



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE - UFS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

PAULA SANTOS NUNES

EFEITO DE MEMBRANAS DE GELATINA CONTENDO
ÁCIDO ÚSNICO EM QUEIMADURAS UTILIZANDO
MODELO SUÍNO

ARACAJU

2013

NUNES/PAULA

EFEITO DE MEMBRANAS DE GELATINA CONTENDO
ÁCIDO ÚSNICO EM QUEIMADURAS UTILIZANDO
MODELO SUÍNO

2013

PAULA SANTOS NUNES

**EFEITO DE MEMBRANAS DE GELATINA CONTENDO
ÁCIDO ÚSNICO EM QUEIMADURAS UTILIZANDO
MODELO SUÍNO**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz C. de Albuquerque Júnior

ARACAJU

2013

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Msnae Nunes, Paula Santos
Efeito de filmes de colágeno contendo ácido úsnico em queimaduras utilizando modelo suíno / Paula Santos Nunes. – São Cristóvão, 2013.
108f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim

1. Queimadura. 2. Membrana de gelatina. 3. Ácido úsnico. 4. Lipossomas I. Título.

CDU 543.392:616-003.9

PAULA SANTOS NUNES

**EFEITO DE MEMBRANAS DE GELATINA CONTENDO
ÁCIDO ÚSNICO EM QUEIMADURAS UTILIZANDO
MODELO SUÍNO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim

1º Examinador: Prof^ª. Dr. Eduardo Luiz de Aquino Neves

2º Examinador: Prof^ª. Dr. Marco Antônio Prado Nunes

3º Examinador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

4º Examinador: Prof^ª. Dr^a. Marta Rabelo Piva

PARECER

AGRADECIMENTOS

Ao final de quatro anos de dedicação a um trabalho torna-se imprescindível externar os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para concretização deste trabalho e sonho. Às pessoas que serão citadas, o meu “muito obrigada”:

À Deus, nosso criador e força sublime. Sabedoria e Simplicidade. Luz que ilumina nosso caminho. Sem a fé que nEle depositamos nada é possível.

Aos meus amados pais e irmãos, Júlio, Tânia, Ivan e Amanda pelo apoio incondicional, dedicação e amor.

À Adriano Antunes pela força, apoio e paciência durante esses anos. Pelo carinho, companherismo e amor fundamentais para que eu conseguisse seguir firme nesse trabalho.

Ao meu orientador e amigo, Professor Leonardo Rigoldi Bonjardim, pela oportunidade e confiança depositadas, pela atenção, amizade e incentivo. Não é possível expressar o quanto lhe sou grata e o quanto me auxiliou e zelou pelo meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Professor e amigo Ricardo Albuquerque, pela dedicação e ensinamento. Por sempre estar tão disponível com paciência, sabedoria e cautela. Pelos momentos dedicados a esse trabalho, pelas considerações tão sábias e esclarecedoras. Um grande mestre, que exige e nos ensina a sermos cada dia melhor. Muito obrigada, Ricardinho, por sempre me socorrer e me apoiar, por me ensinar nesses seis anos como começar a vida acadêmica e por ser um espelho de como ser competente, íntegro, honesto e amigo.

A todos os professores da UFS e da UNIT que em algum momento contribuíram para realização de alguma etapa desse trabalho, especialmente, aos Professores Fracilene Amaral, Lucindo Quintans, Márcio Roberto, Marília Bezerra, Mairim Serafini, Eduardo Caldas, Juliana Cardoso, Leandro Diniz, Luiz Pereira, Francine Padilha pelas contribuições indispensáveis e pertinentes para realização desse estudo.

Aos meus queridos amigos, Jamille, Alessandra, Bruno, Thailson, Júlio e Malone, pelos momentos únicos com nossos porquinhos. Meu muitíssimo obrigada, pela amizade, paciência, persistência, fundamentais para seguirmos em frente nos momentos mais difíceis desse trabalho. As palavras não são suficientes para externar minha gratidão pela companhia das manhãs, das noites, dos sábados, dos domingos e dos feriados que nos encontramos para vencer tantos obstáculos que um trabalho como esse requer. Não teria conseguido sem vocês!!!

RESUMO

Efeito de membranas de gelatina contendo ácido úsnico em queimaduras utilizando modelo suíno. Nunes, P.S., Aracaju-SE, 2013.

A busca por produtos para o tratamento de feridas provocadas principalmente por queimaduras é cada vez maior. Diversos produtos são desenvolvidos e comercializados com finalidade de atuarem acelerando a dinâmica cicatricial, tais como, agentes tópicos, soluções, enxertos, curativos interativos e biofilmes. A gelatina têm sido um dos materiais mais estudados para esse fim, visto que apresenta arquitetura celular adequada para atuar como suporte na construção de novos tecidos, bem como, possibilita a incorporação de substâncias ativas em sua estrutura proteica. O ácido úsnico (AU), um metabólito secundário de líquens, tem apresentado propriedades biológicas promissoras para o tratamento de feridas, como atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Porém é um metabólito insolúvel em água e para sua incorporação às membranas de gelatina se faz necessário o uso de lipossomas, que possibilitam a incorporação de fármacos insolúveis para posterior liberação controlada. Nesta perspectiva, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de membranas de gelatina contendo AU/lipossomas sobre o reparo cicatricial em queimaduras em suínos. O ensaio biológico foi realizado com nove (09) suínos machos, 03 animais em cada grupo, formando três grupos, que foram sacrificados 8, 18 e 30 dias após a indução da queimadura, para remoção dos espécimes e preparo das lâminas histológicas. Foram realizadas três queimaduras no dorso de cada animal, as quais foram recobertas com três produtos: pomada de sulfadiazina de prata (grupo SDZ); Duoderme® (grupo GDU) e filmes de gelatina contendo lipossoma/ácido úsnico (grupo UAL). Os resultados da macroscopia demonstraram redução progressiva da área lesada ao longo do tempo experimental para os três grupos estudados, além disso, não foi observado sinais clínicos de infecção secundária. Na análise do índice médio da retração das feridas não houve diferença estatisticamente significativa entre os índices de retração obtidos nos animais em nenhum grupo e tempos analisados ($p>0,05$). Na microscopia, em 8 dias, os três grupos mostraram degeneração hidrópica do epitélio, com intensa infiltração neutrofílica. A reação de granulação observada na região central das feridas do grupo SDZ foi mais imatura em relação aos grupos GDU e UAL. Em 18 dias, a neoformação epidérmica, apesar de parcial nos três grupos, se mostrou bastante incipiente no SDZ quando comparada aos grupos GDU e UAL. A reação inflamatória foi reduzida em todos os grupos, entretanto a reação de granulação mostrou-se mais imatura no grupo SDZ, em relação à reação de granulação exuberante, ricamente celularizada, evidenciada nos grupos GDU e UAL. Em 30 dias, a reação de granulação, demonstrou estar mais extensa no grupo SDZ, contrapondo-se a restrita reação de granulação observada nos grupos GDU e UAL, presente apenas na região abaixo do epitélio. No grupo SDZ, ainda observou-se presença de infiltrado inflamatório envolvido na reação de granulação. Na análise de colágeno por picrossírius verificou-se uma gradativa substituição das fibras de colágeno tipo III para tipo I, bem como, melhora da densidade de colagenização em todos os grupos, porém no UAL, quando comparado aos grupos SDZ e GDU, observou a substituição mais rápida das fibras de colágeno, assim como melhora na densidade da colagenização. Conclui-se assim, que o grupo UAL promoveu o desenvolvimento e maturação da reação de granulação, do reparo cicatricial comparáveis ao duoderme e melhores que a pomada de sulfadiazina de prata, bem como maior incremento da deposição colagênica em relação aos dois outros grupos.

Descritores: Queimadura, suínos, membrana de gelatina, lipossomas, ácido úsnico.

ABSTRACT

Effect of gelatin membranes containing usnic acid in burns using porcine model. Nunes, P. S., Aracaju, SE, 2013.

The search for products to treat wounds caused by burns is mainly increasing. Several products are developed and marketed with the purpose of act accelerating the scar dynamics, such as topical agents, solutions, grafts, and interactive dressings and biofilms. The gelatin has been one of the most studied materials for this purpose because it shows cellular architecture suitable to act as support in the construction of new tissues as well, allows the incorporation of active substances in its protein structure. The usnic acid (UA), a secondary metabolite of lichens, has shown promising biological properties for the treatment of wounds, such as antimicrobial and anti-inflammatory activities. However, it is a metabolite water-insoluble and for its incorporation into gelatin membranes, it is necessary the use of liposomes, which enable the incorporation of insoluble drugs for subsequent controlled release. In this perspective, the aim of this study was to evaluate the effect of gelatin membranes containing usnic acid/liposome about scar repair of burns in pigs. The biological assay was realized with nine (09) male pigs, 03 animals in each group forming three groups which were sacrificed 8, 18 and 30 days after the induction of the burn for removal of specimens and development of histological slides. Three burns were made on the dorsum of each animal, which were coated with three products: silver sulfadiazine ointment (group SDZ); Duoderme® (group GDU) and gelatin films containing usnic acid/liposome (group UAL). The results of the macroscopic examination showed progressive reduction of the injured area over time for the three experimental groups, furthermore, there was no clinical signs of secondary infections. In the analysis of the average rate of contraction of wounds no statistically significant difference between the rates of decline observed for animals in any group and time periods analyzed ($p > 0,05$). In the microscopy in eight days, all three groups showed hydropic degeneration of the epithelium, with intense neutrophilic infiltration. The reaction of granulation observed in the central region of the injured group SDZ was more immature than in groups GDU and UAL. In 18 days, the neo-formation epidermal, although partial in the three groups showed quite incipient in SDZ compared to groups GDU and UAL. The inflammatory reaction was reduced in all groups, but the reaction of granulation was more immature in group SDZ, in relation to the reaction of exuberant granulation, richly with cells evidenced in groups GDU and UAL. In 30 days, the reaction of granulation, showed to be more extensive in group SDZ, opposing the restricted reaction of granulation observed in groups GDU and UAL, present only in the region below the epithelium. In group SDZ also observed the presence of inflammatory infiltrate involved in the reaction of granulation. In the analysis of collagen by picrosirius there was a gradual substitution of the fibers of collagen type III to type I, and the improvement in the density of collagen in all groups, but in UAL compared to groups and SDZ GDU it was observed a faster substitution of collagen fibers, as well as improvement in the density of collagen. Therefore it is concluded that the UAL group promoted the development and maturation of granulation reaction, scar repair comparable to duoDerme® and better than the sulfadiazine silver ointment, as well as increase of collagen deposition compared to the other two groups.

Keywords: Burn, pigs, gelatin membrane, liposomes, usnic acid

Lista de Figuras

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Procedimento de indução da queimadura. | 39 |
| Figura 2 | Revestimento das queimaduras com os produtos avaliados. | 40 |
| Figura 3 | Secções macroscópicas para microscopia. | 41 |
| Figura 4 | Macroscopia das feridas tratadas em 8, 18 e 30 dias. | 44 |
| Figura 5 | Índice da área da superfície da ferida. | 45 |
| Figura 6 | Análise semiquantitativa do perfil evolutivo da reação de granulação. | 46 |
| Figura 7 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo SDZ em 8 dias. | 47 |
| Figura 8 | Representação histológica da área central da ferida do grupo SDZ em 8 dias. | 48 |
| Figura 9 | Representação histológica da área central da ferida do grupo SDZ em 8 dias. | 48 |
| Figura 10 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo GDU em 8 dias. | 49 |
| Figura 11 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo GDU em 8 dias. | 50 |
| Figura 12 | Representação histológica da área central da ferida do grupo GDU em 8 dias. | 51 |
| Figura 13 | Representação histológica da área central da ferida do grupo GDU em 8 dias. | 51 |
| Figura 14 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo UAL em 8 dias. | 52 |
| Figura 15 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo UAL em 8 dias. | 53 |
| Figura 16 | Representação histológica da área central da ferida do grupo UAL em 8 dias. | 54 |
| Figura 17 | Representação histológica da área central da ferida do grupo UAL em 8 dias. | 54 |
| Figura 18 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo SDZ em 18 dias. | 55 |
| Figura 19 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo SDZ em 18 dias. | 56 |
| Figura 20 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo SDZ em 18 dias. | 56 |
| Figura 21 | Representação histológica da área central da ferida do grupo SDZ em 18 dias. | 57 |
| Figura 22 | Representação histológica da área central da ferida do grupo SDZ em 18 dias. | 58 |
| Figura 23 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo GDU em 18 dias. | 59 |
| Figura 24 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo GDU em 18 dias. | 59 |
| Figura 25 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo GDU em 18 dias. | 60 |
| Figura 26 | Representação histológica da área central da ferida do grupo GDU em 18 dias. | 61 |
| Figura 27 | Representação histológica da área central da ferida do grupo GDU em 18 dias. | 61 |
| Figura 28 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo UAL em 18 dias. | 62 |
| Figura 29 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo UAL em 18 dias. | 63 |
| Figura 30 | Representação histológica da área central da ferida do grupo UAL em 18 dias. | 64 |
| Figura 31 | Representação histológica da área central da ferida do grupo UAL em 18 dias. | 64 |
| Figura 32 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo UAL em 30 dias. | 65 |
| Figura 33 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo SDZ em 30 dias. | 66 |
| Figura 34 | Representação histológica da área central da ferida do grupo SDZ em 30 dias. | 67 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 35 | Representação histológica da área central da ferida do grupo SDZ em 30 dias. | 67 |
| Figura 36 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo GDU em 30 dias. | 69 |
| Figura 37 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo GDU em 30 dias. | 69 |
| Figura 38 | Representação histológica da área central da ferida do grupo GDU em 30 dias. | 70 |
| Figura 39 | Representação histológica da área central da ferida do grupo GDU em 30 dias. | 71 |
| Figura 40 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo UAL em 30 dias. | 72 |
| Figura 41 | Representação histológica da área marginal da ferida do grupo UAL em 30 dias. | 72 |
| Figura 42 | Representação histológica da área central da ferida do grupo UAL em 30 dias. | 73 |
| Figura 43 | Representação da deposição colagênica no grupo SDZ em 8 dias. | 74 |
| Figura 44 | Representação da deposição colagênica no grupo GDU em 8 dias. | 75 |
| Figura 45 | Representação da deposição colagênica no grupo UAL em 8 dias. | 75 |
| Figura 46 | Representação da deposição colagênica no grupo SDZ em 18 dias. | 76 |
| Figura 47 | Representação da deposição colagênica no grupo GDU em 18 dias. | 77 |
| Figura 48 | Representação da deposição colagênica no grupo UAL em 18 dias. | 78 |
| Figura 49 | Representação da deposição colagênica no grupo SDZ em 30 dias. | 79 |
| Figura 50 | Representação da deposição colagênica no grupo GDU em 30 dias. | 80 |
| Figura 51 | Representação da deposição colagênica no grupo UAL em 30 dias. | 81 |

Lista de Tabelas

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Escores da caracterização histológica da reação de granulação. | 42 |
|----------|--|----|

Lista de Siglas e Abreviações

| | |
|--------|--|
| ade | Área de desnudamento epitelial |
| AU | Ácido úsnico |
| BCI-x1 | Células do endotélio vascular umbilical |
| cg | Camada granulosa |
| cf | Cicatriz fibrosa |
| cfp | Cicatriz fibrosa primária |
| eea | Epitelial escamoso acantótico |
| eeh | Epitelial escamoso hiperplásico |
| ef | Exsudato fibrinoso |
| eif | Espaços interfibrilares |
| eifa | Espaços interfibrilares amplos |
| eife | Espaços interfibrilares estreitos |
| EGF | Fator de crescimento epidérmico |
| FGF | Fator de crescimento fibroblástico |
| GDU | Grupo dos animais que utilizaram o Duoderme® |
| HE | Hematoxilina/eosina |
| HO-1 | Heme-oxigenase-1 |
| HepG2 | Células hepáticas G2 |
| hop | Hiperortoqueratinização |
| hp | Hiperplasia epitelial |
| IL-1 | Interleucina-1 |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| iNOS | Óxido nítrico-sintase induzida |
| KGF | Fator de crescimento de queratinócitos |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| lt | Linfócitos |
| MEC | Matriz extracelular |
| MMPs | Metaloproteinases |
| NO | Óxido Nítrico |
| NF-kB | Fator de transcrição nuclear |
| PF4 | Fator plaquetário 4 |
| PGDF | Fator de crescimento derivado de plaquetas |

| | |
|---------------|--|
| PMMA | Polidimetil siloxano |
| PMNs | Polimorfonucleares neutrófilos |
| prof | Profundidade |
| rg | Reação de granulação |
| rgf | Reação de granulação fibrocelular |
| rgi | Reação de granulação imatura |
| rgr | Reação de granulação residual |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| RNS | Espécies reativas de nitrogênio |
| SDZ | Grupo dos animais que utilizaram a pomada de sulfadiazina de prata |
| ta | Tecido adiposo |
| tan | Tecido adiposo necrótico |
| tav | Tecido adiposo viável |
| TGF- β | Fator de crescimento transformador β |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral α |
| UAL | Grupo dos animais que utilizaram a membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas |
| us | Ulceração superficial |
| UV | Ultravioleta |
| UVB | Ultravioleta B |
| VEGF | Fator de crescimento do endotélio vascular |

ANEXOS

| | | |
|------------------|---|-----|
| ANEXO I | Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em animais | 106 |
| ANEXO II | Etapas metodológicas da indução da queimadura | 107 |
| ANEXO III | Etapas metodológicas para obtenção das lâminas histológicas | 108 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2 OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 Objetivo geral | 19 |
| 2.2 Objetivos específicos | 19 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA | 20 |
| 3.1 Queimadura | 20 |
| 3.2 Reparo cicatricial | 24 |
| 3.3 Biomateriais | 29 |
| 3.4 Ácido úsnico | 32 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 4.1 Membrana de gelatina contendo ácido úsnico | 37 |
| 4.2 Ensaio biológico | 38 |
| 4.3 Indução da queimadura | 38 |
| 4.4 Aplicação do biomaterial | 39 |
| 4.5 Estudo macroscópico | 41 |
| 4.6 Obtenção dos espécimes e eutanásia dos animais | 41 |
| 4.7 Estudo morfológico | 42 |
| 4.7.1 Análise da reação inflamatória e granulação | 42 |
| 4.7.2 Análise da área da superfície da ferida | 42 |
| 4.7.3 Análise de deposição colagênica..... | 43 |
| 4.8 Análise estatística | 43 |
| 5 RESULTADOS | 43 |
| 5.1 Macroscopia | 43 |
| 5.1.1 Análise da área da superfície das feridas por queimadura | 44 |
| 5.2 Microscopia por Hematoxilina/eosina | 45 |
| 5.2.1 Análise semiquantitativa da reação de granulação | 45 |
| 5.2.2 Avaliação em 8 dias | 46 |
| 5.2.3 Avaliação em 18 dias | 55 |
| 5.2.4 Avaliação em 30 dias | 65 |
| 5.3 Microscopia por picrossírius | 74 |
| 5.3.1 Avaliação em 8 dias | 74 |

| | |
|----------------------------------|------------|
| 5.3.2 Avaliação em 18 dias | 74 |
| 5.3.3 Avaliação em 30 dias | 76 |
| 6 – DISCUSSÃO | 81 |
| 7 – CONCLUSÃO | 89 |
| 8 – PERSPECTIVAS | 90 |
| REFERÊNCIAS | 91 |
| ANEXO I | 106 |
| ANEXO II | 107 |
| ANEXO III | 108 |

1. Introdução

A queimadura constitui uma lesão dos tecidos vivos que varia desde uma pequena bolha até formas graves, capazes de desencadear respostas sistêmicas proporcionais à extensão e à profundidade (ANDRADE et al., 2010). Sua importância decorre não só da frequência com que acontece, mas, principalmente, da capacidade de provocar sequelas funcionais, estéticas e psicológicas, além da grande taxa de mortalidade (ATIYEH et al., 2009). Queimaduras graves levam tanto a danos teciduais locais como a respostas inflamatórias sistêmicas, exigindo intervenções médicas rápidas para garantir a sobrevivência do indivíduo. No entanto, apesar de muitos avanços no tratamento dessas lesões, elas ainda constituem uma importante causa acidental de morbimortalidade em todo o mundo. A queimadura grave leva a um estado de imunodepressão e ativação de uma cascata pró-inflamatória que predispõe o indivíduo a sepse e a falência múltipla dos órgãos, que são as principais causas de mortalidade (İŞERİ et al., 2008; MIYAZAKI et al., 2012).

Miyazaki et al. (2012) ressaltam que o tecido lesado disponibiliza um ambiente úmido, rico em nutriente e com adequada temperatura para desenvolvimento de um potente meio de cultura para o crescimento de bactérias. Logo após qualquer alteração da integridade da pele, inicia-se a cicatrização, que é um processo complexo de restauração da lesão induzida por agressão local que envolve alterações entre as células e os componentes da matriz extracelular (MEC) (MUZZARELLI, 2009).

O fenômeno cicatricial envolve uma série de processos que visa a recuperação de elementos estruturais celulares. Sehn et al. (2009) afirmam que a cicatrização pode ser dividida em fases distintas, caracterizadas pelo tipo de célula predominante e segue uma sequência harmoniosa de eventos que ocorrem simultaneamente: inflamação, reepitelização, reconstrução dérmica, contração e remodelação.

A busca por produtos que atuem acelerando a dinâmica cicatricial e que possibilitem um tratamento eficaz, que possa trazer maior conforto e breve retorno à normalidade da vida do paciente, tem sido cada dia maior. Um fator de grande importância para o sucesso do tratamento destas lesões é a proteção contra o meio externo, obtida por meio de bandagens oclusivas. Neste sentido, destaca-se o aprimoramento das bandagens para disponibilizar produtos interativos que acelerem a cicatrização da lesão. Membranas de colágeno têm sido um dos materiais mais estudados, pois o colágeno tipo I representa um importante constituinte protéico da pele. A característica de absorvidade credita às membranas de colágeno uma grande vantagem especialmente nas áreas queimadas, já que não necessitam de uma segunda

intervenção cirúrgica para sua remoção, evitando complicações pós-operatórias e desconforto ao paciente (BOATENG et al., 2008).

Diversos estudos têm se concentrado em promover a incorporação de compostos bioativos em biomateriais implantáveis. O colágeno tipo I é um exemplo, especialmente em virtude das vantagens relacionadas à aceleração do processo de granulação e epitelização e à possibilidade de incorporação de fármacos sintéticos ou produtos naturais para posterior liberação controlada diretamente no tecido danificado (ALBUQUERQUE JUNIOR et al., 2009; DANTAS et al., 2011). O uso de curativos bioativos a base de colágeno (associado a substâncias com atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante) tem se mostrado bastante promissor no tratamento de lesões da pele (DIAS et al., 2011; NUNES et al., 2011).

Entre os vários compostos liquênicos, o ácido úsnico é um dos mais conhecidos e estudados (AHMADJIAN, 1993). Ele é oriundo do metabolismo secundário de líquens (associação entre fungos e algas) e possui comprovado efeito cicatrizante (NUNES et al., 2011), antimicrobiano (SEGATORE et al., 2012) e antibiótico (HONDA et al., 2010).

Tendo em vista a escassez de estudos que relatem a aplicação de substâncias ativas no processo de reparação tecidual nas queimaduras, bem como a elevada incidência, em todas as faixas etárias, desta ocorrência, este estudo teve por interesse desenvolver um curativo biocompatível que soma-se na busca de um agente cicatrizante usado para o tratamento de queimaduras.

A utilização do ácido úsnico incorporado a vesículas lipídicas e dispersos em matriz de colágeno e gelatina tem sido estudada há alguns anos pelo grupo de cicatrização de queimaduras do Laboratório de Ensaios Farmacêuticos e Toxicidade (LeFT) da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Inicialmente foram desenvolvidas membranas de colágeno contendo ácido úsnico/lipossomas e a partir de então foram concluídos trabalhos envolvendo: 1) Caracterização físico-química de filmes de colágeno contendo ácido úsnico/lipossomas; 2) Desenvolvimento de um método analítico por espectrofotometria UV para a quantificação de ácido úsnico/lipossomas em filmes bioativos de colágeno; 3) Filmes de colágeno contendo ácido úsnico/lipossomas utilizado como curativo oclusivo em queimaduras; 4) Análise físico-química, microestrutural e biológica de filmes bioativos de colágeno contendo ácido úsnico.

Os projetos desenvolvidos nessa linha receberam financiamento da Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (2009-2011) através dos projetos “Desenvolvimento e avaliação *in vivo*” de filmes bioativos sobre o reparo cicatricial de queimaduras de terceiro grau” e “Avaliação do efeito de filmes bioativos de colágeno/ácido úsnico sobre reparo cicatricial em ratos submetidos à queimadura de terceiro grau”; no

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (2010-2012) através do projeto “Avaliação de filmes de colágeno contendo ácido úsnico no processo de reparo cicatricial de queimaduras em suínos”. Além disso, ganhou o Prêmio de Incentivo em Ciência e Tecnologia para o SUS 2010, do Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde como melhores dissertações de mestrado do Brasil e Prêmio em Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Preparação Farmacêutica com atividade cicatrizante da UFS. Gerou um pedido de patente em 2010: “Processo de obtenção e atividade cicatrizante de um filme bioativo de colágeno contendo ácido úsnico”.

Atualmente, foi iniciado o desenvolvimento das membranas utilizando gelatina comercial em substituição ao colágeno bovino. Essa escolha ocorreu devido à necessidade de transposição da escala de produção, padronização e reprodutibilidade do produto. Sabe-se que o colágeno bovino apesar de possibilitar uma maior concentração de fármaco incorporado, em virtude da sua grande rede proteica, apresenta-se instável quanto a hidratação e concentração, além de apresentar o processo de extração extremamente longo. Sendo assim, iniciou-se o desenvolvimento de membranas de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas. Recentemente, foi concluída a dissertação de mestrado intitulada “Preparação e caracterização físico-química de membranas de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas”. Nesta perspectiva, o trabalho ora apresentado avaliou o efeito das membranas de gelatina contendo ácido úsnico em suínos comparando-os a dois produtos de referência em queimaduras, a sulfadiazina de prata e o DuoDerme[®]. A escolha por suínos ocorreu por ser o mamífero com pele mais semelhante a humana e por possibilitar uma extensa área para teste de lesões (MESQUITA et al., 2010).

2. Objetivos

2.1 Geral

- Analisar o efeito do tratamento com ácido úsnico incorporado a lipossomas em membranas biodegradáveis de gelatina sobre áreas de queimaduras utilizando modelo suíno.

2.2 Específicos

- Avaliar as alterações macroscópicas das feridas tratadas com as membranas biodegradáveis de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas.
- Analisar as características histológicas do reparo cicatricial tratadas com as membranas biodegradáveis de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas.
- Comparar a membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas com produtos de referência promotores da cicatrização utilizando modelo suíno.

3. Revisão da literatura

3.1 Queimaduras

A pele é um órgão protetor e impermeável à água, que isola os componentes internos dos componentes do meio externo, representando, portanto, uma barreira mecânica natural do organismo. Dentre as inúmeras funções da pele pode-se destacar a regulação térmica, a defesa orgânica, o controle do fluxo sanguíneo, a produção de vitaminas, o armazenamento de gordura, a proteção contra diversos agentes do meio ambiente e funções sensoriais como, calor, frio, pressão, dor e tato. Além dessa proteção mecânica, a pele oferece proteção química representada pelas glândulas sebáceas, que geram aldeídos microbicidas, e pelas glândulas sudoríparas, que geram peptídeos microbicidas (BRASILEIRO FILHO, 2012; GUIRRO, 2002; NOWAZ, 2011).

Outro fator de proteção é a microbiota residente normal da pele, variável em diferentes nichos, que compete com patógenos impedindo a colonização. Além de oferecer a barreira mecânica e química, a pele possui componentes do sistema imunitário, como células dendríticas (células de Langerhans) na derme e no epitélio e uma população variável de linfócitos T na derme (tecido linfóide associado à pele), exercendo efeito defensivo contra invasores, especialmente por competição com patógenos e por estimulação persistente do sistema imunitário (BRASILEIRO FILHO, 2012).

A pele é composta por duas camadas principais, a camada mais superficial de células epiteliais intimamente unidas, a epiderme e a camada mais profunda, de tecido conjuntivo denso irregular, a derme. A derme está conectada com a fáscia dos músculos adjacentes, por uma camada de tecido conjuntivo frouxo chamada hipoderme (frequentemente tendo células adiposas depositadas entre as suas fibras) (FATTINI & DANGELO, 2007; MOORE & DALLEY, 2007).

Na epiderme é possível identificar quatro camadas, a mais interna é a camada germinativa, onde ocorre a mitose, fornecendo células para substituir aquelas perdidas na camada mais superficial da epiderme; e a camada mais superficial, é a córnea, onde as células corneificadas formam uma cobertura ao redor de toda a superfície do corpo e não só protegem o corpo contra invasão por substâncias do meio externo como também ajudam a restringir a perda de água. Abaixo da córnea, há uma camada delgada chamada granulosa, cujo nome é derivado da presença de grânulos de querato-hialina no citoplasma de suas células. A derme

por sua vez, é composta por fibras elásticas, reticulares e colagênicas e além de ser amplamente suprida por vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos, acolhe glândulas especializadas (FATTINI & DANGELO, 2007; REHDER et al., 2004).

O trauma por queimadura é uma das formas mais comuns e devastadoras de acometimento a pele. É toda lesão provocada pelo contato direto com alguma fonte de calor ou frio, produtos químicos, corrente elétrica, radiação, ou mesmo alguns animais e plantas (como larvas, água-viva, urtiga), capazes de produzir calor excessivo que danifica os tecidos corporais e acarreta a morte celular (NOWAK, 2012).

Pacientes com lesões térmicas graves requerem atendimento especializado imediato para minimizar a morbidade e mortalidade. Dados do Centro Nacional de Controle e Prevenção de Lesões dos Estados Unidos mostraram que ocorrem cerca de 2 milhões de incêndios por ano, resultando em 1,2 milhões de queimados e 100 mil desses casos demandam hospitalização pois são queimaduras moderadas e severas, levando portanto a cerca de 5 mil mortes anuais, devido a complicações relacionadas a queimaduras (RAFLA & TREDGET, 2011).

Especialmente nos países classificados como de média e baixa rendas, as queimaduras ainda permanecem como um dos agravos mais negligenciados entre os vários tipos de causas externas. No Brasil, apesar de não determinarem um forte impacto no perfil da mortalidade da população, têm alta relevância na morbidade (GAWRYSZEWSKI et al., 2012). Estima-se que cerca de 1 milhão de pessoas sofra algum grau de queimaduras no Brasil a cada ano, sendo que 100 mil pacientes procuram atendimento hospitalar e, destes, cerca de 2,5 mil morrem por razão direta ou indireta de suas lesões (MENDES JÚNIOR et al., 2007).

Em geral, a incidência de queimaduras reduziu de 10 por mil em 1950 para 4,2 por mil em 1990, devido ao aumento da prevenção em casa e no local de trabalho. Desde a segunda guerra mundial, marcadas pelos avanços iniciais no cuidado e manejo clínico dessas lesões, têm-se observado um aumento nas taxas de sobrevivência e expectativa de vida das vítimas de queimaduras que teria sucumbido anteriormente com seus ferimentos. Consequentemente, a taxa global de mortalidade de queimaduras diminuiu em cerca de 30% devido aos avanços no manejo das queimaduras agudas e novas técnicas de controle a sepse (principal causa de mortalidade após esse tipo de lesão) (RAFLA & TREDGET, 2011; YODER et al., 2010).

O trauma por queimadura pode variar de uma pequena lesão a um ferimento devastador e dependendo da extensão e gravidade pode gerar impactos sobre todos os aspectos da vida dos indivíduos, sequelas físicas (estéticas e funcionais), sociais e psicológicas, que podem diminuir as chances dos indivíduos afetados de usufruir plenamente

de seu potencial produtivo do ponto de vista econômico e social (FALDER et al., 2009; GAWRYSZEWSKI et al., 2012).

Nowak (2012) descreveu que a gravidade da queimadura é determinada através de três variáveis: a intensidade do calor, a duração da exposição e a condutibilidade do tecido. Dentre os vários tipos de queimaduras, as térmicas são as mais comuns e as regiões acometidas nesse tipo de queimadura são divididas em três zonas: a primeira é a mais interna, chamada de zona de coagulação. Nesta zona, há destruição da circulação sanguínea e grande necrose de coagulação celular, pois é a área mais comprometida pela extrema exposição ao calor, ou seja, as células estão mortas e não conseguem se regenerar de forma independente, fazendo-se necessário, incisão cirúrgica e/ou exérese.

A segunda é a de estase, externa a de coagulação, com grande risco de necrose celular, pois a circulação está extremamente reduzida. A intervenção nas primeiras 24 a 72 horas é vital, visto que a possibilidade de tornar-se zona de coagulação é grande. A terceira é a de hiperemia, é a mais externa e a menos comprometida delas. A pele desta zona libera mediadores inflamatórios (citocinas) que promovem vasodilatação, permitindo a chegada de nutrientes e de células que ajudaram na remoção e recuperação do tecido. Esta zona, não tem sua estrutura danificada e se regenerará (NOWAK, 2012).

A lesão provocada por queimaduras também pode ser descrita com base na sua profundidade, sendo classificada como de primeiro grau, quando compromete apenas a epiderme, apresentando eritema e dor, porém não provocam alterações hemodinâmicas; de segundo grau, quando atinge a epiderme e parte da derme, provocando a formação de flictenas; podendo ser de segundo grau superficial (atinge epiderme e, superficialmente, a derme, restando ainda os pêlos, glândulas sudoríparas e sebáceas) ou de segundo grau profunda (acomete a porção mais profunda da derme, restando geralmente apenas os pelos) ou ainda de terceiro grau, quando envolve todas as estruturas da pele, apresentando-se esbranquiçada ou negra, pouco dolorosa e seca (ALEMDAROĞLU et al., 2006; EVERS et al., 2010; ZANASI et al., 2007).

Das inúmeras complicações e alterações geradas pela destruição da barreira epitelial e da microbiota residente na pele, as infecções são uma das principais causas de morbidade em pacientes queimados, pois impede a cicatrização da ferida por danificar os tecidos e promover o aumento excessivo da inflamação (RAFLA & TREDGET, 2011). Além disso, a presença de tecido desvitalizado, de proteínas degradadas e a redução do suprimento de oxigênio favorecem a proliferação de microorganismos patógenos do ambiente, da pele normal que circunda a lesão, ou da própria lesão (BARBOSA et al., 2007; BRASILEIRO FILHO, 2012).

Ainda pode-se destacar a disfunção severa do sistema imune que gera uma imunossupressão secundária, a grande colonização cutânea e a prolongada hospitalização e procedimentos invasivos decorrentes desse tipo de lesão. A ruptura da pele é um dos principais fatores que alteram a defesa do hospedeiro, expondo-o a patógenos e favorecendo a invasão de microorganismos por via linfática ou sanguínea, além de levar a uma variedade de estressores físicos, tais como acidose, perda de fluidos, alterações no equilíbrio endócrino, potencial para infecção e dor (İŞERI et al., 2008; ELSNER et al., 2011).

As queimaduras graves induzem a liberação de diferentes mediadores na pele. O potencial de liberação de neuropeptídeos, como as substâncias P, a partir dos danos das terminações nervosas, são fatores conhecidos envolvidos no retardo da liberação de histamina em queimaduras. Esses neuropeptídeos induzem a vasodilatação e permeabilidade vascular, estimulando a migração das células endoteliais vizinhas, o relaxamento das células lisas dos vasos e a liberação de histamina pelos mastócitos (PAPP & VALTONEN, 2006).

Em conjunto, as respostas e modificações celulares que surgem diante das inúmeras agressões constituem o que se denomina estresse celular. As alterações funcionais e as lesões que aparecem nesses casos resultam de desvios metabólicos, tendo como consequência depósitos anormais (degeneração), morte celular (necrose ou apoptose) ou transtornos dos mecanismos de proliferação e diferenciação celulares. Existem nas membranas, no citoplasma e nos núcleos celulares, sensores capazes de responder a essas alterações geradas após uma lesão, induzindo uma grande capacidade de sobreviver, de resistir, de reparar lesões moleculares ou, se essa adaptação não for possível, de levar a célula à morte (BRASILEIRO FILHO, 2012).

A retirada do tecido desvitalizado, deixando extensa área cruenta exposta que, por si só, já é um excelente meio de cultura, exacerba uma série de alterações fisiológicas e propicia a infecção. O fechamento destas áreas é, portanto, uma condição primordial na recuperação e, quanto mais precoce for sua realização, maior a chance de sobrevivência. Sendo assim, o foco das pesquisas para suprir a perda de pele nas queimaduras tem como principal interesse a otimização da dinâmica cicatricial, o desenvolvimento de materiais que possam substituir a pele temporariamente e a redução da formação de cicatrizes hipertróficas (MENDES JÚNIOR et al., 2007).

Atualmente, dentro dos centros médicos e entre os grupos de pesquisa observa-se a utilização de inúmeros produtos já comercializados, bem como o desenvolvimento dos mais variados produtos com atuação na lesão de tecidos. A escolha do produto utilizado como curativo para queimadura varia entre os centros de queimados em todo o mundo.

Mundialmente, em queimaduras parciais, com acometimento de 15-20% da superfície total do corpo, a sulfadiazina é um dos produtos mais utilizados (WANG et al., 2010). Pode-se destacar também o DuoDerme[®], uma membrana impermeável que funciona como curativo hidroativo, ou ainda o CollatampFacie[®], membrana de colágenotipo I, derivada de tendão de Aquiles de bovinos, associada a umequivalente epidérmico temporário (MENDES JUNIOR et al., 2007).

Outros produtos são comercializados, tais como: Dermagraft[®], tela dérmica, metabolicamente ativa, que contém proteínas da matriz (colágenos tipo I, III, V e VII, elastina, fibronectina e tenascina), fatores de crescimento presentes naderme humana e glicosaminoglicanos; Biofill[®], uma película microfibrilar de celulose pura, constituída por uma rede de fibras de celulose dispostas ao acaso; Biobrane[®], membrana de silicone com nylon ligado a peptídios do colágeno dérmico, substituto temporário, de curto prazo, semipermeável e com boa aderência e flexibilidade; Tegaderm[®], membrana sintética, que proporciona uma camada protetora, controlando a redução de perdas hidroeletrolíticas e protéicas e a redução da contaminação e proliferação bacteriana (MENDES JUNIOR et al., 2007; WANG et al., 2010).

3.2 Reparo cicatricial

A cura de lesões que acometem a pele como feridas crônicas (úlceras) ou queimaduras, compreende complexos processos que levam a restauração da integridade do tecido e evita a desregulaçãoda homeostase do corpo (JAYAKUMAR et al., 2011). Lesões teciduais que são acompanhadas de morte celular e/ou destruição da MEC sofrem um processo de cura que se dá por cicatrização ou por regeneração. Na regeneração, o tecido morto é substituído por outro morfofuncionalmente idêntico; na cicatrização, o tecido perdido é substituído por um tecido neoformado, originado do estroma (conjuntivo ou glia), ou seja, é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, sendo semelhante quer a lesão ter sido traumática, quer ocasionada por necrose (BRASILEIRO FILHO, 2012).

O processo de cicatrização consiste na recuperação dos elementos estruturais da célula. É um processo orgânico de restauração da lesão induzida por agressão local que envolve complexas alterações entre as células e os componentes da MEC. O primeiro passo é a instalação de uma reação inflamatória, cujo sangue extravasado e produtos da destruição tecidual são reabsorvidos pelo exsudato de células fagocitárias. A proliferação fibroblástica e endotelial vêm logo em seguida para formar o tecido conjuntivo cicatricial, que

gradativamente sofre remodelação, reduzindo o volume cicatricial, podendo haver até seu desaparecimento (SAMY et al., 2012; VELNAR et al., 2009).

Esse processo ocorre de duas formas: cicatrização por primeira intenção, ferida fechada não infectada, cujas bordas foram aproximadas por suturas, evoluindo para a produção de uma cicatriz; ou cicatrização por segunda intenção, que é uma ferida mais ampla, com bordas afastadas ou que tenha sido infectada, preenchida inicialmente por tecido de granulação e que contrai para formar uma cicatriz. Seja a cicatrização de primeira ou de segunda intenção a resposta inflamatória está estreitamente ligada ao processo de reparação tecidual e atua na destruição, diluição ou encerramento do agente agressor, pondo em movimento uma série de eventos que, tanto quanto possível, promovem a cicatrização e reconstituem o tecido danificado. Contudo, a inflamação e a reparação, quando não bem-coordenadas, são potencialmente lesivas (NAWAZ & BENTLEY, 2011; YOUNG & MCNAUGHT, 2011).

Dryden et al.(2013) afirmam que a cicatrização pode ser dividida em fases distintas, caracterizadas pelo tipo de célula predominante, e segue uma sequência harmoniosa de eventos que ocorrem sem separação distinta entre as quatro fases, hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento. Ainda ressaltam que a complexa interação e o tempo de cicatrização da ferida são necessários para compreender como obter melhores resultados após uma lesão.

Após a lesão do tecido, o processo de cicatrização começa com a hemostasia, como o mecanismo para limitar a hemorragia. A membrana celular comprometida libera vasoconstritores (tromboxano A₂ e prostaglandinas 2 α), promovendo a formação do coágulo sobre a lesão. A constrição vascular estimula a ativação e agregação de plaquetas ao colágeno sub-endotelial e o colágeno exposto desencadeia uma cascata de coagulação, formando uma matriz de fibrina, que funciona como um arcabouço para o tampão de plaquetas e migração de outras células como, leucócitos, células endoteliais e fibroblastos. A agregação de plaquetas e proteínas que se aderem posteriormente formam o coágulo de fibrina, crucial para hemostasia precoce, para prevenção de hemorragias por horas ou dias após a lesão e para o suporte estrutural da fase inflamatória (ANDRADE et al., 2010; DRYDEN et al., 2013).

A fase inflamatória se instala a partir da liberação de mediadores originados do coágulo de fibrina, das células aprisionadas no coágulo, do tecido conjuntivo das bordas da ferida e das células epiteliais da margem da lesão. Mediadores inflamatórios (taquicinas, das terminações nervosas e histaminas de mastócitos) estimulam a vasodilatação arteriolar, com

abertura dos capilares no tecido conjuntivo das margens da lesão, permitindo o aumento da resposta celular. Sinais cardinais são marcantes nas próximas 72h após a lesão, como dor, rubor, calor e edema. Algumas citocinas como, Interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), são liberadas por macrófagos e ativam células endoteliais, que expõem moléculas de adesão, favorecendo a migração de leucócitos (NAWAZ & BENTLEY, 2011; YOUNG & MCNAUGHT, 2011).

A liberação de diferentes agentes quimiotáticos após a lesão, também é um importante estímulo para migração de leucócitos para a área ocupada pelo coágulo de fibrina e para a MEC nas bordas da ferida. Fator de crescimento derivado de plaquetas (PGDF) e fator de crescimento transformador (TGF- β), liberado pelas plaquetas são agentes quimiotáticos para neutrófilos (polimorfonucleares/PMNs) e monócitos circulantes, liberados para maciça migração na ferida. IL-1, TNF- α e fator plaquetário 4 (PF4) são agentes quimiotáticos adicionais para PMNs. Nas primeiras horas a migração é dada pelos neutrófilos e a partir de 18h, há grande adesão de monócitos e linfócitos, os quais predominam no exsudato após 24 h, variando com a extensão da lesão (PITZER & PATEL, 2011; VELNAR et al., 2009).

Os PMNs iniciam a fagocitose, a lise do tecido desvitalizado (enzimas proteolíticas) e destroem as bactérias, atuando no controle da infecção. Eles possuem vida curta e rapidamente os monócitos circulantes são transformados em macrófagos que continuam a fagocitose iniciada pelos neutrófilos. Os macrófagos controlam a formação do tecido de granulação, uma vez que influenciam a angiogênese e estimulam proliferação e migração de fibroblastos. Além dos macrófagos, outras células inflamatórias encontram-se presente nessa fase do processo cicatricial tais como: linfócitos, plasmócitos, eosinófilos. Portanto, o desbridamento do tecido e formação do tecido de granulação inicial, caracteriza o início do preparo da área acometida para a fase proliferativa (DRYDEN et al., 2013, SHVYRKOV & YANUSHEVICH, 2013; YOUNG & MCNAUGHT, 2011).

A transição da fase inflamatória para a fase proliferativa inicia-se no quarto dia após a lesão e estende-se até o décimo sexto dia, aproximadamente (DRYDEN et al., 2013). Ela é caracterizada por intenso aumento de fibroblastos e neoformação vasculo-capilar. Nessa fase, as células endoteliais se multiplicam, formando cordões sólidos que entremeiam os fibroblastos e, posteriormente, se canalizam, resultando em tecido de granulação, com aspecto granuloso, avermelhado e pouco resistente. Portanto, pode-se ressaltar que as alterações primárias que ocorrem na fase de proliferação incluem epitelização, angiogênese e granulação (ALBUQUERQUE JUNIOR et al, 2009; WANG et al., 2012).

A reepitelização começa durante às 24 h após a lesão e caracteriza-se pela migração de células epiteliais da margem da ferida e/ou dos anexos cutâneos profundos (folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas), para dentro da lesão, reestabelecendo uma barreira protetora sobre o tecido subjacente (PITZER & PATEL, 2011). Ela ocorre tanto na membrana basal íntegra como na margem da ferida. É estimulada pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) e TGF- α , sintetizados por plaquetas e macrófagos. Os fibroblastos sintetizam e liberam fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e interleucina-6 (IL-6), que estimulam os queratinócitos a migrarem por toda a ferida, gerando uma barreira protetora inicial (DRYDEN et al., 2013).

É válido ressaltar que o aumento da atividade mitótica das células epiteliais basais, modulado por diversos fatores de crescimento, estimulam a restauração da membrana basal e diferenciação terminal para formação da epiderme estratificada. Em seguida, o restabelecimento da integridade epitelial, seguido pelo processo de corneificação da epiderme é um fenômeno que restabelece a barreira que isola o organismo do meio exterior, e é um dos maiores desafios a serem superados na busca de novas substâncias terapêuticas para lesões dérmicas (CAVALCANTE et al., 2011; RIBEIRO, et al., 2009).

A angiogênese ocorre simultaneamente e inicia-se a partir do endotélio de capilares localizados nas margem da ferida. Os fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o PDGF e o TNF- α promovem a proliferação de células endoteliais, as quais produzem metaloproteases, que digerem a membrana basal comprometida, para posteriormente sintetizar uma nova membrana e formar um novo capilar. Em seguida, uma rica rede vasculocapilar, frágil e muito permeável, acompanha a nova matriz que está sendo produzida por fibroblastos e contribui para formação de um tecido conjuntivo frouxo, bem vascularizado e edemaciado (YOUNG & MCNAUGHT, 2011).

À medida que a concentração local dos fatores de crescimento e citocinas se elevam, os processos de regeneração vascular e fibroplasia se intensificam através da angiogênese, da migração e proliferação fibroblástica, forma-se um tecido rico em elementos vasculares e celulares, denominado tecido de granulação que, gradativamente, se alastra preenchendo o vazio resultante dos tecidos eliminados. Esse tecido contém leucócitos, MEC formada por fibras de colágeno finas (colágeno tipo III), ácido hialurônico e uma quantidade moderada de proteoglicanos (NAWAZ & BENTLEY, 2010; YOUNG & MCNAUGHT, 2011).

Os fibroblastos são elementos celulares extremamente importantes durante a fase proliferativa. A proliferação dessas células e ativação da síntese de componentes da MEC são feitos por fator de crescimento fibroblástico a e b (FGF-a e FGF-b), TGF-B e PDGF,

sintetizados por macrófagos e linfócitos do exsudato. Os fibroblastos estão envolvidos na produção de colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanos e colagenase, essenciais para renovação e maturação do colágeno na fase de remodelamento. Ainda durante a formação do tecido de granulação, inicia-se a remodelação do tecido cicatricial, e é nessa fase que ocorrerá a formação do novo epitélio e do tecido cicatricial definitivo (PITZER & PATEL, 2011; WILD et al., 2010).

A síntese de colágeno aumenta drasticamente a partir do quarto dia após a lesão e em cerca de duas semanas suas fibras passam a predominar na MEC. Gradativamente, ocorre a redução na síntese de glicosaminoglicanos, especialmente de ácido hialurônico e o colágeno tipo I passa a predominar em relação ao tipo III. As fibras de colágeno iniciais são finas e delicadas e ao decorrer do tempo começam a se tornar mais grossas e compactas, comprimindo os capilares e reduzindo seu número. O equilíbrio entre a degradação e a síntese são cruciais nessa fase; as metaloproteinase produzidas durante o processo garantem a degradação de componentes que vão sendo substituídos por outros. Além disso, as ligações transversais nas moléculas de colágeno tornam-se mais resistentes e estáveis (ALBUQUERQUE JUNIOR et al., 2009; DRYDEN et al., 2013).

Ainda observa-se a proliferação de células mesenquimais especializadas no tecido de granulação, que adquirem características de células musculares lisas, denominadas miofibroblastos, com grande capacidade contrátil (NUNES et al., 2011). Essas células produzem actina (daí o nome miofibroblastos) e promovem a contração central das bordas da ferida aberta, garantindo aumento da força tênsil da cicatriz. A transformação de fibroblastos em miofibroblastos ocorre em condições patológicas como resposta a uma injúria no tecido, porém muito mais frequente na cicatrização de segunda intenção, como queimaduras por exemplo. A disposição gradativa das fibras de colágeno em um arranjo mais paralelo permite maior resistência à tração e uma melhor aparência a cicatriz. A força de tensão atinge até 80% da força original do tecido em aproximadamente 1 ano após a lesão (WILD et al., 2010).

É válido ressaltar, que os mecanismos de cicatrização são os mesmos em qualquer tipo de lesão da pele, porém a extensão da lesão, o tipo da lesão e/ou a presença de infecção pode levar ao desenvolvimento de um processo mais intenso, com variação do início e término das fases do processo de cicatrização. Além disso, a maior ou menor velocidade de cicatrização, o tamanho da cicatriz e a variação na retração dependem da qualidade e quantidade de citocinas e fatores de crescimento produzidos durante esse processo (BRASILEIRO FILHO, 2012).

Os principais esforços nessa área estão focados no estudo dos processos fisiológicos da neoformação de tecidos e na ação de medicamentos tópicos e sistêmicos sobre essas lesões.

Neste sentido, destaca-se o aprimoramento de produtos interativos e biomateriais, como esponjas, membranas e hidrogéis que atuem favorecendo a dinâmica cicatricial, principalmente no que se refere à promoção da bioestimulação celular, que resulta na aceleração do processo cicatricial, sem causar efeitos danosos às células, tecidos ou órgãos.

3.3 Biomateriais

A bioengenharia tecidual é um campo multidisciplinar que envolve aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados. A busca por biomateriais disponíveis para a medicina regenerativa é cada vez maior e novos materiais têm sido desenvolvidos, alegando vantagens sobre os já existentes. A escolha do biomaterial vai depender da aplicação pretendida, porém a maioria deles deve apresentar boa biocompatibilidade e uma microestrutura porosa apropriada para facilitar a infiltração celular, proliferação e diferenciação (NELL et al., 2012; XINGANG et al., 2012).

Na comunidade científica de biomateriais e áreas relacionadas a engenharia de tecidos e medicina regenerativa, um biomaterial é definido como uma substância produzida para adquirir uma forma, que por si só, ou fazendo parte de um sistema complexo, através do controle da interação com os componentes do sistemas vivos, é utilizada para direcionar, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico. Em outras palavras, um biomaterial é utilizado para substituir ou auxiliar a função do tecido enquanto está em contato com ele, seja interna ou externamente (CHEN et al., 2013; PEREZ et al., 2013).

As pesquisas na engenharia de tecidos eram voltadas apenas para a formação de elementos estruturais de arquitetura definida e para suporte do metabolismo celular. Uma descoberta fundamental na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos tem sido a extensão da ação de alguns biomateriais no fornecimento de sinais biológicos capazes de direcionar a função celular, através da introdução de fatores de crescimento e liberação controlada de fármacos. Além disso, o biomaterial utilizado em contato íntimo com o tecido vivo, essencialmente deve ser biocompatível, ou seja, não deve causar nenhum efeito nocivo ao tecido do hospedeiro e/ou órgão (CHEN et al., 2013; SANTOS et al., 2012).

Holzappel et al. (2013), classificam os biomateriais em três tipos principais, descritos pela resposta que eles exercem com sua utilização. Inertes, biomateriais mais rígidos, não absorvíveis, capazes de provocar nenhuma ou mínima reação tecidual após sua aplicação; bioativos, possibilitam a ligação do biomaterial ao tecido do hospedeiro, melhorando a

migração do material através da estimulação do crescimento de um novo tecido; e por fim, biodegradáveis ou bioabsorvíveis, são inicialmente incorporados dentro do tecido e caracterizados como tempo-dependentes, ou seja, são completamente absorvidos com o tempo. O implante metálico, utilizado como fixador de fraturas ósseas é um exemplo típico de biomaterial inerte; já as próteses dentárias são exemplos de biomateriais ativos e os polímeros são exemplos de biomateriais biodegradáveis.

Os polímeros podem ser sintéticos ou naturais, os sintéticos são degradados por erosão em massa e hidrólise de ligações de éster. O tempo de degradação pode variar de semanas a anos, através dos ajustes no peso molecular, na cristalinidade e na proporção de co-polímero. Um exemplo característico desses polímeros são os materiais de suturas e alguns fixadores ortopédicos de ligamentos e tendões. Os polímeros naturais são polímeros formados na natureza durante o ciclo de crescimento de todos os organismos. São também referenciados como biopolímeros. A síntese desses polímeros envolve enzimas catalisadoras, reações de crescimento de cadeias ativando monômeros, que caracterizam processos metabólicos complexos dentro de células (DIAS, 2006; PEREZ et al., 2013).

É válido destacar alguns exemplos de polímeros sintéticos não degradáveis: polietileno, poli (álcool vinílico), polimetilmetacrilato (PMMA), polidimetil siloxano, poli (etileno tereftalato) e outros; polímeros sintéticos degradáveis: poli (ácido glicólico), poli (ácido láctico), poli (óxido de etileno), poli (lactato-co-glicolídico), poli (ε-caprolactona) e polímeros naturais biológicos: alginato, amido, sulfato de condroitina, quitosana, ácido hialurônico, colágeno, gelatina, caseína, polilisina, dextran e heparina. Esses polímeros possibilitam o desenvolvimento de inúmeros produtos na engenharia de matérias e de tecidos e na área médica, portanto devem apresentar características físico-químicas bem definidas e adequadas para cada fim individualmente (DIAS, 2006; JIN et al., 2013; MENDES JÚNIOR, 2007).

Segundo Chen et al. (2012), na engenharia de tecido para pele, o biomaterial necessita proporcionar uma (a) barreira protetora; (b) firmemente ligada à derme subjacente; (c) que permita induzir neoformação vascular; (d) e proporcione um suporte estrutural para a pele elástica. No arsenal terapêutico observa-se a predominância de substâncias sintéticas, inclusive anti-inflamatórias, sendo utilizadas para tratamento de lesões na pele. Porém, nos últimos anos têm-se verificado o retorno da valorização de práticas terapêuticas que utilizam como base materiais de origem natural.

Um dos polímeros naturais amplamente utilizado na engenharia de tecidos é a proteína estrutural de colágeno, encontrada no tecido conjuntivo de tendões, ligamentos, cartilagem,

osso e pele. O colágeno representa cerca de 30% da proteína existente no organismo de vertebrados e está presente em tecidos que possuem função mecânica. Existem pelo menos 19 tipos diferentes, porém especialmente os tipos I, II e III têm sido utilizados em diversas aplicações clínicas, pois têm demonstrado ser uma estrutura adequada para experimentação de cultura de célula em terceira dimensão (3D) (PARENTEAU-BAREIL et al., 2011).

Outras características do colágeno possibilitam a sua utilização em diversas aplicações no campo biomédico, como sua alta resistência à tensão, propriedades hemostáticas, não citotóxicas, biodegradabilidade controlada, baixa antigenicidade e características não inflamatórias (AHMAD et al., 2012; FRIESS, 1998; ZAMAN et al., 2011). Além disso, é quimicamente atrativo por vários tipos de células e por ser um substrato natural, é altamente essencial para mantê-las com sua morfologia e fenótipos normais em cultura. A matriz de colágeno oferece uma estrutura de suporte biointerativa, a qual guia e estimula apropriada formação tecidual (LEE et al., 2001; PARENTEAU-BAREIL et al., 2011).

As membranas de colágeno são absorvíveis e degradáveis, bem como possibilitam a nutrição das células que preenchem o tecido afetado e o acesso das células de defesa ao local, permitindo adesão, migração e proliferação celular (HORI et al., 2007; PARENTEAU-BAREIL et al., 2011). Além disso, essas membranas funcionam como sistema de liberação controlada de fármacos e são concebidos para obtenção de adequada concentração plasmática ou níveis de concentração tecidual de fármacos de forma controlada, atingindo o efeito terapêutico desejado e evitando possíveis reações tóxicas inerentes ao composto (LEE, ROBISON, 2004; PARENTEAU-BAREIL et al., 2011).

A gelatina é um biomaterial versátil, derivado da desnaturação do colágeno por ácidos ou por substâncias alcalinas, resultando em polieletrólitos carregados. Estes polieletrólitos podem interagir com moléculas de carga oposta para formar complexos poli-iônicos que permitem a adesão de fatores de crescimento. Além disso, tem sido conhecida pela excelente capacidade de formação de películas. Membranas à base de gelatina são utilizadas como embalagens para manter a qualidade dos alimentos durante o armazenamento, pois apresentam características favoráveis para tal função, como: barreira ao oxigênio, luz e prevenção da desidratação e oxidação lipídica (AHMAD et al., 2012).

Outras propriedades como mecânicas, permeabilidade, absorção de luz, transparência, atividade antimicrobiana e antioxidante, podem ser obtidas pela adição de substâncias ativas a esse biomaterial. Assim como o colágeno e outros polímeros naturais (quitosana, alginato) a gelatina apresenta arquitetura celular que atua como suporte mecânico (“scarfolds”) para

construção de novos tecidos *in vitro* ou *in vivo*, assim como possibilita a incorporação de substâncias ativas em sua estrutura proteica (FORTI et al., 2006; VERHAEGEN et al., 2009).

Jayakumar et al. (2011), descreveram que o produto para lesão na pele deve apresentar características biológicas adequadas, tais como, prevenir a desidratação da ferida, manter um ambiente favorável para trocas gasosas na interface da ferida e atuar como uma barreira protetora contra microorganismos e agentes do meio externo. Além disso, deve ser não aderente, facilmente removido sem trauma e deve apresentar propriedades anti-alérgicas, não tóxicas, antimicrobianas, bem como promover a cicatrização da lesão. Elsner et al. (2011) observaram em seu estudo a eficácia de um curativo que agregou a capacidade oclusiva, a incorporação de fármaco e a biodegradabilidade. Sendo assim, as membranas de colágeno e gelatina se mostram como produtos de grande potencial de aplicação, visto que apresentam muitas características de um produto adequado para lesões na pele.

3.4 Ácido Úsnico

Os líquens são recursos naturais valiosos que têm sido utilizados há séculos para diversos fins, como alimentos, corantes, perfumes e medicamentos (MANOJLOVIC et al., 2012). São estruturas resultantes da associação entre um fungo (micobionte) e uma alga ou cianobactéria (fotobionte) (AHMADJIAN, 1993; APTROOT & SIPMAN, 1997). Taxonomicamente, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica, os líquens são tratados dentro do Reino Fungi, uma vez que, praticamente, 95% dos líquens são constituídos pelo micobionte (HENSSSEN & JAHNS, 1974).

Vários metabólitos liquênicos têm sido investigados para o isolamento de novos compostos com fins terapêuticos e o ácido úsnico é um dos mais estudados (HONDA et al., 2010; MELO et al., 2011 (A); NUNES et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2010; RIBEIRO-COSTA et al., 2004). Esse composto desempenha um importante papel biológico, conferindo aos líquens proteção contra microorganismos invasores e raios ultravioleta (UV). É particularmente abundante em gêneros como o *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* e *Evernia* e apresenta duas formas enantioméricas: (+)-ácido úsnico e (-)-ácido úsnico (BAZIN et al., 2012).

As atividades biológicas do ácido úsnico têm sido estudadas e comprovadas, tais como: antitumoral (BACKOROVA et al., 2012; RUSSO et al., 2008), antioxidante (RABELO et al., 2012; BRISDELLI et al., 2012), cicatricial (NUNES et al., 2011), anti-inflamatória (VIJAYAKUMAR et al., 2000), antimicrobiana (CARVALHO et al., 2005; GUPTA et al.,

2012; SEGATORE et al., 2012; MANOJLOVIC et al., 2012) elarvicida (BOMFIM et al., 2009).

Embora o perfil de citotoxicidade do ácido úsnico tenha sido bastante descrito (MAYER et al., 2005; SANTOS et al., 2006), assim como a caracterização dos mecanismos moleculares envolvidos (CARDERELLI et al., 1997; EINARSDOTTIR et al., 2010; O'NEILL et al., 2010) a sua possível aplicabilidade clínica permanece incerta. Provavelmente, o primeiro trabalho que demonstrou a atividade de citotoxicidade do ácido úsnico foi descrito por Takay et al. (1979), os quais concluíram que o ácido úsnico apresentou atividade antiproliferativa frente ao carcinoma pulmonar de Lewis.

Células HepG2 provenientes do hepatoblastoma humano foram caracterizadas e amplamente utilizadas como modelo *in vitro* para busca de novos medicamentos antitumorais (FANG & BELAND, 2009). Estas células se diferenciam facilmente e exibem características genótípicas e fenotípicas de células hepáticas normais. O ácido úsnico aumenta o estresse oxidativo e compromete a membrana mitocondrial, levando à morte celular. As vias moleculares utilizados por diferentes tipos de células em organismos multicelulares para manter a homeostase são altamente conservadas entre espécies, e portanto, uma abordagem genética aplicada aos modelos de substituição, podem inimizarem as incertezas na extrapolação para humanos (SAHU et al., 2012).

Recentemente, Song et al. (2012) demonstraram que o ácido úsnico pode inibir a proliferação e induzir a apoptose em células do endotélio vascular da região umbilical em humanos, diminuindo a Bcl-x1 (B-cell lymphoma-extralarge), uma molécula transmembrana da mitocôndria, e a survivina, uma proteína envolvida na inibição de apoptose e divisão celular. Este efeito é uma importante ferramenta para gerenciar a proliferação de células tumorais, como por exemplo, a terapia anti-angiogênica em células endoteliais ativas.

Backorova et al. (2012) investigaram os mecanismos de citotoxicidade de quatro metabólitos liquênicos (parietina, atranorina, ácido úsnico e ácido girofórico) sobre células cancerígenas (A2780 e HT-29) e concluíram que o ácido úsnico e a atranorina foram mais eficazes frente às células tumorais quando comparado aos outros dois metabólitos. Além disso, observaram que eles são causadores de morte celular em A2780 e HT-29, provavelmente através da via mitocondrial.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) estão envolvidas na patogênese de diversas doenças, como câncer, doenças inflamatórias e doenças neurodegenerativas (SEIFRIED et al., 2007). Sob condições fisiológicas normais, ROS / RNS participam como mensageiros intracelulares e moléculas reguladoras, bem como são

fortemente regulados por sistemas de equilíbrio, formadas por diferentes enzimas antioxidantes e proteínas (KOWALTOWSKI et al., 2009). As principais ações de metabólitos secundários em sistemas biológicos também têm sido associadas com as suas propriedades redox (MELO et al., 2011 (B); RABELO et al, 2012).

Alguns estudos comprovaram propriedade antioxidante do ácido úsnico em mucosa gástrica. Odabasoglu et al. (2006) demonstraram que o ácido úsnico exibiu efeito antioxidante quando utilizado como terapia contra úlcera gástrica induzida por indometacina em roedores. Estes estudos verificaram que as lesões gástricas foram significativamente reduzidas em todas as doses de ácido úsnico quando comparado ao grupo tratado com a indometacina. Além disso, o ácido úsnico induziu a inibição significativa da formação de ROS, a redução de peroxidação lipídica e o aumento das atividades de enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase e superóxido dismutase (HALICI et al., 2005).

Em outro estudo, o ácido úsnico apresentou comportamento pró-oxidante e antioxidante dose-dependente. O ácido úsnico extraído da *Xanthoparmelia farinosa* (Vainio) foi utilizado em uma linhagem de linfócitos humanos (Células de Jurkat) irradiados com radiação ultravioleta B (UVB), causando efeitos danosos letais nas membranas celulares e reduzindo o metabolismo celular em altas concentrações. No entanto, em baixas concentrações e sob intensidade de UVB considerada fisiológica, o ácido úsnico mostrou um efeito antioxidante (KOHLHARDT-FLOEHR et al., 2010).

O efeito do ácido úsnico sobre o protozoário *Trypanosoma cruzi* foi descrito pela primeira vez por Carvalho et al. (2006). Nesse estudo, a análise ultraestrutural de epimastigotas tratados mostraram danos da mitocôndria, com aumento marcante no volume cinetoplástico e vacuolização da matriz mitocondrial. A lise intensa de tripomastigotas na corrente sanguínea foi observada em todas as concentrações de drogas testadas. Além de danos na estrutura cinetoplástica da mitocôndria os tripomastigotas também levaram a um alargamento da bolsa flagelar, bem como vacuolização intensa do citoplasma. O tratamento de macrófagos infectados com 40 ou 80 mg/mL de ácido úsnico induziu uma marcante vacuolização no citoplasma de células amastigotas e desorganização da estrutura cinetoplástica e da mitocôndria, porém não foi observado nenhum dano ultraestrutural nas células do hospedeiro.

Segatore et al. (2012), avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* do ácido úsnico em combinação com cinco antibióticos terapêuticos disponíveis contra cepas resistentes à meticilina, isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*. Foi observada uma ação sinérgica em combinação a gentamicina, enquanto foi descrito como antagonista com levofloxacina. Além

disso, não verificou-se diferença quando combinado com a eritromicina, enquanto que com a clindamicina e oxacilina observou uma inconstância (variabilidade).

A atividade do ácido úsnico frente à *Candida orthopsilosis* e *Candida parapsilosis* foi investigado por Pires et al. (2012). Os resultados apresentados neste estudo foi o primeiro relato do ácido úsnico mostrando *in vitro* atividade inibitória e fungicida contra as *C. orthopsilosis* e *C. Parapsilosis*. O ácido úsnico exibiu efeito anti-*Candida*, com IC₅₀ de 1,95 µg/mL e IC₈₀ de 7,8 e 15,6 µg/mL.

Outro efeito do ácido úsnico, observado por Campanella et al. (2002), foi sobre a proliferação depoliomavírus em células 3T6 de roedores. Os resultados mostraram que a replicação do DNA do poliomavírus foi severamente inibida em concentrações não tóxicas de ácido úsnico. De acordo com os autores, o ácido úsnico atua como um repressor genético da transcrição do RNA. A atividade antilarvicida do ácido úsnico foi descrita por Bomfim et al. (2009), através da ação do metabólito no mosquito *Aedes aegypti*. A dengue é uma doença viral causada pelo Flavivirus transmitida pelo mosquito *A. aegypti*. Nesse estudo o ácido úsnico exibiu uma concentração letal de 50% (LC₅₀) de 6,61 (6,16 a 7,06 ppm) demonstrando que possui eficácia frente ao mosquito. No entanto, ele apresentou toxicidade frente ao *Brine shrimps*, um organismo utilizado como referência em ensaios de potencial toxicidade frente a invertebrado num ecossistema (BOMFIM et al., 2009).

A inflamação é a resposta de proteção do hospedeiro a um corpo estranho e/ou lesão tecidual que, se sem reação, pode levar a perda estrutural do tecido, bem como a função. Durante o processo de inflamação, a ativação de diversas moléculas determinam a migração de células inflamatórias, além da ativação, proliferação, diferenciação, reparação ou remoção (RIELLA et al., 2012).

Vijayakumar et al. (2000), demonstraram que o ácido úsnico, isolado a partir do líquen *Roccella montagnei*, mostrou atividade anti-inflamatória dose-dependente, empregando os modelos agudos e crônicos em roedores. Neste estudo, o ácido úsnico foi comparado ao ibuprofeno, utilizando o ensaio do edema da pata do rato (efeito agudo induzido pela carragenina) e o ensaio “cotton pellet” (efeitos crônicos). Após tratamento com diferentes doses de ácido úsnico, foi observado redução significativa do edema da pata somente na dose de 100 mg/kg. O efeito da redução dose-dependente em relação ao peso foi observada no segundo ensaio após tratamento crônico. Em estudo anterior, o ácido úsnico mostrou redução significativa no ensaio do edema da pata em ratos com dose oral de 50mg/kg (INGOLFSDOTTIR et al., 1998).

A migração e ativação de células inflamatórias, eventos vasculares, síntese de componentes da MEC são processos fundamentais da dinâmica da restauração da integridade do tecido lesado (GONÇALVES et al., 2007; THU et al., 2012). Esses processos ocorrem de forma sobreposta, porém em fases com características distintas, tais como, extravasamento sanguíneo, coagulação, infiltração de células inflamatórias, neoformação vascular, deposição de tecido de granulação, colagenização, epitelização, contração da ferida e remodelamento (SAMY et al., 2012). Recentemente, Nunes et al (2011) avaliou filmes de colágeno contendo ácido úsnico/lipossomas no processo de reparo cicatricial em queimadura de segundo grau em roedores. Observou que o ácido úsnico demonstrou estar envolvido na modulação de eventos biológicos do reparo cicatricial, tais como resposta inflamatória, epitelização e formação de colágeno.

Alguns estudos mostraram que os líquens são um dos poucos grupos de plantas que não produzem oleorresinas que provocam dermatite de contato alérgica. Vários tipos de ácidos quimicamente relacionados são responsáveis pelas propriedades antigênicas de líquens, porém o ácido úsnico foi o maior sensibilizador no estudo de Stoner et al. (1983). As dermatites são causadas pela exposição ambiental a agentes externos que, em contato com a pele desencadeiam uma reação inflamatória (BRANDÃO & GONTIJO, 2012). Os alérgenos em líquens são apenas sensibilizantes fracos, e até mesmo a exposição repetida pode não produzir uma resposta alérgica. Contudo, Stoner et al. (1986) demonstraram em seu estudo inúmeros casos de dermatite de contato alérgica em trabalhadores do noroeste do Pacífico quando em contato com espécies líquênicas.

Como demonstrado anteriormente, o ácido úsnico apresenta propriedades promissoras no tratamento de feridas, devido a sua atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (SEGATORE et al., 2012; VIJAYAKUMAR et al., 2000). Contudo, essas atividades terapêuticas tornam-se limitadas, pois o metabólito líquênico possui características físico-químicas desfavoráveis, como baixa solubilidade em água. Sendo assim, produtos insolúveis e/ou tóxicos devem ser veiculados através de um sistema de liberação capaz de otimizar a dose terapêutica, minimizar a ocorrência de efeitos tóxicos e viabilizar a administração do composto em uma formulação que melhore sua solubilidade, a exemplo de sistemas lipossomais (NUNES et al., 2010).

Os lipossomas são vesículas microscópicas que consistem em uma ou mais esferas concêntricas de bicamadas lipídicas, possuindo um compartimento aquoso interno formado a partir da fase aquosa em massa (HUANG, 2008). Em contraste com as estruturas lipídicas compostas por monocamadas, os lipossomas caracterizam-se pela extensão em duas

dimensões e regiões hidrofílicas e hidrofóbicas claramente separadas. As porções hidrofílicas da bicamada de lipídios são direcionadas para as fases aquosas (externa e interna), enquanto que porções hidrofóbicas de ambas as camadas lipídicas são direcionadas uma para a outra, formando o núcleo interno de característica membranar (BEZERRA, 2012; NII & ISHII, 2005). Além disso, por serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogênicos os lipossomas são altamente versáteis para utilização em pesquisa e na terapêutica (SANTOS; CASTANHO, 2002).

Ribeiro-Costa et al. (2004) avaliaram a atividade antitumoral *in vitro* do ácido úsnico livre e em microesferas contra o Sarcoma-180 e o carcinoma epidermóide de laringe (HEp-2). Eles observaram que a inibição do tumor ocorreu com maior eficácia quando o ácido úsnico foi encapsulado. Lira et al. (2009) observaram que o uso do complexo ácido úsnico/lipossoma pode ser uma estratégia alternativa para superar a baixa solubilidade do ácido em água e manter a sua atividade antimicrobiana.

4. Material e métodos

4.1. Preparo das membranas de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas

As membranas de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas foram preparadas através do método “*casting*” utilizando 1g de gelatina pura em pó (1%) (NP-Comércio de produtos alimentícios Ltda/Lot. 9766), solubilizada em 60 mL de ácido acético a 0,5 M e 0,2 g de plastificante propilenoglicol (Isofar Lot. V02774U#6) (20% da massa seca do polímero). Essa solução sofreu agitação mecânica por 12h em temperatura ambiente e em seguida foi misturada a solução do ácido úsnico incorporado aos lipossomas.

Os lipossomas foram preparados através do método de formação do filme lipídico por rotaevaporação. Inicialmente, misturou-se 250 mg de fosfolípido (Lipoid GMBH 75% Lot. 776095-1) a 10 mg de ácido úsnico (Sigma-Aldrich EC 231-456-0), dissolvidos em 30 mL de clorofórmio. Em seguida, foi realizada a rotaevaporação para eliminação do solvente orgânico, formando um filme no fundo do balão, o qual foi armazenado no dessecador por 24h para eliminação de resíduos voláteis. Posteriormente, foi realizada a ressuspensão com 40 mL de água destilada e agitação manual até desprendimento completo do filme do balão. Logo após, essa solução foi submetida ao processo de sonicação (ultrasom) por 30min e misturada a solução de gelatina/plastificante/ácido acético, através da agitação mecânica por

12h. Após esse tempo, 30 mL dessa solução foi vertida em placas de Petri para evaporação da água e formação dos filmes a serem recortados em quadrados com diâmetro de 6 cm x 6 cm.

4.2 Ensaio Biológico

Foram estudados nove suínos machos, *large-White*, pesando de 20-30 Kg, provenientes de uma mesma leitegada, com aproximadamente 90 dias de idade. Os nove animais foram distribuídos em três grupos experimentais, que ao final do tempo de 8 (grupo 1), 18 (grupo 2) e 30 (grupo 3) dias foram sacrificados para análise das lesões dérmicas realizadas. Esses animais foram submetidos a exame físico, coprológico pelo método de Willis, além da realização de hemograma, sendo os sadios considerados aptos a participar do estudo. Os animais receberam água e dieta suína, ração comercial (Purina Nutrimentos LTDA-Ribeirão Preto-SP) e foram mantidos em gaiolas individuais com cerca de 3 m² no Biotério da Universidade Federal de Sergipe sob a supervisão do médico veterinário Thailson Monteiro Menezes da Silva (CRMV/SE 0719).

4.3 Indução da Queimadura

Após a realização do exame físico, os animais foram submetidos à sedação com Clorpromazina, na dose de 3 mg/Kg, por via intramuscular. Com a realização desta sedação, foi possível proceder a fixação de um cateter tamanho 20 G na veia marginal auricular, a fim de possibilitar a aplicação do fármaco de indução e manutenção. Passados 20 minutos, o animal foi induzido à anestesia geral intravenosa com a aplicação de Cloridrato de Ketamina 2 mg/Kg e Midazolam 0,08 mg/Kg no acesso venoso. Durante o procedimento foram realizadas duas doses complementares de anestesia intravenosa, a fim de manter o plano anestésico, e para isso foram aplicadas doses equivalentes a metade da dose de indução. Em seguida, foi realizada assepsia e a tricotomia com lâmina da região dorsal para realização das queimaduras.

Cada grupo foi composto por três animais e em cada um deles foi realizado três queimaduras no dorso, sendo as mesmas acompanhadas durante os respectivos tempos de experimento. Cada animal de experimentação foi considerado seu próprio controle. As lesões foram quadrangulares com 25 cm² cada, distando 4 cm entre elas e 4 cm a partir da coluna vertebral (PAPP, 2006). Um instrumento previamente confeccionado com ponta chata e plana em bronze, com um termômetro acoplado, de dimensão de 25 cm², foi aquecido na chama

azul do bico de Busen até atingir 90°C, atingindo o rubro. Neste momento, o instrumental foi encostado no dorso do animal por 20 segundos, em contato com a pele (Figura 1) (HUNT *et al.*, 1998). Após a indução da queimadura, foi administrado o Ibuprofeno (4 mg/Kg) uma vez ao dia por 3 dias e penicilina (20.000 UI/Kg) uma vez ao dia por 5 dias. Ao final do experimento (tempos 8, 18 e 30 dias) os animais foram sacrificados e a epiderme e derme em torno do procedimento foram removidas, para comparação da resposta inflamatória, regeneração epitelial, reação de granulação e colagenização com aplicação da membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas e dos produtos de referência.

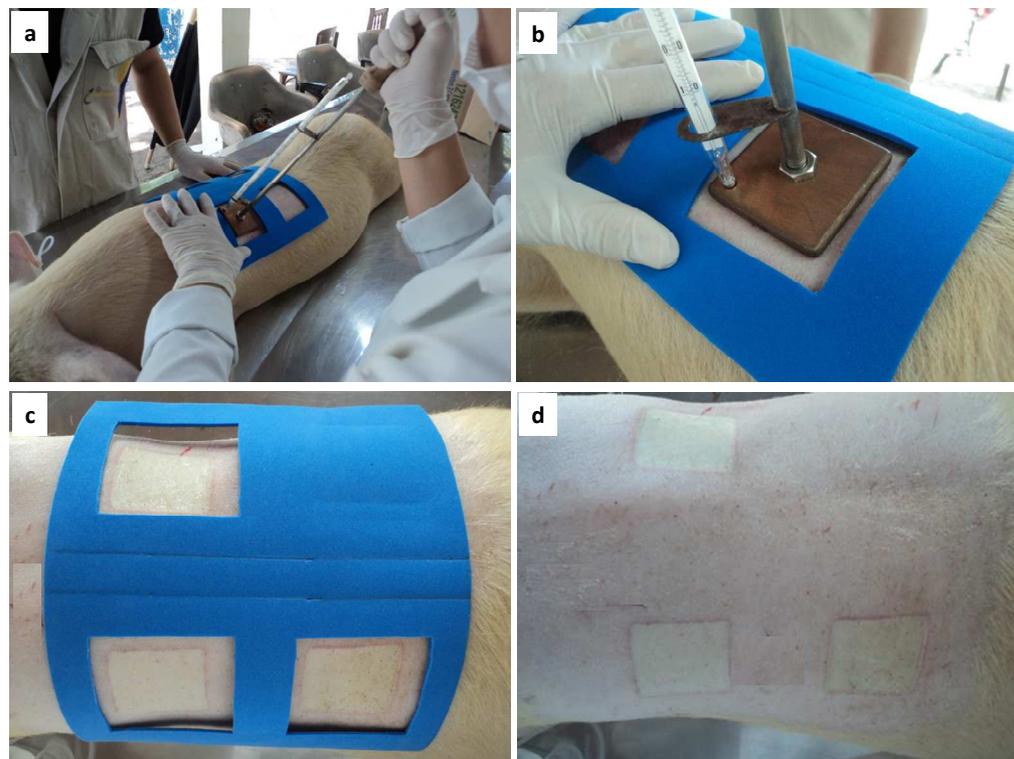


Figura 1. Indução da queimadura com chapa de cobre utilizando aparato para manutenção da distância entre as lesões (a, b, c); aspecto das lesões no dorso do animal (d).

Fonte: AUTOR

4.4 Aplicação do biomaterial

Após a realização das lesões térmicas, os animais foram posicionados em decúbito ventral em mesa cirúrgica e as áreas lesadas foram recobertas com o produto de referência, pomada de sulfadiazina de prata, SDZ (primeira lesão), com o biomaterial DuoDerme[®], GDU (segunda lesão) e com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas, UAL (terceira lesão). Na Figura 2, observa-se o recobrimento das lesões. O recobrimento foi

realizado de forma rotativa em cada animal e em cada tempo do experimento, para não privilegiar nenhum produto avaliado, em regiões mais vascularizadas ou de difícil acesso para o animal.

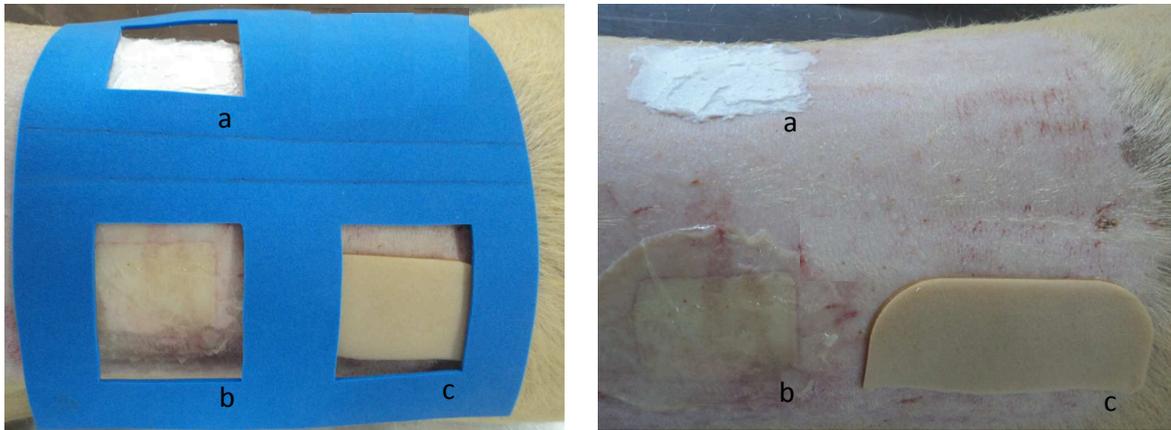


Figura 2. Revestimento da lesão com a pomada de sulfadiazina de prata (a); revestimento com a membrana de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas (b); revestimento com o DuoDerme® (c).

Fonte: AUTOR

4.5 Estudo macroscópico

Antes do sacrifício dos animais, os mesmos foram avaliados macroscopicamente para estudo clínico do processo de reparo. Nos tempos 8, 18 e 30 dias as lesões foram fotografadas e medidas com paquímetro digital Digimess®. A cada quatro dias, as lesões foram desbridadas, até quando necessário, e novas membranas e produtos foram aplicados.

O valor da área lesionada em cada animal foi obtido pelo valor da paquimetria do centro do comprimento da ferida pelo centro da largura da mesma. Foi calculada a média de cada área, de cada grupo individualmente (SDZ, GDU e UAL) nos três tempos do experimento, para posterior análise estatística dos dados. Adicionalmente, foram verificadas as características macroscópicas da lesão como tipo do tecido, comportamento da margem e do centro, da retração e do remodelamento da lesão e presença de infecção secundária. Após a realização dos protocolos experimentais, os animais foram eutanasiados e acondicionados em sacos plásticos, devidamente identificados como material infectante, e posteriormente enviados para coleta seletiva de lixo biológico da UFS para descarte adequado, de acordo com a legislação vigente.

4.6 Obtenção dos espécimes e eutanásia dos animais

Ao final do tempo de seguimento (8, 18 e 30 dias), os animais foram novamente pré-anestesiados e receberam tiopental sódico endovenoso (dose 40 mg/kg) para seu sacrifício. Após a eutanásia, a ferida foi excisada de forma elíptica, com margem de tecido ao redor da queimadura e em seguida hemisseccionada. Uma das hemissecções foi acondicionada em frasco plástico contendo formol a 10% (tampão fosfato, pH 7,4) e a outra amostra foi armazenada a menos 70°C para estudos posteriores de biologia molecular. A hemissecção 1 foi fragmentada em 4 cortes horizontais (secções A, B, C e D), e cada área de secção macroscópica foi novamente seccionada em quatro cortes histológicos semiseriados gerando um total de 16 cortes histológicos por amostra (Figura 3). Em seguida, passaram pelo processo de desidratação em soluções crescentes de etanol a 70, 95 e 100° GL, diafanização em xilol e inclusão em parafina (técnica histológica convencional). Secções histológicas de 5 µm foram obtidas a partir das amostras emblocadas em parafina e posteriormente submetidas à coloração hematoxilina/eosina (HE) e picrossírius.

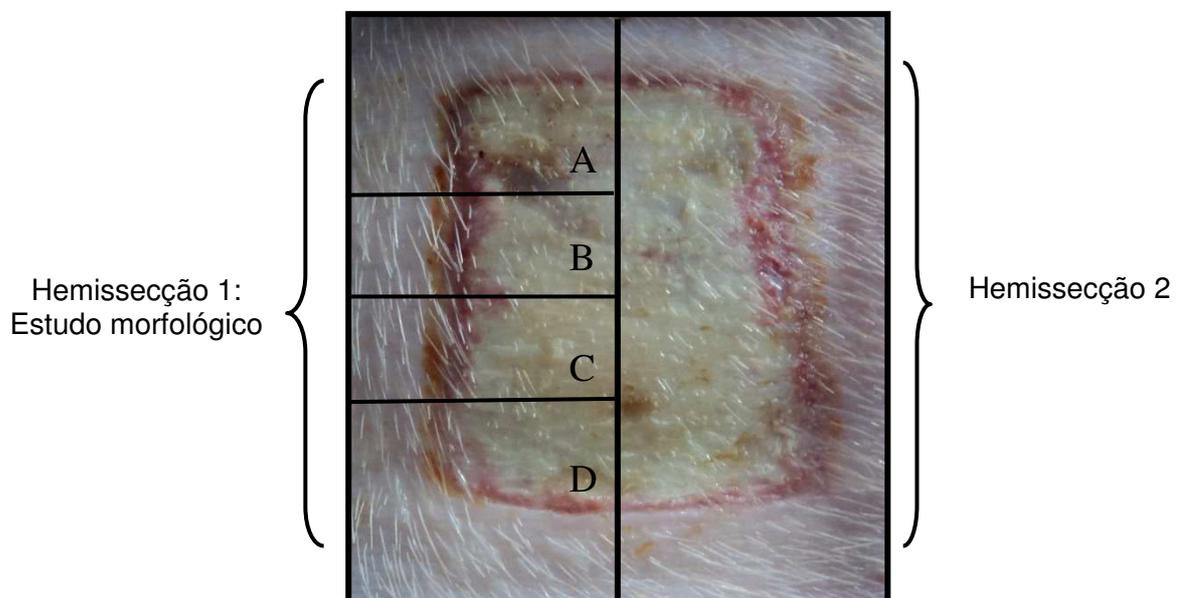


Figura 3. Esquema das secções macroscópicas das feridas induzidas por queimadura.

Fonte: AUTOR

4.7 Estudo morfológico

4.7.1 Análise da reação inflamatória e granulação

Para avaliação das características morfológicas associadas às fases do reparo cicatricial, foram analisadas as secções histológicas coradas em HE, observando-se os seguintes critérios: 1) características do epitélio, 2) determinação da reação inflamatória; 3) características da reação de granulação. Particularmente, para categorizar a reação de granulação observada, foi atribuído um escore médio para cada corte histológico, conforme descrito na Tabela 01. A média dos escores foi obtida por meio da razão entre a somatória dos escores de cada corte histológico e o número de cortes analisados.

Tabela 01. Escores para caracterização histológica da reação de granulação.

| Escore | Caracterização da reação de granulação |
|--------|---|
| 0 | Ausência de reação de granulação. |
| 1 | Reação de granulação pouco evidente e imatura, composta predominantemente por vasos mal formados (em fenda) e células endoteliais dispostas desorganizadamente. |
| 2 | Reação de granulação estendendo-se até 1/3 acima da hipoderme, composta predominantemente por vasos mal formados (em fenda) e células endoteliais dispostas desorganizadamente. |
| 3 | Reação de granulação ocupando mais de 1/3 da derme, composta predominantemente por vasos mal formados (em fenda) e células endoteliais dispostas desorganizadamente. |
| 4 | Reação de granulação limitada a 2/3 superiores da derme, composta predominantemente por fibroblastos e fibras colágenas. |
| 5 | Substituição completa da reação de granulação pela cicatriz fibrosa primária. |

4.7.2 Análise da área da superfície da ferida

A análise da área da superfície foi avaliada através da paquimetria digital do tamanho do centro do comprimento da ferida pelo centro da largura da lesão. Foi registrada a área ainda aberta das lesões, em seguida realizada a média dos valores dos três animais de cada grupo e posteriormente realizada a comparação entre as médias em cada tempo experimental.

4.7.3 Análise da deposição de colágeno

Para realizar o estudo descritivo do padrão morfológico de deposição de fibras colágenas, as secções histológicas coradas em picrossírius foram analisadas por microscopia de luz polarizada. Para tanto, as fibras de colágeno foram classificadas em tipo I ou tipo III de acordo com a birrefringência apresentada (amarelo-alaranjadas/vermelhas e amarelo-esverdeadas/verdes, respectivamente), e descritas suas características quanto ao aspecto morfológico (estiradas ou onduladas, delgadas ou espessas, curtas ou longas) e disposição dos feixes (reticular, entrelaçada ou paralelas), tanto na porção superficial quanto profunda da ferida.

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos a partir da análise da área da superfície lesionada e categorização da reação de granulação foram individualmente comparados entre os grupos experimentais analisados nos tempos 8, 18 e 30 dias. Para análise estatística foi inicialmente realizado o teste de Shapiro-wilk para avaliar a normalidade dos dados. Em seguida, foi realizado o teste de ANOVA para comparar a média de cada grupo nos diferentes tempos. Os valores médios obtidos a partir da análise quantitativa da área das feridas foram comparados utilizando um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1 Macroscopia

Em 8 dias, a macroscopia das queimaduras ainda apresentaram formato quadrado, com halo eritematoso periférico, com fundo necrótico e pseudomembranoso branco amarelado. Ao decorrer do tempo, em 18 dias, foi observada a retração das margens das feridas, que gradativamente, foram assumindo formato irregular e perdendo o halo eritematoso. Em 30 dias, quase todas as lesões, dos três grupos, apresentaram fechamento completo, algumas com a formação de crosta superficial e delgada. Não foi evidenciado nenhum sinal clínico de infecção secundária, como edema pronunciado, abscessos (exsudação supurativa) ou celulites (disseminação purulenta por fâscias musculares). Além disso, o

processo de reparo cicatricial clínico, mostrou-se dentro dos padrões de normalidade, visto que não foi desenvolvida nenhuma cicatriz hipertrófica ou atrófica (Figura 4).

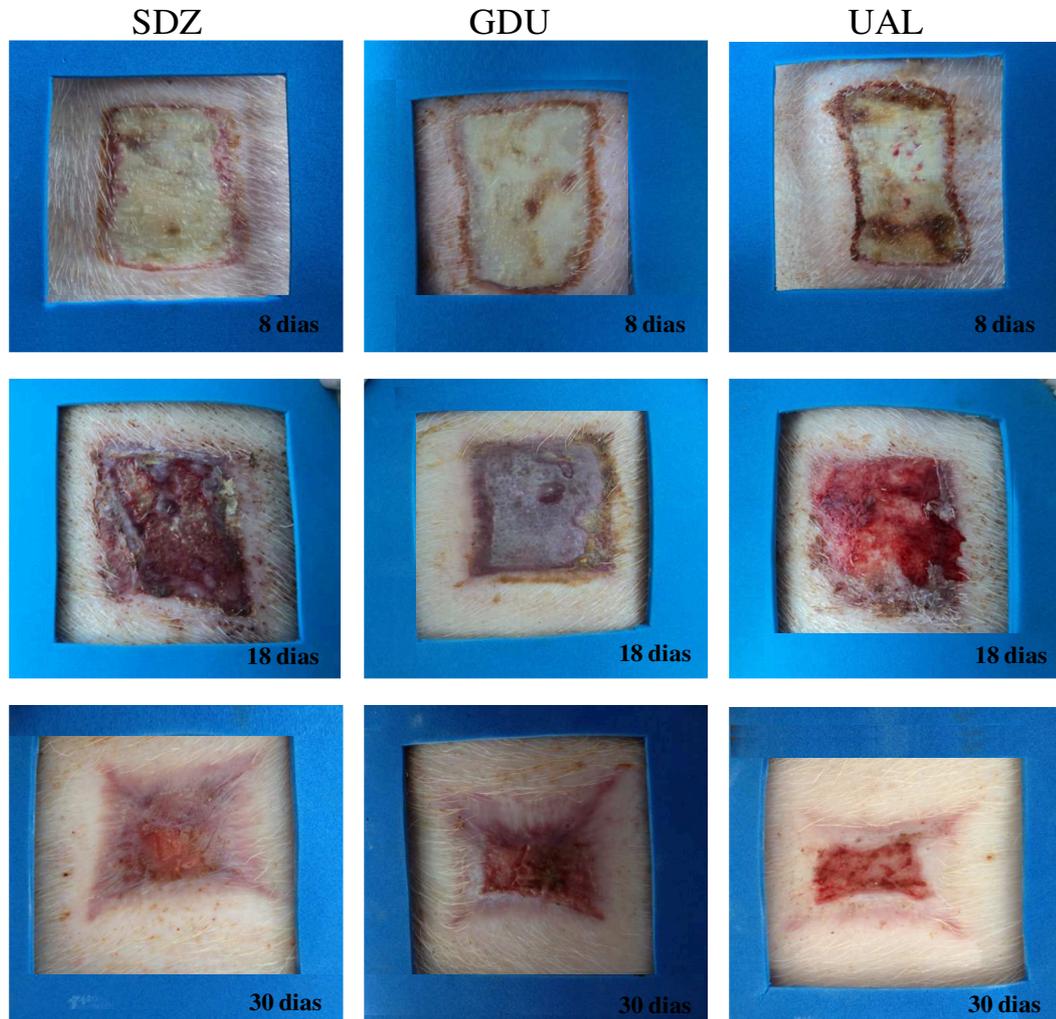


Figura 4. Macroscopia das feridas tratadas com sulfadiazina de prata (SDZ); DuoDerme[®](GDU) emembrana de gelatina com ácido úsnico/lipossomas(UAL) em 8, 18 e 30 dias.

Fonte: AUTOR

5.1.1 Análise do índice da área das feridas por queimaduras

A análise do índice médio da área das feridas demonstrou, nos três grupos estudados, uma redução progressiva da área lesada ao longo do tempo de experimento (Figura 5). Ainda foi observado, que a maior redução das áreas ocorreu no período de 8 a 18 dias após a lesão. Em 30 dias, foi verificada intensa retração da lesão, com índices que chegaram a 80% nos três

grupos. No entanto, não houve diferença significativa entre os índices obtidos nos animais em nenhum grupo e tempos analisados ($p>0,05$).

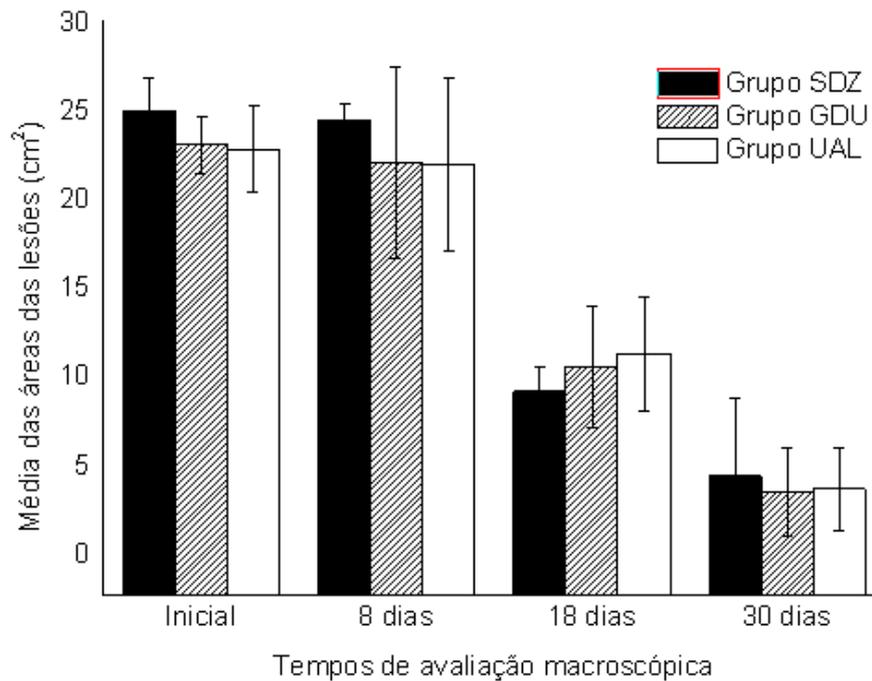


Figura 5. Índice médio das áreas das feridas por queimadura, no tempo inicial (indução da queimadura) e 8, 18 e 30 dias após a lesão, nos três grupos experimentais.

5.2 Microscopia por Hematoxilina-eosina

5.2.1 Análise semi-quantitativa da reação de granulação

O perfil evolutivo da reação de granulação (Figura 6) demonstrou escores significativamente mais altos apenas entre o grupo UAL e o grupo SDZ ($p=0,0160$) no tempo de 8 dias após a lesão. Porém, nos tempos de 18 ($p=0,6101$) e 30 ($p=0,7550$) dias não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

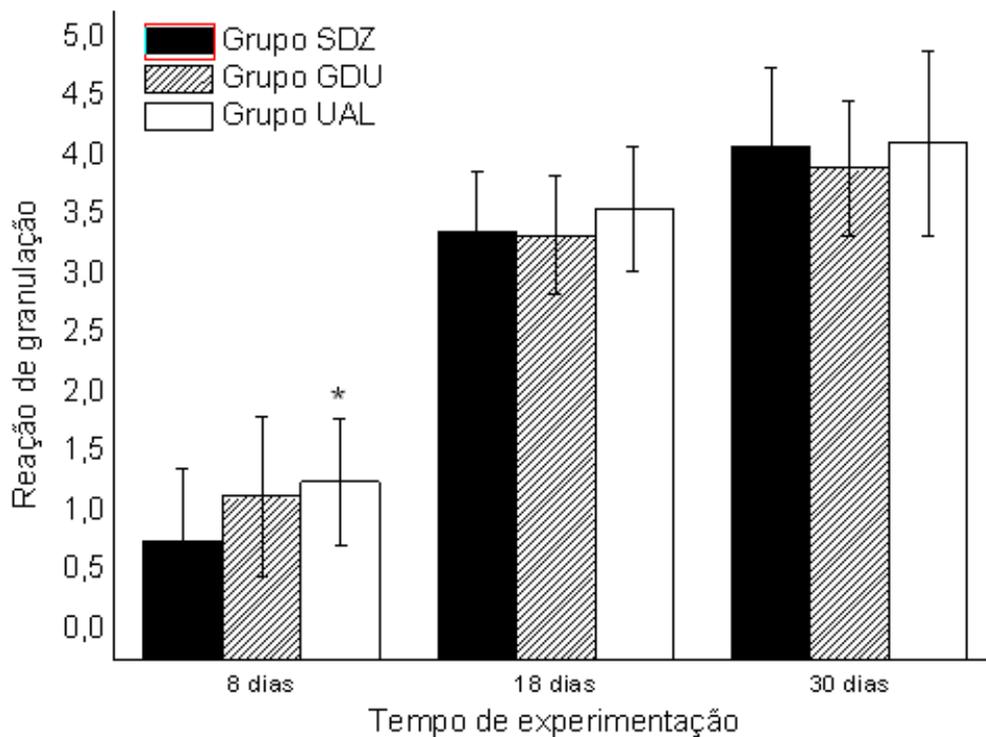


Figura 6. Análise semiquantitativa do perfil evolutivo da reação de granulação ao longo dos três períodos experimentais nos grupos SDZ, GDU e UAL. (*) diferença significativa entre os grupos UAL e SDZ no tempo de 8 dias.

5.2.2 Avaliação aos 8 dias

5.2.2.1 Sulfadiazina de prata (grupo SDZ)

Áreas marginais (secções macroscópicas A e D)

Nestas regiões, foi evidenciada extensa área de desnudamento epitelial e discreta faixa de epitélio escamoso residual. Este último mostrou sinais de proeminente degeneração hidrópica, embora a exocitose fosse inconspícua. Na profundidade, evidenciou-se infiltração predominantemente linfocitária de moderada intensidade. Em algumas áreas, foi possível identificar depósitos de material exógeno escurecido e grosseiramente granuloso, compatível com depósitos argíricos, tanto no citoplasma de fagócitos monucleares (histiócitos) quanto na membrana basal de vasos periféricos. Outra observação foi a moderada infiltração neutrofílica superficial, com intensa exsudação fibrinosa nas áreas marginais das feridas (Figura 7).

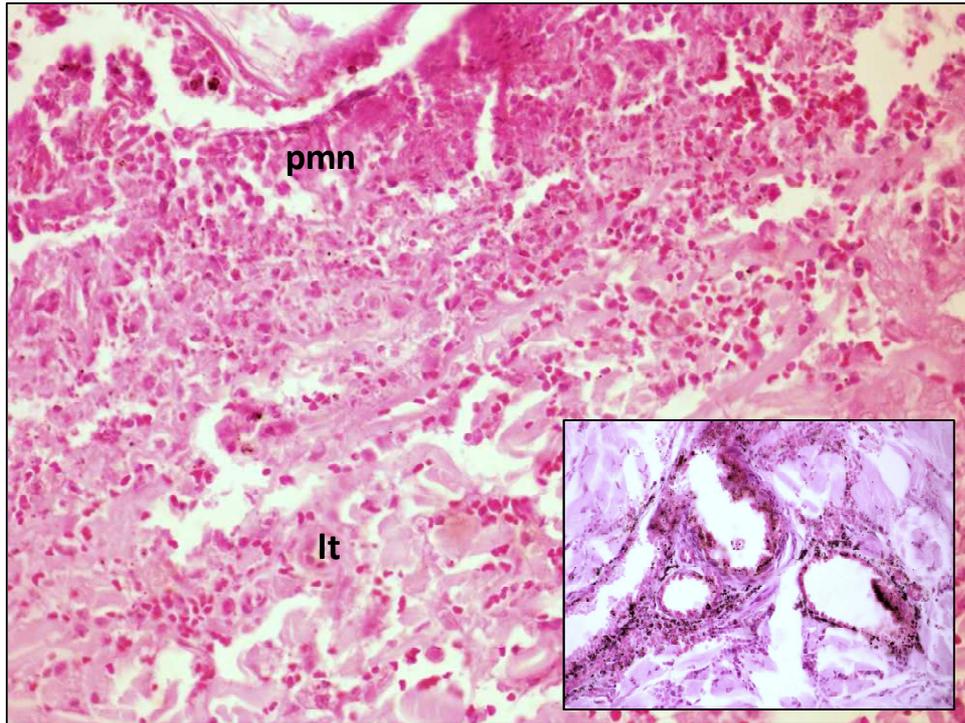


Figura 7. Ausência de revestimento epitelial escamosos e intensa infiltração de polimorfonucleares neutrófilos na área ulcerada (pmn) e linfócitos na lâmina própria (lt). Na imagem em destaque, observa-se material exógeno granuloso escurecido compatível com depósitos argíricos na membrana basal de vasos periféricos (HE, 400 x).

Áreas centrais (secções macroscópicas B e C)

Na porção central das feridas, observou-se extensa faixa superficial de tecido conjuntivo intensamente eosinofílico, com feixes fibrosos grosseiros e mal delimitados. O componente celular estava constituído por células ovaladas, fusiformes e estrelárias exibindo marcante picnose nuclear e intensa eosinofilia citoplasmática, características morfológicas compatíveis com necrose coagulativa. Subjacente a este tecido necrótico, evidenciou-se faixa de infiltração leucocitária composta por polimorfonucleares neutrófilos, se estendendo até a hipoderme (Figura 8). De especial interesse foi a observação de que a reação de granulação estava ainda bastante imatura (fase inflamatória, com discreta a moderada proliferação fibrovascular) e sempre limitada ao parênquima adiposo hipodérmico, que, na sua porção mais superficial, também mostrava sinais morfológicos de necrose, com formação de lóbulos bastante irregulares, perda de definição de limites citoplasmáticos de adipócitos e ausência de núcleos (Figura 9).

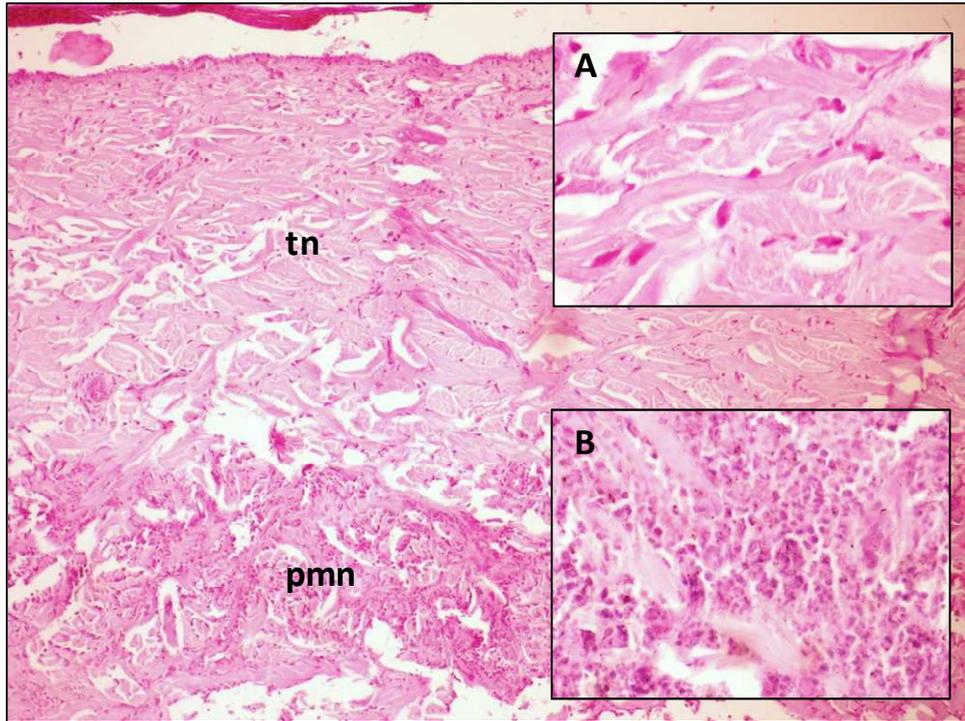


Figura 8. Extensa faixa de tecido conjuntivo hipocelular com aspecto necrótico superficial (tn) e infiltração profunda de polimorfonucleares neutrófilos (pmn) (HE, 100 x). Em maior detalhe (A) notam-se fibroblastos exibindo picnose nuclear e intensa eosinofilia citoplasmática típicas da necrose coagulativa; e (B) acúmulo de neutrófilos no tecido fibroso (HE, 400 x).

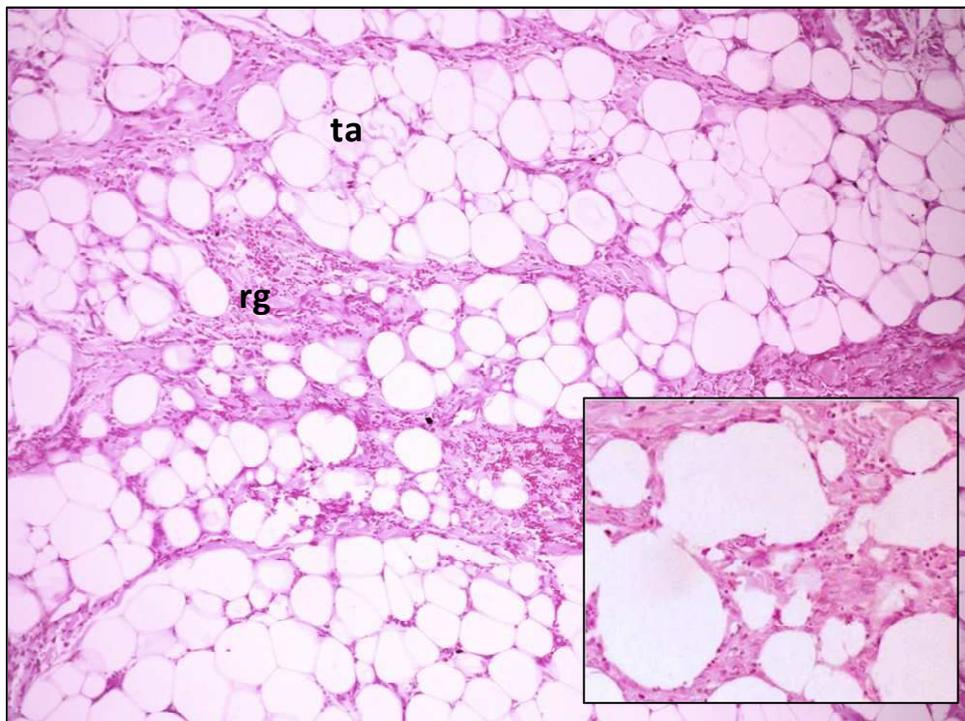


Figura 9. Reação de granulação imatura (rg) em meio ao tecido adiposo hipodérmico (ta) (HE, 100x). Em destaque, tecido adiposo irregular e anuclear necrótico (HE, 400x).

5.2.2.2 DuoDerme®(grupo GDU)

Áreas marginais(secções macroscópicas A e D)

Nas áreas marginais das feridas, o tecido conjuntivo fibroso mostrou-se necrótico com espessura variável, e subjacente, observou-se reação inflamatória com infiltrado neutrofílico de intensidade moderada a intensa, associada à discreta exsudação fibrinosa (Figura 10). A infiltração inflamatória observada na profundidade se mostrou predominantemente linfocitária e histocitária (Figura 11).

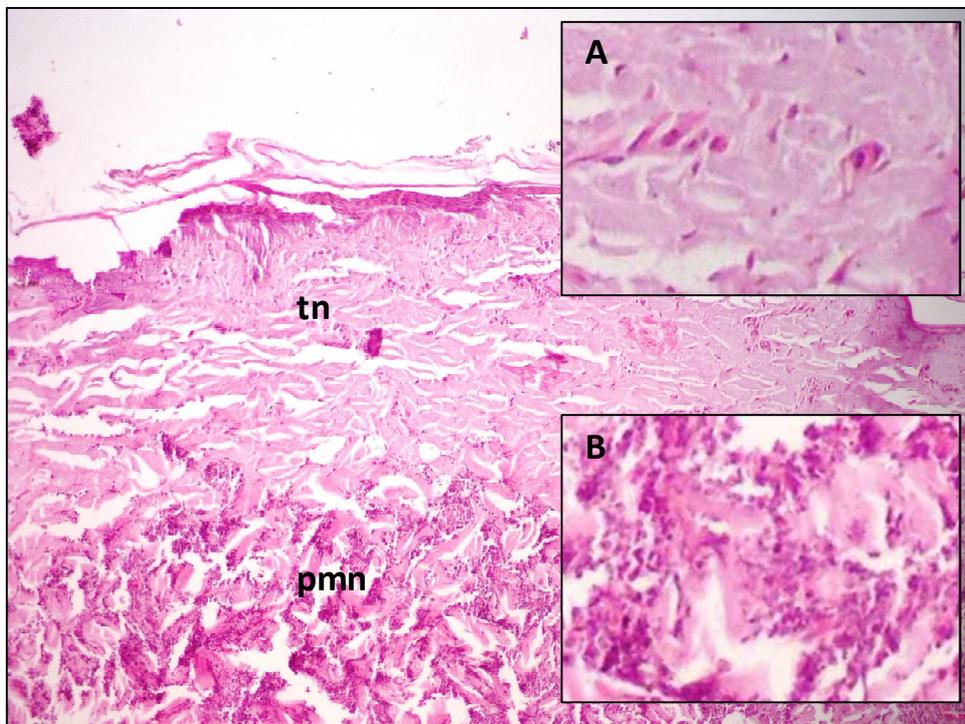


Figura 10. Extensa faixa de tecido conjuntivo hipocelular com aspecto necrótico superficial (tn) e infiltração profunda de polimorfonucleares neutrófilos (pmn) (HE, 100 x). Em maior detalhe (A) notam-se fibroblastos exibindo picnose nuclear e intensa eosinofilia citoplasmática típicas da necrose coagulativa; e (B) acúmulo de neutrófilos no tecido fibroso (HE, 400 x).

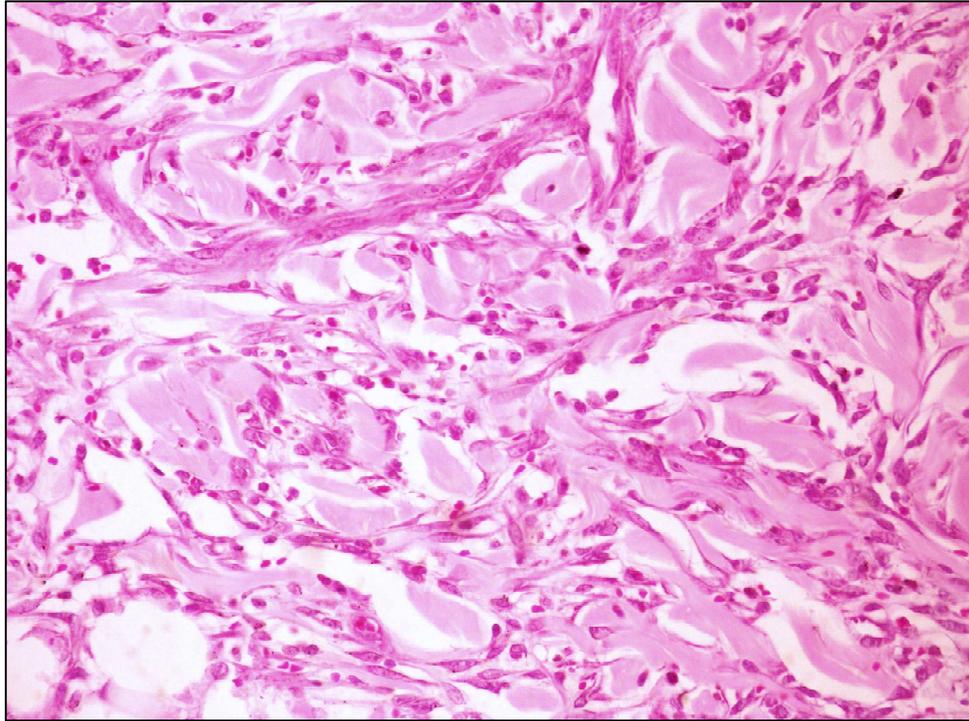


Figura 11. Região mais profunda da derme exibindo infiltração linfohistiocitária (HE, 400 x).

Áreas centrais (secções macroscópicas B e C)

Na porção superficial das feridas, a necrose do tecido conjuntivo fibroso mostrou-se semelhante a observada nas áreas marginais (Figura 12). O epitélio escamoso residual periférico apresentou áreas extensas de degeneração hidrópica e exocitose pronunciada. Na profundidade, a reação de granulação mostrou-se presente entremeada ao tecido adiposo e ocupando camadas profundas da derme, constituída por fibroblastos e células endoteliais, estas últimas formando inúmeros vasos sanguíneos (Figura 13).

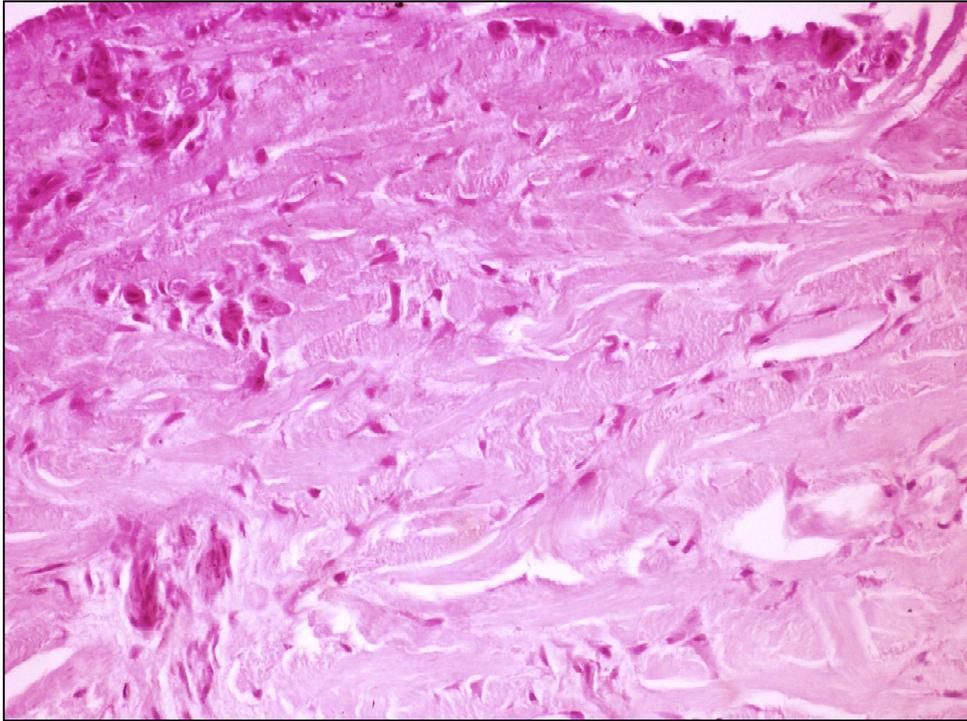


Figura 12. Tecido conjuntivo fibroso superficial apresentando características de necrose. Note células estromais com marcada picnose e intensa eosinofilia citoplasmática (HE, 400 x).

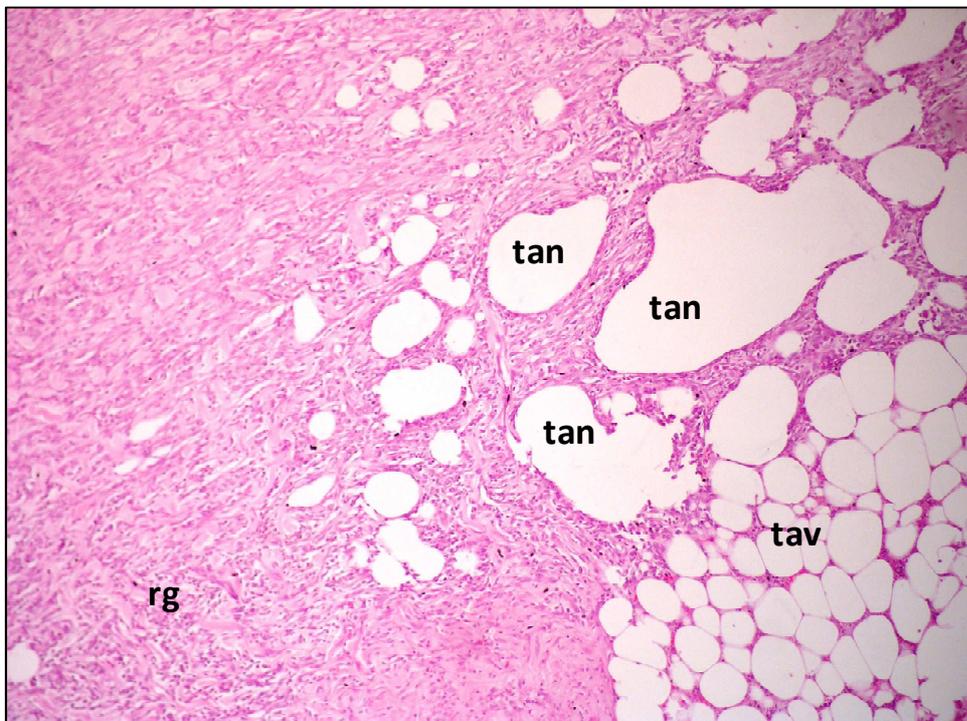


Figura 13. Porção profunda apresentando reação de granulação (rg) ainda rica em linfócitos, permeando tecido adiposonecrótico (tan). Notar lóbulo de tecido adiposo viável (tav) na hipoderme (HE, 100 x).

5.2.2.3 Membranas de gelatina com ácido úsnico/lipossomas (grupo UAL)

Áreas marginais (secções macroscópicas A e D)

Foi observada intensa infiltração neutrofílica, associada a exuberante exsudação fibrinosa, que se estendia ao longo da faixa de tecido necrótico superficial (Figura 14). O epitélio escamoso residual, semelhante aos demais grupos, exibia sinais de degeneração hidrópica e exocitose neutrofílica. Mais na profundidade, evidenciou-se infiltração predominantemente linfocitária de moderada intensidade. Na porção hipodérmica, notou-se formação de reação de granulação imatura permeando lóbulos de tecido adiposo ora viável ora necrótico (Figura 15).

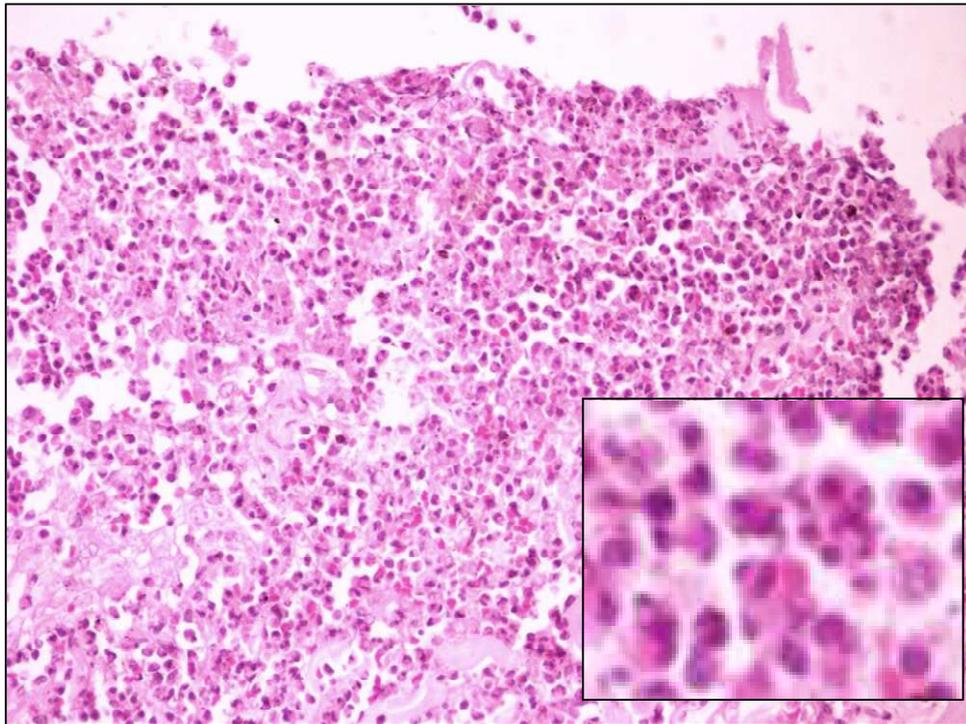


Figura 14. Infiltração intensa de polimorfonucleares neutrófilos na superfície da lesão (HE, 200 x). Em destaque, neutrófilos, exibindo núcleos trilobados e chanfrados (HE, 800 x).

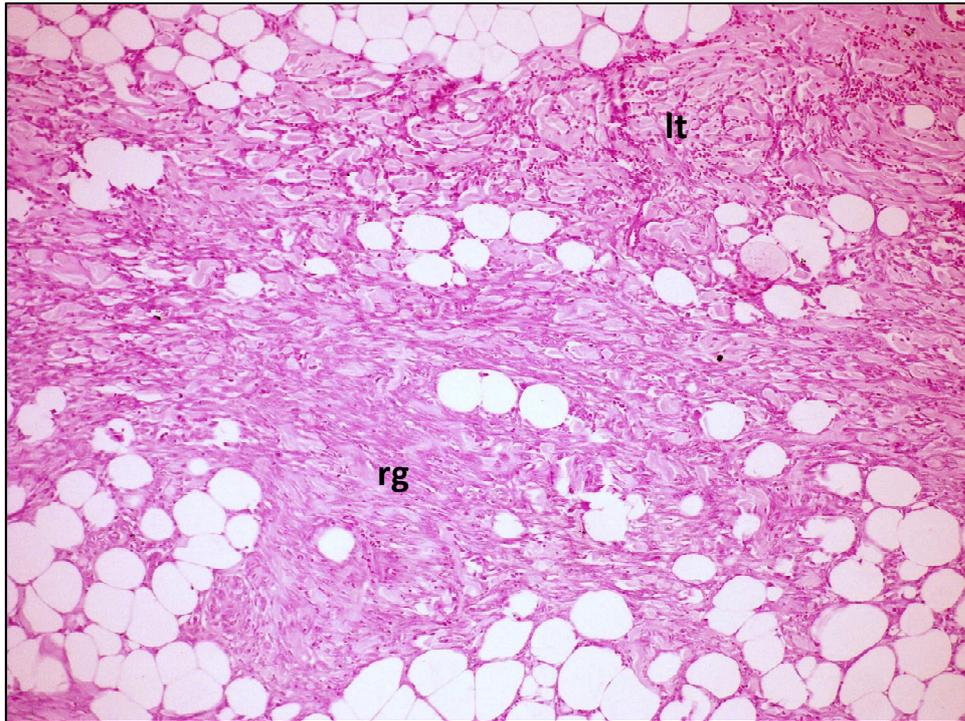


Figura 15. Região mais profunda do espécime, exibindo infiltração inflamatória predominantemente linfocitária na derme reticular (lt) e reação de granulação imatura na hipoderme (rg) (HE, 100 x).

Áreas centrais(secções macroscópicas B e C)

Na porção central da ferida, também foi observada extensa faixa necrótica superficial, bem como faixa de infiltração neutrofílica de espessura variável disposta imediatamente abaixo deste tecido não viável (Figura 16). A reação de granulação se mostrou exuberante e madura, sendo constituída por marcante proliferação de células fusiformes, interpretadas como fibroblastos e angioblastos em associação a fibrilas delgadas de material fibroso eosinofílico compatível com colágeno. Esta estendia-se desde a hipoderme, onde entremeava o tecido adiposo lobular, até a porção média da derme, indicando início de neoformação tissular na área lesada (Figura 17).

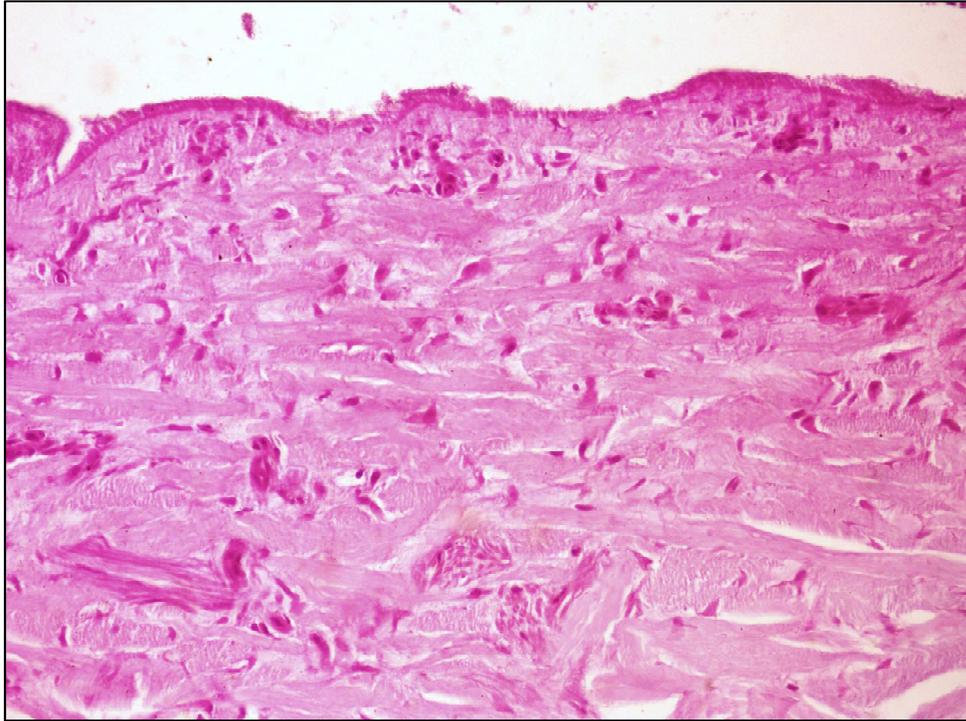


Figura 16. Área de necrose superficial do tecido conjuntivo fibroso, semelhante àquelas vistas nos demais grupos (HE, 400 x).

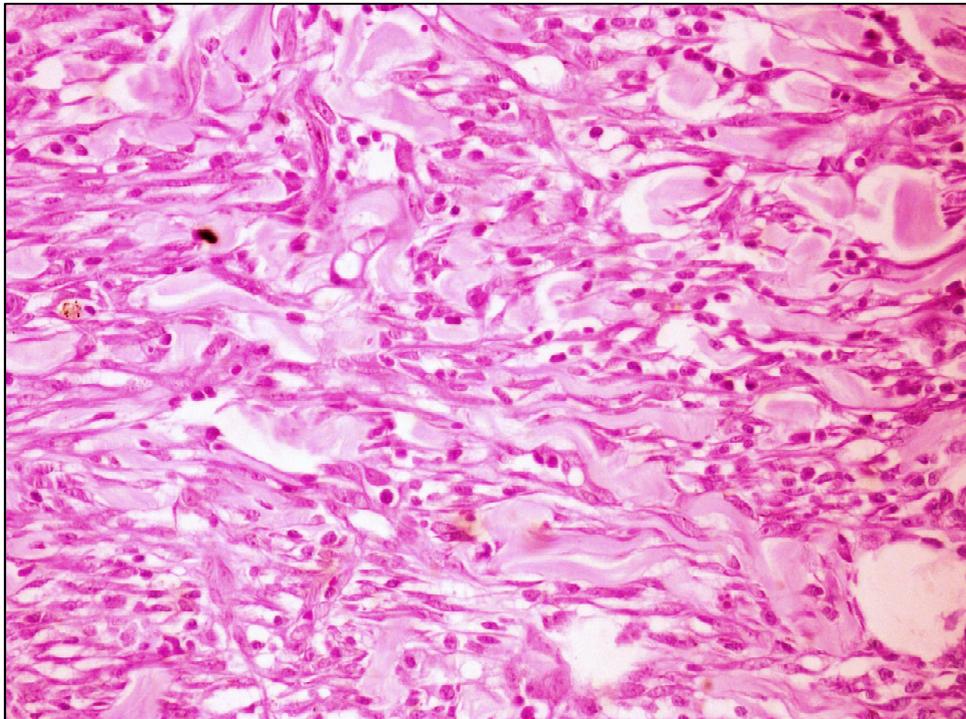


Figura 17. Reação de granulação exuberante observada na profundidade do espécime (HE, 400 x).

5.2.3 Avaliação aos 18 dias

5.2.3.1 Sulfadiazina de prata (grupo SDZ)

Áreas Marginais (secções macroscópicas A e D)

No grupo SDZ a neoformação epitelial epidérmica, ainda mostrou-se bastante incipiente, recobrando menos de 10% da superfície da ferida. A faixa de tecido de granulação mostrou-se extremamente larga e exuberante, estendendo-se desde a superfície à profundidade (Figura 18). Particularmente na região superficial, verificou-se a presença de inúmeros vasos sanguíneos irregulares, muitos deles em forma de fenda, dispostos perpendicularmente à superfície da lesão. A reação de granulação mostrou-se fibrocelular, caracterizando-se por intensa proliferação de células ovaladas e fusiformes paralelamente organizadas em relação à superfície da ferida, em associação a feixes fibrilares delicados de fibras colágenas. De permeio, foi evidenciada a intensa infiltração inflamatória, predominantemente linfocitária (Figura 19). Na profundidade, verificou-se reação de granulação caracterizada por marcante proliferação fusocelular e intensa infiltração inflamatória, predominantemente linfocitária (Figura 20).

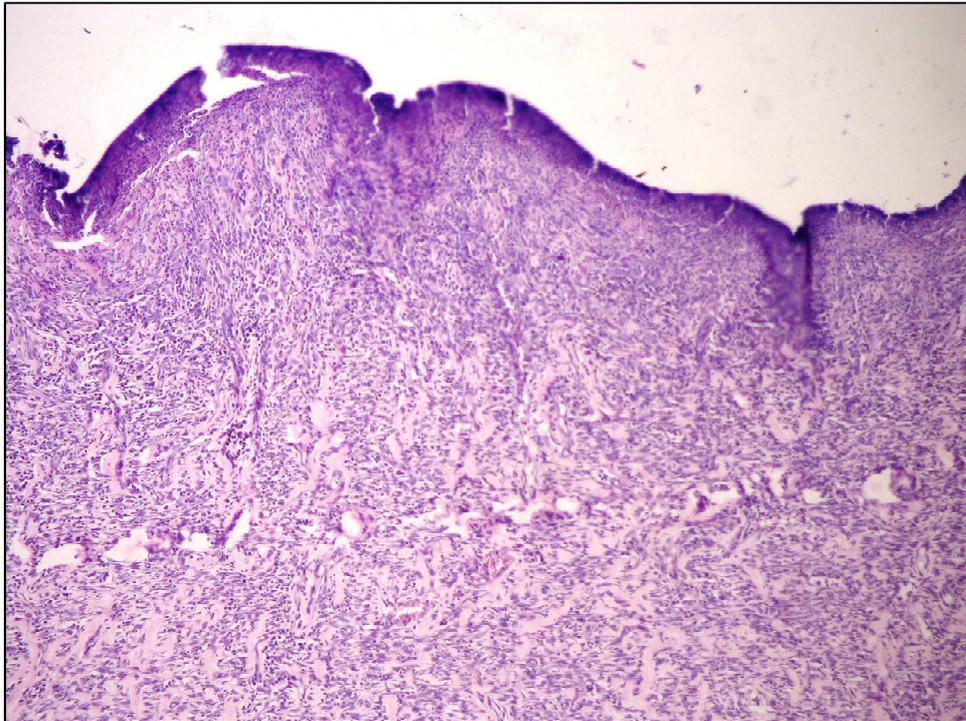


Figura 18. Reação de granulação exuberante rica em células fusiformes interpretadas como fibroblastos observada na superfície da ferida (HE, 100 x).

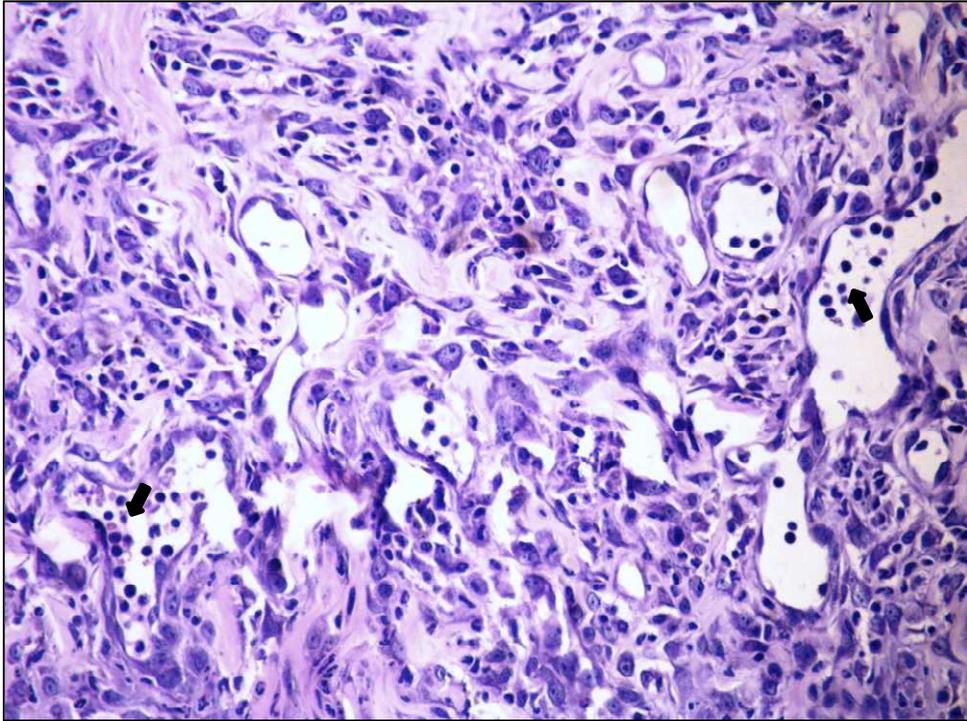


Figura 19. Reação de granulação fibrovascular permeada por infiltrado inflamatório linfo-histiocitário na superfície do espécime. Observar formação de vasos irregulares de pequeno calibre, muitos deles exibindo vasculite (HE, 400 x).

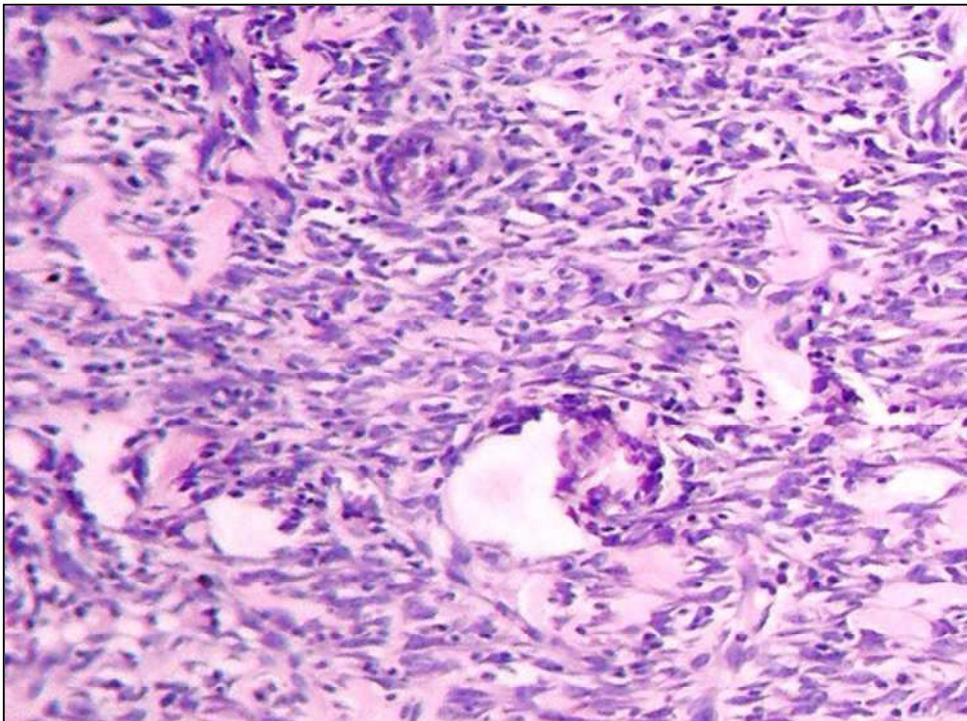


Figura 20. Reação de granulação caracterizada por marcante proliferação fusocelular e intensa infiltração de linfócitos (HE, 400 x).

Áreas Centrais (secções macroscópicas B e C)

Nas regiões centrais dos espécimes analisados não foi observada neoformação epidérmica. O padrão morfológico de reparo se caracterizou por reação de granulação imatura, composta por uma rica rede de vasos sanguíneos tortuosos e organizados perpendicularmente à superfície da ferida, associada a proliferação exuberante de células fusiformes e ovaladas, orientadas em feixes contínuos e paralelos, acompanhando a disposição de fibrilas eosinofílicas delicadas interpretadas como colágeno (Figura 21). Em adição, evidenciou-se reação inflamatória intensa, constituída predominantemente de linfócitos e histiócitos, além de ocasionais plasmócitos. De especial interesse foi o fato de que a faixa de reação de granulação apresentou-se bastante espessa, ocupando todo o espaço entre a hipoderme e a superfície (Figura 22).

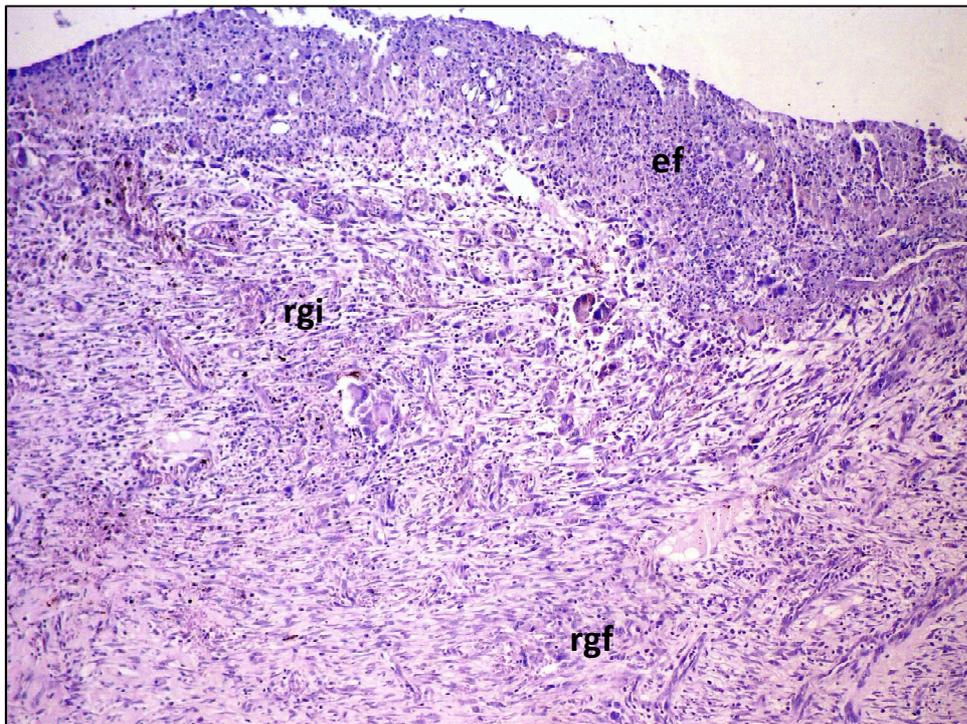


Figura 21. Área central ainda mostrando extensa área de úlcera recoberta por pseudomembrana formada de exsudato fibrinoso e restos de neutrófilos (ef). Reação de granulação imatura (rgi) rica em linfócitos na região equivalente à derme papilar, e reação de granulação mais fibrocelular (rgf) na derme reticular profunda (HE, 100 x).

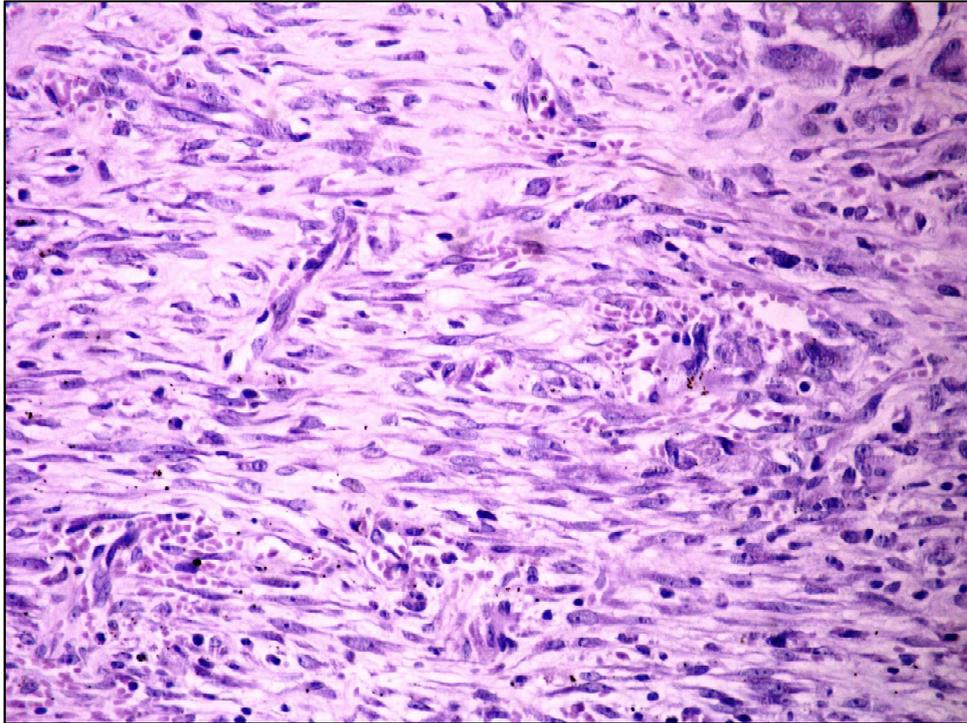


Figura 22. Reação de granulação exibindo componente fibroblástico exuberante, vasos sanguíneos mal formados e de pequeno calibre e infiltração linfo-histiocitária importante (HE, 400 x).

5.2.3.2 DuoDerme® (grupo GDU)

Áreas marginais (secções macroscópicas A e D)

No grupo GDU, a superfície epitelial apresentou-se parcialmente revestida por epitélio escamosoortoqueratinizado, e, na derme subjacente, observou-se reação de granulação fibrocelular (madura) exuberante (Figura 23). Em detalhe, o epitélio escamoso neoformado exibiu acantose e áreas de hiperplasia, recobrando entre 10 a 30% da superfície da ferida (Figura 24). Verificou-se ausência de camada epitelial granulosa evidente. A reação de granulação mostrou-se exuberante, ricamente celularizada, com intenso contingente vascular. A população fusocelular estava organizada de forma paralela a superfície da ferida e os vasos sanguíneos se mostraram ora em fenda, com disposição perpendicular as fibras, ora mais abertos e hiperemiados, sugerindo maior maturidade. O tecido conjuntivo fibroso apresentou-se delicado, com espaços intercelulares bastante alargados, sugerindo a presença de um edema intersticial importante. Ainda observou-se moderado infiltrado inflamatório, predominantemente linfocitário (Figura 25).

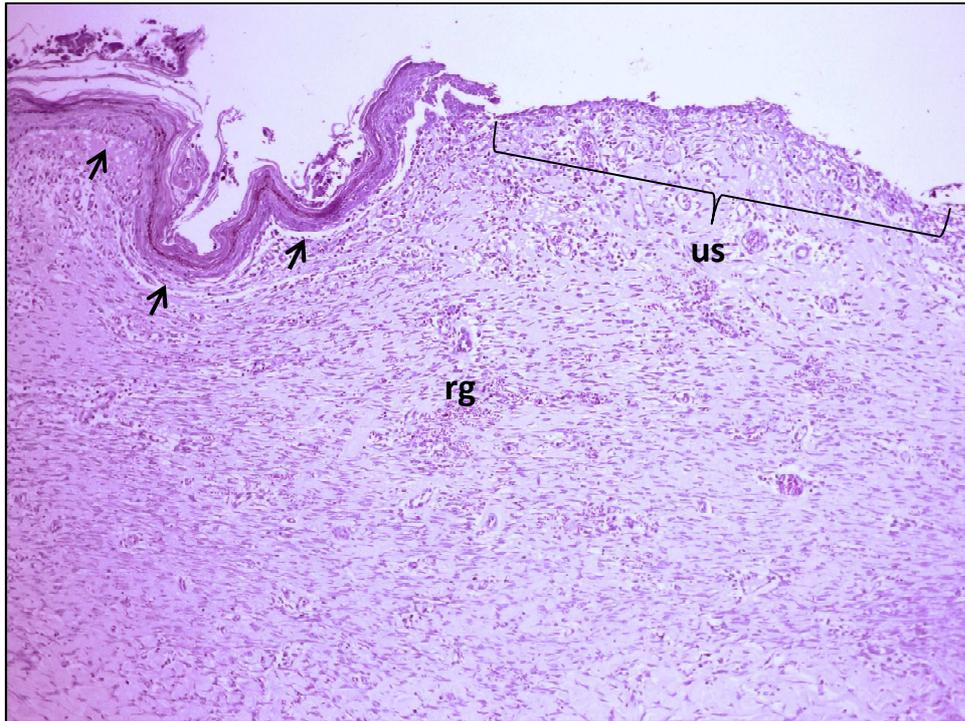


Figura 23. Área de transição entre a superfície epitelizada (setas) e a área de ulceração superficial persistente (us). Na derme subjacente, nota-se reação de granulação madura (rg) (HE, 100 x).

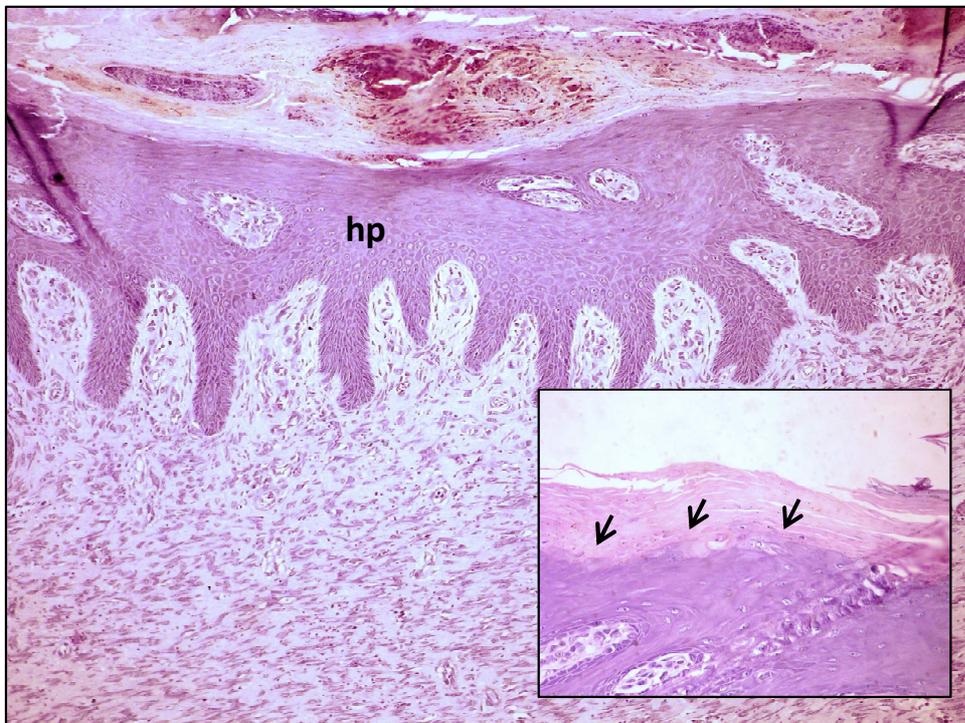


Figura 24. Área de hiperplasia e acantose do epitélio escamoso (hp) (HE, 100 x). No detalhe, observa-se ausência de camada granulosa indicando padrão imaturo de ortoqueratinização (setas) (HE, 400 x).

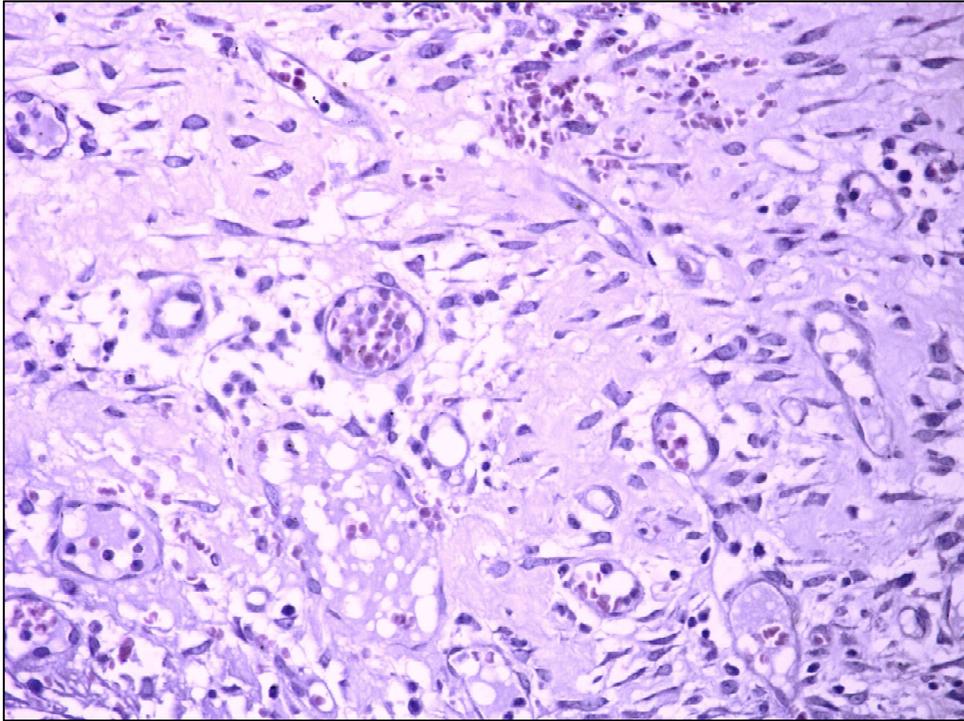


Figura 25. Tecido conjuntivo exibindo área de neoformação de vasos capilares dilatados e congestos abundante e edema intersticial marcante (HE, 400 x).

Áreas centrais (secções macroscópicas B e C)

O revestimento epitelial, apesar de ainda parcial (entre 10 a 30% da superfície da ferida) exibiu áreas de proeminente hiperplasia, ora formando papilas delgadas e profundas para o tecido conjuntivo ora apresentando padrão morfológico arciforme, em associação a acantose pronunciada em algumas áreas. Na superfície, a camada córnea mostrou-se constituída de extensa faixa de ortoqueratina e a camada granulosa evidenciou-se ora discreta ora espessa (Figura 26). A reação de granulação mostrou-se imatura, semelhante ao grupo SDZ, disposta pelo tecido que se estendeu por todas as camadas da derme. O contingente vascular foi composto por vasos sanguíneos em formato de fenda, perpendiculares a superfície e por vasos mais arredondados. Ainda verificou-se reação inflamatória profusa, com predomínio de infiltrado linfocitário. Na profundidade, observou-se um intenso contingente de vasos sanguíneos irregulares sustentados por fibras de colágeno delgadas e delicadas (Figura 27). De especial interesse foi a observação de tecido adiposo não viável remanescente, permeando a reação de granulação de todos os espécimes.

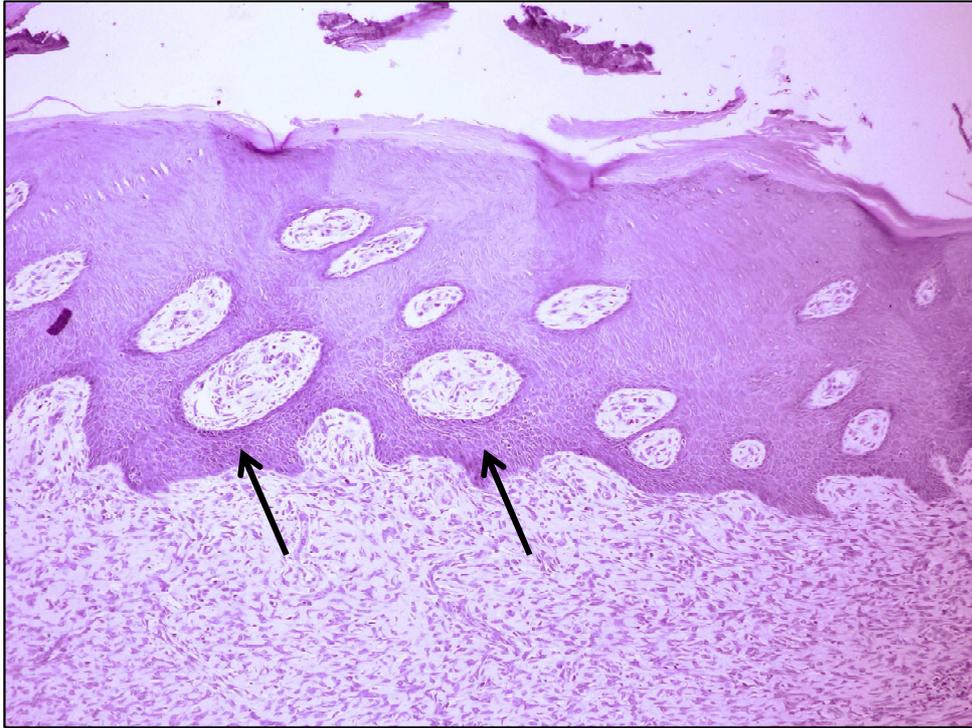


Figura 26. Área de revestimento epitelial exibindo intensa hiperplasia e acantose, arranjado em padrão papilar arciforme (setas) (HE, 200 x).

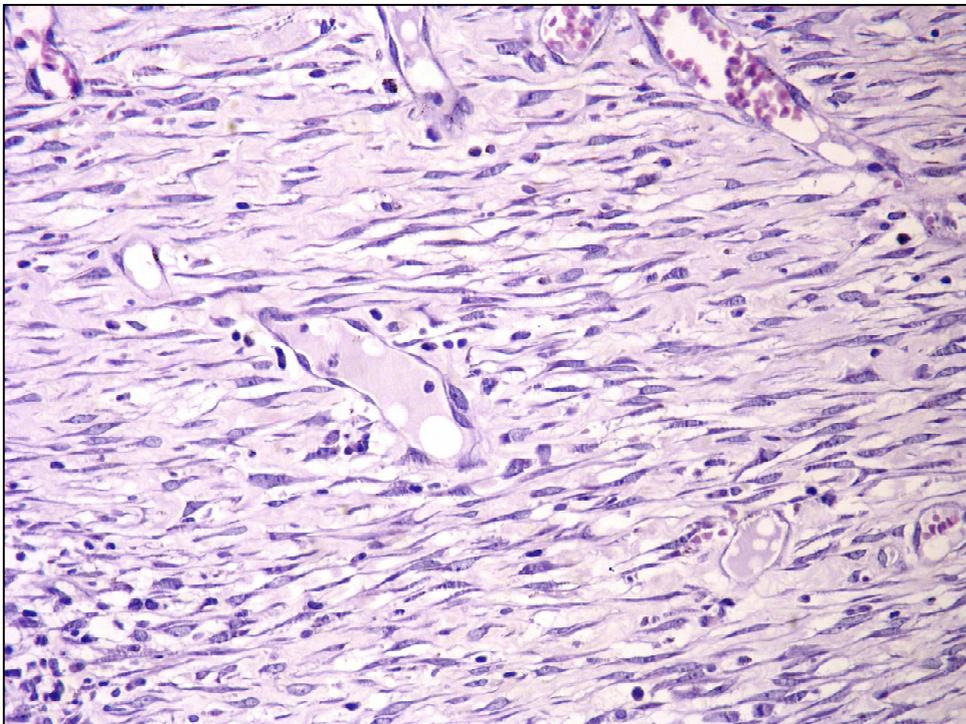


Figura 27. Reação de granulação na profundidade do espécime exibindo intenso contingente de vasos sanguíneos irregulares sustentados por fibras de colágeno delgadas e delicadas (HE, 400 x).

5.2.3.3 Membranas de gelatina com ácido úsnico/lipossomas(UAL)

Áreas marginais (secções macroscópicas A e D)

O padrão morfológico da área marginal do UAL mostrou-se diferente em relação ao grupo SDZ e semelhante ao grupo GDU. A superfície epitelial apresentou formação parcial do epitélio acantótico e hiperplásico, exibindo camada granulosa delgada, em algumas áreas e inexistente em outras (Figura 28). A reação de granulação se mostrou exuberante, bastante celularizada, com intenso contingente de vasos e ora mais abertos, eventualmente congestos (capilares hiperemiados), sugerindo maior maturidade desta fase do processo de reparo cicatricial. Foi ainda observada reação inflamatória linfocitária de magnitude moderada, que se estendia desde a superfície até a profundidade dos espécimes. Na profundidade o tecido conjuntivo fibroso apresentou-se delicado com fibras de colágeno delgadas e paralelas (Figura 29).

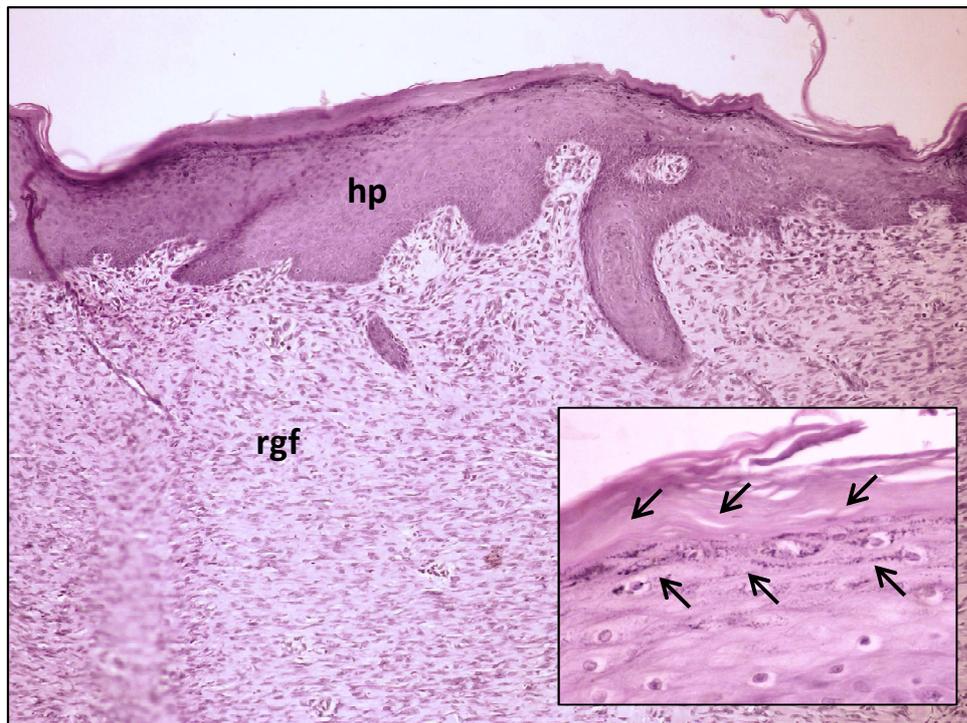


Figura 28. Área marginal exibindo revestimento epitelial acantótico e hiperplásico (hp) e reação de granulação fibrocelular subjacente (rgf) (HE, 100 x). Em destaque, formação de camada granulosa delgada (setas) na superfície epitelial (HE, 400 x).

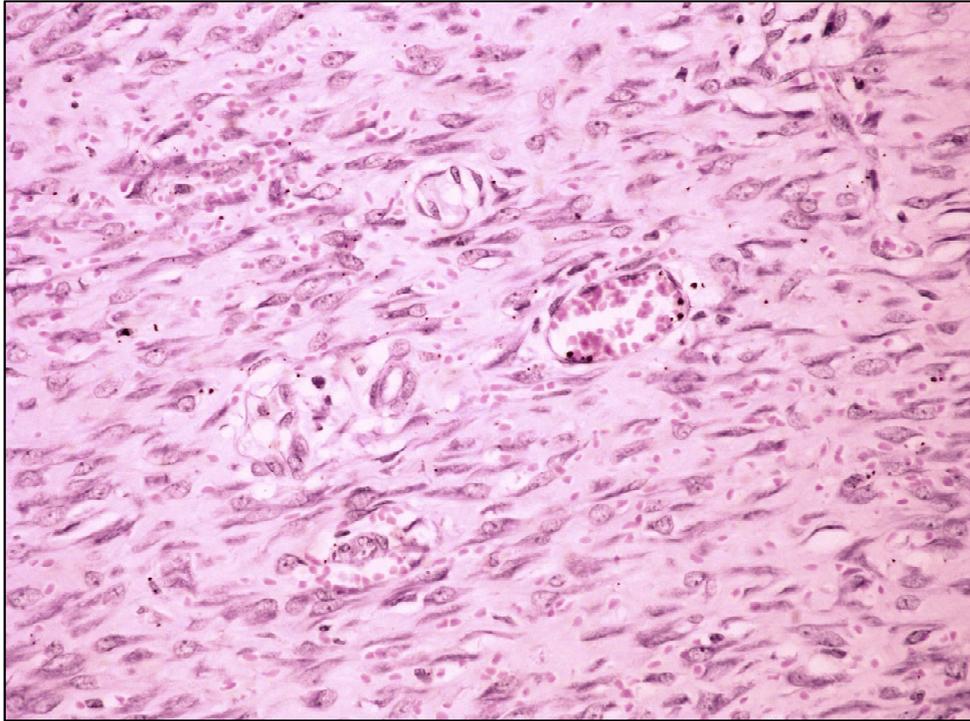


Figura 29. Reação de granulação bastante celularizada, com intenso contingente vascular na profundidade do espécime (HE, 400 x).

Áreas centrais (secções macroscópicas B e C)

Em todos os espécimes, o revestimento epitelial (entre 10 a 30% da superfície da ferida) apresentou áreas de hiperplasia, acantose e ortoqueratinização, associada a áreas de ulceração remanescente. A camada granulosa mostrou-se evidente, porém delgada (Figura 30). Subjacente, a reação de granulação mostrou-se exuberante e imatura, ocupando todas as camadas da derme. A presença de um grande contingente vascular disposto em fenda e perpendiculares ora abertos, aos inúmeros fibroblastos encontrados no tecido, apresentou extensa semelhança àquele padrão morfológico evidenciado no grupo GDU. A região mais superficial foi caracterizada por intensa infiltração inflamatória linfocitária e particularmente na profundidade, evidenciou-se a presença de depósitos de material eosinofílico hialino, compatível com colágeno imaturo, ocupando os espaços entre as células estromais, sugerindo maior densidade de colagenização (Figura 31).

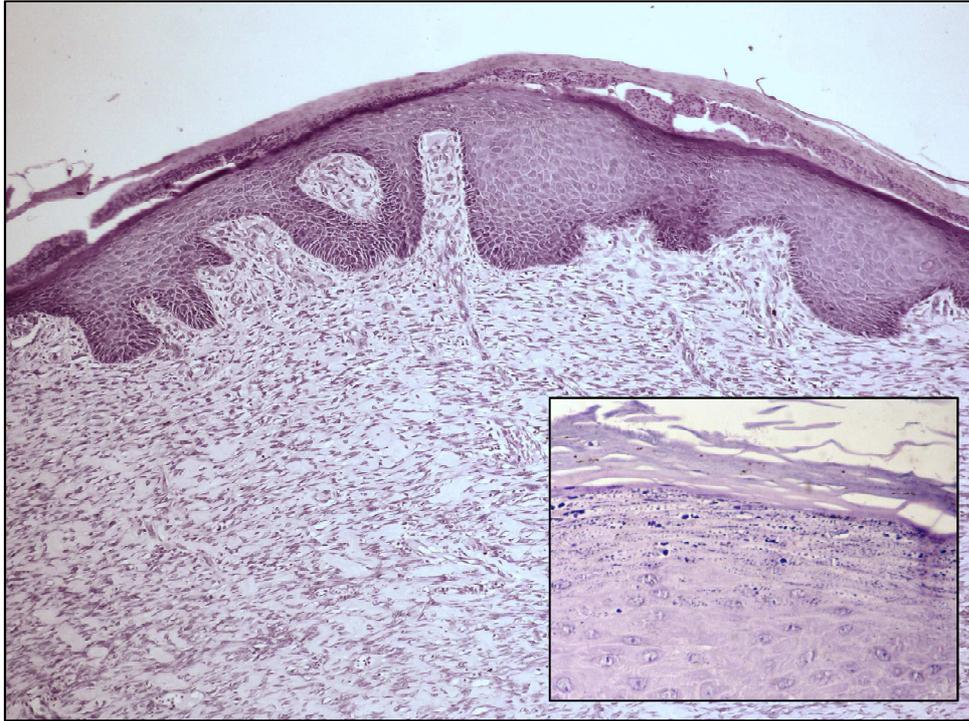


Figura 30. Área marginal exibindo revestimento epitelial acantótico e hiperplásico (hp) e reação de granulação fibrocelular subjacente (HE, 100 x). Em destaque, formação de camada granulosa na superfície epitelial (HE, 400 x).

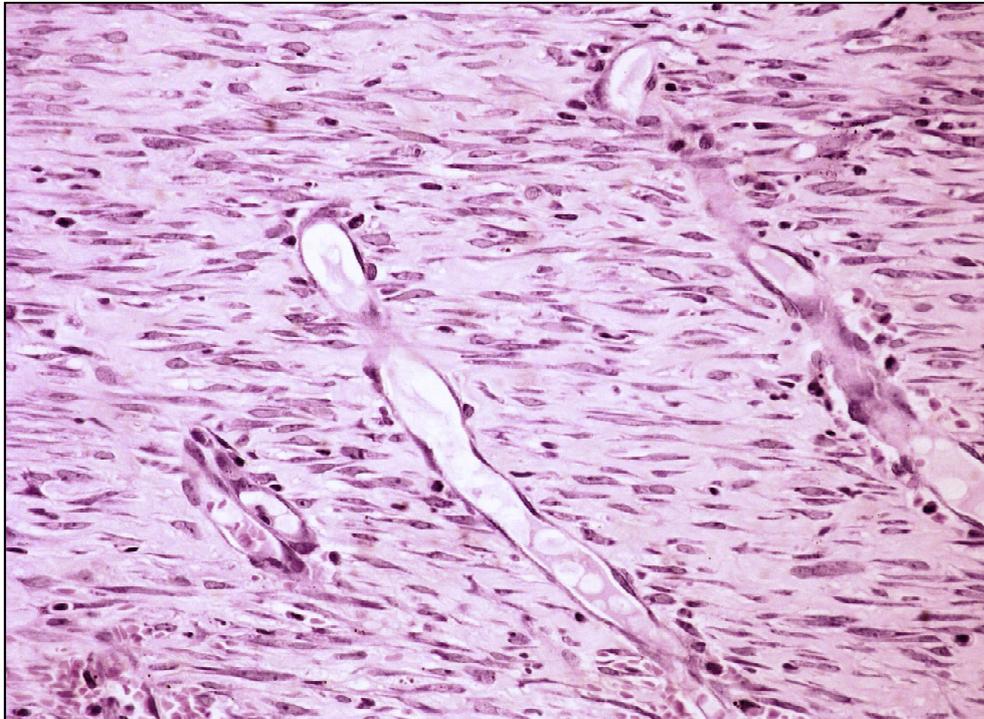


Figura 31. Reação de granulação exuberante e imatura, com grande contingente vascular disposto em fenda, inúmeros fibroblastos proliferando perpendicularmente aos vasos e moderada reação inflamatória linfocitária (HE, 400 x).

5.2.4 Avaliação aos 30 dias

5.2.4.1 Sulfadiazina de prata (grupo SDZ)

Áreas marginais (secções macroscópicas A e D)

Nestas áreas, foi observada extensa neoformação epidérmica, caracterizada por tecido epitelial escamoso levemente hiperplásico e acantótico, exibindo camada córnea ortoqueratinizada espessa. De especial interesse foi a evidenciação de camada epitelial granulosa bem demarcada, embora ainda pouco proeminente (Figura 32). Por outro lado, as áreas de desnudamento do tecido conjuntivo (áreas ulceradas remanescentes) se mostraram pouco evidentes. No conjuntivo subjacente, observou-se reação de granulação exuberante, bastante celular, composta por moderada rede vascular orientada perpendicularmente às fibrilas de colágeno, estas últimas muito delicadas e com orientação paralela. Em algumas regiões do espécime, em especial na profundidade, a rede vascular se mostrou menos irregular e mais dilatada e congesta (capilares hiperemiados). Outra observação foi a evidente redução da intensidade da reação inflamatória, predominantemente linfocitária (Figura 33).

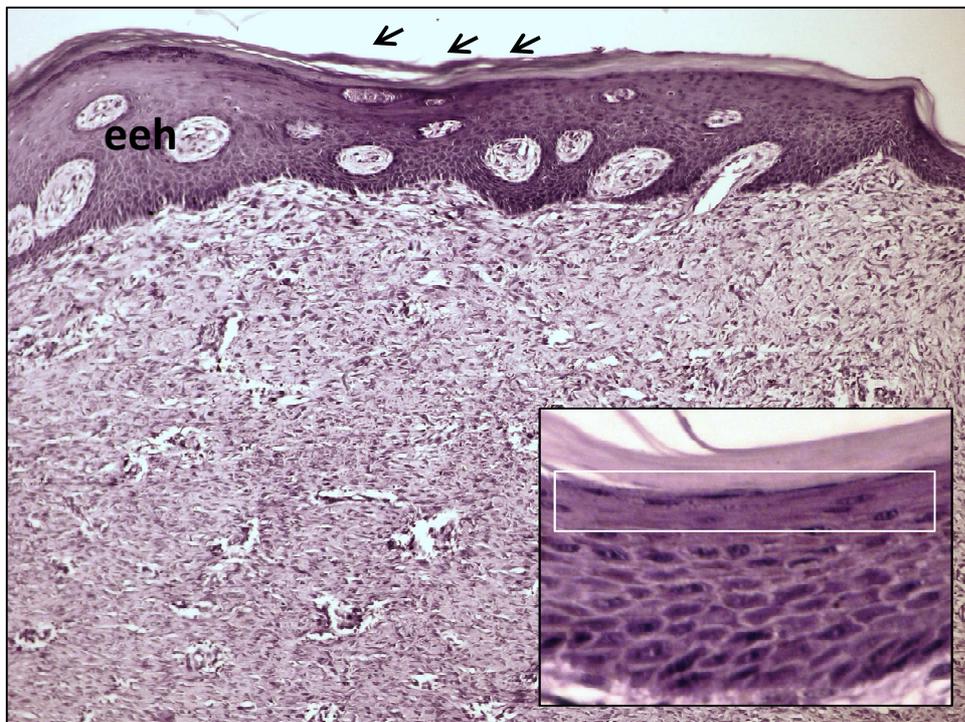


Figura 32. Epitélio escamoso hiperplásico e acantótico (eeh) ortoqueratinizado (setas) revestindo a margem da queimadura (HE, 100 x). Em destaque, observa-se camada granulosa epitelial bem formada, embora delgada (HE, 400 x).

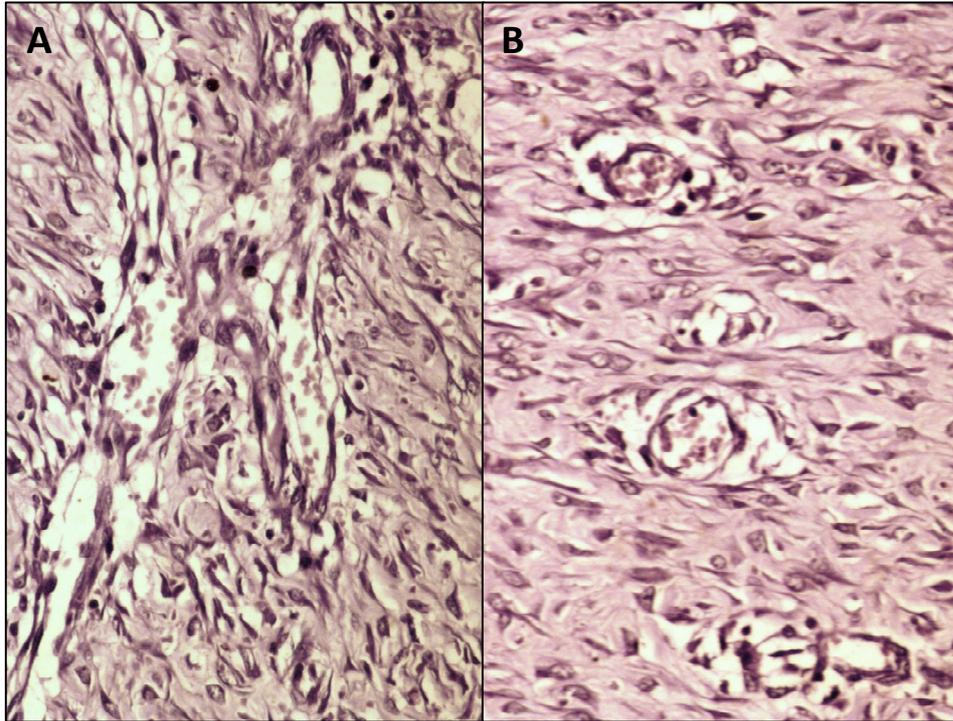


Figura 33. (A) Reação de granulação com moderado contingente vascular orientada perpendicularmente às fibrilas de colágeno na derme mais superficial; (B) rede vascular mais regular, dilatada e congesta na derme profunda (HE, 400 x).

Áreas centrais (secções macroscópicas B e C)

O epitélio mostrou-se levemente acantótico, hiperplásico e hiperqueratinizado, porém com ausência de camada granulosa proeminente e com pequenas áreas não reepitelizadas nas porções do espécime voltadas para o centro da ferida (Figura 34). Nas regiões mais periféricas dos espécimes, o tecido conjuntivo apresentou moderada infiltração inflamatória linfohistiocitária, disposta em faixa que ocupava o terço superior da derme. Nas regiões voltadas para o centro dos espécimes, a reação de granulação se mostrou ricamente celularizada e intensamente vascularizada (Figura 35), ocupando uma ampla faixa correspondente a aproximadamente dois terços da derme. A população fusocelular, constituída de células alongadas e ovaladas interpretadas como fibroblastos ativos, mostrou-se densamente organizados em feixes paralelos, enquanto que o contingente de vasos sanguíneos maturos e em fenda, apresentaram-se organizados perpendicularmente à superfície da ferida. Somente na profundidade, observou-se a ausência da reação de granulação e a presença de fibrócitos dispostos em uma sutil rede de fibrilas de colágeno.

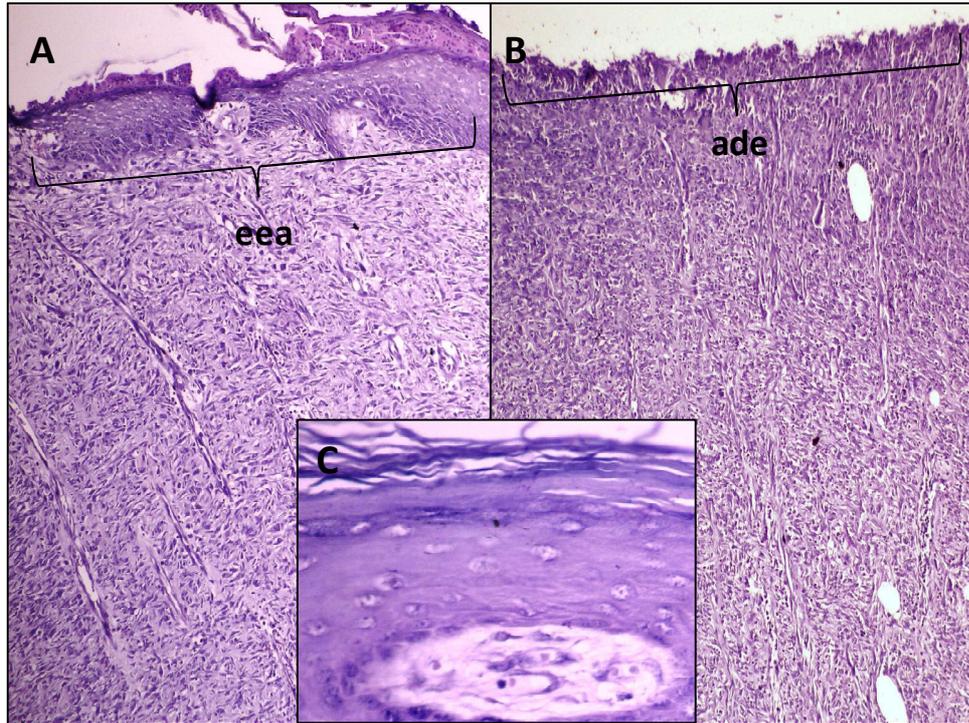


Figura 34. (A) Área exibindo revestimento epitelial escamoso acantótico (eea) e (B) área exibindo desnudamento epitelial (ade) (HE, 100 x). Em destaque (C) observa-se detalhe do epitélio escamoso, mostrando ausência de camada granulosa (HE, 400 x).

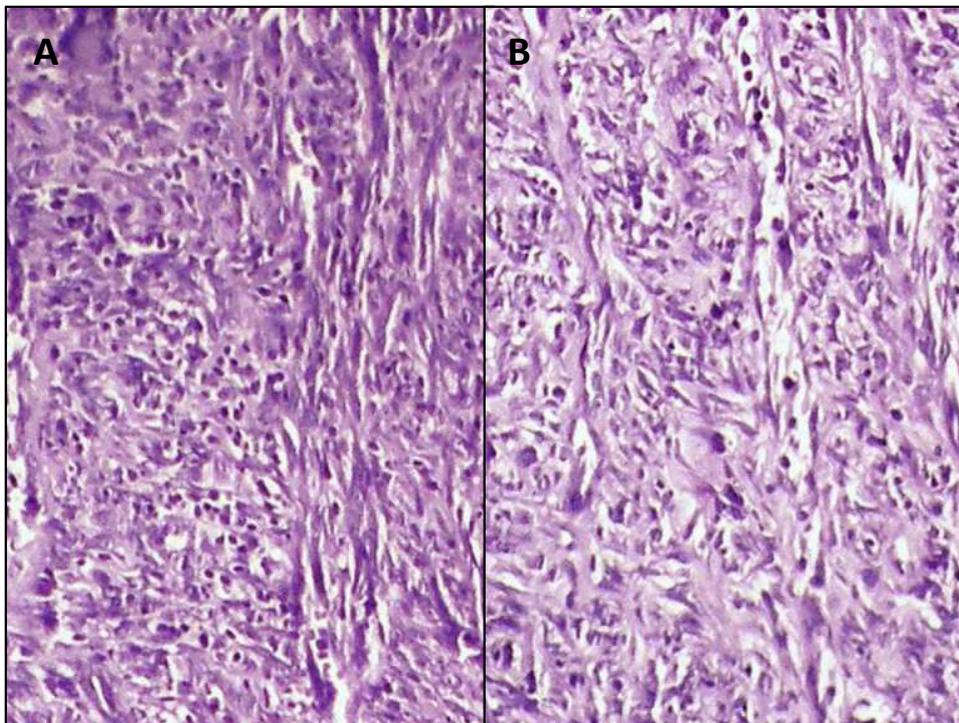


Figura 35. (A) Áreas mais superficiais exibindo moderada infiltração inflamatória linfohistiocitária e reação de granulação vascular. (B) Áreas mais profundas exibindo reação de granulação ricamente celularizada e intensamente vascularizada. Com clara redução do contingente inflamatório (HE, 200 x).

5.2.4.2 DuoDerme[®] (grupo GDU)

Áreas marginais (secções macroscópicas A e D)

A superfície das feridas mostrou neoformação epidérmica completa, constituída por epitélio escamoso acantótico, hiperplásico e hiperortoqueratinizado, exibindo camada granulosa ainda delgada e delicada. Em região subepitelial, observou-se reação de granulaçãoricamente celular, com fibroblastos volumosos, de núcleos grandes, muitos deles exibindo morfologia estrelária, de permeio a tecido conjuntivo fibroso constituído de fibras colágenas ainda delgadas e delicadas (Figura 36). A rede vascular ainda apresentou sedelicada, composta por alguns vasos dilatados, por vezes apresentando paredes mais espessas, compatíveis com vênulas e arteríolas e discreta inflamação crônica persistente, características compatíveis com reação de granulação madura residual. Nos dois terços subjacentes da derme evidenciou-se tecido conjuntivo mais maduro, representado por fibras de colágeno ora espessas e grosseiras ora delgadas e delicadas, de comprimento variável, permeadas por células fusiformes bastante delgadas e alongadas, com núcleos hiper cromáticos, interpretadas como fibrócitos, além dos fibroblastos ativos característicos, mais ovalados e com núcleos mais volumosos. O contingente vascular, nestas regiões mostrou-se escasso, e a infiltração inflamatória crônica, quando observada, foi inconspícua, caracterizando a cicatriz fibrosa primária (Figura 37).

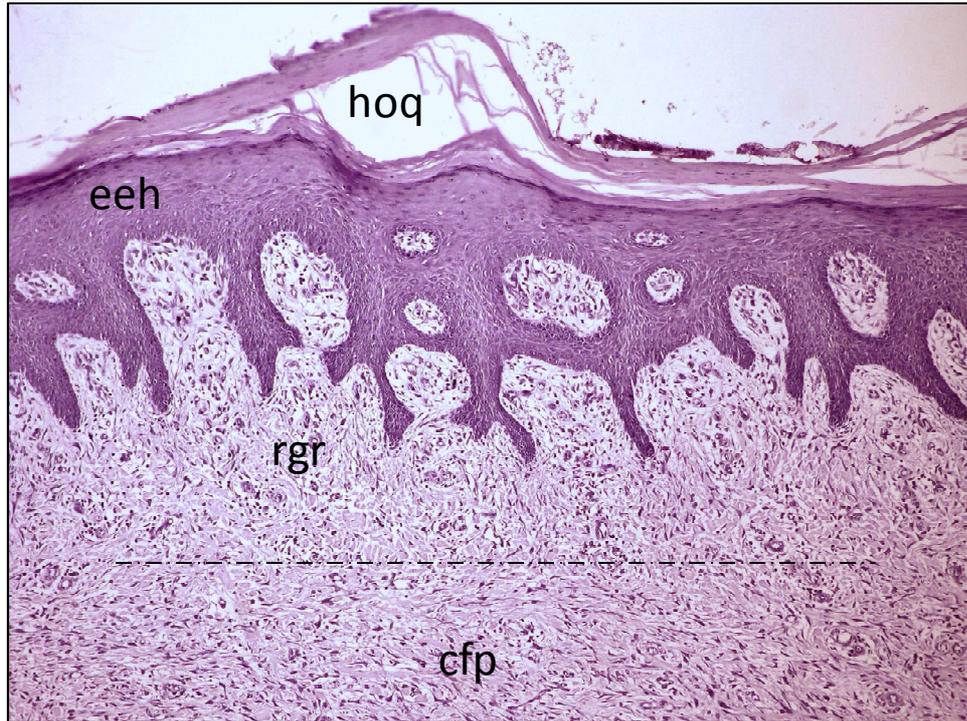


Figura 36. Superfície completamente revestida por epitélio escamoso hiperplásico (eeh) apresentando hiperortoqueratinização (hoq). Na derme superficial, observa-se reação de granulação residual (rgr) e na porção mais profunda, a cicatriz fibrosa primária (cfp). (HE, 100 x).

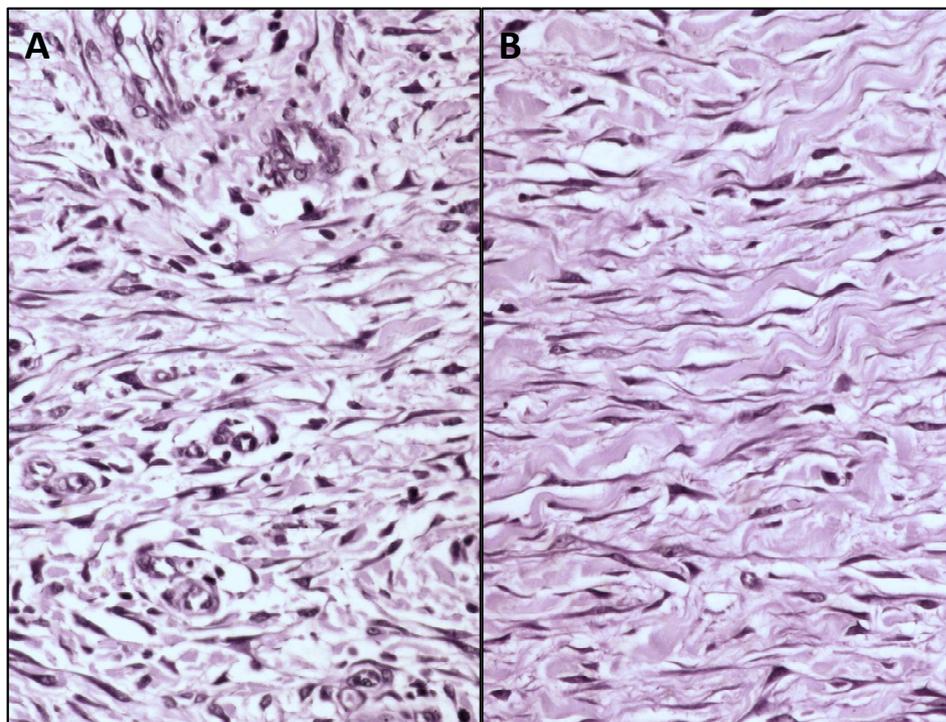


Figura 37. Detalhe da figura anterior exibindo reação de granulação residual em áreas mais superficiais (A) e cicatriz fibrosa primária na áreas mais profundas (B)(HE, 400 x).

Áreas Centrais (secções macroscópicas B e C)

O tecido epitelial escamoso mostrou-se hiperplásico, levemente acantótico, com camada granulosa bem marcada, porém ainda delgada. O desnudamento epitelial sutil foi evidenciado apenas na área mais central da lesão. Nas regiões mais periféricas (reepitelizadas), a reação de granulação residual apresentou-se claramente fibrocelular, estendendo-se para camadas mais profundas da derme. Nas áreas mais voltadas para o centro (adjacentes à região não epitelizada), observou-se proliferação celular intensa, com numerosos vasos sanguíneos neoformados, alguns deles perpendiculares às fibrilas de colágeno delicadas (Figura 38). Nos dois terços mais profundos, observou-se expressiva redução da celularidade e dos vasos sanguíneos, substituídos por fibrilas de colágeno mais alongadas, dispostas paralelamente, embora ainda delgadas. Outra observação foi a escassa presença de células inflamatórias no tecido conjuntivo (Figura 39).

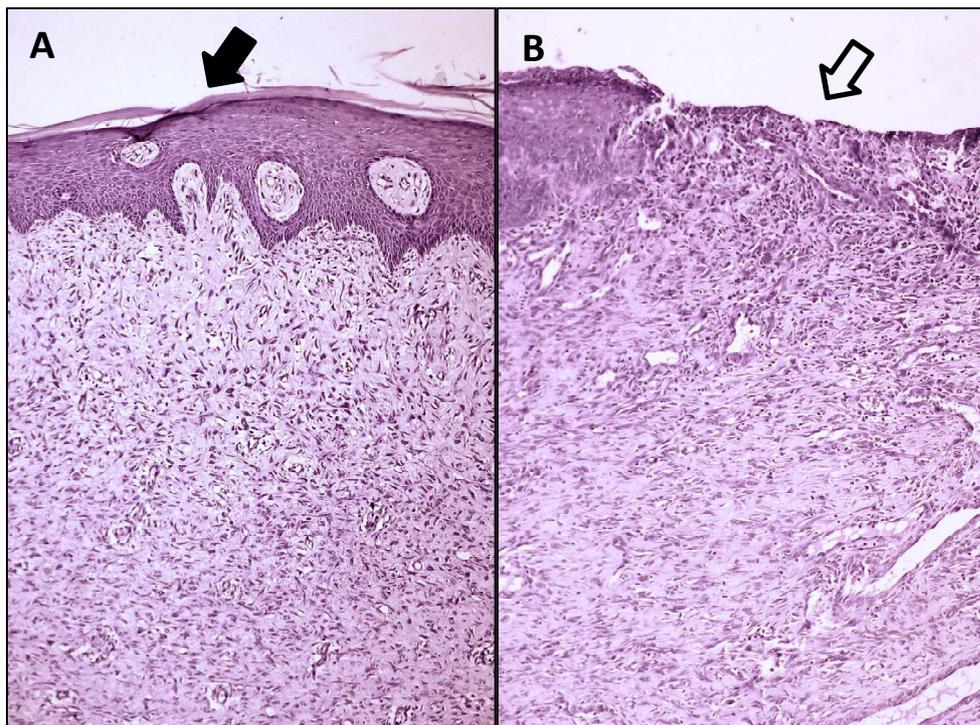


Figura 38. (A) Área cicatricial reepitelizada (seta cheia) exibindo, subjacente, tecido fibroso ricamente celularizado e moderadamente vascular. Notar vasos de calibre bastante diminutos sugerindo tratar-se de fase final da reação de granulação. (B) Área de persistência de ulceração (seta aberta), apresentando subjacente reação de granulação ainda em fase fibrovascular menos madura (HE, 100 x).

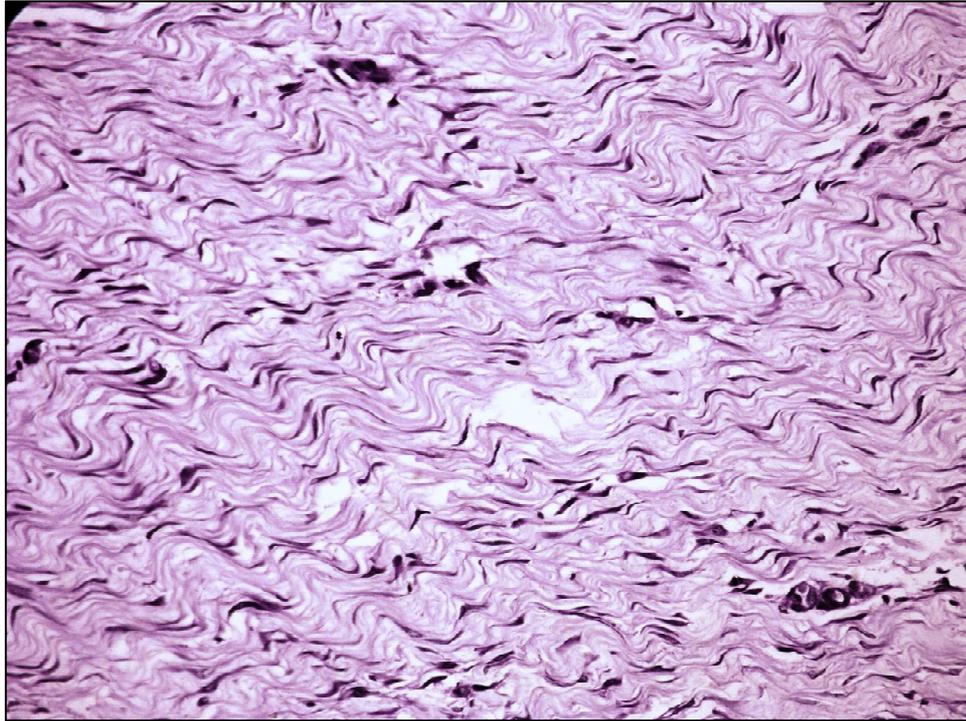


Figura 39. Tecido conjuntivo hipovascular composto por fibras delicadas e onduladas de colágeno compondo cicatriz fibrosa primária no terço profundo dos espécimes (HE, 400 x).

5.2.4.3 Membranas de gelatina com ácido úsnico/lipossomas (grupo UAL)

Áreas marginais (secções macroscópicas A e D)

A superfície da ferida apresentou-se completamente recoberta por tecido epitelial escamoso estratificado com marcante acantose, hiperplasia e hiperqueratose, exibindo camada granulosa mais espessa. A reação de granulação mostrou-se restrita a superfície imediatamente abaixo do epitélio, expressa por vasos sanguíneos redondos, bem abertos, porém de pequeno calibre e fibroblastos volumosos, de núcleos grandes, exibindo morfologia estrelária. Observou-se ainda áreas de discreto infiltrado inflamatório. Na profundidade, o tecido conjuntivo apresentou rede vascular moderada, representada por vênulas e arteríolas bem formadas, e evidenciou grande contingente de fibras colágenas densas e entrelaçadas (Figura 40 e 41).

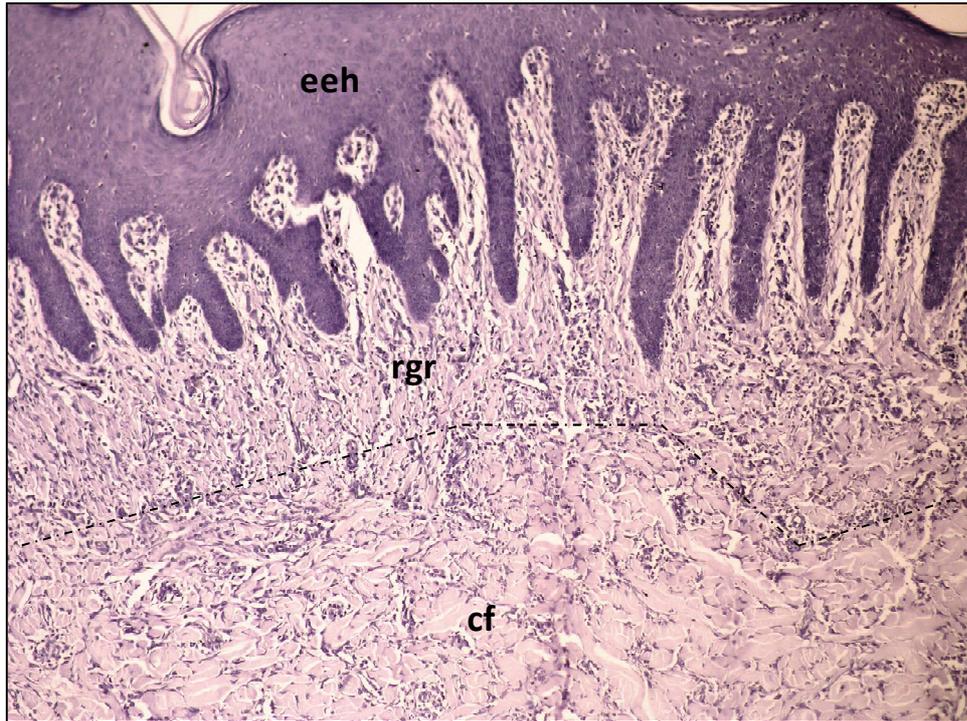


Figura 40. Epitélio escamoso intensamente hiperplásico (eeh) revestindo totalmente a área cicatricial. Subjacente, observa-se clara demarcação entre a estreita área de reação de granulação residual (rgr) e a cicatriz fibrosa profunda (cf) composta por feixes grossieros e densamente compactados de colágeno (HE, 100x).

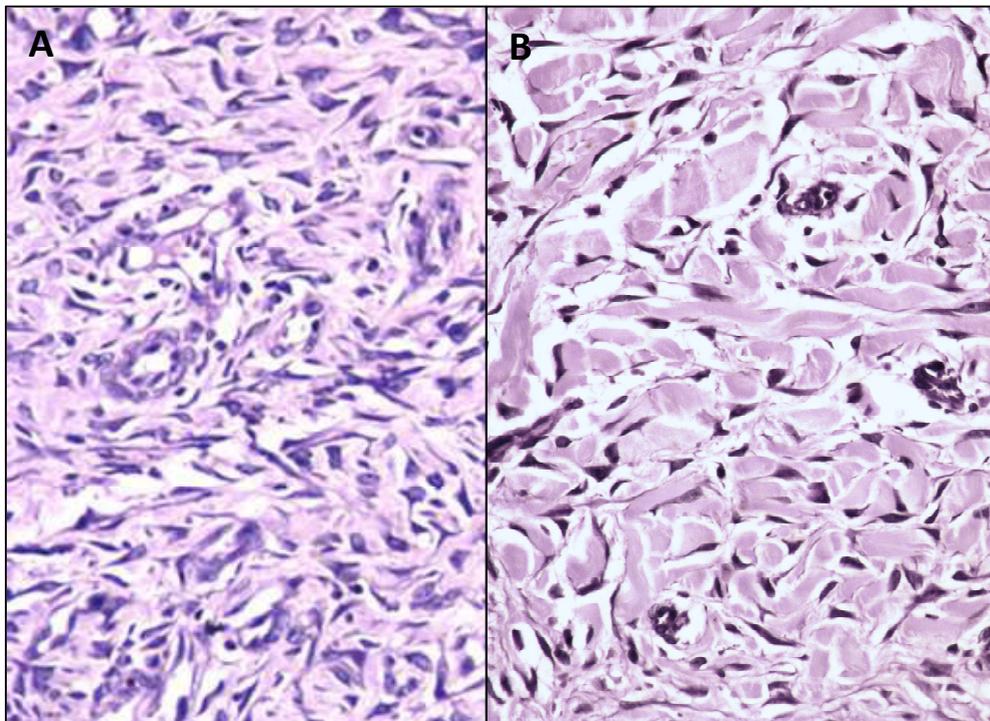


Figura 41. Detalhe da figura anterior destacada reação de granulação residual superficial (A) em detrimento do tecido fibroso cicatricial entrelaçado na profundidade (B) (HE, 400x).

Áreas centrais (secções macroscópicas B e C)

Nestas áreas, foi observada extensa formação epidérmica, caracterizada por tecido epitelial levemente acantótico, com áreas hiperplásicas, exibindo camada granulosa delgada. A arquitetura morfológica dessa região apresentou-se semelhante àquela observada no grupo GDU, com a área de superfície expressa por reação de granulação estreita, caracterizada por fibroblastos volumosos, ora fusiformes ora estrelários, associada à moderada rede vascular formada por capilares em formato de fenda e por capilares mais abertos. De especial interesse, foi a evidenciação de áreas que mesmo compostas por vasos dispostos perpendicularmente, apresentaram fibras de colágeno mais espessas. A profundidade, mostrou-se menos celularizada, composta por pobre contingente vascular, de parede levemente espessa, compatíveis à vênulas e caracterizada pela presença expressiva de fibrilas de colágeno mais espessas em relação aos grupos SDZ e GDU (Figura 42).

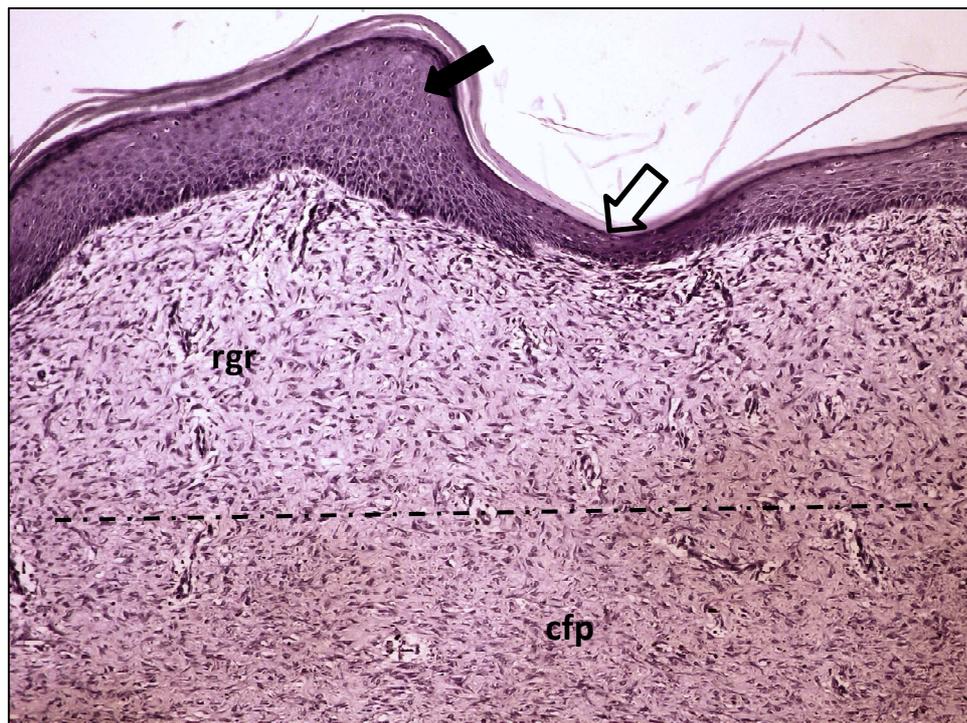


Figura 42. Revestimento epitelial escamoso ora acantótico (seta cheia) ora atrófico (seta aberta). Na derme superficial nota-se reação de granulação residual fibrocelular (rgr) e na porção profunda tecido fibroso mais denso formando cicatriz fibrosa primária (cfp) (HE, 100 x).

5.3 Microscopia por Picrossirius

5.3.1 Avaliação aos 8 dias

5.3.1.1 Sulfadiazina de Prata (grupo SDZ), DuoDerme[®](GDU) e Membranas de gelatina com ácido úsnico/lipossomas (grupo UAL)

Na análise do colágeno por picrossirius, em 8 dias, os três grupos exibiram padrão morfológico similar, caracterizado ora por fibrilas curtas e delgadas, alternadas com fibras mais espessas, formando espaços interfibrilares amplos, ora por fibras de colágeno espessas com pequenos espaços interfibrilares irregulares. A birrefringência alaranjada ou amarelo-ouro das fibras e fibrilas foram referentes a remanescentes necróticos do componente fibroso (Figuras 43, 44 e 45).

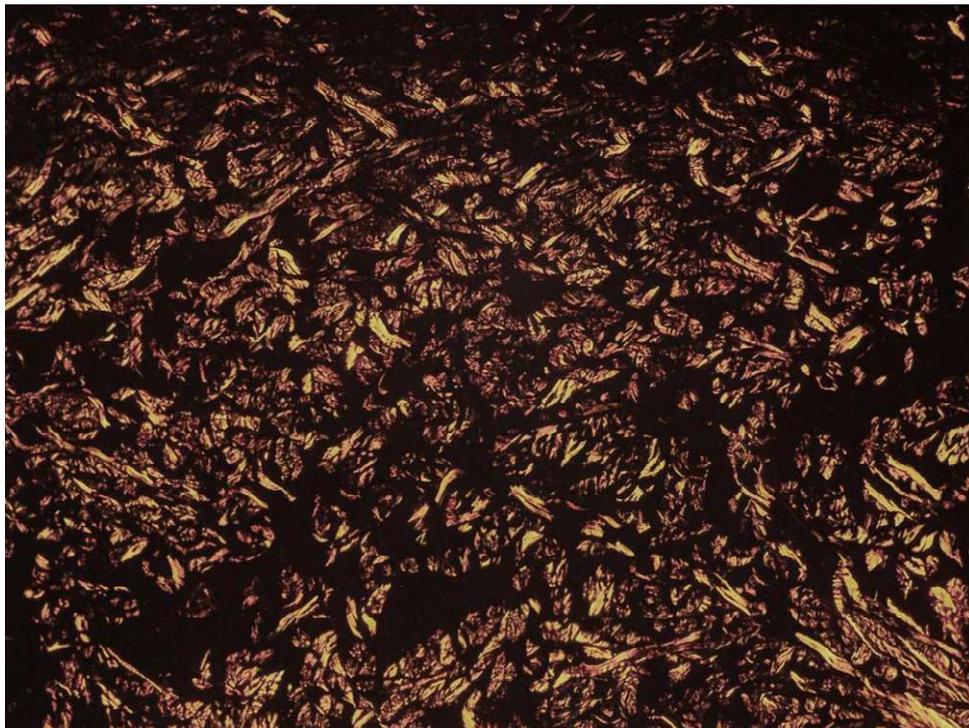


Figura 43. Fibrilas curtas e delgadas, alternadas com fibras mais espessas, representando o grupo SDZ (Picrossírius, 400 x).



Figura 44: Fibrilas curtas e delgadas, alternadas com fibras mais espessas, representando o grupo GDU (Picrossírius, 400 x).

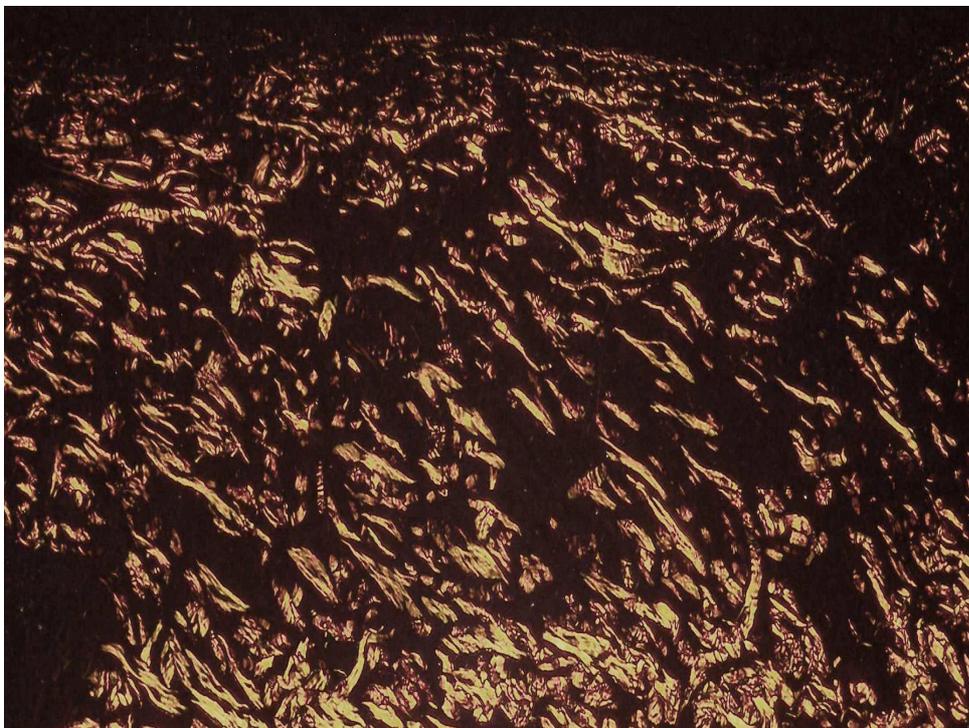


Figura 45: Fibrilas curtas e delgadas, alternadas com fibras mais espessas, representando o grupo UAL (Picrossírius, 400 x).

5.3.2 Avaliação aos 18 dias

5.3.2.1 Sulfadiazina de Prata (grupo SDZ)

Em 18 dias, o grupo da SDZ exibiu padrão morfoarquitetural expresso por fibrilas de colágeno extremamente delicadas, delgadas, curtas, dispostas em um arranjo predominantemente reticular, com espaços interfibrilares muito amplos. Observou-se uma escassa deposição colagênica, com birrefringência ora esverdeada (colágeno tipo III), ora amarelada (colágeno tipo I), tanto nas áreas marginais como no centro da lesão. Particularmente na profundidade, as fibrilas de colágeno apresentaram-se mais condensadas, sutilmente alongadas, porém ainda com padrão reticular (Figura 46).



Figura 46. Fibrilas de colágeno (setas) com espaços interfibrilares amplos (eifa) na superfície e fibrilas de colágeno discretamente alongadas e mais condensadas na profundidade (prof) da lesão (Picrossírius, 100 x).

5.3.2.2 DuoDerme® (grupo GDU)

No grupo GDU, observou-se uma grande semelhança na arquitetura da deposição colagênica quando comparado ao grupo SDZ, expressa por fibrilas notoriamente delicadas, muito delgadas e curtas, com espaços interfibrilares extremamente amplos e

padrãopredominantemente reticular.A colagenização apresentou-se muito escassa, com presença de colágeno tipo III e colágeno tipo I dispostos desde a superfície a profundidade da lesão.Especialmente na profundidade, observou-se uma maior condensação de colágeno, porém, com fibrilas ainda curtas, delgadas, com aspecto levemente ondulado e arranjo reticular, semelhante ao padrão observado no grupo anterior (Figura 47).



Figura 47:Fibrilas de colágeno (setas) e espaços interfibrilares (eifa) na superfície da lesão. Observa-se colágeno tipo III e tipo I por toda extensão da lesão (Picrossírius, 100 x).

5.3.2.3 Membranas de gelatina com ácido úsnico/lipossomas (grupo UAL)

A colagenização no grupo UAL, apresentou um padrão morfológico diferente quando comparado aos grupos SDZ e GDU, expresso pela variação do arranjo reticular e paralelo observado em áreas marginais da lesão. A presença do colágeno tipo I e tipo III observado em toda extensão da ferida, foi semelhante entre os grupos. Na superfície, verificou-se fibrilas delgadas e delicadas, porém com espaços interfibrilares menos amplos quando comparado aos outros grupos. Contudo, na profundidade, uma maior condensação de fibrilas de colágeno, mais espessas, com padrão arquitetural ora reticular oraparelo, diferiram-se das fibras alongadas e delicadas, com padrão notoriamente reticular observados na mesma área de lesão nos grupos SDZ e GDU. Foi de especial interesse a observação de uma faixa muito estreita de

ausência de colágeno entre o epitélio e o conjuntivo profundo, além da abundância de fibrilas perpendicularmente dispostas ao longo do eixo da ferida (Figura 48).

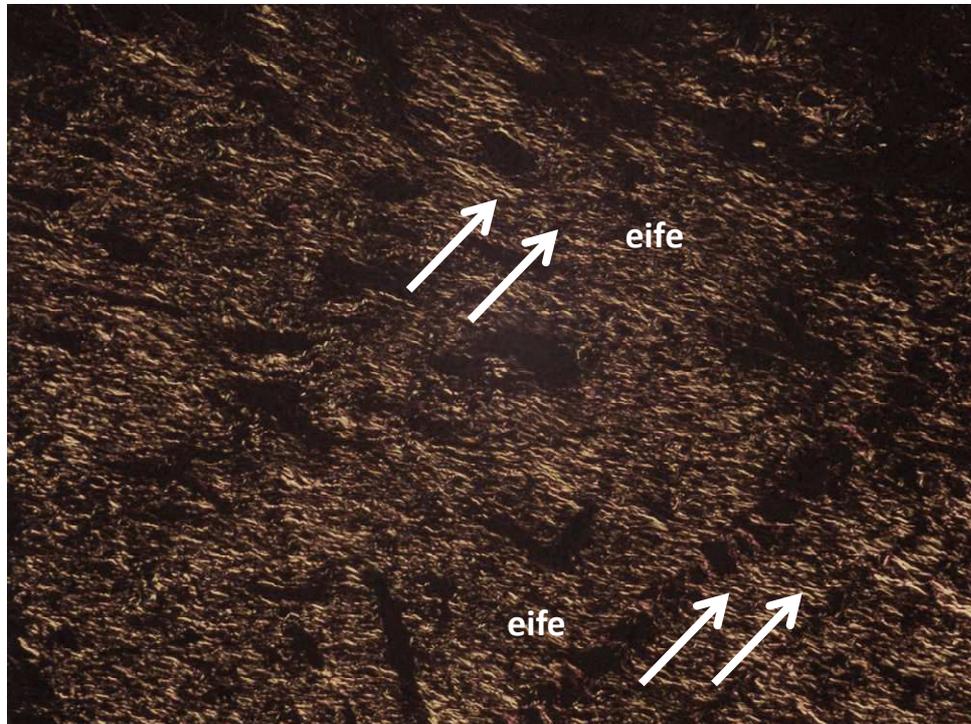


Figura 48. Fibrilas de colágeno delgadas e alongadas (setas) na superfície e fibrilas espessas na profundidade da lesão. Espaços interfibrilares menos amplos (estreitos) (eife) por toda extensão da lesão (Picrosirius, 100 x).

5.3.3 Avaliação aos 30 dias

5.3.3.1 Sulfadiazina de Prata (grupo SDZ)

Em 30 dias, no grupo da SDZ, evidenciou-se uma deposição de fibras de colágeno ainda delgadas e delicadas, com manutenção da arquitetura reticular. Particularmente na superfície da lesão observou-se uma colagenização mais abundante, com espaços interfibrilares nitidamente menos amplos quando comparados ao padrão observado em 18 dias. Contudo, na profundidade, verificou-se uma menor densidade de deposição colagênica, notoriamente do tipo I, com fibras tipicamente alongadas, dispostas em um arranjo paralelo, com menores espaços interfibrilares em relação a arquitetura mais condensada de fibrilas de colágeno tipo III observada no tempo anterior (Figura 49).

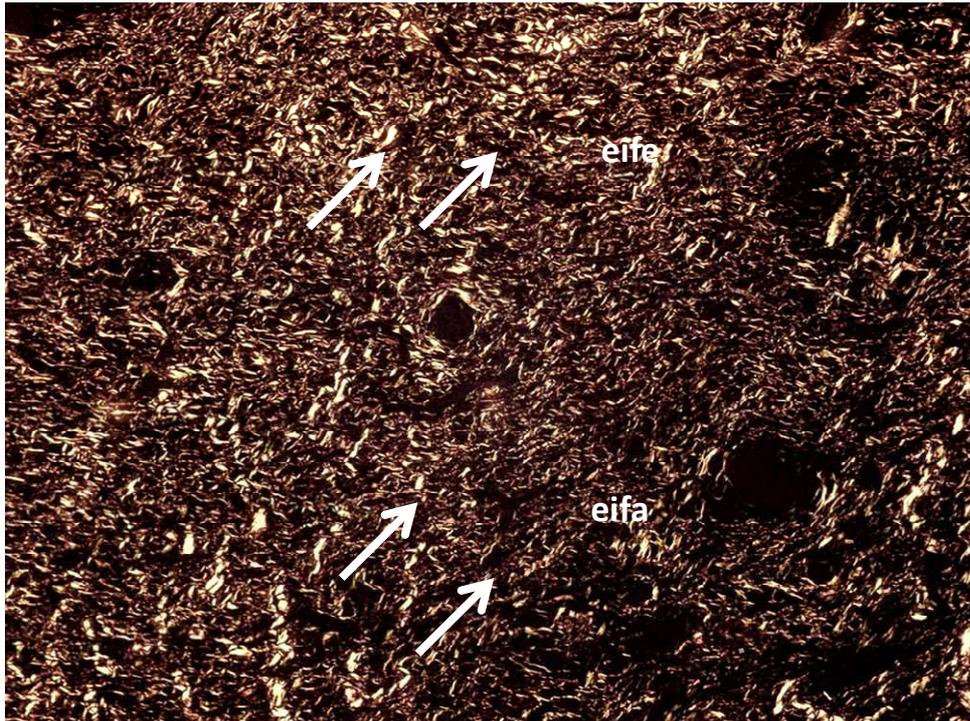


Figura 49. Fibras de colágeno (setas) com padrão reticular por toda extensão da lesão, com espaços interfibrilares estreitos na superfície (eife) e amplos na profundidade (eifa) (Picrosirius, 200 x).

5.3.3.2 DuoDerme[®] (grupo GDU)

O grupo do GDU, apresentou um padrão morfológico diferente em relação aos grupos SDZ e UAL. Tanto na superfície quanto na profundidade da lesão a densidade de deposição colagênica mostrou-se menos expressiva. As fibras de colágeno se dispuseram em um padrão morfológico predominantemente reticular, com fibrilas muito delicadas, delgadas e curtas, com espaços interfibrilares extremamente amplos, diferindo do arranjo mais paralelo e espaços interfibrilares estreitos observados nos outros grupos (Figura 50).

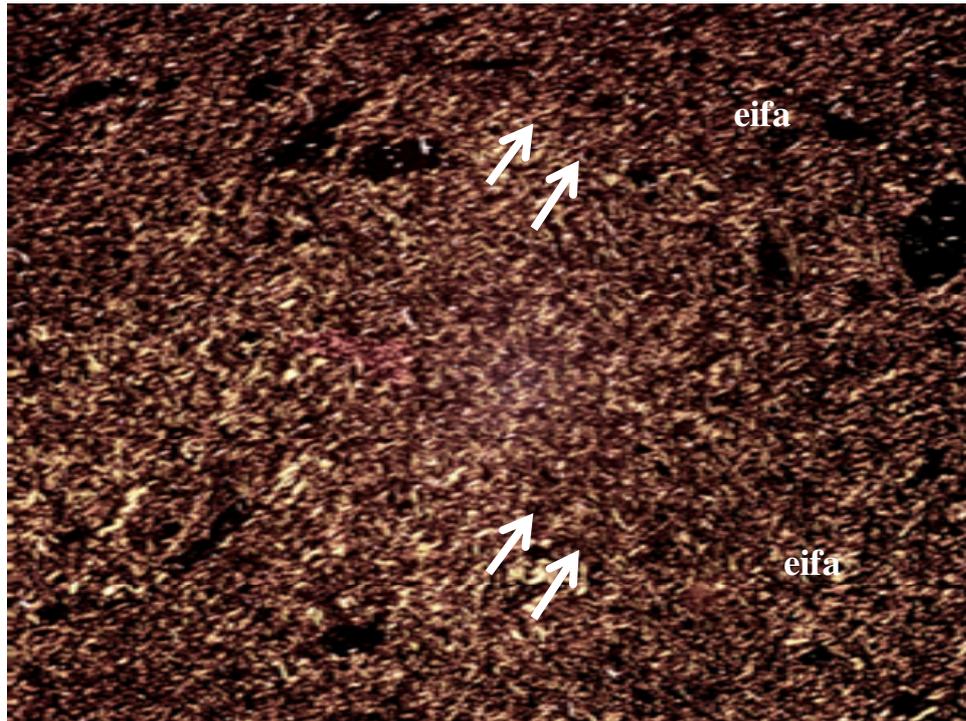


Figura 50. Fibras de colágeno (setas) dispostas em padrão reticular na superfície e na profundidade da lesão, com espaços interfibrilares amplos (eifa) (Picrosirius, 200 x).

5.3.3.3 Membranas de gelatina com ácido úsnico/lipossomas (grupo UAL)

A colagenização do grupo UAL, demonstrou-se mais expressiva quando comparada aos grupos SDZ e GDU, expressa por uma maior condensação de colágeno em toda extensão da lesão, com espaços interfibrilares notadamente menos evidentes. Desde a superfície a profundidade, observou-se fibras de colágeno tipo I, com birrefringência amarelada, porém, particularmente na superfície, essas fibrilas mostraram-se delgadas, dispostas em padrão reticular, diferindo das fibrilas mais espessa com arranjo paralelo, verificadas na profundidade (Figura 51).

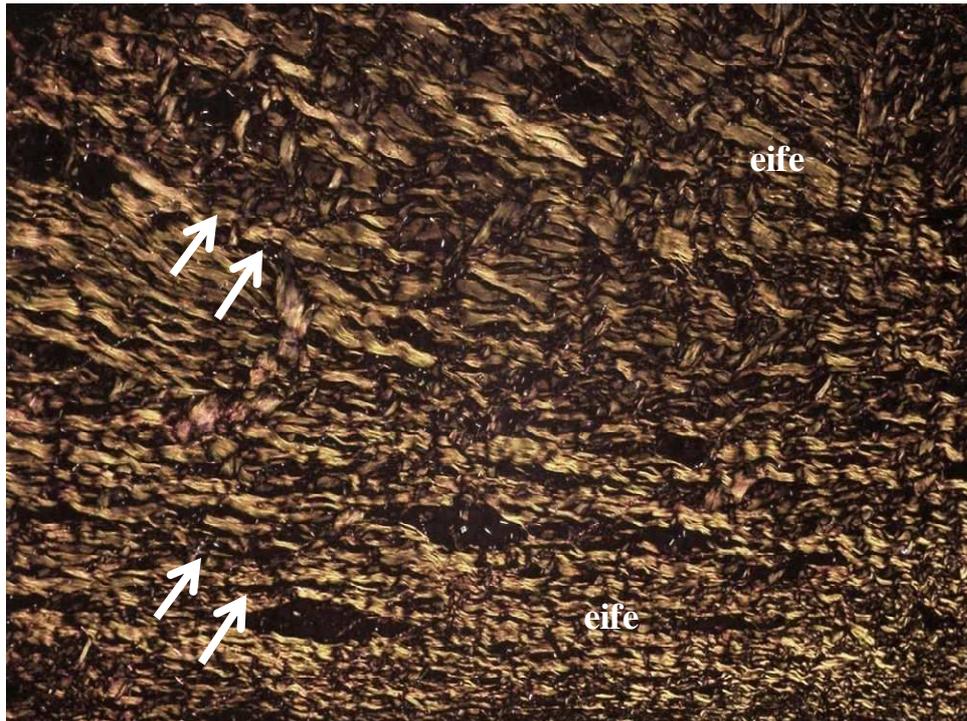


Figura 51. Fibras de colágeno (setas) dispostas em padrão reticular na superfície e paralelo na profundidade, com espaços interfibrilares estreitos (eife) em toda extensão da lesão (Picrossírius, 200 x).

6. Discussão

Nos três grupos em oito dias, observou-se necrose coagulativa do tecido conjuntivo e intensa reação inflamatória aguda, típicas dos achados morfológicos dessa fase do reparo cicatricial (SAMY et al., 2012; VELNAR et al., 2009). O processo de cicatrização consiste na recuperação dos elementos estruturais da célula, e para tanto, o primeiro passo é a instalação de uma reação inflamatória, cujo sangue extravasado e produtos da destruição tecidual são reabsorvidos pelo exsudato de células fagocitárias, responsáveis pela eliminação da carga bacteriana contaminante, bem como pela remoção de grande parte do tecido necrótico (DRYDEN et al., 2013; YOUNG & McNAUGHT, 2011). Entretanto, nos três grupos foi observada a presença de tecido fibroso necrosado, sugerindo a permanência na fase mais inicial do processo de cicatrização.

Outra observação nesse tempo experimental foi à reação de granulação mostrar-se imatura e limitada à profundidade dos espécimes. Contudo, foi possível verificar que a reação inflamatória e a reparação tecidual se mostraram, nos três grupos, mais adiantadas na profundidade do que na superfície da lesão. Esse achado, caracterizado pela reparação do tecido da profundidade para a superfície também foi observado por Nunes et al. (2011). A

transição da fase inflamatória para a fase proliferativa inicia-se no quarto dia após a lesão e estende-se até o décimo sexto dia, aproximadamente (DRYDEN et al., 2013). Ela é caracterizada por intenso aumento de fibroblastos e neoformação vasculo-capilar. Nessa fase, as células endoteliais se multiplicam, formando cordões sólidos que entremeiam os fibroblastos e, posteriormente, se canalizam, resultando em tecido de granulação, com aspecto granuloso, avermelhado e pouco resistente (ALBUQUERQUE JUNIOR et al., 2009; WANG et al., 2012).

Pode ser destacado que a reação de granulação observada na região central das feridas do grupo SDZ foi mais imatura em relação aos grupos GDU e UAL. Além disso, o grupo SDZ apresentou reação de granulação limitada ao pânículo adiposo hipodérmico, com sinais de necrose na sua porção mais superficial, diferentemente da reação de granulação observado nos grupos GDU e UAL, que se estendia desde a hipoderme, onde entremeava o tecido adiposo lobular, até a porção média da derme, indicando início de neoformação tissular na área lesada. Possivelmente, a oclusão gerada pelo DuoDerme[®] e pela membrana de gelatina levou a uma maior proteção da superfície da ferida contra microorganismos.

Diversos autores ressaltam a importância de curativos oclusivos, como filmes de colágeno e gelatina (KANOKPANONT et al., 2012; NUNES et al. 2011), alginato (THU et al., 2012), hidrogéis (WANG et al., 2012; YANG et al., 2010) utilizados como barreira mecânica na cicatrização de feridas. Jayakumar et al. (2011), descreveram que o produto para lesão na pele deve apresentar características biológicas adequadas, dentre elas, atuar como uma barreira protetora contra microorganismos e agentes do meio externo. Elsner et al. (2011) ainda ressaltaram que um bom curativo deve agregar a capacidade oclusiva à biodegradabilidade, além de permitir a incorporação de fármacos bioativos. Estudos prévios demonstraram que o recobrimento de feridas através de filmes biocompatíveis acelera a formação da reação de granulação em modelos experimentais de cicatrização dérmica (ALBUQUERQUE JUNIOR et al., 2009; CAVALCANTE et al., 2011, NUNES et al., 2011).

É válido ressaltar que além da oclusão promovida pela membrana de gelatina e pelo DuoDerme[®], dois dos três grupos avaliados (SDZ e UAL) apresentaramem sua composição compostos com atividade antimicrobiana: a prata (LABOUTA & SCHNEIDER, 2013; LI et al., 2011; MOIEMEN et al., 2011) e o ácido úsnico (BEZERRA, 2012; SEGATORE et al., 2012). Contudo, a incorporação do ácido úsnico em lipossomas, pode sugerir que a liberação mais lenta do metabólito no filme em detrimento à rápida liberação da prata veiculada sob forma de creme, no grupo SDZ, podeter prolongado a sua atividade biológica, favorecendo a cronificação da inflamação e desenvolvimento da reação de granulação. Alguns

autores afirmam que filmes de colágeno e gelatina possibilitam a incorporação de compostos ativos com atividade antimicrobiana e/ou anti-inflamatória para liberação gradativa, e caso os mesmos sejam incorporados em lipossomas podem atuar como sistemas de liberação controlada, concebidos para obtenção de adequada concentração plasmática ou níveis de concentração tecidual de fármacos de forma controlada, atingindo o efeito terapêutico desejado e evitando possíveis reações tóxicas inerentes ao composto (LEE & ROBISON, 2004; PARENTEAU-BAREIL et al., 2011).

Além do tecido de granulação, algumas alterações primárias ocorrem, simultaneamente, na fase proliferativa, como epitelização e angiogênese (WANG et al., 2012). A reepitelização começa durante às 24h após a lesão e caracteriza-se pela migração de células epiteliais da margem da ferida e/ou dos anexos cutâneos profundos (folículos pilosos, glândulas sudoríferas e glândulas sebáceas), para dentro da lesão, reestabelecendo uma barreira protetora sobre o tecido subjacente (PITZER & PATEL, 2011).

O aumento da atividade mitótica das células epiteliais basais, modulado por diversos fatores de crescimento, como o EGF e o KGF, estimulam a restauração da membrana basal e diferenciação terminal para formação da epiderme estratificada. Em seguida, o restabelecimento da integridade epitelial, seguido pelo processo de corneificação da epiderme é um fenômeno que restabelece a barreira que isola o organismo do meio exterior, e é um dos maiores desafios a serem superados na busca de novas substâncias terapêuticas para lesões dérmicas (CAVALCANTE et al., 2011; RIBEIRO et al., 2009).

Em 18 dias, a neoformação epidérmica, apesar de parcial nos três grupos, se mostrou bastante incipiente no SDZ quando comparada aos grupos GDU e UAL. Assim, pode-se sugerir que ambas as membranas utilizadas neste estudo tenham promovido um ambiente mais úmido ao leito da ferida, favorecendo a neoformação da epiderme, enquanto que a formulação da Sulfadiazina em pomada pode ter sofrido ressecamento precoce, não impedindo evaporação da água na ferida. Alguns autores demonstraram que polímeros sintéticos ou naturais, quando utilizados na cicatrização dérmica, devem ser capazes de prevenir a desidratação da ferida (CHEN et al., 2012; JAYAKUMAR et al., 2011). Nell et al. (2012) afirmam que um ambiente úmido favorece a migração de células epiteliais, as quais promoverão uma barreira oclusiva contra o meio externo. Por outro lado, a lenta adesão dessas células quando o meio da lesão encontra-se desidratado ou com superfície parcialmente necrosada, gera um retardamento no processo de cicatrização.

É válido salientar que a umidade do leito da ferida pode facilitar a chegada de queratinócitos à lesão. Trescher et al. (2013) demonstraram que estruturas poliméricas

podem interferir de forma positiva na densidade relativa e na viabilidade de queratinócitos e fibroblastos à ferida. A escolha do biomaterial vai depender da aplicação pretendida, porém a maioria deles deve apresentar uma microestrutura porosa apropriada para facilitar a infiltração, a proliferação e a diferenciação celular (NELLY, et al., 2012, XINGANG et al., 2012). Parenteau-Bareil et al. (2011) afirmaram que filmes de colágeno possibilitam a nutrição de células que preenchem o tecido afetado e o acesso de células de defesa ao local, permitindo adesão, migração e proliferação celular.

Outro achado importante foi a reação de granulação, mais imatura (vascular e inflamatória) no grupo SDZ, em relação à extensa semelhança do padrão morfológico evidenciado nos grupos GDU e UAL, nos quais a reação de granulação mostrou-se exuberante, ricamente celularizada (fibroblástica), com intenso contingente vascular. O tecido de granulação é formado pela intensificação de processos de regeneração vascular e de fibroplasia, os quais se intensificam através da angiogênese, da migração e da proliferação fibroblástica, formando um tecido rico em elementos vasculares e celulares (NAWAZ & BENTLEY, 2010; YOUNG & MCNAUGHT, 2011). Portanto, é possível sugerir, com base nos achados morfológicos, que a dinâmica de reparo cicatricial se apresentou mais avançada nos grupos GDU e UAL.

A aceleração na dinâmica de granulação nos grupos GDU e UAL em relação ao grupo SDZ possivelmente ocorreu em decorrência da estrutura de acarbouço formada pela gelatina que ambos os materiais contêm. Yeh et al. (2011) ressaltaram que um polímero para utilização na engenharia de substitutos de pele devem possibilitar a nutrição celular e a permeabilidade, bem como serem oclusivos contra o meio externo. Ainda relataram que a gelatina reticulada, quando veiculada sob a forma de membranas, propicia grande adesão e migração de fibroblastos ao longo da matriz filmogênica. Ratificando esses relatos, Yang et al. (2010) afirmaram que a gelatina em forma de hidrogel apresenta excelente ajustável capacidade de retenção de água e um módulo de compressão semelhante ao do tecido mole, promovendo assim ótima fixação celular e rápido crescimento de fibroblastos sobre o material. A elevada capacidade de absorção de água, o semelhante módulo de compressão ao tecido mole, a biodegradabilidade controlável e a biocompatibilidade, tornam a gelatina um produto capaz de funcionar como andaimes para a pele, tornando-se um excelente biomaterial para cicatrização de feridas (WANG et al., 2012).

A neoformação epidérmica em 30 dias após as queimaduras ocorreu de forma menos expressiva no grupo SDZ em relação aos outros dois grupos. Os três grupos apresentaram reepitelização completa nas áreas marginais da ferida, porém na região mais central o grupo

SDZ mostrou área de desnudamento epitelial claramente mais extensas quando comparada às escassas regiões de desnudamento persistentes nos grupos GDU e UAL. Esses achados sugerem que, conforme relatado por Nell et al. (2012) e Trescher et al. (2013), materiais sintéticos aumentam a viabilidade de queratinócitos à ferida.

A reação de granulação, ainda em 30 dias, demonstrou estar mais extensa no grupo SDZ, ocupando cerca de dois terços da lesão nas áreas mais centrais, contrapondo-se à restrita reação de granulação observada nos grupos GDU e UAL, presente apenas na região abaixo do epitélio. Esses achados confirmam aqueles evidenciados em 18 dias e atestam a relevância da utilização de polímeros veiculados sob a forma de membranas ou filmes oclusivos como substrato matricial para proliferação celular e desenvolvimento mais rápido desta etapa do processo de reparo (YEH et al., 2011; YANG et al., 2010; WANG et al., 2012).

Esse achado poderia estar associado à regulação das metaloproteases (MMPs) nas feridas recobertas por ambos os filmes. As MMPs produzidas nesta fase são essenciais para o equilíbrio entre a degradação e a síntese dos componentes proteicos da MEC (DRYDEN et al., 2013). Além disso, as MMPs atuam na resposta imune clivando citocinas e quimiocinas e, assim, participando ativamente da inflamação. Estas enzimas ainda atuam em vários processos fisiológicos como angiogênese, reparação tecidual, morfogênese, mobilização de células tronco e cicatrização de feridas (KUPAI et al., 2010; POLYAKOVA et al., 2010; VANHOUTTE et al., 2006). Conquanto a liberação de MMPs seja modulada por uma variedade de células durante o reparo (queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, leucócitos, etc), é possível sugerir que a maior proliferação destas células estromais envolvidas na cicatrização observada nos grupos GDU e UAL durante o reparo (TRESCHER et al., 2013; YANG et al., 2010; YEH et al., 2011) promoveram maior regulação nos níveis de MMPs, reduzindo seus níveis tissulares na fase final do processo de cicatrização, minimizando os riscos de degradação excessiva de colágeno cicatricial.

De especial interesse foi o fato de que, no grupo SDZ, ainda observou-se presença de infiltrado inflamatório envolvido na reação de granulação, sugerindo, portanto, que as feridas tratadas com as membranas, nos grupos GDU e UAL, estão numa fase de cicatrização mais avançada. Esses achados vem corroborar relatos prévios de MOHAJERI et al. (2011) ao afirmarem que a sulfadiazina de prata não parece ter qualquer efeito direto sobre a intensidade da resposta inflamatória durante a cicatrização de feridas. Por outro lado, os grupos GDU e UAL exibiram nítida redução no contingente inflamatório. Vijayakumar et al. (2000) demonstraram que o ácido úsnico, isolado a partir do líquen *Rocella montagnei*, apresenta atividade anti-inflamatória dose-dependente.

Huang et al. (2011) estudou o efeito anti-inflamatório e mecanismo do ácido úsnico através do lipopolissacarídeo (LPS) estimulado pela linhagem celular RAW264.7. Esse estudo avaliou o efeito do ácido úsnico nas citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-6 e IL-1 β e nos mediadores pró-inflamatórios, óxido nítrico (NO), óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) utilizando ELISA, PRC em tempo real e “*Western blot*”. Similarmente, o efeito do ácido úsnico na citocina anti-inflamatória Interleucina-10 (IL-10) e no mediador anti-inflamatório Heme-oxigenase-1 (HO-1) foram analisados pelos mesmos métodos. Além disso, o fator de transcrição nuclear (NF-kB) foi avaliado por imunocitoquímica. Os resultados mostraram que o ácido úsnico tem atividade dose-dependente frente às citocinas e mediadores pró-inflamatórios, promovendo a diminuição da excreção do TNF- α , IL-6, IL-1 β , iNOS, a COX-2, via supressão do NF-kB. Outra observação foi à atividade dose-dependente do ácido úsnico no aumento da produção da IL-10, HO-1. Esses resultados podem sugerir que a redução da intensidade da inflamação gere um maior controle da fase inflamatória da cicatrização e conseqüentemente a antecipação das fases subsequentes. A fase proliferativa, portanto, teria início mais rapidamente com desenvolvimento da reação de granulação, e a colagenização, também seria precocemente observada, promovendo aceleração da dinâmica cicatricial para fechamento completo da ferida, corroborando resultados encontrados na análise semiquantitativa da reação de granulação por HE no tempo de 8 dias e com a dinâmica de deposição colagênica nas fases finais do processo do reparo cicatricial por picrossírius nesse estudo.

Contudo, o DuoDerme[®] não apresenta nenhuma substância ativa incorporada em sua formulação, e ainda assim o infiltrado inflamatório nesse tempo mostrou-se semelhante ao grupo UAL. Como supracitado esta atividade possivelmente seria decorrente da intensa oclusão e manutenção da umidade da ferida, obtidas por esta membrana, características estas que possibilitam o melhor acesso de células de defesa ao local e minimizam a proliferação de bactérias (JAYAKUMAR et al., 2011; PARENTEAU-BAREIL et al., 2011).

Nas etapas iniciais do reparo observou-se fibras colágenas tipo I espessas, grosseiras, entrelaçadas com fibrilas mais delicadas e irregulares em todos os grupos. A interpretação destes achados, contudo, deve ser bastante parcimoniosa, posto que parecem representar apenas a persistência do tecido fibroso necrótico pós-queimadura. Está bem estabelecido que a birrefringência das fibras de colágeno se dá em razão da presença de grande quantidade de aminoácidos básicos que reagem fortemente com as moléculas ácidas que compõem o corante, que se arranjam paralelamente em relação ao eixo axial das moléculas de colágeno. O aumento da birrefringência, detectada em luz polarizada, é, portanto, decorrente do

incremento da quantidade de moléculas orientadas paralelamente (MONTES & JUNQUEIRA, 1991). Conquanto o tecido fibroso necrótico não apresente alterações imediatas no seu contingente de aminoácidos básicos, pode-se sugerir que por luz polarizada, não seja possível distinguir as fibras de tecido necrótico ou viável. As alterações citomorfológicas estromais evidenciadas em HE indicam que o tecido fibroso está, de fato, necrótico, e corroboram essa teoria. Além disso, as áreas com amplos espaços interfibrilares e menor colagenização podem representar regiões com acúmulo de leucócitos, os quais teriam acelerado a degradação do colágeno do tecido necrosado. Suportando essa hipótese, Shvyrkov & Yanushevich (2013), afirmaram que nas primeiras horas após a lesão tecidual a migração é dada pelos neutrófilos, os quais iniciam a fagocitose, a lise do tecido desvitalizado e junta enzimas proteolíticas, destroem as bactérias e atuam no controle da infecção.

Nos períodos experimentais posteriores, contudo, a presença predominante de fibrilas delgadas e delicadas de colágeno tipo III, intercaladas a fibrilas delgadas tipo I, sugere claramente que o tecido necrótico foi adequadamente removido e substituído por colágeno imaturo. Esses achados parecem atestar a evolução satisfatória do processo reparativo, posto que, conforme previamente discutido por Richet al. (2005), o colágeno tipo III é inicialmente produzido, a fim de orientar a proliferação e migração de fibroblastos e células endoteliais durante a formação do tecido de granulação, e gradativamente é substituído por colágeno tipo I para proporcionar força de tração e estabilidade mecânica ao tecido conjuntivo fibroso dérmico. A maior condensação de colágeno em 30 dias é decorrente do aumento progressivo da deposição colagênica, para formar a cicatriz fibrosa, e está em acordo com os achados observados no estudo de Verhaegen et al. (2009) enfocando a dinâmica da colagenização ao longo do tempo de cicatrização. Além disso, o incremento no conteúdo de fibras de colágeno tipo I também parece representar um achado importante, já que estas moléculas são responsáveis pela força tênsil da cicatriz. De especial interesse foi a evidência de predomínio de colágeno tipo III, nas áreas mais centrais e superficiais da ferida, enquanto que a deposição de colágeno tipo I foi mais expressiva na profundidade das lesões. Esse aspecto morfológico já era esperado, posto que também foi evidenciado em outros trabalhos, e parecem representar o padrão clássico de colagenização, que ocorre progressivamente a partir das margens e base em direção ao centro e superfície das feridas (DANTAS et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013).

A colagenização mais expressiva observada no grupo UAL, representada por maior condensação de colágeno em toda extensão da lesão, sugere que o ácido úsnico possa ter desempenhado algum papel no processo de síntese de deposição colagênica. Estudos anteriores utilizando modelos roedores já haviam trazido fortes evidências de que o ácido

úsico incorporado em matrizes filmogênicas de colágeno apresentam ação modulatória positiva sobre a síntese de colágeno cicatricial (NUNES et al., 2011). O predomínio de colágeno tipo I em toda extensão das lesões do grupo UAL também sugere que a fase de remodelamento, representada pela degradação da matriz bruta formada de conjuntivo e deposição gradual e progressiva de uma nova matriz contendo colágeno tipo I e tipo III, mostrou-se mais desenvolvida neste grupo (NUNES et al., 2011; DANTAS et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013).

Neste estudo, foi observado que a aplicação tópica de membranas de gelatina contendo ácido úsico/lipossomas modulou eventos importantes do processo cicatricial, representados especialmente por estímulo ao desenvolvimento e maturação da reação de granulação e incremento substancial da deposição colagênica. Estes achados confirmam aqueles previamente obtidos em modelo roedor por Nunes et al. (2011) e parecem apontar para um importante potencial de aplicação clínica destas biomembranas como curativos dérmicos em feridas por queimadura. No entanto, estudos posteriores ainda são demandados a fim de elucidar os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela atividade biológica destas membranas sobre o reparo cicatricial.

7. Conclusão

Ao final deste estudo, foi possível concluir que, em modelo suíno, a utilização de membranas biodegradáveis de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas:

- Promoveu a cicatrização e retração macroscópicas da ferida semelhante aos outros produtos testados.
- Promoveu o desenvolvimento e maturação da reação de granulação ao longo do reparo cicatricial comparáveis ao DuoDerme[®] e melhores que a pomada de sulfadiazina de prata.
- Promoveu maior incremento da deposição colagênica nas fases finais do experimento comparado ao demais produtos testados.

8. Perspectivas

- Estudar a degradação térmica e fotodegradação das membranas de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas;
- Realizar a esterelização das membranas de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas e otimizar o processo;
- Estudar clinicamente o efeito das membranas de gelatina contendo ácido úsnico/lipossomas em queimaduras de segundo grau.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M., BENJAKUL, S., PRODPRAN, T., AGUSTINI, T.W. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocolloids**, 28: 18-199, 2012.

AHMADJIAN, V. The Lichen Symbiosis. New York. 250, 1993.

ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L.C., BARRETO, A.L.S., PIRES, J.A., REIS, F.P., LIMA, S. O., RIBEIRO, M.A.G., CARDOSO, J.C. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. **International Journal of Morphology**. 27, 1105-1110, 2009.

ALEMDAROĞLU, C., DEĞİM, Z., ÇELEBI, N., ZOR, F., ÖZTÜRK, S., ERDOĞAN. D. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. **Burns**, 32 (3): 319-327, 2006.

ALMEIDA, E.B., CARDOSO J.C., LIMA, A.K., OLIVEIRA, N.L., PONTES-FILHO, N.T., LIMA, S.O., SOUZA I.C..L, ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **Journal Ethnopharmacol**, 147(2): 419-25, 2013.

ANDRADE, A.G.; LIMA de, C.F.; ALBUQUERQUE, A.K.B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**. 9(1): 21-30, 2010.

APTROOT, A.; SIPMAN, H.J.M. Diversity of Lichenized Fungi in the Tropics. Biodiversity of tropical microfungi. **Hong Kong University Press**, 17: 19-51, 1997.

ATIYEH, B.S., COSTAGLIOLA. M.; HAYEK, S.N. Burn prevention mechanisms and outcomes: Pitfalls, failures and successes. **Burns**, 35: 181-193, 2009.

BACKOROVA, M., JENDZELOVSKY, R., KELLO, M., BACKOR, M., MIKES, J., FEDOROCKO, P. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. **Toxicology in Vitro**, 26: 462-468, 2012.

BACKOROVA, M., BACKOR, M., MIKES, J., JENDZELOVSKY, R., AND FEDOROCKO, P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology in Vitro**, 25: 37-44, 2011.

BARBOSA, E, MOREIRA, E. A. M., FAINTUCH, J., PEREIRA, M. J. L. Suplementação de antioxidantes: enfoque em queimados. **Revista de Nutrição**, 20: 6-12, 2007.

BAZIN, M., LAMER, A., DELCROS, G., ROUAUD, I., PHILIPPE URIAC, P., JOËL BOUSTIE, J., CORBEL, J., TOMASI, S. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16:60-66, 2012.

BEZERRA, M.S. Análise físico-química, microestrutural e biológica de filmes bioativos de colágeno contendo ácido úsnico. **Dissertação de mestrado**. Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão- SE, 2012.

BEZIVIN, C., TOMASI, S., ROUAUD, I., DELCROS, J.G., BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convoluta*, **Planta Medica**, 70(9): 874-877, 2004.

BOATENG, J.S.; MATTHEWS, K.H.; STEVENS, H.N.E.; ECCLESTON, G.M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 97(8): 892-923 2008.

BOMFIM, R.R., ARAÚJO, A.S.A., CUADROS-ORELLANA, S., MELO, M.G.D., QUINTANS-JÚNIOR, L.J., CAVALCANTI, S.C.H. Larvicidal Activity of *Cladonia substellata* Extract and Usnic Acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salin*. **Latin American Journal of Pharmacy**, 28(4): 1-5, 2009.

BRANDÃO, M.H.T., GONTIJO, B. Contact sensitivity to metals (chromium, cobalt and nickel) in childhood. **Brazilian Dermatotomy**, 87: 269-276, 2012.

BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo Patologia, 8ª Ed, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2012.

BRISDELLI, F., PERILLI, M., SELITRI, D., PIOVANO, M., GARBARINO, J.A., NICOLETTI, M., BOZZI, A., AMICOSANTE, G., CELENZA, G. Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: An in vitro study. **Phytotherapy Research**, 27(3): 431-7, 2012.

CAMPANELLA, L., DELFINI, M., ERCOLE, P., IACOANGELI, A., RISULEO, G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. **Biochimie**, 84: 329-334, 2002.

CAVALCANTE, D.R.R., OLIVEIRA, P.S., GOIS, S. M., SOARES, A.F., CARDOSO, J.C., PADILHA, F.F., ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L.C. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, 77: 278-284, 2011.

CARDARELLI, M., SERINO, G., CAMPANELLA, L., ERCOLE, P., CICCONE, F., ALESIANO, O., ROSSIELLO, F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 53(8): 667-672, 1997.

CARVALHO E.A.B., ANDRADE P.P., SILVA N.H., PEREIRA E.C., FIGUEIREDO R.C.B.Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Micron Technology**, 36: 155-161, 2005.

CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G.A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Polymer Science**, 38: 584-671, 2013.

DANTAS, M.D.M., CAVALCANTE, D.R.R., ARAUJO, F.E.N., Barreto, S.R., ACIOLE, G.T.S., PINHEIRO, A.L.B., RIBEIRO, M.A.G., LIMA-VERDE, I.B., MELO, C.M., CARDOSO, J.C., ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L.C. Improvement of Dermal Burn Healing by Associating Sodium Alginate/Chitosan-Based Films and Low Level Laser Therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 6: 1-9, 2011.

DIAS, R.C.M. Síntese, caracterização e avaliação preliminar de citotoxicidade da matriz porosa de nanocompósito biodegradável. **Dissertação de Mestrado**. Engenharia Metalúrgica e de Minas. Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

DIAS, A.M.A., BRAGA, M.E.M., SEABRA, I.J., FERREIRA, P., GIL, M.H., SOUSA, H.C. Development of natural based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide. **International Journal of Pharmaceutics**, 408: 9-19, 2011.

DRYDEN, S.V., SHOEMAKER, W.G., KIM, J.H. Wound Management and Nutrition for Optimal Wound Healing. Atlas Oral Maxillofacial. **Surgical Clinics of North America**, 21: 37-47, 2013.

EINARSDOTTIR, E., GROENEWEG, J., BJORNSDOTTIR, G.G., HARETHARDOTTIR, G., OMARSDOTTIR, S., INGOLFSDOTTIR, K., OGMUNDSDOTTIR, H.M. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. **Planta Medica**, 76(10): 969–974, 2010.

ELSNER, J.J., EGOZI, D., ULLMANN, Y., BERDICEVSKY, I., SHEFY-PELEG, A., ZILBERMAN, M. Novel biodegradable composite wound dressings with controlled release of antibiotics: Results in a guinea pig burn model. **Burns**, 37: 896-904, 2011.

EVERS, L.H., BHAVSAR, D., MAILÄNDER, P. The biology of burn injury. **Experimental Dermatology**, 19: 777–783, 2010.

FALDER, S., BROWNE, A., EDGAR, D., STAPLES, E., FONG, J., REA, S., WOOD, F. Core outcomes for adult burn survivors: A clinical overview. **Burns**, 35: 618-641, 2009

FANG, J., BELAND, F.A. Long-term exposure to Zidovudine delays cell cycle progression, induces apoptosis and decreases telomerase activity in human hepatocytes. **Toxicology Science**, 111: 120–130, 2009.

FATTINI, C. A. DANGELO, J. G. Anatomia humana sistêmica e segmentar, 3 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007.

FORTI, F.L.; GOISSIS, G.; PLEPIS, A.M. Modifications on collagen structures promoted by 1,4-dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial. **Journal Biomaterial Applications**, 20(3):267-85, 2006.

FRIESS, W. Collagen - biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 45: 113-136, 1998.

GAWRYSZEWSKI, V.P.; BERNAL, R.T.I.; SILVA, N.N.; MORAIS NETO, O.L.; SILVA, M.M.A.; MASCARENHAS, M.D.M.; SÁ, N. N. B.; MONTEIRO, R.A.; MALTA, D.C. Atendimento decorrentes de queimaduras em serviços públicos de emergência no Brasil em 2009. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 28(4):629-640, 2012.

GONÇALVES, W.L.S., SOUZA, F.M., CONTI, C.L., CIRQUEIRA, J.P., ROCHA, W.A., PIRES, J.G.P., BARROS, L.A.P., MOYSÉS, M.R. Influence of He-Ne laser therapy on the dynamics of wound healing in mice treated with anti-inflammatory drugs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 40: 877-884, 2007.

GUIRRO, E., GUIRRO, R., Fisioterapia Dermato-Funcional, 3ª edição, Editora: Manole, 2002.

GUPTA, V.K., VERMA, S. GUPTA, S., SINGH, A., PAL, A., SRIVASTAVA, S.K., SRIVASTAVA, PK., SINGH, S.C., DAROKAR. M.P. Membrane-damaging potential of natural L (-) usnic acid in *Staphylococcus aureus*. **European Journal Clinical Microbiology and Infection Disorder**, 31 (12):3375-83,2012.

HALICI, M., ODABASOGLU, F., SULEYMAN, H., CAKIR, A., ASLAN, A., BAYIR, Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. **Phytomedicine**, 12: 656-662, 2005.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives Biochemistry Biophysics**, 476: 107-112, 2008.

HENSSEN, A., JAHNS, M. Lichenes. Georg Thieme Verlag, **Stuttgart**, 467, 1974.

HOLZAPFEL, B.M.; REICHERT, J.C.; SCHANTZ, J.T.; GBURECK, U.; RACKWITZ, L.; NÖTH, U.; JAKOB, F.; RUDERT, M.; GROLL, J.; HUTMACHER, D.W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Review**, 65: 581-603, 2013.

HORI, K., SOTOZONO, C., HAMURO, J., YAMASAKI, K., KIMURA, Y., OZEKI, M., TABATA, Y., KINOSHITA, S. Controlled-release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing. **Journal of Controlled Release**, 118: 169–176, 2007.

HONDA, N.K.; PAVAN, F.R.; COELHO, R.G.; ANDRADE LEITE, S.R.DE.; MICHELETTI, A.C.; LOPES, T.I.B.; MISUTSU, M.Y.; BEATRIZ, A.; BRUM, R.L.; LEITE, C.Q.F. Antimicrobial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, 17: 328–332, 2010.

HUANG, S. Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Review**, 60: 1167–1176, 2008.

HUNT, J.P., HUNTER, C.T., BROWNSTEIN, M.R. GIANNOPOULOS, A., HULTMAN, C.S., DESERRES, S., BRACEY, L., FRELINGER, J., MEYER, A.A. The Effector Component of the Cytotoxic T-Lymphocyte Response Has a Biphasic Pattern after Burn Injury. **Journal of Surgical Research**, 80 (2): 243-25, 1998.

INGÓLFSDÓTTIR, K., CHUNG, G.A.C., SKÚLASON, V.G., GISSURARSON, S. R., VILHELMSDÓTTIR, M. Antimicrobial activity of lichen metabolites “in vitro”. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 6: 141-144, 1998.

İŞERİ, S.O., GEDIK, I.E., ERZİK, C., USLU, B., ARBAK, S., GEDIK, N., YEĞEN. B.C. Oxytocin ameliorates skin damage and oxidant gastric injury in rats with thermal trauma. **Burns**, 34 (3): 361-369, 2008.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; KUMAR, P.T.S.; NAIR, SV.; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**. 29: 322-337, 2011.

JIN, G.; PRABHAKARAN, M.P.; KAI, D.; ANNAMALAI, S.K. ARUNACHALAM, K.D.; RAMAKRISHNA. S. Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing. **Biomaterials**, 34: 724-734, 2013.

KANOKPANONT, S.; DAMRONGSAKKUL, S.; RATANAVARAPORN, J.; ARAMWIT, P. An innovative bi-layered wound dressing made of silk and gelatin for accelerated wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, 436: 141– 153, 2012.

KOHLHARDT-FLOEHR, C., BOEHM, F., TROPPEL, S., LADEMANN, J., AND TRUSCOTT, T.G. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation - Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 101: 97-102, 2010.

KOWALTOWSKI, A.J., DE SOUZA-PINTO, N.C., CASTILHO, R.F., VERCESI, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, 47: 333-343, 2009.

KUPAI, K. *et al.* Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **Journal of Pharmacological and toxicological methods**, 61: 2, 205-209, 2010.

LABOUTA, H.I, SCHNEIDER, M. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 39-54, 2013.

LEE, C.H., SINGLA, A., LEE, Y. Biomedical application of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, 221: 21-22, 2001.

LEE, T.W.Y., ROBINSON, J.R. Remington's Pharmaceutical Sciences, 20^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 933-960, 2004.

LI, S.-M.; JIA, N.; MA, M-G.; ZHANG, Z.; LIU, Q.-H.; SUNA, R.-C. Cellulose–silver nanocomposites: Microwave-assisted synthesis, characterization, their thermal stability, and antimicrobial property, **Carbohydrate Polymers**, 86: 441– 447, 2011.

LIRA, M. C. B., MILENA S. FERRAZ, M. S., SILVA, D. G. V. C, CORTES, M. E. TEIXEIRA, K. I., NELLY P., CAETANO, N. P., SINISTERRA, R. D., PONCHEL, G., SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Inclusion complex of usnic acid with b-cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 64: 215–224, 2009.

MANOJLOVIC, N.T., VASILJEVIC, P.J., MASKOVIC, P.Z., JUSKOVIC, M., BOGDANOVIC-DUSANOVIC, G. Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.). **Delise -Umbilicariaceae**, 1-7, 2012.

MAYER, M., O'NEILL, M.A., MURRAY, K.E., SANTOS-MAGALHAES, N.S., CARNEIRO-LEAO, A.M., THOMPSON, A.M., APPELYARD, V.C. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties. **Anticancer Drugs**, 16(8): 805–809, 2005.

MELO, M.G.D.; ARAUJO, A.A.S.; SERAFINI, M.R.; CARVALHO, L.F.; BEZERRA, M.S.; RAMOS, C.S.; BONJARDIM, L.R.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C.; LIMA, J.T.; SIQUEIRA, R.S.; FORTES, V.S.; FONSECA, M.J.V.; QUINTANS-JUNIOR, L.J. Anti-inflammatory and toxicity studies of atranorin extracted from *Cladonia kalbii* Ahti in rodents. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science**, 47:1-12, 2011 (A).

MELO, M.G., DOS SANTOS, J.P., SERAFINI, M.R., CAREGNATO, F.F., PASQUALI, M.A., RABELO, T.K., DA ROCHA, R.F., QUINTANS, L., JR., ARAUJO, A.A., DA SILVA, F.A. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. **Toxicology In Vitro**, 25: 462-468, 2011 (B).

MENDES JÚNIOR, E.C.S.; VITERBO, F., ROSA, C.S. Análise histológica e morfométrica da área cruenta tratada com membrana de silicone: estudo em ratos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 53(5): 395-400, 2007.

MESQUITA, C.J.G., LEITE, J.A.D., FECHINE, F.V., ROCHA, J.L.C., LEITE, J.G.S., JOSE A.D. LEITE- FILHO, J.A.D., BARBOSA FILHO, R.A. Effect of imiquimod on partial-thickness Burns. **Burns**, 36: 97-108. 2010.

MIYAZAKI, H., KINOSHITA, M., SAITO, A., FUJIE, T., KABATA, K., HARA E., ONO, S., TAKEOKA, S., SAITOH, D. An ultrathin poly (L-lactic acid) nanosheet as a burn wound dressing for protection against bacterial infection. **Wound Repair and Regeneration**, 20:573–579, 2012.

MOHAJERI, D., MESGARI, M., DOUSTAR, Y., NAZERI, M., Comparison of the effect of normal saline and silver sulfadiazine on healing of skin burn wounds in rat: A histopathological study. **Middle-East Journal of Scientific Research**, 10 (1): 8-14, 2011.

MOIEMEN, N.S., SHALE, E., DRYSDALE, K.J., SMITH, G., WILSON, Y.T., PAPINI, R. Acticoat dressings and major burns: Systemic silver absorption. **Burns**, 37: 27-35, 2011.

MONTES, G.S., JUNQUEIRA, L.C.U. The use of the Picrosirius-Polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 86(3): 1-11, 1991.

MOORE, K. L., DALLEY, A. F. Anatomia orientada para clínica, 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MUZZARELLI, R.A.A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, 76(2):167-182, 2009.

NAWAZ, Z.; BENTLEY, G. Surgical incisions and principles of wound healing. **Basic Skills**, 29(2): 59-62, 2011.

NEEL, E.A.A., BOZEC, L., KNOWLES, L.C., SYED,O., MUDERA,V., DAY,R., HYUN, J.K. Collagen - Emerging collagen based therapies hit the patient. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 65: 429-456, 2012.

NII, T.; ISHII, F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method.**International Journal of Pharmaceutics**, 298: 198-205, 2005.

NOWAK, T.J. Burn Pathophysiology. **Perioperative Nursing Clinics**. 7: 9–17, 2012.

NUNES, P.S.; BEZERRA, M. S.; COSTA, L. P.; CARDOSO, J. C.;ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L. C; RODRIGUES, M. O.; BARIN, G. B.; SILVA, F. A.; ARAÚJO, A. A. S. Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 99: 1011–1014, 2010.

NUNES, P.S.; BEZERRA, M.S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; CAVALCANTE, D.R.R.; DANTAS, M.D.M., CARDOSO, J.C.; SOUZA, J.C.C.; SERAFINI, M.S.; QUITANS-JR, L.J., BONJARDIM, L.R., ARAÚJO, A.S.A. Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 12(1): 9-14, 2011.

ODABASOGLU, F., ÇAKIR, A., SULEYMAN, H., ASLAN, A., BAYIR, Y., HALICI, M., KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal Ethnopharmacol**, 103: 59-65, 2006

O'NEILL, M.A., MAYER, M., MURRAY, K.E., ROLIM-SANTOS, H.M., SANTOS-MAGALHAES, N.S., THOMPSON, A.M., APPLEYARD, V.C. Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells? **Brazilian Journal of Biology**, 70 (3): 659–664, 2010.

PAPP, A; VALTONEN, P. Tissue substance P levels in acute experimental burns. **Burns**, 32: 842-845, 2006.

PARENTEAU-BAREIL, R., GAUVIN, R., CLICHE, S., GARIÉPY, C., GERMAIN, L., BERTHOD, F. Comparative study of bovine, porcine and avian collagens for the production of a tissue engineered dermis. **Acta Biomaterial**, 7: 57–65, 2011.

PÉREZ, R.A.; WON, J.; KNOWLES, J.C.; KIM, H. Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. **Advanced Drug Delivery Review**, 65: 471-496, 2013.

PIRES R.H., LUCARINI R., MENDES-GIANNINI M.J.S. Effect of Usnic Acid on *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 595–597, 2012.

PITZER, G.B., PATEL, K.G. Proper Care of Early Wounds to Optimize Healing and Prevent Complications. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, 19: 491–504, 2011.

POLYAKOVA, V. LOEFFLER, I., HEIN, S., MIYAGAWA, S., PIOTROWSKA, I., DAMMER, S., RISTELI, J., SCHAPER, J., KOSTIN, S. Fibrosis in endstage human heart failure: Severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. **International Journal of Cardiology**, 151(1): 18-33, 2010.

RABELO, T.K., ZEIDÁN-CHULIÁ. F., VASQUES, L.M., SANTOS, J.P.A DOS., ROCHA, R.F., PASQUALI, M.A.B. RYBARCZYK-FILHO, J.L., ARAÚJO, A.S.A., MOREIRA, J.C.F., GELAIN, D.P. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). **Toxicology in Vitro**, 26: 304–314, 2012.

RAFLA, K; TREDGET, E.E. Infection control in the burn unit. **Burns**, 37: 5-15, 2011.

REHDER, J.; SOUTO, L.R.M.; BERNARDINO, C.M.; ISSA, M.; PUZZI, M.B. Model of human epidermis reconstructed in vitro with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. **São Paulo Medical Journal**, 122(1): 22-5, 2004.

RIBEIRO, M.A.G., ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L C., BOJARDIM, L.R., RAMALHO, L.M.P., PINHEIRO, A.L.B. Immunohistochemical Assessment of Myofibroblasts and Lymphoid Cells During Wound Healing in Rats Subjected to Laser Photobiomodulation at 660 nm. **Photomedicine and Laser Surgery**, 27: 49-55, 2009.

RIBEIRO-COSTA, R. M., ALVES, A. J., SANTOS, N. P., NASCIMENTO, S. C., GONÇALVES, E. C. P., SILVA, N. H., HONDA, N. K., SANTOS-MAGALHÃES, N. S. In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Journal of microencapsulation**, 21: 371-384, 2004.

RICH, L., WHITTAKER, P., Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, 22: 97-104, 2005.

RIELLA, K.R., MARINHO, R.R., SANTOS, J.S., PEREIRA-FILHO, R.N., CARDOSO, J.C., ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C., THOMAZZI, S.M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 143: 656–663, 2012.

RUSSO, A., PIOVANO, M., LOMBARDO, L., GARBARINO, J., CARDILE, V. Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. **Life Sciences**, 83: 468–474, 2008.

SAHU, S.C., MICHAEL, W., O'DONNELL, M.W., SPRANDO, R.L. Interactive toxicity of usnic acid and lipopolysaccharides in human liver HepG2 cells. **Journal of Applied Toxicology**, 32 (9): 739-49, 2012.

SAMY, W., ELGINDY, N., EL-GOWELLI, H.M. Biopolymeric nifedipine powder for acceleration of wound healing. **International Journal of Pharmaceutics**, 422: 323-331, 2012.

SANTOS, N.C., CASTANHO, M.A.R.B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, 25 (6): 1181-1185, 2002.

SANTOS, N.P., NASCIMENTO, S.C., WANDERLEY, M.S., PONTES-FILHO, N.T., DA SILVA, J.F., DE CASTRO, C.M., PEREIRA, E.C., DA SILVA, N.H., HONDA, N.K., SANTOS-MAGALHAES, N.S. Nanoencapsulation of usnic acid: an attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics**, 64(2): 154–160, 2006.

SANTOS, V.E., GOMES, M.E., MANO, J.F., REIS, R.L. Chitosan–chondroitin sulphate nanoparticles for controlled delivery of platelet lysates in bone regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 6(10): 47-59, 2012.

SEGATORE, B.; BELLIO, P.; SETACCI, D.; BRISDELLI, F.; PIOVANOB, M.; GARBARINO, J.A.; NICOLETTI, M.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.; CELENZA, G. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. **Phytomedicine**, 19: 341-347, 2012.

SEHN, E., HERNANDES, L., FRANCO, S.L., GONÇALVES, C.C.M., BAESSO, M.L. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation using cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**, 635: 115-120, 2009.

SEIFRIED, H.E., ANDERSON, D.E., FISHER, E.I., AND MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 18: 567-579, 2007.

SHVYRKOV, M.B., YANUSHEVICH, O.O. Facial gunshot wound debridement: Debridement of facial soft tissue gunshot wounds. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, 41: 8-16, 2013.

SERAFINI, M.R., MENEZES, P.P., COSTA, L.P., LIMA, C.M., QUINTANS-JR, L.J., CARDOSO, J.C., MATOS, J.R., SOARES-SOBRINHO, J.L., GRANGEIRO-JR, S., NUNES, P.S., BONJADIM, L.R., ARAÚJO, A.S.A. Interaction of p-cymene with β -cyclodextrin. **Journal Thermal Analysis and Calorimetry**, 109: 951–955, 2012.

SIQUEIRA, R.S., BONJARDIM, L.R., MELO, M.G.D., OLIVEIRA, M.G.B., GELAIN, D.P., SILVA, F.A., DESANTANA, J.M., ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L.C., ROCHA, R.F., MOREIRA, J.C.F., ANTONIOLLI, A.R., QUINTANS-JUNIOR, L.J. Antinociceptive Activity of Atranorin in Mice Orofacial Nociception Tests. **Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences**, 65: 1-11, 2010.

SONG, Y., DAI, F., ZHAI, D., DONG, Y., ZHANG, J., LU, B., LUO, J., LIU, M., YI, Z. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways. **Angiogenesis**, 15 (3): 421–432, 2012.

STONER, J.G., RASMUSSEN, J.E., ARBOR, A. Plant dermatitis. **Journal American Academy Dermatology**, 9: 1-15, 1983.

STONER, J.G. Miscellaneous dermatitis-inducing. **Plants Journal American Academy Dertatology**, 4: 94-101, 1986

TAKAI, M., UEHARA, Y., AND BEISLER, J.A. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents. **Journal Medicinal Chemistry**, 22 (11): 1380-1384, 1979.

THESCHER, K., ROCHA, T., CUIA, J., KRATZA, K., LENDLEINA, A., JUNGA, F. Test system for evaluating the influence of polymer properties on primary human keratinocytes and fibroblasts in mono- and coculture. **Journal of Biotechnology**, 166 (1-2): 58-64, 2013.

THU, H.; ZULFAKAR, M.H.; FERN, S.-N. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing, **International Journal of pharmaceutics**, 434 (1-2): 375-383, 2012.

VANHOUTTE, D. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: A temporal and spatial window. **Cardiovascular Research**, 69(3): 604-613, 2006.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **Journal of International Medical Research**, 37 (5): 1528-1542, 2009.

VERHAEGEN, P.D., VAN ZUIJLEN, P.P., PENNING S N.M., VAN MARLE J., NIESSEN, F.B., VAN DER HORST, C.M., MIDDELKOOP, E. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. **Wound Repair Regen**, 17 (5): 649-56, 2009.

VIJAUAKUMAR, C. S., VISWANATHAN, S., REDDY, M. K., PARVATHAVARTHINI, S., KUNDU, A. B., SUKUMAR, E. Anti- inflammatory activity of (+)-usnic acid. **Fitoterapia**, 71 (5): 564-566, 2000.

WANG, X.; KRAVCHUK, O.; KIMBLE, R.M. A retrospective review of burn dressings on a porcine burn model. **Burns**, 36 (5): 680-687, 2010.

WANGA, T., ZHU, X.K., XUE, X.T., WU, D.Y. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, 88: 75–83, 2012.

WILD, T., RAHBARNIA, A., KELLNER, M., SOBOTKA, L., EBERLEIN, T. Basics in nutrition and wound healing. **Nutrition**, 26: 862-866, 2010.

XINGANG, W., QIYIN, L., XINLE, H., LI, M., CHUANGANG, Y., YURONG, Z., HUAFENG, S., CHUNMAO, S., CHANGYOU, G. Fabrication and characterization of poly(L-lactide-co-glycolide) knitted mesh-reinforced collagen–chitosan hybrid scaffolds for dermal tissue engineering. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, 8: 201-215, 2012.

YANG, C., XU, L., ZHOU, Y., ZHANG, X., HUANG, X., WANG, M. HAN, Y., ZHAI, M., SHICHENG WEI, S., LI, J. A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel for wound healing. **Carbohydrate Polymers**, 82: 1297-1305, 2010.

YEH, M.-K.; LIANG, Y.-M.; CHENG, K.-M.; DAI, N.-T.; LIU, C.-C.; YOUNG, J.-J. A novel cell support membrane for skin tissue engineering: Gelatin film cross-linked with 2-chloro-1-methylpyridinium iodide, **Polymer**, 52: 996-1003, 2011.

YODER, L.H, NAYBACK, A.M., GAYLORD, K. The evolution and utility of the burn specific health scale: A systematic review. **Burns**, 36: 1143-1156, 2010.

YOUNG, A.; MCNAUGHT, C.-E. The physiology of wound healing. **Surgery**, 475-479, 2011.

ZAMAN, H.U., ISLAM, J.M.M., KHAN, M.A., KHAN, R.A. Physico-mechanical properties of wound dressing material and its biomedical application. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, 4: 1369-1375, 2011.

ZANASI, S.J, FILHO, G.V.P., TELERMAN, R., CLARO, F.D., POSSARI, E., RSTOM, S. A. Queimadura solar de terceiro grau no idoso. **Arquivos Médicos do ABC**, 32 (1): 34-7, 2007.

ANEXO I

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Estudo comparativo do efeito cicatrizante da Membrana biológica de colágeno contendo ácido úsnico (LeFT 123) com outros agentes promotores da cicatrização da pele em suínos: aspectos clínicos ,histopatológicos e morfométricos”**, sob coordenação do **Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo** (protocolo **CEPA (69/2010)**),foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 24/03/2011.

São Cristóvão, 25 de março de 2011.

Prof.^a. Dr.^a. Flavia Teixeira Silva
Presidente do CEPA/UFS

Cidade Universitária “Prof. Aloísio de Campos”
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606

ANEXO II

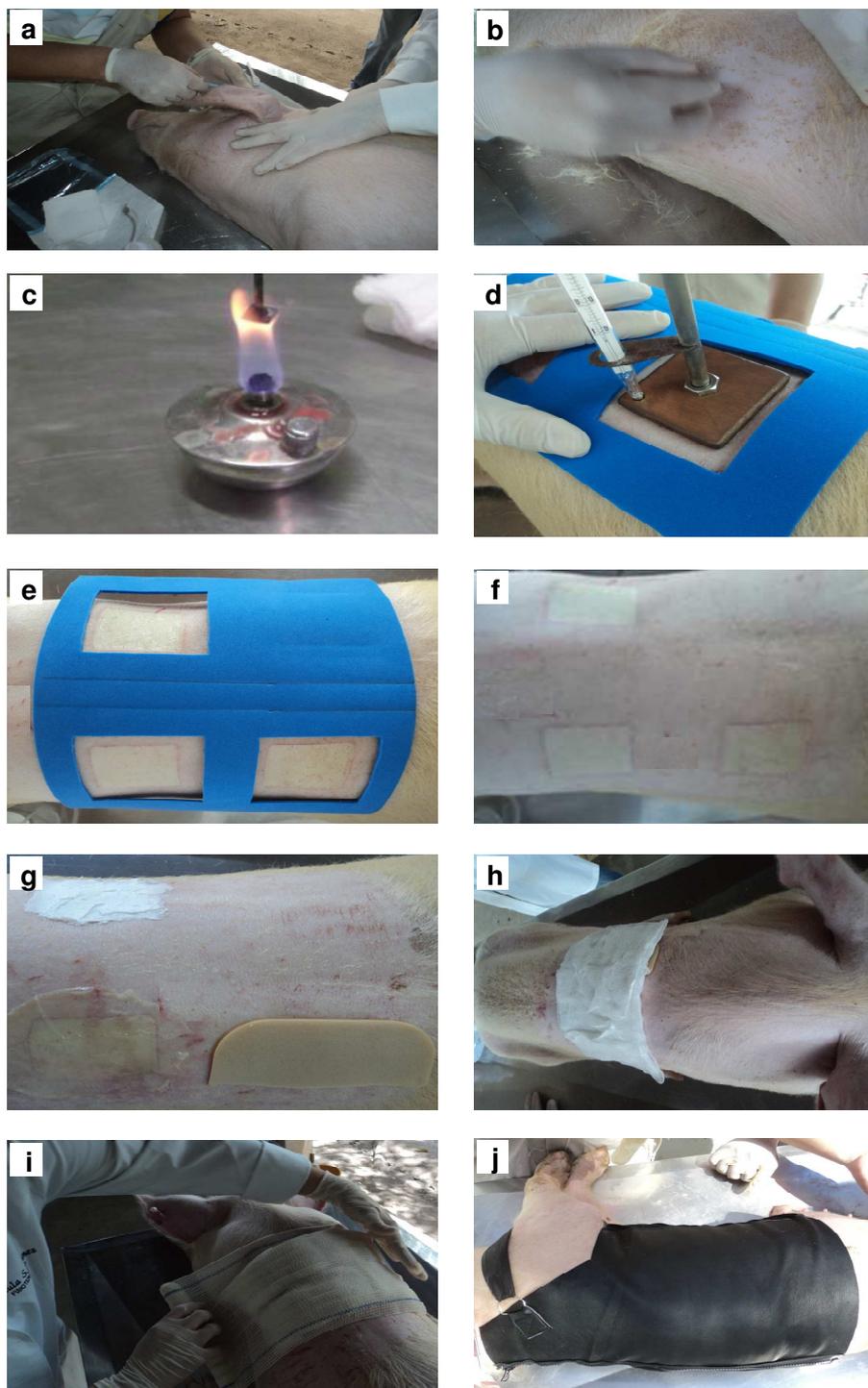


Figura 2. Etapas dos procedimentos metodológicos. (a) Anestesia; (b) tricotomia manual; (c) aquecimento do instrumento no Bico de Bunsen; (d) procedimento de indução da queimadura; (e, f) aspecto da lesão após queimadura com e sem instrumento para manutenção da distância entre as lesões; (g) recobrimento das lesões com os produtos; (h) recobrimento das lesões com gaze algodoadas; (i) recobrimento das lesões com atadura; (j) recobrimento das lesões com vestimenta de proteção.

ANEXO III

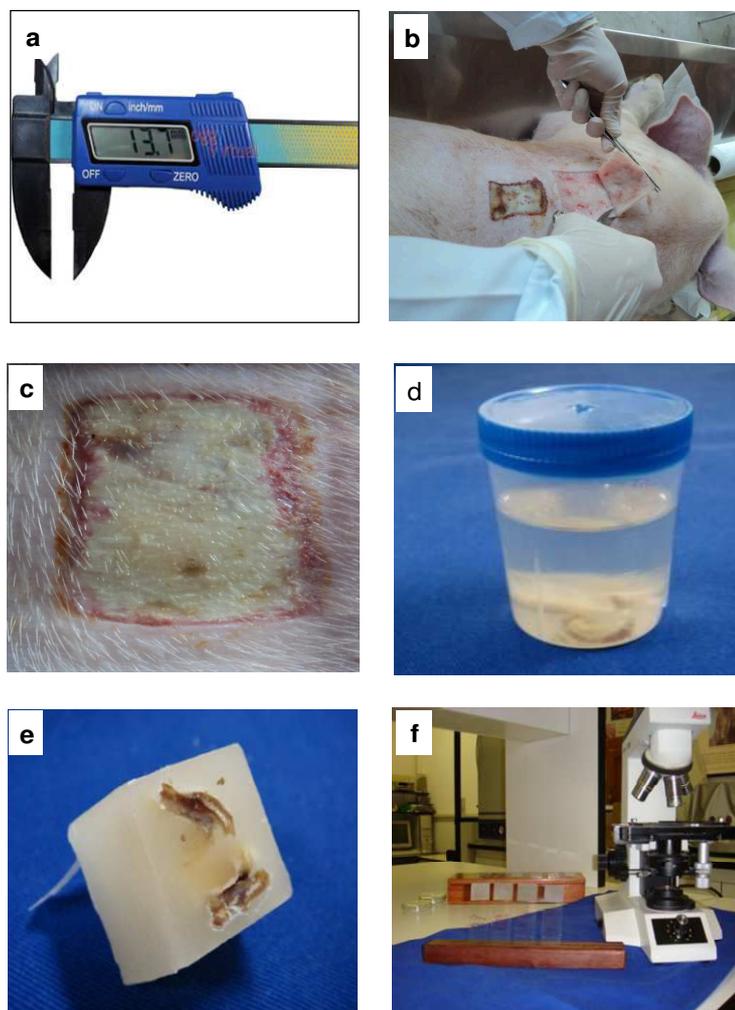


Figura 3. Etapa para obtenção das lâminas histológicas. (a) Paquímetro digital para medir a área cicatricial; (b) remoção dos espécimes; (c) lesão para ser segmentada e armazenada no formol; (d) acondicionamento em frasco plástico contendo formol a 10%; (e) inclusão dos espécimes na parafina; (f) cortes histológicos para coloração e leitura das lâminas.