THIAGO GOMES FIGUEIRA

**APLICAÇÃO DE POMADA DE ÁCIDO HIALURÔNICO
EXTRAÍDO DA CRISTA DO FRANGO PARA REPARO
TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akinobu Yoshioka

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

F375a Figueira, Thiago Gomes
Aplicação de pomada de ácido hialurônico extraído
da crista do frango para reparo tecidual de feridas
cutâneas em ratos / Thiago Gomes Figueira; orientador
Sérgio Akinobu Yoshioka. São Carlos, 2012.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2012.

1. Ácido hialurônico. 2. Pomada. 3. Cicatrização.
4. Feridas cutâneas. I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

THIAGO GOMES FIGUEIRA

Título: "Aplicação de pomada de ácido hialurônico extraído da crista do frango para reparo tecidual de feridas cutâneas em ratos".

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERUNIDADES BIOENGENHARIA EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS
NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 18/01/2013

PROF. DR. SÉRGIO AKINOBU YOSHIOKA
(ORIENTADOR)

Instituto de Química de São Carlos - USP

Resultado: Aprovado

Assinatura: Sergio A. Yoshio

PROF. DR. PAULO SÉRGIO CERRI

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho" - UNESP

Resultado: APROVADO

Assinatura: Paulo Sérgio Cerri

PROF. DR. MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e
Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP -
USP

Resultado: APROVADO

Assinatura: Marco Cipriani

À Minha Avó Therezinha (*In Memoriam*)

Que mesmo sem estudo, sempre foi motivadora para nunca parar de estudar.

Aos meus pais, Priosqui e Pi

Pelo amor incondicional destinado aos filhos...

Pela ajuda e motivação para alcançar os objetivos escolhidos...

Pela paciência e compreensão nos momentos de ausência.

À Jaque...

Pelo amor, companheirismo e motivação. Você é a principal causa para a conquista desse objetivo. Eu te amo!!!

Agradecimentos

A Deus, pela glória concedida e momentos de iluminação nas horas difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Akinobu Yoshioka, pela oportunidade e confiança em mim depositada.

Ao meu irmão Rafael, pela compreensão da ausência, e estímulo para alcançar meus objetivos.

Aos meus cunhados e concunhados Ju, Rê, Jane, Newtinho, Junior, Jukinha e sobrinhos Tathi, Pedro, Talitha, Maria Eduarda e Giovani, por toda a torcida pelo meu sucesso, e pela compreensão nas ausências.

Ao meu sogro, Edson Crusca, pela confiança e estímulo nessa etapa de minha vida.

Aos meus grandes amigos, dona Regina e senhor Luis, por tanto carinho e atenção.

À Professora Dra. Eliana Rigo pela idéia que possibilitou a elaboração desse trabalho.

Ao meu amigo Nelson Ferreira da Silva Júnior, pela valiosa ajuda em minha pesquisa e pela amizade construída.

À Biomédica e amiga, Natália Helena Mendes, pela grande ajuda na realização de parte das minhas análises.

Ao Prof. Dr. Orivaldo Lopes da Silva, pela amizade e conselhos.

À Professora Dra. Ana Maria Plepis pelo livre acesso ao laboratório, à química Virginia da Conceição Amaro Martins pela grande ajuda para o bom andamento da pesquisa.

Aos meus amigos Uziel, Alessandro e Lucas pela imensa colaboração para execução de meu trabalho. E as amigas Rafaela e Talita pela amizade construída.

Às Professoras integrantes da Banca de Qualificação, Ana Maria Minarelli Gaspar e Eliana Rigo pelas críticas e sugestões em meu trabalho.

Às Faculdades Integradas de Cassilândia pelo estímulo para esse avanço em minha vida acadêmica.

Ao técnico do Laboratório de Transformações de Fases da EESC/USP, Pedro Luiz Di Lorenz pela ajuda nos registros histológicos.

À Secretária Janete e estagiária Natália, pela paciência e ajuda.

Ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da USP, pela oportunidade nesta importante etapa de minha vida acadêmica.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante a realização da pesquisa.

Finalmente, a todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram para que o projeto se tornasse possível.

Muito Obrigado!!!

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

“Existem muitas hipóteses em ciências que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan

RESUMO

FIGUEIRA, T. G. (2012). Aplicação de pomada de ácido hialurônico extraído da crista do frango para reparo tecidual de feridas cutâneas em ratos. 84f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

A pele tem como principal função manter o isolamento do meio interior com o exterior. Quando esse órgão sofre uma lesão o organismo tenta reparar essa agressão ao promover a substituição do tecido por meio de um processo complexo dividido em fases. O ácido hialurônico está presente em todas as fases dessa reparação tecidual. Contudo a sua presença em adultos reduz cerca de 50% comparado ao recém-nascido, o que reduz a regeneração tecidual drasticamente. Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito de uma pomada utilizando veículo comercial composto de lanolina e vaselina manipulada com ácido hialurônico, extraído da crista do frango, no processo cicatricial de feridas cutâneas em dorso de ratos. Para atingir o objetivo desse trabalho o ácido hialurônico foi extraído e purificado da crista do frango e foi acrescentado ao veículo comercial composto de 10% lanolina e 90% vaselina. A pomada obtida foi analisada por meio de um reômetro de tensão controlada. Para os estudos *in vivo*, foram separados aleatoriamente 28 animais em 4 grupos. Em cada animal do grupo efetuou-se duas lesões em seu dorso, uma para a aplicação da pomada, com ou sem ácido, e a outra lesão para controle. A pomada foi aplicada diariamente durante 7 e 14 dias conforme protocolo estabelecido. Os resultados mostraram que as propriedades viscoelásticas da pomada, quando acrescentou o ácido hialurônico, tiveram pequenas alterações, porém não de forma significativa, o que possibilitou sua utilização. Como resultados dos testes *in vivo*, o grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico durante 7 dias, obteve menor média da área da lesão com 0,07 cm² contra 0,11 cm² do seu controle, 0,09 cm² do grupo tratado com a pomada placebo e 0,10 cm² do controle do placebo. Ainda, os grupos tratados com a pomada com AH durante 7 e 14 dias obtiveram uma maior média na porcentagem de colágeno, e o grupo tratado com a pomada com AH por 14 dias, resultou em uma melhor cicatrização da lesão.

Palavras-chave: Ácido Hialurônico, Pomada, Cicatrização, Feridas Cutâneas.

ABSTRACT

FIGUEIRA, T. G. (2012). Application of chicken crest-extracted hyaluronic acid ointment for tissue repair of skin wounds in rats. 84f. Master's Degree Thesis – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The skin has as main function to maintain the insulation of the inner tissues of the body from the external environment. When this organ is injured, the organism attempts to repair the damage with a tissue replacement, in a complex process divided into several stages. Hyaluronic acid is present in all phases of this process, although its expression in adults is reduced to approximately 50% compared to newborn individuals, leading to drastically reduced tissue regeneration. This study aimed to analyze the effect of an ointment composed of a commercial vehicle of lanolin and vaseline, manipulated with chicken crest-extracted hyaluronic acid, in skin wounds healing in rats. Hyaluronic acid was extracted and purified from chicken crests, and the extract was added to the commercial vehicle composed of 10% lanolin and 90% vaseline. The obtained ointment was analyzed using a controlled stress rheometer. For *in vivo* studies, 28 rats were randomly separated into four groups. Each animal was injured twice in the back, one lesion destined to the ointment application, and the other lesion as a control injury. The ointment was applied for 7 to 14 days according to the protocol established. Results showed that the viscoelastic properties of the ointment mixed with hyaluronic acid changed slightly, but not significantly, allowing its use *in vivo*. The group of animals treated with the ointment for seven days showed lower average lesion area, with 0.07 cm² against the control area of 0.11 cm². The animals treated with a placebo ointment showed an average lesion area of 0.09 cm² against a 0.10 cm² area of controls. The animals treated with the ointment with hyaluronic acid for 7 and 14 days had a higher average percentage of collagen, and the group treated for 14 days exhibited an improved wound healing.

Keywords: Hyaluronic Acid, Ointment, Healing, Skin Wounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Figura de pele em corte tridimensional.	24
Figura 2 -	Reparo tecidual por regeneração e por fibrose.	28
Figura 3 -	Fases da cicatrização de feridas.	29
Figura 4 -	Importantes funções dos macrófagos nas fases do processo de cicatrização.	31
Figura 5 -	Formas de cicatrização.	33
Figura 6 -	Ácido hialurônico: Estrutura do núcleo dissacarídeos (a) início da polimerização (b).	34
Figura 7 -	Micrografia eletrônica de algumas moléculas de ácido hialurônico interligada que tenham sido depositados em uma superfície plana e rotativa sombreada com metais pesados para o contraste.	34
Figura 8 -	Imagem demonstrativa das lesões controle e tratada dos animais de experimentação.	42
Figura 9 -	Frascos de acondicionamento das pomadas e espátula utilizada para a aplicação.	43
Figura 10 -	<i>Punch</i> de 8 mm utilizado para confecção das feridas.	44
Figura 11 -	Segmentação da área da ferida.	46
Figura 12 -	Procedimento para análise da quantidade de colágeno, através de lâminas coradas com Tricrômico de Masson utilizando o <i>plugin</i> “Colour Deconvolution” do <i>ImageJ</i> . Aquisição da imagem (A), decomposição em três cores (B), Seleção do <i>plugin</i> “Image” – “Adjust” – “Threshold” (C), aplicação “Threshold” (D) e fornecimento dos resultados (E).	47
Figura 13 -	Módulo Elástico e Viscoso em função da frequência angular para pomada e pomada + ácido hialurônico (90:10) à 37 °C.	50
Figura 14 -	Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para pomada e para a mistura de pomada + ácido hialurônico.	51
Figura 15 -	Módulo Elástico e Viscoso em função da porcentagem de deformação. ..	52
Figura 16 -	Ferida com aplicação da pomada com ácido hialurônico (direita) e controle (esquerda). Após 7 dias.	55
Figura 17 -	Ferida com aplicação da pomada placebo (direita) e controle (esquerda). Após 7 dias.	55

Figura 18 -	Cicatriz da ferida tratada com a pomada de ácido hialurônico (direita) e controle (esquerda). Após 14 dias.	56
Figura 19 -	Cicatriz da ferida tratada com a pomada placebo (direita) e controle (esquerda). Após 14 dias.	56
Figura 20 -	Imagens histológicas representativa de diferença em cor e aspecto na ferida tratada após 07 dias (esquerda) e 14 dias (direita). TM 50x (120 µm).	57
Figura 21 -	Imagens histológicas representativa da quantidade de fibras de colágeno entre os grupos, onde: C07 - Controle da pomada placebo; P07 - Pomada placebo; C'07 - Controle da pomada com ácido hialurônico; PAH07 - Pomada com ácido hialurônico. TM 200x (30 µm).	58
Figura 22 -	Imagens histológicas representativa de presença de infiltrados inflamatórios (seta amarela), fibroblastos (seta azul) e vasos neoformados (seta vermelha). HE 200x (30 µm).	59
Figura 23 -	Imagens histológicas representativa da densidade de colágeno, na região onde foram realizadas as feridas cutâneas, nos grupos experimentais de 14 dias. TM 200x.	60
Figura 24 -	Imagens histológicas representativa da presença de folículos pilosos e fibroblastos. HE 200x.	61
Figura 25 -	Imagens histológicas representativas da densidade de colágeno em ambos os períodos experimentais. TM 200x.	62
Figura 26 -	Gráfico representativo da média das áreas das lesões, onde P07 - pomada placebo; C07 - controle da pomada placebo; PAH07 - pomada com AH; C'07 - controle da pomada com AH.	64
Figura 27 -	Gráfico representativo da média da porcentagem de colágeno nos grupos experimentais de 07 dias.	65
Figura 28 -	Gráfico representativo da média da porcentagem de colágeno nos grupos experimentais de 14 dias.	67
Figura 29 -	Gráfico representativo da evolução da porcentagem de colágeno entre os períodos experimentais (em preto 14 dias, em vermelho 07 dias).	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores da área (cm ²) da lesão de cada animal dos respectivos grupos experimentais: P07 (pomada placebo), C07 (controle da pomada placebo), PAH07 (pomada com ácido hialurônico), C'07 (controle da pomada com ácido hialurônico).	82
Tabela 2 -	Valores das médias e desvios padrão da área das lesões dos respectivos grupos experimentais: P07 (pomada placebo), C07 (controle da pomada placebo), PAH07 (pomada com ácido hialurônico), C'07 (controle da pomada com ácido hialurônico).	83
Tabela 3 -	Comparações dos grupos para variável área.	84
Tabela 4 -	Descritiva para porcentagem de colágeno dos respectivos grupos experimentais: P07 (pomada placebo), C07 (controle da pomada placebo), PAH07 (pomada com ácido hialurônico), C'07 (controle da pomada com ácido hialurônico).	85
Tabela 5 -	Comparações dos grupos para variável colágeno 07 dias.	86
Tabela 6 -	Descritiva para porcentagem de colágeno dos respectivos grupos experimentais: P14 (pomada placebo), C14 (controle da pomada placebo), PAH14 (pomada com ácido hialurônico), C'14 (controle da pomada com ácido hialurônico).	87
Tabela 7 -	Comparações dos grupos para variável colágeno 14 dias.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido Hialurônico
C'07	Grupo das feridas controle, no mesmo animal que tiveram as feridas tratadas com a pomada com AH por 7 dias
C'14	Grupo das feridas controle, no mesmo animal que tiveram as feridas tratadas com a pomada com AH por 14 dias
C07	Grupo das feridas controle, no mesmo animal que tiveram as feridas tratadas com a pomada placebo por 7 dias
C14	Grupo das feridas controle, no mesmo animal que tiveram as feridas tratadas com a pomada placebo por 14 dias
CEUA/FMJ	Comitê de Ética para Uso de Animais / Faculdade de Medicina de Jundiaí
DSC-P200	Digital Still Câmera – versão P200
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
GAGs	Glicosaminoglicanos
HE	Hematoxilina e Eosina
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IQSC	Instituto de Química de São Carlos
P07	Grupo das feridas tratadas com a pomada placebo por 7 dias
P14	Grupo das feridas tratadas com a pomada placebo por 14 dias
PAH07	Grupo das feridas tratadas com pomada com ácido hialurônico por 7 dias
PAH14	Grupo das feridas tratadas com pomada com ácido hialurônico por 14 dias
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PF-4	Fator Plaquetário 4
TGF- β	Fator de Transformação de Crescimento Beta
TM	Tricrômico de Masson
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

Da	Daltons
%	Porcentagem
m/m	Massa/massa
mm	Milímetro
KCl	Cloreto de Potássio
μm	Micrômetro
$\mu\text{g/ml}$	Micrograma por mililitro
mg/Kg	Miligrama por Quilograma
g	Grama
h	Hora
NaCl	Cloreto de Sódio
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
Pa	Pascal
s^{-1}	Segundos elevado a -1
Hz	Hertz
ml	Mililitro
cm^2	Centímetro quadrado
M	Molar
mg/ml	Miligrama por mililitro

SUMÁRIO

1	<i>INTRODUÇÃO</i>	17
2	<i>OBJETIVOS</i>	21
2.1	Geral	22
2.2	Específicos	22
3	<i>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</i>	23
3.1	Pele	24
3.1.1	Epiderme	25
3.1.2	Derme	25
3.1.3	Hipoderme	26
3.2	Feridas	26
3.3	Processo de cicatrização	27
3.3.1	Fase de Coagulação	29
3.3.2	Fase Inflamatória	30
3.3.3	Fase Proliferativa	31
3.3.4	Fase de Remodelamento	32
3.4	Ácido Hialurônico	34
3.5	Pomada	38
4	<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	39
4.1	Extração do ácido hialurônico	40
4.2	Preparação da pomada com ácido hialurônico	40
4.3	Avaliação da pomada	41
4.3.1	Reologia	41
4.3.2	Microbiológico	41
4.4	Animais de Experimentação	41
4.5	Delineamento Experimental	42

4.6	Técnica Cirúrgica	43
4.7	Avaliação Clínica	44
4.8	Eutanásia dos Animais	44
4.9	Análise Histológica	44
4.10	Análise de Imagem	45
4.10.1	Delimitação e Quantificação da Área da Ferida	45
4.10.2	Quantificação de Colágeno	46
4.11	Análise dos Resultados	48
5	<i>RESULTADOS e DISCUSSÃO</i>	49
5.1	Reologia da Pomada	50
5.2	Resultado Microbiológico	53
5.3	Análise Qualitativa da Cicatrização Induzida pela Pomada	54
5.3.1	Análise Clínico-Fotográfica	54
5.3.2	Análise Microscópica	57
5.3.2.1	Avaliação Histológica no 7º dia	57
5.3.2.2	Avaliação Histológica no 14º dia	59
5.3.2.3	Avaliação Histológica no 07º e 14º dias	62
5.4	Análise Quantitativa da Cicatrização Induzida pela Pomada	63
5.4.1	Análise da Área da Ferida	63
5.4.2	Análise Microscópica	65
5.4.2.1	Quantificação de Colágeno no 7º dia	65
5.4.2.2	Quantificação de Colágeno no 14º dia	66
5.4.2.3	Quantificação de Colágeno no 7º e 14º dias	69
6	<i>CONCLUSÃO</i>	70
	<i>REFERÊNCIAS</i>	72
	<i>ANEXOS</i>	80

1 INTRODUÇÃO

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, cuja principal função é servir de proteção e isolamento do meio interno com o externo. É dividida em 3 camadas, que são elas a epiderme, derme e hipoderme, onde a terceira tem em sua composição tecido conjuntivo e adiposo, não sendo considerada pele propriamente dita (HESS, 2002; DEALEY, 2008).

Quando essas camadas sofrem lesão por qualquer agente físico, químico ou biológico, o organismo é capaz de substituir com suas próprias células. Isso garante a manutenção da integridade tecidual e sua homeostase e ocorre por duas vias, a da regeneração (células idênticas) e da substituição por tecido conjuntivo (fibroplasia ou fibrose), mas por essa via pode ocorrer perda funcional do tecido acometido e posterior formação de cicatriz (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Toda e qualquer lesão que leve à descontinuidade do tecido pode ser chamada de ferida. As lesões podem atingir desde a epiderme até estruturas mais profundas como músculos, articulações, tendões, ossos ou qualquer outra estrutura do corpo. Podem ser causadas por fatores intrínsecos como úlceras, infecções, neoplasias ou extrínsecos, como em lesões acidentais ou incisões cirúrgicas (DEALEY, 2008).

Morais, Oliveira e Soares (2008) relataram que, no Brasil, as feridas acometem a população de forma geral, independente de sexo, idade ou raça, o que determina um alto índice de pessoas que sofrem com alguma alteração na integridade da pele. Ainda, afirmaram que dados estatísticos que comprovem esse fato são precários por falta de registros desses atendimentos. Contudo, o surgimento de lesões na pele onera os gastos públicos e prejudica a qualidade de vida da população.

Na tentativa de reestruturar a parte lesada, o organismo sofre um processo complexo e dinâmico denominado cicatrização, e este é desencadeado por sinalização bioquímica e mediadores inflamatórios no local da lesão, o qual é constituído por uma cascata de eventos que são representadas pelas seguintes fases: coagulação, inflamatória, fibroplasia e remodelamento (STEED, 2003).

Em todas as fases da cicatrização, o ácido hialurônico (AH) está presente, mas na fase proliferativa (fibroplasia) onde é caracterizada pela proliferação de fibroblastos e células endoteliais, está em maior quantidade. Os fibroblastos migram e proliferam na matriz extracelular, composta por fibronectina e ácido hialurônico, a qual garantirá o suporte necessário para a fibroplasia. Esse fenômeno é caracterizado pela síntese de colágeno, o que torna o tecido conjuntivo mais resistente pela deposição e agregação dessas fibras. Assim, o tecido de granulação é formado e composto por fibroblastos, vasos neoformados e macrófagos suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno. Após a

deposição de fibras colágenas, o tecido de granulação, antes altamente vascularizado e habitado por muitas células, agora apresenta características de uma massa fibrótica avascular e acelular, denominada cicatriz (STALDELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998).

O ácido hialurônico (AH) é uma substância encontrada no organismo, que preenche o espaço entre as células em todos os órgãos do corpo. É um dos polímeros naturais pertencentes à classe dos glicosaminoglicanos não sulfatados e representa um importante componente da matriz extracelular da derme. Tem importantes funções estruturais e mecânicas, que desempenham papel fundamental no processo da cicatrização e estimulam a formação de fibrina ((YOSHIOKA; SCABORA, 2009).

Para Vigetti, Ori e Passi (2010) embora o ácido hialurônico tenha a estrutura química menos complexa de todos os glicosaminoglicanos, as cadeias podem atingir massas molares de $10^5 - 10^7$ Da e possuem importantes aplicações nas áreas médica, farmacêutica e cosmética.

Ao observar-se que o AH é efetivamente atuante no processo de cicatrização, nas décadas de 60 e 70, ele começou a ser utilizado na área da oftalmologia, mas nos anos 80 iniciou as aplicações para a prevenção de aderências em cirurgias abdominais e no tratamento da disfunção articular degenerativa. A partir de 1992, quando o ácido foi utilizado como material de preenchimento no tratamento do envelhecimento da pele, iniciaram então, um número crescente de preparações com ácido hialurônico para diversos tratamentos (REINMÜLLER, 2003).

O ácido hialurônico é usado no tratamento de doenças degenerativas e inflamatórias das articulações dos ossos, na reposição do fluido sinovial e na liberação de agentes quimioterápicos em implantes cirúrgicos, como meio hidratante e como sistema para encapsulação e liberação controlada de fármacos e cosméticos (OGRODOWSKI, 2006). Ele também é aplicado em lentes de contato (BEEK; JONES; SHEARDOWN, 2008) e em aplicações vasculares, como um copolímero com propriedades antitrombóticas (XU et al., 2008).

Neste trabalho, o ácido hialurônico utilizado, foi extraído no laboratório de Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), a partir de cristas de frango obtidas em abatedouro de aves, conforme patente registrada (PI 1000460-2), desenvolvido pelo grupo.

Em busca de uma solução a base de ácido hialurônico para acelerar o processo cicatricial, este trabalho analisou, por meio de um reômetro de tensão controlada, uma pomada composta de 10% lanolina e 90% vaselina (m/m) manipulada com o AH em questão,

e avaliou seu efeito quando aplicada em feridas cutâneas em dorso de ratos, através de análise clínica e quantificação de colágeno no local da cicatriz.

2 OBJETIVOS

2.1 – Geral

Este trabalho teve como objetivo utilizar o ácido hialurônico obtido da crista de frango, manipulado na forma de pomada, no processo cicatricial de feridas cutâneas em dorso de ratos.

2.2 – Específicos

- ✓ Obter o ácido hialurônico a partir da crista de frango.
- ✓ Avaliar se o ácido hialurônico interage homogeneamente com o veículo comercial utilizado.
- ✓ Avaliar o efeito do ácido hialurônico sobre as propriedades viscoelásticas do veículo comercial utilizado.
- ✓ Avaliar clinicamente o efeito da pomada no processo cicatricial de feridas cutâneas em ratos.
- ✓ Avaliar os aspectos histológicos da cicatrização dos ratos entre os grupos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 – Pele

A pele é o tecido de revestimento do organismo indispensável à vida, que tem função de isolar e proteger os componentes orgânicos do meio exterior e interior, pois é composta por uma complexa estrutura de tecidos, constituída de grupos celulares, dispostos e relacionados entre si, para adequarem-se de maneira coerente no desempenho de suas funções (PRAZERES, 2009).

Considerada o maior órgão do corpo humano, a pele recobre toda sua superfície, correspondendo a 16% de sua massa e é constituída por uma porção epitelial, a epiderme e uma porção conjuntiva, a derme (figura 1). A hipoderme, que não faz parte da pele, está abaixo e em continuidade com a derme, que serve apenas de suporte e união com os órgãos subjacentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; McGRATH; EADY; POPE, 2004).

Figura 1 - Figura de pele em corte tridimensional.
Fonte: Saúde Total (2011)

Esse tecido possui funções importantes que representa a primeira linha de defesa do organismo, sendo uma barreira física contra traumas, microrganismos e outros parasitas; impede a perda excessiva de líquidos, mantém a homeostase, termorregulação e o metabolismo da vitamina D, além disso, serve ainda como órgão sensorial (IRION, 2005; CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007).

3.1.1 – Epiderme

A epiderme tem como principal função manter a integridade da pele, é a camada mais externa, avascular e constituída de epitélio estratificado, contendo os melanócitos, produtores de melanina, que dá pigmentação à pele. A epiderme costuma regenerar-se entre quatro e seis semanas e, à medida que se movem através dos estratos, as células gradualmente se nivelam, vindo a formar a queratina (DEALEY, 2008; IRION, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A epiderme está organizada em camadas e à medida que as mais superficiais são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular. Em regiões onde a pele é mais espessa, como a planta dos pés, a epiderme chega a apresentar cinco camadas: germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada basal ou germinativa consiste de uma única camada de queratinócitos sobre a membrana basal que separa a epiderme da derme. Ela apresenta intensa atividade mitótica sendo responsável junto com a camada espinhosa, pela constante renovação da epiderme. A camada granulosa apresenta grânulos lamelares formados por bicamada lipídica, que contribuem para formar uma barreira contra a penetração de substâncias e tornar a pele impermeável à água, impedindo a desidratação do organismo. A camada lúcida é constituída por uma delgada camada de células achatadas e é mais evidente na pele espessa. A camada mais superficial é a córnea, de espessura variável, formada por células cujo citoplasma é repleto de grânulos de querato e hialina. (BARANOSKI; AYELLO, 2008; GARTNER; HIATT, 2003).

3.1.2 - Derme

A derme é o tecido conjuntivo onde se apoia a epiderme e une a pele ao tecido celular subcutâneo ou hipoderme. Sua superfície externa é bastante irregular, onde são vistas saliências que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme (papilas dérmicas) (STANDRING, 2010).

Esta camada é a mais espessa, atingindo um máximo de 3 mm na planta dos pés, sendo composta por fibroblastos, colágeno e fibras elásticas, sendo considerada muito elástica e resiliente (com capacidade de recuperação). Situam-se nela as terminações nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos, glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos (DEALEY, 2008).

A derme apresenta duas camadas: a papilar, constituída de tecido conjuntivo frouxo (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas delgadas) em contato com a epiderme; e a reticular,

constituída por tecido conjuntivo denso contendo feixes espessos de fibras colágenas e elásticas. Esse tecido é responsável por algumas funções, como sustentação estrutural, nutrição, defesa, preenchimento, transporte (meio para trocas) e reparo tecidual (GARTNER; HIATT, 2003).

O tecido conjuntivo é composto por uma matriz extracelular e dois tipos de células, as fixas, que quando desenvolvidas permanecem no próprio tecido, como fibroblastos (mais abundante), mastócitos, macrófagos e células adiposas; e as transitórias, quando recrutadas migram da corrente sanguínea para derme, como plasmócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e macrófagos (GARTNER; HIATT, 2003).

3.1.3 – Hipoderme

A hipoderme ou tecido subcutâneo é a camada mais profunda e é composta principalmente de tecido conjuntivo adiposo, onde é responsável pelo isolamento térmico, reserva nutritiva e também o acolchoamento das protuberâncias ósseas, dando ainda suporte às estruturas superiores (HESS, 2002; IRION, 2005).

A hipoderme conecta frouxamente à pele e à fáscia dos músculos subjacentes, o que permite aos músculos contraírem-se sem repuxar a pele. Assim toda e qualquer lesão que leve à descontinuidade do tecido pode ser chamada de ferida (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

3.2 – Feridas

Ferida é a interrupção da continuidade de um tecido biológico, em maior ou menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica que aciona de imediato as frentes da defesa orgânica para o reparo (ARNOLD; ODOM; JAMES, 1994).

As feridas podem atingir desde a epiderme até estruturas mais profundas como músculos, articulações, tendões, ossos ou qualquer outra estrutura do corpo. Podem ser causadas por fatores intrínsecos como úlceras, infecções, neoplasias ou extrínsecos, como em lesões acidentais ou incisões cirúrgicas (DEALEY, 2008).

A perda tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, chegando ao tecido celular subcutâneo. Existem dois tipos de feridas: a de espessura parcial, onde a reparação faz-se pela reepitelização dos anexos epiteliais ou epitélio da região não acometida, apresentando uma cicatriz imperceptível; o outro tipo de ferida é a de espessura total,

precisam de reepitelização, através da formação de tecido de granulação, não somente nas margens da ferida, nesse caso, a cicatriz é totalmente perceptível (MANDELBAUM; SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

As feridas são identificadas, quanto ao potencial de infecção, como limpas ou assépticas, ou não infectadas, livres de microrganismos patogênicos; limpas contaminadas, que ocorrem em tecidos de baixa colonização e sem significativa contaminação prévia; contaminadas, que são feridas colonizadas por flora bacteriana considerável; e infectadas ou sépticas, aquelas potencialmente colonizadas ou quando há contaminação grosseira por detritos ou microrganismos, como parasitas, fungos, bactérias ou vírus (BLANCK; BARROZO, 2009).

Para Geovanini, Oliveira Junior e Palermo (2007), as lesões, quanto ao comprometimento tecidual, são classificadas em estágios I, II, III e IV. No estágio I a pele é íntegra, com sinais de hiperemia, descoloração ou endurecimento; no estágio II, ocorre perda parcial do tecido envolvendo a epiderme ou derme, ulceração superficial com presença de bolhas ou cratera rasa; no estágio III há perda total do tecido cutâneo, necrose do tecido subcutâneo até a fáscia muscular; e no estágio IV, quando há grande destruição tecidual com necrose, atingindo músculos, tendões e ossos.

3.3 – Processo de cicatrização

O processo de reparo tecidual pode ocorrer por duas vias, como mostra a figura 2, a da regeneração, que é o reparo tissular por células idênticas às lesadas, e a da substituição por tecido conjuntivo (fibroplasia ou fibrose), com perda funcional do tecido acometido e posterior formação de cicatriz (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

Figura 2 - Reparo tecidual por regeneração e por fibrose.
Fonte: Cotran, Kumar e Collins (2000)

A cicatrização é uma complexa sequência de eventos coordenados e desencadeados pelo organismo, que objetivam reconstruir estrutural e funcionalmente o tecido comprometido em sua maior plenitude (SILVA et al., 2011). Esse processo cicatricial (fibrose) ocorre quando as células parenquimatosas e a matriz extracelular são acometidas e impossibilitadas de gerar novos tecidos. Na tentativa da reestruturação da parte lesada, o organismo sofre um processo complexo e dinâmico desencadeado pela sinalização bioquímica e mediadores inflamatórios no local da lesão. Esse processo resulta no preenchimento da lesão por tecido conjuntivo, que produz fibrose e posterior cicatriz (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A cicatrização é um processo complexo que envolve a organização celular, sinais químicos e a matriz extracelular, cujo objetivo é reparar os tecidos, buscando o fechamento rápido da lesão, com a finalidade de obter uma cicatriz funcional e esteticamente satisfatória. Somente durante a fase fetal é que o reparo da ferida se dá sem a formação da cicatriz, numa perfeita e organizada regeneração tecidual (MENDONÇA; COUTINHO NETTO, 2009).

Estudos realizados demonstraram que o feto tem um processo de cicatrização de feridas diferente do que ocorre no adulto. A cicatrização evolui mais rapidamente, sem

contração, sem deixar marcas e apresentando um padrão de colágeno mais organizado do que o encontrado no adulto. As características peculiares da cicatrização fetal podem ser atribuídas à alta concentração de ácido hialurônico na matriz extracelular do tecido em cicatrização (LONGAKER; CHIU; ADZICK, 1991).

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e organizada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a formação e a reconstituição do tecido. Tais eventos referidos (figura 3) envolvem 4 fases: de coagulação, inflamatória, de fibroplasia e de remodelamento (STEED, 2003), embora alguns autores apresentem o processo em cinco (BEANES et al., 2003) ou em apenas 3 fases (GURTNER et al., 2008).

Figura 3 - Fases da cicatrização de feridas.
Fonte: Cotran, Kumar e Collins (2000)

3.3.1 – Fase de Coagulação

O rompimento de continuidade tecidual proporciona um extravasamento de constituintes como plasma, plaquetas, fibrinogênio e fibrina para a matriz extracelular. Esse processo é o primeiro momento de liberação de sinalizadores para ocorrer o reparo tecidual (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A coagulação ou homeostasia ocorre logo após a lesão, na qual as plaquetas e fibrinas são os dois principais componentes do processo. As plaquetas são as primeiras células que aparecem após a lesão e têm papel central no processo de homeostasia (LI; CHEN; KISNER, 2007).

Posteriormente, acontece uma dilatação dos vasos locais e um aumento da permeabilidade dos capilares, que contribui para a adesão dos leucócitos no endotélio e para o

extravasamento de mediadores pró-inflamatórios. Para ativar os eventos sequenciais da coagulação sanguínea, as plaquetas iniciam um processo de agregação devido a exposição de colágeno subendotelial (LI; CHEN; KISNER, 2007; WITTE; BARBUL, 1997).

O coágulo de fibrina atua como matriz provisória para migração de leucócitos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, que serve também com reservatório de fatores de crescimento, tais como Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fator de Crescimento Fibroblasto (FGF), Fator de Transformação de Crescimento Beta (TGF- β), Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF), Fator de Agregação Plaquetária, liberando também serotonina, histamina e bradicinina (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998).

3.3.2 – Fase Inflamatória

A fase inflamatória é caracterizada por uma migração de leucócitos para a área da lesão. Dentro de poucas horas após a lesão, grande quantidade de neutrófilos atravessam o endotélio dos capilares sanguíneos para a área lesionada levando moléculas de adesão e rolamento dos leucócitos. A principal ação dos neutrófilos é a fagocitose de restos celulares, micro-organismos e agentes estranhos à ferida (FUJIMAKI et al., 2003). Com o aumento da permeabilidade vascular e por um gradiente de substâncias quimiostáticas, como fatores de complemento, IL - 1 β , Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), TGF - β , Fator Plaquetário 4 (PF - 4) e produtos bacterianos é ativada a proliferação das células inflamatórias (WITTE; BARBUL, 1997).

Os monócitos são atraídos para a área da lesão por sinais liberados por quimiocinas específicas e proteínas 1 de macrófagos inflamatórios. Na área da lesão os monócitos se diferenciam geralmente em torno de 48 a 96 h após o trauma. Os macrófagos atuam auxiliando os neutrófilos na fagocitose de resíduos de tecidos e de células, debridam a ferida e liberam peptídeos (IL - 1 β e TNF - α) às células T auxiliares, ou seja, os linfócitos (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

Os macrófagos são considerados as células reguladoras mais importantes da reação inflamatória, com importante papel nas fases da cicatrização como mostra a figura 4. Esses processos importantes realizados por monócitos/macrófagos permitem induzir a angiogênese e formação do tecido de granulação (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Figura 4 - Importantes funções dos macrófagos nas fases do processo de cicatrização.
Fonte: Witte e Barbul (1997)

Estas células liberam fatores quimiotáticos que atraem fibroblastos para a lesão, com isso, na transição dessa fase para a fase proliferativa da cicatrização, é de fundamental importância que os macrófagos estejam ativados (BROUGHTON; JANIS, 2006; EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007).

3.3.3 – Fase Proliferativa

A resposta inflamatória inicial à lesão promove uma estrutura necessária para a produção de uma nova barreira funcional. Essa fase, também chamada de formação tecidual, inicia-se geralmente três dias pós lesão e é marcada por uma intensa atividade celular e migração de diferentes tipos celulares para a região lesada. Os maiores eventos dessa fase são a formação do tecido de granulação e a reepitelização (LI; CHEN; KISNER, 2007).

A matriz extracelular composta por fibronectina e ácido hialurônico é suporte necessário para receber os fibroblastos, onde se proliferam e permite a fibroplasia. Esse fenômeno é caracterizado pela síntese de colágeno, iniciando assim, a deposição e agregação dessas fibras o que torna o tecido conjuntivo mais resistente (STALDELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998; STARKEY, 2001).

Simultaneamente a fibroplasia, ocorre a angiogênese local, essa neovascularização acontece pelo estímulo de receptores de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e o Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF) que se encontram no endotélio de vasos não-lesados e fornece o suporte nutricional dos fibroblastos (GILLITZER; GOEBELER, 2001).

A migração e ativação de macrófagos e fibroblastos para a região da lesão, somada à presença de vasos recém-formados e ácido hialurônico, permitem que os componentes da nova matriz extracelular possam ser produzidos por essas células. Como o ácido hialurônico tem facilidade de se ligar à água, ele auxilia na resistência do tecido a compressão (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A maturação é o último processo que ocorre nessa fase, onde os fibroblastos instalados no leito da lesão realizarão a síntese de colágeno, que tornará o principal componente da nova matriz. A deposição de fibras colágenas é fundamental à resistência do tecido neoformado. O tecido de granulação altamente vascularizado torna-se uma massa fibrótica avascular e acelular, denominada cicatriz (JORGE, 2009).

3.3.4 – Fase de Remodelamento

A fase de remodelamento ou reparadora, corresponde à fase final do processo de cicatrização, na qual ocorre a formação do tecido conjuntivo novo e de epitelização. Ocorre a reorganização das fibras de colágeno, que se remodelam e amadurecem, dando força de tensão ao novo tecido. Essa fase visa à recuperação da integridade da superfície corporal, com a máxima resistência do defeito residual à tração de suas bordas, diminuindo as chances de reabertura da ferida (GEOVANINI; OLIVEIRA JUNIOR; PALERMO, 2007).

Uma substância produzida em grande quantidade na fase reparadora da cicatrização é o ácido hialurônico, uma vez que têm facilidade de se ligar às moléculas de água, auxilia na resistência do tecido à compressão, propicia um microambiente eficiente para a movimentação celular. À medida que o processo de maturação da ferida avança, a concentração de ácido hialurônico diminui, aumentando a síntese de proteoglicanos e ou glicosaminoglicanos sulfatados. Essa modificação na composição da matriz extracelular favorece a fixação e imobilidade das células, que auxilia a diferenciação e maturação das células (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Na fase de remodelagem tecidual ocorre um equilíbrio entre síntese e degradação do colágeno depositado através da ação das collagenases. A cicatriz atinge definitivamente sua máxima resistência após o terceiro mês, que corresponde de 70% a 80% da pele saudável (BROUGHTON; JANIS, 2006).

No reparo tecidual são utilizadas diversas técnicas e métodos terapêuticos como, por exemplo, materiais tópicos (farmacologia), curativos biológicos ou não (Biomateriais),

tratamentos utilizando a eletrotermofototerapia, entre outras, todas com o objetivo de acelerar cicatrização (figura 5).

Figura 5 – Formas de cicatrização.
Fonte: Gurtner et al. (2008)

Muitos estudos têm sido realizados no intuito de melhorar o reparo e cicatrização de feridas, tendo em vista toda a dificuldade encontrada nas terapêuticas habituais dessa cura. Cuevas, Méndez e Andrade (2007) testaram as propriedades cicatrizantes e reparadoras do ácido hialurônico em lesões de pé diabético, onde obtiveram resultados favoráveis na aceleração do processo de reparação tecidual.

3.4 – Ácido Hialurônico

O ácido hialurônico (AH) é uma molécula geneticamente conservada, formada de repetições de dissacarídeos simples (ácido D-glicurônico β - 1, 3 - *N*-acetil - D-glucosamina - β - 1, 4) denominados glicosaminoglicanos não sulfatados (GAGS) (figura 6) (GALL, 2010).

Figura 6: Ácido hialurônico: Estrutura do núcleo dissacarídeos (a) início da polimerização (b).
Fonte: Gall (2010)

Uma molécula de ácido hialurônico de 10.000 repetições poderia estender por 10 μm se esticado de ponta a ponta, um comprimento aproximadamente igual ao diâmetro de um eritrócito humano (figura 7) (HASCAL; LAURENT, 1997).

Figura 7: Micrografia eletrônica de algumas moléculas de ácido hialurônico interligados que tenham sido depositados em uma superfície plana e rotativa sombreada com metais pesados para o contraste.

Fonte: Hascal e Laurent (1997)

O AH é o único a não ser sulfatado ou equipado com uma proteína. É um polissacarídeo composto pela associação linear, ramificada e alternada de duas moléculas básicas: o ácido D-glicurônico e *N*-acetilglicosamina. Ambas moléculas são unidas por um laço β [1-3] glicuronídeo para formar um dissacarídeo. Pode chegar a uma massa molecular muito grande, por volta de 8 à 10 milhões daltons e comprimento de 2,5 - 6,5 μm . Há também fragmentos fisiologicamente menor de 100.000 à 1.000.000 daltons (GALL, 2010).

O ácido hialurônico é uma molécula polar altamente solúvel em água, pois, devido a essa propriedade, ele pode estar ligado a muitas moléculas de água, com altos níveis de hidratação. Por ser uma molécula de alta estabilidade, as soluções à base deste ácido diferem apenas no tamanho e na massa molecular. A biocompatibilidade do ácido hialurônico não depende da sua síntese de origem, em contraste com outras moléculas, pois a sua estrutura química é invariável, uma vez que todas as células de síntese de AH seguem o mesmo padrão (ROMAGNOLI; BELMONTESI, 2008).

Meyer e Palmer (1934) descreveram um processo para isolar um glicosaminoglicano do humor vítreo de olhos de bovinos. Eles mostraram que esta substância continha um ácido urônico e um aminoaçúcar, mas não sulfatado. Foi proposto, por conveniência, o nome de "ácido hialurônico", da hialóide (vítrea) + ácido urônico. Isto marcou o anúncio do nascimento de uma das macromoléculas mais versáteis e fascinantes da natureza.

Segundo Gall (2010), o ácido hialurônico foi isolado pela primeira vez no humor vítreo do olho antes de ser encontrado em muitos tecidos (cordão umbilical, cartilagens, pele, paredes dos vasos sanguíneos) e maioria dos fluídos corporais (sangue, líquido sinovial, pleural). Sendo assim, a sintetase, enzima que produz ácido hialurônico, é idêntica em muitas espécies (frango, humano, sapo, entre outros) (ROMAGNOLI; BELMONTESI, 2008).

A sua concentração varia em torno de 4100 $\mu\text{g/ml}$ no cordão umbilical, 1400 a 3600 $\mu\text{g/ml}$ no líquido sinovial, 140 a 340 $\mu\text{g/ml}$ no humor vítreo, 200 a 500 $\mu\text{g/ml}$ na derme, 100 $\mu\text{g/ml}$ na epiderme, 0,2 a 50 $\mu\text{g/ml}$ na linfa torácica e 0,01 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ no soro. No reino animal, as maiores concentrações do ácido hialurônico são encontradas na crista do galo (7500 $\mu\text{g/ml}$) e na cartilagem do nariz do boi (1200 $\mu\text{g/ml}$). Também é encontrado na parede de algumas bactérias, como estreptococos, mas está ausente em fungos, bem como em plantas e insetos (GALL, 2010).

O metabolismo do ácido hialurônico é muito dinâmico. Algumas células, como condrócitos das cartilagens, sintetizam e catabolizam ácido hialurônico ao longo da vida do tecido. A síntese é normalmente equilibrada pelo catabolismo, mantendo assim uma constante concentração no tecido (TAMMI; TAMMI, 1998).

Estudos metabólicos demonstraram que a meia-vida de uma molécula de ácido hialurônico na cartilagem é normalmente 2 à 3 semanas. Queratinócitos na epiderme são outro exemplo de células que sintetizam ativamente e catabolizam o ácido hialurônico. Neste caso, a meia-vida de uma molécula de ácido hialurônico é surpreendentemente curto, menos de um dia (HASCAL; LAURENT, 1997).

Ainda Hascal e Laurent (1997) afirmaram que a meia-vida de uma molécula de ácido hialurônico no sangue é muito pequena, apenas alguns minutos, mostrando assim que alguns tecidos predominantemente sintetizam ou catabolizam o ácido hialurônico. Por exemplo, as células da derme são mais ativas na síntese de ácido hialurônico. Uma grande proporção das moléculas sintetizadas escapa desse tecido para ser rapidamente capturado pelos receptores das células do retículo-endotelial nos linfonodos para armazenamento no fígado e posterior catabolismo nos lisossomos.

Células endoteliais do revestimento dos vasos linfáticos removem ativamente cerca de 90% do ácido hialurônico antes que o restante atinge o sistema vascular. Estima-se que quase um terço do total de ácido hialurônico no corpo humano é metabolicamente removido e substituído durante um dia normal (TAMMI; TAMMI, 1998).

No espaço extracelular, as funções do ácido hialurônico são fundamentais para a manutenção da estrutura e funções dos tecidos, devido à sua capacidade de criar volume, lubrificar tecidos e afetar a integridade, mobilidade e proliferação celular. A média da concentração de AH é de 200 mg/kg (0,02%), portanto, em um corpo humano pesando aproximadamente 60 kg, contém cerca de 12g de ácido hialurônico (POMAREDE, 2008).

A estrutura da epiderme, a espessura e a taxa de rotatividade dos queratinócitos variam de acordo com o estágio de desenvolvimento e estado fisiológico do tecido. O ácido hialurônico está intimamente envolvido na proliferação, migração e diferenciação de queratinócitos, e, portanto, participa de todas essas mudanças regulatórias. Assim, seu metabolismo é controlado por tais moléculas sinalizadoras como hormônios, citocinas e fatores de crescimento (TAMMI; TAMMI, 1998).

O ácido hialurônico, além da propriedade de inibir a aderência de neutrófilos em meios de cultura e a diminuição da proliferação de linfócitos, tem propriedade analgésica (inibe a dor com efeito forte e prolongado), modular (proliferação celular), migração e expressão genética das células com atividade reparadora (RESENDE, 2006).

As propriedades estruturais que promovem as características da natureza única do ácido hialurônico são o seu alto peso molecular e de seu grande volume. O material de maneira lenta, mas completa dissolve-se em água para originar uma solução viscosa, clara,

ligeiramente opalescente e incolor, que deve ser preservado no uso de cosméticos (LOWER, 1998).

Este ácido tem a capacidade de reter água em maior quantidade do que qualquer outro polímero natural ou sintético. Também desempenha um papel fundamental no tecido em regeneração e angiogênese, com propriedades osmóticas, estereoscópicas e viscoelásticas e altamente eficientes nos processos de cicatrização dos tecidos (LOWER, 1998; RENA et al., 2009).

O AH tem demonstrado não ser antigênico na injeção em animais, e com potencial alérgico negativo em seres humanos. Em estudos, o ácido mostrou-se resistente à invasão bacteriana (TAMMI; TAMMI, 1998).

Lower (1998) afirmou que como produto, o ácido hialurônico seco pode ser usado em cosméticos em uma concentração de 0,1 a 1,0%. O uso de ácido hialurônico nesses produtos pode ajudar a sua aplicação como um meio de melhorar a circulação de fluidos na pele. Condicionadores de cabelos com um teor de ácido hialurônico ou seus sais podem ajudar a mantê-los mais suaves e flexíveis.

Soluções ultra puras de AH extraídas de crista de galo foram usadas por vários anos como suporte em cirurgias oftálmicas, e preparações similares têm sido utilizadas em doenças degenerativas e inflamatórias das articulações dos ossos de animais e humanos (KIM et al., 1996).

Devido às suas propriedades reológicas única e incomparável com os de qualquer outro polímero natural ou sintético, o ácido hialurônico tem uma grande variedade de aplicações cosméticas e farmacêuticas, uma delas é o preenchimento de defeitos de tecidos moles, tais como rugas faciais ou para tratar distúrbios articulares. As propriedades reológicas de soluções deste ácido são muito importantes para essas aplicações, por exemplo, dispositivos viscocirúrgico oftalmológicos são classificados de acordo com seu comportamento reológico (GARCÍA-ABDUÍN et al., 2011).

O ácido hialurônico pode atuar como um agente antiinflamatório, promover a cicatrização de feridas, reparação dos tecidos e proteger contra a infecção. Pele afetada por condições especiais tais como a irradiação ultravioleta, envelhecimento, distúrbios metabólicos ou trauma, pode ser controlada em termos de teor de umidade (LOWER, 1998).

Ainda Lower (1998) concluiu que o AH, como observado, é normalmente utilizado em formulações cosméticas como potássio ou sal de sódio. Hialuronato de sódio dimetilsilanol usada em gel ocular (2%); utilizado também em gel anti-envelhecimento, gel anti-celulite (2%), loção pós-sol reparadora (5%), gel pós-sol anti-inflamatórios (2%),

hidratante e protetor labial (3%), complexos géis de cuidados da pele (solução de hialuronato de sódio 20%), loção hidratante de pele (0,3%) e máscara facial (0,01%).

3.5 – Pomada

As pomadas são preparações semi-sólidas que apresentam comportamento reológico plástico. Quando aplicadas sobre a pele, amolecem ou fundem-se com a temperatura corporal e/ou com a força de aplicação. Devem ser facilmente espalháveis e sem arenosidades, que adira à pele ou em membranas das mucosas. Consistem em excipientes não-aquosos de fase única contendo um ou mais fármacos dispersos ou dissolvidos. São untuosas e preparadas com excipientes gordurosos ou com polietilenoglicóis. Uma pomada ideal deve apresentar um aspecto homogêneo, não devendo produzir irritação ou sensibilização na pele, nem retardar sua cicatrização. Ela deve ser de consistência mole, inerte, inodora, física e quimicamente estável e compatível com a pele e com os fármacos de uso dermatológico (FERREIRA, 2006).

Oliveira (2009) afirma que as pomadas são utilizadas como veículos para fármacos que destinam a produzir efeito no local ou próximo do sítio de aplicação. Elas também são aplicadas por sua ação emoliente ou protetora da pele.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Extração do ácido hialurônico

Para obtenção do ácido hialurônico foi utilizado o método de extração via soxhlet, desenvolvido pelo grupo de biomateriais e bioquímica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP), segundo patente registrada (PI 1000460-2).

Para essa extração seguiu-se o modelo de Yoshioka e Scabora (2009), onde as cristas de frangos foram adquiridas em abatedouro de aves. Posteriormente elas foram liofilizadas com a finalidade de desidratá-las. Após as cristas secas, picotou-as para que ficasse em um tamanho de aproximadamente 0,5 cm².

Continuando com o processo de extração e purificação de ácido hialurônico, colocou as cristas picotadas em um aparelho soxhlet com acetona em refluxo durante 12 à 72 h, com intuito de retirar a gordura destas cristas. Após a retirada da gordura de todas as cristas de frango, elas foram colocadas em água destilada e após um intervalo de tempo de 24 a 36 h, essa mistura foi filtrada, resultando em um líquido de coloração amarelada e com a viscosidade minimamente aumentada. Após a filtragem, foi adicionado NaCl sólido ao líquido resultante e agitou até que estivesse completamente dissolvido. Posteriormente centrifugou-se e adicionou etanol absoluto ao sobrenadante, até que ficasse em uma proporção de 70% de etanol, e aguardou precipitação. Secou-se o precipitado pelo processo de liofilização e guardou o mesmo em frasco âmbar até o seu uso.

4.2 – Preparação da pomada com ácido hialurônico

Todo procedimento de mistura foi executado em uma capela de fluxo laminar, onde essa foi limpa, desinfetada com álcool 70% e ficou 30 minutos com radiação de ultravioleta para garantir a sua esterilização. Os utensílios utilizados foram devidamente lavados e enxaguados com água a uma temperatura aproximada de 80 °C a 90 °C.

A preparação envolveu a mistura de um veículo, obtido comercialmente, composto de 10% lanolina e 90% vaselina. Este veículo foi pesado e espalhado em um recipiente de vidro onde, após pesagem, foi colocado o ácido hialurônico extraído da crista do frango, em uma proporção de 1% m/m (ROCHA; REIS, 2005). Ambos foram cuidadosamente misturados com uma espátula, em movimentos de vaivém (GIRARDI, 2005), até que apresentasse aparência e consistência homogênea, levando em torno de 30 minutos. Em seguida, a mistura foi acondicionada em frasco opaco e estéril, e posteriormente conservada a 10 °C até o uso.

4.3 – Avaliação da Pomada

4.3.1 – Reologia

Os estudos foram realizados em um reômetro de tensão controlada (AR-1000N - TA Instruments) com sistema acrílico de cone placa com 2° de angulação (60 mm, gap 62 μm) e temperatura de 37 °C. A região viscoelástica foi obtida através de varredura de tensão de 10 a 10000 Pa, onde G' e G'' foram medidos como função da deformação à frequência constante de 1,0 Hz. Os ensaios de viscosidade foram efetuados com variação do cisalhamento de 0,001 a 10000 s^{-1} , na temperatura 37 °C. As medidas foram feitas no máximo dois dias após a preparação da pomada.

4.3.2 – Microbiológico

O teste microbiológico foi realizado em parceria com uma biomédica, responsável pelo setor de Microbiologia de um laboratório de análises clínicas da cidade de São Carlos-SP. O procedimento do teste ocorreu da seguinte maneira: Foi acrescentado aproximadamente 10 mL de meio de cultura líquido BHI (Brain-Heart Infusion) nos frascos da pomada. Posteriormente foi incubado 24 h em estufa bacteriológica a 37 °C.

No dia seguinte, o caldo foi retirado dos frascos da pomada, semeado com alça bacteriológica de 10 microlitros em meios de cultura: agar sangue, agar chocolate, e *MacConkey*, e incubado por mais 24 h em estufa bacteriológica a 37 °C. Após as 24 h verificou-se o crescimento bacteriano.

4.4 – Animais de Experimentação

Para a realização deste estudo foram utilizados 28 ratos (*Rattus norvegicus*: var. *albinus*), machos, da linhagem Holtzman, com massa corporal variando de 250 à 300 g, obtidos do Biotério Central da UNESP, Campus de Araraquara.

Os ratos foram mantidos no Biotério do Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia da USP/São Carlos, durante todo o procedimento experimental em gaiolas apropriadas de prolipropileno padrão, em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, ambiente higienizado, temperatura e ventilação adequadas), e receberam ração própria comum e água *ad libitum*.

4.5 – Delineamento Experimental

Os 28 ratos foram pesados e distribuídos, aleatoriamente, nos grupos experimentais. O primeiro grupo (14 ratos) foi tratado durante 7 dias e o segundo grupo foi tratado durante 14 dias (14 ratos). Os animais de cada um desses grupos foram subdivididos em outros dois grupos (7 ratos cada), sendo um controle e outro tratado. Com a finalidade de padronização todos os animais sofreram duas lesões de 8 mm de diâmetro em seu dorso, uma para aplicação da pomada (com ou sem ácido hialurônico) e outro para controle. A lesão da esquerda foi a controle e a lesão direita a tratada com a pomada (figura 8).

A seguir estão descritos os grupos das lesões:

P07 (n = 7): Lesões tratadas somente com o veículo comercial (Placebo), com animais mantidos em gaiolas por 7 dias.

C07 (n = 7): Lesões não tratadas, com os animais mantidos em gaiolas por 7 dias.

PAH07 (n = 7): Lesões tratadas com pomada contendo o veículo comercial e o ácido hialurônico à 1% (m/m), com os animais mantidos em gaiolas por 7 dias.

C'07 (n = 7): Lesões não tratadas no mesmo animal que tiveram as lesões tratadas com a pomada (veículo comercial + ácido hialurônico), mantidos em gaiolas por 7 dias.

P14 (n = 7): Lesões tratadas com pomada placebo, com animais mantidos em gaiolas por 14 dias.

C14 (n = 7): Lesões não tratadas, com os animais mantidos em gaiolas por 14 dias.

PAH14 (n = 7): Lesões tratadas com pomada com o ácido hialurônico, com os animais mantidos em gaiolas por 14 dias.

C'14 (n = 7): Lesões não tratadas no mesmo animal que tiveram as lesões tratadas com a pomada com AH, mantidos em gaiolas por 14 dias.

Figura 8: Imagem demonstrativa das lesões controle e tratada dos os animais de experimentação.

A pomada (figura 9) foi aplicada uma vez ao dia (manhã) durante todo o período experimental. Para a aplicação da pomada utilizou-se uma espátula limpa e desinfetada com álcool 70% e aplicou-se quantidade de pomada suficiente para cobrir toda área da lesão (ROCHA; REIS, 2005). Neste trabalho não foi utilizado nenhum tipo de curativo, ficando a ferida aberta durante todo o período de tratamento.

Figura 9: Frascos de acondicionamento das pomadas e espátula utilizada para a aplicação.

4.6 – Técnica Cirúrgica

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética para Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Jundiaí – CEUA/FMJ (anexo). Os animais foram pesados e em seguida anestesiados proporcionalmente à massa corpórea, com uma associação de ketamina (95 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg), injetada por via intraperitoneal, com uso de uma seringa de insulina. Após a indução anestésica, os animais foram posicionados em uma superfície plana com extensão dos quatro membros, foi realizada a tricotomia manual no dorso dos mesmos, e seguida de assepsia com solução de iodo.

Foram realizadas duas feridas no dorso de cada animal, com aproximadamente 1,5 cm entre elas, usando um *punch* de aço inoxidável com 8 mm de diâmetro (figura 10) da marca ABC Instrumentos Cirúrgicos, posteriormente foram lavadas com soro fisiológico 0,9% (LEITE, 2009).

Após procedimento cirúrgico, prosseguiu-se o tratamento estipulado e os animais foram retornados às gaiolas.

Figura 10: *Punch* de 8 mm utilizado para confecção das feridas.

4.7 – Avaliação Clínica

Os animais foram avaliados clinicamente quanto ao aspecto da cicatrização e média das áreas das lesões, por meio de fotodocumentação, as imagens foram capturadas com a máquina fotográfica digital Sony® Cyber-Shot DSC-P200 7.2 megapixels, utilizando resolução de 3.0 megapixels, apoiada por um suporte com 16 cm de altura em relação à bancada.

As fotografias foram realizadas sem *zoom*, sem *flash*, apenas com a iluminação ambiente da sala, onde dispõe de quatro janelas que permitiu a entrada da luz solar. As fotos foram colhidas e armazenadas para posterior análise com o *software ImageJ*.

4.8 – Eutanásia dos Animais

No 7º dia após a cirurgia realizou-se a eutanásia dos animais pertencentes aos grupos: C07, P07, C'07 e PAH07; e no 14º dia após a cirurgia realizou-se eutanásia dos animais dos grupos: C14, P14, C'14 e PAH14. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (95 mg/Kg) e xilazina (12 mg/Kg) e depois de realizada a coleta do segmento desejado, os animais, ainda anestesiados, foram sacrificados por injeção intracardíaca de KCl à 30%.

4.9 – Análise Histológica

Com a finalidade de padronizar a coleta da área cicatricial, foi utilizado um *punch* de

8 mm. Após a coleta, as peças permaneceram em solução de formaldeído tamponado a 10% para fixação, durante 24 h. Depois disso, conforme protocolo estabelecido pelo Laboratório do Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, com banhos seriados em soluções de etanol e xilol. Em seguida, as peças foram incluídas em parafina, em sentido longitudinal, e cortadas com espessura padronizada de 4 μm , por meio de um micrótomo rotativo Spencer 820 do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia da UNESP (Universidade Estadual Paulista). Os cortes foram então montados em lâminas histológicas e corados com Hematoxilina e Eosina (HE), para verificação de fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos; e Tricrômico de Masson (TM), para quantificação de colágeno.

As imagens histológicas dessas lâminas foram capturadas pelo sistema de análise de imagem composto por uma câmera digital Motican 1300, embutida no microscópio óptico Leica® do modelo Leitz DMRX, processadas pelo *software* Image Motic Image Advanced – versão 3.2 no Departamento de Engenharia dos Materiais, Aeronáutica e Automobilística Laboratório de Transformação de Fase, com aumento de 200 vezes (30 μm). Foram obtidos 6 campos aleatórios de cada lâmina para posterior quantificação no *software ImageJ*.

4.10 – Análise de Imagem

4.10.1 – Delimitação e Quantificação da Área da Ferida

Para delimitação e quantificação da área da lesão seguiu-se o modelo estabelecido por Jorge (2009) onde, com o intuito de padronizar sua escala, cada imagem foi calibrada através da ferramenta “Analyze/Set Scale”, que permitiu ajustar a medida em pixels/cm por meio da régua contida na foto. Posteriormente, selecionou-se o *plugin* “polygon” para a delimitação da borda da úlcera com o mouse (figura 11), salvando em extensão ROI. Logo após o procedimento, o *software* calculou automaticamente a área em cm^2 pelo comando «CTRL+M».

Figura 11: Segmentação da área da ferida

4.10.2 – Quantificação de Colágeno

Para o cálculo da área percentual do colágeno das lâminas coradas com Tricrômico de Masson (TM), foi utilizado o *plugin* “Colour Deconvolution”, ilustrado pela figura 12 (A). Posteriormente, apareceu as decomposições em 3 cores (azul, laranja e roxa), descartou-se a de cor laranja e roxa, permanecendo assim a azul (Figura 12 – B). Então, selecionou o *plugin* “Image” – “Adjust” – “Threshold” (Figura 12 – C), surgiu assim, a janela “Apply Lut”, na qual, foram selecionados os 3 itens e confirmado. Em seguida apareceu a janela “Threshold”, selecionou-se “Red” e confirmou (Figura 12 – D). Por fim, na lateral da janela clicou-se «CTRL+M», o qual forneceu os resultados (Figura 12 – E).

Figura 12: Procedimento para análise da quantidade de colágeno, através de lâminas coradas com Tricrômico de Masson utilizando o *plugin* “Colour Deconvolution” do *ImageJ*. Aquisição da imagem (A), decomposição em três cores (B), Seleção do *plugin* “Image” – “Adjust” – “Threshold” (C), aplicação “Threshold” (D) e fornecimento dos resultados (E).

4.11 – Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e a análise estatística foi realizada através do programa OriginPro 8 versão 8.0773, onde foi realizada a análise de normalidade e se optou pelo teste ANOVA *one way*, com *post hoc* de *Tukey*, adotando-se o nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A terminologia ácido hialurônico referida no presente estudo, também foi utilizado para referenciar as formas salinas de hialuronato de sódio e potássio, porém o AH obtido neste estudo foi em meio neutro salino.

Após familiarização com a técnica de espatulação, a mistura da pomada com o ácido hialurônico ocorreu sem grandes complicações, com tempo aproximado de 30 minutos, com pequenas pausas nesse intervalo, em torno de 5 minutos, até que o AH fosse completamente dissolvido. A aparência do veículo comercial não foi alterada após a adição do ácido. Girardi (2005) utilizou a mesma técnica de espatulação para misturar colágeno a um creme comercial, e também percebeu que a aparência do creme comercial não havia sido alterada, corroborando com o presente estudo.

5.1 – Reologia da Pomada

Como primeiro item analisado neste estudo reológico foi a viscosidade e a elasticidade da pomada, com e sem ácido hialurônico extraído da crista de frango. Tanto no módulo viscoso quanto no módulo elástico da pomada com AH ocorreu um discreto aumento quando comparado com a pomada sem ácido. Essa diferença pôde ser notada na figura 13, que mostra o módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') pela frequência angular.

Figura 13: Módulo Elástico e Viscoso em função da frequência angular para pomada e pomada + ácido hialurônico (90:10) à 37 °C.

Os resultados experimentais obtidos sobre a influência da taxa de cisalhamento para todas as condições experimentais mostram que as soluções aquosas de ácido hialurônico são sistemas incluídos em fluidos não-newtonianos e pseudoplástico. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores sobre a influência da presença de hialuronato de sódio sobre o comportamento reológico (GARCÍA-ABDUÍN et al., 2011).

A alteração na viscosidade também ocorreu quando analisados em função da taxa de cisalhamento. A pomada acrescida de ácido hialurônico mostrou um discreto aumento viscoso quando comparado com a pomada sem ácido, conforme observado na figura 14.

Figura 14: Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para pomada e para a mistura de pomada + ácido hialurônico.

Resultados de Girardi (2005) mostraram que as propriedades elásticas são predominantes, com extensa região viscoelástica linear, mostrando a habilidade das estruturas em resistir às tensões externas, o que corrobora com o presente estudo onde, embora discreta, uma maior viscosidade da pomada com ácido hialurônico em relação à pomada placebo.

Oliveira (2009) verificou que os cremes com AH apresentavam maior viscosidade do que o creme-base, sendo que o creme com 0,5% de AH apresenta viscosidade relativamente mais elevada, corroborando com o presente estudo.

Soluções de ácido hialurônico foram submetidas à radiação X e Gama e tiveram sua

viscosidade diminuída após o procedimento (DAAR et al., 2010). Girardi (2005) em seus estudos constatou que a viscosidade do creme, utilizado por ela, diminui cerca de 10% após a adição do colágeno, contrariando o presente estudo.

Os resultados seguintes mostram o comportamento visco-elástico do material utilizado em relação a uma porcentagem de deformação aplicada, onde não foram observadas mudanças significativas entre o veículo comercial e o mesmo quando acrescido do ácido hialurônico. Isso demonstra uma grande interação entre eles e uma mistura bem homogênea do veículo comercial com o AH utilizado neste trabalho, conforme pode ser notado na figura 15.

Figura 15: Módulo Elástico e Viscoso em função da porcentagem de deformação.

Segundo Gacía-Abduín et al. (2011), em seus estudos notaram que conforme aumentavam a concentração da solução de ácido hialurônico em cloreto de sódio à 0,1 M, tornava-se maior a viscosidade da mistura, o que corrobora com este presente estudo onde ocorreu um pequeno aumento na viscosidade da pomada com ácido hialurônico quando comparado com pomada sem o AH.

Park et al (2010) em seus estudos concluiu que uma solução de ácido hialurônico à 0,5 mg/ml em solução tamponante salivar apresenta valores de viscosidade semelhante à

saliva. Na presente pesquisa constatou que o ácido hialurônico à 1% (m/m) na pomada também foi encontrado valores de viscosidade semelhantes à da pomada sem a adição de AH.

Oliveira (2009), para o sistema analisado em seu trabalho, um aumento no valor da taxa de cisalhamento produz uma diminuição da viscosidade, esse comportamento foi observado sob diferentes condições experimentais em relação à concentração de ácido hialurônico, e um aumento da concentração do polímero tornou maior o valor da viscosidade aparente para todos os valores da taxa de cisalhamento.

Os resultados demonstraram que, embora discreto, houve um aumento no módulo visco-elástico da pomada utilizado quando acrescido ácido hialurônico, porém mantendo o padrão linear da pomada sem a adição do material. Isto mostra que é uma mistura homogênea e sem perda das propriedades originais do veículo comercial utilizado para esse protocolo.

5.2 – Resultado Microbiológico

O crescimento bacteriano foi encontrado nos dois frascos da pomada (placebo e com AH), esse crescimento foi caracterizado pela presença do *Bacillus cereus*, que é uma bactéria de contaminação ambiental. Essa bactéria possui riscos mínimos de causa de patogenicidade e é esperado em produtos que são manipulados por várias vezes, como foi o caso da pomada, onde manipulou-se mais do que uma vez para a realização do ensaio reológico. Dário (2008), após avaliação microbiológica, encontrou em seu produto resultados acima do limite estipulado para fungos e outros microorganismos diferenciando da presente pesquisa, que essa carga alterada de microorganismos nocivos não foi encontrada possivelmente em razão de o veículo comercial ter sido adquirido em farmácia de manipulação, devido ao cuidado em acrescentar o AH e pelo processo de purificação que o ácido hialurônico passa em sua extração.

Pinnix et al. (2012) em seus estudos não encontrou nenhuma reação de toxicidade ou outros distúrbios na aplicação tópica de seu ácido hialurônico, corroborando com o presente estudo onde a pomada não apresentou nenhum problema bacteriológico ou de reação adversa que impossibilitasse sua utilização.

Rocha e Reis (2005) em sua pesquisa, manipularam a pomada com ácido hialurônico que foi aplicada no dorso dos animais, e não relataram a avaliação microbiológica do produto final. Para essa pesquisa garantiu-se que o produto avaliado não causaria dano aos animais de experimentação.

5.3 – Análise Qualitativa da Cicatrização Induzida pela Pomada

5.3.1 – Análise Clínico-Fotográfica

A pomada deste estudo foi aplicada diariamente nos animais, o que permitiu acompanhar a evolução da cicatrização. Durante esse período não foram realizadas imagens, porém foi anotada toda a evolução desse processo.

Após a cirurgia foi aplicada a primeira dose da pomada, com os animais ainda anestesiados. A cirurgia ocorreu dentro da normalidade, bem como à recuperação dos animais.

Logo no primeiro dia pós operatório notou-se arranhões no dorso de dois dos animais, no lado da ferida que foi aplicada a pomada. Possivelmente esses arranhões ocorreram devido ao incômodo da presença da pomada na lesão. Porém a cicatrização das lesões seguia dentro da normalidade e semelhante aos outros animais. Corroborando com o estudo de Murashita et al. (1996) que também percebeu um pequeno incômodo de alguns animais após o procedimento cirúrgico.

Por volta do 3º dia pós operatório começou a formação das crostas em todas as feridas, tanto controle quanto as tratadas. Ainda, nesse período não havia diferença significativa entre os grupos. Corroborando com a pesquisa de Crusca (2010) que em seu trabalho analisou o comportamento da laserterapia e a aplicação de biomateriais em cicatrização cutânea em ratos, e também observou a formação de crostas de fibrina tanto nas lesões tratadas quanto nas lesões controle no mesmo período do presente estudo.

Ainda, Anilkumar et al. (2011) percebeu a presença das crostas por volta do 7º dia, tanto no grupo tratado com o ácido hialurônico quanto no controle. Porém seu estudo foi realizado em coelhos e com uma área de lesão maior, o que possivelmente acarretou essa alteração.

Em torno do 5º dia pós cirurgia começaram a aparecer às primeiras diferenças entre os grupos, embora discretas. No grupo tratado com pomada, tanto a com ácido hialurônico quanto a placebo, as cicatrizações apresentavam melhor aspecto, devido à hidratação proporcionada pela mesma. Tais achados corroborou com o estudo de Laznicek et al (2012) que analisaram a progressão da cicatrização de feridas cutâneas em ratos durante 1, 2, 24, 72, 144 e 216 h após procedimento cirúrgico, e constataram que a cicatrização máxima da ferida ocorreu em 216 horas e a diferença entre o grupo tratado e o grupo controle só iniciou após 72 h.

No 7º dia pós operatório foram registradas as imagens das feridas e posteriormente prosseguiu a eutanásia dos animais pertencentes a este período. Com as imagens captadas, calculou-se a área de cada lesão, onde as diferenças entre os grupos estavam mais aparentes e as feridas apresentaram-se com uma área bem reduzida, principalmente aquelas tratadas com a pomada com ácido hialurônico (figuras 16 e 17).

Figura 16: Ferida com aplicação da pomada com ácido hialurônico (direita) e controle (esquerda). Após 7 dias.

Figura 17: Ferida com aplicação da pomada placebo (direita) e controle (esquerda). Após 7 dias.

A ferida a qual foi tratada com a pomada com ácido hialurônico mostrou uma cicatrização mais efetiva e de melhor aspecto corroborando com o estudo de Reinmüller (2003), onde constatou em seus pacientes a restauração persistente da pele, alisando as rugas principalmente na testa e regiões perioral quando aplicou o ácido hialurônico na forma intradérmica, acreditando que o AH gera uma mudança na composição do tecido.

A tendência do espaço extracelular é edemaciar devido à presença de altas concentrações de ácido hialurônico, desestabilizando desmossomas e junções aderentes entre as células adjacentes, podendo assim o ácido hialurônico facilitar a remodelação celular constante. Essa remodelação acontece devido à divisão celular dos queratinócitos derivados da camada basal (TAMMI e TAMMI, 1998).

A cicatrização das feridas do grupo 14 dias evoluiu de forma semelhante ao grupo de 07 dias. Porém por volta do 9º dia percebeu-se uma melhor evolução cicatricial no grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico. No 11º dia, algumas feridas do grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico apresentaram-se com oclusão quase completa.

O ácido hialurônico é um abundante glicosaminoglicano da matriz extracelular embrionárias com importantes funções biológicas. Sua importância é reconhecida pela correta montagem das matrizes intersticiais e por sua capacidade de influenciar o comportamento das ligações celulares (VIGETTI, ORI, PASSI, 2010).

No 13º dia de tratamento, as lesões encontraram-se completamente fechadas, porém alguns animais pertencentes ao grupo controle ainda permaneciam com pequena crosta em sua ferida. Essas crostas já não existiam no 14º dia.

No 14º dia, as feridas estavam completamente fechadas, tanto as tratadas (P14 e PAH14) quanto as dos grupos controle (C14 e C'14), porém aquelas tratadas com a pomada com ácido hialurônico apresentaram melhor aspecto cicatricial (figuras 18 e 19).

Figura 18: Cicatriz da ferida tratada com a pomada com ácido hialurônico (direita) e controle (esquerda). Após 14 dias.

Figura 19: Cicatriz da ferida tratada com a pomada placebo (direita) e controle (esquerda). Após 14 dias.

Após a injeção de ácido hialurônico em cicatrizes hipertróficas ou quelóides, coceiras e dor cessaram. Além disso, a infiltração das bordas da ferida com AH após a excisão de cicatrizes hipertróficas ou quelóides ajudou a prevenir a sua recorrência. Este efeito ocorreu porque os tecidos fetais são ricos em AH e nesses tecidos, a formação de cicatriz é mínima (REINMÜLLER, 2003).

A morfologia macroscópica da contração da ferida após o tratamento com ácido hialurônico, complexo de iodo, combinação de complexo de iodo e ácido hialurônico, e de controle mostraram uma melhor cicatrização onde foi aplicado o complexo de iodo e AH, seguido daquela onde foi aplicado somente AH (LAZNICEK et al., 2012), reforçando o objetivo alvo dessa pesquisa.

Conforme Anilkumar et al. (2011), em seu estudo, após 07 dias de tratamento a reepitelização foi maior nas feridas tratadas do que nas controles, e ao 14º dia a reepitelização apresentou quase completa no grupo tratado e com uma grande vantagem sobre o controle, corroborando com essa pesquisa, que aos 14 dias ocorreu cicatrização total das feridas, com melhor aspecto aquelas tratadas com a pomada com ácido hialurônico.

No grupo tratado por 14 dias não foi mensurada a área da lesão devido à cicatrização total das feridas.

5.3.2 – Análise Microscópica

Houve uma diferença perceptível no padrão e orientação do colágeno no tecido em cicatrização em comparação com o tecido normal. Após coloração artificial do campo para estudar o padrão e distribuição de colágeno, que mostrou feixes ondulados dispostos em forma compacta de uma área na região saudável, enquanto a malha solta e ramificada como padrão de neocolágeno foi observada na área lesionada (ANILKUMAR et al., 2011).

Queratinócitos epidérmicos nas camadas celulares suprabasais tem o AH como componente predominante da matriz extracelular. Os dados atuais são consistentes com a possibilidade de que o ácido hialurônico ao interagir em nível celular, estimula a organização do colágeno da derme (TAMMI e TAMMI, 1998).

Em análise histológica qualitativa, o tecido compreendido na área da ferida apresentou-se com coloração e aspecto diferente da área com tecido normal. Essa diferença ocorreu tanto no grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico quanto na pomada placebo, e também nas feridas controle. Nos animais cujas feridas foram acompanhadas por 07 dias essa diferença estava mais marcante do que nos animais do grupo de 14 dias (figura 20).

Figura 20: Imagens histológicas representativa de diferença em cor e aspecto na ferida tratada após 07 dias (esquerda) e 14 dias (direita). TM 50x (120 μ m).

5.3.2.1 – Avaliação Histológica no 7º dia

Nas lâminas coradas com TM e HE, observou uma diferença em cor e aspecto na região da ferida. Nesse período não se notou uma diferença na densidade de colágeno entre os grupos, porém as feridas que foram tratadas com a pomada com ácido hialurônico mostrou uma trama de colágeno mais organizada do que as dos demais grupos. Contudo a densidade colagênica foi pouca neste período (figura 21).

Figura 21: Imagens histológicas representativa da quantidade de fibras de colágeno entre os grupos, onde: C07 - Controle da pomada placebo; P07 - Pomada placebo; C'07 - Controle da pomada com ácido hialurônico; PAH07 - Pomada com ácido hialurônico. TM 200x (30 μ m).

Rocha e Reis (2005), relataram que no processo cicatricial em rato albino, aos quatro dias de pós-operatório e tratamento, apresentou nuances de maior aceleração e outras de igualdade. Em suas análises, durante esse período, mostrou a maior presença de macrófagos nas suas funções de remoção de restos fibrilares, restos celulares, com neoformação vascular e uma revelação de certa quantidade de fibras colágenas, mostrando que o tratamento promoveu um adiantamento na fase inflamatória e de fibroplasia, se comparada aos outros tratamentos. Esses resultados assemelham-se aos observados no presente estudo.

Murashita et al. (1996), ao avaliar uma base de pele artificial embebida ou não em ácido hialurônico observou histologicamente que no sétimo dia infiltrados inflamatórios estavam semelhante nos dois enxertos (com e sem AH) e o número de capilares eram pouco maiores nos enxertos de AH em comparação com os enxertos controle. Corroborando com o presente estudo que observou nas lâminas histológicas dos grupos de 07 dias um grande infiltrado de células inflamatórias, presença de vasos sanguíneos neoformados e fibroblastos ativados (figura 22).

Figura 22: Imagens histológicas representativas de presença de infiltrados inflamatórios (seta amarela), fibroblastos (seta azul) e vasos neoformados (seta vermelha). HE 200x (30 µm).

Anilkumar et al. (2011), observaram em sua pesquisa que ao fim do sétimo dia pós cirúrgico, a cicatrização encontrava-se incompleta, com presença de exsudados, números moderados de células necróticas no local da ferida e infiltração de linfócitos e macrófagos. Na presente pesquisa também observou-se um processo cicatricial incompleto e a presença de infiltrados inflamatório, no mesmo período.

5.3.2.2 – Avaliação Histológica no 14º dia

Em análise histológica da cicatriz das feridas desse período, observou-se pouca diferença no aspecto e coloração na região lesada, constatou-se também uma densa trama de colágeno com maior organização de suas fibras, principalmente no grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico. O grupo tratado com o placebo se manteve semelhante aos grupos controle (figura 23).

Figura 23: Imagens histológicas representativa da densidade de colágeno, na região onde foram realizadas as feridas cutâneas, nos grupos experimentais de 14 dias. TM 200x.

No 14º dia, havia uma maior extensão de infiltrados celular e um número maior de capilares nos enxertos embebidos em ácido hialurônico, quando comparado com os enxertos de controle (MURASHITA et al, 1996). Nesta presente pesquisa percebeu uma diminuição intensa no número de macrófagos em todos os grupos, porém no grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico essa diminuição foi mais intensa.

Ao analisar as lâminas histológicas dos grupos, constatou-se uma presença marcante de formação de folículos pilosos em formação com maior intensidade no grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico. Também verificou-se presença considerável de fibroblastos. Os demais grupos não apresentaram diferença visual entre si.

A presença marcante de fibroblastos (figura 24) nas feridas tratadas com a pomada com AH favoreceu a maior produção de colágeno. Esse resultado corrobora com o estudo de Dário (2008), que percebeu essa relação quando aplicou argila medicinal em feridas cutâneas em ratos.

Figura 24: Imagens histológicas representativa da presença de folículos pilosos e fibroblastos. HE 200x.

O grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico mostrou uma maior predominância de fibroblastos quando comparado com os grupos controle e placebo. Não foi observado diferença na quantidade de fibroblasto no grupo placebo para os grupos controle. Robert, Robert e Renard (2010), em um estudo *in vitro*, estimulou fibroblasto com ácido hialurônico e percebeu um aumento da proliferação celular enquanto o grupo controle apresentou uma fase de latência prolongada. No quinto dia após a proliferação de células tratadas ocorreu outro súbito aumento.

Mesmo o grupo controle, cuja ferida foi realizada no animal submetido ao tratamento com a pomada com ácido hialurônico, não apresentou alteração histológica quando comparado com os grupos C14 e P14.

A resposta inicial dos tecidos afetados inclui a formação de uma matriz extracelular rica em ácido hialurônico e fibrina que suporta a influência de fibroblastos e células endoteliais no interior da área alvo, e a seguinte formação do tecido de granulação. O tecido de granulação rico em matriz de AH desenvolve funções de reparação tecidual mais rapidamente, além de ser um estimulador e moderador da inflamação (PONCE-LEÓN; FORESTO; VALVERDE, 2009).

5.3.2.3 – Avaliação Histológica no 7º e 14º dias

Ao comparar as lâminas de TM de ambos os períodos experimentais, observou-se grande diferença na densidade de colágeno nos dois períodos, e constatou ainda uma melhor organização das fibras no grupo tratado com ácido hialurônico. O grupo PAH07 apresentou uma formação colagênica precoce, quando comparado com os demais grupos do mesmo período (figura 25).

Figura 25: Imagens histológicas representativa da densidade de colágeno em ambos os períodos experimentais. TM 200x.

Deposição de colágeno pelos fibroblastos é um dos fatores chave na reconstituição da matriz de suporte em locais de formação de cicatrizes por estimular a proliferação de fibroblastos, aumentar a deposição de colágeno, o que resulta em uma cicatriz de melhor qualidade (PRICE; BERRY; NAVSARIA, 2007).

Corroborando com os dados descritos anteriormente, observou-se nesta pesquisa que após epitelização completa, a qualidade da cicatriz nos grupos tratados com ácido hialurônico apresentou superioridade em relação às demais.

5.4 – Análise Quantitativa da Cicatrização Induzida pela Pomada

Com a obtenção dos dados dos grupos experimentais, analisou-se as áreas das lesões somente dos grupos de 07 dias, já que nos grupos de 14 dias as feridas fecharam completamente. Também quantificou a porcentagem de colágeno nos grupos de ambos os períodos experimentais.

5.4.1 – Análise da Área da Ferida

No sétimo dia pós operatório foram registradas as imagens e as áreas calculadas posteriormente, onde não observou diferenças estatísticas nas médias das áreas ($p > 0,05$) entre os grupos PAH07 ($0,07 \text{ cm}^2$) e P07 ($0,09 \text{ cm}^2$), porém quando comparado com os grupos controles esses se mostraram com diferenças estatísticas (C'07 – $0,11 \text{ cm}^2$ e C07 – $0,10 \text{ cm}^2$) ($p < 0,05$), constatando assim, que o fato das feridas se manterem hidratadas pelas pomadas proporcionou uma cicatrização mais adiantada no sétimo dia e que o ácido hialurônico influenciou nesses resultados (figura 26).

Wit, Neck e Hovius (2007) observaram em seu estudo, que a utilização do ácido hialurônico melhorou a cicatrização tanto qualitativamente, quanto quantitativamente, diminuindo seu tempo, corroborando com o presente estudo.

Figura 26: Gráfico representativo da média das áreas das lesões, onde P07 – pomada placebo; C07 – controle da pomada placebo; PAH07 – pomada com AH; C'07 – controle da pomada com AH.

Medeiros et al. (1999) constatarem em seu estudo, que após a epitelização, existiu uma menor deformidade das lesões nos animais tratados com ácido hialurônico tópico, quando comparados com os controles. Esses achados corroboram com o presente estudo onde as feridas tratadas apresentaram um melhor aspecto. Embora a diferença foi pequena na diminuição da área entre pomada placebo e com ácido hialurônico, quando comparadas com os controles houve uma maior diferença.

A manutenção da área lesada úmida e limpa foi evidenciada, durante o estudo, como ótimo para cicatrização de feridas, mesmo sem o tratamento, essa cicatrização teve um decurso natural sem complicações (ANILKUMAR et al., 2011).

Martins (2010) notou em seus estudos, que em sua primeira mensuração as feridas tratadas com ácido hialurônico nanoestruturado apresentaram boa resposta cicatricial quando comparado com grupo controle.

Crusca (2010) observou em seu estudo, que o grupo o qual foi aplicado curativo biológico e irradiado com laser obteve menor média das áreas da lesão, seguido do grupo o qual somente foi aplicado o biomaterial, e este consequentemente menor que o grupo controle. Esses dados corroboram com o presente estudo que mostra uma menor média da área das lesões que foi aplicado o biomaterial alvo da pesquisa.

5.4.2 – Análise Microscópica

Nas análises microscópicas foram mensurada porcentagem de colágeno no local da cicatriz em ambos os períodos experimentais.

5.4.2.1 – Quantificação de Colágeno no 7º dia

Após obtenção das médias da porcentagem de colágeno nas lâminas histológicas (TM) observou-se que não houve diferença significativa entre os grupos, tendo vista que ainda havia bastante infiltrados inflamatórios nesse período. O grupo tratado com a pomada com AH apresentou uma média de 61,62% de colágeno, contra 59,76% da pomada placebo ($p=0,25$), 56,48% do grupo C'07 ($p<0,05$) e 60,92% do grupo C07 ($p=0,90$) não mostrando diferença estatística significativa entre os grupos (figura 27). Embora o ácido hialurônico seja um importante estimulador na produção de colágeno, nesse período era esperado uma diferença pequena entre os grupos. Mesmo com variações mínimas, o grupo tratado com a pomada com AH apresentou em análise macroscópica uma melhor disposição nas fibras de colágeno, deixando sua trama mais uniforme.

Figura 27: Gráfico representativo da média da porcentagem de colágeno nos grupos experimentais de 07 dias.

Segundo Dário (2008), nessa etapa da cicatrização os macrófagos estimulam o crescimento de tecido novo, com a presença de pequenas fibras de colágeno, um número

considerável de macrófagos e o início de um processo de reepitelização pela presença de tecido de granulação e fibroblastos. Nessa fase, os macrófagos estimulam a produção de fibroblasto que por sua vez propiciam a produção de colágeno. Esses achados corroboram com o presente estudo, pois quantidades significantes de macrófagos e fibroblastos foram observadas, e a presença de colágeno comportou-se da maneira descrita.

Conforme descrito por Girardi (2005) em sua pesquisa, no sétimo dia de tratamento com seu creme manipulado foi encontrado presença de infiltrados, neovascularização, presença de formação de colágeno com paralelismo incompleto de suas fibras. Esses achados corroboram com o presente estudo, onde no sétimo dia havia pouca colagenização e presença de grande número de infiltrados inflamatórios.

Em culturas de células de fibroblastos e queratinócitos após a adição de ácido hialurônico ativaram sua produção e ocorreu um aumento em ambos os tipos de células em cerca de 20%. Estas experiências confirmam e ampliam o papel de AH pericelular na regulação da expressão e ativação destes dois elementos da matriz (ROBERT; ROBERT; RENARD, 2010). Esses achados corroboram com o presente estudo, já que a produção de fibroblasto está intimamente relacionado com a produção colagênica.

Rocha e Reis (2005) observaram em sua pesquisa, que a quantidade de fibras colágenas aumentou linearmente nos dias analisados, e os grupos comparados não houve um aumento linear, pelo contrário um dos grupos apresentou suas as fibras diminuídas após o 7º dia.

Robert, Robert e Renard (2010) constataram em sua pesquisa, que no 5º dia após o tratamento com AH nas células, sua proliferação aumentou repentinamente, e novamente no sexto dia. Esta cinética de proliferação celular foi bastante diferente da ressíntese de AH após degradação, dessa maneira resultou uma resposta rápida, reação contínua e sem atraso de fase.

Na derme, o ácido hialurônico promove o movimento de migração e proliferação de fibroblastos na matriz extracelular. Este AH estimulam a proliferação das células endoteliais e promovem a angiogenese. Isto é realizado em colaboração com outros fatores, incluindo fatores de crescimento, contudo aumentando e modelando a trama de colágeno (GALL, 2010).

5.4.2.2 – Quantificação de Colágeno no 14º dia

Ao analisar as lâminas correspondentes a este período observou-se uma maior trama de colágeno no local onde foi efetuada a lesão. Isso ocorreu devido ao tempo de cicatrização e

também pelo reparo total da ferida.

A cicatrização completa era evidente nas feridas controle, mas nos sítios tratados demonstraram mínima cicatriz proveniente de uma trama de colágeno recém-estabelecidas (ANILKUMAR et al, 2011).

Oliskovicz et al. (2006) observou que após catorze dias de tratamento, o grupo que foi aplicada a pomada manipulada apresentou uma maior presença de fibras colágenas em relação aos demais tratamentos. Esses achados corroboram com a presente pesquisa, que demonstrou uma melhor trama colagênica nas feridas tratadas com a pomada com ácido hialurônico por catorze dias.

O grupo PAH14 obteve uma maior média na porcentagem de colágeno com 73,39% seguido de ambos os grupos controles (C14 e C'14) com 69,29% ($p < 0,05$) e por fim o grupo tratado com a pomada placebo (P14) com 66,83% ($p < 0,05$) (figura 28). O grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico apresentou um melhor resultado na porcentagem de colágeno com diferença estatística significativa entre os demais grupos. Entre os grupos controle e placebo não houve diferença estatística.

Figura 28: Gráfico representativo da média da porcentagem de colágeno nos grupos experimentais de 14 dias.

Segundo Anilkumar et al. (2011) a presença de colágeno foi semelhante no grupo controle e nos sítios tratados no sétimo dia, porém havia uma diferença entre os grupos nos dias 14 e 28, o que corrobora com esse estudo onde a deposição colagênica mostrou-se alterada entre os grupos no décimo quarto dia.

Mehra et al (2006) relatou em seu estudo que o efeito estimulante do ácido

hialurônico inibiu a contração do colágeno permitindo uma melhor disposição em camadas e excelente biocompatibilidade.

Girardi (2005) observou, no nono e último dia de tratamento, a presença de alguns polimorfos a formação completa de novos vasos sanguíneos, presença marcante de colagenização e início da reepitelização. No presente estudo as análises foram efetuadas aos 14º dia, e encontrou importante presença de colágeno no grupo tratado, rara presença de células inflamatórias e uma reepitelização completa, incluindo a formação de folículos pilosos na cicatriz.

Pinnix et al (2012), concluíram em seu estudo que a aplicação de uma emulsão de ácido hialurônico, na pele, com a finalidade de prevenir dermatite causada por radioterapia, não reduziu a incidência ou gravidade da lesão. Este relato diferencia-se do presente estudo que visou a reparação da ferida, afirmando que o ácido hialurônico é um importante estimulador no processo cicatricial.

Buckingham, Bader e Smith (2010), observaram em seus estudos que a aplicação de ácido hialurônico em preenchimento de pálpebra mostrou excelentes resultados em 3 a 5 dias, e a única complicação ocorrida foi uma hipocorreção porém, a técnica poderia ser repetida após 2 a 4 semanas. Ainda relatou que esses resultados são devido ao estímulo do ácido hialurônico na formação de fibras colágenas melhores agrupadas.

Os achados descritos acima corroboram com o presente estudo, onde uma maior formação de colágeno e melhor agrupamento de suas fibras foi encontrado no grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico.

Em avaliação histológica, Coelho et al. (2010) observaram que a epitelização das feridas tratadas estavam completas aos catorze dias e com quantidade de colágeno maior do que no grupo controle. Esses achados corroboram com o presente estudo quanto à epitelização e quantificação de colágeno.

Vazquez et al (2003) avaliaram o efeito do ácido hialurônico no tratamento de feridas crônicas em pé diabético, e observaram que o AH aumentou a formação de tecido de granulação, diminuiu a formação de tecido fibrótico, e com isso melhorou a cicatrização.

A cicatrização de feridas fetal é caracterizada pela ausência de marcas cicatriciais. Isso ocorre porque nessa etapa da vida o conteúdo de ácido hialurônico nas lesões permanecem elevadas por períodos mais longos do que em adultos, levando à sugestão de que a quantidade baixa de ácido hialurônico pode reduzir a deposição de colágeno levando à marcas cicatriciais (CHEN; ABATANGELO, 1999).

Os achados descritos anteriormente corroboram com a presente pesquisa, que em análise macroscópica mostrou que no grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico ocorreu uma melhor cicatrização, e em análise microscópica constatou uma maior densidade de colágeno neste grupo.

5.4.2.3 – Quantificação de Colágeno no 7º e 14º dias

Ao Comparar a evolução cicatricial do sétimo dia pós operatório para o décimo quarto dia, observou que o grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico teve um aumento de 11,77% na formação de colágeno, e seu controle 12,81%. O grupo tratado com a pomada placebo teve um aumento de 7,07%, e o controle 8,37%. Percebeu-se que ambos os grupos controle obtiveram uma maior diferença entre os períodos (figura 29).

Figura 29: Gráfico representativo da evolução da porcentagem de colágeno entre os períodos experimentais (em preto 14 dias, em vermelho 07 dias).

Isto foi observado por Coelho et al. (2010) em seu trabalho, com resultados semelhantes na evolução colagenica em todos os grupos experimentais, durante os períodos de 07, 14 e 30 dias, onde houve também um acréscimo de cerca de 10%, semelhante a este trabalho.

CONCLUSÃO

Com esse estudo conclui-se que o ácido hialurônico extraído da crista de frango pelo método soxhlet, quando adicionado à pomada provoca um pequeno aumento em seu módulo viscoelástico sem alterar suas propriedades iniciais, e interagindo homogeneamente com o veículo comercial. Ainda, ao aplicar a pomada manipulada com esse AH em feridas cutâneas em ratos concluiu-se que utilização deste biomaterial proporcionou uma melhor cicatrização de feridas cutâneas e um aumento na densidade de colágeno das cicatrizes tratadas.

ANILKUMAR, T. V.; MUHAMED, J.; JOSE, A.; JYOTHI, A.; MOHANAN, P. V.; KRISHNAN, L. K. Advantages of hyaluronic acid as a component of fibrin sheet for care of Acute wound. **Biologicals**, v. 39, p. 81-88, 2011.

ARNOLD Jr, H. L.; ODOM, R. B.; JAMES, W. D. A pele: estrutura básica e função. **Doenças básicas da pele de Andrews: Dermatologia Clínica**, 8 ed. São Paulo: Manole, p. 1-14, 1994.

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

BARANOSKI, S.; AYELLO, E. A. Skin: An essential organ. **Wound Care Essentials, Practice Principles**, 2 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 47-63, 2008.

BEANES, S. R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- β . **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, p. 1-11, 2003.

BEEK, M.; JONES, L.; SHEARDOWN, H. Hyaluronic acid containing hydrogels for the reduction of protein adsorption. **Biomaterials**, v. 29, p. 780-789, 2008.

BLANCK, M.; BARROZO, S. Curso de feridas In: Desbridamento, métodos e legislação. **Revista Enfermagem Atual**, v. 53, n. 6, p.12, 2009.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, p. e-S – 32e-S, 2006.

BUCKINGHAM, E. D.; BADER, B.; SMITH, S. P.; Autologous fat and fillers in periocular rejuvenation. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 18, p. 385–398, 2010.

CHEN, W. Y. J.; ABATANGELO, G. Functions of hyaluronan in wound repair. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, p. 79–89, 1999.

CLARK, R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue engeneering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1018-1029, 2007.

COELHO, J. M.; ANTONIOLLI, A. B.; SILVA, D. N.; CARVALHO, T. M. M. B.; PONTES, E. R. J. C.; ODASHIRO, A. N. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, p. 045-051, 2010.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: _____. **Robbins – Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 79-100, 2000.

CRUSCA, J. S. **Laser de baixa intensidade no tratamento de úlceras cutâneas aplicando curativos de pericárdio porcino revestido com quitosana**. Dissertação (mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

CUEVAS, R. F; MÉNDEZ, V. A. A; ANDRADE C. I. Efecto del hialuronato de zinc sobre las úlceras en pacientes con diabetes. **Gerokomos**, v. 18, n. 2, 2007.

DAAR, E.; KING, L.; NISBET, A.; THORPE, R. B.; BRADLEY, D. A. Viscosity changes in hyaluronic acid: Irradiation and rheological studies. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 68, p. 746–750, 2010.

DÁRIO, G. M. **Avaliação da atividade cicatrizante de formulação contendo argila medicinal sobre feridas cutâneas em ratos**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2008.

DEALEY C. **Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras**. 3. ed. São Paulo: Editora. Atheneu, p. 143-147, 2008.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 283-289, 2004.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 514-525, 2007.

FERREIRA, A. O. **Formas farmacêuticas semi-sólidas**. São Paulo: ANFARMAG – Associação de Farmacêuticos Magistrais, 2006.

FUJIMAKI, Y.; SHIMOYAMA, T.; LIU, Q.; UMEDA, T.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Low-level laser irradiation attenuates production of reactive oxygen species by human neutrophils. **Journal of Clinical Laser Medicine Surgery**, v. 21, n. 3, p. 165-170, 2003.

GALL, Y. Hyaluronic acid: structure, metabolism and implication in cicatrization. **Annales de dermatologie**, v. 137, sup. 1, p. 30-39, 2010.

GARCÍA-ABDUÍN, A.; GÓMES-DÍAZ, D.; NAVAZA, J. M.; REGUEIRO, L.; VIDAL-TATO, I. Viscosimetric behaviour of hyaluronic acid in different aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 500–505, 2011.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 265-276, 2003.

GEOVANINI, T; OLIVEIRA JUNIOR, A. G; PALERMO, T. C. S. **Manual de curativos**. São Paulo: Corpus, p. 23-50, 2007.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, p. 513-521, 2001.

GIRARDI, R. C. G. **Comportamento de Matrizes de Colágeno Utilizadas no Tratamento de Feridas Planas Induzidas em Pele de Rato**. Dissertação (mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, p. 314-321, 2008.

HASCAL, V. C.; LAURENT, T. C. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. **GlycoForum**, 1997.

HESS, C. T. **Tratamento de feridas e úlceras**. Rio de Janeiro: Reichman e Affonso Editores, p. 3-77, 2002.

IRION, G. **Feridas: Novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 119-143, 2005.

JORGE, A. E. S. **Ultrassom pulsado de baixa intensidade na cicatrização de úlcera venosa crônica: estudo comparativo de duas técnicas de aplicação**. Dissertação (mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, F. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 18, p. 359-370, 2008.

KIM, J.; YOO, S.; OH, D.; KWEON, Y.; PARK, D.; LEE, C.; GIL, G. Seletion of a Streptococcus equi mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 440-445, 1996.

LAZNICEK, M.; SVIK, K.; LAZNICKOVA, A.; VELEBNY, V. Preclinical evaluation of wound treatment with hyaluronan-iodine hydrogel. **Wounds**, v. 24, p. 267-274, 2012.

LEITE, S. N. **Fototerapia como estímulo à cicatrização de úlceras cutâneas em ratos nutridos e desnutridos**. Dissertação (mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

LI, J.; CHEN, J.; KISNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 9-18, 2007.

LONGAKER MT, CHIU ES, ADZICK NS. Studies in fetal wound healing. V: A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. **Annals of Surgery**, v. 213, p. 292-6, 1991.

LOWER, E. Heralding hyaluronic acid (in cosmetics). **Soap Perfumery & Cosmetics**, v. 71, n. 5, p. 41, 1998.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARTINS, E. S. R. **Efeito do ácido hialurônico na cicatrização de feridas em portadores de úlcera venosa**. Dissertação (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

McGRATH, J. A.; EADY, R. A. J.; POPE, F. M. Anatomy and organization of human skin. In: **ROOK, A. et al. Rook's Textbook of Dermatology**. 7 ed. New York: Wiley – Blackwell Publishing, v. 1, cap. 3, p. 1-84, 2004.

MEDEIROS, A. C.; RAMOS, A. M. O.; DANTAS FILHO, A. M.; AZEVEDO, R. C. F.; ARAÚJO, F. L. F. B. Tratamento tópico de queimaduras do dorso de ratos com ácido hialurônico. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 14, n. 4, 1999.

MENDONÇA, R. J; COUTINHO NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização; **Anais Brasileiros de Dermatologia**, São Paulo, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

MEHRA, T. D.; GHOSH, K.; SHU, X. Z.; PRESTWICH, G. D.; CLARK, R. A. F. Molecular Stenting with a Crosslinked Hyaluronan Derivative Inhibits Collagen Gel Contraction. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 2202–2209, 2006.

MEYER, K.; PALMER, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. **Journal of Biological Chemistry**, 107, 629-634, 1934.

MORAIS, G. F. C; OLIVEIRA, S. H. S; SOARES, M. J. G. O. Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. **Revista Texto Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 17, n. 1, p. 98-105, 2008.

MURASHITA, T.; NAKAYAMA, Y.; HIRANO, T.; OHASHI, S. Acceleration of granulation tissue ingrowth by hyaluronic acid in artificial skin. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 49, p. 58-63, 1996.

OGRODOWSKI, C. S. **Produção de ácido hialurônico *Streptococcus*: estudo da fermentação e caracterização do produto**. Tese de doutorado (Faculdade de Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

OLISKOVICZ, K.; FACCO, G.; FAVERO, S.; AFFONSECA, M. I. J.; MESQUITA D. D; SARAGIOTTO, M. H.; MATIAS, R. Morfologia da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos wistar tratados durante sete e catorze dias com extrato de *equisetum pyramidale* cultivado. **Ensaio e Ciência**, vol. 10, n. 1, p. 153-165, 2006.

OLIVEIRA, A. Z. M. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2009.

PARK, M. S.; CHANG, J. Y.; KANG, J. H.; PARK, K. P.; KHO, H. S. Rheological properties of hyaluronic acid and its effects on salivary enzymes and candida. **Oral Diseases**. v. 16 p. 382–387. 2010.

PINNIX, C.; PERKINS, G. H.; STROM, E. A.; TEREFFE, W.; WOODWARD, W.; OH, J. L.; ARRIAGA, L.; MUNSELL, M. F.; KELLY, P.; HOFFMAN, K. E.; SMITH, B. D.; BUCHHOLZ, T. A. YU, T. K.; Topical hyaluronic acid vs. standard of care for the prevention of radiation dermatitis after adjuvant radiotherapy for breast cancer: single-blind randomized phase iii clinical trial, **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 83, n. 4, p. 1089-1094, 2012.

PONCE-LEÓN, P.; FORESTO, P.; VALVERDE, J. Estados larvales de *Ascaris lumbricoides*: capacidad de unión a ácido hialurónico. **Investigación Clínica**, v. 50, p. 5-12, 2009.

POMAREDE, N. Acide hyaluronique. **Annales de dermatologie et de venerologie**, v. 135, p. 35-38, 2008.

PRAZERES, S. J. **Tratamento de Feridas: teoria e prática**. Porto Alegre: Moriá Editora, cap. 6, p. 97-111, 2009.

PRICE, D. R.; BERRY, M. G.; NAVSARIA, H. A. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 60, p. 1110-1119, 2007.

REINMÜLLER, J. Hyaluronic Acid. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 23, p. 309-311, 2003.

RENA, Y. J.; ZHOUA, Z. Y.; LIUB, B. F.; XUB, Q. Y.; CUIA, F. Z. Preparation and characterization of fibroin / hyaluronic acid composite scaffold. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, p. 372-378, 2009.

RESENDE, M. U. Viscosuplementação no tratamento de osteoartrose do joelho. **Revista do Joelho**, 3 ed., p. 160-164 2006.

ROBERT, L.; ROBERT, A. M.; RENARD, G. Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging. **Pathologie Biologie**, v. 58, p. 187-198, 2010.

ROCHA, C. B. J.; REIS, N. S. Estudo comparativo do efeito glicosaminoglicanas ácidas sulfatada (Hirudóid[®]) e não-sulfatada (ácido hialurônico) e da própolis sobre a cicatrização da pele de ratos albinos. **Revista Científica da Universidade de Franca**, v. 5, p. 101-109, 2005.

ROMAGNOLI, M.; BELMONTESI, M. Hyaluronic acid-based fillers: theory and practice. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 123-159, 2008.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, p. 418-421, 2001.

SAÚDE TOTAL. Disponível em:
<http://www.saudetotal.com.br/prevencao/topicos/histologia.asp>. Acesso em 10 mar. 2011.

SILVA, R. C. L.; FIGUEIREDO, N. M. A.; MEIRELES, I. B.; COSTA, M. M.; SILVA, C. R. L. **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem**. 3 ed. São Caetano do Sul: Yendis, p. 68-80, 2011.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176, p. 265-385, 1998.

STANDRING, S. **Gray's Anatomia: A base anatômica da prática clínica**. 40 ed. São Paulo: Elsevier, s. 1, cap. 7, p. 145-164, 2010.

STARKEY, C. **Recursos Terapêuticos em Fisioterapia**. 2 ed. Barueri: Manole, p. 176-276, 2001.

STEED, D. L. Wound-healing trajectories. **Surgical Clinics of North America**, v. 83, p. 547-555, 2003.

TAMMI, R.; TAMMI, M. Hyaluronan in the Epidermis. **Glycoforum**, 1998.

VAZQUEZ, J. R.; SHORT, B.; FINDLOW, A. H.; NIXON, B. P.; BOULTON, A. J. M.; ARMSTRONG, D. G. Outcomes of hyaluronan therapy in diabetic foot wounds. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 59, n. 2, p.123-127, 2003.

VIGETTI, D.; ORI, M.; PASSI, A. The *Xenopus* model for evaluating hyaluronan during development. **Glycoforum**, 2010.

WIT, T.; NECK, J. V.; HOVIUS, S. Auto-crosslinked hyaluronic acid gel accelerates healing of rabbit flexor tendons in vivo. **Journal of Hand Surgery**, v. 32, n. 1, p. 32, 2007.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 509-528, 1997.

XU, F.; NACKER, J.; CRONE, W.; MASTERS, K. The haemocompatibility of polyurethane-hyaluronic acid copolymers. **Biomaterials**, v. 29, p. 150-160, 2008.

YOSHIOKA, S. A.; SCABORA, T. Processo de extração e purificação de ácido hialurônico de crista de Frango por método de soxhlet. PI 1000460-2. (BR) 2009.

Anexo A – Apreciação do Comitê de Ética

FACULDADE DE MEDICINA DE JUNDIAÍ

Autarquia Municipal criada por Lei Municipal Nº 1506 de 12 de março de 1968 - C.N.P.J. Nº 50.985.266/0001-09
Reconhecimento Federal Decreto Nº 71656 de 04/01/1973

R. Francisco Telles, 250 - CEP: 13.202-550 - Cx. Postal: 1295
Fone/Fax: (11) 4587-1095 - Jundiaí-SP - site: www.fmj.br - e-mail: fmj@fmj.br

COMITÊ DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS

Jundiaí, 13 de setembro de 2011

Ilustríssimo Senhor
SÉRGIO AKINOBU YOSHIOKA

Ref.:Aprovação de Projeto de Pesquisa.

TÍTULO: "APLICAÇÃO DE POMADA DE ÁCIDO HIALURÔNICO EXTRAÍDO DA CRISTA DO FRANGO PARA REPARO TECIDUAL NO PROCESSO CICATRICIAL DE ÚLCERAS CUTÂNEAS EM RATOS."

Prezado Pesquisador:

O Comitê de Ética para Uso de Animais – CEUA desta Faculdade, em reunião no dia 13 de setembro de 2011, no cumprimento de suas atribuições e após revisão ao seu protocolo de pesquisa em epígrafe, emitiu parecer APROVADO para o seguinte documento:

» Protocolo para Uso de Animais em Pesquisa nº 273/11.

Lembramos a V.Sa. que é necessário enviar a este CEUA relatórios de eventos adversos, caso estes venham a ocorrer, assim como relatório final com os resultados da pesquisa, para finalização do processo. Quaisquer dúvidas estamos à disposição.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Evaldo Marchi

Coordenador do Comitê de Ética para Uso de Animais

Anexo B – Tabela da área da lesão de cada animal dos grupos experimentais.

Tabela 1: Valores da área (cm²) da lesão de cada animal dos respectivos grupos experimentais: P07 (pomada placebo), C07 (controle da pomada placebo), PAH07 (pomada com ácido hialurônico), C'07 (controle da pomada com ácido hialurônico)

Grupos	P07	C07	PAH07	C'07
Animais				
01	0,03	0,10	0,09	0,13
02	0,06	0,09	0,04	0,13
03	0,12	0,13	0,06	0,14
04	0,11	0,12	0,05	0,10
07	0,09	0,08	0,12	0,14
06	0,12	0,09	0,07	0,09
07	0,13	0,11	0,05	0,07

Anexo C – Tabela com dados descritivos das lesões dos grupos experimentais.

Tabela 2: Valores das médias e desvios padrão da área da lesão dos respectivos grupos experimentais: P07 (pomada placebo), C07 (controle da pomada placebo), PAH07 (pomada com ácido hialurônico), C'07 (controle da pomada com ácido hialurônico).

Grupos	P07	C07	PAH07	C'07
Média – cm²	0,09	0,10	0,07	0,11
Desvio Padrão	0,04	0,02	0,03	0,03

Anexo D – Tabela dos resultados da análise pelo teste Tukey para área.

Tabela 3: Comparações dos grupos para variável área.

GRUPOS	P-valor	IC (95%)
PAH07 - P07	0,34	
PAH07 - C'07	0,03	
PAH07 - C07	0,13	
P07 - C'07	0,56	
P07 - C07	0,94	
C07 - C'07	0,87	

Anexo E – Tabela descritiva da análise de colágeno do grupo experimental de 07 dias.

Tabela 4: Descritiva para porcentagem de colágeno dos respectivos grupos experimentais: P07 (pomada placebo), C07 (controle da pomada placebo), PAH07 (pomada com ácido hialurônico), C'07 (controle da pomada com ácido hialurônico).

Grupos	média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
P07	59,76	4,45	50,07	60,45	67,56
C07	60,92	3,67	53,53	60,92	69,62
PAH07	61,62	4,03	55,86	60,69	69,54
C'07	56,48	5,96	36,65	57,49	64,87

Anexo F – Tabela dos resultados da análise pelo teste Tukey para colágeno 7 dias.

Tabela 5: Comparações dos grupos para variável colágeno 07 dias.

GRUPOS	P-valor	IC (95%)
PAH07 - P07	0,25	
PAH07 - C'07	0,00	
PAH07 - C07	0,90	
P07 - C'07	0,01	
P07 - C07	0,65	
C07 - C'07	0,00	

Anexo G – Tabela descritiva da análise de colágeno do grupo experimental de 14 dias.

Tabela 6: Descritiva para porcentagem de colágeno dos respectivos grupos experimentais: P14 (pomada placebo), C14 (controle da pomada placebo), PAH14 (pomada com ácido hialurônico), C'14 (controle da pomada com ácido hialurônico).

Grupos	média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
P14	66,83	5,43	58,01	65,60	84,20
C14	69,29	7,67	39,71	68,67	84,92
PAH14	73,39	5,56	63,57	72,84	88,19
C'14	69,29	6,28	59,78	68,00	82,05

Anexo H – Tabela dos resultados da análise pelo teste Tukey para colágeno 14 dias.

Tabela 7 – Comparações dos grupos para variável colágeno 14 dias.

GRUPOS	P-valor	IC (95%)
PAH14 - P14	0,00	
PAH14 - C'14	0,01	
PAH14 - C14	0,01	
P14 - C'14	0,25	
P14 - C14	0,28	
C14 - C'14	1,00	