



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA SAÚDE



Carolina Silva Cardoso

Avaliação farmacológica da membrana de PVA [Poli (álcool-vinil)] associada a Arnica e à laserterapia no processo cicatricial de lesão cutânea causadas por queimaduras

Mestrado em Biomateriais e Medicina Regenerativa

SOROCABA

2023

Carolina Silva Cardoso

Avaliação farmacológica da membrana de PVA [Poli (álcool-vinil)] associada a Arnica e à laserterapia no processo cicatricial de lesão cutânea causadas por queimaduras

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca Examinadora da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em **Biomateriais e Medicina Regenerativa**.

Orientadora: Profa. Dra. **Priscila Randazzo de Moura**;

Co-orientador: **Prof. Dr. Daniel Komatsu**

SOROCABA

2023

Cardoso, Carolina Silva

Avaliação farmacológica da membrana de PVA [Poli
(álcool-vinil)] associada a Arnica e à laserterapia
no processo cicatricial de lesão cutânea causadas
por queimaduras / Carolina Silva Cardoso. --
Sorocaba, SP: [s.n.], 2023.

p ; cm.

Orientador: Priscila Randazzo de Moura.
Dissertação (Mestrado)-- Pontifícia Universidade
Católica de São Paulo, Programa de Estudos Pós-
Graduados em Biomateriais e Medicina
Regenerativa.

1. Queimadura. 2. Biomateriais. 3. PVA . 4.
Laser de baixa intensidade. I. Moura, Priscila
Randazzo de . II. Pontifícia Universidade Católica de
São Paulo, Programa de Estudos Pós-Graduados em
Biomateriais e Medicina Regenerativa. III. Título.

CDD

Banca Examinadora

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 –
processo número 88887.675758/2022-00

RESUMO

Cardoso, C.S. Avaliação farmacológica da membrana de PVA [Poli (álcool-vinil)] associada a Arnica e à laserterapia no processo cicatricial de lesão cutânea causadas por queimaduras

Introdução: O órgão mais atingido pelas queimaduras é a pele e os cuidados iniciais variam de acordo com o grau da lesão. As queimaduras de 2o grau requerem um cuidado maior, pois os danos são mais extensos e preocupantes e a utilização de um biomaterial pode ajudar no processo de reparo celular, com melhor prognóstico, baixo custo e melhor acessibilidade. O extrato de arnica possui comprovadamente propriedades anti-inflamatória e analgésica em tratamentos de lesões cutâneas. Com o advento da laserterapia, e comprovação na biomodulação do processo inflamatório em queimaduras de 2o grau, é mais uma alternativa terapêutica das lesões cutâneas.

Objetivo: Avaliar os efeitos farmacológicos do extrato de arnica incorporada ao PVA [poli (álcool vinílico)] em sistema de liberação modificado associada ao laser de baixa intensidade sobre queimadura de 2o grau. **Material e Métodos:** As membranas de PVA puro (PVA) ou PVA com extrato de arnica à 5% (PVA+A) foram obtidas e caracterizadas (métodos físico-químicos) para aplicação em lesões cutâneas. Através dos estudos *in vivo* os efeitos do curativo de membranas de PVA e PVA+A, com ou sem a aplicação do laser de baixa intensidade (L), sobre as queimaduras de 2o grau em ratos Wistar que possibilitaram as análises histológica (Hematoxilina-eosina e Tricrômio de Masson) e imunohistoquímica [marcadores: CD68, alfa actina de músculo liso (a-SMA) e fibronectina] nos diferentes grupos experimentais.

Resultados: Com relação a obtenção e caracterização, temos que: a curva de termogravimetria mostrou que a adição da arnica à matriz do PVA não alterou a resistência térmica deste polímero; a calorimetria exploratória diferencial demonstrou que a adição de arnica aumentou sutilmente o valor da cristalinidade da amostra de PVA+A quando comparado à amostra de PVA; no ensaio mecânico de tração, após a adição da arnica observou-se uma redução no valor do módulo elástico, em relação ao PVA; na espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier observou-se que não houve interação entre as moléculas de arnica e as cadeias do PVA; no teste de intumescimento, a presença de arnica reduziu a capacidade de intumescimento da membrana. O perfil de liberação controlado da arnica mostrou uma liberação rápida para o meio em até 9h e liberação sustentada até o final do ensaio. Nos estudos *in vivo*, com relação ao reparo tecidual, o grupo PVA+A+L possibilitou identificar mais fibras colágenas do que no grupo controle ($p<0,05$), já com os marcadores imunohistoquímicos o destaque foi com a a-SMA, onde os grupos PVA e PVA+L demonstraram aumento de miofibroblastos ($p<0,05$). Tanto o aumento no número de fibras colágenas quanto o de miofibroblastos aceleram o processo cicatricial, logo diminui o tempo de reparo tecidual. **Conclusão:** A incorporação do extrato de arnica ao PVA foi biocompatível e com liberação sustentada do ativo de maneira eficaz, sendo uma promissora opção de curativo para lesões cutâneas. Através deste estudo, também, reiteramos que a laserterapia de baixa intensidade com ou sem arnica foi efetivo na aceleração do processo cicatricial, devido ao seu potencial efeito biomodulador, melhorando aspectos inflamatórios, bem como, o condicionamento das fibras colágenas, promovendo rápida cicatrização em lesões cutâneas.

Palavras-chave: biomaterial. fitoterápico. polímero. laser de baixa potência.

ABSTRACT

Cardoso, C.S. The pharmacological effects of arnica extract incorporated into PVA [poly (vinyl alcohol)] in a delivery system associated with low-intensity laser.

Introduction: The organ most affected by burns is the skin and initial care differs according to the degree of injury. Second-degree burns require greater care, as the damage is more extensive and worrisome and the use of a biomaterial can help in the cell repair process, with better planning, low cost and better accessibility. Arnica extract has proven anti-inflammatory and analgesic properties in the treatment of skin lesions. With the advent of laser therapy, and proven biomodulation of the inflammatory process in second-degree burns, it is yet another therapeutic alternative for skin lesions. **Objective:** To evaluate the pharmacological effects of arnica extract incorporated into PVA [poly (vinyl alcohol)] in a delivery system associated with low-intensity laser on second-degree burns. **Material and Methods:** Pure PVA membranes (PVA) or PVA with 5% arnica extract (PVA+A) were resistant and characteristic (physical-chemical methods) for application in skin lesions. Through in vivo studies, the effects of PVA and PVA+A membrane dressings, with or without the application of low-intensity laser (L), on 2nd degree burns in Wistar rats, which enabled histological analyzes (Hematoxylin-eosin and Masson's Trichrome) and immunohistochemistry [markers: CD68, smooth method alpha actin (α -SMA) and fibronectin] in the different experimental groups. **Results:** With regard to obtaining and characterizing, we have that: the thermogravimetry curve showed that the addition of arnica to the PVA matrix did not alter the thermal resistance of this polymer; differential scanning calorimetry demonstrated that the addition of arnica subtly increased the crystallinity value of the PVA+A sample when compared to the PVA sample; in the mechanical tensile test, after the addition of arnica, a reduction in the value of the elastic modulus was observed, in relation to the PVA; in the Fourier Transform Infrared spectroscopy it was observed that there was no interaction between the arnica molecules and the PVA chains; in the swelling test, the presence of arnica reduced the swelling capacity of the membrane. The controlled release profile of arnica showed a rapid release into the medium in up to 9 hours and a sustained release until the end of the test. In in vivo studies, with regard to tissue repair, the PVA+A+L group made it possible to identify more collagen fibers than in the control group ($p < 0.05$), whereas with immunohistochemical markers the highlight was with α -SMA, where the PVA and PVA+L groups showed an increase in myofibroblasts ($p < 0.05$). Both the increase in the number of collagen fibers and myofibroblasts accelerate the healing process, thus reducing tissue repair time. **Conclusion:** The incorporation of arnica extract to PVA was biocompatible and with sustained release of the active in an effective way, being a promising dressing option for skin lesions. Through this study, we also reiterate that low-intensity laser therapy with or without arnica was effective in accelerating the healing process, due to its potential biomodulator effect, improving inflammatory aspects, as well as conditioning collagen fibers, promoting rapid healing in skin lesions.

Keywords: biomaterial. herbal medicine. polymer. low power laser.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Termograma da solução Arnica	31
Figura 2 - Termograma da amostra de PVA.....	32
Figura 3 - Termograma da amostra de PVA+A.	32
Figura 4 - Curva de DSC da solução de Arnica (Endo down).	33
Figura 5 - Curva de DSC da amostra PVA (Endo down).....	33
Figura 6 - Curva de DSC da amostra de PVA+A (Endo down).	34
Figura 7 - Ensaio Mecânico Amostra de PVA+A.	36
Figura 8 - Ensaio Mecânico Amostra de PVA+A.	36
Figura 9 - Gráfico de intumescimento das amostras de PVA e PVA+A em função do tempo (h).....	38
Figura 10 - Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier para a solução de arnica, membrana de PVA e membrana de PVA+A.	39
Figura 11 - Curva de liberação da arnica em função do tempo (h).	41
Figura 12 - Fotografia representativa da experimentação animal. A) Indução da queimadura com o auxílio da barra de alumínio (diâmetro=12mm), pré-aquecida entre 70-80°C, por 10 segundos. B) área queimada no dorso depilado do animal. C) Curativo de PVA sobre a área	42
Figura 13 - Pannel histológico de HE dos tecidos cicatriciais das áreas queimadas de ratos Wistar, dos grupos controle e tratados por 7 dias. A) Nãive; B) Controle, somente queimadura; C) PVA; D) PVA+A; E) PVA+L; F) PVA+A+L. Parâmetros: (*): Epiderme normal; (**)	46
Figura 14 - Pannel histológico de HE dos tecidos cicatriciais das áreas queimadas de ratos Wistar, dos grupos controle e tratados por 14 dias. A) Nãive; B) Controle, somente queimadura; C) PVA; D) PVA+A; E) PVA+L; F) PVA+A+L. Parâmetros: (*): Epiderme normal; (**)	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos Experimentais (Controle e Tratados).....	26
Tabela 2 - Valores de Tg, Tm e Entalpia de fusão das amostras de PVA puro e PVA com arnica.....	34
Tabela 3 - Valores obtidos do ensaio mecânico de tração para as amostras PVA e Amostra PVA + Arnica.....	37
Tabela 4 - Identificação dos estiramentos e deformações presentes no espectro do PVA puro.....	39
Tabela 5 - Identificação dos estiramentos e deformações presentes no espectro da Arnica.	40
Tabela 6 - Análise histológica das lâminas coradas em HE, nos diferentes grupos experimentais.(continua)	43
Tabela 7 - Identificação de Fibras colágenas nos diferentes grupos experimentais.	49
Tabela 8 - Análise dos Marcadores de imunohistoquímica (CD68, α -SMA e fibronectina) do tecido cicatricial da área queimada nos diferentes grupos experimentais (Controle e Tratados).	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP -	Adenosina trifosfato
a-SMA -	Alfa-actina de Músculo Liso
ATR -	Reflectância Total Atenuada
BSA -	Albumina Sérica Bovina
C -	Carbono
cm -	Centímetro (s)
CIS -	Comissões Interestaduais de Saúde
C -	Grupo controle
CD68 -	Marcador de macrófagos
CH₂ -	Metileno
DSC -	Calorimetria Exploratória Diferencial
d -	Dias
DTG -	Termogravimetria derivada
FTIR -	Infravermelho por transformada de Fourier
g -	Grama (s)
HE -	Hematoxilina-Eosina
H -	Hidrogênio
h -	Hora (s)
He-Ne -	Ligação dos elementos Hélio e Néon
H₂O₂ -	Peróxido de hidrogênio
J -	Joule (s)
Kg -	Kilograma (s)
L -	Low Level Laser Therapy
M -	Massa
M_i -	Massa da amostra intumescida
M_s -	Massa da amostra seca
mW -	Megawatt (s)
µm -	Micrometro (s)
mg -	Miligrama (s)

mL -	Mililitro (s)
mm -	Milimetro (s)
min -	Minuto (s)
nm -	Nanômetro (s)
N -	Nêutron (s)
n -	Número de ratos
OH -	Hidroxila
OMS -	Organização Mundial da Saúde
O -	Oxigênio
PGA -	Ácido glicólico
PLA -	Ácido láctico
PVA -	Álcool vinílico
PVA + A -	Álcool vinílico + Arnica
PVA + A + L -	Álcool vinílico + Arnica + Laser
PVA + L -	Álcool vinílico + Laser
poli -	Polímeros
PNPIC -	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
pH -	Potencial hidrogênico
PBS -	Tampão fosfato-salino
Radiação - UVB -	Raio ultravioleta B
SUS -	Sistema Único de Saúde
T_m(T_m) -	Fusão cristalina
TG	Termogravimetria
T_g(T_g) -	Transição vítrea
TM -	Tricrômico de Masson
UPS -	Unidade pilosebácea
v -	Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Geral	21
2.2. Específicos	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Material.....	22
3.2 Animais	22
3.3 Caracterização das membranas de PVA	22
3.3.1 Obtenção das membranas de PVA	22
3.4. Estudos com Experimentação Animal	25
3.4.1 Indução da queimadura de 2o grau.....	25
3.5. Análise microscópica.....	27
3.5.1 Análise histológica.....	27
3.5.2 Coloração - Hematoxilina-Eosina (HE).....	27
3.5.3 Coloração - Tricrômico de Masson (TM)	28
3.5.4 Análise Imunohistoquímica.....	28
3.6. Análise estatística	30
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	31
4.1 Caracterização das membranas de PVA	31
4.1.1 Termogravimetria (TG)	31
4.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	33
4.1.3 Ensaio Mecânico de Tração	35
4.1.4 Ensaio de Intumescimento	37
4.1.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	38
4.1.6 Perfil de Liberação Controlada	41
4.2. Estudos com experimentação animal	41
4.2.1 Análise macroscópica.....	41
4.3. Análise microscópica.....	43
4.3.1 Análise Histológica - Coloração Hematoxilina-Eosina (HE).....	43
4.3.2 Análise Histológica - Coloração Tricrômico de Masson (TM)	48
4.4. Análise Imunohistoquímica.....	50
5. CONCLUSÃO	55

REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	65

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a 16% do peso corporal, com função de proteção e barreira física entre órgãos e o meio externo, mantém a homeostase corporal e é dividida em camadas, sendo elas: a epiderme, a derme e o subcutâneo (BOROJEVIC; SERRICELLA, 1999; OLIVEIRA *et al*, 2012). A camada mais externa é a epiderme, cujo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado é formado por cinco estratos: basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo. A derme é constituída pelos componentes papilar (de tecido conjuntivo frouxo) e pelo reticular (de tecido conjuntivo denso não modelado). Também na derme que se localizam os anexos cutâneos, vasos sanguíneos, nervos e terminações nervosas. Abaixo da derme se localiza o subcutâneo, um tecido conjuntivo com propriedade de unir a pele às estruturas adjacentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Apesar de toda capacidade estrutural e de proteção para com o meio externo, a pele ainda sofre com diversos traumas, dentre eles as queimaduras, um problema de saúde atemporal persistente no Brasil, resultante do calor excessivo, por eletricidade, por radioatividade ou por substâncias químicas corrosivas, provocando perda da homeostase cutânea e desnaturação de proteínas (FAN *et al.*, 2016; CAMPOS; DAHER; DAHER, 2016).

Em relação, à profundidade das lesões no tecido de revestimento, as queimaduras podem ser classificadas em graus: I, II ou III (PIERINI; ASSUNÇÃO, 2014). Às queimaduras de 1o grau são superficiais e atingem a epiderme, causam vermelhidão, inchaço, dor suportável, sem formação de bolhas, sem alterações hemodinâmicas e, na maioria das vezes, resolutividade em até sete dias (PEREIRA *et al*, 2010). Já as queimaduras de 2o grau podem ser divididas em: superficiais (epiderme e parte da derme) e profundas (epiderme e porções extensa da derme). As superficiais provocam eritema, inchaço, desprendimento de camadas e formação de bolhas que, quando rompidas, expõem superfície rósea e úmida. As profundas apresentam-se mais pálidas e menos dolorosas, por comprometimento das terminações nervosas, com ulcerações recorrentes e tendência à cicatrização hipertrófica e contratura (PEREIRA *et al*, 2010).

Por fim, as queimaduras de 3o grau, são consideradas graves e atingem todas as camadas da pele podendo chegar até aos tecidos muscular e ósseo. Estas formam lesões esbranquiçadas ou carbonizadas e, como atingem tecidos subcutâneos, levam

à destruição de nervos, motivo pelo qual são indolores e deformantes, necessitando, em muitos casos, de intervenção cirúrgica e enxertos ou transplante de pele, devido à retração das bordas (PIERINI; ASSUNÇÃO, 2014; SANTOS-JUNIOR *et al*, 2016). Atualmente, os biomateriais de origem natural ou sintética, em diversas apresentações, tais como: formas sólidas, semi sólidas, pastas, líquidos e até retalhos de pele humana são opções terapêuticas para lesões cutâneas (PIRES *et al*, 2015).

Os biomateriais são dispositivos compatíveis aos tecidos orgânicos, de origem natural, quimicamente modificado ou sintético, utilizados na saúde para fins diagnósticos ou terapêuticos (PIRES *et al*, 2015; GHASEMI-MOBARAKEH *et al*, 2019). Isto inclui os biopolímeros, como: o poli (ácido glicólico) (PGA) e o poli (ácido láctico) (PLA) e o poli (álcool vinílico) (PVA) que possuem propriedades química, mecânica e estrutural bem conhecidas e com biocompatibilidade comprovada.

Um dos polímeros responsivos a estímulos é o PVA, porque além das inúmeras aplicações do PVA na medicina, biomedicina, tecnologia farmacêutica, os pesquisadores estão mostrando uma tendência de usar o PVA em tecnologias de impressão 3D/4D. As principais razões para o aumento do interesse do PVA em tecnologias de impressão 3D/4D são: fluidez adequada, responsividade a estímulos, extrusão, biocompatibilidade, biodegradabilidade, custo baixo e outros recursos (MALLAKPOUR; TABESH; HUSSAIN, 2022). Este polímero demonstrou um elevado potencial em aplicações biomédicas, devido a sua natureza elástica, não toxicidade, não-carcinogenicidade e rápida aceitação por parte do corpo (CHANG *et al*, 2000).

O progresso da bioengenharia tem permitido o desenvolvimento e a aplicação de biomateriais em ferimentos (DIXIT *et al*, 2017), o que culminou na possibilidade de regeneração do epitélio ferido, bem como, prevenção da infecção e deterioração do tecido. Em relação à queimadura, os biomateriais desenvolvidos podem atuar no recobrimento da epiderme, substituição da derme ou substituição da derme e epiderme, atuando como alternativa para a realização de enxertos (MACNEIL, 2008). Temos também biomaterial bastante utilizado e produzido com colágeno tipo I bovino associado a silicone, mas existem também os biomateriais fabricados a partir de colágeno criopreservado de cadáver humano, da pele de tilápia, ou ácido poliglicólico e polilático de origem sintética (DIXIT *et al*, 2017; SHEIKHOESLAM *et al*, 2018). Biomateriais produzidos a partir do látex natural de seringueira (*Hevea brasilienses*), contém substâncias que, no tecido humano, são capazes de estimular

a angiogênese, adesão celular e formação de matriz extracelular, propiciando seu uso como acelerador da cicatrização de ferimentos (PENHAVEL *et al*, 2016).

Dentro do imenso universo dos biomateriais poliméricos, o PVA [Poli (álcool vinílico)], obtido através da polimerização do acetato de vinila seguida da reação de hidrólise, apresenta excelentes propriedades físico-químicas, como: consistência e textura macia, isento de toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, resistências química, térmica e mecânica, além das propriedades elásticas e de transparência. Segundo Aranha e Lucas (2001) e Juvêncio (2017), o PVA é um polímero iônico altamente hidrofílico devido à presença de grupos hidroxilas (-OH) ligados em sua molécula. De tal forma que, sua reticulação por agentes químicos e físicos se deve justamente a reação desses agentes com as hidroxilas, podendo assim obter redes tridimensionais (MARTENS; ANSETH, 2000). Tanto o grau de polimerização quanto o grau de hidrólise, a quantidade de grupos acetatos no polímero e a massa molar, são fatores que influenciam na cristalinidade, solubilidade, adesão, força mecânica, bem como, nas propriedades químicas do material resultante (MANSUR *et al*, 2007; PON-ON *et al*, 2014).

O PVA tem apresentado boa aplicabilidade na medicina de biomateriais, como: lentes de contato, cateteres, membranas de diálise, cartilagens, discos intervertebrais, pele artificiais, além de ser aplicado na forma de géis, hidrogéis e filmes para o desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de ativos (fármacos ou fitoterápicos), bem como na produção de arcabouços para aplicações na engenharia de tecido ósseo (LEE; MOONEY, 2001; NUTTELMAN *et al*, 2001; PON-ON *et al*, 2014). Por conta da sua capacidade de absorção de proteínas e água, intumescimento em fluídos corpóreos, torna-o promissor na aplicação de curativos cutâneo, uma vez que, apresenta a capacidade de simular tecidos orgânicos (MANSUR *et al*, 2007, COSTA-JÚNIOR; PEREIRA; MANSUR, 2008).

Oliveira *et al* (2017) também estudaram os hidrogéis de PVA [Poli (álcool vinílico)], incorporando produtos naturais, como extrato de Romã e á Arnica, uma estratégia para aliar seus efeitos bactericidas às propriedades favoráveis dos géis para o tratamento de feridas. Os autores investigaram as propriedades microestruturais, mecânicas e de liberação de amostras de PVA-Romã e PVA-Arnica e observaram que a liberação da Arnica foi mais difícil do que a liberação da Romã,

além das amostras de Romã apresentarem maior potencial de liberação de compostos ativos do que as amostras de arnica.

Atualmente, muitas pesquisas têm sido direcionadas à caracterização de polímeros que possam veicular ativos naturais, semi sintéticos ou sintéticos para o reparo ou regeneração de um tecido lesado, dentre eles o uso de fitoterápicos (advindo de plantas medicinais) com propriedades farmacológicas de interesse clínico. Com a pesquisa feita sobre a utilização de membranas, filmes e arcabouços biológicos ou sintéticos, é perceptível a grande utilização de princípios ativos naturais, extraídos de plantas que possam apresentar mecanismos de reparação, podendo promover ação antioxidante, cicatrizante, anti-inflamatório, antiedematoso entre outros, sendo uma opção de substituição da pele, membranas com fator de crescimento epitelial e tecidos (VYAS; VASCONDEZ, 2014).

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde) que reconhece fragilidade no acesso ao atendimento primário de saúde e que a fitoterapia se torna uma fonte de cuidados de saúde viável e de baixo custo. Já no Brasil, as diretrizes do Ministério da Saúde determinaram prioridades na investigação de plantas medicinais e implantação de práticas de medicina fitoterápica com orientação das Comissões Interestaduais de Saúde (CIS), incluindo-as no Sistema Único de Saúde (SUS), com maior visibilidade em 2006, após a criação de Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (BRASIL, 2014).

A biodiversidade no Brasil, vem de encontro ao uso maciço de plantas medicinais direcionados ao tratamento de lesões cutâneas, como queimaduras, dermatites, alergias por picadas de insetos, contusões, psoríase, dentre outras. Dentre os fitoterápicos mais usados para lesões dérmicas temos babosa, arnica, barbatimão, confrei, aroeira, calêndula, própolis, etc. Na medicina popular brasileira, utiliza à arnica em infusão com álcool como anti-inflamatório, no tratamento de ferimentos, contusões, alívio de coceiras de picadas, inchaço, suavização de hematomas, entre outras funções (BRASIL, 2016).

Peruchi *et al* (2001) compararam a cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos a partir do uso de solução alcoólica de própolis a 10% e a 30%, e constataram que ambas estimularam a reparação tecidual, ocorrendo uma acentuada neovascularização, seguida de rápida regeneração do tecido, embora o resultado das lesões tratadas com solução a 30% fosse mais lento. Em relação à ação terapêutica

do própolis na cicatrização das lesões, os estudos mostraram resultados positivos, com ação antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica e de neoangiogênese, resultados corroborados por Barbosa *et al.* (2009).

Já Della-loggia *et al* (1994) demonstraram que a utilização da calêndula reduziu a inflamação induzida em camundongos. Em feridas cirúrgicas, provocadas experimentalmente em ratos, a aplicação da pomada contendo extrato de calêndula 5% acelerou significativamente a cicatrização dessas feridas (KLOUCHEK-POPOVA *et al*, 1982).

Nos últimos anos, como discutido anteriormente, os fitoterápicos ganharam espaço importante na reparação de tecidos, obtendo a partir deles formulações que agem no tratamento de feridas. Dentre as plantas medicinais de interesse clínico, destacamos à *Arnica montana* L., popularmente conhecida como arnica, que é uma planta herbácea e perene, pertencente à família Compositae, sendo nativa de regiões montanhosas da Europa, com comprovação científica de seus efeitos antiinflamatório, cicatrizante e analgésico, tendo como classe de compostos as lactonas (NATHAN; SCHOLTEN, 1999; CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

A medicina tradicional brasileira atribuiu o nome de arnica também a outras espécies da família Asteraceae, entre elas algumas dos gêneros *Solidago* e *Lychnophora*. O uso da *Solidago microglossa* como arnica, por exemplo, é muito antigo, inscrita na Farmacopéia Brasileira 1ª edição sob o nome de arnica Silvestre (NATHAN; SCHOLTEN., 1998; CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; BRASIL, 2010). Em 2010, o Ministério da Saúde divulgou uma lista contendo 71 plantas medicinais consideradas com potencial para gerar produtos de interesse do SUS (Sistema Único de Saúde), entre elas, encontra-se o *Solidago chilensis* Meyen, ainda com sinonímia utilizada anteriormente, *Solidago microglossa* DC ou *Solidago microglossa* L.

As atividades anti-inflamatórias e cicatrizantes da arnica sempre despertaram grande interesse nos estudos direcionados ao tratamento de injúrias cutâneas. Segundo Nascimento (2011) ao estudar a tintura das flores de arnica incorporada á um gel, descobriu que tanto na fase proliferativa quanto na fase de maturação das fibras colágenas, os animais tratados com o gel obtiveram melhor cicatrização quando comparados aos animais controle. Outros autores atribuíram a melhoria da reparação tecidual à presença das lactonas, helenalina e dihidro-helenalina, por possuírem atividades anti-inflamatórias (KLAAS *et al*, 2002). A pesquisa aponta que a atividade

anti-inflamatória atua na redução do edema e alívio da dor decorrente de trauma tecidual (CONFORTI *et al*, 2007).

Segundo Melo, Ciampi e Vieira (2009), as substâncias presentes na arnica que conferem propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva, analgésica foram atribuídas aos flavonóides, goiasensolido, centraterina, triterpenos, lignanas e ácidos cafeicos, portanto, muitos estudos têm comprovado o potencial anti-inflamatório da arnica, tanto em modelo animal como roedores (MACEDO *et al*, 2004; CONFORTI *et al*, 2007) e cães (PINTO, 1998) quanto em seres humanos (FERNÁNDEZ *et al*, 2002; JEFFREY; BELCHER, 2002; KAROW, 2008; MACEDO *et al*, 2005).

O extrato de arnica, também tem sido usado para miocardite, insuficiência cardíaca, arteriosclerose, angina pectoris e demonstrou redução significativa nos edemas pós-operatórios e hematomas (CASTRO *et al*, 2012).

A arnica pode ser considerada um bálsamo adequado para os primeiros socorros e desconfortos articulares e musculares, por esse motivo, diversos medicamentos contêm esse fitoterápico como principal ativo de suas formulações. Pesquisas apontam à eficácia do tratamento com pomadas de arnica no alívio no processo inflamatório e nos danos oxidativos induzidos pela radiação UVB, e além disso, os derivados da arnica contribuem para o tratamento de feridas de pele e demais inflamações cutâneas de modo a colaborar com o processo reparatório do ferimento (ŠUTOVSKÁ *et al*, 2014).

Castro *et al* (2012) verificaram que, ratos Wistar após intervenção cirúrgica receberam a aplicação de extrato de erva-de-São-João ou arnica com a aplicação de microcorrente (10 microAmperes/2 min) e demonstraram melhora significativa na cicatrização de feridas, podendo ser usado clinicamente como um coadjuvante no tratamento de lesões cutâneas.

O tratamento de queimaduras continua sendo um desafio à medicina, tanto pela sua gravidade, como pelas múltiplas complicações que normalmente ocorrem proporcionais ao tempo necessário para a cura da lesão. A causa mais comum de queimadura é a de efeito térmico e dentre os muitos fatores desencadeantes desse tipo de queimadura podemos destacar as causadas por álcool, pois atingem cerca de 20% de todas relacionadas a altas temperaturas. Pode incluir também qualquer queimadura ocasionada por chamas de fogo, escaldos, objetos quentes como fatores comuns de queimaduras. As menos frequentes são as ocasionadas por correntes

elétricas ou fatores químicos, sendo a primeira considerada muito grave e geralmente letal (RAS-JUNIOR *et al*, 2016).

Dentro do arsenal terapêutico para tratamento complementar de lesões cutâneas, como as queimaduras, temos o recurso da laserterapia. Laserterapia de baixa frequência tem proporcionado efeito analgésico mais rápido, redução do processo inflamatório e aceleração no processo cicatricial de lesões teciduais. O laser terapêutico é uma luz monocromática e coerente que tem sido usada para induzir a cicatrização de feridas indolentes. Os primeiros lasers foram rapidamente introduzidos à Medicina, particularmente na cirurgia, utilizando-se de suas propriedades fototérmicas e fotoablativas (BAXTER, 2003). Sobre os tipos de lasers, temos os lasers de alta intensidade que são fototérmicos, e os lasers de baixa intensidade que promovem a conversão fotoquímica da energia absorvida por fotorreceptores específicos. Os fotorreceptores ou cromóforos são quaisquer tipos de moléculas (enzimas, membranas, substâncias) que apresentam uma configuração atômica capaz de ser excitada pela incidência de fótons específicos, como por exemplo: melanina, porfirina, hemoglobina e citocromo C oxidase (KARU, 1999).

Para alcançar o efeito terapêutico desejado é importante o uso adequado da dosimetria em Joules por centímetros quadrados (J/cm^2) para estimular, ou seja, aumentar a atividade metabólica do tecido, geralmente nas cicatrizes crônicas ou hipotrófica, a quantidade de J/cm^2 é de no máximo 2 J/cm^2 . Quando o objetivo é a bioinibição, ou seja, retardar o processo inflamatório em atividade intensa, a quantidade aplicada é de 18 J/cm^2 . Agora para biomodular o processo de cicatrização, ou seja, evitar que este evolua para uma cicatriz desorganizada, a dose aplicada é de 4 Joules (PIVA *et al*, 2011).

Nesta mesma linha, Corazza (2005) observou que animais irradiados com laser de dose de 5 J/cm^2 apresentaram redução das células inflamatórias nos primeiros 3 dias, configurando uma modulação do processo inflamatório. Segundo Campos (2004), o laser He-Ne (Hélio-Neon) é capaz de aumentar o número e a atividade dos polimorfonucleares sobre bactérias e promover maior fagocitose sobre os detritos teciduais. A fotomodulação corresponde a um aumento inicial do número das células inflamatórias, removendo rapidamente o excesso de detritos e, posteriormente, a redução do número destas células, dinamizando a produção de fatores de crescimento para as fases seguintes. O macrófago é a célula inflamatória mais

importante, pois direciona a formação do tecido de granulação pela liberação de fatores de crescimento (MANDELBAUM *et al*, 2003); a presença marcante desta célula no sítio inflamatório indica o início da fase proliferativa (PICCOLO; PICCOLO; PICCOLO, 2004). Steffani (2019) ao analisarem histologicamente as queimaduras dos ratos submetidos a laser de 670 nm, afirmam que o laser auxilia a formação e o aparecimento dos linfócitos e macrófagos, diminuindo o edema e o número de neutrófilos após algum tempo de aplicação, resultados estes corroborados por Araújo *et al.* (2007).

Outro estudo de Meireles (2005) analisou comparativamente o efeito dos lasers de 660nm e 780nm em queimaduras de ratos e obtiveram maior pavimentação epitelial em todos os grupos irradiados, afirmando ser o laser um recurso eficaz para estimular o reparo das queimaduras. Já Schlager *et al* (2000), apesar de não confirmarem a efetividade do laser terapêutico em acelerar o reparo de queimaduras, observaram que, macroscopicamente, a reepitelização do grupo irradiado demonstrou leve aceleração da reepitelização comparado ao grupo controle.

Até o momento, são escassas as pesquisas científicas quanto ao uso de curativo dérmico do PVA [Poli (álcool vinílico)] incorporado com fitoterápicos, em especial com extrato de Arnica num sistema de liberação modificada, o que justifica a originalidade deste trabalho, bem como, exprime relevância clínica, com o adicional da aplicação da laserterapia de baixa intensidade diretamente sobre as lesões de queimadura de 2o grau induzidas experimentalmente em ratos machos Wistar. O sistema de liberação modificada com arnica incorporada ao PVA, prolonga os efeitos anti-inflamatórios e proporciona melhora precoce e substancial do processo cicatricial, combinado ao efeito sinérgico do laser de baixa intensidade, ambos em conjunto representam promissores recursos terapêuticos na qualidade significativa do reparo tecidual, além de custo baixo, maior acessibilidade ao paciente e menor risco de complicações.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar os efeitos farmacológicos do extrato de arnica a 5% incorporado à membrana de PVA em sistema de liberação modificado, associada ao laser de baixa intensidade no processo cicatricial de lesões cutâneas causadas por queimaduras de 2o grau.

2.2. Específicos

- Obter e caracterizar membranas de PVA puro (PVA) e PVA associada ao extrato de arnica à 5% (PVA+A);
- Avaliar *in vivo* os efeitos das membranas de PVA e PVA+A com ou sem a aplicação do laser de baixa intensidade, sobre as queimaduras de 2o grau em ratos Wistar;
- Analisar macro e microscopicamente (histológico e imunohistoquímico) a cicatrização cutânea nos grupos experimentais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

O PVA 99% hidrolisado, com massa molar (M_w) 85,0-124,0.10³g/mol foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich.

O extrato glicólico (propilenoglicol e etanol) de arnica, nome botânico *Solidago microglossa*, parte aérea do vegetal utilizada (inflorescência) foi obtida comercialmente da empresa Valdequímica Produtos Químicos Ltda, São Paulo-SP, lote: 035901, Fabricante Mapric – Greentech Company- Produtos Farmacocosméticos Ltda.

Todos os reagentes e sais com alto grau de pureza foram obtidos dos laboratórios (Sigma-Aldrich e Synth, Labsynth e ScyTek Laboratories). Os kits de imunohistoquímica foram obtidos da marca Dako, Sigma e Serotec.

3.2 Animais

Foram utilizados 46 ratos machos Wistar, com idade de três a seis meses, pesando entre 250-350 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde (FCMS–PUC/SP). Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (ciclo claro/escuro). O projeto foi submetido e aprovado protocolo no. 2022/127 pela CEUA - FCMS – PUC/SP (Anexo A).

3.3 Caracterização das membranas de PVA

3.3.1 Obtenção das membranas de PVA

A membrana de PVA foi preparada e o adicionamento do polímero em 50 mL de água ultrapurificada, na concentração 10% (m/v = a 5g PVA) à temperatura de 80°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) sob agitação magnética. A temperatura e a agitação magnética foram mantidas até a total dissolução do PVA. Em seguida, esta foi vertida em placas de Petri e levadas ao freezer à -15°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), para o processo de congelamento *overnight* e posterior descongelamento de duas horas, o qual é denominado de crio reticulação,

procedimento realizado em duplicata. A membrana com o extrato de arnica foi obtida com o mesmo procedimento adotado para a membrana de PVA. Neste caso, a arnica foi adicionada à solução de PVA, quando a mesma atingiu a temperatura de 40°C. A concentração de arnica, 5% (m/m = 0,25 mL), utilizada foi em relação a massa de PVA presente na solução. Assim, as amostras foram identificadas como membrana de PVA (usada como controle positivo) e membrana de PVA + 5% de extrato de Arnica (PVA+A).

3.3.3.1 Termogravimetria (TG)

A estabilidade térmica das amostras foi avaliada com o equipamento TA Instruments modelo Discovery TGA 55. As amostras, com massa de aproximadamente 10 mg foram submetidas ao aquecimento no intervalo de 25°C a 700°C, com uma razão de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio.

3.3.3.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial foi realizada com o equipamento TA Instruments modelo Discovery DSC 25. As amostras com massa de aproximadamente 7 mg foram submetidas ao aquecimento no intervalo de 25°C até 250°C, com razão de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio.

3.3.3.3 Ensaio Mecânico

As propriedades mecânicas das membranas obtidas foram avaliadas pelo teste de ensaio mecânico de tração. Para realização das medidas foi utilizado um equipamento universal de ensaios mecânicos da marca Instron, modelo EMIC 23-30 com célula de carga de 490 N. O ensaio foi realizado em triplicata, à temperatura ambiente e com velocidade de travessão de 10 mm/min até o seu rompimento.

3.3.3.4 Teste de Intumescimento

O teste de intumescimento foi realizado, em triplicata, para a membrana de PVA puro e a membrana com arnica. As amostras foram pesadas e colocadas em

tubo Falcon contendo 10mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) a 0,01M e mantidas em banho termostático a uma temperatura de 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). As medições foram realizadas no intervalo de 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos, mantidas, posteriormente, as pesagens de hora em hora até o tempo de quatro horas e depois a cada 24 horas. Para a pesagem, as amostras foram retiradas do tubo Falcon e secadas com papel absorvente a fim de remover o excesso de água da sua superfície. A quantidade de água absorvida foi expressa em porcentagem determinada pela equação 3 (ALVES *et al.*, 2016).

$$\text{Intumescimento (\%)} = [(M_i - M_s)/M_s] \cdot 100 \quad \text{Eq. 3}$$

Onde: M_i = massa da amostra intumescida; M_s = massa da amostra seca.

3.3.3.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de PVA e PVA+A foram analisadas em um equipamento de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, com modo ATR (Reflectância Total Atenuada), Spectrum 65 (Perkin Elmer). Os espectros de absorção foram obtidos na faixa de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e com 32 scans de varredura.

3.3.3.6 Perfil de Liberação Controlada

O Perfil de liberação *in vitro* da membrana, com 2 cm^2 , de PVA+A foi realizado em triplicata. As amostras foram imersas em tubos Falcon com 50 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) e mantidas a 37°C em banho termostático. Em seguida, as alíquotas de 10mL foram coletadas inicialmente após 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 minutos, seguidas por coletas em 2, 3, 4 e 5 horas. Após essa etapa inicial, as alíquotas foram colhidas a cada 24 horas até completar 380 horas de ensaio. A quantidade retirada em cada alíquota foi repostada com solução de PBS após cada coleta. As amostras coletadas foram analisadas em um espectrofotômetro da marca Femto modelo 800 XI, no comprimento de onda de 274 nm. A partir da absorbância obtida para cada amostra, a porcentagem de arnica liberada foi calculada em cada

intervalo de tempo. Para este cálculo, foi utilizada a curva de calibração obtida através da diluição seriada de uma solução a 10% de arnica.

3.4. Estudos com Experimentação Animal

3.4.1 Indução da queimadura de 2o grau

Foram utilizados 46 ratos Wistar machos adultos, com peso aproximado de 250 a 350g, submetidos à anestesia e bloqueio neuromuscular prévio à execução da queimadura de 2o grau. Para tanto, foram utilizados o cloridrato de cetamina (100mg/Kg) e o cloridrato de xilazina (10mg/Kg), via intraperitoneal. Após a anestesia, os animais foram depilados no dorso numa área de 3cm x 3cm, sendo a mesma higienizada com 1% de polivinilpirrolidona-iodo. As queimaduras foram induzidas simetricamente nas áreas depiladas, através do contato com uma barra de alumínio (diâmetro=12mm), pré-aquecida entre 70-80°C, por dez segundos (PEREIRA *et al*, 2012; PIRBALOUTI *et al*, 2012). Após a indução da lesão, colocou-se a membrana de 2cm/2cm PVA ou PVA+A no local onde havia sido depilado. E antes de despertar, os animais receberam dipirona 500mg/mL, 200mg/Kg do animal, via subcutânea. E nos dias subsequentes os animais foram observados, e se dor, receberam tramadol 50 g/mL, na dose de 12,5 mg/Kg do animal, via subcutânea, para a analgesia pós-queimadura. As lesões foram observadas durante cinco dias consecutivos, desde o dia da queimadura considerado “dia 1”, momento que receberam curativo de 2cm/2cm da membrana de PVA ou PVA+A ou laser (L) antes do curativo. Para que o curativo não fosse removido pelo animal, foi utilizada uma bandagem elástica Putter Flex seguida de esparadrapo, adaptada à circunferência do corpo do animal.

Após a indução da queimadura, os curativos foram mantidos por no mínimo 48 horas, alguns animais também receberam em dias alternados a aplicação do laser de baixa intensidade, a saber: no 1º (antes do curativo), 3º (após retirada do curativo) e 5º dias (PIVA *et al*, 2011). Foi utilizado o Laser Duo MM Optics - Aparelho de Laserterapia e Terapia Fotodinâmica, emissor de luz: Laser semiconductor (GaAlAs e InGaAlP), área do feixe laser de saída no BICO da caneta laser: 3mm², comprimento de onda: 660 nm (Laser vermelho), potência do aparelho: 30mW, tipo de feixe: colimado, área de emissão: 0,035 cm² e modo de operação contínuo, com registro

ANVISA: 80051420022. A aplicação do laser de baixa intensidade (660 nm, 4J/cm²), à uma distância pré-determinada por dez segundos, no modo pontual, perpendicularmente a área queimada (ângulo de 90° em relação a lesão), segundo a metodologia de Borato (2006). A água e a comida foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

Cada grupo foi dividido em tempos de 7 e 14 dias (7d e 14d) de duração do experimento (tempo total), até a ressecção do tecido cicatricial (após eutanásia dos animais com isoflurano, via inalatória). Amostras de pele intacta do dorso de alguns animais foram coletadas e consideradas grupo naïve, para comparação contralateral das possíveis alterações histológicas dos grupos experimentais (Tabela 1). As amostras obtidas foram mantidas em solução de formaldeído tamponado à 10%, por 24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, clarificadas em xilol, incluídas em blocos de parafina, e submetidas a microtomia (Micrótomo Leica RM 2245) com cortes longitudinais de 5µm de espessura.

Tabela 1 - Grupos Experimentais (Controle e Tratados)

Grupos Experimentais (n=3 em A n=5 em B, em cada tempo)	Indução de Queimadura
A) Controle (C) 7d e 14d	Somente queimadura sem tratamento
B) Tratados 7d e 14d	
- PVA: PVA	Queimadura - membrana PVA
- PVA+A: PVA + Arnica 5%	Queimadura - membrana PVA+Arnica
- PVA+L: PVA + Laser	Queimadura - membrana PVA+Laser
- PVA+A+L: PVA + Arnica 5% + Laser	Queimadura - membrana PVA+Arnica+Laser
C) Naïve (N) 7d e 14d (do próprio animal em estudo)	Pele intacta

Fonte: Próprio Autor

3.5. Análise microscópica

3.5.1 Análise histológica

As lâminas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol (10 min cada); hidratadas em série decrescente de etanol (100%, 95%, 80% e 70%) e água destilada, e coradas em: Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM), cada lâmina com um total de três cortes histológicos e o total de lâminas para cada coloração e imunohistoquímica foram igual a 55 (C 7d e C 14d n=3 cada; Tratados 7d e 14d n=5 cada (sendo 4 tratamento em cada tempo); naïve 7d (n=5) e 14d (n=4). Após as colorações, as lâminas foram desidratadas em série crescente de etanol (70%, 80%, 95% e 100%), xilol e montadas com bálsamo do Canadá sintético. O mesmo número de cortes por lâminas e a quantidade também foi aplicado nas lâminas silanizadas da imunohistoquímica.

3.5.2 Coloração - Hematoxilina-Eosina (HE)

As lâminas foram coradas com Hematoxilina, por 5 minutos, lavadas em água corrente, coradas com Eosina, por 3 minutos, e finalmente lavadas em água corrente. Os exames histológicos das secções do neo tecido foram analisados na objetiva de aumento de 40X, e os seguintes parâmetros foram avaliados:

- 1) Profundidade da necrose: extensão da lesão, se alcançou a derme papilar, derme reticular ou derme profunda;
- 2) grau de fibrose: ausente, leve, moderado ou intenso;
- 3) tecido de neovascularização: ausente, leve, moderado ou intenso;
- 4) presença de linfócitos/plasmócitos: ausente, leve, moderado ou intenso;
- 5) presença de macrófagos: ausente, leve, moderado ou intenso;
- 6) presença de neutrófilos: ausente, leve, moderado ou intenso;

Foram utilizados os seguintes escores:

0= ausente;

1= leve (1-5);

2= moderado (6-10);

3= intenso (11 ou mais).

Esta análise foi realizada sob a supervisão do Patologista Dr. Nelson Brancaccio dos Santos, que desconhecia os grupos experimentais aos quais os animais pertenciam.

3.5.3 Coloração - Tricrômico de Masson (TM)

As lâminas foram mantidas, por 1 hora, na estufa, resfriadas, lavadas em água corrente até clarear completamente, lavadas em água destilada, por 3 vezes, e tratadas com solução Escarlata de Bierbrich, por 3 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada, mantidas em ácido fosfotúngstico, por 8 minutos, lavadas em água corrente e destilada, mantidas em azul de anilina, por 3 minutos e finalmente lavadas em água corrente. Tricrômico de Masson (TM) foi usado para identificação das fibras de colágeno em todos os grupos experimentais. Foram analisados 3 campos, na objetiva de aumento de 20X, sob a supervisão do Patologista Dr. Nelson Brancaccio dos Santos, que desconhecia os grupos experimentais aos quais os animais pertenciam. Foram utilizados os seguintes escores:

0= ausente;

1= leve (menor ou igual a 25%);

2= moderado (de 25% a 50%);

3= intenso (50% ou mais).

3.5.4 Análise Imunohistoquímica

Para a imunohistoquímica as lâminas silanizadas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol (10 min cada); alcoolizadas em série decrescente de etanol (100%, 95%, 80% e 70%), hidratadas em água destilada, submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de H₂O₂ 10%, por 30 minutos, lavadas em PBS 0,05M, tratadas em solução de PBS/BSA 1% (BSA, Sigma-Aldrich Chemical Co, Mo, USA) por uma hora para bloqueio das proteínas inespecíficas, e novamente lavadas em PBS 0,05M.

A técnica de imunohistoquímica da imunoperoxidase indireta foi realizada pela Dra. Camilla Fanelli, do Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP-SP). Para esta técnica foi empregada a identificação de macrófagos, detectados através da positividade para

o marcador de superfície CD68; miofibroblastos, detectados pela presença da proteína alfa-actina de Músculo Liso (*a-Smooth Muscle Actin* = *a-SMA*); e fibronectina. Após a desparafinização, foi realizada a recuperação antigênica por calor úmido, utilizando-se uma solução de Ácido Cítrico a 10 mM, tamponado a pH 6,0, em microondas, por 15 minutos. As lâminas foram resfriadas e mergulhadas em solução tampão TBS (Tris buffer saline), com pH 7,6. Os cortes foram delimitados com a caneta hidrofóbica (PAP PEN) e as incubações foram feitas em câmara úmida, protegida da luz, a fim de evitar o ressecamento dos cortes. Os cortes foram submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena (Peroxidase Block #ACA015, ScyTek Laboratories, USA) seguido pelo bloqueio contra marcação inespecífica (Super Block #AAA125, ScyTek Laboratories, USA). Para a detecção de macrófagos, os tecidos foram incubados com 50 mL de solução de anticorpo primário *Monoclonal Mouse Anti-CD68 clone ED-1* (Serotec, #MCA341R), na diluição de [1:200], para a identificação de miofibroblastos, os cortes foram incubados com 50 mL de solução de anticorpo primário *Monoclonal Mouse Anti a-SMA* (Sigma, #A5228), na diluição de [1:1000] e para identificação de fibronectina, usamos o anticorpo primário *Polyclonal Rabbit Anti-Fibronectin* (Sigma, #F3648), na diluição de [1:200]. Os anticorpos foram diluídos em solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1% em TBS e as incubações foram realizadas em câmara úmida, a 4°C, tendo duração entre 12-16 horas (*Over Night*). No dia seguinte as lâminas foram lavadas em TBS e incubadas com a solução de anticorpos secundários marcados com peroxidase ENVISION Flex Mouse & Rabbit HRP (Dako #K4061) por 45 minutos. Sequencialmente, os cortes foram mais uma vez lavados em TBS e submetidos à revelação com solução a base de Dab (Diaminobenzidine, Dab Chromogen + Substrate Kit #ACB030, ScyTek Laboratories, USA), seguida de contra-coloração com Hematoxilina de Harrys. Findo essa etapa, as lâminas foram analisadas, na PUC-SP, em microscopia óptica, observação de 3 campos na objetiva de aumento de 20X, sob a supervisão do Patologista, Dr. Nelson Brancaccio dos Santos, que desconhecia os grupos experimentais aos quais os animais pertenciam. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Marcador de superfície CD68: identificação de macrófagos, detectados através da positividade. Foram utilizados os seguintes escores:

0= ausente;

1= leve (1-5);

2= moderado (6-10);
3= intenso (11 ou mais).

- Marcador da proteína Alfa-actina de Músculo Liso (*α-Smooth Muscle Actin* - α-SMA): presença de miofibroblastos.
- Marcador da Fibronectina: presença da proteína fibronectina

Foram utilizados os seguintes escores:

0= ausente;
1= leve (menor ou igual a 25%);
2= moderado (de 25% a 50%);
3= intenso (50% ou mais).

3.6. Análise estatística

Para a análise das diferenças entre os grupos experimentais (controle e tratados), nos diversos tipos de tratamentos e tempos, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, atribuído valores de 0 a 3 aos resultados observados, para as diversas variáveis pesquisadas (parâmetros histológicos), e considerados os seguintes escores: grau 0 = ausente; grau 1 = leve; grau 2 = moderado; grau 3 = intenso. Foram consideradas como significantes $p < 0,05$ (nível de significância de 5%).

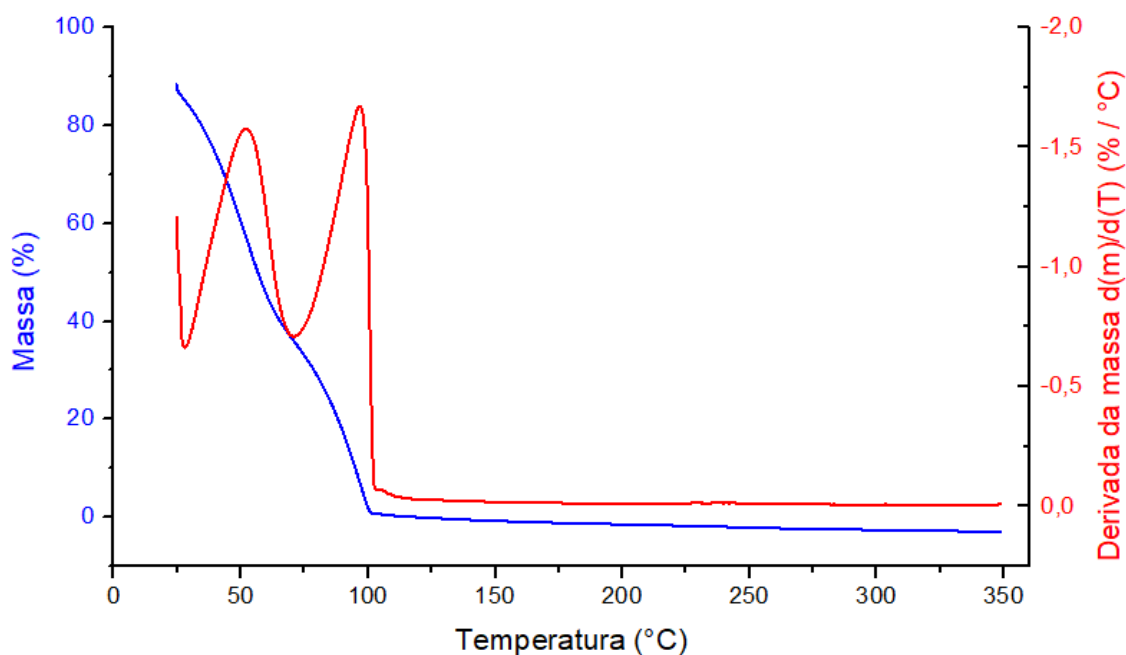
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das membranas de PVA

4.1.1 Termogravimetria (TG)

A Figura 1 ilustra a curva de TG da solução de arnica. Assim, é possível observar uma perda de massa acentuada na região entre 25 a 100°C. Isto está relacionado à evaporação da solução de extrato glicólico (propilenoglicol (188°C) e etanol (78°C) de arnica. Provavelmente os picos da DTG (termogravimetria derivada), derivada da massa em função da temperatura, estão relacionados à evaporação do etanol, próximo à 50°C (primeiro pico), e à evaporação do propilenoglicol, próximo à 90°C (segundo pico) (SILVA *et al.*, 2019).

Figura 1 - Termograma da solução Arnica

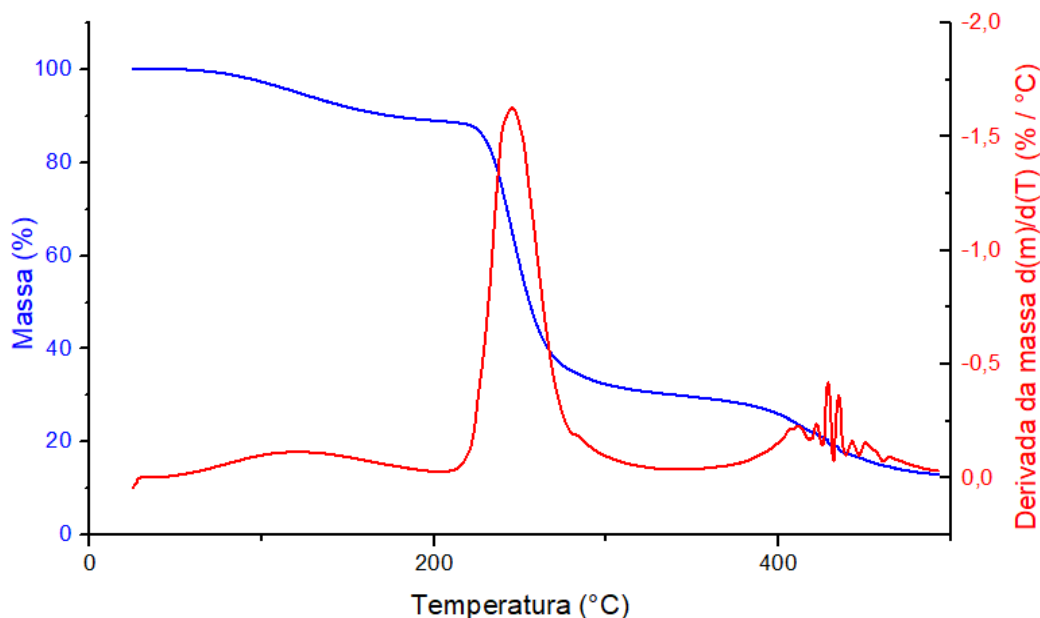


Fonte:

A Figura 2 ilustra a curva de TG para a amostra de PVA. O primeiro estágio de perda de massa é observado próximo a 120 °C e está, normalmente, relacionado à perda de água. Por sua vez, o segundo estágio de perda de massa ocorreu próximo da região de 245 °C, indicando a degradação do PVA. E por fim, o terceiro estágio de

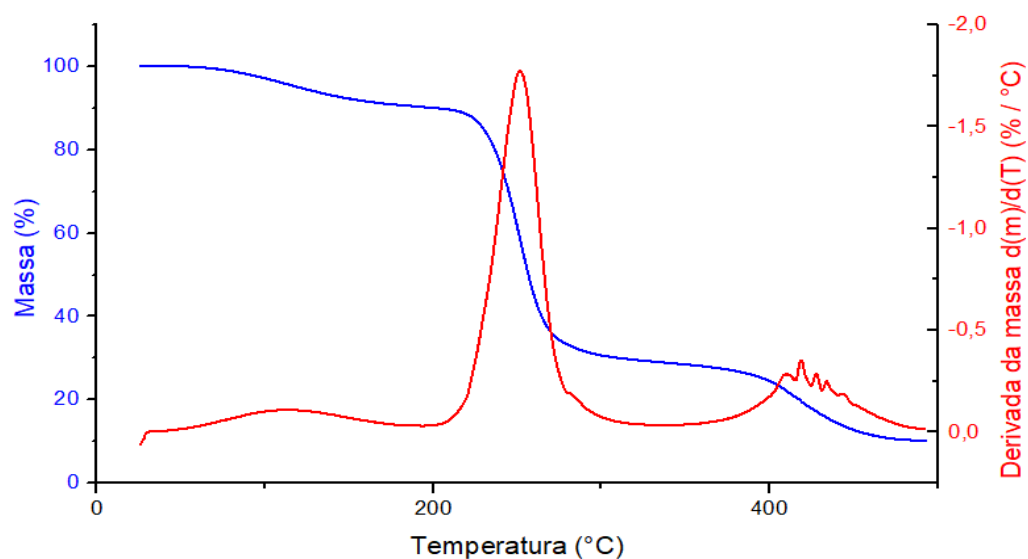
perda de massa, normalmente relacionado aos produtos da degradação, ocorreu próximo da região de 425°C (JUVÊNCIO, 2017).

Figura 2 - Termograma da amostra de PVA.



A Figura 3 ilustra a curva de TG para a amostra de PVA+A. É possível observar que a mesma apresenta os três estágios de perda de massa, assim como aconteceu para a amostra de PVA (Fig.3), com os mesmos valores para cada etapa. Assim, é possível observar que a adição da arnica à matriz do PVA não alterou a resistência térmica deste polímero.

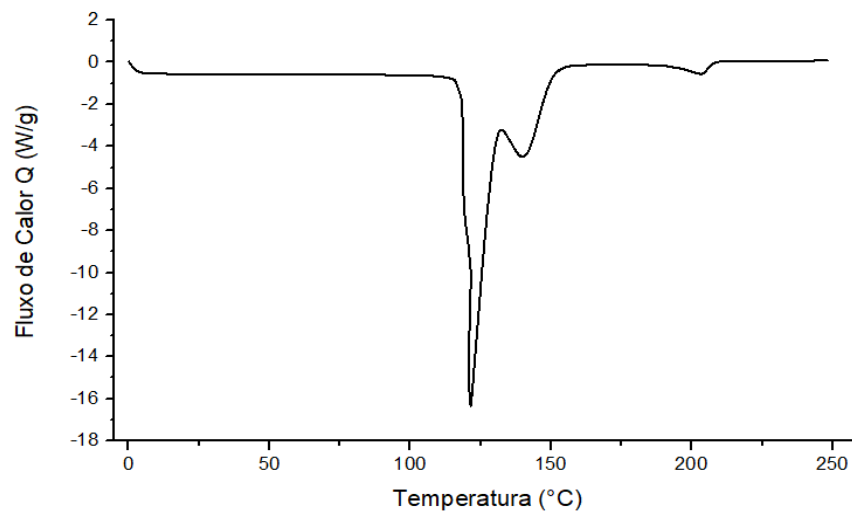
Figura 3 - Termograma da amostra de PVA+A.



4.1.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

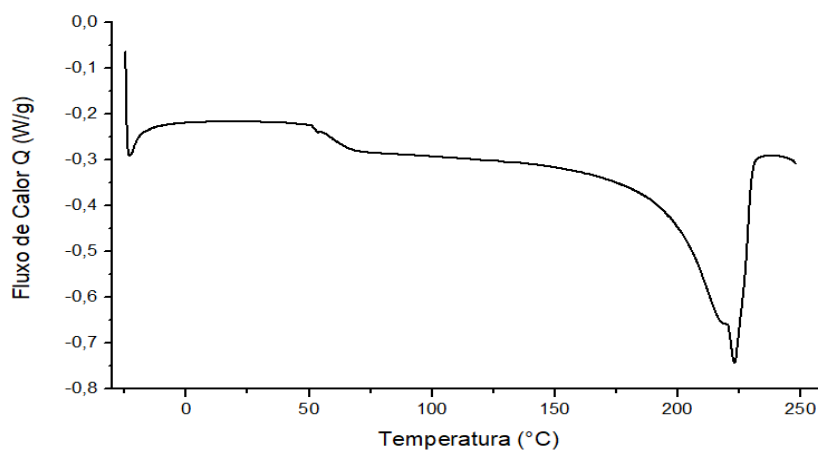
A Figura 4 ilustra a curva de DSC da solução de arnica. É possível observar a existência de dois picos endotérmicos sendo o primeiro a aproximadamente 120°C e o segundo a 140°C, os quais estão, possivelmente, relacionados à vaporização dos solventes (etanol e propilenoglicol). Além disso, existe um pico endotérmico próximo a 210°C que provavelmente está relacionado.

Figura 4 - Curva de DSC da solução de Arnica (Endo down).



A Figura 5 ilustra a curva de DSC da amostra de PVA. É possível observar que este polímero apresenta uma temperatura de transição vítrea (T_g) próxima a 70°C e temperatura de fusão cristalina (T_m) de 225°C, estando de acordo com a literatura (KONIDARI; PAPADOKOSTAKI; SANOPOULOU, 2011; TIAN *et al*, 2017).

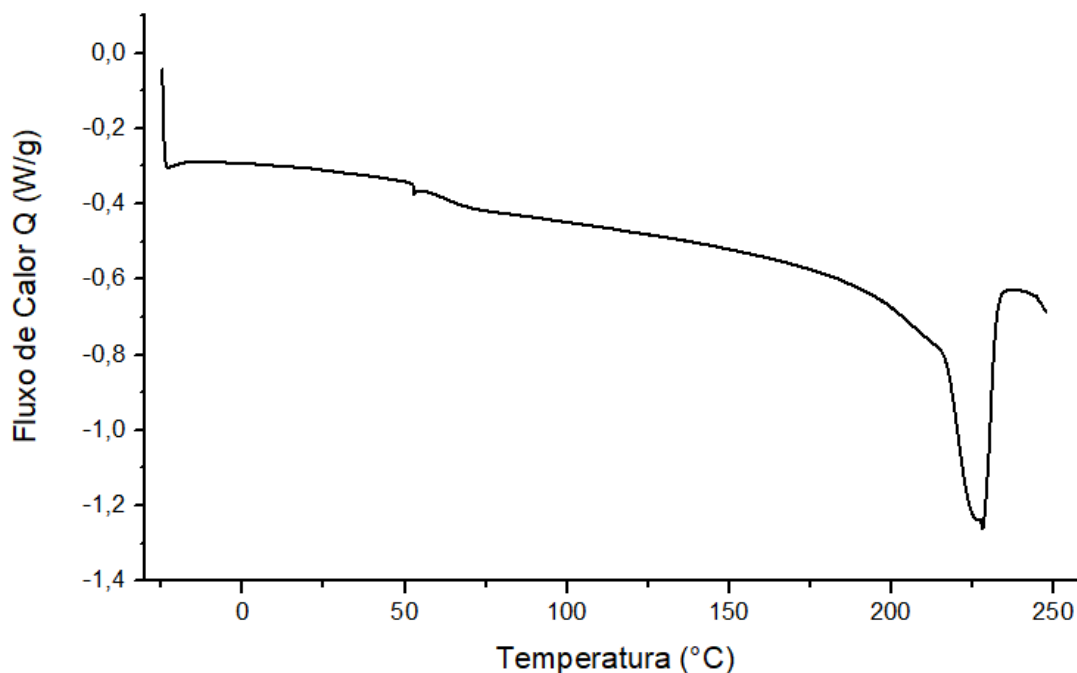
Figura 5 - Curva de DSC da amostra PVA (Endo down).



Fonte:

A Figura 6 ilustra a curva de DSC da amostra de PVA+A. É possível observar que a adição de arnica à matriz de PVA não altera os valores de T_g e T_m quando comparado ao PVA puro. A T_g e a T_m se encontram próximas à 70°C e 225°C, respectivamente.

Figura 6 - Curva de DSC da amostra de PVA+A (Endo down).



A Tabela 2 ilustra os valores de T_g , T_m e Entalpia de fusão das amostras de PVA puro e PVA com arnica.

Tabela 2 - Valores de T_g , T_m e Entalpia de fusão das amostras de PVA puro e PVA com arnica.

Amostras	T_g (°C)	T_m (°C)	Entalpia de fusão (J/g)
PVA	59,2	223,1	46,8
PVA + Arnica	52,6	228,1	49,1

*Entalpia de fusão do PVA 100% cristalino = 138,6 J/g (KONIDARI; PAPADOKOSTAKI; SANOPOULOU, 2011).

Fonte:

Os valores da cristalinidade de PVA e PVA+A estão na mesma ordem de grandeza dos resultados apresentados por Oliveira *et al* (2017). De acordo com os valores de entalpia de fusão ilustrados na Tabela 2, foi possível calcular o valor de cristalinidade para as amostras de PVA e PVA+A que foram de 33,7% e 35,4%, respectivamente. Portanto, é possível observar que a adição de arnica aumenta, de maneira tímida, o valor da cristalinidade da amostra de PVA+A quando comparado à amostra de PVA puro.

4.1.3 Ensaio Mecânico de Tração

Os hidrogéis como o PVA são considerados excelentes alternativas aos tecidos biológicos devido à sua alta biocompatibilidade, resistência mecânica, integridade física sob grande deformação, propriedades viscoelásticas, estabilidade térmica e não toxicidade. A biocompatibilidade e as propriedades mecânicas sempre foram indicadores importantes para a aplicação do hidrogel (BI *et al*, 2019). Assim, ele se adequa como um biomaterial para este estudo. O hidrogel de PVA pode ser reticulado fisicamente através de ciclos repetidos de congelamento e descongelamento para criar um ponto de reticulação entre aglomerados cristalinos (PANG *et al*, 2017). Portanto, a rigidez dos materiais é um dos importantes fatores que afetam o comportamento celular, incluindo adesão, proliferação e diferenciação (ZHUANG *et al*, 2016).

As Figuras 7 e 8 ilustram as curvas de tensão versus deformação para as amostras de PVA e PVA com arnica. Na Figura 7 é possível observar que em relação à deformação (%), quando a membrana é puxada, as membranas de PVA pura apresentam valores bastante distintos. Isso mostra que a membrana não apresenta homogeneidade em relação a sua estrutura, este efeito de não homogeneidade reflete, também, na variação dos valores da tensão no escoamento. Por outro lado, a Figura 8 ilustra um conjunto de curvas mais semelhantes. Neste caso, isto ilustraria uma estrutura mais homogênea do PVA e poderia ser relacionado à presença do extrato de arnica.

Figura 7 - Ensaio Mecânico Amostra de PVA+A.

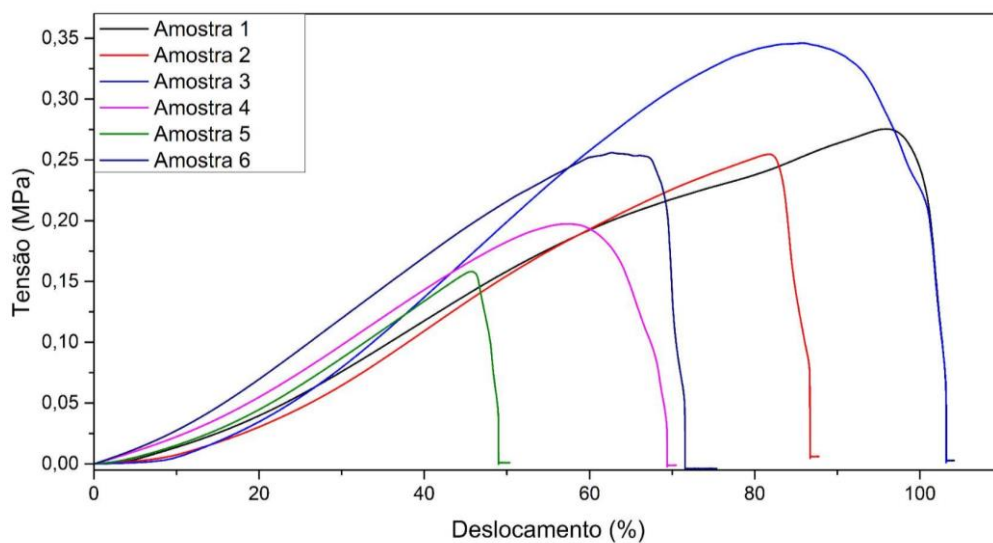
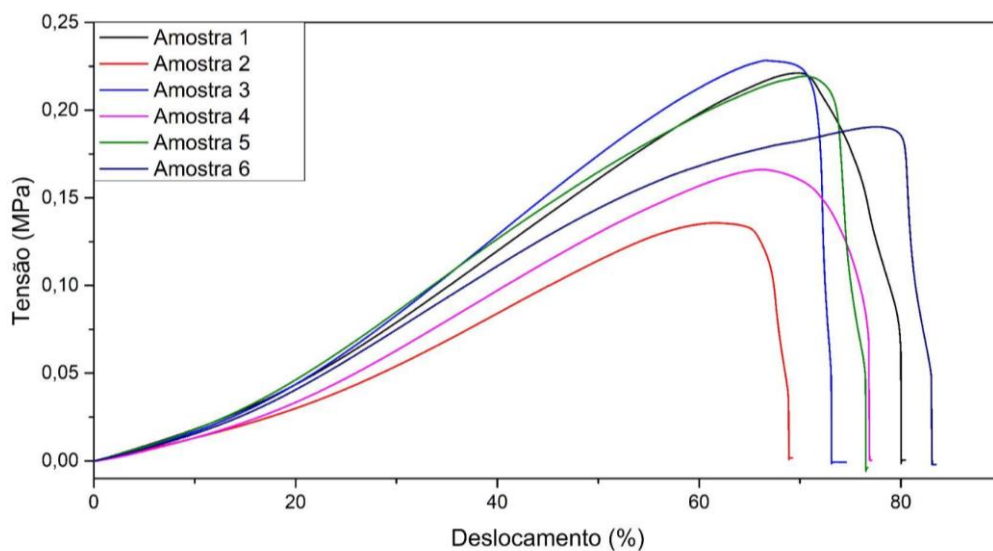


Figura 8 - Ensaio Mecânico Amostra de PVA+A.



A Tabela 3 ilustra os valores obtidos do ensaio mecânico de tração para as amostras PVA e Amostra PVA + Arnica. Neste caso, é possível observar na Tabela 3 que após a adição de arnica houve uma redução do módulo elástico em relação à amostra de PVA puro. Isso indicaria o efeito plastificante do extrato de arnica na matriz de PVA. Além disso, este efeito influenciou, também, na redução da tensão de escoamento da membrana de PVA + arnica. Apesar da redução nas propriedades

mecânicas da matriz de PVA após a adição do extrato de arnica, isso não inviabiliza a utilização da mesma na proteção da área da pele lesionada.

Tabela 3 - Valores obtidos do ensaio mecânico de tração para as amostras PVA e Amostra PVA + Arnica.

Amostra	PVA			PVA + Arnica		
	Módulo Elástico (MPa)	Tensão no Escoamento (N)	Tensão na Tração (MPa)	Módulo Elástico (MPa)	Tensão no Escoamento (N)	Tensão na Tração (MPa)
1	4,21	6,33	0,27	0,41	5,48	0,22
2	4,66	6,36	0,25	0,31	4,21	0,13
3	6,12	6,23	0,34	0,24	2,96	0,09
4	4,58	4,83	0,20	0,46	6,17	0,23
5	4,69	3,79	0,15	0,34	3,82	0,17
6	5,07	5,89	0,25	0,42	5,48	0,22
Média	4,89 ± 0,66	5,57 ± 1,04	0,25 ± 0,06	0,36 ± 0,08	4,69 ± 1,22	0,18 ± 0,05

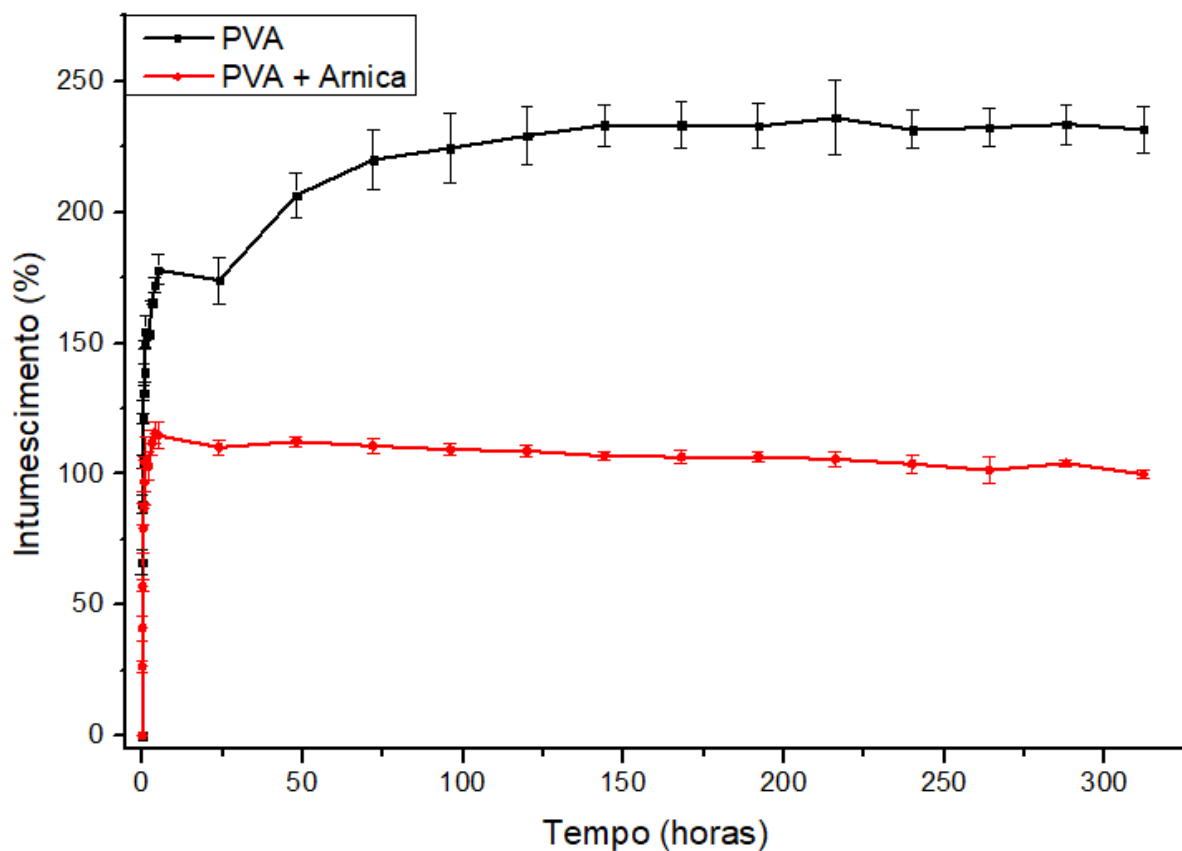
4.1.4 Ensaio de Intumescimento

A Figura 9 ilustra os resultados do ensaio de intumescimento. Nele é possível observar que a membrana de PVA apresentou um intumescimento rápido no início do ensaio nos primeiros 60 min e após 150h de ensaio a membrana atingiu o máximo de intumescimento, por volta de 230%, de acordo com o trabalho de Santos *et al* (2019).

A membrana de PVA+A mostrou um comportamento semelhante à amostra de PVA. Houve um rápido intumescimento em curto período de ensaio da primeira hora, atingindo em seguida a sua capacidade máxima de intumescimento, por volta de 118%.

Assim, comparando as duas membranas, PVA e PVA+A, é possível observar que a presença de arnica reduz a capacidade de intumescimento da membrana. Isto poderia ser explicado devido ao aumento da cristalinidade da amostra de PVA+A em relação à amostra de PVA. Sugere-se que a arnica é menos hidrofílica do que o PVA, deixa a matriz de PVA mais densa e isso é um fator importante para justificar essa redução do intumescimento, justamente com o aumento da cristalinidade.

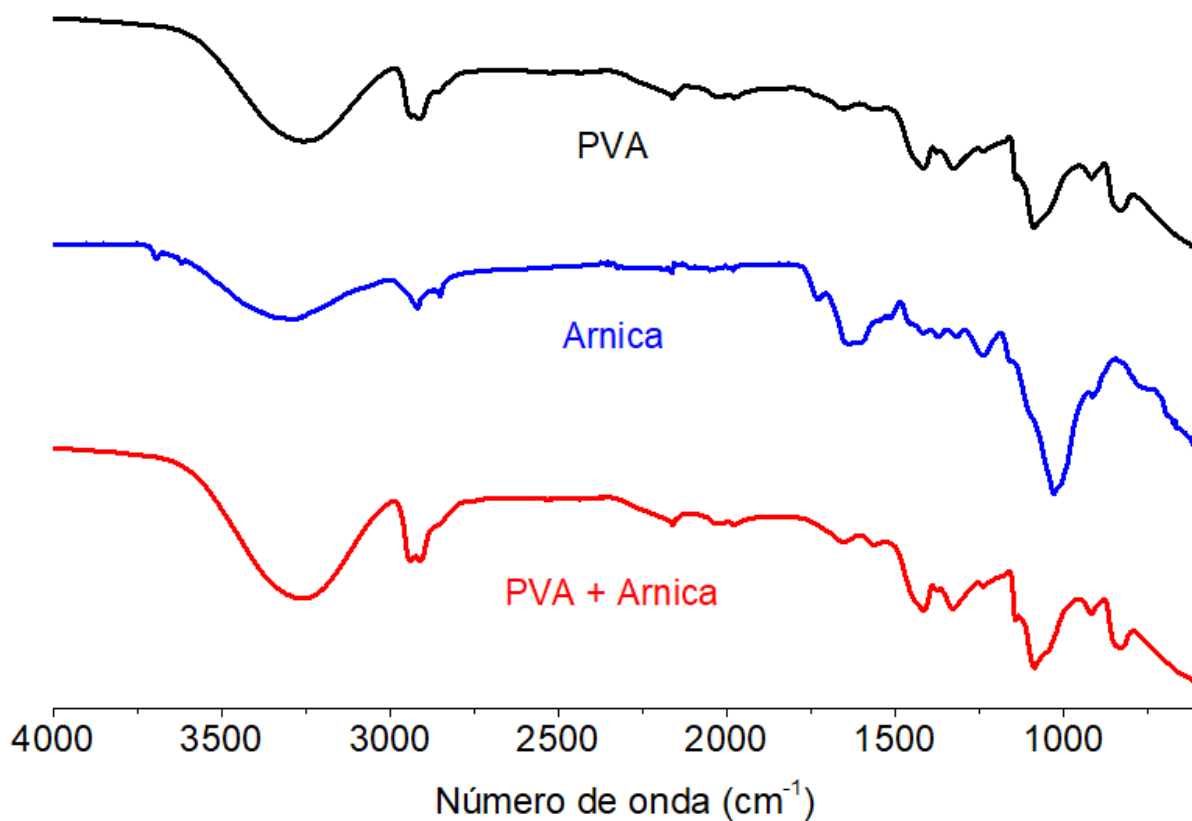
Figura 9 - Gráfico de intumescimento das amostras de PVA e PVA+A em função do tempo (h).



4.1.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica para caracterização de grupos químicos e pode ser utilizada para identificar mudanças ocasionadas por agentes químicos e físicos em uma determinada amostra. Os espectros da membrana de PVA produzida, da arnica utilizada e da membrana de PVA contendo a arnica estão apresentados na figura 10.

Figura 10 - Espectro de absorção no infravermelho por transformada de Fourier para a solução de arnica, membrana de PVA e membrana de PVA+A.



Fonte:

Analisando as bandas de transmitância no espectro do PVA puro, observa-se na tabela 4 os estiramentos presentes na composição química do material:

Tabela 4 - Identificação dos estiramentos e deformações presentes no espectro do PVA puro

Número de onda	Estiramentos e deformações
3200 – 3500 cm ⁻¹	Estiramento da ligação O–H
2900 cm ⁻¹	Estiramento assimétrico CH ₂
1620 – 1650 cm ⁻¹	Deformação angular C–O–H
1100 – 1200 cm ⁻¹	Estiramento da ligação C–O

Fonte: TEODORESCU; BERCEA; MORARIU, (2019).

Na tabela 5, é apresentado as bandas presentes no espectro da Arnica.

Tabela 5 - Identificação dos estiramentos e deformações presentes no espectro da Arnica.

Número de onda	Estiramentos e deformações
3291 cm ⁻¹	Banda alargada referente à sobreposição dos estiramentos das ligações O–H pertencentes aos grupos álcool e fenol, bem como dos estiramentos das ligações N–H dos grupos aminas.
1730 cm ⁻¹	Estiramento das ligações C=O presentes nos grupos aldeído e carbonil.
1640 cm ⁻¹	Sobreposição dos estiramentos das ligações C=C e C=O relativas respectivamente aos grupos acrilato e amida.
1241 cm ⁻¹	Estiramento da ligação C–O de grupos éter e éster.
1026 cm ⁻¹	Estiramentos de grupos aromáticos
916 cm ⁻¹	Deformação angular da ligação =CH

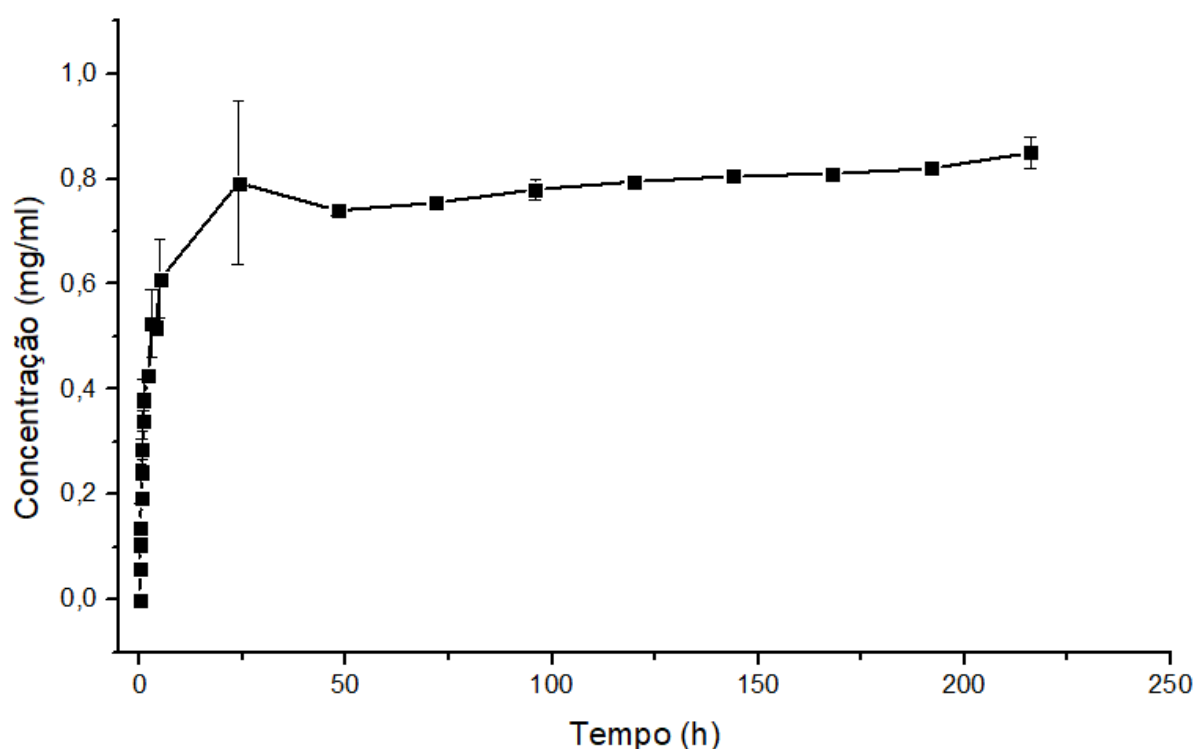
Identificação dos estiramentos e deformações presentes no espectro da Arnica
Fonte: (SILVA, 2021; KALLIANTAS, 2020; PURKAIT; SHARMA, 2015).

Ao se analisar o espectro do PVA com arnica, nota-se que é semelhante ao espectro do PVA puro, tal fato pode ser creditado à concentração do fitoterápico ser baixa e possivelmente não haver a detecção no equipamento, além de que, tanto o PVA quanto a arnica apresentam muitas bandas nas mesmas regiões espectrais, resultando em uma sobreposição dos espectros obtidos. Além disso, não foi observado o surgimento, desaparecimento ou mesmo deslocamento de bandas após a incorporação da arnica junto ao PVA, indicando, assim, não haver interações entre as moléculas de arnica e as cadeias do PVA. (PURKAIT; SHARMA, 2015; TEODORESCU; BERCEA; MORARIU, 2019; OLIVEIRA *et al*, 2017; KALLIANTAS, 2020; SILVA, 2021).

4.1.6 Perfil de Liberação Controlada

A Figura 11 ilustra o perfil de liberação da arnica, incorporada à membrana de PVA, em função do tempo. Assim, é possível observar nessa figura que existem duas regiões distintas. A primeira, onde ocorre em até 9h, uma liberação rápida da arnica para o meio e a segunda, após 24h de ensaio, onde ocorre a liberação sustentada da arnica até o final do ensaio (225h).

Figura 11 - Curva de liberação da arnica em função do tempo (h).



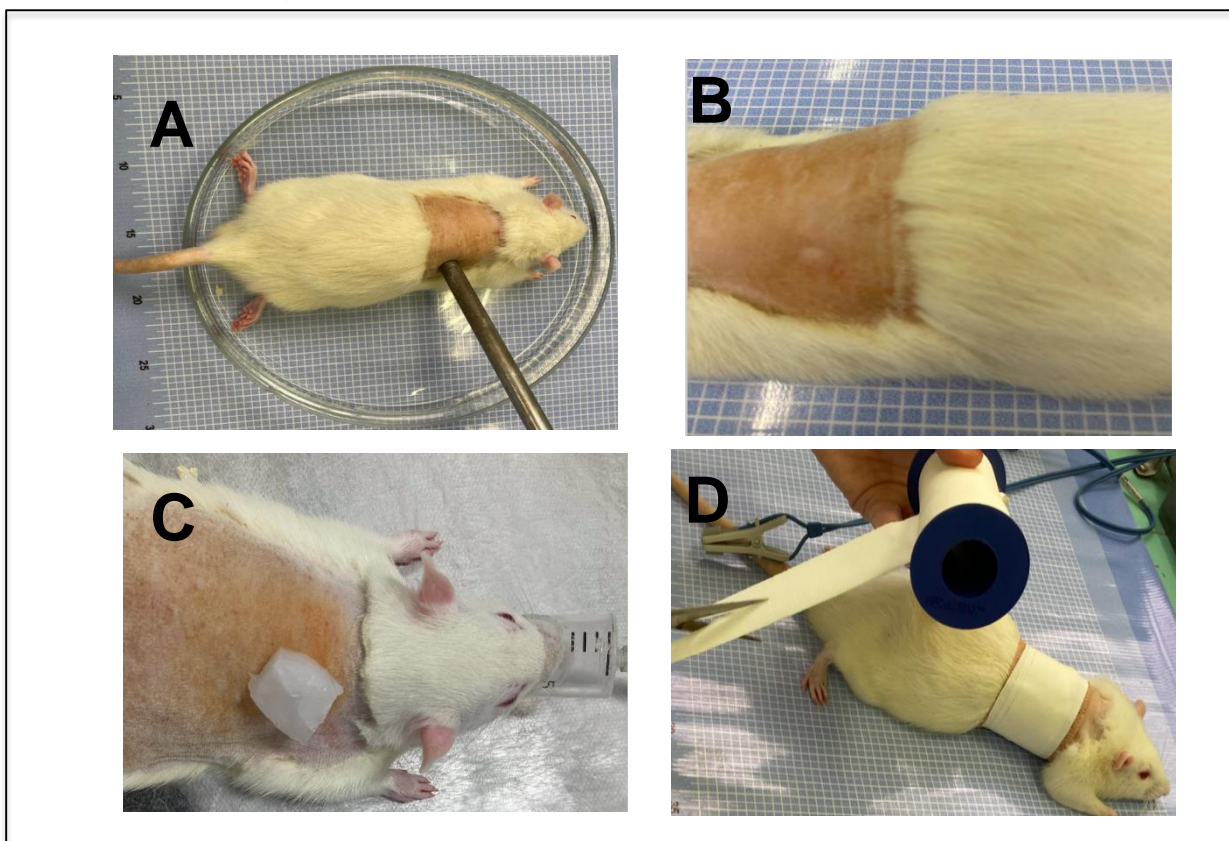
4.2. Estudos com experimentação animal

4.2.1 Análise macroscópica

A técnica de indução da queimadura foi executada com precisão e sem nenhuma intercorrência (Fig. 12A). Os animais retornaram da anestesia num período de 30 a 60 minutos após a queimadura (Fig. 12B) e não necessitaram de analgésicos para controle da dor. As membranas de PVA ou PVA+A foram mantidos por um período mínimo de 48h, tempo suficiente principalmente no que tange a liberação da arnica que acontece dentro das primeiras nove horas (conforme Fig. 11) e também

considerando que a aplicação do laser no 3º dia necessitava ser feito sem a presença do curativo (Fig. 12C e 12D), ou seja, diretamente sob a lesão. Sob a observação macroscópica foi possível observar que todos os grupos experimentais (controle ou tratados) não apresentaram infecção, edema perceptível, exsudato ou sangramento, durante todo o período da experimentação (7 ou 14 dias). No momento da indução da queimadura foi observado discreto eritema ou alteração da coloração da pele que ficou mais esbranquiçada. Ao longo do período de 7 dias, após retirada do curativo, foi possível observar crostas em algumas lesões (sem diferença entre os grupos controle ou tratados). Já no período de 14 dias, além da presença de crostas em alguns animais do grupo controle ou tratado, também foi possível observar crescimento de pêlo. A cicatrização de lesões cutâneas é um processo complexo que consiste de algumas etapas, sendo a primeira etapa a hemostasia, processo pelo qual o sangramento é contido no local da ferida. A segunda etapa, é a “fase inflamatória”, que ocorre imediatamente após a lesão e envolve inflamação, dura entre 24 horas e 4 a 6 dias (LEE; SUN; PARK, 2022).

Figura 12 - Fotografia representativa da experimentação animal. A) Indução da queimadura com o auxílio da barra de alumínio (diâmetro=12mm), pré-aquecida entre 70-80°C, por 10 segundos. B) área queimada no dorso depilado do animal. C) Curativo. D)



4.3. Análise microscópica

4.3.1 Análise Histológica - Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

As 55 lâminas obtidas das amostras de tecido cicatricial das áreas queimadas foram analisadas e nenhum dos grupos tratados apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle, em nenhum dos parâmetros avaliados (Tab. 6), e foi possível confirmar a precisão da técnica na indução da queimadura de 2o grau, uma vez que todos os cortes histológicos das lâminas foram analisados em sua totalidade e em apenas cinco lâminas detectou profundidade da lesão até derme profunda, dez em derme papilar e o restante em derme reticular, portanto, nenhum protocolo atingiu a fáscia muscular ou músculo. Como é esperado em todas as lesões de derme reticular apresentaram lesão da unidade pilossebácea. Segundo Pereira *et al* (2010) queimaduras de 2o grau podem ser divididas em superficiais (epiderme e parte da derme) e profundas (epiderme e porções extensa da derme). As queimaduras de 2o grau afetam a epiderme a até derme, podendo alcançar a derme profunda, podendo apresentar eritema, presença de bolhas e umidade variável, podendo curar dentro de duas a três semanas (KARIM; SHAUM; GIBSON, 2020).

Tabela 6 - Análise histológica das lâminas coradas em HE, nos diferentes grupos experimentais.(continua)

Tratamentos	Fibrose				Neovascularização				Linfócitos/Plasmócitos			
	Soma	dos	Mediana	e	Soma	dos	Mediana	e	Soma	dos	Mediana	e
	rankings		IC95%		rankings		IC95%		rankings		IC95%	
	Cont./Trat.		Cont./Trat.		Cont./Trat.		Cont./Trat.		Cont./Trat.		Cont./Trat.	
PVA 7d	10/26		2(0-2)/2(2-3)		14,5/21,5		2(0-2)/1(0-2)		12/24		2(1-2)/2(1-3)	
PVA+A 7d	11/25		2(0-2)/2(2-2)		15,5/20,5		2(0-2)/1(0-2)		14,5/21,5		2(1-2)/2(0-2)	
PVA+L 7d	11/25		2(0-2)/2(2-2)		12/24		2(0-2)/2(1-2)		12,5/23,5		2(1-2)/2(1-2)	
PVA+A+L 7d	11/25		2(0-2)/2(2-2)		14/22		2(0-2)/1(1-2)		15,5/20,5		2(1-2)/1(1-2)	
PVA 14d	14,5/21,5		2(1-2)/2(0-2)		16,5/19,5		2(2-3)/2(1-3)		10,5/25,5		2(2-2)/2(2-3)	

Tabela "6 - Análise histológica das lâminas coradas em HE, nos diferentes grupos experimentais.(continuação)

PVA+A 14d	11/25	2(0-2)/2(2-2)	17/19	2(2-3)/2(1-2)	16,5/19,5	2(2-2)/2(1-2)
PVA+L 14d	10/26	2(0-2)/2(2-3)	16/20	2(2-3)/2(2-2)	15/21	2(2-2)/2(1-2)
PVA+A+L 14d	11/25	2(0-2)/2(2-2)	16/20	2(2-3)/2(2-2)	13,5/22,5	2(2-2)/2(2-2)

Tratamentos	Macrófagos		Neutrófilos	
	Soma dos rankings	Mediana e IC95%	Soma dos rankings	Mediana e IC95%
	Cont./Trat.	Cont./Trat.	Cont./Trat.	Cont./Trat.
PVA 7d	13/23	2(0-2)/1(1-3)	17,5/18,5	3(0-3)/0(0-1)
PVA+A 7d	14,5/21,5	2(0-2)/1(0-3)	13,5/22,5	3(0-3)/3(0-3)
PVA+L 7d	12/24	2(0-2)/2(1-2)	15/21	3(0-3)/1(1-3)
PVA+A+L 7d	14/22	2(0-2)/1(1-2)	16/20	3(0-3)/1(1-2)
PVA 14d	13/23	2(1-2)/2(1-3)	14/22	3(2-3)/3(2-3)
PVA+A 14d	14/22	2(1-2)/2(1-2)	14,5/21,5	3(2-3)/3(1-3)
PVA+L 14d	12,5/23,5	2(1-2)/2(1-2)	18/18	3(2-3)/2(1-3)
PVA+A+L 14d	11/25	2(1-2)/2(2-2)	15,5/20,5	3(2-3)/2(2-3)

Análise histológica dos tecidos cicatriciais nos diferentes grupos experimentais (Controle 7 ou 14d, n= 3; e Tratados 7 ou 14d, n= 5 cada), na coloração de HE. Nenhum dos grupos tratados apresentaram diferença significativa quando comparado ao grupo controle, em nenhum dos parâmetros observados (fibrose, neovascularização, linfócitos/plasmócitos, macrófagos, neutrófilos). Escores: 0: ausente; 1; Leve; 2: Moderado; 3: Intenso. IC95% = intervalo de 95% de confiança.

Fonte: Próprio autor

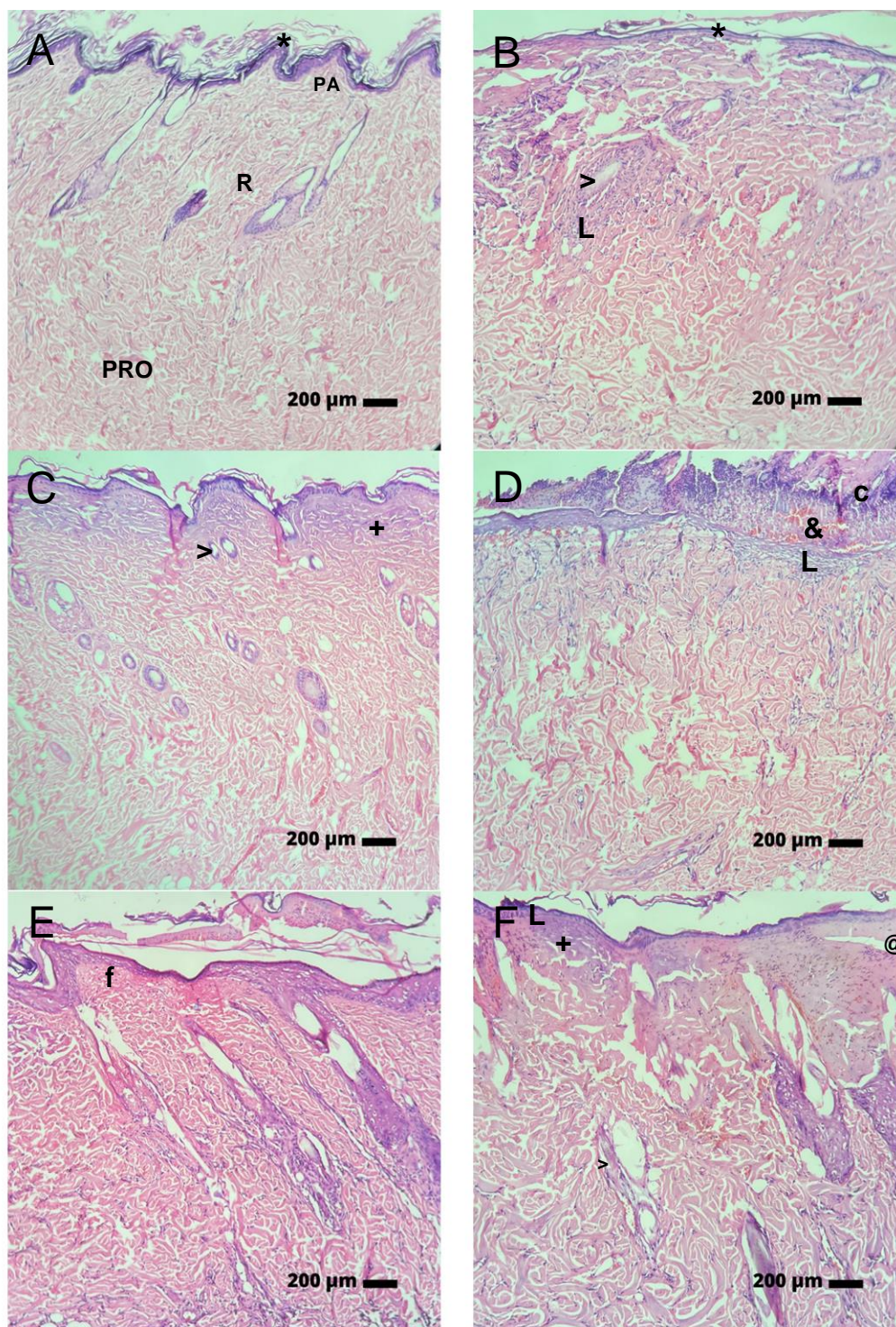
Analisando todos os parâmetros como: grau de fibrose, tecido de neovascularização, presença de linfócitos/plasmócitos, presença de macrófagos e presença de neutrófilos nos grupos experimentais, observou-se que nos grupos tratados nos diferentes tempos (7 ou 14d) apresentaram aumento substancial desses parâmetros, porém sem diferença significativa quando comparados ao grupo controle (Tab. 6). Isto pode ser explicado, pois no processo de cicatrização de feridas a inflamação é o primeiro evento e com ela temos uma sequência de etapas incluindo a extensão de fibroses, versus regeneração e resposta imune através da angiogênese, neutrófilos, macrófagos e fibronectina (JONES, 2008). A cicatrização normal de feridas consiste em diferentes estágios: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (ENOCH; LEAPER, 2005). Visto que a pele de mamíferos adultos não se regenera espontaneamente, o reparo de queimaduras é comumente alcançado através da cicatrização, tratando-se de um ajuste fisiológico onde há a

substituição do tecido lesionado por tecido fibroso, de modo a ser morfológicamente e funcionalmente diferente do tecido original (CHOUHAN *et al*, 2019).

Com a indução da queimadura de 2o grau ocorreu lesão da unidade pilossebácea em todos os grupos experimentais, lesão esta que foi intensa em todos os grupos experimentais e apenas moderado no grupo controle (Figs. 13 e 14). A neovascularização também esteve presente em todos os grupos experimentais, principalmente nos grupos tratados e indica um efeito angiogênico que ocorre como uma rede microvascular de novos capilares sanguíneos para garantir o suprimento de oxigênio e nutrientes ao neo tecido (LEE; SUN; PARK, 2022). Com o término do estágio inflamatório, inicia-se a angiogênese, com a proliferação, migração e ramificação de células endoteliais para formação da neovascularização. À medida que novos vasos sanguíneos surgem, os fibroblastos presentes se proliferam e invadem o coágulo com o intuito de formar o tecido de granulação, alguns fibroblastos podem se diferenciar em miofibroblastos, unindo as margens da ferida (RODRIGUES *et al*, 2019). Durante a proliferação dos fibroblastos, há a deposição de matriz extracelular que modifica o microambiente da ferida do estado inflamatório para o estado de crescimento (WERNER; KRIEG; SMOLA, 2007).

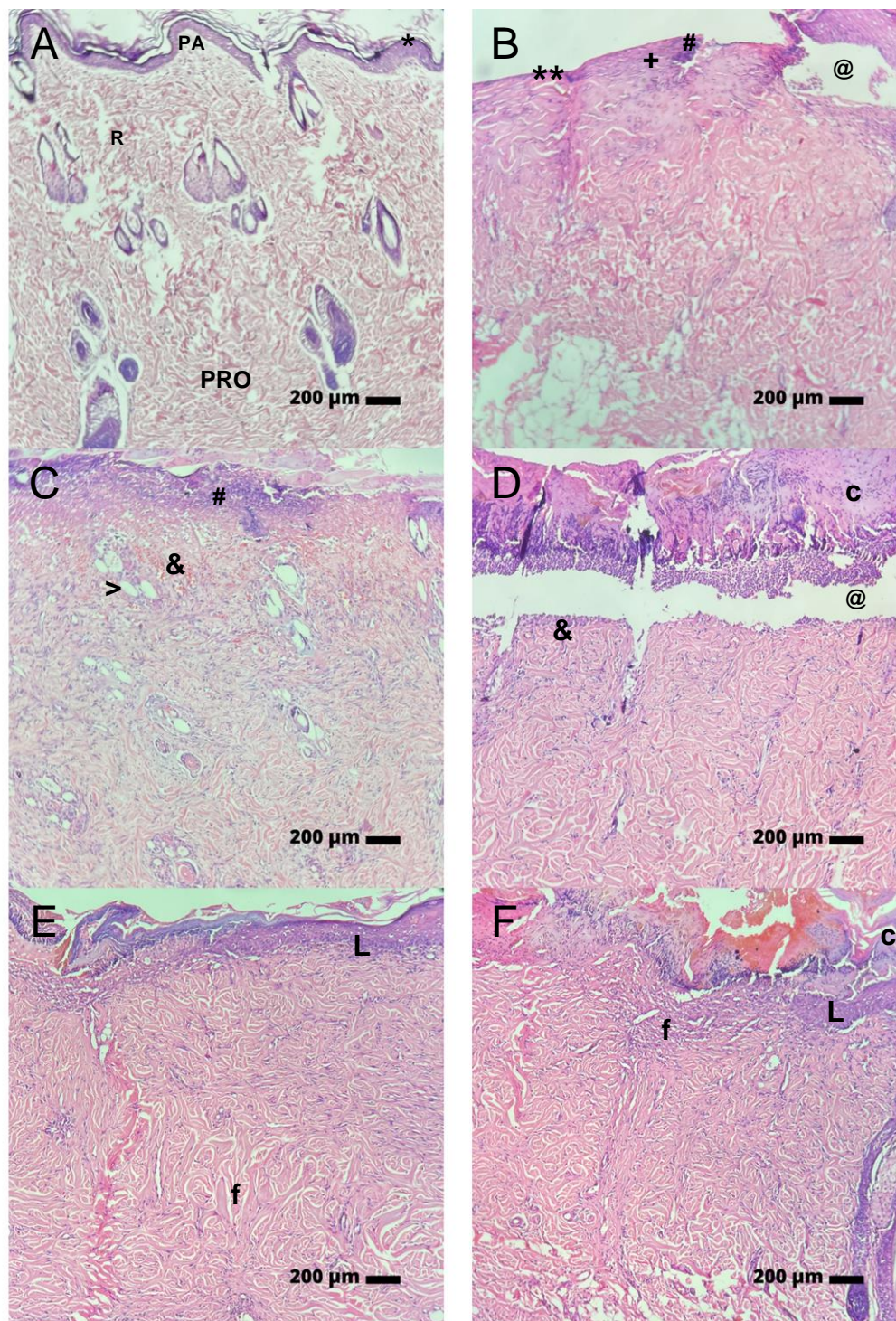
Quanto aos aspectos celulares avaliados, observa-se que há presença significativa de linfócitos/plasmócitos, neutrófilo e macrófagos que vem de encontro com o processo inflamatório induzido pela queimadura de 2o grau (Figs. 13 e 14). Essa presença maciça de células mononucleares e polimorfonucleares compreende exatamente a fase inflamatória, que envolve o recrutamento de enzimas proteolíticas e inflamação induzida por infiltração de fagócitos (neutrófilos e macrófagos) no local da ferida. Nesta fase, todos os corpos estranhos e restos de tecido são removidos do local da ferida por neutrófilos e macrófagos para prevenir a infecção (WILGUS; ROY; MCDANIEL, 2013; HUANG *et al*, 2019; LEE; SUN; PARK, 2022). Os macrófagos presentes provocam contração da lesão, reduzindo assim sua área de superfície (ŞAKRAK *et al*, 2012).

Figura 13 - Painel histológico de HE dos tecidos cicatriciais das áreas queimadas de ratos Wistar, dos grupos controle e tratados por 7 dias. A) Nãive; B) Controle, somente queimadura; C) PVA; D) PVA+A; E) PVA+L; F) PVA+A+L. Parâmetros: (*): Epiderme normal; (**)



Fonte:

Figura 14 - Painel histológico de HE dos tecidos cicatriciais das áreas queimadas de ratos Wistar, dos grupos controle e tratados por 14 dias. A) Nãive; B) Controle, somente queimadura; C) PVA; D) PVA+A; E) PVA+L; F) PVA+A+L. Parâmetros: (*): Epiderme normal; (**



Fonte:

Os tratamentos somente com membranas de PVA também demonstraram ser um curativo promissor no tratamento de lesões cutâneas, com resultados muito melhores na redução do processo inflamatório exuberante, uma vez que mantém a umidade e se comporta como uma barreira física contra a contaminação e proliferação de microrganismos com potencial infeccioso. Um curativo ideal para feridas deve promover uma cicatrização rápida, com mínimo desconforto para o paciente, aderência ao tecido danificado, manutenção da fase úmida balanceada, troca de oxigênio, proteção contra agentes infecciosos externos, como bactérias, e cicatrização de um microambiente ideal que pode acelerar o processo. Além disso, os curativos para feridas devem ser flexíveis e de fácil remoção (KAMOUN; KENAWY; CHEN, 2017).

Os curativos para tratamento de feridas são selecionados de acordo com os tipos de feridas, e vários estudos sistemáticos realizados estão voltados ao desenvolvimento de materiais e tecnologias. Alguns produtos naturais com propriedades emolientes, demulcentes (proteger a integridade do epitélio), epitelizantes (lubrificante e hidratante da pele), adstringentes (auxilia na remoção do excesso de oleosidade), antimicrobianas, antiinflamatórias e antioxidantes podem melhorar o processo de cicatrização de feridas (MOGOŞANU *et al.*, 2012).

4.3.2 Análise Histológica - Coloração Tricrômico de Masson (TM)

Nas 55 lâminas com a coloração de Tricrômio de Masson, obtidas das amostras de tecido cicatricial das áreas queimadas, tanto do grupo controle quanto dos grupos tratados foram analisadas para identificar a presença de fibras colágenas. Em todos os grupos tratados comparado ao grupo controle, foram identificados presença de colágeno em potencial, mas somente o grupo tratado PVA+A+L 14 dias foi significativamente diferente, mostrando que a incorporação da arnica ao PVA associado a laserterapia foi mais eficiente neste protocolo (Tab. 7). Resultado semelhante a este também encontrado nos estudos de Mohammad *et al* (2021) com comparou os efeitos clínicos e histopatológicos de *Plantago ovata* e da sulfadiazina de prata na cicatrização de queimaduras de 2o grau.

Tabela 7 - Identificação de Fibras colágenas nos diferentes grupos experimentais.

Tratamentos	Fibras de colágeno	
	Soma dos ranking	Mediana (IC95%)
	Controle/Tratamento	Controle/Tratamento
PVA 7d	108/192	2(0-3)/2(1-3)
PVA+A 7d	103,5/196,5	2(0-3)/2(1-3)
PVA+L 7d	99/201	2(0-3)/2(1-3)
PVA+A+L 7d	97,5/202,5	2(0-3)/2(2-3)
PVA 14d	108/192	2(1-2)/2(0-3)
PVA+A 14d	91,5/208,5	2(1-2)/2(1-3)
PVA+L 14d	87/213	2(1-2)/2(1-3)
PVA+A+L 14d	75/225	2(1-2)/2(2-3)*

Escores histopatológicos do tecido cicatricial da área queimada nos diferentes grupos experimentais (Controle 7 ou 14d - n= 3; e Tratados 7 ou 14d - n= 5 cada), na coloração de Tricrômio de Masson. Escores: 0: ausente; 1; Leve; 2: Moderado; 3: Intenso. O grupo tratado PVA+A+L 14d apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle. *p<0,05 diferença do tratamento para o controle. IC95% = intervalo de 95% de confiança.

Fonte: Próprio autor

Resultados como este de aumento significativo de fibras colágeno no dia 14 de experimento como no grupo PVA+A+L, também são discutidos em outros estudos semelhantes. Por exemplo, pesquisadores como Hamid e Soliman (2015) e Imbarak *et al* (2021) sugeriram que o tratamento com um fitoterápico, Aloe vera aumentou progressivamente o conteúdo de colágeno no tecido de granulação em ratos com queimaduras de pele, além de MacKay e Miller (2003) e Tarameshloo *et al.* (2012) que seguindo a mesma linha de pesquisa, sugeriram que o tratamento de Aloe vera em modelo de ferida aumenta a estimulação dos fibroblastos e, por sua vez, o conteúdo de colágeno. Já é sabido que o colágeno é a principal proteína estrutural produzida pelos fibroblastos e compõe a matriz extracelular no tecido normal, tornando-se a proteína mais abundante durante a cicatrização da pele (KALLIS; FRIEDMAN, 2018). A derme normal contém aproximadamente 80-85% de colágeno I e 10-15% de colágeno III (EL-DOMYATI *et al*, 2002; CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). O colágeno I são fibras espessas e estáveis que garantem a resistência do tecido às forças mecânicas, enquanto o colágeno III são fibrilas finas, dispostas abaixo da membrana basal, que garantem a aderência da epiderme à derme (ALVES, *et al.*, 2015).

Os resultados aqui demonstrados, com a associação da laserterapia, corroboram com os efeitos benéficos do laser de baixa intensidade, sugerindo fortemente que o processo inflamatório inicial foi biomodulado pela luz e, consequentemente estimulando o reparo tecidual precocemente. Basicamente, o colágeno tipo III produzido no estágio de remodelação é substituído por colágeno do tipo I posteriormente. A laserterapia de baixa intensidade tem sido usada em estudos *in vivo* e *in vitro* para biomodulação da terapêutica do reparo tecidual, modulando os processos biológicos em modelos animais após trauma. O LLLT (Low Level Laser Therapy) ativam ou inibem efeitos fisiológicos, bioquímicos e metabólicos através de seu efeitos fotoquímico ou fotofísico, que geram resultados terapêuticos de morfodiferenciação e proliferação celular, neoformação tecidual, revascularização, redução de edema, analgesia, maior regeneração celular, aumento da circulação e permeabilidade vascular (HENRIQUES; CAZAL; CASTRO, 2010).

Similar ao resultado da laserterapia deste trabalho, muitas pesquisas mostraram o efeito biomodulador do laser com aumento na quantidade de colágeno, em diferentes protocolos com terapias a laser (HOUGHTON; BROWN, 1998)(BISHT *et al*, 1994) e (CONLAN; RAPLEY; COBB, 1996).

4.4. Análise Imunohistoquímica

A técnica de imuno-histoquímica da imunoperoxidase indireta foi empregada na identificação de macrófagos, detectados através da positividade para o marcador de superfície CD68; presença de miofibroblastos, detectados através do marcador da proteína alfa-actina de Músculo Liso (*α-Smooth Muscle Actin* - *αSMA*); e fibronectina (Tab. 8).

Tabela 8 - Análise dos Marcadores de imunohistoquímica (CD68, a-SMA e fibronectina) do tecido cicatricial da área queimada nos diferentes grupos experimentais (Controle e Tratados).

Tratamentos	CD68		Fibronectina		a-SMA	
	Soma dos ranking Cont./Trat.	Mediana (IC95%) Cont./Trat.	Soma dos ranking Cont./Trat.	Mediana (IC95%) Cont./Trat.	Soma dos ranking Cont./Trat.	Mediana (IC95%) Cont./Trat.
PVA 7d	111/189	2(0-3)/2(1-3)	92/208	2(0-3)/2(1-3)	80/220	2(0-3)/2(2-3)*
PVA+A 7d	130,5/169,5	2(0-3)/1(0-2)	92/208	2(0-3)/2(1-3)	102,5/197,5	2(0-3)/2(1-3)
PVA+L 7d	105/195	2(0-3)/2(1-3)	89,5/210,5	2(0-3)/2(1-3)	82,5/217,5	2(0-3)/2(1-3)*
PVA+A+L 7d	118,5/181,5	2(0-3)/1(1-3)	95/205	2(0-3)/2(2-3)	96,5/203,5	2(0-3)/2(0-3)
PVA 14d	102,5/197,5	2(1-2)/2(1-2)	124/176	2(1-2)/2(0-3)	117/183	2(1-2)/2(0-3)
PVA+A 14d	110,5/189,5	2(1-2)/2(1-3)	98,5/201,5	2(1-2)/2(1-3)	96/204	2(1-2)/2(1-3)
PVA+L 14d	96/204	2(1-2)/2(1-3)	92,5/207,5	2(1-2)/2(1-3)	87/213	2(1-2)/2(1-3)
PVA+A+L 14d	92,5/207,5	2(1-2)/2(1-3)	100,5/199,5	2(1-2)/2(1-3)	91,5/208,5	2(1-2)/2(0-3)

Resultados das diferenças dos tratamentos segundo o teste de Kruskal-Wallis para as variáveis: CD68, fibronectina e alfa-actina de músculo liso (a-SMA). Note que houve diferença significativa somente nos grupos PVA 7d e PVA+L 7d quando comparados ao grupo controle. Escores: 0: ausente; 1; Leve; 2: Moderado; 3: Intenso. N=3 para controle N=5 para tratamento; *p<0,05 diferença do tratamento para o controle. IC95% = intervalo de 95% de confiança.

Fonte: Próprio autor

Nos resultados de imunohistoquímica com o marcador molecular específico para resposta inflamatória, o CD68, capaz de identificar macrófagos, verificou-se que em todos os grupos tratados houve detecção expressiva dessa célula, mesmo sem diferença significativa ao grupo controle, talvez com aumento do N ou análise de um maior número de campos, isso pudesse ser alcançado. Este aumento da positividade para macrófago corrobora com a evolução no processo de reparo tecidual, já que a literatura mostra que resposta deficiente de macrófagos causam prejuízo na cicatrização e fechamento das feridas, pois a participação expressiva de macrófagos leva ao tecido fibrótico e eficiente reparo tecidual (BORTHWICK *et al*, 2015). Diferentemente dos resultados obtidos por Komatsu *et al* (2019) que demonstrou fraca marcação de CD68 na crosta de feridas da derme quando tratadas com extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi.

Ainda com relação aos marcadores imunohistoquímicos, a positividade para miofibroblastos que foram detectados pelas presenças das proteínas a-SMA e

fibronectina. Sendo que os aumentos de miofibroblasto e fibronectina foram expressivos em todos os grupos tratados (7 e 14d); porém o resultado estatisticamente diferente do controle foi observado com os grupos PVA e PVA+L (ambos no período de 7d) com o marcador α -SMA, com aumento de miofibroblastos. Resultado este que vai de encontro com os dados na literatura, onde a fase proliferativa do processo cicatricial, compreende do 4o ao 14o dia com reepitelização, fibroplasia e angiogênese, nessa fase a reconstrução do tecido epidérmico com a formação do tecido de granulação com diferentes tipos de células, incluindo: fibroblastos, fibronectina, glicosaminoglicanas, elastina, colágeno entre outros, e por fim a fase de remodelação onde teremos a formação de colágeno III (com fibras frouxas e menos densas), uma neocolagênese com colágeno I de melhor qualidade. Esta informação também explica, o aumento expressivo para positividade da proteína fibronectina em todos os grupos tratados, resultado similar ao obtido na pesquisa de Lee *et al* (2011), e colaboradores que observaram aumento da expressão de fibronectina induzido pelos efeitos da acupuntura na cicatrização de queimaduras de 2o grau em roedores.

Até o momento, a literatura é escassa em pesquisas *in vivo* com a proteína fibronectina, embora várias funções são bem descritas e conhecidas, dentre elas: componente essencial para a formação de tecido tanto na reparação de feridas como na reparação do tecido conjuntivo e interage com outras células para formar uma matriz extracelular, em todos os estágios da cicatrização de feridas (LENSELINK, 2013). São os fibroblastos do tecido conjuntivo que depositam grandes quantidades de fibronectina que, embora seja substrato que desempenha outras funções, basicamente serve para a fixação da própria célula. Então, também importante, a fibronectina, proteína encontrada no processo cicatricial, que se liga a receptores protéicos da membrana extracelular (MEC) chamados de integrinas na matriz extracelular, fazendo parte da adesão à superfície celular (TO; MIDWOOD, 2011). Dos vários componentes da MEC, a fibronectina é uma proteína de adesão celular que ajuda na migração celular e no depósito de colágeno e, conseqüentemente, acelera a cicatrização de feridas (RAGHOW, 1994).

Já o α -SMA é o marcador molecular mais comum para se referir ao miofibroblasto (DUSCHER *et al*, 2014; HINZ, 2013). Em todos os animais tratados, neste trabalho, a expressão de α -SMA foram relevantes, enfatizando a importância

das etapas de cicatrização de feridas, onde os miofibroblastos desenvolvem-se gradualmente a partir de fibroblastos de tecido de granulação e expressam transitoriamente um marcador de diferenciação do músculo liso, α -SMA (DARBY; SKALLI; GABBIANI, 1990). Durante o processo de cicatrização, os miofibroblastos são encontrados em todo o tecido de granulação, e seu número e distribuição ao longo do tempo se correlacionam com a taxa de contração da ferida (MCGRATH; HUNDAHL, 1982).

Assim, esses resultados em conjunto, reiteram com os grupos tratados com o laser de baixa intensidade, que mesmo sem apresentar diferença significativa em relação ao controle, mostrou valor relevante, uma vez que facilita a síntese de colágeno, com liberação de fatores de crescimento, além de transformar fibroblastos em miofibroblastos e garantir um processo de reparação tecidual mais evoluído, com maior contração das feridas e maior velocidade de migração epitelial, similar aos resultados obtidos por Rocha-Júnior *et al* (2006). Para contração do tecido da ferida ou tecido de granulação é necessário a formação controlada e persistente de miofibroblastos, esses promovidos pelos fibroblastos, porém o número desordenado dessas células poderá levar a deformação para um tecido fibrótico (CASTELINO; VARGA, 2014). Em comparativo a ativação correta do fibroblasto para miofibroblasto como evento controlado no tecido de reparo, coágulo de fibronectina é depositado e precisará ser substituído, aumentando fibras colágenas e incorporando actina de músculo liso (α -SMA) (TOMASEK *et al*, 2002). É sabido que miofibroblastos são células chaves para cicatrização, essas células ativadas com fenótipos e função comum, são alvos terapêuticos cada vez mais reconhecidos no processo cicatricial, dadas devidas condições químicas e mecânicas do processo de ativação controlado (HINZ, 2013).

Muitos são as pesquisas com os diversos tipos de lasers, mas pouco foi encontrado com o laser de baixa intensidade, principalmente no que tange estudos com experimentação animal e indução de queimadura de 2o grau, mesmo sabendo da gama de utilização da laserterapia em protocolos de reparo tecidual de pele e mucosas (CAMPOS *et al*, 2009; GABRIEL, 2019), tendo em vista seu recurso para a biomodulação da resposta inflamatória (TARADAJ *et al*, 2018) e melhorias na proliferação celular (CAULIN *et al*, 2000). O mecanismo de indução da luz através do laser induz a fotoexcitação do citocromo C oxidase aumentando o ATP (adenosina

trifosfato), melhorando a secreção de diversas proteínas (KARU, 2015) e do processo cicatricial de feridas, causando um aumento na deposição de colágeno (NASCIMENTO *et al*, 2004).

5. CONCLUSÃO

O recurso terapêutico deste estudo, curativo dérmico de PVA incorporado ao extrato de arnica foi biocompatível e com liberação sustentada do ativo de maneira eficaz, sendo uma promissora opção de curativo para lesões cutâneas, com potencial no reparo tecidual. Através deste estudo, também, reiteramos que a laserterapia de baixa intensidade com ou sem arnica foi efetivo na aceleração do processo cicatricial, devido ao seu potencial efeito biomodulador, melhorando aspectos inflamatórios, bem como, o acondicionamento das fibras colágenas, promovendo rápida cicatrização em lesões cutâneas.

REFERÊNCIAS

- ARANHA, I. B.; LUCAS, E. F. Poli(Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo. **Polímeros**, v. 11, n. 4, p. 174–181, 2001.
- ARAÚJO, C. E. N. *et al.* Ultrastructural and autoradiographical analysis show a faster skin repair in He-Ne laser-treated wounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 86, n. 2, p. 87–96, 2007.
- ALVES, A. P. N. N. *et al.* Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 14, n. 3, p. 203-10, 2015.
- ALVES, N. O. *et al.* Chitosan/poly(vinyl alcohol)/bovine bone powder biocomposites: A potential biomaterial for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions. Carbohydrate. **Polymers**, v. 148, p. 115-124, 2016.
- BARBOSA, M. H. *et al.* Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 318–322, 2009.
- BAXTER, D. **Laserterapia de baixa intensidade**. In: Kitchen S, ed. **Eletroterapia: prática baseada em evidências**. 11a ed. Barueri: Manole, p.171-88, 2003.
- BI, S. *et al.* Construction of physical-crosslink chitosan/PVA double-network hydrogel with surface mineralization for bone repair. **Carbohydrate Polymers**, v. 224, p. 115176–115176, 15 nov. 2019.
- BILGEN, B.; JAYASURIYA, C. T.; OWENS, B. D. Current Concepts in Meniscus Tissue Engineering and Repair. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 11, p. 1701407, 2018.
- BISHT, D. *et al.* Effect of low intensity laser radiation on healing of open skin wounds in rats. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 100, n. 6, p. 43–46, 1994.
- BORATO, E. **Influência da fotoestimulação com laser de baixa intensidade, em ambiente claro e penumbra, na cicatrização de queimaduras de terceiro grau induzidas em ratos Wistar**. 2006. Dissertação (Mestrado) - apresentada na Faculdade Assis Gurgacz. Cascavel, 2006.
- BOROJEVIC, R.; SERRICELLA, P. Próteses contendo as células do próprio paciente no tratamento de lesões cutâneas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 7, p. 16–18, 1999.
- BORTHWICK, L. A. *et al.* Macrophages are critical to the maintenance of IL-13-dependent lung inflammation and fibrosis. **Mucosal Immunology**, v. 9, n. 1, p. 38–55, 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial:** plantas para o futuro - região centro-oeste. Brasília, 2016.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO - RDC No 26, DE 13 DE MAIO DE 2014. Brasília/DF, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Plantas de interesse ao SUS. 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277. Acesso em: 20 jul. 2023.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial:** plantas para o futuro - região Centro-Oeste. Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

CAMPOS, S. Laserterapia HeNe. 2004. Disponível em <http://www.drshirleycampos.com.br/noticias/11509>.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51–58, mar. 2007.

CAMPOS, A. L. S.; DAHER, R. P.; DIAS, A. C. B. Estresse parental em mães de bebês, crianças e adolescentes com queimadura. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 15, n. 4, p. 240–245, 2016.

CAMPOS, L. M. *et al.* Improvement in Quality of Life of An Oncological Patient by Laser Phototherapy. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 2, p. 371–374, 2009.

CASTELINO, F. V.; VARGA, J. Emerging cellular and molecular targets in fibrosis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, n. 6, p. 607–614, 2014.

CASTRO, F. C. B. *et al.* Effects of microcurrent application alone or in combination with topical *Hypericum perforatum* L. and *Arnica montana* L. on surgically induced wound healing in Wistar rats. **Homeopathy**, v. 101, n. 3, p. 147–153, 2012.

CAULIN, C. *et al.* Keratin-Dependent, Epithelial Resistance to Tumor Necrosis Factor-Induced Apoptosis. **Journal of Cell Biology**, v. 149, n. 1, p. 17–22, 2000.

CHANG, J. Y. *et al.* **Biopolymers - PVA hydrogels anionic polymerisation nanocomposites**. New York: Springer, 2000. (Advances in Polymer Science, 153)
CHICOUREL, E. L. *et al.* Contribuição ao conhecimento analítico de três compostas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7-8, n. 8, p. 59–66, 1998.

CHOI, J. H. *et al.* High molecular weight syndiotacticity-rich poly(vinyl alcohol) gel in aging process. **Colloid and Polymer Science**, v. 278, n. 12, p. 1198–1204, 2000.

CHOUHAN, D. *et al.* Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. **Biomaterials**, v. 216, p. 119267, 2019.

CONFORTI, A. *et al.* Rat models of acute inflammation: a randomized controlled study on the effects of homeopathic remedies. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 1, 2007.

CONLAN, M. J.; RAPLEY, J. W.; COBB, C. M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation A review. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 23, n. 5, p. 492–496, 1996.

CORAZZA, A. V. **Fotobiomodulação comparativa entre Laser e LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas em ratos**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 89p. 2005.

DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 63, n. 1, p. 21–29, 1990.

DELLA-LOGGIA, R. *et al.* The Role of Triterpenoids in the Topical Anti-Inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Flowers. **Planta Medica**, v. 60, n. 06, p. 516–520, 1994.

DIXIT, S. *et al.* Immunological challenges associated with artificial skin grafts: available solutions and stem cells in future design of synthetic skin. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, 2017.

DUSCHER, D. *et al.* Mechanotransduction and fibrosis. **Journal of Biomechanics**, v. 47, n. 9, p. 1997–2005, 2014.

EL-DOMYATI, M. *et al.* Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin.

Experimental Dermatology, v. 11, n. 5, p. 398–405, 2002.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Surgery**, v. 26, n. 2, p. 31–37, 2008.

FAN, L. *et al.* Preparation and characterization of chitosan/gelatin/PVA hydrogel for wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 427–434, 2016.

IMBARAK, N. *et al.* Effect of mesenchymal stem cells versus aloe vera on healing of deep second-degree burn. **Stem Cell Investigation**, v. 8, p. 12–12, 2021.

GABRIEL, A. F. *et al.* Photobiomodulation therapy modulates epigenetic events and NF- κ B expression in oral epithelial wound healing. **Lasers in Medical Science**, v. 34, n. 7, p. 1465–1472, 2019.

GHASEMI-MOBARAKEH, L. *et al.* Key terminology in biomaterials and biocompatibility. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 10, p. 45–50, 2019.

HENRIQUES, Á. C. G.; CAZAL, C.; CASTRO, J. F. L. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular: revisão da literatura. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 4, p. 295–302, 2010.

HINZ, B. Matrix mechanics and regulation of the fibroblast phenotype. **Periodontology 2000**, v. 63, n. 1, p. 14–28, 2013.

HAMID, A. A. A.; SOLIMAN, M. F. Effect of topical aloe vera on the process of healing of full-thickness skin burn: a histological and immunohistochemical study. **Journal of Histology and Histopathology**, v. 2, n. 1, p. 3, 2015.

HOUGHTON, P. E.; BROWN, J. L. Effect of low-level laser on healing in wounded fetal mouse limbs. **Laser Therapy**, v. 11, n. 2, p. 54–70, 1999.

HUANG, S. M. *et al.* High glucose environment induces M1 macrophage polarization that impairs keratinocyte migration via TNF- α : An important mechanism to delay the diabetic wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 96, n. 3, p. 159–167, 2019.

JEFFREY, S. L. A.; BELCHER, H. J. C. R. Use of Arnica to relieve pain after carpal-tunnel release surgery. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 8, n. 2, p. 66–68, 2002.

JONES, K. S. Effects of biomaterial-induced inflammation on fibrosis and rejection. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 2, p. 130–136, 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

JUVENCIO, L. R. F. **Preparação e caracterização de filme de PVA/Quitosana/Colágeno visando a aplicação como curativo cutâneo**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2017.
KALLIS, P. J.; FRIEDMAN, A. J. Collagen Powder in Wound Healing. **Journal of drugs in dermatology**, v. 17, n. 4, p. 403–408, 2018.

KALLIANTAS, D. The nanostructure character of Arnica Montana as ultra-high diluted succussed solution medicinal product. Recent advances and prospects. **Journal of Nanomedicine**, v. 3, p. 1021, 2020.

KARIM, A. S.; SHAUM, K.; GIBSON, A. L. F. Indeterminate-Depth Burn Injury—Exploring the Uncertainty. **Journal of Surgical Research**, v. 245, p. 183–197, 2020.

KAROW, J. H. *et al.* Efficacy of Arnica montana D4 for Healing of Wounds After Hallux Valgus Surgery Compared to Diclofenac. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 14, n. 1, p. 17–25, 2008.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 49, n. 1, p. 1–17, 1999.

KARU, T. I. Cellular mechanisms of photobiomodulation. In: **Lasers in Dentistry: Guide for Clinical Practice**. John Wiley & Sons, Inc., 2015.

KLAAS, C. A. *et al.* Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from Arnica flowers. *Planta Medica*, v. 68, n. 5, p. 385–391, 2002.

KLOUCHEK-POPOVA, E. *et al.* Influence of the physiological regeneration and epithelialization using fractions isolated from *Calendula officinalis*. **Acta Physiologica Et Pharmacologica Bulgarica**, v. 8, n. 4, p. 63–67, 1982.

KONIDARI, M. V.; PAPADOKOSTAKI, K. G.; SANOPOULOU, M. Moisture-induced effects on the tensile mechanical properties and glass-transition temperature of poly(vinyl alcohol) films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, n. 6, p. 3381–3386, 2011.

LEE, J. Y.; SUN, K.; PARK, Y.-J. Evaluation of Melia azedarach extract-loaded poly (vinyl alcohol)/pectin hydrogel for burn wound healing. **PLoS One**, v. 17, n. 6, p. 0270281, 2022.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 7, p. 1869–1880, 2001.

LENSELINK, E. A. Role of fibronectin in normal wound healing. **International Wound Journal**, v. 12, n. 3, p. 313–316, 2013.

MACEDO, S. B. *et al.* Anti-inflammatory activity of Arnica montana 6cH: preclinical study in animals. **Homeopathy**, v. 93, n. 2, p. 84–87, 2004.

MACEDO, S. B. *et al.* Effect of Arnica montana 6 cH on edema, mouth opening and pain in patients submitted to extraction of impacted third molars. **Arztezeitschrift fur Naturheilverfahren und Regulationsmedizin**, v. 46, n. 6, p. 381, 2005.

MACNEIL, S. Biomaterials for tissue engineering of skin. **Materials Today**, v. 11, n. 5, p. 26–35, 2008.

MALLAKPOUR, S.; TABESH, F.; HUSSAIN, C. M. A new trend of using poly(vinyl alcohol) in 3D and 4D printing technologies: Process and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 301, p. 102605, 2022.

MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393–408, 2003.

MANSUR, H. S. *et al.* FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with

glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n. 4, p. 539–548, 2008.

MACKAY, D.; MILLER, A. L. Nutritional support for wound healing. **Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic**, v. 8, n. 4, p. 359–377, 2003.

MARTENS, P.; ANSETH, K. S. Characterization of hydrogels formed from acrylate modified poly(vinyl alcohol) macromers. **Polymer**, v. 41, n. 21, p. 7715–7722, 2000.

MCGRATH, M. H.; HUNDAHL, S. A. The Spatial and Temporal Quantification of Myofibroblasts. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 69, n. 6, p. 975–983, 1982.

MEIRELES, G. C. S. **Análise comparativa do efeito dos lasers GaAlAs de $\lambda = 660$ nm e $\lambda = 780$ nm na cicatrização de úlceras por queimaduras em dorso de ratos diabéticos e não-diabéticos: estudo histológico**. Tese (Doutorado)—Salvador: Faculdade de Odontologia.: 2005.

MELO, L. Q.; CIAMPI, A. Y.; VIEIRA, R. F. Análise da variabilidade genética de arnica (*Lychnophora ericoides* Less. - Asteraceae) usando marcadores RAPDs. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 259–266, 2009.

MOGOȘANU, G. D. *et al.* Natural products locally modulators of the cellular response: therapeutic perspectives in skin burns. **Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie**, v. 53, n. 2, p. 249–262, 2012.

NASCIMENTO, E. D. M.; CESARETTI, M. Estudo do efeito da Arnica (*Arnica montana* L.) feridas cutâneas em ratos sobre a cicatrização. 24. Monografia. Faculdade Ciências Médicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica, São Paulo, 2011.

NASCIMENTO, P. M. *et al.* A Preliminary Report on the Effect of Laser Therapy on the Healing of Cutaneous Surgical Wounds as a Consequence of an Inversely Proportional Relationship between Wavelength and Intensity: Histological Study in Rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 22, n. 6, p. 513–518, 2004.

NATHAN, M.; SCHOLTEN, R. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. In: **Annals of Internal Medicine**. Austin: American Botanical Council, 1999.

NUTTELMAN, C. R. *et al.* Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 57, n. 2, p. 217–223, 2001.

OLIVEIRA, B. G. R. B. *et al.* Caracterização dos pacientes com úlcera venosa acompanhados no ambulatório de reparo de feridas. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 14, n. 1, p. 156–163, 2012.

OLIVEIRA, R. N. *et al.* Comparative analysis of PVA hydrogels incorporating two natural antimicrobials: Punica granatum and Arnica montana tinctures. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 41, 2017.

PANG, Q. *et al.* A photo-cleavable polyprodrug-loaded wound dressing with UV-responsive antibacterial property. **Journal of Materials Chemistry. B**, v. 5, n. 45, p. 8975–8982, 2017.

PENHAVEL, M. V. C. *et al.* Effect of Hevea brasiliensis latex sap gel on healing of acute skin wounds induced on the back of rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 1, p. 48–53, 2016.

PEREIRA, D. S. T. *et al.* Topical Application Effect of the Isolectin Hydrogel (Cramoll 1,4) on Second-Degree Burns: Experimental Model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. e184538, 2012.

PEREIRA, E. M. C. P.; DUTRA, F. C.; LONIEM, S. C. H. O paciente queimado e a cicatrização: uma revisão literária. **Revista Eletrônica INESUL**, v. 3, n. 1, p. 10–27, 2010.

PERUCHI, C. M. S. *et al.* Efecto del propóleo en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico. **Revista de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile**, v. 19, n. 2, p. 23–34, 2001.

PICCOLO, M. T. S.; PICCOLO, N. S.; PICCOLO, M. S. O processo de cicatrização. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004.

PIERINI, E.; ASSUNÇÃO, F. F. O. Aesthetic resources applied to burns: literature review. **Manual Therapy, Posturology & Rehabilitation Journal**, v. 12, p. 170, 2014.

PINTO, L. F. Protocolo pós-operatório homeopático em pan-histerectomia de cadelas e gatas. **Homeopatia Brasileira**, v. 4, n. 1, p. 514–515, 1998.

PIRBALOUTI, A. G.; AZIZI, S.; KOOHPAYEH, A. Healing potential of Iranian traditional medicinal plants on burn wounds in alloxan-induced diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 397–403, 2012.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, 2015.

PIVA, J. A. A. C. *et al.* Ação da terapia com laser de baixa potência nas fases iniciais do reparo tecidual: princípios básicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 947–954, 2011.

PON-ON, W. *et al.* Mechanical properties, biological activity and protein controlled release by poly(vinyl alcohol)–bioglass/chitosan–collagen composite scaffolds: A bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 38, p. 63–72, 2014.

PURKAIT, B.; SHARMA, A. Identification and characterization of medicinally active ingredient of endangered plant *Arnica montana*. **International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis**, v. 2, n. 2, p. 59–64, 2021.

RAGHOW, R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. **The FASEB Journal**, v. 8, n. 11, p. 823–831, 1994.

RAS-JUNIOR, *et al.* Perfil epidemiológico dos pacientes queimados no Hospital de Urgências de Sergipe. **Revista Brasileira de Queimaduras**; v. 15, n. 4, p. 251-255. 2016.

ROCHA-JÚNIOR, A. M. *et al.* Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 2, p. 150–156, 2006.

RODRIGUES, M. *et al.* Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 665–706, 2019.

ŞAKRAK, T. *et al.* The effects of combined application of autogenous fibroblast cell culture and full-tissue skin graft (FTSG) on wound healing and contraction in full-thickness tissue defects. **Burns**, v. 38, n. 2, p. 225–231, 2012.

SANTOS JUNIOR, R. A. *et al.* Perfil epidemiológico dos pacientes queimados no Hospital de Urgências de Sergipe. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 15, n. 4, p. 251–255, 2016.

SANTOS, A. M. N. *et al.* Physically Cross-Linked Gels of PVA with Natural Polymers as Matrices for Manuka Honey Release in Wound-Care Applications. **Materials**, v. 12, n. 4, p. 559, 2019.

SCHLAGER, A. *et al.* Healing of Burns after Treatment with 670Nanometer Low-Power Laser Light. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 105, n. 5, p. 1635–1639, 2000.

SHEIKHOLESLAM, M. *et al.* Biomaterials for Skin Substitutes. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 5, 2018.

SILVA, G. F. *et al.* Swelling degree prediction of polyhydroxybutyrate/chitosan matrices loaded with “*Arnica-do-Brasil*”. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 32, p. 47838–47838, 2019.

STEFFANI, J. A. Influência da laserterapia no processo cicatricial de queimaduras do terceiro grau. **Fisioterapia Brasil**, v. 4, n. 5, p. 335–340, 2019.
ŠUTOVSKÁ, M. *et al.* Characterization and pharmacodynamic properties of *Arnica montana* complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 214–221, 2014.

TARAMESHLOO, M. *et al.* A comparative study of the effects of topical application of Aloe vera, thyroid hormone and silver sulfadiazine on skin wounds in Wistar rats. **Laboratory Animal Research**, v. 28, n. 1, p. 17–21, 2012.

TARADAJ, J. *et al.* Effect of laser therapy on expression of angio- and fibrogenic factors, and cytokine concentrations during the healing process of human pressure ulcers. **International Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 11, p. 1105–1112, 2018.

TEODORESCU, M.; BERCEA, M.; MORARIU, S. Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 109–131, 2019.

TIAN, H. *et al.* Effect of Sorbitol Plasticizer on the Structure and Properties of Melt Processed Polyvinyl Alcohol Films. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 12, p. 2926–2932, 2017.

TO, W. S.; MIDWOOD, K. S. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 4, n. 1, 2011.

TOMASEK, J. J. *et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 5, p. 349–363, 2002.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 998–1008, 2007.

WILGUS, T. A.; ROY, S.; MCDANIEL, J. C. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 7, p. 379–388, 2013.

VYAS, K.; VASCONEZ, H. Wound Healing: Biologics, Skin Substitutes, Biomembranes and Scaffolds. **Healthcare**, v. 2, n. 3, p. 356–400, 10 set. 2014.

ZHUANG, X. *et al.* A two-dimensional conjugated polymer framework with fully sp²-bonded carbon skeleton. **Polymer Chemistry**, v. 7, n. 25, p. 4176–4181, 2016.

ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

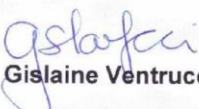


Pontifícia Universidade Católica de São Paulo
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Avaliação farmacológica da biomembrana de PVA [Poli (álcool-vinil)] associada a Arnica e à laserterapia no processo cicatricial de lesão cutânea causadas por queimaduras”**, protocolo nº2022/127, sob a responsabilidade do pesquisador **Carolina Silva Cardoso** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (CEUA-FCMS-PUC/SP), em reunião de **17/05/2022**.

Vigência do Projeto	06/2022 à 06/2023
Espécie/linhagem	Ratos Wistar
Nº de animais	50
Peso/Idade	3 meses 180 a 250 gramas
Sexo	Machos
Origem	CEMIB / UNICAMP


Profa. Dra. Gislaine Ventrucchi
Coordenadora CEUA-FCMS-PUC/SP