mater.* 5 (2020) 164–183.
- [82] G.C. Jagetia, G.K. Rajanikant, Acceleration of wound repair by curcumin in the excision wound of mice exposed to different doses of fractionated γ radiation, *Int. Wound J.* 9 (2012) 76–92.
- [83] T.J. James, M.A. Hughes, G.W. Cherry, R.P. Taylor, Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers, *Wound Repair Regen.* 11 (2003) 172–176.
- [84] B. Joe, M. Vijaykumar, B.R. Lokesh, Biological Properties of Curcumin-Cellular and Molecular Mechanisms of Action, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (2004) 97–111.
- [85] B.M. Kajagar, A.S. Godhi, A. Pandit, S. Khatri, Efficacy of Low Level Laser Therapy on Wound Healing in Patients with Chronic Diabetic Foot Ulcers-A Randomised Control Trial, *Indian J. Surg.* 74 (2012) 359–363.
- [86] M.R. Kaminski, A. Raspovic, L.P. McMahon, G.F.M. Strippoli, S.C. Palmer, M. Ruospo, S. Dallimore, K.B. Landorf, Risk factors for foot ulceration and lower extremity amputation in adults with end-stage renal disease on dialysis: A systematic review and meta-analysis, *Nephrol. Dial. Transplant.* 30 (2015) 1747–1766.
- [87] A. Kanda, Y. Yasutaka, D. van Bui, K. Suzuki, S. Sawada, Y. Kobayashi, M. Asako, H. Iwai, Multiple biological aspects of eosinophils in host defense, eosinophil-associated diseases, immunoregulation, and homeostasis: Is their role beneficial, detrimental, regulator, or bystander?, *Biol. Pharm. Bull.* 43 (2020) 20–30.
- [88] V. Kant, A. Gopal, D. Kumar, N.N. Pathak, M. Ram, B.L. Jangir, S.K. Tandan, D. Kumar, Curcumin-induced angiogenesis hastens wound healing in diabetic rats., *J. Surg. Res.* 193 (2015) 978–988.
- [89] V. Kant, A. Gopal, N.N. Pathak, P. Kumar, S.K. Tandan, D. Kumar, Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats, *Int. Immunopharmacol.* 20 (2014) 322–330.
- [90] L.N. Kasiewicz, K.A. Whitehead, Recent advances in biomaterials for the treatment of diabetic foot ulcers, *Biomater. Sci.* 5 (2017) 1962–1975.
- [91] A. Kaviani, G.E. Djavid, L. Ataie-Fashtami, M. Fateh, M. Ghodsi, M. Salami, N. Zand, N. Kashef, B. Larijani, A randomized clinical trial on the effect of low-level laser therapy on chronic diabetic foot wound healing: A preliminary report, *Photomed. Laser Surg.* 29 (2011) 109–114.
- [92] M.H. Kim, W. Liu, D.L. Borjesson, F.R.E. Curry, L.S. Miller, A.L. Cheung, F.T. Liu, R.R. Isseroff, S.I. Simon, Dynamics of neutrophil infiltration during cutaneous wound healing and infection using fluorescence imaging, *J. Invest. Dermatol.* 128 (2008) 1812–1820.

- [93] S.S. Kordestani, Diabetic Foot Ulcers, in: S.S.B.T.-A. of W.H. Kordestani (Ed.), Atlas Wound Heal. A Tissue Regen. Approach, Elsevier, 2019: pp. 77–99.
- [94] S.S. Kordestani, Wound Healing Process, in: S.S.B.T.-A. of W.H. Kordestani (Ed.), Atlas Wound Heal. A Tissue Regen. Approach, Elsevier, 2019: pp. 11–22.
- [95] J.C. Kraft, J.P. Freeling, Z. Wang, R.J.Y. Ho, Emerging Research and Clinical Development Trends of Liposome and Lipid Nanoparticle Drug Delivery Systems, *J. Pharm. Sci.* 103 (2014) 29–52.
- [96] T. Krupp, B.D. dos Santos, L.A. Gama, J.R. Silva, W.W. Arrais-Silva, N.C. de Souza, M.F. Américo, P.C. de Souza Souto, Natural rubber - propolis membrane improves wound healing in second-degree burning model, *Int. J. Biol. Macromol.* 131 (2019) 980–988.
- [97] D.P. Kuffler, Photobiomodulation in promoting wound healing: A review, *Regen. Med.* 11 (2016) 107–122.
- [98] A. Kumar, A. Ahuja, J. Ali, & Sanjula Baboota, Conundrum and Therapeutic Potential of Curcumin in Drug Delivery, 2010.
- [99] B. Kunkemoeller, T.R. Kyriakides, Redox Signaling in Diabetic Wound Healing Regulates Extracellular Matrix Deposition, *Antioxidants Redox Signal.* 27 (2017) 823–838.
- [100] B. Kunkemoeller, T.R. Kyriakides, Redox Signaling in Diabetic Wound Healing Regulates Extracellular Matrix Deposition, *Antioxidants Redox Signal.* 27 (2017) 823–838.
- [101] S.A. Lamel, R.S. Kirsner, New approaches to enhanced wound healing: Future modalities for chronic venous ulcers, *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 10 (2013) e71–e77.
- [102] Z. Landau, M. Migdal, A. Lipovsky, R. Lubart, Visible light-induced healing of diabetic or venous foot ulcers: A placebo-controlled double-blind study, *Photomed. Laser Surg.* 29 (2011) 399–404.
- [103] K.L. Lane, M.S. Abusamaan, B.F. Voss, E.G. Thurber, N. Al-Hajri, S. Gopakumar, J.T. Le, S. Gill, J. Blanck, L. Prichett, C.W. Hicks, R.L. Sherman, C.J. Abularrage, N.N. Mathioudakis, Glycemic control and diabetic foot ulcer outcomes: A systematic review and meta-analysis of observational studies, *J. Diabetes Complications.* 34 (2020) 107638.
- [104] G.S. Lazarus, D.M. Cooper, D.R. Knighton, D.J. Margolis, R.E. Percoraro, G. Rodeheaver, M.C. Robson, Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing, *Wound Repair Regen.* 2 (1994) 165–170.
- [105] J.H. Lee, S.J. Jekal, P.S. Kwon, The effect of 630nm light emitting diode (LED) irradiation on dermal wound healing, *Physiotherapy.* 101 (2015) e847.

- [106] S. Li, C. Wang, B. Wang, L. Liu, L. Tang, D. Liu, G. Yang, L. Zhang, Efficacy of low-level light therapy for treatment of diabetic foot ulcer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, (2018).
- [107] F.J.C. de Lima, F.T. Barbosa, C.F. de Sousa-Rodrigues, Use alone or in Combination of Red and Infrared Laser in Skin Wounds., *J. Lasers Med. Sci.* 5 (2014) 51–7.
- [108] A. López-Delis, S. de S. Rodrigues Fleury Rosa, P.E.N. de Souza, M.L.B. Carneiro, M.F.F. Rosa, Y.C.L. Macedo, F.H. Veiga-Souza, A.F. da Rocha, Characterization of the Cicatrization Process in Diabetic Foot Ulcers Based on the Production of Reactive Oxygen Species, *J. Diabetes Res.* 2018 (2018) 1–10.
- [109] A. López-Delis, S. de S Rodrigues Fleury Rosa, P.E.N. de Souza, M.L.B. Carneiro, M.F.F. Rosa, Y.C.L. Macedo, F.H. Veiga-Souza, A.F. da Rocha, Characterization of the Cicatrization Process in Diabetic Foot Ulcers Based on the Production of Reactive Oxygen Species, *J. Diabetes Res.* 2018 (2018) 4641364.
- [110] M. Loredana Marcovecchio, M. Lucantoni, F. Chiarelli, Reviews Role of Chronic and Acute Hyperglycemia in the Development of Diabetes Complications, (n.d.).
- [111] C. De Loura Santana, D. De Fátima Teixeira Silva, A.M. Deana, R.A. Prates, A.P. Souza, M.T. Gomes, B.P. De Azevedo Sampaio, J.F. Shibuya, S.K. Bussadori, R.A. Mesquita-Ferrari, K.P.S. Fernandes, C.M. França, Tissue responses to postoperative laser therapy in diabetic rats submitted to excisional wounds, *PLoS One.* 10 (2015).
- [112] M. Majumdar, S. Shivalkar, A. Pal, M.L. Verma, A.K. Sahoo, D.N. Roy, Nanotechnology for enhanced bioactivity of bioactive compounds, in: M.L. Verma, A.K.B.T.-B.P. of B.C. Chandel (Eds.), *Biotechnol. Prod. Bioact. Compd.*, Elsevier, 2020: pp. 433–466.
- [113] D. Martins-Mendes, M. Monteiro-Soares, E.J. Boyko, M. Ribeiro, P. Barata, J. Lima, R. Soares, The independent contribution of diabetic foot ulcer on lower extremity amputation and mortality risk, *J. Diabetes Complications.* 28 (2014) 632–638.
- [114] M.F. Medellín-Luna, J.E. Castañeda-Delgado, V.Y. Martínez-Balderas, A.R. Cervantes-Villagrana, Medicinal Plant Extracts and Their Use As Wound Closure Inducing Agents, *J. Med. Food.* 22 (2019) 435–443.
- [115] C.A.V. de Melo, A.N. Alves, S.M.L. Terena, K.P.S. Fernandes, F.D. Nunes, D. de F.T. da Silva, S.K. Bussadori, A.M. Deana, R.A. Mesquita-Ferrari, Light-emitting diode therapy increases collagen deposition during the repair process of skeletal muscle, *Lasers Med. Sci.* 31 (2016) 531–538.
- [116] R.J. Mendonça, V.B. Maurício, L. De Bortolli Teixeira, J.J. Lachat, J. Coutinho-Netto, Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*, *Phyther. Res.* 24 (2010) 764–768.
- [117] L. Meng, X. Guo, X. Yang, H. Liu, M. Yu, Y. Wu, Z. Zhu, Human α defensins promote

- the expression of the inflammatory cytokine interleukin-8 under high-glucose conditions: Novel insights into the poor healing of diabetic foot ulcers, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 33 (2019).
- [118] J.G. Merrell, S.W. McLaughlin, L. Tie, C.T. Laurencin, A.F. Chen, L.S. Nair, Curcumin-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanofibres: Diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36 (2009) 1149–1156.
- [119] M.D. Mesa-Garcia, J. Plaza-Diaz, C. Gomez-Llorente, Chapter 3 - Molecular Basis of Oxidative Stress and Inflammation, in: A.M. del Moral, C.M.B.T.-O. Aguilera García (Eds.), Academic Press, 2018: pp. 41–62.
- [120] Q. Mi, B. Rivière, G. Clermont, D.L. Steed, Y. Vodovotz, Agent-based model of inflammation and wound healing: insights into diabetic foot ulcer pathology and the role of transforming growth factor- β 1, *Wound Repair Regen.* 15 (2007) 671–682.
- [121] D.G. Minatel, M.A.C. Frade, S.C. França, C.S. Enwemeka, Phototherapy promotes healing of chronic diabetic leg ulcers that failed to respond to other therapies, *Lasers Surg. Med.* 41 (2009) 433–441.
- [122] A.J. Minor, K.L.K. Coulombe, Engineering a collagen matrix for cell-instructive regenerative angiogenesis, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* (2020) jbm.b.34573.
- [123] A.R. Mohammed, N. Weston, A.G.A. Coombes, M. Fitzgerald, Y. Perrie, Liposome formulation of poorly water soluble drugs: Optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability, *Int. J. Pharm.* 285 (2004) 23–34.
- [124] C. Mohanty, S.K. Sahoo, Curcumin and its topical formulations for wound healing applications, *Drug Discov. Today.* 22 (2017) 1582–1592.
- [125] S. Mohseni, M. Aalaa, R. Atlasi, M.R. Mohajeri Tehrani, M. Sanjari, M.R. Amini, The effectiveness of negative pressure wound therapy as a novel management of diabetic foot ulcers: an overview of systematic reviews, *J. Diabetes Metab. Disord.* 18 (2019) 625–641.
- [126] M. Momen-Heravi, E. Barahimi, R. Razzaghi, F. Bahmani, H.R. Gilasi, Z. Asemi, The effects of zinc supplementation on wound healing and metabolic status in patients with diabetic foot ulcer: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Wound Repair Regen.* 25 (2017) 512–520.
- [127] M. Monteiro-Soares, E.J. Boyko, W. Jeffcoate, J.L. Mills, D. Russell, S. Morbach, F. Game, Diabetic foot ulcer classifications: A critical review, *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 36 (2020) 1–16.
- [128] A. Moura Neto, D.E. Zantut-Wittmann, T.D. Fernandes, M. Nery, M.C.R. Parisi, Risk factors for ulceration and amputation in diabetic foot: Study in a cohort of 496 patients, *Endocrine.* 44 (2013) 119–124.

- [129] P.W. Moxey, P. Gogalniceanu, R.J. Hinchliffe, I.M. Loftus, K.J. Jones, M.M. Thompson, P.J. Holt, Lower extremity amputations - a review of global variability in incidence, *Diabet. Med.* 28 (2011) 1144–1153.
- [130] F. Mrue, J.C. Netto, R. Ceneviva, J.J. Lachat, J.A. Thomazini, H. Tambelini, Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane, *Mater. Res.* 7 (2004) 277–283.
- [131] K. Muniandy, S. Gothai, P. Arulselvan, S.S. Kumar, M.E. Norhaizan, A. Umamaheswari, S. Fakurazi, Mini Review: Wound healing potential of edible plants., *Pak. J. Pharm. Sci.* 32 (2019) 703–707.
- [132] M. Mushlih, Difference of Red Blood Cell Count (RBC) Levels in Diabetes Mellitus Type II with Ulcers and without Ulcers, *J. Ris. Biol. Dan Apl.* 2 (2020) 6.
- [133] M. Nasrollahzadeh, S.M. Sajadi, M. Sajjadi, Z. Issaabadi, Applications of Nanotechnology in Daily Life, in: M. Nasrollahzadeh, S.M. Sajadi, M. Sajjadi, Z. Issaabadi, M.B.T.-I.S. and T. Atarod (Eds.), *An Introd. to Green Nanotechnol.*, Elsevier, 2019: pp. 113–143.
- [134] T.T. Nguyen, D. Ding, W.R. Wolter, M.M. Champion, D. Heseck, M. Lee, R.L. Pérez, V.A. Schroeder, M.A. Suckow, S. Mobashery, M. Chang, Expression of active matrix metalloproteinase-9 as a likely contributor to the clinical failure of aclelastide in treatment of diabetic foot ulcers, *Eur. J. Pharmacol.* 834 (2018) 77–83.
- [135] T.T. Nguyen, S. Mobashery, M. Chang, Roles of Matrix Metalloproteinases in Cutaneous Wound Healing, in: *Wound Heal. - New Insights into Anc. Challenges*, InTech, 2016.
- [136] E. Nichols, Wound assessment part 1 : how to measure a wound, 10 (2015) 51–55.
- [137] A. Nouvong, A.M. Ambrus, E.R. Zhang, L. Hultman, H.A. Collier, Reactive oxygen species and bacterial biofilms in diabetic wound healing, *Physiol. Genomics.* 48 (2016) 889–896.
- [138] G.A.M. de A. Nunes, M. do C. dos Reis, M.F.F. Rosa, L.R.T. Peixoto, A.F. da Rocha, S. de S.R.F. Rosa, G. Adolfo, M. De, A. Nunes, M. Do Carmo, D. Reis, M. Fabrício, F. Rosa, L. Roberta, T. Peixoto, A. Ferreira Da Rocha, S. De, S. Rodrigues, G.A.M. de A. Nunes, M. do C. dos Reis, M.F.F. Rosa, L.R.T. Peixoto, A.F. da Rocha, S. de S.R.F. Rosa, G.A.M. de A. Nunes, M. do C. dos Reis, M.F.F. Rosa, L.R.T. Peixoto, A.F. da Rocha, S. de S.R.F. Rosa, A system for treatment of diabetic foot ulcers using led irradiation and natural latex, *Res. Biomed. Eng.* 32 (2016) 3–13.
- [139] I. Oesman, W. Dhamar Hutami, Gamma-treated placental amniotic membrane allograft as the adjuvant treatment of unresponsive diabetic ulcer of the foot, *Int. J. Surg. Case Rep.* 66 (2020) 313–318.
- [140] C.F. Packer, B. Manna, *Diabetic Ulcer*, StatPearls Publishing, 2020.
- [141] S.L. Percival, K.E. Hill, D.W. Williams, S.J. Hooper, D.W. Thomas, J.W. Costerton, A

- review of the scientific evidence for biofilms in wounds, *Wound Repair Regen.* 20 (2012) 647–657.
- [142] B.B. Petrovska, Historical review of medicinal plants' usage, *Pharmacogn. Rev.* 6 (2012) 1–5.
- [143] T.T. Phan, P. See, S.T. Lee, S.Y. Chan, Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing, *J. Trauma.* 51 (2001) 927–931.
- [144] E.C.C.M. De Pinho, S.J. De Faria E Sousa, F. Schaud, J.J. Lachat, J. Coutinho-Netto, Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival, *Arq. Bras. Oftalmol.* 67 (2004) 27–32.
- [145] M. Pitorre, H. Gondé, C. Haury, M. Messous, J. Poilane, D. Boudaud, E. Kanber, G.A. Rossemond Ndombina, J.-P. Benoit, G. Bastiat, Recent advances in nanocarrier-loaded gels: Which drug delivery technologies against which diseases?, *J. Control. Release.* 266 (2017) 140–155.
- [146] A. Qayoom, V.A. Aneesha, S. Anagha, J.A. Dar, P. Kumar, D. Kumar, Lecithin-based deferoxamine nanoparticles accelerated cutaneous wound healing in diabetic rats, *Eur. J. Pharmacol.* 858 (2019) 172478.
- [147] C. Qing, The molecular biology in wound healing & non-healing wound, *Chinese J. Traumatol. - English Ed.* 20 (2017) 189–193.
- [148] S.S. Rao, J. Venkatesan, A. Prabhu, P.D. Rekha, Natural polymeric biomaterials in growth factor delivery for treating diabetic foot ulcers, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 55 (2020) 101385.
- [149] A. Rastogi, S. Mukhopadhyay, J.P. Sahoo, A. Mennon, A. Ghosh, S. Jha, A. Bal, Intensive Glycemic Control for Diabetic Foot Ulcer Healing: A Multicentric, Randomized, Parallel Arm, Single-Blind, Controlled Study Protocol (INGLOBE Study), *Int. J. Low. Extrem. Wounds.* (2020) 153473462095224.
- [150] S.S.K. Reddy, Diagnosis of Diabetes Mellitus in Older Adults, *Clin. Geriatr. Med.* 36 (2020) 379–384.
- [151] M. do C. dos Reis, Sistema indutor de neoformação tecidual para pé diabético com circuito emissor de luz de LEDs e utilização do látex natural, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2013.
- [152] M. do C. dos Reis, Sistema indutor de neoformação tecidual para pé diabético com circuito emissor de luz de LEDs e utilização do látex natural, Univrsidade de Brasília, Brasília, DF, 2013.
- [153] Y.J.J. Rhou, F.R. Henshaw, M.J. McGill, S.M. Twigg, Congestive heart failure presence predicts delayed healing of foot ulcers in diabetes: An audit from a multidisciplinary high-risk foot clinic, *J. Diabetes Complications.* 29 (2015) 556–562.

- [154] J. Rodrigues da Silva, F. de Matos da Silva, Nanosistemas lipídicos e poliméricos para aplicação tópica no tratamento de feridas, *Hegemonia – Rev. Eletrônica Do Programa Mestr. Em Direitos Humanos, Cid. e Violência/Ciência Política Do Cent. Univ. Unieuro*. 25 (2018) 7–25.
- [155] S. de S.R.F. Rosa, M.F.F. Rosa, A.G. Domínguez, Duarte, C.F.D. Avila, A.M. da S. Ferreira, A tecnologia Rapha e sua incorporação no Sistema Único De Saúde-SUS: inovação de baixo custo dentro dos serviços de saúde, *Hegemonia – Rev. Eletrônica Do Programa Mestr. Em Direitos Humanos, Cid. e Violência*. (2018) 260–287.
- [156] S. de S.R.F. Rosa, M.F.F. Rosa, M.A.M. Fonseca, G.V. da S. Luz, C.F.D. Avila, A.G.D. Domínguez, A.G.D. Dantas, V.B. Richter, Evidence in Practice of Tissue Healing with Latex Biomembrane: Integrative Review, *J. Diabetes Res*. 2019 (2019) 7457295.
- [157] S. de S.R.F. Rosa, M.F.F. Rosa, P.H.G. Inazawa, A.K. Inazawa, Latex-Made Microperforated Adhesive, Associated with Led Light Sources for Direct Application to Internal and External Human Inflammatory Processes., 2016.
- [158] S.S.R.F. Rosa, M.F.F. Rosa, M.P. Marques, G.A. Guimarães, B.C. Motta, Y.C.L. Macedo, P. Inazawa, A. Dominguez, F.S. Macedo, C.A.P. Lopes, A.F. da Rocha, Regeneration of Diabetic Foot Ulcers Based on Therapy with Red LED Light and a Natural Latex Biomembrane, *Ann. Biomed. Eng.* (2019).
- [159] S.S.R.F. Rosa, M.F.F. Rosa, M.P. Marques, G.A. Guimarães, B.C. Motta, Y.C.L. Macedo, P. Inazawa, A. Dominguez, F.S. Macedo, C.A.P. Lopes, A.F. da Rocha, Regeneration of Diabetic Foot Ulcers Based on Therapy with Red LED Light and a Natural Latex Biomembrane, *Ann. Biomed. Eng.* (2019).
- [160] S.S.R.F. Rosa, M.F.F. Rosa, M.P. Marques, G.A. Guimarães, B.C. Motta, Y.C.L. Macedo, P. Inazawa, A. Dominguez, F.S. Macedo, C.A.P. Lopes, A.F. da Rocha, Regeneration of Diabetic Foot Ulcers Based on Therapy with Red LED Light and a Natural Latex Biomembrane, *Ann. Biomed. Eng.* 47 (2019) 1153–1164.
- [161] L.G. Rosenfeld, D.C. Malta, C.L. Szwarcwald, N.S. Bacal, M.A.M. Cuder, C.A. Pereira, A.W. Figueiredo, A.G. da Silva, Í.E. Machado, W.A. da Silva, G.V. Neto, J.B. da Silva Júnior, Reference values for blood count laboratory tests in the Brazilian adult population, national health survey, *Rev. Bras. Epidemiol.* 22 (2019) 147–2018.
- [162] R. Saito, Y. Uetera, Y. Saito, N. Okamura, K. Moriya, K. Koike, Evaluation of the efficacy of a low temperature steam and formaldehyde steriliser by using biological indicators, *J. Hosp. Infect.* 73 (2009) 179–180.
- [163] S. Saleem, N. Hayat, I. Ahmed, T. Ahmed, A.G. Rehan, Risk factors associated with poor outcome in diabetic foot ulcer patients, *Turkish J. Med. Sci.* 47 (2017) 826–831.
- [164] S. Saleem, N. Hayat, I. Ahmed, T. Ahmed, A.G. Rehan, Risk factors associated with poor outcome in diabetic foot ulcer patients, *Turkish J. Med. Sci.* 47 (2017) 826–831.
- [165] T.F. Santana, G.V. da S. Luz, G. de C.N.B. Lôbo, M.L.B. Carneiro, Liposomes use in

- diabetic wounds treatment: a systematic review, in: 5 Th Int. Conf. Nanosci. Nanotechnol. Nanobiotechnology, Brasilia, 2019.
- [166] A.C. Santos, D. Rodrigues, J.A.D. Sequeira, I. Pereira, A. Simões, D. Costa, D. Peixoto, G. Costa, F. Veiga, Nanotechnological breakthroughs in the development of topical phytochemicals-based formulations, *Int. J. Pharm.* 572 (2019) 118787.
- [167] O.P.-A. de Saúde, O.M. de Saúde, OPAS/OMS Brasil - Diabetes Mellitus, (n.d.).
- [168] Z.A. Sayiner, F.I. Can, E. Akarsu, Patients' clinical characteristics and predictors for diabetic foot amputation, *Prim. Care Diabetes.* 13 (2019) 247–251.
- [169] S. Sharifi, N. Fathi, M.Y. Memar, S.M. Hosseiniyan Khatibi, R. Khalilov, R. Negahdari, S. Zununi Vahed, S. Maleki Dizaj, Anti-microbial activity of curcumin nanoformulations: New trends and future perspectives, *Phyther. Res.* (2020) ptr.6658.
- [170] Y. Shen, R. Cai, J. Sun, X. Dong, R. Huang, S. Tian, S. Wang, Diabetes mellitus as a risk factor for incident chronic kidney disease and end-stage renal disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis, *Endocrine.* 55 (2017) 66–76.
- [171] G.S. Sidhu, H. Mani, J.P. Gaddipati, A.K. Singh, P. Seth, K.K. Banaudha, G.K. Patnaik, R.K. Maheshwari, Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice, *Wound Repair Regen.* 7 (1999) 362–374.
- [172] F. de M. da Silva, Desenvolvimento e aplicação de biomembranas a base de látex (*Hevea brasiliensis*) contendo curcumina (*Curcuma longa*) e papaína (*Carica papaya*) lipossomais associado à fototerapia no tratamento de feridas em ratos wistar (*Rattus norvegicus*) diabéticos, Universidade de Brasília, 2019.
- [173] R. Singh, A. Barden, T. Mori, L. Beilin, Advanced glycation end-products: A review, *Diabetologia.* 44 (2001) 129–146.
- [174] H. Soleimani, A. Amini, S. Taheri, E. Sajadi, S. Shafikhani, L.A. Schuger, V.B. Reddy, S.K. Ghoreishi, R. Pouriran, S. Chien, M. Bayat, The effect of combined photobiomodulation and curcumin on skin wound healing in type I diabetes in rats, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 181 (2018) 23–30.
- [175] J. Strandmark, S. Rausch, S. Hartmann, Eosinophils in homeostasis and their contrasting roles during inflammation and helminth infections, *Crit. Rev. Immunol.* 36 (2016) 193–238.
- [176] J.C. Tatmatsu-Rocha, C.R. Tim, L. Avo, R. Bernardes-Filho, P. Brassolatti, H.W. Kido, M.R. Hamblin, N.A. Parizotto, Mitochondrial dynamics (fission and fusion) and collagen production in a rat model of diabetic wound healing treated by photobiomodulation: comparison of 904 nm laser and 850 nm light-emitting diode (LED), *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 187 (2018) 41–47.
- [177] C.N. Tchanque-Fossuo, D. Ho, S.E. Dahle, E. Koo, C.S. Li, R.R. Isseroff, J. Jagdeo, A

- systematic review of low-level light therapy for treatment of diabetic foot ulcer, *Wound Repair Regen.* 24 (2016) 418–426.
- [178] S. Tejiram, S.L. Kavalukas, J.W. Shupp, A. Barbul, Wound healing, in: M.S.B.T.-W.H.B. Ågren (Ed.), *Wound Heal. Biomater.*, Woodhead Publishing, 2016: pp. 3–39.
- [179] M.E. Temple, M.C. Nahata, Pharmacotherapy of lower limb diabetic ulcers, *J. Am. Geriatr. Soc.* 48 (2000) 822–828.
- [180] R.L. Thangapazham, S. Sharad, R.K. Maheshwari, Skin regenerative potentials of curcumin, *BioFactors.* 39 (2013) 141–149.
- [181] D.R. Thomas, Clinical management of diabetic ulcers, *Clin. Geriatr. Med.* 29 (2013) 433–441.
- [182] E. Tsourdi, A. Barthel, H. Rietzsch, A. Reichel, S.R. Bornstein, Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus, *Biomed Res. Int.* (2013) 385641.
- [183] S. Tsuchiya, S. Ichioka, N. Sekiya, Hydroxyurea-induced foot ulcer in a case of essential thrombocythaemia, *J. Wound Care.* 19 (2010) 361–364.
- [184] O. Tusskorn, T. Khunluck, A. Prawan, L. Senggunprai, V. Kukongviriyapan, Mitochondrial division inhibitor-1 potentiates cisplatin-induced apoptosis via the mitochondrial death pathway in cholangiocarcinoma cells, *Biomed. Pharmacother.* 111 (2019) 109–118.
- [185] F. University of Brasilia, C. Technological Development, Latex-Made Microperforated Adhesive, Associated with Led Light Sources for Direct Application to Internal and External Human Inflammatory Processes, BR 10 2016 019963 8 A2, 2016.
- [186] K. Varaprasad, T. Jayaramudu, V. Kanikireddy, C. Toro, E.R. Sadiku, Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review, *Carbohydr. Polym.* 236 (2020) 116025.
- [187] K. Vedhara, K. Dawe, M.A. Wetherell, J.N.V. Miles, N. Cullum, C. Dayan, N. Drake, P. Price, J. Tarlton, J. Weinman, A. Day, R. Campbell, Illness beliefs predict self-care behaviours in patients with diabetic foot ulcers: A prospective study, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 106 (2014) 67–72.
- [188] N.A.M. Vitoriano, D.G.B. Mont’Alverne, M.I.S. Martins, P.S. Silva, C.A. Martins, H.D. Teixeira, C.B. Miranda, L.M.M. Bezerra, R.M. Montenegro, J.C. Tatmatsu-Rocha, Comparative study on laser and LED influence on tissue repair and improvement of neuropathic symptoms during the treatment of diabetic ulcers, *Lasers Med. Sci.* (2019) 1–7.
- [189] J. Wang, R. Wan, Y. Mo, M. Li, Q. Zhang, S. Chien, Intracellular delivery of adenosine triphosphate enhanced healing process in full-thickness skin wounds in diabetic rabbits., *Am. J. Surg.* 199 (2010) 823–832.

- [190] Q. Wang, X. Cao, G. Zhu, T. Xie, K. Ge, Y. Niu, Blockade of receptor for advanced glycation end products improved essential response of inflammation in diabetic wound healing, *Int. J. Diabetes Dev. Ctries.* (2019) 1–7.
- [191] W. Wang, K.J. Lu, C.H. Yu, Q.L. Huang, Y.Z. Du, Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration, *J. Nanobiotechnology.* 17 (2019).
- [192] R.M. Warner, *Applied Statistics: From Bivariate Through Multivariate Techniques*, London, UK, 2007.
- [193] T. Wen, M.E. Rothenberg, The Regulatory Function of Eosinophils, in: *Myeloid Cells Heal. Dis.*, American Society of Microbiology, 2016: pp. 257–269.
- [194] M. Wlaschek, K. Scharffetter-Kochanek, Oxidative stress in chronic venous leg ulcers, *Wound Repair Regen.* 13 (2005) 452–461.
- [195] M. Wojcik, M. Krawczyk, A. Zieleniak, K. Mac Marcjanek, L.A. Wozniak, Associations of high blood sugar with oxidative stress and inflammation in patients with type 2 diabetes, INC, 2020.
- [196] World Health Organization, *Diabetes*, (2018).
- [197] W. Wu, X. Zhou, P. Sun, X. Yu, S. Wang, L. Qu, F. Zhang, Y. Ma, J. Lv, G. Liu, L. Yang, Interstitial eosinophilic infiltration in diabetic nephropathy is indicative of poor prognosis, with no therapy benefit from steroid, *J. Diabetes.* 12 (2020) 881–894.
- [198] J. Xiang, S. Wang, Y. He, L. Xu, S. Zhang, Z. Tang, Reasonable Glycemic Control Would Help Wound Healing During the Treatment of Diabetic Foot Ulcers, *Diabetes Ther.* 10 (2019) 95–105.
- [199] Z. Xu, S. Han, Z. Gu, J. Wu, Advances and Impact of Antioxidant Hydrogel in Chronic Wound Healing, *Adv. Healthc. Mater.* 9 (2020) 1901502.
- [200] P. Yang, J. Feng, Q. Peng, X. Liu, Z. Fan, Advanced Glycation End Products: Potential Mechanism and Therapeutic Target in Cardiovascular Complications under Diabetes, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019 (2019).
- [201] Q. Yang, Y. Zhang, H. Yin, Y. Lu, Topical Recombinant Human Epidermal Growth Factor for Diabetic Foot Ulcers: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Clinical Trials, *Ann. Vasc. Surg.* 62 (2020) 442–451.
- [202] L. Yazdanpanah, M. Nasiri, S. Adarvishi, Literature review on the management of diabetic foot ulcer WJD 5 th Anniversary Special Issues (4): Diabetes-related complications, *World J Diabetes.* 6 (2015) 37–53.
- [203] P. Zhang, J. Lu, Y. Jing, S. Tang, D. Zhu, Y. Bi, Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis (†), *Ann. Med.* 49 (2017) 106–116.
- [204] Y. Zhang, A. Rauf Khan, M. Fu, Y. Zhai, J. Ji, L. Bobrovskaya, G. Zhai, Advances in curcumin-loaded nanopreparations: improving bioavailability and overcoming inherent

- drawbacks, *J. Drug Target.* 27 (2019) 917–931.
- [205] M. Zimmermann, A.G. Raiser, A.L. da T. Barbosa, D. Novosad, R.P.B. Steffen, R. Lukarsewsk, M.S. da Silva, R. Lindinger, F. Pastore Júnior, Teste de biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães, *Ciência Rural.* 37 (2007) 1719–1723.
- [206] Biocompatible Materials - MeSH - NCBI, (n.d.).
- [207] Raízes de cúrcuma com açafrão em pó isolado no fundo branco | Foto Premium, (n.d.).

ANEXOS

Parecer consubstanciado do CEP

	UNB - FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Ensaio clínico randomizado comparativo duplo cego aplicado em úlceras diabéticas de membros inferiores utilizando associação de biomembrana derivada do látex natural (Hevea Brasiliensis) e equipamento emissor de luz de leds de comprimento de onda variado ($450 \pm 20\text{nm}$ à $636 \pm 20\text{nm}$)		
Pesquisador: Suelia de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa		
Área Temática: Equipamentos e dispositivos terapêuticos, novos ou não registrados no País; Novos procedimentos terapêuticos invasivos;		
Versão: 2		
CAAE: 94910718.5.0000.0030		
Instituição Proponente: Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Faculdade do		
Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO Ministério da Saúde Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 2.962.901		
Apresentação do Projeto:		
Patrocinador principal: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Ministério da Saúde.		
Local de realização da pesquisa: Hospital Regional da Asa Norte/SES/DF e Hospital Regional do Gama/SES/DF.		
Resumo:		
"Este é um projeto de pesquisa na área de biotecnologia - vinculado a Desenvolvimento Tecnológico e Extensão Inovadora – DT, nível 2, a Bolsa Produtividade em Pesquisa 1C e ao Projeto de Pesquisa financiado Ministério da Saúde Termo de Cooperação TED 128/2016 e TED 129/2016. Trata-se Ensaio clínico randomizado comparativo duplo cego aplicado em úlceras diabéticas de membros inferiores utilizando associação de biomembrana derivada do látex natural (Hevea Brasiliensis) e equipamento emissor de luz de leds de comprimento de onda variado ($= 450 \pm 20\text{nm}$ à $= 636 \pm 20\text{nm}$). O presente estudo tem como objetivo avaliar a ação conjunta do biomaterial látex (denominada biomembrana derivada do látex natural) e do equipamento emissor de luz de com um intervalo de comprimento de onda de $= 450 \pm 20\text{nm}$, 5mW a $= 636 \pm 20\text{nm}$,		
Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900 UF: DF Município: BRASILIA Telefone: (61)3107-1947 E-mail: cepfsunb@gmail.com		