



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARÍLIA CAMARGO FONTEQUE

**EFEITO TÓPICO DO FLAVONOIDE HESPERIDINA METIL
CHALCONA NOS DANOS OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS
INDUZIDOS POR QUEIMADURA TÉRMICA EM
CAMUNDONGO *HAIRLESS***

MARÍLIA CAMARGO FONTEQUE

**EFEITO TÓPICO DO FLAVONOIDE HESPERIDINA METIL
CHALCONA NOS DANOS OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS
INDUZIDOS POR QUEIMADURA TÉRMICA EM
CAMUNDONGO *HAIRLESS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

Orientador: Profa. Dra. Sandra Regina Georgetti

Londrina
2020

Ficha de Identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F683 Fonteque, Marília.
Efeito tóxico do flavonoide hesperidina metil chalcona nos danos oxidativos e
inflamatórios induzidos por queimadura térmica em camundongos hairless /
Marília Fonteque. - Londrina, 2020.
121 f.

Orientador: Sandra regina Georgetti.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Hesperidina metil chalcona - Tese. 2. Queimadura térmica - Tese. 3.
Poloxamer 407 - Tese. I. Georgetti, Sandra regina . II. Universidade Estadual de
Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDU 61

MARÍLIA CAMARGO FONTEQUE

**EFEITO TÓPICO DO FLAVONOIDE HESPERIDINA METIL
CHALCONA NOS DANOS OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS
INDUZIDOS POR QUEIMADURA TÉRMICA EM
CAMUNDONGO *HAIRLESS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dra. Sandra Regina Georgetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Renata Micheli Martinez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 17 de julho de 2020.

Dedico este trabalho aos meus pais Rosanne e Geovane, aos meus avós Neide e Luiz por todo amor, dedicação, compreensão e orações fatos que motivaram até o fim desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Nossa Senhora Aparecida e a Deus, pois sem o amor, a iluminação e energia de ambos eu não seria capaz de ser quem eu sou e muito menos de finalizar a Pós-Graduação.

Aos meus familiares por toda ajuda direta e indireta, em especial aos meus pais, Geovane e Rosanne, por toda dedicação, esforço, ida e vindas para Londrina, sempre proporcionando o melhor para mim.

À minha orientadora Prof. Dra. Sandra Georgetti que me ajudou com as dificuldades que encontrei neste trabalho e foi muito paciente. Muito obrigado pela oportunidade em me orientar e por contribuir para a minha carreira profissional.

A minha avó Neide e minha tia do coração Ilda, pelas incassáveis orações durante essa caminhada.

Agradeço as minhas madrinhas Leila e Kika, por serem tão dedicadas a mim e por me darem todo suporte e amor.

Agradeço a minha amiga-irmã, Carla, por toda nossa parceria, cumplicidade, fidelidade e amizade. Com certeza ela foi essencial nessa trajetória.

Agradeço ao meu namorado, Stefano, por toda compreensão, paciência, motivação e conselhos dedicados a mim durante esses anos de trabalho, principalmente por aceitar minha ausência.

Agradeço a minha amiga Ana Paula por compartilhar sua experiência na Pós-graduação, além de toda ajuda, explicações, instruções de trabalho realizadas no Laboratório de Pós-Graduação. E principalmente, por não me deixar desistir e estar sempre ao meu lado,

À técnica do laboratório, Denise Duarte, pela sua disponibilidade, paciência e orientações sobre o uso dos equipamentos.

Aos colegas de curso Cláudia, Ricardo e David, pois além de companheiros de laboratório, também me ajudaram nos experimentos, sempre muito dispostos e disponíveis.

A Prof. Dra Rubia Casagrande, pela sua disponibilidade e orientação nas dúvidas em relação a pesquisa, bem como à suas alunas que me ensinaram a limpeza do Biotério e também os experimentos.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina e ao Hospital Universitário, por todo o suporte possível para a conclusão desse trabalho.

A todos os professores da Universidade Estadual de Londrina, que contribuíram para que eu cumprisse mais esta jornada e por me impulsionarem a alcançar meus sonhos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

*“Nunca desista de um sonho pelo tempo que
você vai levar para realizá-lo. O tempo passa de
qualquer forma.”*

(Renato Maia)

FONTEQUE, Marília Camargo. **Efeito tópico do flavonoide Hesperidina metil chalcona nos danos oxidativos e inflamatórios induzidos por queimadura térmica em camundongo *hairless***. 2020. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A queimadura térmica de pele é o quadro resultante da ação direta do calor, promovendo logo após a injúria uma resposta inflamatória com produção de radicais livres, os quais podem amplificar a lesão. A Hesperidina metil chalcona (HMC) é um flavonoide que apresenta propriedades anti-inflamatória, antioxidante e analgésica. Assim, este trabalho objetivou o desenvolvimento de uma formulação termossensível utilizando Poloxamer 407 (P407) associado de HMC para o tratamento tópico em lesões cutâneas induzidas por queimadura térmica por meio de contato com haste de ferro previamente aquecida em água 100°C em camundongos *hairless*, com intuito de avaliar o potencial anti-inflamatório, antioxidante e cicatrizante da HMC. Realizou-se o preparo à frio do gel de P407 a 20% adicionado a 1% de HMC (P407+HMC) ou não (P407). Em seguida, as formulações foram caracterizadas quanto ao pH, densidade, espalhabilidade, temperatura de transição sol-gel (Tsol-gel), viscosidade, Calorimetria Exploratório Diferencial (DSC) e atividade sequestradora do radical ABTS *in vitro*. Para avaliação dos parâmetros oxidativos e inflamatórios na pele de camundongos foi padronizado o tempo de indução da queimadura na pele (3, 6 e 9 segundos) e tempo de coleta para análise (24, 48 e 72h). Após a padronização do tempo de indução da lesão de 3s e coleta pele de 48h após injúria térmica, avaliou-se o efeito do tratamento de 8/8h por 48h do gel P407+HMC na queimadura utilizando como parâmetros, edema, atividade da mieloperoxidase (MPO), níveis de glutathiona reduzida (GSH), catalase (CAT), ânion superóxido (ensaio NBT) e capacidade total antioxidante da pele (ensaios FRAP – poder antioxidante redutor de ferro e ABTS - 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), além da análise macroscópica das lesões pelo período de 15 dias. Os resultados demonstraram que o gel com HMC apresentou um pH (6,00±0,15) ideal para aplicação na pele lesionada, uma densidade de 1,0032g/mL e boa espalhabilidade. A adição da HMC no gel promoveu um aumento da Tsol-gel no teste do tubo invertido e aumentou a viscosidade do veículo. A curva de DSC do P407+HMC não apresentou o evento térmico do mesmo. A formulação com HMC também apresentou atividade antioxidante, apesar de uma diminuição em relação a matéria prima (IC₅₀ 18,75µg/mL), ainda foi encontrado um IC₅₀ 16,88 µg/mL. Os resultados *in vivo* evidenciaram que esta formulação suprimiu a inflamação cutânea, reduzindo o recrutamento de neutrófilos. Em adição, as imagens dos animais queimados tratados com HMC apresentaram uma melhor evolução do fechamento da ferida, propondo uma atividade cicatrizante. O tratamento contendo formulação com HMC, também mostrou efeito contra o estresse oxidativo induzido pela queimadura térmica, mantendo os níveis GSH, atividade da CAT e capacidade antioxidante total da pele a níveis basais. Em adição mostrou-se eficiente na diminuição da produção de ânion superóxido pelo estímulo da injúria térmica. Dessa forma, os resultados sugerem que a HMC pode contribuir para redução dos danos causados por queimadura térmica, no entanto, são necessários mais estudos para uma futura aplicação clínica.

Palavras-chave: Hesperidina metil chalcona. Poloxamer 407. Queimadura térmica.

FONTEQUE, Marília Camargo. **Topical effect of the flavonoid Hesperidin methyl chalcone in oxidative and inflammatory damage induced by thermal burn in hairless mice**. 2020. 117 p. Dissertation (Master's degree in Pharmaceutical Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Burning is considered one of the most devastating injuries that the human body can suffer, affecting people of all ages and both sexes. Thermal skin burn is the result of the direct action of heat, promoting an inflammatory response after the injury with the release of free radicals, which can amplify the lesion. Hesperidin methyl chalcone (HMC) is a flavonoid that has anti-inflammatory, antioxidant and analgesic properties. Thus, this work aimed to develop a thermosensitive formulation using Poloxamer 407 (P407) associated with HMC for topical treatment in skin lesions induced by thermal burn through contact with an iron rod previously heated in 100°C water in *hairless* mice, in order to assess the anti-inflammatory, antioxidant and healing potential of HMC. The cold preparation of the 20% P407 gel was carried out, added to 1% HMC (P407 + HMC) or not (P407). Then, the formulations were characterized in terms of pH, density, spreadability, solution-gel (Tsol-gel) transition temperature, rheological properties, differential scanning calorimetry (DSC) and sequestering activity of the ABTS radical *in vitro*. In order to assess oxidative and inflammatory parameters in the skin of mice, the skin burn induction time (3, 6 and 9 seconds) and collection time for analysis (24, 48 and 72h) were verified. After standardizing the 3s lesion induction time and 48h skin collection after thermal injury, the effect of the 8 / 8h treatment of the P407 gel added with HMC on the burn was evaluated using as parameters, edema, myeloperoxidase activity (MPO), reduced glutathione levels (GSH), catalase (CAT), superoxide anion (NBT test) and total antioxidant capacity of the skin (FRAP-ferric reducing antioxidant power and ABTS-2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), in addition to the macroscopic analysis of the lesions for a period of 15 days. The results showed that the gel with HMC showed an ideal pH ($6,00 \pm 0,15$) for application on the injured skin, density of 1,0032g/mL and good spreadability. The addition of HMC to the gel promoted an increase in T_{sol-gel} in the inverted tube test and increased vehicle viscosity. The DSC curve of P407 added to the flavonoid did not show its thermal event. The HMC formulation also showed antioxidant activity, despite a decrease in relation to the raw material (IC₅₀ 18,75µg/mL), an IC₅₀ was still found 16.88 µg/mL. The *in vivo* results showed that this formulation suppressed skin inflammation, reducing the recruitment of neutrophils. Furthermore, images of burned animals treated with HMC showed a better evolution of wound closure proposing a healing activity. The treatment containing HMC formulation also showed an effect against oxidative stress induced by thermal burn, maintaining GSH levels, CAT activity and total skin antioxidant capacity at baseline levels. In addition, it proved to be efficient in decreasing the production of superoxide anion by stimulating thermal injury. Thus, the results suggest that HMC may contribute to reduce the damage caused by thermal burn, however, further studies are needed for future clinical application.

Key words: Hesperidin methyl chalcone. Poloxamer 407. Thermal burn.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação da queimadura de acordo com a profundidade.....	25
Figura 2 -	Zonas de lesão térmica	26
Figura 3 -	Produção, eliminação de EROs e controle da homeostase redox	32
Figura 4 -	Estrutura Química dos Flavonoides	40
Figura 5 -	Estrutura Química da hesperidina metil chalcona	43
Figura 6 -	Estrutura Química do Poloxamer 407	46
Figura 7 -	Processo de micelização do Poloxamer 407.....	46
Figura 8 -	Espalhabilidade da formulação P407 e formulação P407+HMC em relação ao peso adicionado	63
Figura 9 -	Viscosidade versus temperatura das formulações P407 e P407+HMC.....	67
Figura 10 -	Curvas termoanalíticas das amostras P407, HMC e P407+HMC ..	68
Figura 11 -	Atividade doadora de elétrons ao radical livre ABTS	69
Figura 12 -	Atividade sequestradora do cátion radical ABTS da HMC P407+HMC.....	70
Figura 13 -	Características macroscópicas da lesão térmica nos tempos 24, 48 e 72horas	72
Figura 14 -	Avaliação do edema e atividade de MPO na pele dos animais queimados.....	74
Figura 15 -	Avaliação dos níveis de GSH, CAT e NBT na pele dos animais queimados.....	75
Figura 16 -	Avaliação da capacidade antioxidante total da pele na pele dos animais queimados	76
Figura 17 -	Acompanhamento da redução da área queimada do dorso dos animais submetidos a lesão térmica	79
Figura 18 -	Efeito do tratamento com P407+HMC na diminuição do edema, 48horas após injúria térmica	81
Figura 19 -	Efeito do tratamento com P407+HMC na diminuição da atividade da MPO, 48 horas após a injúria térmica	83
Figura 20 -	Efeito do tratamento com P407+HMC na redução dos níveis de GSH, CAT e ânion superóxido, 48 horas após a injúria térmica	86

Figura 21 - Efeito do tratamento com P407+HMC na diminuição da capacidade antioxidante total da pele, 48 horas após a injúria térmica87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Formulação do gel termorreversível contendo HMC	50
Tabela 2 – Agrupamento, nomenclatura e tratamento dos animais	55
Tabela 3 – Análise da temperatura de transição ($T_{sol-gel}$) entre a formulação P407 e P407+HMC pelo teste do tubo invertido	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
CAT	Catalase
CB	Controle queimado e tratado com formulação base de P407
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
CID	Classificação Internacional de Doenças
CN	Controle não queimado e sem tratamento
CQ	Controle queimado e sem tratamento
CS	Controle queimado e tratado com Sulfadiazina de Prata 1%
CST	Critical solution temperature
CTQ	Centro de Tratamento de Queimados
DMSO	Dimetilsufóxido
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EUA	Estados Unidos da América
FGF	Fator de crescimento derivado dos fibroblastos
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
F68	Pluronic F68
F127	Pluronic F127
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
HCl	Ácido clorídrico
HMC	Hesperidina metil chalcona
HUL	Hospital Universitário de Londrina
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio

HOCl	Ácido hipocloroso
HTAB	Brometo de hexadecil trietil amônio
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
K ₂ S ₂ O ₈	Persulfato de potássio
LCST	Lower critical solution temperature
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MMP-9	Metaloproteinases
MPO	Mieloperoxidase
MSU	Cristais de urato monossódico
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida adenine dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT	Nitroblue tetrazolium
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NO•	Radical óxido nítrico
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ •-	Radical superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singlete
OD	Densidade óptica
OH-	Radical hidroxila
•OH	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PMNLs	Neutrófilo polimorfonucleares
PMNLs	Leucócitos polimorfonucleares
PPO	Polioxipropileno
PEO ₁₀₀ PPO ₆₅ PEO ₁₀₀	Poloxamer 407
PEO	Polioxiétileno
PEO ₇₆ PPO ₂₉ PEO ₇₆	Poloxamer 188
P407	Poloxamer 407
RF	Retração da Ferida
RL	Radicais livres

RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
REINISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RO ₂ •	Radical peroxil
RO•	Radical alcoxil
SCQ	Superfície Corpórea Queimada
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloro acético
TGF-β	Fator de crescimento de transformação beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina
Tris	Hidroximetil aminometano
UCPs	Proteínas antioxidantes e desacopladoras
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UTQs	Unidades de Tratamento de Queimados
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	QUEIMADURA: EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO	21
2.2	CICATRIZAÇÃO POR LESÕES DE QUEIMADURA.....	27
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO	30
2.4	TRATAMENTO EM LESÕES POR QUEIMADURAS	34
2.5	ANTIOXIDANTES E SEUS EFEITOS NO TRATAMENTO DE QUEIMADOS	37
2.6	HESPERIDINA METIL CHALCONA.....	42
2.7	SISTEMAS TERMOSENSÍVEIS	45
3	OBJETIVOS	48
3.1	OBJETIVO GERAL	48
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	MATERIAIS.....	49
4.1.1	Materiais de Consumo.....	49
4.2	MÉTODOS	49
4.2.1	Obtenção do Gel Termorreversível Contendo HMC.....	49
4.2.2	Avaliação das Características Físico-Químicas do Gel	50
4.2.2.1	Determinação pH.....	50
4.2.2.2	Determinação da densidade relativa	50
4.2.2.3	Determinação da espalhabilidade	51
4.2.2.4	Determinação da temperatura de transição sol-gel método do tubo invertido	51
4.2.2.5	Determinação da viscosidade em função da temperatura.....	52
4.2.2.6	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	52
4.2.2.7	Determinação da atividade sequestradora do radical ABTS•+ (2,2' azinobis-(3-etil benzotiazolin-6-ácido sulfônico)	52
4.2.3	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA IN VIVO DO ATIVO HESPERIDINA METIL CHALCONA INCORPORADO EM FORMULAÇÃO A BASE DE POLOXAMER 407	53

4.2.3.1	Animais experimentais	53
4.2.3.2	Padronização do modelo de indução de lesões cutâneas através de queimadura térmica em camundongo hairless	54
4.2.3.3	Protocolo de avaliação da eficácia do gel termossensível adicionado de HMC	55
4.2.3.4	Análise macroscópica da redução da lesão térmica.....	56
4.2.3.5	Avaliação do edema cutâneo	56
4.2.3.6	Determinação da atividade de mieloperoxidase (recrutamento de neutrófilos).....	56
4.2.3.7	Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno GSH.....	57
4.2.3.8	Avaliação da atividade da CAT.....	57
4.2.3.9	Avaliação da produção de ânion superóxido.....	58
4.2.3.10	Avaliação do poder redutor do ferro (FRAP) na pele.....	58
4.2.3.11	Avaliação do poder antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical 2,2',azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS).....	59
4.2.3.11	Análise estatística dos resultados	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DO GEL TERMORREVERSÍVEL P407+ HMC.....	61
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DO RADICAL LIVRE ABTS PELA HMC.....	68
5.3	PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE INDUÇÃO TÉRMICA EM CAMUNDONGOS HAIRLESS.....	70
5.4	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA IN VIVO DO ATIVO HESPEDIRINA METIL CHALCONA INCORPORADO EM FORMULAÇÃO A BASE DE POLOXAMER 407 EM QUEIMADURA TÉRMICA.....	77
6	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS.....	90

1. INTRODUÇÃO

Queimaduras podem ser definidas como lesão na pele ou lesões teciduais resultantes de traumas com origem térmica causada por chamas, líquidos quentes, superfícies quentes, substâncias químicas, radiação, atrito ou fricção (MOZINGO *et al.*, 2005; STEIN *et al.*, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), anualmente existem 300.000 mortes no mundo decorrentes de queimaduras, a qual é o quarto tipo mais comum de trauma no mundo, perdendo somente para violência interpessoal, quedas e acidentes de trânsito. Avalia-se que no Brasil acontecem em torno de 1.000.000 de incidentes por queimaduras ao ano, sendo que 100.000 pacientes buscaram atendimento hospitalar e, destes, cerca de 2.500 pacientes irão a óbito direta ou indiretamente em função de suas lesões (BRASIL, 2017).

O principal órgão atingido pela queimadura térmica é a pele e seu estágio de destruição tecidual é dependente da temperatura, do tempo de contato, espessura e irrigação da pele. Sendo a desnaturação proteica, o dano celular imediato e os tardios são consequências da resposta imuno-inflamatória ao trauma. Dessa forma, as queimaduras são classificadas em 3 graus: onde o 1º grau, é superficial, atingindo epiderme; o 2º grau, é profundo, com lesão de espessura parcial profunda, por atingir a epiderme e a derme profundamente e 3º grau, com espessura total, lesionando estruturas mais profundas como tecido celular subcutâneo, músculos, tendões e ossos (LIMA-JUNIOR; SERRA, 2004)

O processo de reparo de queimadura pode ser diferente da evolução normal de outras feridas, mas as fases da cicatrização são as mesmas e dependem de diversos tipos celulares e mediadores que interagem de forma complexa e simultânea (HORST *et al.*, 2018; ROWAN *et al.*, 2015). A progressão da queimadura está diretamente relacionada a sequelas, infecção, edema, comprometimento na perfusão sanguínea que expandem os danos inicialmente causados (KECK *et al.*, 2009). Assim, a cicatrização é um processo dinâmico e interativo originária em resposta a um trauma, onde participam diversos mensageiros humorais e celulares desencadeando a coagulação, inflamação, deposição e diferenciação da matriz extracelular, angiogênese, tecido de granulação, fibroblasia, epitelização, contração, remodelamento e maturação (ROBSON, 2003).

Como na queimadura ocorre destruição da barreira epitelial e da microbiota

residente na pele, o seu efeito protetor é desestabilizado, sendo um ambiente propício para a proliferação de micro-organismos. Esta condição desencadeia respostas imunológicas, entre essas está a fagocitose, o qual é um evento dependente de energia, onde o oxigênio é rapidamente consumido, resultando na produção de radicais livres. Além disso, a produção de radicais livres na lesão térmica está associada a inflamação, devido os componentes de necrose celular, infecção e ativação citoquímica na queimadura (HORTON, 2003; LATHA, BABU, 2001).

Para combater o estresse oxidativo ocasionado na queimadura detoxificando o agente oxidante, existe um sistema de defesa antioxidante endógeno presente no organismo, representado por compostos enzimáticos e não enzimático e provenientes da dieta pela dieta, como por exemplo, vitaminas C, E, A, β -caroteno, minerais zinco, manganês, cobre e selênio, coenzima Q10, flavonoides, licopeno, e as catequinas (CAROCHO; FERREIRA, 2013; PANZIERA *et al.*, 2011; NEDEL, 2005) que reagem com as espécies reativas de oxigênio neutralizando-as (STAGNARO-GREEN *et al.*, 2011; SCHNEUER *et al.*, 2012). O sistema antioxidante enzimático é formado pela superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), sendo presentes no citoplasma e na matriz mitocondrial e o não enzimático é formado pela glutathiona (GSH) (DE GROOT *et al.*, 2012). A ação dessas enzimas ocorre pelo bloqueio e/ou controle da formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), transformando-as em moléculas mais estáveis. A SOD converte ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio, a GPx remove o H_2O_2 produzido pela SOD no citosol e na mitocôndria por meio da oxidação da GSH em moléculas de água e a CAT que reduz o H_2O_2 em água e oxigênio (XIA *et al.*, 2017).

Dessa maneira, o tratamento de lesões ocasionadas por queimaduras tem o objetivo de reepitelização rápida e prevenção de infecções, através da aplicação de antibióticos tópicos e de curativos biológicos e não biológicos, o controle da dor e garantia de um ambiente úmido e protegido à lesão (ROSSI *et al.*, 2010; SALIBIAN *et al.*, 2016). Como primeira escolha de tratamento para queimaduras nos hospitais é o antimicrobiano Sulfadiazina de Prata 1%, presente na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), porém possui atividade anti-microbiano e não cicatrizante (ROSSI *et al.*, 2010; FERREIRA, PAULA, 2013). Nesse cenário, práticas terapêuticas das lesões térmicas, com o uso plantas medicinais devido à grande diversidade de fitoquímicos com efeitos antioxidante, anti-inflamatório e

imunomodulador (SHETTY; UDUPA; UDUPA, 2008; BEN-DJEMAA *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2017; HEIDARI *et al.*, 2019) é de ampla utilização no Brasil com bons resultados, entre elas estão *Aloe vera*, *Schinus terebinthifolia*, *Casearia sylvestris*, *Curcuma longa*, *Malva Sylvestris*, *Punica granatum*, todas essas espécies estão disponíveis na RENAME ou na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (REINISUS) (COSTA, MAYWORM, 2011; MARMITT *et al.*, 2018).

Muitas classes de substâncias antioxidantes originárias de produtos naturais são utilizadas para o restabelecimento do equilíbrio redox cutâneo, e também, para a prevenção ou tratamento de patologias provocadas por estresse oxidativo (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007). Entre produtos naturais, podem-se destacar os flavonoides, os quais possuem capacidade antiviral, antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral e efeitos analgésicos (CARVALHO *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015; GARG, *et al.*, 2001; SANTOS, RODRIGUES, 2017). Como exemplo dessas substâncias, existe a Hesperidina metil chalcona (HMC), um flavonóide da classe das chalconas derivado da Hesperidina presente em vegetais e frutas, principalmente nas cítricas como laranja, limão e tangerina (GARG, *et al.*, 2001).

Nesse contexto, é de grande interesse a incorporação desses ativos naturais em soluções que contribuam para o tratamento das lesões térmicas controlando a dor, garantindo um ambiente úmido e protegido. Assim, uma boa alternativa são os sistemas termossensíveis que possuem respostas a alterações do ambiente, sofrendo modificações reversíveis na sua microestrutura e em suas propriedades físico-químicas de acordo com o objetivo desejado (KIRCHHOF; GOEPFERICH; BRANDL, 2015). Um exemplo de insumo com essas características é o hidrogel Pluronic® F-127 ou Poloxamer 407 (P407) que é um copolímero não tóxico em tribloco, com um bloco hidrofóbico com unidade de polioxipropileno e dois blocos hidrofílicos com unidades de polioxi-etileno com característica anfifílica, capaz de formar gel *in situ*. Em baixas temperaturas, o Poloxamer é solução aquosa e torna-se hidrogel a uma temperatura mais elevada. Essa gelificação ocorre devido a desidratação da região hidrofóbica do óxido de polioxipropileno e assim, com o aumento da temperatura as moléculas de Poloxamer se agregam formando micelas (DUMORTIER *et al.*, 2006; NIU *et al.*, 2009). Dessa forma, mediante sua característica termossensível agregado a sua baixa toxicidade impulsiona pesquisas sobre o uso do Poloxamer como um possível sistema de administração de fármacos (GILBERT *et al.*, 1986).

Diante da necessidade de se ampliar o conhecimento sobre as propriedades farmacológicas no tratamento da queimadura, o presente estudo teve como objetivo investigar a atividade anti-inflamatória, antioxidante e cicatrizante da HMC frente a lesão térmica, induzida em camundongos *hairless*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUEIMADURA: EPIDEMIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO

Na versão atualizada da Classificação Internacional de Doenças (CID 11), a queimadura encontra-se na categoria de causas externas, por trauma térmico ou outro trauma agudo, presente no capítulo 22 (WHO, 2019).

A queimadura é considerada uma das lesões mais devastadoras que o corpo humano pode sofrer, afetando pessoas de todas as idades e ambos os sexos (ANDRETTA *et al.*, 2013). São lesões parciais ou totais da pele e seus anexos, podendo atingir camadas como derme, epiderme, tecido celular subcutâneo, músculo, tendões e ossos (JÚNIOR; VIEIRA; ALVES, 2010). É definida, pela Sociedade Internacional de Lesões por Queimadura, como uma lesão na pele ou de qualquer tecido orgânico causada por trauma térmico (labaredas, água fervente ou superfícies quentes e congeladas), radiação ultravioleta, radioatividade, eletricidade ou produtos químicos (ácidos e bases, produtos cáusticos e de limpeza doméstica) (STEIN *et al.*, 2013).

As queimaduras são acompanhadas por grandes mudanças metabólicas, imunes e endócrinas e, independentemente de sua causa, determinam lesões locais e sistêmicas. Nas queimaduras pequenas, existe uma reação unicamente local, enquanto nas queimaduras moderadas e graves ocorre uma reação local maior, podendo ser acompanhada de graves repercussões sistêmicas (AGUIAR *et al.*, 2014)

O cuidado e promoção da cicatrização de feridas oriundas de queimaduras é considerado objetivo fundamental no tratamento médico (FRYKBERG; BANKS, 2015). Uma rápida re-epitelização é fundamental para a recuperação do isolamento da pele. Quando a cicatrização está prejudicada os riscos de infecção aumentam, provocando alterações sistêmicas e respostas imunológicas intensas que causam risco de vida (FARINAS *et al.*, 2018; HORST *et al.*, 2018; SEPEHRIPOUR; DUGGINENI; SHAHSAVARI, 2018).

Em adição, a pele desempenha um papel vital nas funções fisiológicas como transpiração, sensação de calor e dor, portanto, qualquer dano causado a ela pode levar a graves consequências, como dor e trauma, problemas de saúde e até morte em casos graves (BARONI *et al.*, 2012). O custo no tratamento de queimaduras é alto

devido a internações, cirurgias e longo acompanhamento no caso de lesões mais graves (JOHNSON, 2018). Dessa forma, há uma necessidade urgente de desenvolver produtos efetivos e de baixo custo que minimizem os encargos físicos e financeiros na sociedade humana. No cenário de hoje, as drogas sintéticas usadas no tratamento de feridas são consideradas menos efetivas e vários efeitos tóxicos são relatados (GHOSH; MONDAL; RAMAKRISHNA, 2019).

Esta forma de lesão é um problema de saúde pública no Brasil e em todo mundo, porém é observado um número consideravelmente maior desta forma de lesão em países em desenvolvimento ou pouco desenvolvidos (ZOU *et al.*, 2015; MCINTYRE *et al.*, 2016). Noventa e cinco por cento das queimaduras ocorrem em países com baixa renda per capita causando sofrimento, incapacidade funcional e psíquica às vítimas e até mesmo morte (TEVLIN *et al.*, 2017). O índice de acidentes na infância nestes países supera onze vezes os níveis em países de elevada renda, e ainda assim afetam mais indivíduos de minorias raciais e étnicas, caracterizado pelo baixo poder socioeconômico (HAMBLIN, 2018).

Conforme dados publicado pela OMS, as queimaduras estão classificadas como o quarto tipo mais comum de traumas no mundo, com aproximadamente 300.000 mortes anualmente. É elevada a estatística das pessoas que sofrem queimaduras, resultando em um problema grave de saúde pública. Em todo o mundo, estima-se que 6 milhões de vítimas por ano recorrem ao atendimento médico com algum grau de queimadura, entretanto, é difícil estabelecer a distribuição específica de casos para cada país, devido à escassez de dados epidemiológicos e de sistemas nacionais de notificação (ARRUDA, *et al.*, 2018).

É possível encontrar dados disponíveis para alguns países, onde se estima a incidência anual de queimaduras, em média 500 mil nos Estados Unidos, 10 a 15 mil internações hospitalares por ano na Alemanha e 700 a 800 mil novos casos na Índia (ARRUDA, *et al.*, 2018). Avalia-se que no Brasil acontecem em torno de 1.000.000 de incidentes por queimaduras ao ano, sendo que 100.000 pacientes buscaram atendimento hospitalar e, destes, cerca de 2.500 pacientes irão a óbito direta ou indiretamente em função de suas lesões (BRASIL, 2017). Porém, mesmo que estes dados sejam alarmantes, o número exato de pessoas acometidas no Brasil por queimaduras é subdeterminado, devido à subnotificação. Dessa forma, é provável que no Brasil, as lesões inflamatórias causadas por queimaduras possam ser consideradas como as principais responsáveis por ferimentos e mortes dentre as

ocasionadas por causa externa (PERFOLL, 2016).

Entre as faixas etárias há diferença na epidemiologia das queimaduras. Em crianças, os casos de queimadura primeiramente são provocados por líquidos superaquecidos, logo depois por queimaduras de contato e chama. As escaldaduras caracterizam até 85% dos casos desse tipo de trauma, onde a população abaixo de 5 anos são as principais vítimas (BARCELLOS *et al.*, 2018). Nessas situações geralmente são lesões mais superficiais, porém, mais extensas (STROBEL; FEY, 2018). Segundo, Simaan *et al.*, (2019), os meninos são mais acometidos pelas queimaduras térmicas que as meninas.

Mundialmente a literatura indica que as crianças são mais acometidas por queimaduras, representando a quinta causa mais comum de acidentes não fatais na infância, a maioria dos casos ocorre por falta de supervisão adequada de adultos, além das condições socioeconômicas, com a deficiência de recursos para viabilizar ambientes domésticos mais seguros (WHO, 2018; SOARES, *et al.*, 2016).

A escaldadura é o segundo agente causador de queimaduras em idosos acima de 60 anos, perdendo apenas para a lesão por chama direta (LIMA, *et al.*, 2017). O paciente idoso deve ser acompanhado por equipe multidisciplinar devido doenças de base que muitos possuem, para Novaes *et al.*, (2018) a escaldadura também esteve em segundo lugar como principal causa de queimaduras em pacientes entre 63 e 85 anos.

Mundialmente existem Unidades de Tratamento de Queimados (UTQs). A literatura propõe os EUA e Inglaterra como os países que originaram estas unidades, na década de 1950, são unidades compostas por equipe multidisciplinar, cuja finalidade é o tratamento especializado de pacientes com traumas de queimaduras e também, tem o objetivo de melhorar os índices epidemiológicos desses atendimentos. Atualmente, os EUA contam com 137 UTQs espalhadas por todo o país. No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras, existem 57 UTQs cadastradas em todo o território nacional, a maior parte está localizada na Região Sudeste. Há ainda no país nove estados que não dispõem de nenhum centro de referência para tratamento de queimaduras (MACEDO, 2018; ARRUDA *et al.*, 2018; PESCUA JÚNIOR *et al.*, 2013).

Em Londrina, cidade do estado do Paraná, a Universidade Estadual de Londrina (UEL) possui um ambulatório do Centro de Tratamento de Queimados (CTQ) do Hospital Universitário de Londrina (HUL), o qual é um centro de referência em

tratamento de queimados para o Estado do Paraná. Nesse contexto algumas pesquisas foram realizadas com objetivo de caracterizar o perfil dos pacientes e causas das queimaduras que foram atendidas nesse centro (CABULON *et al.*, 2015). Assim, esse mesmo autor afirmou ser o sexo masculino as vítimas predominantes (58%) nesse tipo de acidente, também observou maior concentração na faixa etária entre os 20 e 49 anos (66%), a maioria (71%) sofreu queimaduras de segundo grau e as principais causas foram chamas (55%), escaldos (20%) e eletricidade (17%).

As crianças apresentam elevada frequência nos estudos epidemiológicos de queimadura, devido comportamentos de curiosidade e inabilidade. Dessa forma, um estudo realizado no CTQ/HU/UEL, analisou prontuários de paciente pediátricos com idade entre 7 a 12 anos, constatou maior prevalência no sexo masculino (69,4%), sendo o fogo/álcool o principal agente causador (49%), seguido de escaldadura (29%) (FRANSCICONI *et al.*, 2016). Similarmente, em um estudo realizado com idosos internados no mesmo CTQ, os homens lideram a incidência dos acidentes com (55,4%) dos casos, com média de idade entre 69,1 anos e sendo fogo o principal agente etiológico (54,5%), acompanhado de escaldo (34%), com taxa de óbito de 35,7% (GIULI *et al.*, 2015).

Apesar de todos os dados publicados pelo Ministério da Saúde e pela Sociedade Brasileira de Queimadura, Macedo, (2018) afirma que o Brasil não possui estudos estatísticos que demonstrem, de maneira efetiva, a abrangência de ocorrências de queimadura, em âmbito nacional, fato que impacta consequentemente nas ações de saúde pública.

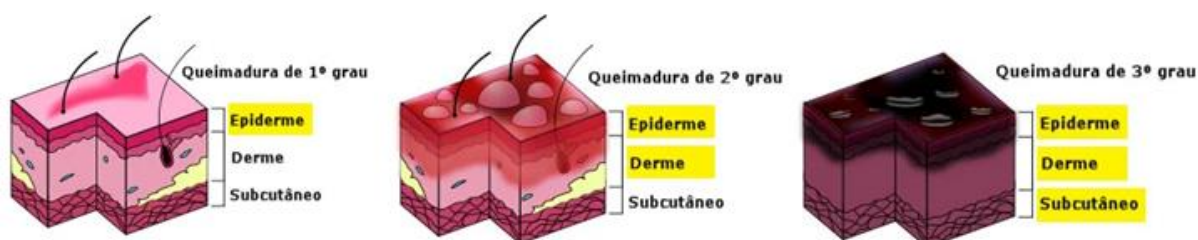
O processo de reparo de queimadura pode ser diferente da evolução normal de outras feridas, mas as fases da cicatrização são as mesmas e dependem de diversos tipos celulares e mediadores que interagem de forma complexa e simultânea (HORST *et al.*, 2018; ROWAN *et al.*, 2015). A progressão da queimadura está diretamente relacionada a sequelas, infecção, edema, comprometimento na perfusão sanguínea que expandem os danos inicialmente causados (KECK *et al.*, 2009).

A pele é o maior órgão do corpo humano, um órgão altamente metabólico e o único que se encontra exposto diretamente ao meio ambiente. Ela representa a primeira linha de defesa do organismo contra estresses ambientais como, patógenos, agentes químicos diversos e radiação UV (XU; FISHER, 2005). Como envoltório do organismo, a pele também regula a troca de água com o meio ambiente e atua no controle da temperatura do corpo. O órgão apresenta estrutura estratificada em três

camadas sendo a epiderme a camada mais externa que está em contato direto com o meio ambiente; a derme a camada de sustentação intermediária e a hipoderme ou tecido subcutâneo a camada mais profunda (BROWNLOW *et al.*, 2015; PÉREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2018).

A pele humana pode tolerar sem prejuízo temperaturas de até 40°C, acima deste valor são produzidas lesões de diferentes comportamentos (MUEHLBERGER; OTTOMANN, 2012). Segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras (2018), os danos térmicos são classificados de acordo com a profundidade das queimaduras e avaliados quanto à extensão da Superfície Corpórea Queimada (SCQ). Quanto ao grau de profundidade da lesão são classificadas em primeiro, segundo e terceiro grau, sendo as de 1º grau acometendo a camada mais externa da pele (a epiderme), as de 2º grau apresentam envolvimento dérmico, podendo ser superficiais ou profundas e as queimaduras de 3º grau ou de espessura integral acometem toda a epiderme e derme com danos profundos atingindo os tecidos subcutâneos, podendo até lesar músculos e estruturas ósseas, ilustrado na figura 1 (GIORDANI *et al.*, 2016).

Figura 1: Classificação da queimadura de acordo com a profundidade



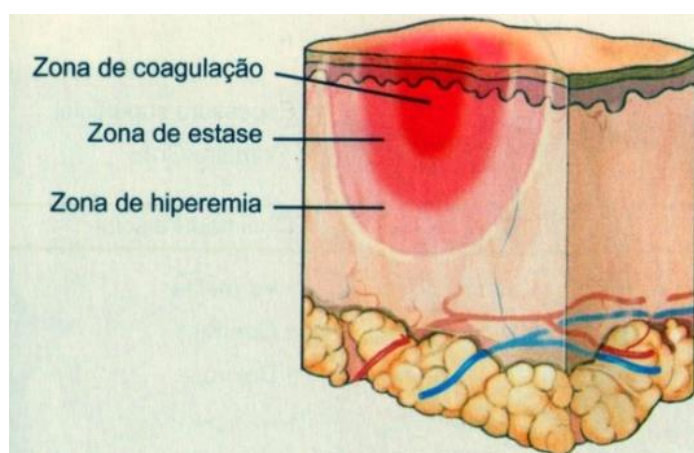
Fonte: MD.SAUDE, 2020

As queimaduras classificadas como de 1º grau são leves com vermelhidão no local, seguida de inchaço e a dor pode ser variável, a pele não se desprende e também não há formação de bolhas. Na recuperação não surgem cicatrizes, mas podem deixar a pele levemente escurecida no início, se re-estabelecendo por completo com o tempo. Nas de 2º grau verifica-se destruição da derme e epiderme, dor intensa com presença de bolhas no local da queimadura, porém a pele não se desprende totalmente. A recuperação dos tecidos é mais lenta, cicatrizes podem permanecer no local afetado com presença de manchas claras ou escuras. Enquanto que na de 3º grau há destruição total de todas as camadas da pele, a mesma pode ficar esbranquiçada ou carbonizada. Geralmente a dor é leve, pois a queimadura é tão

profunda que lesiona as terminações nervosas da pele. Pode ser muito grave até fatal dependendo da porcentagem de área corporal afetada. Durante a recuperação da pele é muito comum que sejam realizados procedimentos cirúrgicos para amenizar as cicatrizes, bem como tratamentos fisioterápicos, pois algumas lesões afetam a movimentação. Tardiamente, algumas cicatrizes podem ser foco de carcinomas de pele e, assim, é muito importante que seja feito um acompanhamento das lesões (MARUMO, MONICA, 2009).

De modo geral, a queimadura pode ser dividida em três lesões concêntricas, descritas em 1953 por Jackson (Figura 2), sendo a zona de coagulação ou necrose localizada no centro da lesão, esta teve maior contato com o agente lesivo e tem perda tecidual irreversível e baixo potencial de regeneração celular devido a desnaturação, degradação e coagulação de proteínas e trombose vascular; sendo circundada pela zona de estase, onde ocorre o edema, comprometimento do fluxo sanguíneo e até isquemia, esta região é terapêuticamente crítica na resolução ou na progressão da lesão dependendo da sua profundidade e extensão pois pode sofrer necrose; e ao redor desta se encontra a zona de hiperemia, onde ocorre a resposta inflamatória, aumento no fluxo sanguíneo e a recuperação tende a ser completa a menos que haja hipotensão prolongada, infecção e sepse (JOHNSON, 2018; KOWALSKE, 2011; SHUPP et al., 2010).

Figura 2: Zonas de lesão térmica



Fonte: PHTLS, 2017.

O processo normal de cura de um ferimento se inicia no momento em que o tecido é lesionado. Após a lesão, ocorre uma resposta inflamatória e as células da

derme começam a aumentar a produção de colágeno. Mais tarde, o tecido epitelial é regenerado (NAYAK *et al.*, 2006). As estratégias de tratamento atuais geralmente são direcionadas na aplicação tópica de medicamento visando intensificar a cicatrização de feridas, minimizar a resposta inflamatória e interromper infecções que são comumente associadas em lesões graves de feridas (BHATIA *et al.*, 2016).

2.2 CICATRIZAÇÕES POR LESÕES DE QUEIMADURA

A atividade de cicatrização tem a finalidade de restaurar a integridade anatômica e funcional do tecido, para isso, o organismo dispõe de um mecanismo envolvendo quimiotaxia, divisão celular, neovascularização, síntese de matriz proteica extra-celular e remodelação da cicatriz (COSTA, ALVES, SOUZA, 2018).

Na cicatrização de lesões cutâneas há possibilidade do aparecimento de dois fenômenos biológicos, são eles: regeneração ou reparação. Na primeira, a lesão é restrita a epiderme, portanto, ocorre substituição característica do tecido lesionado, sem perda de sua função, por outro lado, na reparação o desfecho da lesão apresenta cicatrizes e fibrose (BORGES *et al.*, 2008; REINKE, SORG, 2012).

O processo de cicatrização de qualquer tipo de ferida é o mesmo, seja ela queimadura ou não, portanto, após a lesão ocorre o processo inflamatório, o qual tem por finalidade a reconstituição da ferida. O processo inflamatório pode ser dividido em três fases: inflamatória, proliferação ou granulação e remodelamento ou maturação (CAMPOS, BORGES-BRANCO, GROTH, 2007; ANDRADE *et al.*, 2013). Na primeira fase ocorrem danos às células com resposta vascular. A segunda fase envolve a reconstrução dos tecidos, revestimento da ferida, começando a formação de um tecido fibroso denso. E por último o remodelamento desse tecido o qual pode continuar por meses ou anos (CURI, PEREIRA, BALBINO, 2005).

Na fase inflamatória, a qual ocorre imediatamente após a lesão, verifica-se a liberação de substâncias vasoconstritoras pela membrana celular, inicia-se o extravasamento sanguíneo para o preenchimento da área lesada com plasma e elementos celulares, entre eles, as plaquetas. Assim, as plaquetas incentivam a formação do coágulo, rico em fibrina, estimulando a hemostasia e desenvolvendo um bloqueio contra a invasão de micro-organismos, organiza a matriz provisória essencial para a migração celular (MENDONÇA *et al.*, 2010). Essa matriz também possui a finalidade de reservatório de citocinas e fatores de crescimento, os quais serão

liberados durante as fases seguintes da cicatrização (WERNER, GROOSE, 2003).

Frequentemente a lesão expõe o colágeno na matriz extracelular, dessa forma, ocorre a ativação das plaquetas, estas se aderem e se agregam no local da lesão, permitindo que a hemostasia aconteça, pois são secretados mediadores que auxiliam na coagulação, como fatores de crescimento (LAUREANO, RODRIGUES, 2011). Entre eles estão: fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) e, também, fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), prostaglandinas e tromboxanos que atraem neutrófilos para a lesão. Desta forma, a resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia (RENK, SORG, 2012).

Assim, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local da lesão, produzem radicais livres que auxiliam na fagocitose de bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos. Após 24 horas da injúria, os neutrófilos começam a ser substituídos por macrófagos (TAZIMA *et al.*, 2008). Os macrófagos se deslocam para a lesão, antes dos fibroblastos, finalizando o debridamento iniciado pelos neutrófilos. Em adição, também secretam citocinas e fatores de crescimento, colaboram com a angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, essenciais para a fase proliferativa (BROUGHTON *et al.*, 2006).

No entanto, um processo inflamatório prolongado causa degradação do colágeno, apoptose de queratinócitos, comprometimento vascular e produção de radicais livres em excesso. O acúmulo de neutrófilos no local da lesão permite a produção acentuada de substâncias tóxicas, como os radicais livres que levam a ativação de enzimas proteolíticas causando dano no tecido de granulação incipiente, inibindo fatores de crescimento e dificultando o processo de reparação. Ao mesmo tempo, as células viáveis restantes iniciam um processo de regeneração em um ambiente desfavorável, potencializando a inflamação (HORTON, 2003; GRAGNANI *et al.*, 2013).

A fase proliferativa é formada por três subfases: reepitelização, angiogênese e fibroplasia, as quais são responsáveis pelo fechamento da lesão. Quando a membrana basal permanece íntegra, as camadas da epiderme podem ser restauradas em média em três dias, caso contrário, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar com objetivo de restaurar a barreira protetora (LAUREANO; RODRIGUES, 2011). De acordo com Mandelbaum *et al.*, (2003), o propósito da

reepitelização é a migração de queratinócitos para as margens da lesão e dos anexos epiteliais, quando a ferida tem espessura parcial. Essa proliferação dos queratinócitos é iniciada entre 24 a 48 horas após a lesão, contribuindo para a formação de novo epitélio, bem como a reestruturação da membrana basal.

A angiogênese é um estágio essencial da cicatrização, pois novos vasos sanguíneos serão formados, a partir da proliferação de vasos pré-existentes nas margens da ferida, com proliferação das células endoteliais, formação da estrutura tubular dos novos vasos e reconstrução da membrana basal (LAUREANO; RODRIGUES, 2011). Esse processo é estimulado pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), além disso, também ocorrer a migração de células endoteliais e formação de capilares, fundamentais para a constituição de uma cicatriz apropriada (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Os autores Reinke e Sorg (2012), complementam que o fator de crescimento VEGF, produzido por macrófagos, estimula a expressão de integrinas, as quais são receptores importantes para a migração de células endoteliais.

A formação do tecido de granulação completa a terceira subfase do estágio proliferativo da cicatrização, onde os fibroblastos e células endoteliais são predominantes. Após a lesão, células mesenquimais são transformadas em fibroblastos, por estímulo do fator de crescimento PDGF, que serão divididos no local da ferida e, assim, produzirão os componentes da matriz extracelular. Os fibroblastos sintetizam colágeno tipo I, pela influência do TGF- β , ainda na fase inflamatória (CAMPOS; BORGES; GROTH, 2007). Essa síntese de colágeno é influenciada pela hidroxilação dos aminoácidos lisina e prolina, sendo dependente do nível de oxigenação celular (TAZIMA *et al.*, 2008).

Na última fase do processo de cicatrização verifica-se uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal, sendo assim, ocorre o remodelamento do tecido, onde acontece a deposição organizada do colágeno (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). Inicialmente há produção do colágeno tipo III que é mais fino que o presente na pele normal. Porém, com a evolução do processo de cicatrização, esse colágeno inicial é reabsorvido e um colágeno espesso (tipo I) é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão (BROUGHTON *et al.*, 2006). Conforme há o aumento da formação do tecido cicatricial na fase de remodelamento, a coloração rósea brilhante da lesão é gradativamente substituída por um tom esbranquiçado. A duração desse processo depende da profundidade da lesão (SILVA;

FIGUEREDO; MEIRELLES, 2007).

Portanto, a cicatrização dos tecidos é formada por algumas etapas como a coagulação, inflamação, granulação, fibrose, arranjo de colágeno e epitelização. A duração para a cura completa em lesões por queimaduras de segundo grau, sem a utilização de medicações específicas, é incerta, levando de três a seis semanas ou até mesmo por um período maior, o que vai influenciar nessa cura, é a profundidade da injúria. Além disso, existe a possibilidade de permanecer um tecido cicatricial que pode hipertrofiar e contrair-se (MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013).

Existem alguns interferentes no processo de cicatrização da queimadura, como extremos de idade, estado nutricional, presença de infecção, doenças como diabetes mellitus e insuficiência vascular, ou traumas associados e tratamentos citotóxicos são considerados. O ideal é que a cicatrização ocorra no tempo esperado e sem complicações mínimas (ROSSI, *et al.*, 2010).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO

A transferência de elétrons é um processo fundamental para sobrevivência celular, porém em decorrência desse processo, são formados radicais livres (RL) principalmente espécies reativas de oxigênio (EROs), capazes de causar danos oxidativos (ALVES *et al.*, 2010). Essas espécies derivadas do oxigênio molecular possuem funções biológicas essenciais no organismo, como manutenção das funções normais das células, equilíbrio no estado redox, sinalização celular, atividade do sistema imunológico e defesa contra micro-organismos (YU, AHMEDNA, GOKTEPE, 2005).

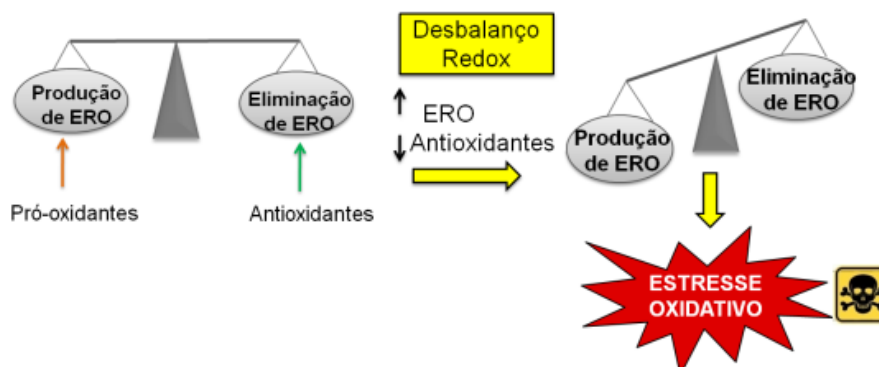
A produção de RL é um processo contínuo e fisiológico. Sua produção é controlada por vários sistemas e vias metabólicas, assim os RL podem ser mediadores na sinalização extra e intracelular. A principal fonte de RL produzidos no organismo é resultante do metabolismo normal do oxigênio, devido sua importância nos processos metabólicos, no entanto, o carbono, o enxofre e o nitrogênio também podem produzir RL (RENZ, 2003). Os RL, os quais são espécies químicas instáveis e reativas formadas de um átomo ou associação de átomos, com um elétron desemparelhado na camada eletrônica (SHAO *et al.*, 2012). Essa atividade resulta em alta instabilidade energética, pois para os RL manterem sua estabilidade precisam doar ou retirar elétron de outra molécula (DROSE, BRANDT, 2012). Entretanto, a produção em

excesso ocasiona danos oxidativos. O estresse oxidativo é qualificado pelo excesso intracelular de RL principalmente de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN), e frequentemente, aparecem nas células como consequência ao desequilíbrio do estado redox, em razão do acúmulo de espécies reativas e/ou pela redução de antioxidantes (MESTMAN, 2012).

As EROs são produzidas continuamente pelas células, por diferentes vias, porém, a cadeia respiratória é a principal fonte devido a presença de vários centros redox, os quais podem transferir um elétron da molécula de oxigênio para formarem ânion superóxido (SCHNEUER *et al.*, 2012). Essas reações de transferência de elétrons na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ocorrem nos complexos I e III, como parte de seus processos metabólicos, além disso, são instáveis (HAMID *et al.*, 2002, MURPHY, 2009). A mitocôndria possui controle preciso do estado redox celular, por meio da combinação entre as numerosas proteínas antioxidantes e desacopladoras (UCPs) e os canais modificadores do gradiente de prótons. A função mitocondrial também pode ser alterada pela combinação de moléculas com as ERN. É válido ressaltar que existem outras fontes importantes de EROs, como enzimas, entre elas estão as oxidases de membrana; xantina oxidase, enzima expressa na parede vascular e presente no plasma; mieloperoxidase, uma hemoproteína secretada durante ativação de neutrófilos e monócitos; óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), a qual produz óxido nítrico (NO) e este interage com as EROs; e NADPH oxidase um importante complexo enzimático produtor de EROs no músculo esquelético (MESTMAN, 2012; STANGARO-GREEN, *et al.*, 2011; GUIMARÃES, 2015).

O desequilíbrio entre a formação e remoção dessas espécies é resultante da redução de antioxidantes endógenos e exógenos, ou também, pelo aumento de geração de espécies oxidantes, gerando um estado pró-oxidante denominado estresse oxidativo (DROSE, BRANDT, 2012).

Figura 3: Produção, eliminação de EROs e controle da homeostase redox



Fonte: PANIERI, SANTORO, 2016 (Adaptado)

EROs são consideradas as mais importantes espécies reativas em sistemas biológicos, onde o centro é o oxigênio molecular (VALKO *et al.*, 2007). Este possui dois elétrons desemparelhados na camada de valência, os quais o tornam passível para a formação de radicais livres (KIM *et al.*, 2015). Dentre eles destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$), o radical óxido nítrico (NO^{\cdot}), o radical peroxil (RO_2^{\cdot}) e algumas espécies reativas não radicalares como o H_2O_2 , o ácido hipocloroso (HOCl) e o oxigênio singlete (1O_2), que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados tem potencial para sofrer reações gerando radicais livres (HALLIWELL, 2009). O radical $O_2^{\cdot-}$ é importante na produção das demais EROs, pois ele resulta da primeira redução do oxigênio, além de ser uma molécula altamente reativa, com meia vida em torno de $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$, assim é capaz de desencadear a formação das demais espécies (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990). Sua principal fonte é a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, mas segundo KIM *et al.*, (2015), o ânion superóxido pode ser produzido durante o burst respiratório das células fagocíticas (monócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos), apresentando ação bactericida.

O estresse oxidativo contribui para os ataques das EROs a componentes celulares, ocasionando lesões oxidativas em macromoléculas e outras estruturas celulares, e se isso não for reparado ou bloqueado poderá causar alterações na funcionalidade de órgãos, tecidos e células. Logo, em muitas patologias o estresse oxidativo está presente, pois as EROs estão relacionadas a vários processos degenerativos (SILVA, GONÇALVES, 2010). Todas as estruturas celulares são

suscetíveis a ação das EROs, mas a membrana é um dos principais focos em decorrência da peroxidação lipídica. Esta pode causar alterações na membrana celular, influenciando em sua integridade, permeabilidade e fluidez, provocando a perda da seletividade, na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, favorecendo a morte celular (SAITO *et al.*, 2015).

Em muitas patologêses, há presença do desequilíbrio redox, o qual contribui para a evolução dos quadros, entre elas estão: as doenças neurodegenerativas, câncer, as cardiovasculares, diabetes mellitus e hipercolesterolemia. Todas essas patologias possuem como características em comum a inflamação crônica e esta, somada ao estresse oxidativo, contribuem para o desenvolvimento e progressão das mesmas. Em seguida a exposição celular a EROs e mudança no estado redox, ocorre o início do processo de transcrição de genes inflamatórios e os fatores de transcrição são regulados por meio de mecanismos redox-sensíveis (DE GROOT *et al.*, 2012). Nesse cenário, as EROs ativam o fator nuclear kappa β (NF- κ B), os quais vão estimular a transcrição de genes que codificam citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α) e moléculas de adesão (NEGRO *et al.*, 2010; SEROR *et al.*, 2014). Por outro lado, as próprias citocinas podem levar a formação de EROs, desencadeando um círculo vicioso entre o estresse oxidativo e a geração de citocinas pró-inflamatórias (HIRSCH *et al.*, 2013). A relação entre a produção de EROs e a inflamação é muito definida, entretanto, os mecanismos moleculares não são completamente esclarecidos (GOMES, 2017).

No trauma térmico os RL são produzidos durante a reposição de fluidos, alterando moléculas como ácidos nucléicos, lipídios e proteínas (BARBOSA, 2006). Nesses casos de queimadura é necessária a restauração da volemia, causando um estresse oxidativo secundário, com perda de mecanismos endógenos de defesa antioxidante. Logo, a hipóxia e o choque hipovolêmico em pacientes com quadros graves de queimadura, contribuem para o acúmulo intracelular de hipoxantinas. Com a restauração da perfusão celular, a hipoxantina é oxidada, produzindo RL, os quais podem aumentar a injúria inicial, comprometendo a defesa antioxidante endógena (HORTON, 2003). Pintaudi *et al.*, (2000) sugere que na queimadura térmica, os RL e EROs gerados colaboram para danos locais adicionais como o aumento do edema, além de participarem dos processos inflamatórios.

Em conclusão, a queimadura com seus componentes de necrose celular, infecção e ativação citoquímica, desenvolvem uma reação inflamatória, a qual aumenta

radicais livres, impedem os mecanismos de defesa antioxidantes, podendo conduzir a vítima queimada a maior possibilidade de injúria mediada pelas EROs, levando a piora do estado metabólico do paciente (CORREIA, 2001). Dessa forma, o estresse oxidativo é um passo crítico na cascata nociva mediada pela queimadura (HORTON, 2003).

2.4 TRATAMENTO EM LESÕES POR QUEIMADURAS

O tratamento das queimaduras objetiva a reepitelização rápida e prevenção de infecções, através da aplicação de antibióticos tópicos e de curativos biológicos e não biológicos, o controle da dor e garantia de um ambiente úmido e protegido à lesão (ROSSI *et al.*, 2010; SALIBIAN *et al.*, 2016). Contudo, esses tratamentos podem ter efeitos secundários na ferida, uma vez que a patogênese da progressão da lesão por queimadura ainda não está bem entendida, poucas terapias clínicas são projetadas para abordar diretamente a questão da progressão da mesma (SALIBIAN *et al.*, 2016).

É importante a escolha de um bom curativo que seja de fácil aplicação e remoção, acessível economicamente e confortável ao uso pelo indivíduo (DALMEDICO *et al.*, 2016). Após os cuidados gerais no atendimento inicial ao paciente queimado, a atenção deve ser voltada ao tratamento tópico da ferida, com escarotomias, se necessário, e limpeza da superfície queimada, debridamento e remoção de flictenas rotas, se for o caso. A aplicação de curativos, cujo componente primário deve oferecer condições ideais para a revitalização, e também deve permitir que a ferida seja inspecionada a cada 48 horas para avaliar o processo de cicatrização e aparecimento de infecções (MOSER, 2013).

A seleção de coberturas é baseada nos efeitos sobre a cura, na facilidade de aplicação e remoção do produto, no custo de tratamento e conforto do paciente (WASIAK *et al.*, 2013). Como uma das primeiras linhas de tratamento, agentes antibacterianos tópicos são usados para prevenir infecções; entretanto, eles podem causar reações alérgicas que adiam o processo de cicatrização (THOMAS *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2005).

A sulfadiazina de prata tem ação antimicrobiana contra micro-organismos gram-positivos e gram-negativos, fungos e anaeróbicos. A medicação deve ser aplicada sobre a queimadura com uma camada de aproximadamente 3-5 mm e, em seguida, coberto com camada de gaze absorvente, devendo ser trocado a cada 24

horas ou com menor intervalo de tempo caso a ferida seja muito exsudativa (ROSSI *et al.*, 2010). O uso da sulfadiazina de prata 1%, em creme está inclusa na RENAME. Não se apresenta como cicatrizante e sim apenas como anti-microbiano (ROSSI *et al.*, 2010; FERREIRA, PAULA, 2013). Em 2017, foi atualizada a lista da RENAME, os 12 medicamentos fitoterápicos das edições 2012 e 2014 permaneceram, as atualizações foram em relação à concentração por forma farmacêutica e a dose diária na coluna concentração/composição (BRASIL, 2017). Dentre estes, estão os cremes à base de babosa e aroeira, conhecidos por sua ação cicatrizante, constituindo alternativas economicamente mais viáveis para o tratamento de feridas e queimaduras (COSTA; MAYWORM, 2011).

De acordo com os dados publicados por Marmitt *et al.*, (2018), há evidências da atividade cicatrizante com eficácia na contração, neovascularização e re-epitelização de queimaduras induzidas em ratos das folhas de *Casearia sylvestris*, o rizoma de *Curcuma longa* e as flores de *Malva Sylvestris* e de *Punica granatum*, as quais pertencem a REINISUS. A literatura também relata a eficácia de produtos naturais como mel e *Aloe vera* para tratamentos de doenças de pele, como as queimaduras (SILVA, 2013; PINHEIRO, NASCIMENTO, 2019). E foi a partir de 2011 que tratamentos dermatológicos a base de babosa foram inseridos na RENAME, para o tratamento de lesões e queimaduras de 1º e 2º graus (BRASIL, 2017; COREN, 2012).

Uma ampla área de pesquisa utilizando plantas medicinais tem sido realizada nos últimos anos no tratamento de queimaduras, devido à grande diversidade de fitoquímicos com efeitos antioxidante, anti-inflamatório e imunomodulador (SHETTY; UDUPA; UDUPA, 2008; BEN-DJEMAA *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2017; HEIDARI *et al.*, 2018). Entre os produtos naturais também se destacam a papaína e o mel e entre as soluções, o nitrato de prata, o gluconato de clorexidina e o iodopovidona, embora pouco utilizado nos dias atuais (MONTES *et al.*, 2011).

Muitas classes de substâncias antioxidantes originárias de produtos naturais são utilizadas para o restabelecimento do equilíbrio redox cutâneo, e também, para a prevenção ou tratamento de patologias provocadas por estresse oxidativo (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007). A eficácia de antioxidantes desta origem é muito investigada, alguns estudos sobre queimadura utilizaram essas fontes naturais em seus tratamentos, como extrato de *Passiflora edulis* S., creme a base de

Isoquercetina, o extrato de *Aloe barbadensis*, Curcumina (BARROS *et al.*, 2016; BHATIA *et al.*, 2016; MERCÊS, 2015, SINGER *et al.*, 2007).

Outras linhas de tratamento merecem destaque como os curativos com hidrogéis, que demonstram eficácia no alívio da dor e cicatrização mais rápida pela promoção de um ambiente úmido a lesão. Já os curativos substitutos de pele, petrolato e espuma de silicone são importantes como alternativas para a lesão, porém, uma análise deve ser feita para se adequar as melhores terapias e acesso ao tipo de curativo ideal para o paciente (TAVARES, SILVA, 2015). As coberturas com alginato de cálcio e sódio são úteis na promoção do debridamento autolítico e absorção do exsudato, que costuma ser excessivo na fase inicial da cicatrização, ainda assim mantendo o ambiente úmido necessário para que a reepitelização ocorra. Sua remoção não causa traumas à lesão e não necessita de troca diária (ROSSI *et al.*, 2010).

Um curativo de hidrogel a base de quitosana, mel e gelatina foi desenvolvido por pesquisadores e apresentou eficácia antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* e promoveu a cicatrização de queimaduras (WANG *et al.*, 2012). O ácido hialurônico, um composto que promove retenção da umidade na pele, associado à sulfadiazina de prata, denota potencial para o tratamento de queimaduras de espessura parcial ou profundas, por conta da sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e por ser não imunogênico. No entanto, ainda é insuficiente o número de evidências de seu uso na prática clínica (DALMEDICO *et al.*, 2016).

Wattanaploy *et al.*, (2017) realizaram um estudo comparando a eficácia do gel de polihexanida/betaína com a sulfadiazina de prata no tratamento de queimadura de espessura parcial. O gel de polihexanida/betaína demonstra ser um candidato promissor por apresentar algumas vantagens em relação a sulfadiazina de prata, incluindo baixa citotoxicidade, promoção da cicatrização de feridas e facilidade de remoção da ferida (HUBNER; KRAMER, 2010), contudo, este estudo não encontrou diferença significativa no tempo de epitelização representado a partir do tempo de cicatrização de queimaduras entre grupos tratados com gel de polihexanida/betaína e grupo tratado com sulfadiazina prata.

Existem diversos tipos de substitutos de epiderme, de derme e compostos equivalentes de pele que funcionam como *Scaffolds* (base de sustentação) para o tratamento de queimaduras graves, profundas e de difícil cicatrização. Além de fatores de crescimento recombinantes, particularmente FGF, EGF e GM-CSF que são

indicados para muitos pacientes, no entanto, são de alto custo e muitas vezes inviáveis principalmente para o sistema público (ELKINS-WILLIAMS; MARSTON; HULTMAN, 2017; OJEH *et al.*, 2015).

Neste contexto, pode-se verificar que a conversão da queimadura continua a ser um aspecto que requer mais estudos. Contudo, pesquisas recentes avançaram tanto no melhor entendimento dos fatores contribuintes na conversão da patogênese da ferida, bem como a aplicação de novos tratamentos para mecanismos de progressão secundária. A maioria dos estudos realizados nos últimos cinco anos se concentrou na adaptação de terapias como possíveis intervenções visando a zona de estase, além de tratamentos experimentais visando reduzir a inflamação prolongada, diminuindo radicais livres de oxigênio e melhoria da perfusão, que demonstraram resultados promissores (SALIBIAN *et al.*, 2016).

2.5 ANTIOXIDANTES E SEUS EFEITOS NO TRATAMENTO DE QUEIMADOS

A pele é um órgão complexo formado por diferentes estruturas e com diversos tipos celulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018). Além disso, ela é exposta a inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos, muitos dos quais induzem a formação de EROs e ERN, pois está susceptível ao O₂ fornecido pela circulação sanguínea, bem como, ao O₂ proveniente do meio ambiente (OLIVEIRA; FONSECA; FONSECA, 2008). Estas substâncias colaboram para manutenção da sobrevivência e homeostase celular, também são importantes para vários processos fisiopatológicos e bioquímicos quando há um equilíbrio entre sua formação e remoção (RASILAINEN *et al.*, 2002). No entanto, quando essa homeostase é rompida instala-se o estresse oxidativo.

Uma vez que este órgão está altamente susceptível ao desequilíbrio fisiológico causado principalmente pela alta exposição a agentes agressores, a pele possui mecanismos enzimáticos e resposta rápida, e moléculas antioxidantes de baixo peso molecular, para conter o estresse oxidativo. As EROs formadas na pele, são principalmente os radicais $\cdot\text{OH}$, e $\text{O}_2^{\cdot-}$, os radicais peroxil (RO_2^{\cdot}) e alcoxil (RO^{\cdot}), o $^1\text{O}_2$ e o H_2O_2 . As ERNs como o óxido nítrico (NO^{\cdot}), também estão presentes (RASILAINEN *et al.*, 2002; BEAK *et al.*, 2004; KING; OH, 2004).

Os antioxidantes são moléculas que podem prevenir ou retardar a oxidação, mesmo quando presentes em baixas concentrações, protegendo os sistemas

biológicos contra efeitos deletérios das reações que levam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Estes podem atuar de maneiras distintas, prolongando a fase de iniciação ou inibindo a fase de propagação, entretanto, não são capazes de prevenir completamente a oxidação (JUNIOR, 1998; MOURA, 2006). Conforme a atividade desempenhada, os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos e, também, pelo modo de ação, onde podem ser primários ou secundários (COTINGUIBA, 2013).

Os antioxidantes enzimáticos agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não radicalares, envolvidos com o início de reações em cadeia, as quais resultam amplificação do processo e, conseqüentemente, com ocorrência de danos oxidativos. E os não enzimáticos, são estruturas moleculares com capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004; PODSDEK, 2007). Em relação ao modo de ação, os antioxidantes primários paralisam a cadeia de reação por meio da doação de elétrons ou de átomos de hidrogênio aos RL, transformando-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres. Por outro lado, os antioxidantes secundários são capazes de retardar a oxidação por meio de vários métodos entre eles: sequestros de oxigênio (O_2), decomposição de hidroperóxidos para formar espécies não reativas, absorção de radiação ultravioleta, desativação de oxigênio singlete ou pela complexação de metais (SOUSA, 2007).

O sistema de defesa enzimático é formado por enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (Gr) (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013). A ação dessas enzimas ocorre pelo bloqueio e/ou controle da formação das EROs, transformando-as em moléculas mais estáveis. A SOD converte $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 , a GPx remove o H_2O_2 produzido pela SOD no citosol e na mitocôndria por meio da oxidação da GSH em moléculas de água e a CAT que reduz o H_2O_2 em água (H_2O) e O_2 (XIA *et al.* 2017).

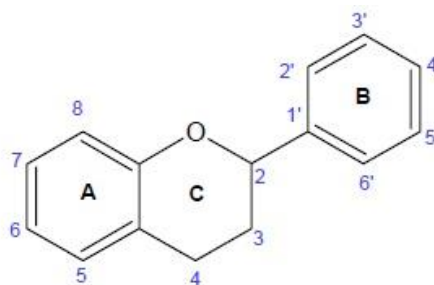
Dentre os não enzimáticos, estão substâncias antioxidantes de origem endógena como a GSH ou exógenas obtidas pela dieta, como por exemplo, vitaminas C, E, A, β -caroteno, minerais zinco, manganês, cobre e selênio, coenzima Q10, flavonoides e licopeno (CAROCHO; FERREIRA, 2013; PANZIERA *et al.*, 2011; NEDEL, 2005). Tanto a GSH que é um tripeptídeo com função celular protetora contra os danos oxidativos, atuando como co-substrato da GPx, como as enzimas servem

como biomarcadores para a defesa antioxidante devido às suas habilidades de eliminar e atenuar os efeitos das EROs (SHAO *et al.*, 2012).

Como proteção antioxidante cutânea pode-se citar as enzimas SOD, GPx e CAT e pelos antioxidantes não enzimáticos, onde as substâncias endógenas consistem em hormônios estradiol e melatonina, GSH, ácido lipólico, melanina, entre outros, que inibem a formação de novas espécies reativas (KVAM, DAHLE, 2003; SLOMINSKI *et al.*, 2002). E os não enzimáticos adquiridos pela alimentação como as vitaminas: A, C e E; carotenoides, polifenóis e Coenzima Q10, os quais são indispensáveis para a defesa apropriada contra oxidação e, portanto, têm importante papel na manutenção da saúde (ADDOR, 2017; ALJUFFALI *et al.*, 2015; MIRONCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018; DINIZ, 2015).

Dentre os principais antioxidantes associados à inibição do estresse oxidativo, estão os compostos fenólicos, entre eles os polifenóis, os quais são substâncias amplamente distribuídas na natureza, sendo que mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas (FONTES, 2018). Estes possuem como principais fontes os vegetais (frutas, sementes, cereais, óleos, vinho, chás e especiarias) (MCCULLOUGH *et al.*, 2012; AHMAD *et al.*, 2016). Os mecanismos da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos se dão pelas suas propriedades de sequestrar radicais livres, quelar metais e o sinergismo com outros antioxidantes (BARCIA, 2014). Os polifenóis possuem como modelo básico estrutural um grupo fenol, formado por um anel aromático hidroxilado, sendo a disposição e o número dessas hidroxilas que influenciam no potencial antioxidante (MARTINS; PETROPOULOS; FERREIRA, 2016; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Dentre as classes que compõe os compostos fenólicos, os mais comuns são os ácidos fenólicos e os flavonoides, sendo o último o grupo mais estudado (ACOSTA-ESTRADA; GUTIERREZ-URIBE; SERNASALDIVAR, 2014).

Os flavonoides possuem 15 átomos de carbono com estrutura C6-C3-C6, onde os anéis C6 são aromáticos, chamados de fenil ligados por meio de um anel pirano (Figura 4) (CUNHA, 2010). São sintetizados a partir da via dos fenilpropanoides, possuem baixo peso molecular e estão presentes em todas as partes da planta, desde as raízes até folhas e frutos (SIMÕES *et al.*, 2004). Podem ser classificados como: flavan-3-ol, flavona, flavonol, flavonona, chalcona, isoflavona e antocianidina (KUMAR; PANDEY, 2013). Os flavonoides podem ocorrer na forma de aglicona, glicosídica ou como derivados metilados (PIETTA, 2000; CUNHA, 2010).

Figura 4: Estrutura Química dos Flavonóides

Fonte: CUNHA, 2010.

Os flavonoides possuem efeito cardioprotetor, atividade vasodilatadora, atividade antioxidante, anti radicalar, atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune, ação anti-inflamatória e analgésica (CUNHA, 2010, FERNANDES-JUNIOR *et al.*, 2006). São capazes de inibir a peroxidação lipídica e desta forma a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e do ácido linoleico (KUMAR; PANDEY, 2013; ANILA; VIJAYALAKSHMI, 2003). Atuam como antioxidantes primários, bloqueando a cadeia da reação, por meio da doação de elétrons ou de hidrogênio, aos radicais livres transformando-os em produtos estáveis (PIETTA, 2000).

Nesse contexto, existem pesquisas científicas, as quais estão priorizando desenvolvimento e testes de vários compostos naturais e sintéticos para o aumento da taxa de cicatrização de feridas ou até mesmo a supressão das possíveis complicações do processo de cicatrização (VIEIRA *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2012). Dessa forma, há evidências científicas de uma diversidade de espécies nativas com ação cicatrizante, devido a diferentes classes de compostos bioativos, como: os taninos, flavonoides, saponinas triterpênicas, óleos essenciais e mucilagens (PAPANAS; MALTEZOS; 2011; MORESKI, *et al.*, 2018; REIS *et al.*, 2014.).

A planta Candieiro (*Melochia tomentosa L.*) da família Malvaceae e subfamília Sterculiaceae, erva nativa da Caatinga apresenta atividade antioxidante devido seus metabólitos secundários presentes em seu extrato bruto, entre eles os flavonoides, saponinas e taninos (NAVARRO, 2010). Assim, Acácio *et al.*, (2018), realizou um estudo, o qual verificou que devido a presença dos taninos na Candieiro estes além de agirem na defesa química das estruturas das plantas, como folhas e flores, também podem auxiliar nos processos de cura de lesões, queimaduras e inflamações.

Outro achado relevante em relação a plantas medicinais brasileiras usadas para tratamento de feridas ou queimaduras na pele, por administração tópica é a *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer, conhecida popularmente por Alecrim de vaqueiro, Alecrim do mato e Pedrécio (AGRA *et al.*, 2008). Seu extrato metanólico e hidrometanólico derivados das inflorescências apresentaram forte potencial antioxidante, pela presença de compostos fenólicos e flavonoides, avaliado pelo sequestro do radical livre DPPH (BOMFIM *et al.*, 2016).

Os benefícios terapêuticos do creme de *Malva sylvestris* L, no processo de cicatrização e cura da ferida de ratos queimados foi comprovado por Nasiri *et al.*, (2015). Resultados semelhantes foram encontrados na aplicação de creme adicionado do extrato aquoso da *Malva sylvestris* L em feridas cutâneas causadas em ratos BALB/c, demonstrando que após dez dias de tratamento houve redução do número de células inflamatórias, reafirmando a ação cicatrizante e antioxidante da *Malva sylvestris* (AFSHAR *et al.*, 2015).

Song *et al.*, (2017) demonstraram que extrato polifenólico do resíduo de *Bletilla striata* apresenta atividade antioxidante *in vitro* e efeito na cicatrização de queimaduras *in vivo* induzidas pelo contato no dorso do animal com uma placa metálica circular (\varnothing 1,5 cm) aquecida a 80°C por 15s. Devido a relatos anteriores sobre os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da planta *Tragopogon graminifolius*, foi realizado estudo sobre as propriedades de cicatrização de feridas realizadas em ratos por meio de queimaduras utilizando haste de alumínio (1,5 cm) com calor de 110°C e exposto a 10s. O extrato de partes aéreas desta planta, adicionado a 10% em creme, apresentou potencial de cicatrização das feridas induzidas nesse modelo de queimadura de segundo grau, como também, apresentou diminuição dos biomarcadores de dano oxidativo (HEIDARI *et al.*, 2019).

De acordo com a definição da OMS, os agentes fitoterápicos incorporam como componentes ativos obtidos de partes de plantas ou materiais herbáceos no estado bruto ou processado (CALIXTO, 2000). Nesse contexto, estudos também foram realizados utilizando produtos de origem natural, que assim como, as plantas medicinais tornaram-se foco de pesquisa devido algumas limitações e efeitos adversos de drogas químicas e sintéticas (PAZYAR *et al.*, 2014). Zhang *et al.*, (2018), investigaram a efetividade tópica do ácido usnico, um metabólito secundário líquenico, na aplicação da lesão dérmica por meio das alterações macro e microscópicas na contração das feridas, análise histológica e análise imuno-histoquímica.

A curcumina, um composto fenólico hidrofóbico natural (KUMAVAT *et al.*, 2013), vem sendo extensivamente estudada devido à suas inúmeras atividades farmacológicas, incluindo antioxidante, antifúngica, anti-inflamatória, antimalárica, antitumoral, antiviral, cicatrizante, esquistossomicida, hipoglicemiante, leishmanicida, nematocida, neuroprotetora, anti-aimiloidogênica e imunomoduladora (SANTIAGO *et al.*, 2015). Assim, várias formulações tópicas adicionadas de curcumina, tais como; filmes, fibras, emulsão, hidrogéis e diferentes nanoformulações foram desenvolvidas para a sua aplicação em feridas (MOHANTY; SHOO, 2017). Especificamente, foram realizados estudos para avaliar seu potencial *in vivo* na cicatrização de feridas causadas por queimadura (EL-REFAIE *et al.*, 2015; DURGAPRASADI *et al.*, 2011).

Ademais relatos anteriores sobre a propriedade antioxidante estabelecida da isoquercetina, Bhatia *et al.*, 2016, verificaram que a mesma aplicada topicamente em creme sobre queimaduras causadas pela exposição em água quente a 90°C/10s promoveu melhora na re-epitilização e reestruturação do tecido. Ainda, estudos bioquímicos dos tecidos indicaram um possível papel do seu potencial de eliminação de radicais livres para efeito na cicatrização das feridas.

Mediante a implicação da formação e liberação de radicais livres oxidativos nas injúrias térmicas, assim como, outros mediadores pró-inflamatórios que contribuem no agravamento da lesão (PICCOLO *et al.*, 1999; SINGH *et al.*, 2007; RANI *et al.*, 2012), além do evidenciado que antioxidantes quando administrados após queimadura, podem exercer potencial na cicatrização tecidual (HORTON *et al.*, 2001; SENER *et al.*, 2002; CETINKALE, SENEL, BULAN, 1999), a terapia antioxidante para cicatrização de feridas se torna promissora (FITZMAURICE *et al.*, 2011).

Dessa forma, a indústria farmacêutica tem despertado o interesse por novas substâncias que possam ser usadas para melhorar a qualidade de vida das populações, entre elas estão as plantas empregadas na medicina popular (DAVIS, PEREZ, 2009). Os medicamentos de origem vegetal são utilizados por 80% da população mundial em desenvolvimento, além disso, 25% dos princípios ativos são derivados químicos de plantas (AZIZ *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018).

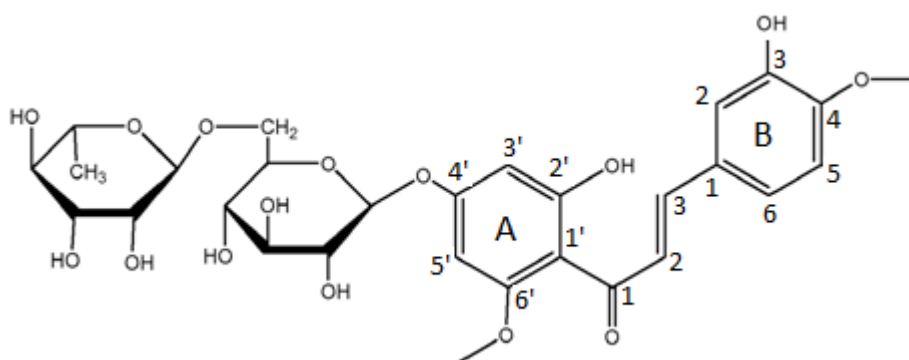
2.6 HESPERIDINA METIL CHALCONA

Flavanonas pertencem a uma classe de flavonoides encontrada em quantidades significativas em frutas cítricas, portanto, estas frutas e os seus

respectivos sucos são a maior fonte de flavanonas ingeridos pelo homem. Muitos dos efeitos benéficos do consumo do suco de laranja têm sido atribuídos a presença da quantidade elevada da flavanona hesperidina (MANACH *et al.*, 2004). As propriedades farmacológicas dos flavonoides estão relacionadas a sua capacidade antiviral, antioxidante, antimicroniana, anti-inflamatória, antitumoral e efeitos analgésicos, tais propriedades estão presentes em vários estudos (CARVALHO *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015; GARG, *et al.*, 2001; SANTOS, RODRIGUES, 2017).

Hesperidina, ou 3,5,7-trihydroxy flavanone 7-rhamnoglucoside (hesperetin-7-rhamnoglucoside), é um flavonoide da classe das flavanonas, presente em vegetais e frutas, principalmente nas cítricas como laranja, limão e tangerina (GARG, *et al.*, 2001). Como característica química, a Hesperidina possui baixa solubilidade em água e baixa absorção intestinal quando comparada a outros flavonoides, devido a adição dos grupamentos glicosídicos. A Hesperidina pode sofrer metilação em meio alcalino, formando a hesperidina metil chalcona (HMC - C₂₉H₃₆O₁₅) ou (E)-1-[4-[[6-O-(6-Deoxy- α -L100-mannopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl]oxy]-2-hydroxy-6-methoxyphenyl]-3-(3hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-propen-1-one (Figura 5), uma chalcona que apresenta melhor biodisponibilidade e resistência metabólica em comparação a hesperidina (WALLE, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2015).

Figura 5: Estrutura química da hesperidina metil chalcona



Fonte: MARTINEZ *et al.*, 2015.

HMC é amplamente utilizada em indústrias farmacêuticas como vasodilatador, modificador da permeabilidade vascular, intensificador da resistência capilar e estabilizador de prostaglandina E. O seu uso em cosméticos como corante também foi relatado (CASTILLO *et al.*, 1991).

HMC é eficaz no tratamento de doenças vasculares quando combinada com outros compostos como vitamina C e extrato de *Ruscus aculeatus* (JAWIEN *et al.*, 2017; KAKKOS *et al.*, 2017). Comercialmente a HMC está presente no medicamento Ciclo 3 Fort® (fabricado pelo laboratório francês Pierre Fabre), prescrito para o tratamento de doenças vasculares, com a função de agente vasoprotetor, ainda não está disponível no Brasil (ALLAERT *et al.*, 2011). Entretanto, o laboratório brasileiro Aché, possui em seu portfólio o medicamento fitoterápico Diosmin®, composto por uma fração flavonóica de 90% Diosmina e 10% Hesperidina, indicado para o tratamento de varizes, úlceras varicosas e úlceras de estase, hemorróidas, e outros sintomas de má circulação (ACHÉ, 2017).

A aplicação tópica de HMC em camundongos sem pelos melhorou os danos inflamatórios causados pela irradiação UVB, como edema, recrutamento de neutrófilos, produção de citocinas IL-6, TNF α , IL-10 e IL-1 β e aumentou as defesas endógenas da pele contra o estresse oxidativo (MARTINEZ *et al.*, 2016). Em outro estudo, essa flavanona, administrada por via intraperitoneal em camundongos *hairless* foi eficaz na inibição de edema, recrutamento de neutrófilos e na atividade das metaloproteinases (MMP-9) (MARTINEZ, *et al.*, 2015).

Walle (2007), em sua pesquisa com camundongos, concluiu que a HMC possui atividade antioxidante, analgésica e anti-inflamatória, tais efeitos estão associados com a inibição da produção de citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-22) e ativação do NF- κ B. Além disso, foi verificado que o tratamento com HMC reduziu a dor inflamatória desencadeada por diferentes estímulos, como carragenina, cristais de urato monossódico (MSU) e capsaicina (PINHO-RIBEIRO, *et al.*, 2015; RUIZ-MIYAZAWA *et al.*, 2018).

Em adição, evidências suportam que o HMC possui um perfil pré-clínico e clínico seguro (KIRTLEY, PECK 1948; BELTRAMINO *et al.*, 2000; PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2015). No estudo realizado por Beltramino *et al.*, (2000), pacientes não apresentaram efeitos tóxicos sobre o consumo de HMC durante 90 dias.

Ainda com relação a HMC, ela foi capaz de inibir o estresse oxidativo pela manutenção da capacidade antioxidante (FRAP, ABTS e GSH), inibindo a produção de ânion superóxido e peroxidação lipídica (RUIZ-MIYAZAWA, *et al.*, 2018).

Desta forma, considerando as características antioxidantes e anti-inflamatórias da HMC, justifica-se a aplicação tópica deste flavonoide em modelo de queimadura experimental. Essa via de administração foi escolhida, pois o tratamento tópico é muito

utilizado em virtude da obstrução vascular ocasionada pela lesão térmica, que dificulta a chegada de antimicrobianos e de componentes celulares do sistema imune na área queimada (MACEDO *et al.*, 2005).

2.7 SISTEMAS TERMOSENSÍVEIS

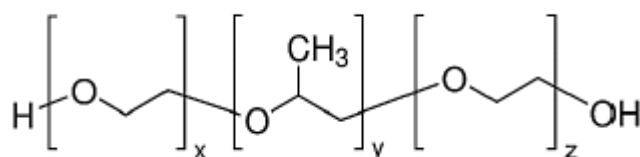
Atualmente muitos pesquisadores estão investindo em desenvolvimento de novos sistemas de administração de fármacos com o objetivo de direcionar o medicamento para um local específico de ação, com intuito de alcançar uma liberação controlada do princípio ativo com cinética de liberação preferível (SILVA, 2017). Assim, existem polímeros “inteligentes” ou polímeros *stimuli-responsive*, que possuem respostas a alterações do ambiente, sofrendo modificações reversíveis na sua microestrutura e em suas propriedades físico-químicas de acordo com o objetivo desejado (KIRCHHOF; GOEPFERICH; BRANDL, 2015). Desta forma, o desenvolvimento de hidrogéis usando polímero termo responsivos tem despertado muito interesse pela comunidade científica (HANI; SHIVAKUMAR, 2013).

Esses sistemas de gelificação comportam-se de maneira diferente de acordo com a temperatura. Dessa forma, a estrutura de polímeros termossensíveis apresenta um equilíbrio entre os grupos hidrofóbicos, o polioxipropileno (PPO) e, hidrofílicos, o polioxietileno (PEO). Assim, uma pequena alteração na temperatura pode gerar um novo ajuste nas interações químicas entre os blocos de polímero e moléculas de água, modificando sua característica de gel para líquido ou vice versa (BAJPAL *et al.*, 2008). Tais modificações ocorrem, pois em determinada temperatura ocorre a dispersão polimérica resultando em separação de fases, sendo classificada como temperatura de solução crítica (CST – *critical solution temperature*). Logo, abaixo da CST, há a LCST (“*lower critical solution temperature*”) na qual os polímeros são solúveis em água e, acima da CST, se tornam hidrofóbicos e insolúveis, formando uma dispersão gelatinosa (BROMBERG; RON, 1998; PEPPAS, 2000).

Nesse contexto, existe o Poloxamer 407 (P407), conhecido como Pluronic® F-127 (figura 6), um copolímero muito usado para obtenção de sistemas termossensíveis. Ele constitui um grupo de copolímeros de tribloco, não iônicos, formados por um bloco hidrofóbico com unidade de PPO e dois blocos hidrofílicos com unidades de PEO (DEVI, SANDHYA, HARI, 2013; KAROLEWICZ, 2015). O P407 é sensível a concentração, assim, quando está baixa, ele é capaz de formar micelas, e gel

termicamente reversível em concentrações elevadas (ALVES, 2016).

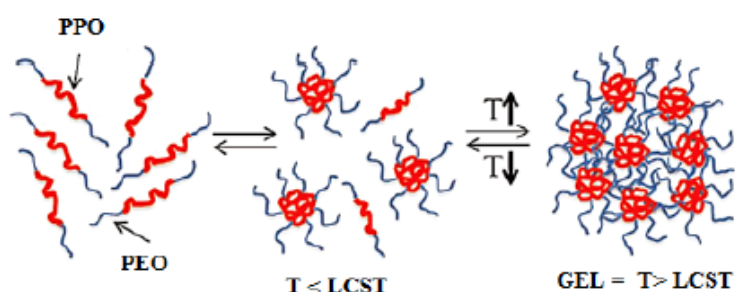
Figura 6: Estrutura Química do Poloxamer 407



Fonte: Sigma – Aldrich

O efeito de gelificação do P407 é definido por uma temperatura específica de transição $T_{\text{sol-gel}}$ e a formação desse gel pode ser revertida com a diminuição da temperatura. A termogelificação é resultado da interação de diferentes segmentos do copolímero. Assim, quando ocorre o aumento da temperatura há agregação em micelas e esta micelização é resultado da desidratação dos blocos de PPO, os quais são hidrofóbicos, padronizando a primeira fase no processo de gelificação. As micelas apresentam em seu interior um núcleo de PPO desidratado recoberta por cadeias de PEO hidratadas. O processo de micelização ocorre, pois as micelas entram em contato entre si formando uma estrutura altamente ordenada, resultando na formação do gel (Figura 7). Porém, o mecanismo real dessa gelificação ainda é controverso (DUMORTIER *et al.*, 2006; KOFFI *et al.*, 2006; RUEL-GARIÉPY *et al.*, 2004; JUNG *et al.*, 2017).

Figura 7: Processo de micelização do Poloxamer 407



Fonte: SILVA, 2017

Por essas propriedades termossensíveis, esse tipo de polímero é uma potencial matéria prima para o desenvolvimento de sistemas para administração de medicamentos por via tópica (CARMELLA *et al.*, 2015; DEWAN *et al.*, 2017).

Em adição, Pluronic F127 com a fórmula de PEO₁₀₀PPO₆₅PEO₁₀₀ (poloxamer 407) juntamente com o Pluronic F68 com a fórmula de PEO₇₆PPO₂₉PEO₇₆, conhecido como poloxamer 188, são os dois tipos de poloxamers que promovem proteção as células e administração de medicamentos (ERUKOVA *et al.*, 2000; MURHAMMER, GOOCHE, 1990). F68 e F127 demonstraram melhorar o processo de cicatrização de feridas regulando a síntese de fatores de inflamação e crescimento (KANT *et al.*, 2013; YUHUA *et al.*, 2012). Além disso, o F127 foi utilizado para o tratamento de feridas causadas por queimaduras (NALBANDIAN *et al.*, 1987).

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da Hesperidina metil chalcona, adicionada em formulações tópica de gel termorreversível, em lesões cutâneas induzidas por queimadura térmica utilizando camundongos sem pelo, visando uma possível alternativa de tratamento para reduzir a inflamação e ao mesmo tempo neutralizar a geração de oxidantes tóxicos na pele lesionada.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Preparo do gel termorreversível utilizando o polímero Poloxamer® 407 adicionado de HMC;
- Caracterização físico-química do gel por meio da análise de pH, teste de espalhabilidade, densidade relativa, temperatura de gelificação, viscosidade e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
- Avaliação da atividade sequestradora do radical livre ABTS da HMC e do gel P407+HMC;
- Padronização da queimadura por meio de haste aquecida em água quente em camundongos sem pelo;
- Tratamento e avaliação do efeito tópico do gel P407+ HMC na contração da queimadura;
- Tratamento e avaliação do efeito tópico do gel P407+ HMC nos danos oxidativos e inflamatórios causados pela queimadura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1 Materiais de Consumo

Poloxamer 407 foi obtido da Fragon-BR. Glutathiona reduzida (GSH), brometo de hexadecil trietil amônio (HTAB), *o*-dianisidina, 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), bisacrilamida, *nitroblue tetrazolium* (NBT) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hesperidina metil chalcona foi obtida da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA). Hidroximetil aminometano (Tris) foi obtido da Amresco (Solon, OH, USA). Os excipientes usados para o preparo das formulações foram obtidos da Galena (Campinas, SP, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico. A Ketamina (Dopalen®) e Xilasina (Dopaser®) foram adquiridos mediante receituário Médico Veterinário, após aprovação do projeto, em Casa Agropecuária (Ribeirão Claro, PR, Brasil) e o Paracetamol foi adquirido em farmácia comercial (Londrina, PR, Brasil).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Obtenção do Gel Termorreversível Contendo HMC

O gel de Pluronic® 127 (poloxamer 407), um copolímero em bloco do óxido de etileno e óxido de propileno, foi preparado como descrito na literatura (FERREIRA, 2010). O polímero foi lentamente pulverizado em água purificada previamente gelada (5°C) sob constante agitação que foi mantida por 1 hora até a obtenção de uma solução clara. A solução límpida e transparente foi mantida em refrigeração por 12h, sendo em seguida incorporado o flavonoide HMC na concentração de 1% utilizando propilenoglicol (5%) como solubilizante e umectante da formulação (Tabela 1). O gel foi mantido em geladeira a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ para realização dos testes *in vitro* e *in vivo*.

Tabela 1: Formulação do gel termorreversível contendo HMC

Componente	Quantidade (%)
Poloxamer 407(Pluronic®P127)	20
Sorbato de Potássio	0,2
Propilenoglicol	5
HMC	1,0
Água purificada	qsp 100mL

Fonte: Autora

4.2.2 Avaliação das Características Físico-Químicas do gel

4.2.2.1 Determinação pH

O pH das formulações foi avaliado utilizando um potenciômetro digital com eletrodo de vidro e sensor de temperatura da marca Marte®, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Para realização da análise, 1 g das amostras foram dispersadas em 9mL de água purificada e homogeneizadas em agitador magnético por 2 minutos (PIANA *et al.*, 2013, GEORGETTI *et al.*, 2006). As determinações foram realizadas em triplicata.

4.2.2.2 Determinação da densidade relativa

A determinação da densidade relativa foi realizada utilizando-se o método do picnômetro, segundo Farmacopéia Brasileira 6ª. Edição (ANVISA, 2019). Para tanto foi utilizado picnômetro com capacidade total de 10mL e água purificada como líquido referência. Os valores foram obtidos em triplicata.

Primeiramente, pesou-se o picnômetro vazio, logo após pesou-se o mesmo com água purificada e depois com a amostra. A partir de então foi realizado o cálculo da densidade da água e da densidade da amostra para, em seguida, fazer-se o cálculo da densidade relativa através da equação (ANVISA 2010; CÉSAR; PAOLI; ANDRADE, 2018):

$$P_{\text{amostra}} = m_{\text{amostra}}/m_{\text{água}} \text{ (Eq. 1)}$$

- $m_{\text{amostra}} = m_2 - m_1$ é a massa da amostra em questão que ocupa o volume V

do picnômetro

- $m_{\text{água}} = m_3 - m_1$, é a massa da água pura que ocupam o mesmo volume V .
- m_1 a massa do picnômetro vazio;
- m_2 a massa do picnômetro cheio com a amostra;
- m_3 a massa do picnômetro cheio de água pura;

4.2.2.3 Determinação da espalhabilidade

A espalhabilidade refere-se à expansão de um componente sobre uma superfície e se baseia na resistência ao movimento forçado. O Índice de Espalhabilidade é definido como a área de espalhamento na pele (mm^2) com a força aplicada sobre o produto (minutos) (BORGHETTI; KNORST, 2006).

Uma lâmina de vidro foi posicionada sobre um papel milimetrado, no qual foi traçado todos os lados da lâmina a fim de indicar o ponto central. Foi adicionado 0,5g de amostra no centro da lâmina e, posteriormente, adicionou-se outra lâmina de peso determinado suavemente em cima da amostra. Após 1 minuto, anotou-se o diâmetro do círculo (mm) formado pelo espalhamento da amostra com um auxílio de uma régua. O mesmo procedimento foi repetido em intervalos de 1 minuto, adicionando-se pesos aferidos de 2g, 4g, e 10g sobre a lâmina de vidro. Igualmente, promoveu-se a determinação da espalhabilidade do gel sem ativo. O teste foi realizado a temperatura ambiente e em triplicata.

Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, de acordo com a seguinte equação (BORGHETTI; KNORST, 2006; ISAAC *et al.*, 2008):

$$E_i = d^2 \cdot \pi / 4 \text{ (Eq. 2)}$$

E_i = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm^2);

d = diâmetro médio (mm).

4.2.2.4 Determinação da temperatura de transição sol-gel pelo método do tubo invertido

A temperatura de T sol-gel foi realizada através do método de inclinação do tubo de ensaio, no qual 2 mL das amostras foram incubadas em banho de água a 0°C por 20 minutos, posteriormente a temperatura foi aumentada em 2°C , gradativamente, até 60°C , onde os géis foram incubados por 1 minuto a cada temperatura. A

temperatura de gelificação foi determinada no momento em que a solução no tubo de vidro parou de fluir quando submetida a inversão, sendo classificadas em três grupos (DEWAN *et al.*, 2015; ZENG *et al.*, 2014):

- Líquida: inversão completa da amostra no sentido da gravidade;
- *Soft gel*: Inversão lenta da amostra no sentido da gravidade, onde parte permanece no fundo do tubo;
- *Hard gel*: amostra permanece totalmente posicionada no fundo do tubo, mesmo após a inversão.

4.2.2.5 Determinação da viscosidade em função da temperatura

A análise da viscosidade foi realizada utilizando um reômetro rotativo digital Brookfield R/S plus Rheometer com sensor cone-placa de 50mm de diâmetro e 1° de angulatura. Utilizou-se uma taxa de cisalhamento constante de 20 s⁻¹, variando a temperatura de 5 a 40 °C, com objetivo de verificar o aumento da viscosidade em função da temperatura e, assim, determinar o momento de transição sol-gel através da mudança drástica na viscosidade (MAZIA *et al.*, 2016).

4.2.2.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização termoanalítica foi realizada utilizando DSC (Thermal Analyzer TA 60W – Shimadzu DSC-60, Kyoto, Japão) em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50mL/min, na faixa de aquecimento de 25 – 300°C, sob uma razão de aquecimento de 10°C/min. As amostras de hidrogéis termorresponsivos foram previamente secas a temperatura ambiente em dessecador. A matéria-prima HMC também foi colocada nas mesmas condições dos géis. A massa de amostra empregada para análise de DSC foi de aproximadamente 2 mg.

4.2.2.7 Determinação da atividade sequestradora do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico)

A capacidade redutora do radical livre ABTS é medida pela supressão da cor do radical devido à diminuição do mesmo no meio e conseqüente queda de

absorvância, quando substâncias antioxidantes com capacidade em doar elétrons são adicionadas (VIGNOLI, BASSOLI, BENASSI, 2011). O método foi realizado de acordo com Sánchez-Gonzalez *et al.* (2005), com algumas modificações.

A formação do cátion radical ABTS foi realizada por meio da reação de 7mM da solução ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) (PASQUINETTO *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2011). A mistura foi armazenada em frasco âmbar e em geladeira por no mínimo 16 horas antes do uso. Posteriormente, a solução de radical ABTS foi diluída com tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) até apresentar uma absorvância de 0,700 a 0,800 em 730 nm. Amostras foram preparadas por meio de diluições em etanol para alcançar no meio reacional concentrações de 1,56 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Para a análise, foram adicionados 50 μL de cada amostra em 2 mL de solução de radical ABTS diluído. O branco foi preparado com uma solução de persulfato de potássio diluída em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) e um controle positivo foi feito com 50 μL de etanol em 2 mL de solução ABTS. Após 6 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorvância em 720 nm espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer).

Para avaliação da atividade sequestradora da HMC após incorporação no gel termorreversível, pesou-se 1,5g do mesmo diluíu em 10mL de etanol. Após, foi agitado por 10 minutos em agitador magnético e 5 minutos em vórtex. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em geladeira por 24 horas e centrifugadas por 20 minutos a 3600 g. Alíquotas dos sobrenadantes foram retiradas e filtradas em millipore de 0,45 μm e, em seguida, foram diluídas de forma a se obter a mesma concentração de ativo no meio reacional que a matéria-prima livre, a qual foi de próxima do valor de IC_{50} determinado (18,75 $\mu\text{g/mL}$). O controle positivo para a formulação foi composto da solução de ABTS e gel sem adição de HMC que sofreu o mesmo processo de preparo do gel aditivado.

4.2.3 Avaliação da Eficácia *in vivo* da Hesperidina Metil Chalcona Incorporado em Formulação a Base de Poloxamer 407

4.2.3.1 Animais experimentais

Como modelo animal foi utilizado camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, do sexo masculino, adultos e com peso de 20 a 30 g. Os animais foram mantidos no

biotério do Hospital Universitário de Londrina-PR, em sala com temperatura controlada, ciclo claro/escuro de 12 horas e com suprimento de água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram conduzidos conforme as normas da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (OF.CIRC.CEUA nº 71/2018, processo nº 7078.2018.60).

4.2.3.2 Padronização do modelo de indução de lesões cutâneas através de queimadura térmica em camundongos *hairless*

Para realização dos experimentos foram utilizados camundongos sem pelos, machos, os quais foram subdivididos em grupos contendo 5 animais cada, para todos os experimentos. Primeiramente, foi analisado macroscopicamente o tempo de indução da queimadura para os grupos 3, 6 e 9 segundos. Posteriormente, utilizando o tempo previamente estabelecido de 3s foi avaliado o tempo de coleta da pele após lesão nos tempos de 24 horas, 48 horas e 72 horas. A indução da queimadura foi realizada no dorso dos animais, que foram previamente anestesiados com Quetamina 90mg/kg e Xilasina 10 mg/kg via intraperitoneal (CAMPELO, 2018). Para analgesia, utilizou-se paracetamol de 500mg na proporção de um comprimido triturado e dissolvido em 500 mL de água potável, consumida por via oral, no bebedouro, durante as primeiras 24 horas de pós-queimadura (ROCHA, 2010). A assepsia foi feita com álcool 70% e a queimadura realizada com molde de ferro, no qual foi acoplado na extremidade da haste uma placa fina retangular com superfície de contato de 1cm x 2cm. A extremidade foi mantida em contato por 3 minutos em água na temperatura de 100°C, monitorada por termômetro (BATHIA *et al.*, 2016). Posteriormente, o molde de ferro foi colocado verticalmente em contato com a pele dos animais, sem pressão adicional por tempo de contato estabelecido 3s cronometrado (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017). Imediatamente após cada queimadura, a área foi resfriada com aplicação de gaze estéril umedecida com solução fisiológica. Os animais receberam apenas uma área de queimadura para análise macroscópica comparativa das lesões nos diferentes tempos de contato de 3, 6 e 9s. Posteriormente, nos testes com tempo de contato estabelecido de 3s os animais receberam 2 áreas de queimadura com intervalo de pele não lesionada para representar a zona de estase. Os mesmos foram terminalmente eutanasiados com isoflurano a 3% e as peles queimadas e não queimadas foram coletadas cirurgicamente. A retirada do tecido foi realizada somente

na região da pele lesionada pela queimadura, sem margem livre. As amostras foram mantidas resfriadas e, posteriormente, congeladas a -80°C para procedimentos e análises. O ensaio de edema foi realizado imediatamente após extração das peles.

4.2.3.3 Protocolo de Avaliação da Eficácia do Gel Termossensível P407+ HMC

Os animais foram alocados aleatoriamente em cinco grupos (n= 5). Sendo:

Tabela 2: Agrupamento, nomenclatura e tratamento dos animais

Grupo (n=5)	Tratamento
CN	Controle não queimado e sem tratamento
CQ	Controle queimado e sem tratamento
CS	Controle queimado e tratado com Sulfadiazina de Prata 1%
CB	Controle queimado e tratado com formulação base de poloxamer 407
HMC	Controle queimado e tratado com formulação base de poloxamer 407 adicionada HMC 1%

Fonte: Autora

Os animais foram tratados topicamente de 8/8h por 48h, nas áreas queimadas, com 200 μL de formulação, com ou sem ativo HMC, administrada com o auxílio de uma pipeta. Em adição, para grupos tratados com Sulfadiazina de Prata 1%, pesou-se 0,2 g do creme. As formulações foram espalhadas nas áreas previamente lesionadas com auxílio de um pincel após o término da queimadura. A indução da queimadura foi realizada nos tempos de 3s e a coleta das peles após 48h. Os animais foram eutanasiados com isoflurano a 3%, a pele queimada e não queimada do dorso dos animais foi retirada, limpa, lavada com NaCl 145 mM e armazenadas a -80°C para as análises subsequentes. A análise do edema cutâneo foi realizada imediatamente após a eutanásia dos animais. Estes foram divididos em grupos com 5 animais e o experimento foi repetido 1 vez.

4.2.3.4 Análise macroscópica da redução da lesão térmica

Para avaliação da área da lesão e sua redução, foram realizadas fotografias, logo após a indução das queimaduras, nos dias 5, 10 e 15, sendo os camundongos, posicionados em decúbito ventral, dos grupos não tratados e tratados. As imagens foram obtidas com câmera de celular (Iphone 7 plus), montada em tripé com distância padronizada de 10cm do dorso do animal (CAMPELO, 2018). As queimaduras foram analisadas clinicamente quanto a qualidade e a extensão da cicatrização (BEAUSANG *et al.*, 1998) após tratamento dos grupos CS, CB e HMC ser realizado de 8/8h.

4.2.3.5 Avaliação do edema cutâneo

As amostras de pele dos diferentes grupos foram coletadas com auxílio de um molde com área fixa com área fixa de 5 mm de diâmetro para avaliação do edema e este foi mensurado pela variação do peso de pele, comparando os diferentes grupos (BHATIA *et al.*, 2011; CAMPANINI *et al.*, 2013, MARTINEZ *et al.*, 2015). Assim, o efeito dos tratamentos no edema cutâneo causado pela queimadura térmica foram expressos em mg de pele.

4.2.3.6 Determinação da atividade de mieloperoxidase (recrutamento de neutrófilos)

A quantificação da migração de neutrófilos para a pele induzida por queimadura térmica foi determinada indiretamente pela atividade da enzima MPO. Neste método, a MPO catalisa a oxidação do substrato *o*-dianisidina, resultando em um composto colorido que é detectado espectrofotometricamente em 450 nm (CASAGRANDE *et al.*, 2006). As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos foram coletadas em microtubos contendo 400 µL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil amônio (HTAB), homogeneizadas com auxílio Tissue-Tearor (Biospec 985370). O homogenato foi centrifugado a 16.100g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado para o ensaio (30 µL). A alíquota do sobrenadante foi adicionada a um poço em uma microplaca de 96 poços, sendo adicionados posteriormente 200 µL de uma solução contendo 10% de tampão fosfato 0,05M (pH 6,0), 0,0167% de *o*-dianisidina e 0,05% de H₂O₂ em água deionizada. Após 20 minutos

de reação a atividade da MPO das amostras foi determinada em 450 nm (Asys Expert Plus, Biochrom) e comparada com uma curva padrão de neutrófilos de concentração conhecida. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos/mg de pele (BRADLEY *et al.*, 1982; CAMPANINI *et al.*, 2013; IVAN *et al.*, 2014).

4.2.3.7 Avaliação dos níveis do antioxidante endógeno GSH

As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos foram coletadas em microtubos, diluídas (1:4) em EDTA 0,02M e trituradas com auxílio Tissue-Tearor (Biospec 985370). Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50% na proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. A mistura foi centrifugada a 2.700g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 2.700g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante final foi retirado para análise. Para o ensaio de quantificação dos níveis de GSH na pele foram adicionados 50 µL do último sobrenadante em microplaca com o meio reacional contendo 100 µL de tampão Tris 0,4M (pH 8,9) e 5 µL de uma solução de 1,9 mg/mL de DTNB em metanol. Após 5 minutos de incubação, a leitura da microplaca foi realizada no espectrofotômetro (EnSpire, Perkin Elmer) em 405 nm. Foi preparada uma curva padrão com 5 a 150 µM de GSH. Os resultados foram expressos em µM de GSH/mg de pele (SRINIVASAN *et al.*, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2015).

4.2.3.8 Avaliação da atividade da CAT

O método é baseado no decaimento da concentração de H₂O₂ que é diretamente proporcional a diminuição da absorbância a 240 nm. A diferença de absorbância por unidade de tempo é a medida da atividade da catalase (AEBI, 1984). As amostras de pele dos animais foram coletadas em microtubos e diluídas em 500 µL de EDTA 0,02 M. Em seguida, foram trituradas com auxílio Tissue-Tearor (Biospec 985370) e o homogenato foi centrifugado a 2.700 g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi novamente centrifugado a 2.700 g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante final foi retirado para análise. A determinação da atividade da CAT na pele foi realizada em microplaca de 96 poços por meio da adição de 10 µL de amostra, 160 µL de tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0, 20 µL de água deionizada e 20 µL de H₂O₂ 200 mM. Foi incluído um branco para cada amostra

preparado com 10 µL do sobrenadante da amostra, 180 µL de tampão Tris-HCl 1M com EDTA 5 mM pH 8,0 e 20 µL de água deionizada. A velocidade com que o H₂O₂ é reduzido pela ação da CAT foi analisada por meio da diminuição no valor da absorbância pela diferença entre a leitura inicial e a leitura 30 segundos após a adição do H₂O₂ 200 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (EnSpire, Perkin Elmer) em 240 nm com temperatura mantida em 25 °C. Os valores de CAT foram expressos como unidade de catalase/mg de pele/minuto (MARTINEZ *et al.*, 2015, SAITO *et al.*, 2018).

4.2.3.9 Avaliação da produção de ânion superóxido

A produção do ânion superóxido foi avaliada pela sua capacidade de redução de *nitroblue tetrazolium* (CAMPANINI *et al.*, 2013). As amostras de pele foram homogeneizadas com o Tissue-Tearor (Biospec 985370) em 500 µL EDTA 0,02 M e centrifugadas (2000 g por 20 segundos a 4°C). Para a reação, o sobrenadante (50 µL) foi incubado em microplaca por 1 hora para fixação das células. Em seguida, o sobrenadante foi removido e NBT foi adicionado (1 mg/mL) às células fixadas. Após 15 minutos, o NBT foi cuidadosamente removido e ao precipitado foram adicionados 20 µL de metanol 100% para fixação. O composto formado pela redução do NBT pelo ânion superóxido (Formazan) foi solubilizado com 120 µL de KOH 2M e 140 µL de dimetilsufóxido (DMSO). A redução do NBT para formazan foi medida em espectrofotômetro de microplacas (EnSpire, Perkin Elmer) a 620 nm e os resultados foram apresentados como densidade óptica (DO)/10 mg de pele (SAITO *et al.*, 2018).

4.2.3.10 Avaliação do poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) na pele

As amostras de pele dos animais foram coletadas em microtubos contendo 500 µL de KCl 1,15%. No início do ensaio, as amostras foram trituradas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370). Em seguida, foram centrifugadas a 1.000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado para a análise. Para a reação foram adicionados em microplaca contendo 96 poços, 30 µL do sobrenadante e 150 µL de reagente FRAP. O branco foi preparado com 30 µL de KCl a 1,15% e 150 µL do reagente de FRAP. O reagente de FRAP foi preparado adicionando 2,5 mL de uma solução 10 mM de 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) em HCl

40 mM com 2,5 mL de cloreto de ferro hexahidratado 20mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3.6), e esta solução foi incubada a 37°C por 30 min antes do uso e posteriormente foi realizada a leitura da microplaca em espectrofotômetro a 595 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Soluções padrão com diferentes concentrações de Trolox (0,5-20 nmol) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como nmol equivalente de Trolox/mg de pele (KATALINIC *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.*, 2018).

4.2.3.11 Avaliação do poder antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical 2,2',azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

As amostras de pele dos animais (aproximadamente 30 mg) foram coletadas em microtubos contendo 500 µL de KCl 1,15%. No início do ensaio, as amostras foram trituradas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370). Em seguida, foram centrifugadas (Hettich Zentrifugen®) a 1.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado para a análise. Para a reação foi adicionado 7 µL do sobrenadante a 200uL de solução de ABTS diluída. O branco formado somente por tampão. A solução do cátion radical ABTS foi produzida como descrito no item 4.2.2.7. A solução ABTS para uso na reação foi diluída com tampão fosfato (pH 7,4) até uma absorvância de 0,700 a 0,800 em 730 nm, em seguida a leitura da reação foi realizada em 730 nm. Soluções padrão com diferentes concentrações de trolox (1 a 25 nmol) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como nmol Trolox/mg de pele (KATALINIC *et al.*, 2005; CAMPANINI *et al.*, 2014).

4.2.3.12 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram analisados pelo software GraphPad Prism®, versão 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA) e expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

Os resultados *in vitro* foram apresentados de mensurações feitas em triplicata. A concentração da HMC necessária para sequestrar o radical livre em 50% (IC₅₀) foi estimada por meio de uma curva hiperbólica. A avaliação de possíveis interferentes da formulação na atividade antioxidante da HMC foi analisada utilizando-se *t-test*.

Os resultados *in vivo* foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) com um fator seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM) de mensurações feitas com 5 animais em cada grupo e representativos de 2 experimentos separados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DO GEL TERMORREVERSÍVEL P407+ HMC

Habitualmente o tratamento de lesões cutâneas, como queimaduras é realizado com formas farmacêuticas usuais, entre elas, agentes tópicos, como pomadas, cremes e géis, soluções e substitutos temporários de pele. Além disso, a localização, profundidade, extensão, presença ou não de infecção, agente causador do trauma, presença de comorbidades, faixa etária influenciarão na escolha do tratamento (FERREIRA *et al.*, 2003).

Os hidrogéis termicamente responsivos tem sido amplamente investigados por causa de sua aplicação simples e reações adversas baixas nos tecidos em comparação com outros compostos utilizados como solubilizadores (ex. Cremophor® EL) (RUEL-GARIÉPY *et al.*, 2004). Acima de uma certa concentração, eles se apresentam como uma solução à temperatura ambiente de 25°C, e em determinada temperatura, como por exemplo na temperatura corporal se comportam como gel (CARAMELLA *et al.*, 2015). Estes sistemas têm uma propriedade reversível de transição de estado o que permite, quando na forma de solução, facilidade de aplicação e distribuição no local de aplicação. No entanto, quando a temperatura aumenta, as formulações exibem aumento na viscosidade e tempo de retenção no local da administração, para o período de tempo desejado (KLOUDA, 2015). Dessa forma, considerando sua característica termossensível agregado a sua baixa toxicidade impulsiona pesquisas sobre o uso do P407 como um possível sistema de administração de fármacos (GILBERT *et al.*, 1986).

Dessa forma, partindo de estudos anteriores (RUIZ-MIYAZAWA, *et al.*, 2018; MARTINEZ *et al.*, 2016; WALLE, 2007) sobre as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias da HMC, este estudo utilizou um polímero termorresponsivo (P407) a 20% como veículo para obtenção de uma forma farmacêutica adicionada de 1% de HMC, visando aplicação em lesões na pele causadas por queimaduras que proporcione maior comodidade e adesão do paciente. Vale ressaltar que a concentração utilizada de HMC foi escolhida mediante estudo prévio realizado por Martinez *et al.*, (2016).

Contudo, a formulação apropriada de uma forma farmacêutica requer a consideração das suas características físicas, químicas e biológicas (BUGNOTTO *et*

al., 2006). Sendo assim, as formulações preparadas foram submetidas à avaliação de pH, o qual é importante tanto para a estabilidade da formulação, quanto para a sua compatibilidade com a pele (RODRIGUES, 1997; GEORGETTI *et al.*, 2006). Sabe-se que o pH da pele é geralmente ácido, mas o valor exato depende do local a ser analisado, e este está relacionado com a densidade das glândulas sudoríparas (SILVA, 2012). Os resultados dos testes físico-químico de pH revelaram que o P407 apresentou um valor de pH de $6,94 \pm 0,01$, e após a incorporação da HMC houve uma pequena diminuição do valor para $6,00 \pm 0,015$. Esse valor permaneceu próximo ao pH da pele, o que é ideal para um tratamento tópico em pele queimada, a qual perdeu sua integridade e o desequilíbrio do pH possibilita a colonização da lesão por micro-organismos (FERNANDES, RIBEIRO-FILHO, 2000). Segundo, Schneider *et al.*, (2007) diferentes faixas de pH são essenciais para as diversas fases da cicatrização, relatando a complexidade das alterações de pH nesse processo. Em adição, Kaufaman e Berger (1988), também avaliaram a relação entre cicatrização e pH tópico, onde a ferida pode ser curada por meio do controle, em partes, da alteração dos níveis de pH. Verificou-se que para avaliação terapêutica da cicatrização, o pH baixo é mais efetivo, enquanto os ambientes alcalinos estão relacionados a lesões crônicas (GETHIN, 2007; PERCIVAL *et al.*, 2014).

A densidade é representada pela relação entre a massa de uma substância e o volume que ela ocupa. No caso de líquidos ou semi-sólidos este parâmetro pode indicar a incorporação de ar ou a perda de ingredientes voláteis e água (ANVISA, 2010). Foi observado que ambas as amostras, de P407+HMC (1,0032g/mL) e P407 (1,00168g/mL) apresentaram densidade próxima a 1 g/mL e que a presença do ativo não alterou essa característica na formulação base. Em adição, os valores próximos da densidade da água encontrados para os géis, deve-se provavelmente pela grande proporção de água que compõe ambos os sistemas, de aproximadamente 80% (p/p).

Neto *et al.*, 2006, avaliaram a densidade de um gel preparado por uma mistura de 15% e 5% de P407 e Poloxamer 188, respectivamente, e verificaram um valor bem próximo ao que foi encontrado em nosso estudo, um valor médio de 1,01623 g/mL. Os mesmos também relataram que esses valores estabelecem uma relação importante quando do uso clínico, pois permitem a correlação entre a massa e o volume do gel presente, garantindo a dose adequada.

Outro teste realizado foi a análise da espalhabilidade da formulação contendo somente P407 e do mesmo adicionada de HMC com relação aos diferentes pesos

adicionados. O objetivo desse teste é determinar a capacidade que uma formulação possui de se espalhar quando submetida a uma força estipulada, procurando reproduzir as condições de esforço necessárias para a aplicação na pele (SPELLMEIER, 2005). Dessa forma, a espalhabilidade é um parâmetro importante para produtos de uso tópico. As representações gráficas da espalhabilidade, das formulações P407 e P407+HMC em função da massa aplicada (Figuras 8 A e B) revelou comportamentos semelhantes, ou seja, a adição do ativo não afetou essa característica física da base. Em adição, pode-se observar que a espalhabilidade dos géis aumentou à medida em que o peso foi adicionado, apresentando assim uma boa espalhabilidade, com capacidade de espalhar-se e abranger o local de ação.

Figura 8: Espalhabilidade da formulação P407 (Figura A) e formulação P407+HMC (Figura B) em relação ao peso adicionado.

Figura A

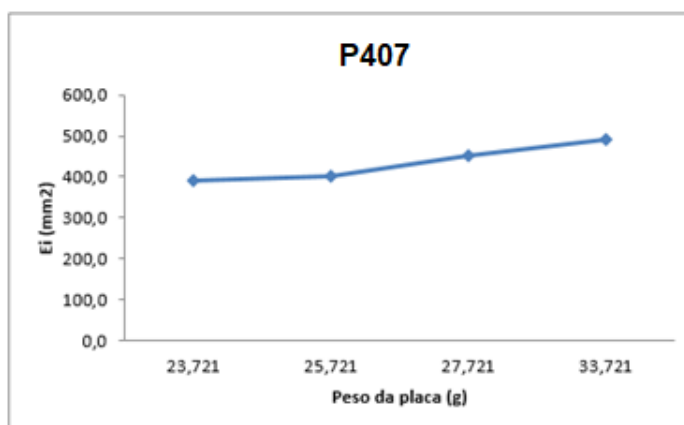
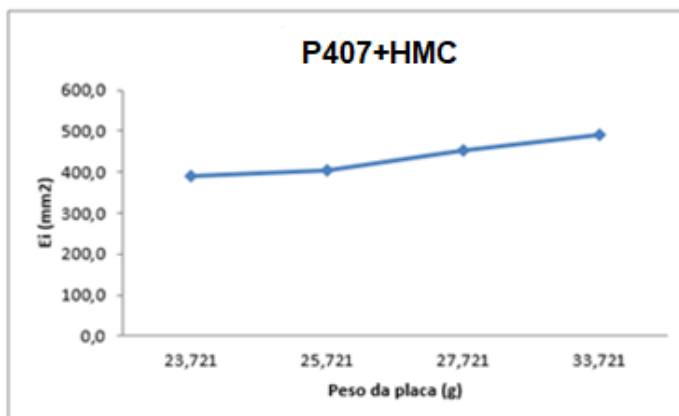


Figura B



Fonte: Autora

Em formulações semissólidas de uso tópico, a quantificação desse parâmetro

é importante para verificar modificações na capacidade que a formulação tem de se espalhar em determinada área, o que pode facilitar ou dificultar a sua aplicação, distribuição e/ou absorção através da pele (BORGHETTI; KNORST, 2006). Sendo assim, podemos concluir que a adição do flavonoide não alterou esse parâmetro do veículo que se mostra importante para a aplicação na pele após lesão térmica.

Também foi realizado a determinação da temperatura de transição sol-gel pelo método do tubo invertido, o qual é uma metodologia visual e, portanto, subjetiva, porém simples e de fácil execução (BHATTARAI *et al.*, 2005; CHUNG *et al.*, 2002). Moléculas de P407 apresentam reticulação em meio aquoso, o que transforma as dispersões de P407 em gel, cuja viscosidade aumenta com o aumento da temperatura (BALOGLU *et al.*, 2011), ou seja, é esperado que os géis termorreversíveis alterem suas fases de transição sol-gel próximo a temperatura corpórea (SHELKE *et al.*, 2015). A temperatura de transição sol-gel do P407 é influenciada pela concentração desse polímero em meio aquoso. Quando a temperatura de T_{sol-gel} é elevada, a formulação permanece no estado líquido na temperatura fisiológica (BALOGLU *et al.*, 2011).

Sugere-se que a razão de sua ocorrência seja graças à interação desfavorável entre a água e o grupo PPO a temperaturas mais elevadas, resultando na desidratação e encolhimento das coroas micelares (SONG *et al.*, 2000). Isto iria efetivamente diminuir o volume micelar e reduzir a fração de volume total para um valor inferior ao valor crítico (SHARMA e BHATIA, 2004).

Assim, foi realizada a avaliação da temperatura de gelificação pela inversão do tubo, sendo determinada como a temperatura de transição o momento em que a solução no tubo parou de fluir quando submetida a inversão (ALVES, 2016). Na Tabela 3 está demonstrado que a formulação base de P407 apresentou a fase gel a partir da temperatura de 22°C e a formulação do P407+ HMC indicou a formação do gel a partir da temperatura de 26°C. Uma das principais causas da gelificação nestes sistemas é devido a desidratação dos núcleos micelares (DUMORTIER *et al.*, 2006), assim o flavonoide poderia estar interagindo com o polímero de forma a alterar esse processo de desidratação das cadeias dos blocos hidrofóbicos de PPO levando a um aumento da T_{sol-gel}.

Tabela 3: Análise da temperatura de transição (Tsol-gel) entre as formulações P407 e a P407+HMC pelo Teste do tubo invertido

Formulações	Temperatura °C				
	0 - 8	10-14	16-20	22 - 24	26-60
P407	L	L	S	H	H
P407+HMC	L	S	S	S	H

Fonte: Autora - L: Líquido; S: Soft gel; H: Hard

Freitas *et al.*, 2006, verificaram que a temperatura de transição sol-gel da solução de Poloxamer 407 a 25% contendo nimesulida a 2% (15,81°C) foi maior que a da solução preparada na ausência do fármaco (13,14°C) e relatam que esse aumento não pode afetar o desempenho de gelificação da formulação para sua aplicação. Zhang *et al.*, (2014) verificaram que um gel de Poloxamer 407 preparado com 20% do polímero apresentou uma T_{sol-gel} de 21.50 ± 0.21 °C, enquanto que a adição de 10% do Poloxamer 188 forneceu uma aumento dessa temperatura para 31.68 ± 0.28. Pereira *et al.*, (2013) verificaram que o método empregado para análise da gelificação do P407, seja por teste visual ou pelo uso do reômetro, além da composição da formulação, podem influenciar no valor encontrado de T_{sol-gel}. Fakhari *et al.*, (2017), encontraram uma T_{sol-gel} para Poloxamer a 17,9% foi de 23.4 °C. Os mesmos autores verificaram que adição de concentrações crescentes de etanol no gel reduziu a T_{sol-gel}. Portanto, verifica-se que adição de ingredientes farmacêuticos ativos, sais, excipientes e outros compostos para as formulações à base de poloxamer 407 podem aumentar ou diminuir o T_{sol-gel} (DURMORTIER *et al.*, 2006).

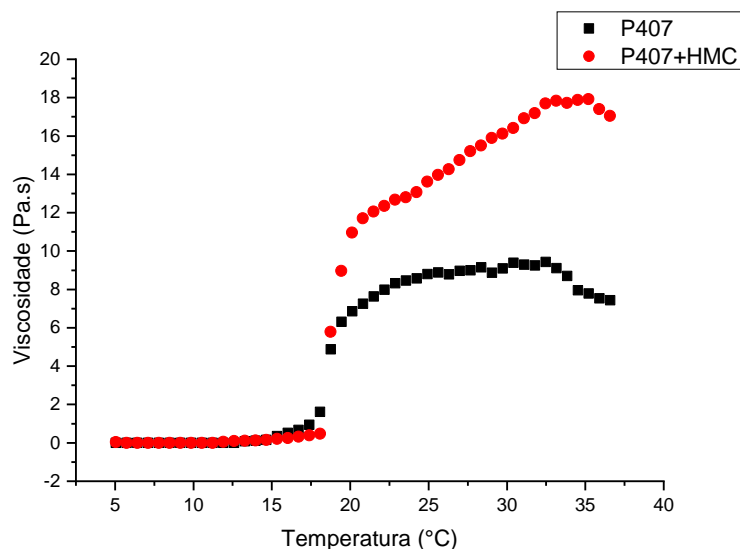
Como os resultados obtidos pelo método de tubo invertido não trazem valores exatos com relação a viscosidade da transição sol-gel foi realizado uma avaliação mais precisa da influência dessa temperatura utilizando um reômetro. As curvas de viscosidade *versus* temperatura de gelificação, como ponte de inflexão da curva está apresentado na figura 9. Assim, pode-se observar a influência do aumento da temperatura na viscosidade do gel termorresponsivo como do mesmo adicionado do ativo, ou seja, característica de formulação contendo P407 (KWEON *et al.*, 2003).

As micelas se organizam durante o aquecimento até atingir uma viscosidade

máxima, indicando a integridade do processo (BOFFITO *et al.*, 2016; KABANOV; BATRAKOVA; VALERY, 2002). Foi observado que com a elevação da temperatura, a viscosidade da solução de P407 aumenta e a temperatura em cuja viscosidade exibe um incremento significativo é observado como a temperatura de gelificação (AL KATHEB *et al.*, 2016).

Para aplicações farmacêuticas e biomédicas, sistemas poliméricos com Tso-gel a cerca de 25-37°C permitem a formação de gel quando a formulação é aquecida da temperatura ambiente para corporal (PUND; RASVE, BORADE2013; CHANG *et al.*, 2002). O estudo Tso-gel permite a seleção apropriada da formulação de acordo com a área de aplicação, tais como formulações de uso tópico, onde a temperatura corporal é mais baixa em comparação a administração parenteral, na qual a temperatura corpora é maior (SILVA *et al.*, 2020).

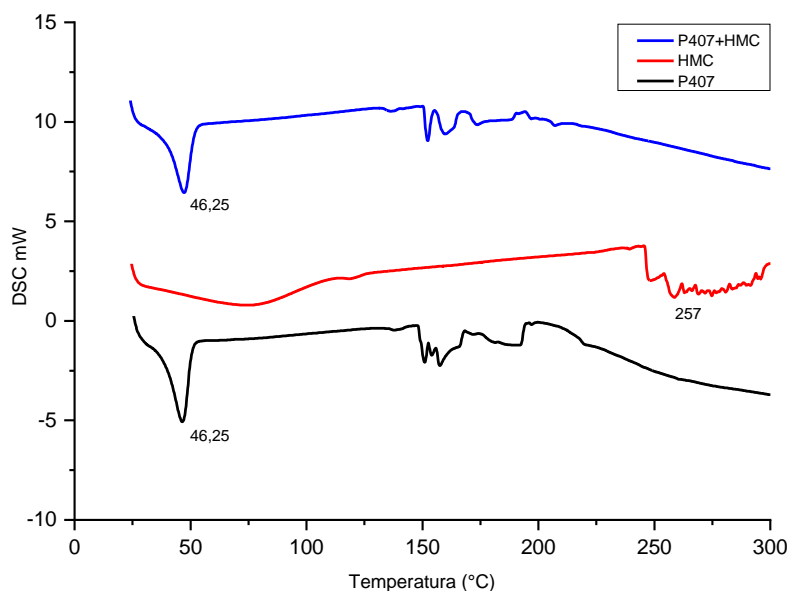
A análise dos resultados apresentados na figura 9 mostra que a viscosidade dos hidrogéis é baixa, na fase sol, na temperatura menor que 20°C. Para a formulação P407 o ponto de inflexão para Tso-gel inicia em 19°C e gelificando completamente em 32°C. Enquanto a formulação P407+HMC o ponto de inflexão para Tso-gel inicia em 20°C gelificando completamente em 35°C. A adição de 1% de HMC aumentou a viscosidade do hidrogel e alterou a Tso-gel e o perfil da curva (viscosidade x temperatura). Dados semelhantes da temperatura de gelificação foram encontrados por outros autores, sendo estas 36,56°C para P407 à 18% e 33°C para P407 à 20% (SILVA, 2017; ALVES, 2016).

Figura 9: Viscosidade *versus* temperatura das formulações P407 e P407+HMC

Fonte: Autora

A análise térmica das formulações foi realizada pelo método de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), onde foi verificado o ponto de fusão das formulações. Segundo, dados da literatura o P407 possui ponto de fusão entre 55° e 56°C, solúvel em água e na concentração 20% a 25°C é capaz de formar um gel rígido (SCHMOLKA, 1972; KWEON, 2002; ALVES, 2016). Assim, os resultados (figura 10) deste estudo indicam que a formulação contendo somente gel P407 apresentou ponto de fusão em 46,25°C. Essa diferença possivelmente pode ter ocorrido, devido a realização prévia da dessecação da formulação para viabilizar a análise e, assim, ocasionar esse deslocamento do pico endotérmico. Observou-se que a curva DSC da HMC obteve evento térmico em aproximadamente 257°C, não foram encontrados dados semelhantes na literatura sobre o ponto de fusão desse ativo, porém há relatos que a Hesperidina possui evento endotérmico de fusão com pico em 254,66°C (MAULUDIN; MÜLLER, 2013; ABDULLAH *et al.*, 2014; BORTOLON, 2018). Para a formulação P407+HMC é possível verificar que não há evento térmico da HMC, permanecendo somente o evento do poloxamer. Dessa forma, propõe-se que o desaparecimento do pico de HMC, pode estar relacionado à sua completa dispersão na formulação, bem como, a redução de sua cristalinidade, devido a mudança de estado sólido. Segundo, Alves (2016), a associação entre P407 e Curcumina também resultou no desaparecimento do evento térmico do ativo, devido a mudanças das propriedades físico-químicas, como a diminuição da cristalinidade.

Figura 10: Curvas termoanalíticas obtidas das formulações P407, HMC e P407+HMC.



Fonte: Autora

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DO RADICAL LIVRE ABTS PELA HMC

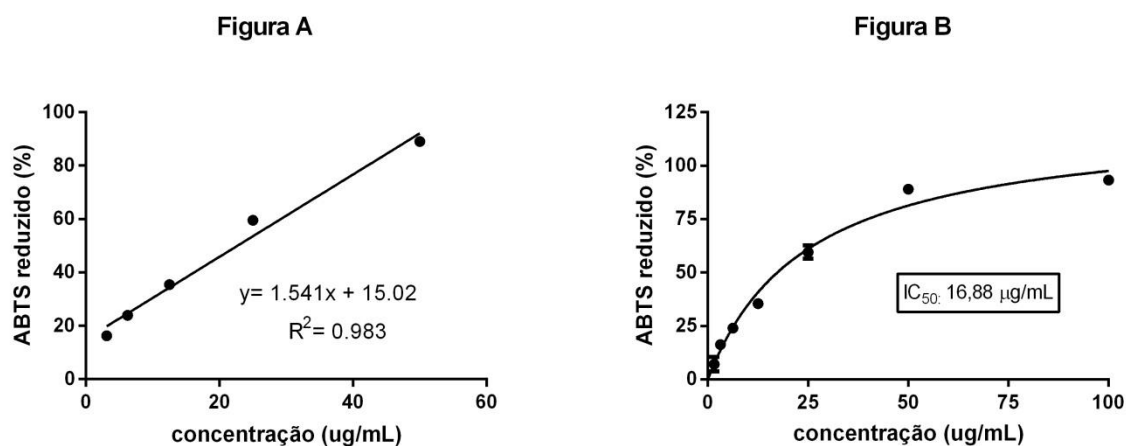
HMC, é um flavonoide antioxidante, muito usado para tratar pacientes com insuficiência venosa crônica e hemorróidas agudas, também há relatos da sua influência no aumento de defesas endógenas cutâneas contra o estresse oxidativo, bem como a manutenção da capacidade antioxidante global da pele (BELTRAMINO; PEENORY; BUCETA, 2000; KIRTLEY; PECK, 1948; GUEx *et al.*, 2010; MARTINEZ, *et al.*, 2016; RUIZ-MIYAZAWA, *et al.*, 2018). Assim, foi avaliado a capacidade antioxidante da HMC livre e após incorporação no gel de P407 pelo método de doação de elétrons ao radical livre ABTS.

O radical ABTS necessita ser gerado antes por reações químicas (persulfato de potássio) ou enzimáticas, que irão reagir com o cromógeno ABTS de coloração azul esverdeado claro, gerando o radical ABTS de coloração esverdeada escuro. O radical ABTS é bastante estável e é solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise tanto de amostras hidrofílicas como lipofílicas. Na medida em que o antioxidante é misturado com esse radical, ocorre a redução do radical, provocando a perda da coloração do meio reacional, podendo ser lido em comprimento de onda

de 730 nm (SANCHEZ-GONZALEZ *et al.*, 2005).

A capacidade sequestradora do radical ABTS pelo HMC foi concentração-dependente de acordo com resultados obtidos. A linearidade apresentou-se entre 3,13 – 50,0 µg/mL, com R^2 de 0,983 (Figura 11A). A atividade máxima encontrada para o ativo na concentração de 50 µg/mL no meio reacional, apresentou valor de 89,06% alcançando posteriormente um platô. O valor de IC_{50} encontrado para o flavonoide foi de 16,88 µg/mL (Figura 11B). Martinez *et al.*, (2016), também avaliaram a atividade antioxidante da HMC por ensaio de ABTS e encontraram valor muito próximo de IC_{50} (19 µg/mL).

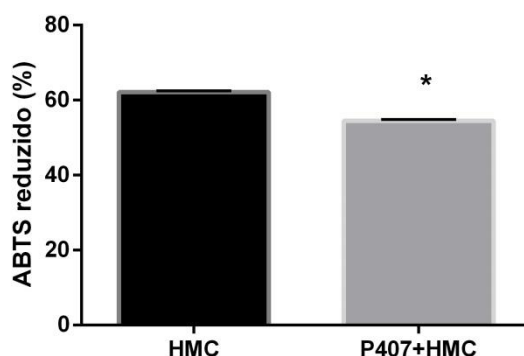
Figura 11: Atividade doadora de elétrons ao radical livre ABTS



Linearidade representada pela figura A e curva concentração-resposta da HMC na figura B. Os resultados são representados pela média±EPM.

Verificou-se a capacidade sequestradora de radical da P407+HMC. Para tanto, um controle adicionado da base sem ativo foi utilizado para verificar se a mesma não poderia interferir com o meio reacional. As porcentagens redutoras encontradas para a HMC livre e formulação com ativo foi de 62,18%±0,21 e 54,52±0,19, respectivamente, apresentando uma diminuição da atividade antioxidante estatisticamente significativa (Figura 12).

Figura 12: Atividade sequestradora do cátion radical ABTS da HMC pura e P407+HMC.



Os resultados são representados pela média \pm EPM. A análise estatística foi realizada utilizando-se t-Test. *Diferença estatística significativa se $p < 0,05$.

5.3 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE INDUÇÃO TÉRMICA EM CAMUNDONGOS *HAIRLESS*

Na literatura existem vários tipos de modelos de lesão em animais com o objetivo de estudar o processo de cicatrização e prever resultados terapêuticos (ROCHA, 2010; RIBEIRO, 2017; SOUZA, 2019; OLIVEIRA, 2010; DEBIASI, 2017; FRANCK *et al.*, 2018; CAMPELO, 2018; CAMPELO *et al.*, 2011; BARROS *et al.*, 2016; BHATIA *et al.*, 2016; SINGER *et al.*, 2007; MERCES, 2015; FANG *et al.*, 2017). Entre elas estão as queimaduras e as técnicas mais utilizadas para criá-las são por eletricidade ou contato com superfícies quentes como metais ou água aquecidos (MITSUNAGA JUNIOR *et al.*, 2012; ROCHA, 2010; FANG *et al.*, 2017; SOUZA, 2019). Porém, está última é considerada o modelo padrão para produção de queimaduras, pois há uma certa frequência desse incidente em humanos (ABDULLAHI, AMINI-NIK, JESCHKE, 2014).

Os efeitos na pele lesionada por queimadura foram examinados usando um contato térmico por meio de uma haste aquecida previamente em água quente (SINGER *et al.*, 2007; FANG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015). Contudo, estes estudos utilizaram ratos *Wistar* e *Sprague-Dawley* como modelo animal, enquanto que nosso trabalho foi conduzido com camundongos *hairless*, sendo necessário que alguns parâmetros fossem previamente padronizados para correto uso do modelo animal para análise contra os danos causados pela queimadura com aplicação tópica de gel P407+ HMC.

Primeiramente, foi observado nesses trabalhos que os tempos de contato na pele dos animais para promover as lesões foram geralmente de 10 a 30s (FRANCK

et al., 2018; SONG *et al.*, 2017; OLIVEIRA, 2010; FANG *et al.*, 2017; SINGER *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2015). Portanto, como o tamanho e a espessura da pele do camundongo *hairless* se mostram diferentes em relação aos ratos utilizados nos estudos, o presente trabalho analisou macroscopicamente as lesões formadas na pele dos camundongos em relação ao tempo de contato da haste de ferro previamente aquecida a 100°C por 3 min em água fervente.

Dessa forma, avaliou-se macroscopicamente as lesões térmicas quanto ao grau de profundidade, bem como extensão após 3, 6 e 9 segundos de contato com a pele, sem pressão adicional. O dorso dos animais submetidos a 6 e 9 segundos de contato com a haste, resultaram em feridas profundas, extensas, com perda tecidual e necrose.

As queimaduras classificam-se de acordo com a profundidade da lesão: de primeiro, segundo e terceiro graus. Essas informações são essenciais para o direcionamento do atendimento, porém a avaliação da profundidade é feita somente por estimativa, uma vez que a real profundidade da lesão só se revela depois de alguns dias. A de primeiro grau, quando compromete apenas epiderme, resulta em eritema e dor, sem causar alterações hemodinâmicas ou clínicas significativas, devido ausência de vascularização epitelial; segundo grau quando atinge epiderme e parte da derme, ocasionando a formação de bolhas, dor intensa, podendo ser de segundo grau superficial (afeta epiderme e, superficialmente, a derme, restando pelos, glândulas sudoríparas e sebáceas, sendo reconhecida por superfície rósea abaixo do epitélio descolado) ou profunda (atinge a porção mais profunda, formando lesões esbranquiçadas, menos dolorosas que a superficial, restando somente pelos); ou terceiro grau, envolvendo todas as camadas e estruturas da pele, apresentando-se esbranquiçada ou negra, pouco dolorosa e seca (EVERS; BHAVSAR; MAILANDER, 2010; ROCHA 2009).

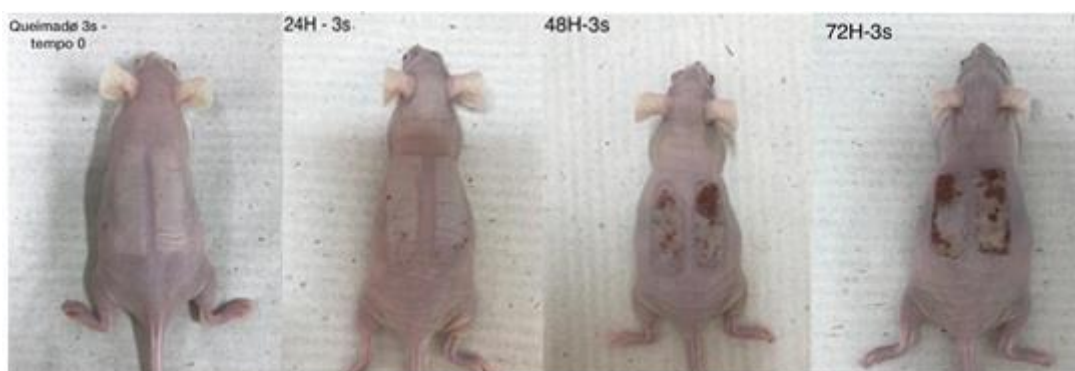
Alguns autores relatam que o grau que uma queimadura causa dano à pele é multifatorial, pois depende da etiologia, duração e intensidade do calor, afetando de maneiras diferentes a pele, segundo a espessura, área exposta, vascularização e idade do paciente (JASKILLE *et al.*, 2009; AL *et al.*, 2009; FRIESE, *et al.*, 2009; MURPHY *et al.*, 2009). Por outro lado, no caso de queimaduras por líquidos e radiação solar, são geralmente lesões superficiais, quando comparadas a lesões por chamas, as quais tendem a ser mais profundas (SUMMER *et al.*, 2007; RICHARDSON, *et al.*, 2009). Logo, o tempo de contato de 3s da haste de ferro com a pele dos animais foi o

escolhido, caracterizando uma queimadura de 2º grau superficial.

Após definição do modelo de queimadura, foi realizada avaliação do tempo de coleta das amostras para as subseqüentes análises das alterações oxidativas e inflamatórias causadas pela indução térmica. Assim, foram escolhidos os tempos de análise de 24, 48 e 72h conforme modelo proposto por Lima-Junior (2017) e Fang *et al.*, (2017) que avaliaram os tempos 6, 12, 24 e 48h, como de Singer *et al.*,(2007) que utilizaram os tempos de 24, 48 e 72h.

As lesões foram realizadas com tempo de indução, previamente estabelecido, de 3 segundos de contato da haste de ferro aquecida em água quente no dorso dos animais. Posteriormente, foram avaliadas as características macroscópicas das lesões de acordo com o tempo de coleta. De imediato após a indução da queimadura o dorso dos animais no local do contato, apresentava-se edemaciado e nas primeiras 24 horas iniciava-se o processo inflamatório com aumento da permeabilidade vascular, caracterizado pelo surgimento de edema. Além disso, também foi possível visualizar pontos de exudato, o qual progrediu após 48 e 72 horas da lesão superficial de espessura total (Figura 13).

Figura 13: Características macroscópicas da lesão térmica no tempos 24, 48 e 72horas



Fonte: Autora

A cicatrização de queimaduras é um processo complexo, que apresenta várias etapas o que finalmente resulta em reparo do tecido da derme e epiderme. Uma resposta Inflamatória local ocorre em pouco tempo após a lesão, principalmente com a infiltração de granulócitos ou leucócitos PMN, que liberam radicais livres no local da inflamação que pode danificar as células e adiar o processo de cicatrização (MARTIN; LEIBOVICH, 2005; HEIDARI *et al.*, 2019).

Portanto, foi avaliado nos diferentes tempos de coleta de pele a formação de

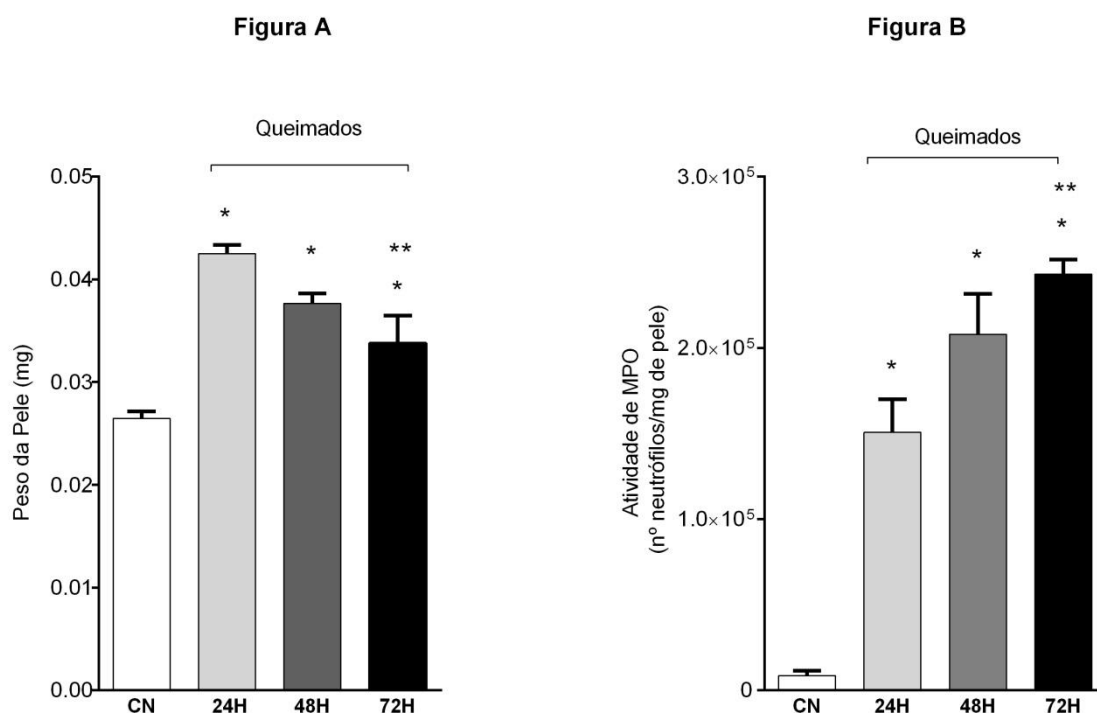
edema (Figura 14A), que é considerado um marcador da inflamação na pele (LATHA; BABU, 2001), como também, a atividade da MPO (Figura 14B), uma enzima que desempenha um papel importante no sistema imunológico inato e pode ser usado como um marcador da presença de neutrófilos ou inflamação (JANTSCHKO *et al.*, 2005). Em adição, realizou-se a análise de danos oxidativos nas lesões térmicas por meio dos ensaios de análise da diminuição dos antioxidantes GSH (Figura 15A) e CAT (Figura 15B), como também, da capacidade antioxidante total da pele (teste FRAP e ABTS) (Figuras 16A e B), além do aumento da geração do ânion superóxido (Figura 16C).

Os resultados apresentados na figura 14A, indicaram que em todos os tempos de análise foi observado um aumento estatisticamente significativo do edema, assim, como da MPO em comparação com a pele que não sofreu lesão térmica. Observou-se que o edema foi mais intenso no tempo de 24h, sofrendo uma diminuição gradual, mas permanecendo estatisticamente diferente da pele íntegra em todos os tempos analisados. Esse perfil pode ter ocorrido, uma vez que é relatado que o edema se forma rapidamente nas primeiras 8h no espaço intersticial após a queimadura, e continua a se formar mais lentamente por pelo menos 18 h (SHIRANI *et al.*, 1996; ROWAN *et al.*, 2015). Além disso, houve diferença estatística significativa entre os tempos de 24h e 72h.

Já para atividade MPO foi observado o inverso, ou seja, houve um aumento gradativo entre os tempos analisados, havendo uma diferença estatística significativa do tempo 72h em relação ao grupo 24h. Esse perfil pode ter ocorrido pela sequência de eventos subsequentes que ocorrem após a lesão. Assim, tem-se primeiramente a ativação das plaquetas circulantes que liberam mediadores como PDGF e TGF- β . Simultaneamente, a cascata da coagulação é ativada pelo fator tecidual produzindo um coágulo de fibrina, uma matriz provisória, que permite a locomoção de células que irão reparar a lesão (MARKESON *et al.*, 2015). O PDGF liberado por plaquetas atrai neutrófilos, macrófagos e fibroblastos para a lesão, estimula a síntese da matriz extracelular para compor o novo tecido de granulação. Fatores de crescimento são polipeptídeos liberados no leito da ferida principalmente para promover quimioatração de certos tipos celulares e estimular a sua proliferação (BIELEFELD *et al.*, 2013; SORG *et al.*, 2017). Os neutrófilos em resposta a quimiocinas alcançam a lesão atravessando os capilares sanguíneos e degradam patógenos, através da sua atividade granulocítica apoptótica mediada por enzimas tóxicas e metabólitos de

oxigênio, dentro dos seus fagolisossomas. Na ausência de infecção, os neutrófilos permanecem por 2 a 5 dias, exercendo suas funções de desbridamento do tecido e amplificando a resposta inflamatória liberando citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (FRIERI *et al.*, 2016; LANDÉN *et al.*, 2016).

Figura 14: Avaliação do edema (A) e atividade de MPO (B) na pele dos animais queimados

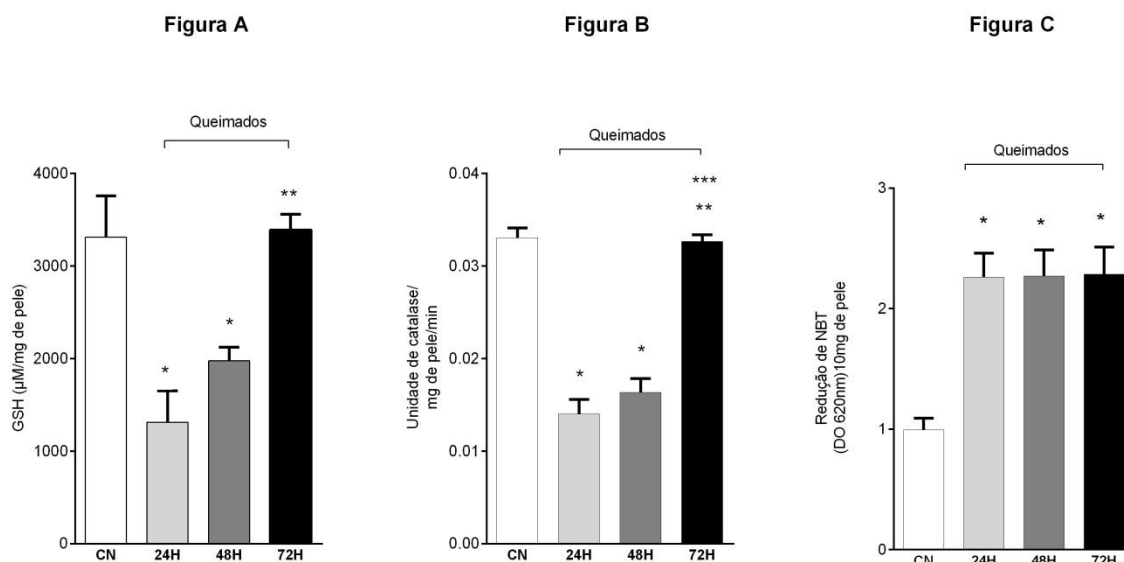


Relação tempo de coleta de pele-indução de edema (A) e atividade da MPO (B). Os dados são representativos da média de 2 experimentos \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey (* $p < 0,05$ comparado com o grupo não queimado, ** $p < 0,05$ comparado com tempo 24h). CN= grupo controle não queimado.

A análise dos antioxidantes endógenos GSH e CAT (Figuras 15 A e 15B), revelou que nos tempos de coleta de 24 e 48h houve uma diminuição acentuada comparado ao grupo não queimado com diferença estatística significativa. Também foi verificado que houve diferença estatística significativa entre os grupos 24 e 72h para GSH e entre todos os grupos para CAT. Ademais, foi verificado um reestabelecimento significativo destes antioxidantes não enzimático e enzimático, respectivamente, na pele no tempo de observação 72h, alcançando níveis próximos do basal. Além da diminuição dos antioxidantes endógenos foi possível observar que a indução de queimadura na pele dos camundongos promoveu um aumento na geração do ânion superóxido quando comparado com o grupo não lesionado. No entanto, não foi

demonstrada diferença estatística entre os tempos de coleta da pele (Figura 15C).

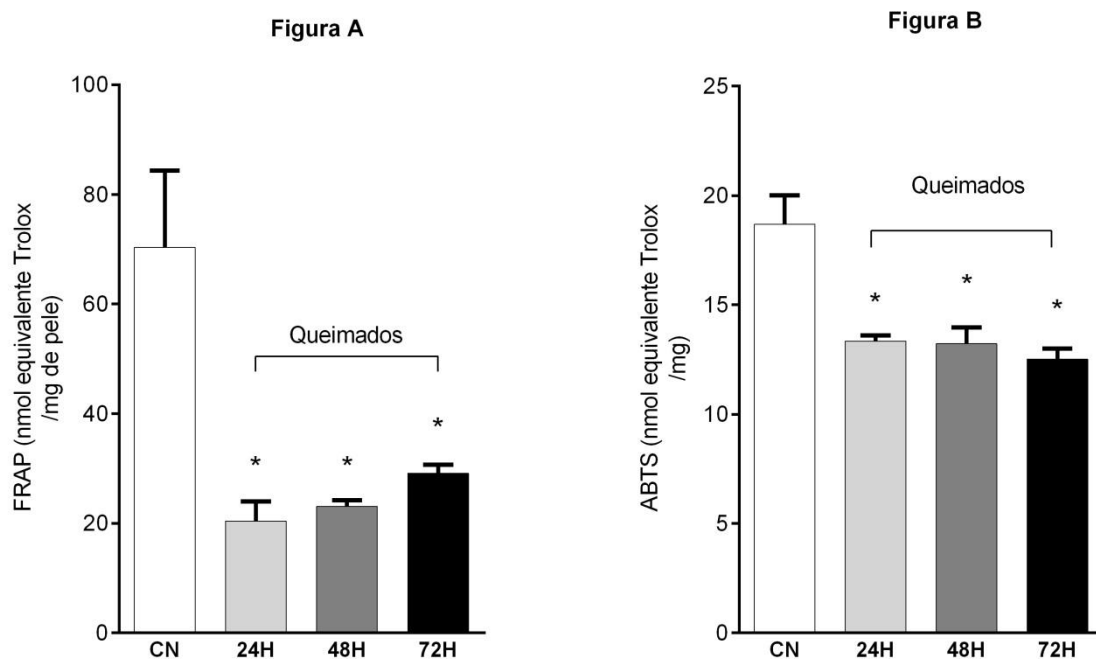
Figura 15: Avaliação dos níveis de GSH (A), CAT (B) e ânion superóxido (C) na pele dos animais queimados



Relação tempo de coleta de pele-diminuição dos níveis de GSH (A), diminuição da CAT (B) e aumento do ânion superóxido (NBT) (C). Os dados são representativos da média de 2 experimentos \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. (*p<0,05 comparado com o grupo não queimado, ** p<0,05 comparado com tempo 24h; *** p<0,05 comparado com tempo 48h). CN= grupo controle não queimado.

Em adição, foi avaliada a capacidade antioxidante global presente na pele dos animais, por meio dos testes de FRAP e ABTS. O primeiro indica a capacidade antioxidante da pele avaliando a redução do complexo íons $\text{Fe}^{+3} + \text{TPTZ}$ a Fe^{+2} , enquanto o ABTS avalia a capacidade cutânea em remover o radical livre ABTS^+ , por meio da doação de elétrons (CRUZ, 2017). Dessa forma, ao avaliar as figuras 16 A e B, é possível afirmar que todos os grupos queimados apresentaram diferença significativa em relação ao grupo não queimado, demonstrando que a lesão térmica reduz a capacidade antioxidante na pele dos animais após indução da queimadura.

Figura 16: Avaliação da capacidade antioxidante da pele dos animais queimados



Relação tempo de coleta pele-diminuição da capacidade antioxidante da pele por meio da redução férrica (FRAP) (A) e sequestro do radical ABTS (B). Os dados são representativos da média de 2 experimentos \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. (* $p < 0,05$ comparado com o grupo não queimado). CN= grupo controle não queimado.

Como dito anteriormente, o processo de cicatrização ocorre em três estágios e o objetivo do processo de cicatrização é impedir a invasão de patógenos, restabelecer a integridade dos danos no tecido e reconstruir a função fisiológica da pele (GHLISSI *et al.*, 2016). As células inflamatórias migram para o local da lesão para eliminar bactérias e preparar o local da lesão para a cura (LAWRENCE; DIEGELMANN, 1994). Assim, fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório respondem com um aumento da quantidade de ânion superóxido e H_2O_2 que desempenham importante função bacteriana (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; SILVA, 2001; SILVA, 2013; PARIHAR *et al.*, 2008). Assim, podemos observar que as respostas encontradas em relação atividade da MPO e quantidade de ânion superóxido estão coerentes, uma vez que se verificou um aumento progressivo nos tempos de análise da pele lesionada e alta quantidade detectada do radical nos diferentes grupos.

Os leucócitos polimorfonucleares (PMNLs) são os primeiros leucócitos a

chegar ao local de uma queimadura nos estágios iniciais após lesão térmica, e essas células exacerbam lesões teciduais, e assim, prolongam a cicatrização (FANG *et al.*, 2017).

Assim, uma resposta inflamatória prolongada nas queimaduras, mediada pela ativação do sistema complemento, liberação de mediadores inflamatórios, apoptose celular inflamatória tardia, sinais inflamatórios e EROs, participam da progressão da queimadura (SALIBIAN *et al.*, 2016; SHUPP *et al.*, 2010). Dessa forma, o aumento verificado no tempo 72h dos antioxidantes GSH e CAT pode sugerir que a pele está iniciando um processo de restabelecimento de cura, uma vez que o processo de cicatrização se faz por interações complicadas e bem organizadas entre vários tecidos e células que se sobrepõem entre estágios sucessivos (ARAGONA *et al.*, 2017).

Com os resultados encontrados podemos concluir que o modelo de injúria térmica utilizada no presente trabalho na pele de camundongos *hairless*, resultou em processo inflamatório e oxidativo. Em adição, após a análise dos resultados dos danos oxidativos e inflamatórios foi definido o tempo de 48h para avaliar o tratamento tópico com gel P407+HMC. Para tanto, foram realizadas as lesões térmicas em 4 grupos, onde um deles não recebeu nenhum tratamento e os outros 3, foram tratados com as formulações de P407+HMC, somente gel P407 e creme de sulfadiazina de prata 1%, sendo este o agente tópico mais amplamente utilizado para queimaduras relatado pela sua eficácia antimicrobiana (BATHIA *et al.*, 2016; COSTA; ALVES; SOUZA, 2018; YAMAN *et al.*, 2010; ROSSI *et al.*, 2010).

5.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VIVO* DA HESPEDIRINA METIL CHALCONA INCORPORADA EM FORMULAÇÃO A BASE DE POLOXAMER 407 EM QUEIMADURA TÉRMICA

Neste trabalho a eficácia *in vivo* da aplicação do flavonoide HMC incorporado em gel termossensível Poloxamer 407 após indução térmica foi avaliada em camundongos machos da linhagem *hairless*. Essa linhagem é um modelo de animal de pequeno porte, com facilidade de manipulação experimental e apresentam a vantagem de não possuírem pelo, o que permite uma análise direta da pele. Além disso, foram utilizados somente os animais do sexo masculino, pois as fêmeas apresentam variações hormonais, as quais podem influenciar nos testes (ROCHA, 2010).

Há certa limitação dos modelos *in vitro* para estudos de queimaduras, pois não

há possibilidade de verificar toda a fisiopatologia e características clínicas da queimadura. Por estas razões os modelos *in vivo* são muito utilizados para avaliação de lesões cutâneas, bem como para investigar novos métodos de tratamento e conhecer como os fármacos respondem a esse tipo de lesão (INOUE *et al.*, 2018). Para indução da queimadura foi utilizado o tempo de 3s, escolhido por preservar a maior parte dos anexos dérmicos, os quais influenciam no processo de reparação cutânea (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017). Esse método permitiu controle adequado da exposição da área a ser lesada nos procedimentos. Em todos os animais, a área dorsal que recebeu a injúria ficou edemaciada, com presença de crostas, características de uma inflamação. A lesão apresentou aproximadamente 2cm² (1cm x 2cm).

Durante as 48 horas de experimento, todos os animais sobreviveram, não tiveram sinais de infecções nas lesões, não apresentaram perda de peso significativa (dados não mostrados) e o comportamento (por exemplo, ingestão de alimentos, atividade diária) permaneceu normal até o momento da eutanásia. Resultados semelhantes foram encontrados por Wade *et al.*, (2013), porém após as lesões os camundongos exibiram comportamento característico de dor como postura encurvada e irritabilidade, mas isso foi amenizado com a administração de analgésico na água do bebedouro, paracetamol 500mg por 24 horas (ROCHA, 2010).

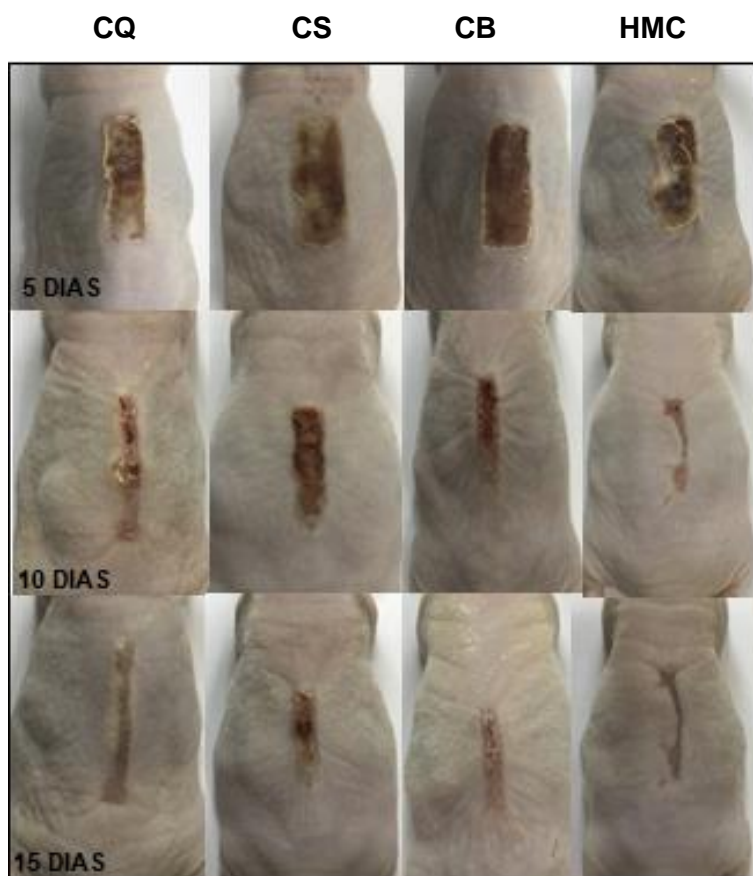
As imagens digitais (Figura 17) de indução das lesões térmicas mostraram a intensidade da ferida em camundongos *hairless* e progressão da ferida nos animais tratados com CS, CB e P407+HMC nos dias 5, 10 e 15 após injúria. Após a lesão térmica, foram observadas características de processo inflamatório com edema, vermelhidão, exsudato, formação de crosta no local de contato com a haste. Macroscopicamente, notou-se que as bordas estavam bem delimitadas e havia presença de necrose. Imediatamente após a queimadura, ou seja, no tempo zero, a pele encontrava-se edemaciada e vermelha. A partir do quinto dia após a indução das queimaduras, observou-se a formação de crosta em todas as lesões, as quais tem como função a liberação dos mediadores químicos inflamatórios, além de ser responsável pela contenção da hemorragia (ALVES *et al.*, 2011).

Em adição, notou-se em todos os grupos uma regressão gradual da lesão, contudo o tratamento com HMC apresentou um processo de contração da lesão mais evidente já iniciando no dia 5 e uma regressão bastante acentuada da área queimada em comparação aos outros grupos tratados, principalmente o CS, no qual ainda

apresentava lesão visual. Ainda, o grupo tratado com P407+HMC apresentou área totalmente fechada com características de cicatrização completa em 10 dias. Assim, a análise visual realizada em relação ao grupo CS, pode confirmar os relatos da literatura a respeito da sulfadiazina de prata, onde desde sua descoberta em 1968 ela é muito utilizada no tratamento de queimaduras, com finalidade de debridar tecidos necrosados e combater infecção local (FERREIRA; DE PAULA, 2013; ROSSI *et al.*, 2010), porém não há indícios de uma atividade cicatrizante da mesma. Segundo Fuller (2009), ela possui efeito tóxico a queratinócitos e fibroblastos, além de possuir potencial alergênico (LEE; MOON, 2003; DE SMET *et al.*, 2009; GREGORY, 2002).

Portanto, pode-se verificar que a aplicação do P407+HMC promoveu uma rápida recuperação visual do tecido cutâneo com uma diminuição da área da ferida pelo quinto dia após injúria e um intenso fechamento visual da ferida no 10º dia.

Figura 17: Acompanhamento da redução da área queimada do dorso dos animais submetidos a lesão térmica



Fonte: Autora

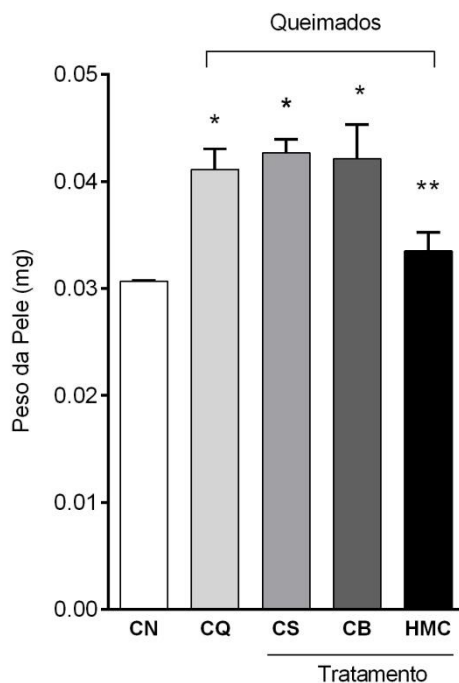
Os animais foram submetidos à lesão térmica e tratados topicamente com Sulfadiazina de Prata 1% (CS), formulação P407 (CB) e formulação P407+HMC, de 8/8h durante 15 dias

após a lesão, em comparação com grupo queimado sem tratamento (CQ).

A progressão da queimadura está relacionada há diversos fatores, entre eles o edema, o qual é um dos sintomas das doenças inflamatórias. Na lesão térmica há exposição do colágeno e, assim, ativação e liberação das histamina pelos mastócitos nos tecidos lesionados. Esse mediador inflamatório induz o aumento da permeabilidade capilar, ocasionando o edema tecidual, bem como acúmulo de líquido na lesão, que pode ser visualizado por meio das bolhas que podem surgir nas queimaduras de 2º grau (KECK *et al.*, 2009; KENWORTH *et al.*, 2018; SINGER; BOYCE, 2017).

Assim, a avaliação da diminuição do edema induzido pelo estresse térmico na pele após tratamento de 8/8h com P407+HMC foi analisado no tempo de 48h. Na figura 18 está demonstrado que os grupos, queimado não tratado (CQ), queimado tratado com creme de sulfadiazina de prata (CS) e queimado tratado com P407 (CB) apresentaram um aumento no peso das peles caracterizado pelo edema quando comparados com o grupo não queimado (CN) ($p < 0,05$). Por outro lado, não foi verificado diferença significativa entre o CN e o grupo tratado com HMC, indicando que a aplicação do HMC foi eficaz na diminuição do edema formado após injúria térmica (Figura 18).

Figura 18: Efeito do tratamento com P407+HMC na diminuição do edema, 48 horas após a injúria térmica



Efeito do tratamento com P407+HMC na diminuição do edema formado após injúria térmica. Os dados são representativos da média de 2 experimentos \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. (* $p < 0,05$ comparado com o grupo não queimado, ** $p < 0,05$ comparado com tempo CQ). CN=grupo sem queimadura, CQ=grupo queimado e não tratado, CS=grupo queimado e tratado com creme sulfadiazina de prata 1%, CB= grupo queimado e tratado com gel P407, HMC=grupo queimado e tratado com P407+HMC.

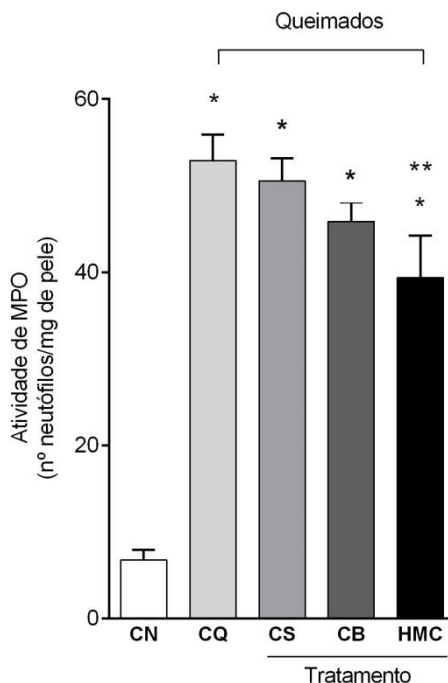
Sabe-se que após lesões térmicas ocorre a migração de células inflamatórias ao local da lesão como neutrófilos e macrófagos, os quais são defesas contra micro-organismos e, também, auxiliam na remoção do tecido coagulado (HORTON, 2003; EVERS *et al.*, 2010; MCINTYRE *et al.*, 2016). O conteúdo de MPO é mais alto no grânulo azurófilo de neutrófilo (neutrófilo polimorfonuclear, PMN), que é relativamente constante em cada PMN. Portanto, a atividade da MPO no tecido reflete indiretamente o número de PMNs no tecido (SCHIERWARGEN *et al.*, 1990; YUHUA *et al.*, 2012). Sabe-se que o excesso de neutrófilos no local da lesão, ocasiona a produção de radicais livres, os quais são substâncias tóxicas que ativam enzimas proteolíticas causando dano no tecido de granulação, inibem fatores de crescimento e dificultam o processo de reparação (HORTON, 2003; GRAGNANI *et al.*, 2013).

Os resultados (Figura 19) mostram que a lesão térmica proporcionou um

grande aumento da atividade da MPO na pele dos animais em relação ao CN. Também, observou uma diminuição relevante e conseqüentemente diferença estatística significativa da MPO no grupo HMC em comparação ao CQ, o que não ocorreu com os grupos CS e CB, demonstrando que o flavonoide foi capaz de diminuir a elevação da atividade dessa enzima no processo de queimadura térmica.

É válido descrever que após 48 horas da injúria a pele encontrava-se altamente vascularizada, caracterizando um processo de angiogênese, o qual é um estágio essencial para a cicatrização (LAUREANO, RODRIGUES, 2011). Resultados semelhantes foram encontrados por Perfoll (2016) e Silva (2013), ambos os pesquisadores observaram o aumento de atividade da enzima MPO em testes com queimaduras térmicas em ratos. Mercês (2015), também utilizou a injúria térmica como modelo de queimadura em ratos e verificou o aumento da rede vascular nos animais que receberam o tratamento tópico com *Aloe vera*. No processo de angiogênese ocorre o crescimento de novos vasos a partir da proliferação dos vasos já existentes nas margens da ferida, evento essencial para a cicatrização adequada (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Figura 19: Efeito do tratamento com P407+HMC na diminuição da atividade da MPO, 48 horas após a injúria térmica



Efeito do tratamento com P407+HMC na diminuição da atividade da MPO após injúria térmica. Os dados são representativos da média de 2 experimentos \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. (* $p < 0,05$ comparado com o grupo não queimado, ** $p < 0,05$ comparado com o grupo queimado e não tratado). CN=grupo sem queimadura, CQ=grupo queimado e não tratado, CS=grupo queimado e tratado com creme sulfadiazina de prata 1%, CB= grupo queimado e tratado com gel P407, HMC=grupo queimado e tratado com P407+HMC.

EROs são produzidas em excesso após a queimadura causando prejuízos ao tecido relacionados à necrose (FRIERI *et al.*, 2016; ROWAN *et al.*, 2015). Em condições fisiológicas, as EROs são subprodutos da fosforilação oxidativa mitocondrial, da oxidação de purinas pela xantina oxidase, do sistema oxidase dependente de NADPH pela ativação de neutrófilos e via do ácido araquidônico. A propriedade catalítica da xantina oxidase faz com que a atividade da histamina aumente gradativamente a permeabilidade vascular, além dos seus subprodutos oxidantes H_2O_2 , $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$, danificarem as estruturas dérmicas (KECK *et al.*, 2009). O H_2O_2 é capaz de se difundir pela membrana plasmática e alcançar o lisossoma, reagindo com o ferro e produzindo o radical $O_2^{\cdot -}$, que é mais potente, causando danos na membrana lisossomal e extravasamento do seu conteúdo, culminando em

apoptose celular. No entanto, existe um equilíbrio entre EROs e sistemas antioxidantes das células tais como catalase, superóxido dismutase, glutathione e peroxidase. Na queimadura este equilíbrio pode ser afetado e a progressão lesiva do estresse oxidativo pode ocorrer na zona de estase, incluindo a peroxidação lipídica de membranas, ruptura proteica e de ácidos nucleicos, ocasionando morte celular (GALICKA *et al.*, 2014; SHUPP *et al.*, 2010).

Portanto, o estresse oxidativo é um dos fatores que pode comprometer o processo de cicatrização da ferida (FITZMAURICE *et al.*, 2011). Assim, mediante o papel central dos oxidantes na patogênese do atraso da cicatrização em lesões, defende-se a necessidade de terapia antioxidante para auxiliar no tratamento (SEN *et al.*, 2002; SINGER *et al.*, 2007; MOHANTY; SAHOO, 2017), uma vez que a eliminação das EROs na área ferida pode ser tomada como uma abordagem importante para melhorar a cicatrização (FITZMAURICE *et al.*, 2011; AKBIK *et al.*, 2014; FANG *et al.*, 2017).

Dessa forma, foi avaliado o efeito da aplicação tópica do gel termossensível P407+ HMC na diminuição do estresse oxidativo gerado na pele dos camundongos *hairless* no modelo de indução de queimadura térmica.

GSH é um antioxidante endógeno não enzimático responsável pela neutralização de RL e redução de peróxido de hidrogênio (FRANKLIN, 2010) e seu consumo é indicativo de estresse oxidativo (DEBIASI, 2017). Como o GSH é essencial para a proteção de tiol e outros grupos nucleofílicos nas proteínas dos radicais tóxicos do oxigênio, a concentração de GSH intracelular, torna-se importante na determinação da extensão da lesão cutânea induzida por queimadura (SENER *et al.*, 2005; TOKLU *et al.*, 2006; TOKLU *et al.*, 2007).

Na figura 20A está demonstrado que a lesão térmica diminui intensamente a presença de GSH nas peles queimadas em comparação a íntegra. Em adição, observou-se que os grupos tratados CS e CB não apresentaram diferença em relação ao grupo CQ, demonstrando não conseguiram restabelecer a diminuição dos níveis do antioxidante gerado na injúria. Contudo, o tratamento com HMC, um antioxidante sequestrador de EROs (NG *et al.*, 2007) apresentou capacidade de reduzir a depleção de GSH chegando próximo ao nível basal.

Toklu *et al.*, (2007), utilizou duas alternativas de tratamento para queimadura, uma administração tópica e outra tópica associada com oral, assim, os autores verificaram que após 48h da injúria térmica, ambos os tratamentos com o antioxidante

fenólico silimarina, aplicado na lesão causada em ratos Wistar por exposição da pele a água quente (90°C) por 10s, também foi capaz de reverter a diminuição dos níveis de GSH causados pela queimadura. O recurso terapêutico por via oral com antioxidante naringenina, administrado para o tratamento de lesão térmica, também indicou que este ativo foi capaz de reduzir os efeitos da queimadura, demonstrado pelo aumento dos níveis de GSH em comparação aos grupos controles (AL-ROUJAYEE, 2017).

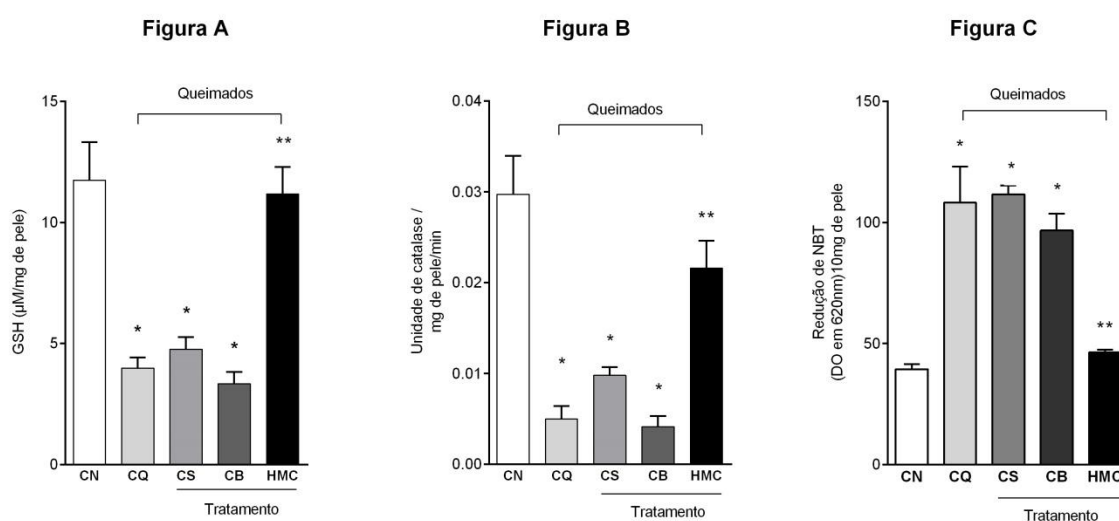
A CAT é uma enzima endógena altamente eficiente presente em quase todos os tecidos vivos que utilizam oxigênio, ela realiza a degradação ou redução do H₂O₂. Está localizada principalmente nos peroxissomos (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). No estresse oxidativo há o acúmulo não somente de RL, como também de não-radicalais, como peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (HORTON *et al.*, 2001). O H₂O₂ é capaz de reagir com ferro e produzir o radical hidroxil, que é mais potente, causando danos celulares (GALICKA *et al.*, 2014; SHUPP *et al.*, 2010). Em adição, o aumento dos níveis das EROs também leva a diminuição das defesas antioxidantes, tais como, α -tocoferol, ácido ascórbico, SOD, glutathiona e catalase (HORTON *et al.*, 2001; SHUPP *et al.*, 2010)

Foi observado na figura 20B que os níveis de CAT nas peles queimadas e tratadas com CS e CB diminuíram intensamente em comparação ao grupo controle não queimado, demonstrando que a lesão térmica altera a homeostase redox da célula. Já o grupo tratado com a P407+HMC foi capaz de aumentar os níveis da enzima CAT na pele que sofreu queimadura térmica.

O ânion superóxido é uma EROs presente no estresse oxidativo induzido pela queimadura, produzido por meio da reação de redução do O₂ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; KANEKO; HARVEY; BRUSS 2008). Nas lesões térmicas os RL são produzidos durante a reposição de fluídos, exacerbando a injúria mediada pela isquemia, alterando numerosos componentes celulares. Assim, a intensa produção do O₂⁻, associada a redução da capacidade de defesa das enzimas antioxidantes endógenas, corrobora para o aumento do estresse oxidativo e lesões celulares (HORTON, 2003). O O₂⁻, é o resultado da primeira redução do oxigênio, portanto, este ânion participa da produção das demais EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Existem muitos métodos para avaliação da atividade antioxidante, dentre eles está o teste de redução do NBT (CIARLINI *et al.*, 2004), método utilizado para avaliar a capacidade sequestradora do radical O₂⁻. Assim, os resultados (figura 20C) indicaram

que o grupo tratado com a formulação P407+HMC foi capaz de reduzir os valores de NBT, indicando menor quantidade do $O_2^{\cdot -}$ na pele desses animais, alcançando valores próximos aos níveis basais, ou seja, do grupo que não sofreu a lesão térmica local. Os demais grupos queimados (CS e CB), apresentaram um aumento na geração do ânion superóxido significativamente diferente do CN, mas não promoveu a diminuição desse radical comparado com CQ. Portanto, o tratamento tópico com HMC inibiu a diminuição dos antioxidantes endógenos GSH e CAT, assim como a redução da produção do radical livre ânion superóxido no modelo de queimadura térmica. Os resultados corroboram com, outros trabalhos, os quais já demonstraram que a HMC mantém os antioxidantes endógenos, além de inibir a produção de ânion superóxido em modelo de avaliação de danos cutâneos inflamatórios e oxidativos induzidos pela radiação UVB em camundongos *hairless* e em modelo de rato com artrite induzido por injeção intra-articular de urato monossódico (MARTINEZ *et al.*, 2016; MARTINEZ *et al.*, 2015; RUIZ-MIYAZAWA, *et al.*, 2018).

Figura 20: Efeito do tratamento com P407+HMC na redução dos níveis de GSH (A), CAT (B) e na redução do ânion superóxido (C), 48 horas após da injúria térmica

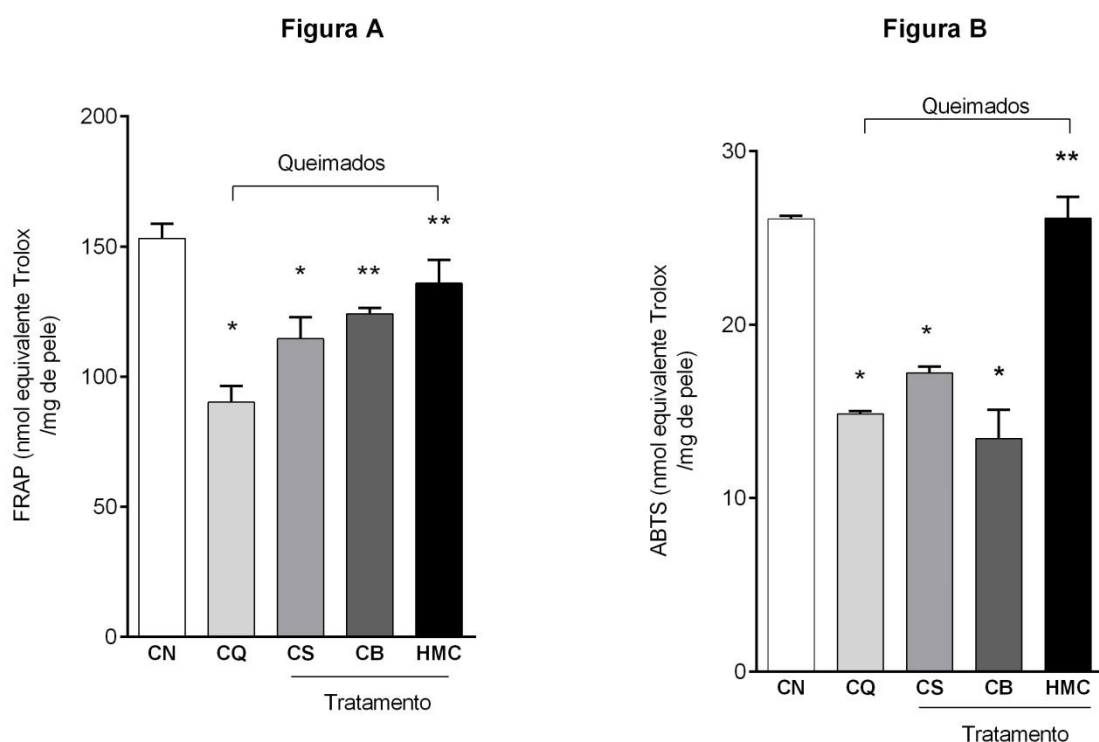


Efeito do tratamento com P407+HMC na redução dos níveis de GSH (A), CAT (B) e ânion superóxido (C). Os dados são representativos da média de 2 experimentos \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. (* $p < 0,05$ comparado com o grupo não queimado, ** $p < 0,05$ comparado com o grupo queimado e não tratado). CN=grupo sem queimadura, CQ=grupo queimado e não tratado, CS=grupo queimado e tratado com creme sulfadiazina de prata 1%, CB= grupo queimado e tratado com gel P407, HMC=grupo queimado e tratado com P407+HMC.

Como pode ser afetado o equilíbrio pro-oxidante/antioxidante na queimadura

(SHUP *et al.*, 2010), o presente trabalho avaliou o tratamento com HMC na capacidade antioxidante total da pele após lesão térmica. Nas figuras 21A e B foi demonstrado que a injúria térmica induziu uma diminuição significativa do poder redutor de ferro (FRAP) e da capacidade sequestradora de radical (ABTS) na pele em comparação a não queimada. Ainda podemos verificar que no ensaio do ABTS, o tratamento com HMC restabeleceu a capacidade sequestradora de radical da pele próximo ao nível basal e os grupos tratados com CB e CS não apresentaram essa capacidade. Por outro lado, no teste FRAP foi observado que tanto o veículo (CB), como grupo tratado com HMC foi capaz de diminuir a redução do poder redutor de ferro na pele.

Figura 21: Efeito do tratamento com P407+HMC na diminuição da capacidade antioxidante da pele, após 48h da injúria térmica



Efeito do tratamento com P407+HMC na diminuição da capacidade antioxidante da pele por meio da redução férrica (FRAP) (A) e sequestro do radical ABTS (B). Os dados são representativos da média de 2 experimentos \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. (* $p < 0,05$ comparado com o grupo não queimado, ** $p < 0,05$ comparado com o grupo queimado e não tratado). CN=grupo sem queimadura, CQ=grupo queimado e não tratado, CS=grupo queimado e tratado com creme sulfadiazina de prata 1%, CB= grupo queimado e tratado com gel P407, HMC=grupo queimado e tratado com P407+HMC.

Em suma, foi possível verificar que aplicação tópica de HMC adicionada em gel termorreversível P407 mostra-se como uma abordagem promissora com o objetivo de

diminuir o estresse oxidativo e inflamação gerada após queimadura térmica. Além disso, também foi observado que o tratamento realizado com creme de sulfadiazina de prata a 1% não conseguiu diminuir a injúria oxidativa e inflamatória nas queimaduras. Este resultado corrobora o que é relatado na literatura, na qual descreve que este ativo pode atrasar a cicatrização das feridas, por ser classificado como antimicrobiano e não cicatrizante (COSTA, ALVES, SOUZA, 2018; FERREIRA, *et al.*, 2003; ROSSI *et al.*, 2010). Além disso, a sulfadiazina também apresenta outra desvantagem no tratamento clínico, uma vez que sua rotina de curativos é estressante para os pacientes, pois é necessária manipulação diária no curativo, causando dor intensa e trauma psicológico, principalmente em crianças (MUANGMAN *et al.*, 2010; GENUINO *et al.*, 2014)

Ademais, a HMC além de ser eficiente para o tratamento de lesões térmicas de acordo com os resultados apresentados neste estudo, também é um ativo seguro, sendo comercializado como Ciclo 3 Fort[®], utilizado para o tratamento de doenças vasculares, com a função de agente vasoprotetor (ALLAERT *et al.*, 2011).

Portanto, este estudo foi o primeiro a descrever a HMC como um ativo promissor no tratamento de queimadura térmica, uma vez que demonstrou melhorar visualmente a regeneração da pele após queimaduras, reduzir processo inflamatório e reestabelecer a capacidade antioxidante da pele.

6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a formulação do gel termorreversível adicionado a HMC apresentou um pH ideal para formulação tópica em pele lesionada, além de uma densidade adequada e boa espalhabilidade. A adição do flavonoide no gel aumentou a T_{sol}-gel no teste do tubo invertido e elevou a viscosidade do veículo. Além disso, a formulação apresentou atividade antioxidante. Em relação aos testes *in vivo* a HMC adicionada no P407 acelerou o processo de cicatrização das bordas para o centro da ferida. Também foi possível confirmar relatos encontrados em pesquisas anteriores, onde a HMC possui potencial antioxidante, atuando na manutenção do sistema antioxidante endógeno, e anti-inflamatório por meio da redução de parâmetros avaliados que participam desse processo. Sendo assim, este estudo constitui relevância científica, uma vez que existem no mercado poucos recursos disponíveis para o tratamento tópico de queimaduras térmicas, com produtos de origem natural. No entanto, sugere-se a necessidade de maiores estudos que viabilizem o desenvolvimento deste tratamento. Este estudo é válido no contexto de experimentação com animais, a utilização em seres humanos deve ser feita com cautela e demanda de estudos clínicos para sua real comprovação.

REFERENCIAS

- ACÁCIO, R. S., FRANCO, S. P. B., FILHO, W. S. C., COSTA, J. G., SANTOS, A. F., GOULART, H. F. Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico de *Melochia tomentosa* Linnaeus (1735). **Diversitas Journal**. v.3, n.2, p.412-428, 2018.
- ABDULLAHI, A.; AMINI-NIK, S.; JESCHKE, M. G. Animal models in burn research. **Cel Mol Life Sci**. v. 71, n. 17, p. 3241-55, 2014.
- ABDULLAH, A. R., MOKHTAR, M., ISA, N.H., BAKHARI, N.A., WAHAB, N.A. Characterization and Molecular Modelling of Inclusion Complex between Hesperidin and β -cyclodextrin. **Int J Enh Res Sci Tech Engin**. v.3, n.2, p.32–38, 2014.
- ACHÉ. Bula Disomin 2017. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp. Acesso em: 01 mai. 2020
- ACOSTA-ESTRADA, B. A., GUTIERREZ-URIBE, J. A., SERNA-SALDIVAR, S. O. Bound phenolics in food, a review. **Food Chem**. v.152, p.46-55, 2014.
- ADDOR, F. A. S. Antioxidants in dermatology. **An Bras Dermat**. v. 92, n. 3, p.356-362, 2017.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**. v.105, p.121–126, 1984.
- AFSHAR, M., RAVARIAN, B., ZARDAST, M., MOALLEM, S. A., FARD, M. H., VALAVI, M. Evaluation of cutaneous wound healing activity of *Malva sylvestris* aqueous extract in BALB/c mice. **Iran J of Basic Med Sci**. v. 18, n. 6, p. 616-622, 2015.
- AGUIAR, A.O.; OLIVEIRA, B.B.R.; CARNIB, L.P.A.A. Efeito dos antioxidantes vitamina C e selênio em pacientes queimados: uma revisão bibliográfica. **Rev Bras Queim**. v.13, n.2, p.62-66, 2014.
- AGRA, M. F., SILVA, K. N., BASILIO, I. J. L. D., FREITAS, P. F., BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn**. v.18, N.3, p.472-508, 2008.
- AHMAD, N., ZUO, Y., LU, X., ANWAR, F., HAMEED, S. Characterization of free and conjugated phenolic compounds in fruits of selected wild plants. **Food Chem**. v.190, n.1,p.80-89,2016.
- AKBIK, D.,GHADIRI, M., CHRZANOWSKI, W., ROHANIZADEH, R. Curcumin as a wound healing agent. **Life Sci**. v.116, p.1–7, 2014.
- AL, B.; YILDIRIM, C.; COBAN, S.; ALDEMIR, M.; GÜLOĞLU, C. Mortality factors in flame and scalds burns: our experience in 816 patients. **Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Derneği**. v. 15, n. 6, p. 599-606, 2009.
- AL KHATEB, K., OZHMUKHAMETOVA, E. K., MUSSIN, M. N., SEILKHANOV, S. K.,

RAKHYPBEKOV, T. K., LAU, W. M., KHUTORYANSKIY, V. V. In situ gelling systems based on Pluronic F127/Pluronic F68 formulations for ocular drug delivery. *Int J Pharmac.* v.502, p70-79, 2016.

ALJUFFALI, I. A.; HSU, C.; LIN, Y.; FANG, J. Cutaneous delivery of natural antioxidants: the enhancement approaches. *Current Pharmac Design.* v. 21, n. 20, p. 2745 – 2757, 2015.

ALLAERT, F. A., HUGUE, C., CAZAUBON, M., RENAUDIN, J. M., CLAVEL, T., ESCOURROU, P. Correlation between improvement in functional signs and plethysmographic parameters during venoactive treatment (Cyclo 3 Fort). *Int. Angiol.* v. 30, n.3, p. 272–277, 2011.

AL-ROUJAYEE, A. B. Naringenin improves the healing process of thermally-induced skin damage in rats. *Res Report.* v.45, n.2, p.570-582, 2017.

ALVES, C. Q., DAVID, J. M., DAVID, J. P., BAHIA, M .V., AGUIAR, R . M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova.* v.33, n.10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, T. F. R. Desenvolvimento e avaliação de hidrogéis termorresponsivos para administração vaginal e veiculação de curcumina. 2016. 139 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas -Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2016.

ALVES, H.; MACHADO, M. T.; NORONHA, A. M. N. Análise Qualitativa do Processo de Reparo em Cicatriz Cirúrgica de Ratos Tratados com Extrato de Musa Sapientum, Aloe Vera e Colagenase/Qualitative Analysis of the Repair Process in Surgical Scar in Treated Rats with Musa Sapientum Extract, Aloe Vera. *Rev Ciênc Saúde*, v. 1, n. 2, p. 8-18, 2011.

ANDRADE, M. G. L., CAMELO, C. N., CARNEIRO, J. A., TERÊNCIO, K. P. Evidências de alterações do processo de cicatrização de queimaduras em indivíduos diabéticos: revisão bibliográfica . *Rev Bras Queim.* v.12, n.1, p.42-48, 2013.

ANDRETTA, I. B., CANCELIER, A. C., MENDES, C., BRANCO, A. F. C., TEZZA, M. Z., CARMELLO, F. A., LEA, B. M., GUERRO, A. C., DETTENBORN, S. A. Perfil epidemiológico das crianças internadas por queimaduras em hospital do sul do Brasil, de 1998 a 2008. *Rev Bras Queim.* v.12, n.1, p.22-29, 2013.

ANILA, L., VIJAYALAKSHMI, N. Antioxidant action of flavonoids from mangifera indica and emblica officinalis in hypercholesterolemic rats. *Food chem.* v.83, n.4, p.569–574, 2003.

ARAGONA, M., DEKONINCK, S., RULANDS, S., LENGLEZ, S., MASCRE, G., SIMONS, B. D., C. BLANPAIN. Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis. *Nat. Commun.* v.8, n.14684, 2017.

ARRUDA FCF, CASTRO BCO, MEDEIROS JF, VALADÃO WJ, REIS GMD. Análise epidemiológica de 2 anos na Unidade de Queimados do Hospital de Urgências

Governador Otávio Lage de Siqueira, Goiânia, Brasil. **Rev Bras Cir Plást.** v.33, n.3, p.389-394, 2018.

AZIZ, M. A., ADNAN, M., KHAN, A. H., SHAHAT, A. B., AL-SAID, M. S., ULLAH, R. Traditional uses of medicinal plants practiced by the indigenous communities at Mohmand Agency, FATA, Pakistan. **J Ethnobiol Ethnomed**, v. 14, n. 2, p. 1–16, 2018.

BAJPAI, A. K., SHUKLA, S. K., BHANU, S., KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. v. 33, n. 11, p. 1088–1118, 2008.

BALBINO, C. A., PEREIRA, L. M., CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev Bras de Ciênc Farmac.** v. 41, n.1, p.27-51, 2005.

BALOGLU, E., KARAVANA, S. Y., SENYGIT, Z. A., GUNERI, T. Rheological and Mechanical Properties of Poloxamer Mixtures as a Mucoadhesive Gel Base. **Pharm Dev Technol.** v.16, n.6, p.627-636, 2011.

BARBOSA, E. Efeito da suplementação de vitamina e, vitamina c e Zinco no estresse oxidativo e no de tempo de Reepitelização em pacientes pediátricos queimados. 2006. 157p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BARCELLOS, L. G., SILVA, A. P. P., PIVA, J. P., RECH, L., BRONDANI, T. G. Características e evolução de pacientes queimados admitidos em unidade de terapia intensiva pediátrica. **Rev Bras Ter Intens.** v.30, n.3, p.333-337, 2018.

BARCIA, M. T. Estudo dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante de subprodutos do processo de vinificação. 2014. 234 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

BARROS, E. M. L., SANTOS, D. K. B., COELHO, N. P. M. F., REIS, M. R., BEZERRA, B. G. Efeitos da *Passiflora edulis* S.no processo de cicatrização em queimaduras induzidas em camundongos. **Cons Saúde.** v.15, n.1, p.122-128, 2016.

BARONI, A., BUOMMINO, E., GREGORIO, V., RUOCCO, E., RUOCCO, V., WOLF, R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clin Dermatol.** v.30. n.3, p. 257-62, 2012.

BATHIA, N., KAUR, G., SONI, V., KATARIA, J., DHAWAN, R. K. Evaluation of the wound healing potential of isoquercetin-based cream on scald burn injury in rats. **Burns Trauma.** v.7, n.7, p.1-8, 2016.

BATISTA, L. L. V. CAMPESATTO, E. A., DE ASSIS, M. L. B., BARBOSA, A. P. F., GRILLO, L. A. M., DORNELAS, C. B. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 39, n.6, p. 515-520, 2012.

BARREIROS, A. L. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between

the formation of reactive species and the organism's defense. **Quím. Nova.** v.29. n.1, 2006

BEAK, S. M., PAEK, S. H., JAHNG, Y., LEE, Y. S., KIM, J. A. Inhibition of uva irradiation-modulated signaling pathways by rutaecarpine, a quinazolinocarboline alkaloid, in human keratinocytes. **Eur. J. Pharmacol.** v.498,n.1-3, p.19-25, 2004.

BEAUSAN, E., FLOYD, H., DUNN, K., ORTON, C., FEGURSON, M. A new quantitative scale for clinical scar assessment. **Plastic Reconstructive Surgery,** v.102, n.6, p.1954-1961, 1998.

BELTRAMINO, R., PENENORY, A., BUCETA, A. M. An open-label, randomized multicenter study comparing the efficacy and safety of cyclo 3 fort® versus hydroxyethyl rutoside in chronic venous lymphatic insufficiency. **Angiology.** v. 51, n.7, p.535–544, 2000.

BEN-DJEMAA, F. G., BELLASSOUED, K., ZOUARI, S., EL-FEKI, A., AMMAR, E. Antioxidant and wound healing activity of Lavandula aspic L. ointment. **J Tissue Viability.** v.25, n.4, p.193-200, 2016.

BHATTARAI, N., RAMAY, H. R., GUNN, J., MATSEN, F. A., ZHANG, M. PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. **J Control Rel.** v. 103, n. 3, p. 609–624, 2005.

BIELEFELD, K. A., S. AMINI-NIK, ALMAN, B. A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cell Mol Life Sci.** v. 70, p. 2059–2081, 2013.

BOFFITO, M., GIOFFREDI, E., CHIONO, V., CALZONE, S., RANZATO, E., MARTINOTTI, S., CIARDELLI, G. Novel polyurethane-based thermosensitive hydrogels as drug release and tissue engineering platforms: Design and in vitro characterization. **Polymer International,** v. 65, n. 7, p. 756–769, 2016

BOMFIM, H. F., LUCCHESI, A. M., FREITAS, M. M., SANTANA, A. F. Composição Química e Atividade Antioxidante de Inflorências de Lippia alnifolia Mart. & Schauer. Anais Seminário de Iniciação Científica – 2016. Disponível em: <http://periodicos.uefs.br/index.php/semic/article/view/3284/2689>. Acesso em: 01 jun. 2020

BORGES, E. L.; SAAR, S. R. C.; LIMA, V. L. A. N.; GOMES, F. S. L.; MAGALHÃES, M. B. B. Feridas: Como Tratar. 2ª Ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2008. 248p.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Rev Bras Ciênc Farmac.** v. 42, n. 4, p.531-537, 2006.

BORTOLON, F. F. Desenvolvimento de nanoemulsões contendo fração flavonoídica enriquecida com diosmina e hesperidina em hidrogeis para a aplicação tópica cutânea visando tratamento de doenças venosas crônicas. 2018. 159p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de

Santa Catarina. Florianópolis. 2018.

BRADLEY, P. P., PRIEBAT, D. A., CHRISTENSEN, R. D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. v.78, p.206-209, 1982.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Queimados, 2017. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/component/content/article/842-queimados/40990>- Acesso em: 19 abr. 2020

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2017/06/um-milhao-de-brasileiros-sofrem-queimaduras-por-ano>. Acesso em: 14 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Publicada a renome 2017. Veja o que mudou para fitoterápicos. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/noticias/sas/1334-fitoterapicos-noticias/29538-publicada-a-renome-2017-veja-o-que-mudou-para-fitoterapicos>. Acesso em: 22 abr. 2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : RENAME 2017, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos Brasília, 2017.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira. V.1 5ed. Brasília, 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5%C2%AA+edi%C3%A7%C3%A3o++Volume+1/4c530f86-fe83-4c4a-b907-6a96b5c2d2fc>. Acesso em: 01 jun. 2020

BRIGELIUS-FLOHÉ R., MAIORINO M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. v. 1830, n.5, p. 3289–3303, 2013.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. *Plastic Reconstruct Surg*. v.117, n.7S, p.12S-34S, 2006.

BROWNLOW, B., NAGARAJ, V.J., NAYEL, A., JOSHI, M., ELBAYOUMI, T. Development and in vitro evaluation of vitamin E-enriched nanoemulsion vehicles loaded with genistein for chemoprevention against UVB-induced skin damage. *J Pharm. Sci*. v.104, n10, p.3510-3523, 2015.

BROMBERG, L. E.; RON, E. S. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. v. 31, n. 3, p. 197–221, 1998.

BUGNOTTO, C., SOARES, G., LAPORTA, L. V., ALVES, M. P., SCHMIDT, C. A., LIMBERGER. J. B. Estudo de estabilidade de formulação tópica contendo Propólis. *Ciênc Saúde*. v.7, n.1, p.1-12, 2006.

CABULON, E. A. L. C., MARTINS, J. T., ROBAZZI, M. L. C. C., CARDELLI, A. A. M.

Atendimento no ambulatório de um Centro de Tratamento de queimados do Sul do Brasil: perfil e opinião dos usuários. **O Mundo da Saúde**. v.39, n.4, p.410-418, 2015.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**. v. 33, n.2, p. 179–189, 2000.

CAMPANINI, M. Z., PINHO-RIBEIRO, F. A., IVAN, A. L. M., FERREIRA, V. S., VILELA, F. M. P., VICENTINI, F. T. M. C., MARTINEZ, R. M., ZARPELON, A. C., FONSECA, M. J. V., FARIA, T. J., BARACAT, M. M., VERRI JÚNIOR, W. A., GEORGETTI, S. R., CASAGRANDE R. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **J Photochem photobio B: Biology**. v.127, p.153-160, 2013.

CAMPANINI M.Z., CUSTODIO, D.L., IVAN, A.L., MARTINS, S.M., PARANZINI, M.J., MARTINEZ, R.M., VERRI, W.A., JR., VICENTINI, F.T., ARAKAWA, N.S., DE, J.F.T., BARACAT, M.M., CASAGRANDE, R., GEORGETTI, S.R. Topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract: In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced oxidative stress. **AAPS Pharm Sci Tech**. 15, 86-95, 2014.

CAMPELO, A. P. B. S., CAMPELO, M. W. S., BRITTO, G. A. C., AYALA, A. P., GUIMARÃES, S. B., VASCONCELOS, P. R. L. Um modelo animal aperfeiçoado para estudo de queimaduras superficiais e profundas da pele. **Acta Cir Bras**. v.26, p.38-41, 2011.

CAMPELO, A. P. B. S. Efeitos nutracêuticos do leite enriquecido com ômega 9, 6 e 3 em ratos submetidos à queimadura térmica por condução direta. 2018. 158p. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD, Arq Bras Cir Dig**. v.20, n.1, p.51-58, 2007.

CARAMELLA, C. M., ROSSI, S., FERRARI, F., BONFERONI, M. C., SANDRI, G. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. **Adv Drug Deliv Ver**. v. 92, p. 39–52, 2015.

CAROCHO, M., FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem Toxicol**. v.51, p.15-25, 2013.

CARVALHO, O. V., Oliveira, F. S., Saraiva, G. L., Botelho, C. V., Ferreira, H. C. C., Santos, M. R., Silva Júnior, A., Almeida, M. R. Potencial antiviral da quercetina sobre o parvovírus canino. **Arq Bras Med Vet Zootec**. v.65, n.2, p. 353-358, 2013.

CASTILLO, J., BENAVENTE, O.,BORREGO, F.,DEL RIO, J. A. Analysis of commercial hesperidin methyl chalcone by highperformance liquid chromatography. **J Chromat**. v. 555, n. 1-2, p. 285-290, 1991.

CASAGRANDE, R., GEORGETTI, S. R., JUNIOR, W. A. V., DORTA, D. J., SANTOS,

A. C., FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **J Photochem Photobio B: Bio.** v. 84, n. 1, p. 21-27, 2006.

CETINKALE, O., SENEL, O., BULAN, R. The effect of antioxidante therapy on cell-mediated immunity following burn injury in an animal model. **Burns.** v. 25, n. 2, p. 113–118, 1999.

CÉSAR, J., PAOLI, M. A. D., ANDRADE, J. C. A determinação da densidade de sólidos e líquidos. **Rev Chemkeys,** n. 7, p.1-8, 2018.

CHANG, J. Y., OH, Y. K., KONG, H. S., KIM, E. J., JANG, D. D., NAM, K. T., KIM, C. K. Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. **J Control Rel.** v.82, n.1, p.39-50, 2002.

CHUNG, Y. M., SIMMONS, K. L., GUTOWSKA, A., JEONG B. Sol-gel transition temperature of PLGA-g-PEG aqueous solutions. **Biomacromol.** v.3, n.3, p.511–516, 2002.

CIARLINI, P. C., PATRÍCIO, R. F., COUTO, R., BONELLO, F. L. Efeito da vacina polivalente sobre o leucograma e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães. **Arq Inst Biológico.** v.71, n.3, p.323-327, 2004.

COREN-AP. COSELHO REGIONAL DE ENFERMAGEM DO AMAPÁ. Babosa e holerlã entram na lista de remédios oferecidos pelo SUS, 2012. Disponível em: https://www.coren-ap.gov.br/babosa-e-hortela-entram-na-lista-de-remedios-oferecidos-no-sus_47.html. Acesso em: 24 abr 2020.

CORREIA, M. I. T. D. Antioxidação - O papel das vitaminas. **Rev Bras Nutr Clin.** v.16, n.2, p.74-78, 2001.

COSTA, A. C. S. M., ALVES, A.S., SOUZA, E. S. Aplicação de membranas de colágeno contendo ácido úsnico incorporado em lipossomas no processo de cicatrização de queimaduras em áreas especiais. **Rev Bras Queimad.** v.17, n.2, p. 94-99, 2018.

COSTA, V.P., MAYWORM, M. A. S. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes - município de Extrema, MG, Brasil. **Rev Bras PI Med.** v. 13, n. 3, p. 282-292, 2011

COTINGUIBA, G.G., SILVA, J. R. N., AZEVEDO, R. R.S, ROCHA, T. J. M., DOS SANTOS, A F. Methods of the Antioxidant Defense: A Literature Review. **Cient Ciênc Biol Saúde.** v.15, n.3, p.231-237, 2013.

CRUZ, R. G. Potencia de metabólitos da acerola (Malpighi emarginata) como antioxidantes em diferentes sistemas oxidativos mediados por radicais livres. 2017. 134p. Tese (Doutorado) – Universidade São Paulo, Piracicaba, 2017.

CUNHA, A. P. Farmacognosia e fitoquímica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010. 670p.

DALMEDICO, M. M., MEIER, M. J., FELIX, J. V. C., POTT, F. S., PETZ, F. F. C., SANTOS, M. C. Hyaluronic acid covers in burn treatment: a systematic review. **Rev Esc Enferm USP**. v.50, n.3, p.519-524, 2016.

DAVIS, S. C., PEREZ, R. Cosmeceuticals and natural products: wound healing. **Clin Dermat**. v. 27, n. 5 p. 502-506, 2009.

DEBIASI, M. M. Comparação do efeito da dexametasona, diclofenaco e associação na evolução da cicatrização de queimaduras em ratos. 2017. 72p. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Oeste de Santa Catarina, Videira, 2017.

DE GROOT, L., ABALOVICH, M., ALEXANDER, E. K., AMINO, N., BARBOUR, L., COBIN, R. H., EASTMAN, C. J., LAZARUA, J. H., LUTON, D., MANDEL, S. J., MESTMAN, J., ROVET, J., SULLIVAN, S. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 97, n.8, p.2543–2565, 2012.

DE SMET, K., VAN DEN PLAS, D., LENS, D., SOLLIE, P. Pre-clinical Evaluation of a New Antimicrobial Enzyme for the Control of Wound Bioburden. Wounds Compend **Clin Res Pract**. v.21, n.3, p.65–73, 2009.

DEVI, D. R.; SANDHYA, P.; HARI, B. N. V. P: A novel functional molecule for drug delivery and gene therapy. **J Pharmac Sci Res**. v.5, n.8, p.159–165, 2013.

DEWAN, M., BHOWMICK, B., SARKAR, G., RANA, D., BAIN, M. K., BHOWMIK, M., CHATTOPADHYAY, D. Effect of methyl cellulose on gelation behavior and drug release from P based ophthalmic formulations. **Int J Bio Macromol**. v.72, p.706–710, 2015.

DIAS, C. A. R., MOURA, P. M. S. S., D'ANGELIZ, C. E. M. A complexa interação entre radicais livres, suplementação e doenças. **Rev Multidiscip**. v.10, p.34-43, 2010.

DINIZ, Sílvia Nerantzoulis da Cunha. Vitaminas antioxidantes, carotenoides, polifenóis e envelhecimento. 2015. 46p. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015.

DROSE, S., BRANDT, U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Adv Exp Med Biol**.v.748, p.145–169, 2012.

DUMORTIER, G., GROSSIORD, J. L., AGNELY, F., CHAUMEIL, J.C. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharm Res**. v.23, n.12, p.2709–28, 2006.

DURGAPRASAD, S., REETESH, R., HAREESH, K., RAJPUT, R. Effect of a topical curcumin preparation (BIOCURCUMAX) on burn wound healing in rats. **J pharm biom sci**. v.8, n. 23, p. 1-3, 2011.

EL-REFAIE, W. M., ELNAGGAR, Y. S., EL-MASSIK, K. A., ABDALLAH, O. Y. Novel curcumin-loaded gel-core hyalurosomes with promising burn-wound healing potential:

development, in-vitro appraisal and in-vivo studies. *Int J Pharm.* v. 486, n. 1-2, p. 88-98, 2015.

ELKINS-WILLIAMS, S. T., MARSTON, W. A.; HULTMAN, C. S. Management of the Chronic Burn Wound. *Clin Plastic Surg*, v.44, n.3, p. 679–687, 2017.

ERUKOVA, V. Y., KRYLOVA, O. O., ANTONENKO, Y. N., MELIK-NUBAROV, N. S. Effect of ethylene oxide and propylene oxide block copolymers on the permeability of bilayer lipid membranes to small solutes including doxorubicin. *Biochim Biophys Acta*. v. 1468, n.1, p.73–86, 2000.

EVERS, L. H., BHAVSAR, D., MAILÄNDER, P. The biology of burn injury. *Exp Dermatol*. v.19, n.9, p777-783, 2010.

FAKHARI, A., CORCORAN, M., SCHWARZ, A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. *Heliyon*. v. 3, n.8, 2017.

FANG, Q., GUO, S., ZHOU, H., HAN, R., WU, P., HAN, C. Astaxanthin protects against early burn-wound progression in rats by attenuating oxidative stress-induced inflammation and mitochondria-related apoptosis. *Sci Rep*. v.7, 2017.

FARINAS, A. F., BAMBA, R., POLLINS, A. C., POLLINS, A. C., CARDWELL, N. L., THAYER, W. P. Burn wounds in the young versus the aged patient display differential immunological responses. *Burns*. v.44, n.6, p.1475-1481, 2018.

FERNANDES, A. T., RIBEIRO FILHO, N. Infecção em queimados. In: Fernandes AT, Fernandes MOV, Ribeiro Filho N, orgs. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: Atheneu. p.657- 69, 2000

FERNANDES-JUNIOR, A.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciênc Rural*. v. 36, n.1, p.294-297, 2006.

FERREIRA, E., LUCAS, R., ROSSI, L. A., ANDRADE, D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. *Rev Esc Enfer USP*. v.37, n.1, p.44-51, 2003.

FERREIRA, F. V.; PAULA, L. B. Sulfadiazina de prata versus medicamentos fitoterápicos: estudo comparativo dos efeitos no tratamento de queimaduras. *Rev Bras Queimad*. v.12, n.3, p.132–139, 2013.

FERREIRA, A. de O. Guia Prático da Farmácia Magistral, 4^a ed., São Paulo: Pharmabooks, 2010

FITZMAURICE, S. D., SIVAMANI. R. K., ISSEROFF, R. R. Antioxidant Therapies for Wound Healing: A Clinical Guide to Currently Commercially Available Products. *Skin Pharmacol Physiol*. v. 24, n. 3, p.113–126, 2011.

FONTES, S. M. S. Curcuma longa L: caracterização química e estudo da capacidade antioxidante. 2018. 64 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018.

FRANCK, C. L., SENEGAGLIA, A. C., LEITE, L. M. B., RIBAS-FILHO, J. M. Padronização de queimaduras térmicas em ratos por contato direto com a superfície cutânea. **Rev Bras Queimad.** v.17, n.1, p.14-19, 2018.

FRANKLIN, C. C. Enhanced glutathione: biosynthetic capacity promotes resistance to AS3+ induced apoptosis. **Toxic Letters.** v.193, n.1, p.33-40, 2010.

FRANSCICONI, M. H. G., ITAKUSSU, E. Y., VALENCIANO, P. J., FUJISAWA, D. S., TRELHA, C. S. Perfil epidemiológico das crianças com queimaduras hospitalizadas em um Centro de Tratamento de Queimados. **Rev Bras Queim.** v.15, n.3, p.137-141, 2016.

FREITAS, M. N., FARAH, M., BRETAS, R. E. S., RICCI-JÚNIOR, E., MARCHETTI, J. M. Rheological characterization of Poloxamer 407 nimesulide gels. **Rev. Ciênc. Farm . Básica Apl.** v. 27, n.1, p.113-118, 2006

FRIERI, M., KUMAR, K., BOUTIN, A. Wounds, burns, trauma, and injury. **Wound Med.** v. 13, p. 12–17, 2016.

FRIESE, G. Burn injury assessment. An interactive lesson plan for burn injury management and care. **EMS magazine,** v. 38, n.10, p. 91-92, 2009.

FRYKBERG, R.G., BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. **New Rochelle.** v.4, n.9, p.560–582, 2015.

FULLER, F. W. The side effects of silver sulfadiazine. **J Burn Care Res.** v.30, n.3, p.464–70, 2009.

GALICKA, A., KRETOWSKI, R., NAZARUK, J., CECHOWSA-PASKO, M. Anethole prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis and collagen metabolism alterations in human skin fibroblasts. **Mol Cell Biochem,** v. 394, p. 217–224, 2014.

GARG, A., GARG, S., ZANEVELD, L. J., SINGLA, A. K. Chemistry and pharmacology of the Citrus 627 bioflavonoid hesperidin. **Phytother. Res.** v.15, n.8, p. 655–669, 2001.

GENUINO, G. A, BALUYUT-ANGELES, K. V., ESPIRITU, A. P., LAPITAN, M. C., BUCKLEY, B. S. Topical petrolatum gel alone versus topical silver sulfadiazine with standard gauze dressings for the treatment of superficial partial thickness burns in adults: a randomized controlled trial. **Burns.** v.40, n.7, p.1267-1273, 2014.

GEORGETTI S.R., CASAGRANDE, R., MOURA-DE-CARVALHO VICENTINI, F.T., VERRI, W.A., JR., FONSECA, M.J. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. **Eur. J. Pharm Biopharm,** v. 64, n.1, p. 99-106, 2006.

GETHIN, G. The significance of surface pH in chronic wounds. **Wounds – UK.** v.3, p.52–6, 2007.

GHOSH, D., MONDAL, S., RAMAKRISHNA, K. A topical ointment formulation containing leaves extract of *Aegialitis rotundifolia* Roxb., accelerates excision, incision and burn wound healing in rats. **Wound Medicine**. v.26, n.1, 2019.

GILBERT, J. C., HADGRAFT, J., BYE, A., BROOKES, L. G. Drug release from Pluronic F-127 gels. **Int J Pharmac**. v.32, p.223-228, 1986.

GIORDANI, A.T., SONOBE, H.M., GUARINI, G., STADLER, D.V. Complicações em pacientes queimados: revisão integrativa. **Rev Eletr Gestão & Saúde**. v.7, n.2, p.535-548, 2016.

GIULI, A. E., ITAKUSSU, E. Y., VALENCIANDO, P. J., FUJISAWA, D. S., TRELHA, C. S. Caracterização de idosos vítimas de queimaduras internados em um centro de tratamento de queimados. **Rev Bras Queim**. v.14, n.4, p.253-256, 2015.

GHLISSI, Z., KALLELB, R., SILAC, A., HARRABIA, B., ATHEYMENA, R., ZEGHALA, K., BOUGATEFC, A., SAHNOUNA, Z.. *Globularia alypum* methanolic extract improves burn wound healing process and inflammation in rats and possesses antibacterial and antioxidant activities. **Biomed Pharmac**. v.84, p.1488–1495, 2016.

GOMES, B. R. B. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio durante a febre e a antipirese em ratos. 2017. 75 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

GRAGNANI, A., MULLER, B.R., SILVA, I.D. NORONHA, S.M. FERREIRA, L.M. Keratinocyte growth factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta gene expression in cultured fibroblasts and keratinocytes from burned patients. **Acta Cir Bras**. v.28, n.8, p.551-558, 2013.

GREGORY, S. R., PICCOLO, N., PICCOLO, M. T., PICCOLO, M. S., HEGGERS, J. P. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. **J Alt Complem Med**. v. 8, n. 1, p. 77-83, 2002.

GUARATINI, T., MEDEIROS, M. H. G., COLEPICCOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Quim Nova**. v.30, n.1, p.206-213, 2007.

GUEX, J. J., AVRIL, L., ENRICI, E., ENRIQUEZ, E., LIS, C. Quality of life improvement in Latin American patients suffering from chronic venous disorder using a combination of *Ruscus aculcatus* and hesperidin metyl chalcone and acid ascorbic (quality study). **Int Angiol**. v.29, n. 6., p. 525-532, 2010.

GUIMARÃES, F. L. R. Efeitos da inibição do complexo enzimático NADPH oxidase nas adaptações do estado redox e da função contrátil do músculo esquelético induzidos pelo treinamento físico em ratos. 2015. 95p. Dissertação (Mestrado). Univerisdade de São Paulo – Escola de Educação Física e Esporte, São Paulo, 2015.

HAMBLIN, M.R. Novel pharmacotherapy for burn wounds: what are the

advancements. *Exp Opi Pharmacot.* v.20, n.3, p.305-325, 2018.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. The chemistry of free radicals and related "reactive species". In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rded. Oxford: Clarendon Press, 1999, p.36-104.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*. v.186, n.1981, p.1–85,1990.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med.* v.46, n.5, p.531–542, 2009.

HAMID, A. A., SHAH, Z. M., MUSE, R., MOHAMED, S. Characterization of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. *Food Chemistry*. v. 77, n. 4, p.565-469, 2002.

HANI, U., SHIVAKUMAR, H. Development of Miconazole nitrate Thermosensitive Bioadhesive Vaginal Gel for Vaginal Candidiasis. *Amer J Adv Drug Deliv..* v. 3, p. 358–368, 2013.

HEIDARI, M., BAHRAMSOLTANI, R., ABDOLGHAFFARI, A. H., RAHIMI, R., ESFANDYARI, M., BAEERI, M., HASSANZADEH, G., ABDOLLAHI, M., FARZAEI, M. H. Efficacy of topical application of standardized extract of *Tragopogon graminifolius* in the healing process of experimental burn wounds. *J Trad Chin Medic Sci.* v.9, n.1, p.54-59, 2019.

HIRSCH, D., LEVY, S., NADLER, V., KOPEL, V., SHAINBERG, B., TOLEDANO, Y. Pregnancy outcomes in women with severe hypothyroidism. *Eur J Endocrinol.* v. 169, n.3, p.313-320, 2013.

HORST, B. T., CHOUHAN, G., MOIEMEN, N. S., GROVER, L. M. Advances in keratinocyte delivery in burn wound care. *Adv Drug Deliv Ver.* v.123, p.18–32, 2018.

HORTON, J. W. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology.* v.189, p.75-88, 2003.

HORTON, J. W., WHITE, D. J., MAASS, D. L., HYBKI, D. P., HAUDEK, S., GIROIR., B. Antioxidant vitamin therapy alters burn trauma traumamediated cardiac NF-kappaB activation and cardiomyocyte cytokine secretion. *J Trauma* v. 50, n. 3, p. 397–408, 2001.

HUBNER, N.O., KRAMER, A. Review on the efficacy, safety and clinical applications of polyhexanide, a modern wound antiseptic. *Skin Pharmacol Physiol.* v.23, n.1, p.17-27, 2010.

IGHODARO, O. M., AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex J Med.* v.54, p.287-293, 2018.

INOUE, Y., LIU, Y. M., OTAWARA, M., CALERO, I. C., NAM, A. S., YU, Y-M., CHANG,

P., BUTLER, K. L., NAZARIAN, R. M., GOVERMAN, J., VAKOC, B. J., IRIMIA, D. Resolvin D2 Limits Secondary Tissue Necrosis After Burn Wounds in Rats. **J Burn Care Res.** v.39, n.3,p.423-432, 2018.

ISAAC, V. L. B., CEFALI, L. C., CHIARI, B. G., OLIVEIRA, C. C. L. G., SALGADO, H. R. N., CORREA, M. A. Protocolo para ensaios fisico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **J Basic App Pharmac Sci.** v.29, n.1, p. 81-96, 2008.

IVAN, A. L. M., CAMPANINI, M. Z., MARTINEZ, R. M., FERREIRA, V. S., STEFFEN, V. S., VICENTINI, F. T. M. C., VILELA, F. M. P., MARTINS, F. S., ZARPELON, A. C., CUNHA, T. M., FONSECA, M. J. V., BARACAT, M. M., GEORGETTI, S. R., VERRI-JR, W. A., CASAGRANDE, R. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. **J Photochem Photobio B: Biology.** v.138, p.124–133, 2014.

JANTSCHKO, W., FURTMÜLLER, P. G., ZEDERBAUER, M., NEUGSCHWANDTNER, K., LEHNER, I., JAKOPITSCH, ., ARNHOLD, J., OBINGER, C. Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. **Biochem. Pharmacol.** v. 69, n.8, p.1149–1157, 2005.

JASKILLE, A. D.; SHUPP, J. W.; JORDAN, M. H.; JENG, J. C. Critical review of burn depth assessment techniques: Part I. Historical review. **J burn care res.** v. 30, n. 6, p. 937-947, 2009.

JAWIEN, A., BOUSKELA, E., ALLAERT, F. A., NICOLAÏDES, A.N. The place of Ruscus extract, hesperidin methyl chalcone, and vitamin C in the management of chronic venous disease. **Int Angiol.** v.36, n. 1, p.31– 41, 2017.

JOHNSON, C. Management of burns. **Surgery,** v.36, n.8, p.435–440, 2018.

JUNG, Y., PARK, W., PARK, H., LEE, D. K., NA, K. Thermo-sensitive injectable hydrogel based on the physical mixing of hyaluronic acid and Pluronic F-127 for sustained NSAID delivery. **Carbohydrate Polymers.** v.156, p.403–408, 2017.

JUNIOR, A. A. J.,CHIARELLO, P. G., BERNARDES, M. S., VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da Glutathiona reduzida e da vitamina E. Medicina, Ribeirão Preto. v.31, p. 343-449, 1998.

JUNIOR, G.; VIEIRA, A. C.; ALVES, G. Avaliação da qualidade de vida de indivíduos queimados pós alta hospitalar. **Rev Bras Queimaduras.** v. 9, n. 4, p. 140-5, 2010.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. 2018. Histologia básica. 13ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 568p.

KABANOV, A. V; BATRAKOVA, E. V; VALERY, Y. A. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. **J Control Rel.** v.82, p.189–212, 2002.

KAKKOS, S. K., BOUSKELA, E., JAWIEN, A., NICOLAIDES, A N. New data on chronic

venous disease: a new place for Cyclo 3® Fort. *Int Angiol.* v.37, n.1, p.85–92, 2017.

KANEKO, J.J., HARVEY, J., BRUSS, M. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6ed. Academic Press, San Diego, 2008. 932p.

KANT, V., GOPAL, A., KUMAR, D., GOPALKRISHNAN, A., PATHAK, N. N., KURADE, N. P., TANDAN, S. K., KUMAR, D. Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats. *Acta Histochem.* v. 116, n.1, p. 5–13, 2013.

KAROLEWICZ, B. A review of polymers as multifunctional excipients in drug dosage form technology. *Saudi Pharmac J.* v.24, n.5, p.525-536, 2015.

KATALINIC, V., MODUN, D., MUSIC, I., BOBAN, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2V-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol – Part C.* v.140, p.47-52, 2005.

KAUFMAN, T., BERGER, J. Topical pH and burn wound healing: a review. Beyond occlusion: wound care proceedings. *Royal Soc Med Serv Limit Isr.* p.55–9, 1988.

KECK, M., HERNDON, D.H., KAMOLZ, L.P., FREY, M., JESCHKE, M.G. Pathophysiology of burns. *Wien Med Wochenschr.* v.159, n.13-14, p.327–336, 2009.

KENWORTHY, P., PHILLIPS, M., GRISBROOK, T. L., GIBSON, W., WOOD, F. M., EDGAR, D. W. Monitoring wound healing in minor burns - A novel approach. *Burns.* v. 44, p. 70–76, 2018.

KIM, G. H., KIM, J. E., RHIE, A. J., YOON, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobio.* v. 24, n.4, p.325, 2015.

KING, B. A, OH, D. A. Spatial control of reactive oxygen species formation in fibroblasts using two-photon excitation. *Photochem photobiol.* v. 80, p.1-6, 2004.

KIRCHHOF, S., GOEPFERICH, A. M., BRANDL, F. P. Hydrogels in ophthalmic applications. *Eur J Pharm Biopharma.* v.95, p.227–238, 2015.

KIRTLEY, W. R., PECK, F. B. Administration of Massive Doses of Vitamin P. *Am J Med Sci.* v. 216, n. 1, p. 64–70, 1948.

KLOUDA, L. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications A seven-year update. *Eur J Pharmac Biopharmac.* v. 97, p. 338–349, 2015.

KOFFI, A. A., AGNELY, F., PONCHEL, G., GROSSIORD, J. L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. *Eur J Pharm Sci.* v.27,n.4,p.328–335,2006.

KOWALSKE, K. J. Burn Wound Care. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* v.22, n.2, p. 213–227, 2011.

KVAM, E., DAHLE, J. Pigmented Melanocytes Are Protected Against Ultraviolet-A-Induced Membrane Damage. **J. Invest. Dermatol.** v.121, n.3, p. 564-569, 2003.

KUMAR, S., PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **J Sastre.** v.2013, p.1-16, 2013.

KUMAVAT, S. D., CHAUDHARI, Y. S., BOROLE, P., SHENGHANI, K., DUVVURI, P., BUBERA, N., SHAH, P. Characterization and Evaluation of Curcumin - PVP Solid Dispersion by Solvent Evaporation Technique. **Int J Phar Res Sci.** v.2, n.5, p.693–706, 2013.

KWEON, H., YOO, M.-K., LEE, J.-H., WEE, W.-R., HAN, Y.-G., LEE, K.-G., CHO, C.-S. Preparation of a novel poloxamer hydrogel. **J App Polym Sci,** v.88, n.11, p, 2670–2676, 2003.

LANDÉN, N. X., LI, D., STAHL, M. Transition from inflammation to proliferation : a critical step during wound healing. **Cell Mol Life Sci.** v. 73, p. 3861–3885, 2016.

LATHA B, BABU M. The involvement of free radicals in burn injury: a review. **Burns.** v. 27, n.4, p.309-317, 2001.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de feridas. **Rev Soc Portug Dermat e Venereol.** v. 69, n.3, p.355, 2011.

LAWRENCE, W. T., DIEGELMANN, R. F. Growth factors in wound healing. **Clin. Dermatol.** v.12, p.157–169, 1994.

LEE, A. R. C., LEEM, H., LEE, J., PARK, K. C. Reversal of silver sulfadiazine-impaired wound healing by epidermal growth factor. **Biomaterials.** v.26, n.22, p.4670-4676, 2005.

LEE, A-R. C., MOON, H. K. Effect of topically applied silver sulfadiazine on fibroblast cell proliferation and biomechanical properties of the wound. **Arch Pharm Res.** v.26, n.10, p.855–60, 2003.

LIMA, G. L., JÚNIOR, R. A. S., SILVA, R. L. M., CINTRA, B. B., BORGES, K. S. Características dos idosos vítimas de queimaduras no Hospital de Urgências de Sergipe. **Rev Bras Queim.** v.16, n.2, p.100-105, 2017.

LIMA-JÚNIOR, E. M., SERRA, M. C. Tratado de Queimaduras. São Paulo: Atheneu, 2004.

LIMA-JUNIOR, E. M., PICOLLO, N. S., MIRANDA, M. J. B., RIBEIRO, W. L. C., ALVES, A. P. N. N., FERREIRA, G. E., PARENTE, E. A., MORAES-FILHO, M. O. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Rev Bras Queim.** v.16, n.1, p.10-17, 2017.

MACEDO, A. R. A EXPERIÊNCIA DA QUEIMADURA: implicações subjetivas e socioculturais. 2018. 44p. Dissertação (Mestrado) – Univerisadade Estadual Paulista,

Assis, 2018.

MACEDO, J. L. S., ROSA, S. C., MACEDO, K. C. S., CASTRO, C. Fatores de risco da sepse em pacientes queimados. **Rev Col Bras Cir.** v. 32, n.4, p.173-177, 2005.

MAULUDIN, R.; MÜLLER, R. H. Physicochemical properties of hesperidin nanocrystal. **Int J Pharmacy Pharmac Sci.** v. 5, n.3, p.954–960, 2013.

MANACH C., SCALBERT, A., MORAND, C., REMESY, C., JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. A. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I Cicatrization: current concepts and auxiliary resources-Part I. **An Bras Dermatol**, v.78, n.4, p.393-410, 2003.

MARKESON, D., PLEAT, J. M., SHARPE, J. R., HARRIS, A. L., SEIFALIAN, A. M., WATT, S. M. Scarring, stem cells, scaffolds and skin repair. **J Tissue Eng Regen Med.** v.9, n.6, p.649-668, 2015.

MARMITT, D. J., BITENCOURT, S., SILVA, A. D. C. E., REMPEL, C., GOETTERT, M. I. T The healing properties of medicinal plants used in the Brazilian public health system: a systematic review. **J Wound Care.** v.27, n.6, p.4-13 2018.

MARTINEZ, R. M., PINHO-RIBEIRO, F. A., STEFFEN, V. S., CAVIGLIONE, C. V., PALA, D., BARACAT, M. M., GEORGETTI, S. R., VERRI-JUNIOR, W. A., CASAGRANDE, R. Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation. **Photochem Photobiol Sci.** v. 15, n.4, p. 554–563, 2016.

MARTINEZ, R. M., PINHO-RIBEIRO, F. A., STEFFEN, V. S., CAVIGLIONE, C. V., PALA, D., BARACAT, M. M., GEORGETTI, S. R., VERRI-JUNIOR, W. A., CASAGRANDE, R. Hesperidin methyl chalcone inhibits oxidative stress and inflammation in a mouse model of ultraviolet B irradiation-induced skin damage. **J. Photochem. Photobiol.** v.148, p. 145–153, 2015.

MARTINEZ, R. M., FATTORI, V., SAITO, P., MELO, C. B. P., BORGHI, S. M., PINTO, I. C., BUSSMANN, A. J. C., BARACAT, M. M., GEORGETTI, S. R., VERRI JUNIOR, W. A., CASAGRANDE, R. Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. **J Dermat Sci.** v.91, n.2, p.164-174, 2018.

MARTIN, P., LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol.** V.15, n.11, p.599-607, 2005.

MARTINS, N., PETROPOULOS, S., FERREIRA, I. C.F.R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre and post harvest conditions: A review. **Food Chem.** v.21,p.41-50, 2016.

MARUNO, M. Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele. Tese (Doutorado). 2009. 177p. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade de

São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MAZIA, R. S., DE ARAUJO PEREIRA, R. R., DE FRANCISCO, L. M., NATALI, M. R., DIAS FILHO, B. P., NAKAMURA, C. V., BRUSCHI, M. L., UEDA-NAKAMURA, T. Formulation and Evaluation of a Mucoadhesive Thermoresponsive System Containing Brazilian Green Propolis for the Treatment of Lesions Caused by Herpes Simplex Type I. **J Pharmac Sci.** v. 105, n. 1, p. 113–121, 2016.

MCINTYRE, M.K., CLIFFORD, J.L., MAANI, C.V., BURMEISTER, D.M. Progress of clinical practice on the management of burn-associated pain: Lessons from animal models. **Burns.** v.42, n.6, p.1161-1172, 2016.

MCCULLOUGH, M. L., PETERSON, J. J., PATEL, R., JACQUES, P. F., SHAH, R., DWYER, J. T. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. **Am J Clin Nutr.** v.95, n.2, p.454-64, 2012.

MD. SAÚDE. Queimaduras – Graus, Complicações e Tratamentos Caseiros – 2020. Disponível em: <https://www.mdsaude.com/dermatologia/queimaduras/>. Acesso em: 30 jun. 2020.

MENDONÇA, R. J.; MAURÍCIO, V. B.; DE BORTOLLI TEIXEIRA, L.; LCHAT, J. J.; COUTINHO-NETTO, J. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytotherap Res.** v. 24, n. 5, p.764-768, 2010.

MENDONÇA, R. J., COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Bras Dermat.** v. 84, n.3, p.257-62, 2009.

MERCES, P. L. Avaliação das atividades angiogênica e cicatricial do extrato de Aloe vera (*Aloe barbadensis*). 2015. 54p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2015.

MESTMAN, J. H. Thyroid and Parathyroid Diseases in Pregnancy. In: GABBE, S. G., NIEBYL, J. R., SIMPSON, J. L., LANDON, M. B., GALAN, H. L., JAUNIAUX, E. R. M. et al. *Obstetrics normal and problem pregnancies*. 6 ed. Filadelfia: Saunders Elsevier, 2012, p. 922-53.

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I., WITKOWSKA, A. M., ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Adv Med Sci.** v.63, n.1, p.68-78, 2018.

MITSUNAGA JUNIOR, J. K., GRAGNANI, A., RAMOS, M. L. C., FERREIRA, L. M. Rat an experimental model for burns. A systematic review. **Acta Cirurgica Brasileira.** v. 27, n. 6, p. 417-23, 2012.

MOHANTY, C., SAHOO, S. K. Curcumin and its topical formulations for wound healing applications q1. **Drug discovery today.** v.22, n.10, p.152-1592, 2017.

MONTES, F. S.; BARBOSA, H. M.; NETO, S. L. A. Aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes queimados internados em um Hospital de Ensino. **Rev**

Esc Enferm USP. v.45, n.2, p.369-73, 2011.

MOREIRA, A. V. B., MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Rev Nutrição.** v.17, n. 4, p.411-424, 2004.

MORESKI, D. A. B., LEITE-MELLO, E. V. de S., BUENO, F. G. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. **Arq Ciênc Saúde da UNIPAR.** v. 22, n. 1, p. 63-69, 2018.

MOSER, H., PEREIRA, R. R., PEREIRA, L. J. M. Evolução dos curativos de prata no tratamento de queimaduras de espessura parcial. **Rev Bras Queim,** v.12, n.2, p. 60-7, 2013.

MOURA, J. G. P. de M. Nutrientes e Terapêutica: como usá-los, quando usá-los, como avaliar suas carências, radicais livres na saúde. Pelotas: Visão Artes Gráficas, 1ed, 2006. 338 p.

MOZINGO, A. W., AHRENHOLZ, D. H., CUSICK-JOST, J., WICHITA, K. S. Advanced burn life support course provider's manual, 2005.

MUANGMAN, P., PUNDEE, C., OPASANON, S., MUANGMAN, S. A prospective, randomized trial of silver containing hydrofiber dressing versus 1% silver sulfadiazine for the treatment of partial thickness burns. **Int Wound J.** v.7, n.4, p.271-276, 2010.

MUEHLBERGER, T., OTTOMANN, C. The pathophysiology of burns. In: MCLAUGHLIN, E.S.; PATERSON, A.O. Burns Prevention, Causes and Treatment. Nova York: Sci Publis, Inc., p.131-133, 2012.

MURHAMMER, D. W., GOOCHEE, C. F. Sparged animal cell bioreactors: mechanism of cell damage and Pluronic F-68 protection. **Biotechnol Prog.** v. 6, n.5, p. 391–397, 1990.

MURPHY, P.; COLWELL, C.; PINEDA, G.; BRYAN, T. Burning issues. By understanding the pathophysiology of burns, providers can give patients their best chance at good outcomes. **EMS magazine.** v.38, n.10, p.83-90, 2009.

NALBANDIAN, R. M., HENRY, R. L., BALKO, K. W., ADAMS, D. V., NEUMAN, N. R. Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs. **J Biomed Mater Res.** v. 21, n.9, p.1135–1148, 1987.

NASIRI, E., HOSSEINIMEHR, S. J., AZADBAKHT, M., AKBARI, J., ENAYATI-FARD, R., AZIZI, S. Effect of Malva sylvestris cream on burn injury and wounds in rats. **Avicenna J Phytomed,** v. 5, n. 4, p. 341-354, 2015.

NAVARRO, F. K. S. P. Efeito do fotoperíodo na atividade locomotora e parâmetros fisiológicos em fêmeas de lambari (*Astyanax bimaculatus*). UFLA, 2010. 59 p. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias: Ciências Veterinárias, Lavras, Minas Gerais, 2010.

NAYAK, S., NALABOTHU, P., SANDFORD, S., BHOGADI, V., ADOGWA, A. Evaluation of wound healing activity of *Allamanda catártica* L. and *Laurus nobilis* L. extracts on rats. ***BMC Complem Altern Med.*** v.6, n.12, 2006.

NEDEL, D.R. Antioxidantes x radicais livres: a influência das vitaminas antioxidantes no retardo do envelhecimento cutâneo. 2005. 78 f. Monografia - Curso de Graduação em Farmácia, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2005.

NEGRO, R., SCHWARTZ, A., GISMONDI, R., TINELLI, A., MANGIERI, T., STAGNARO-GREEN, A. Increased pregnancy loss rate in thyroid antibody negative women with TSH levels between 2.5 and 5.0 in the first trimester of pregnancy. ***J Clin Endocrinol Metab.*** v.95, n.9, p.E44-E48, 2010.

NETO, J. L., JANSEN, J. L., FARAGO, P. V., SANTOS, F. A. Avaliação físico-química e microbiológica de geltermosensível a base de lidocaína e prilocaína para anestesia periodontal. ***Arq Odont.*** v.42, n.3, p.161-256, 2006.

NG, C. F.; SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R.; RODGERS, V. G. The rate of cellular hydrogen dependency on GSH: mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. ***Free Radic. Res.*** v.41, n.11, p.1201-1211, 2007.

NIU, G., DU, F., SONG, L., ZHANG, H., YANG, J., CAO, H., ZHENG, Y., YANG, Z., WANG, G., YANG, H., ZHU, S. Synthesis and characterization of reactive poloxamer 407s for biomedical applications. ***J Control Real.*** v.138, n.1, p.49-56, 2009.

NOVAES, M. R. C. G., RODRIGUES, C. S., NOVAES, A. G., GOTTEMS, L. B., REIS, C. M. S. Aspectos epidemiológicos y fisiológicos en el tratamiento de adultos mayores quemados. ***Rev Kairós-Gerontol.*** v. 21, n.1, p.149-167, 2018.

OJEH, N., PASTAR, I., TOMIC-CANIC, M., STOJADINOVIC, O. Stem Cells in Skin Regeneration , Wound Healing , and Their Clinical Applications. ***Int J Mol Sci.*** v.16, p. 25476–25501, 2015.

OLIVEIRA, F. M.; FONSECA, Y. M. FONSECA, M. J. V. Desenvolvimento de formulações tópicas antioxidantes. ***Cosmet Toilet.*** v. 20, p. 64-68, 2008.

OLIVEIRA, N. L. Efeito de extratos de própolis brasileira sobre a cicatrização de queimaduras dérmicas profundas. Dissertação (Mestrado). 2010. 64p. Programa de Pós Graduação em Saúde e Ambiente. Aracaju, 2010.

PANIERI, E., SANTORO, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. ***Cell Death Dis.*** v.7, n.6, 2016.

PANZIERA, F. B., DORNELES, M. M., DURGANTE, P. C., SILVA, V. L. Avaliação da ingestão de minerais antioxidantes em idosos. ***Rev Bras Geriatr Gerontol.*** v.14, n.1, p. 49-58, 2011.

PAPANAS, N.; MALTEZOS, E. Polyherbal formulation as a therapeutic option to improve wound healing in the diabetic foot. ***Ind J Med Res.*** v.134, n.2, p.146-147,

2011.

PARIHAR, A., PARIHAR, M. S., MILNER, S., BHAT, S. Oxidative stress na anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**. v.34, n.1, p.6-17, 2008.

PASQUINI-NETTO, H., MANENTE, F. A., MOURA, E. L., REGASINI, L. O., PINTO, M. E. F., BOLZANI, V. S., OLIVEIRA, O. M. M. F., VELLOSA, J. C. R. Avaliação das atividades antioxidante, anti e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de *Pterogyne nitens* Tul.(Fabaceae-Caesalpinioideae). **Rev Bras PI Med**. v.14, n.4, p.666-672, 2012.

PAZYAR, N. YAGHOUBI, R., RAFIEE, E., MEHRABIAN, A., FEILY, A. Skin wound healing and phytomedicine: a review. **Skin Pharmacol Phys**. v.27, n.6, p. 303–310, 2014.

PEPPAS, N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **Eur J Pharmac Biopharmac**. v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.

PERCIVAL, S., MPHIL, S. M., HUNT, J. A., WOODS, E. J. The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. **Wound Rep Regenerat**. v. 22, n. 2, p. 174-186, 2014.

PEREIRA, W. L., OLIVEIRA, T. T., KANASHIRO, M., COSTA, M. R. Ação antiproliferativa-do flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea* L.) contra a linhagem de célula H460. **Rev Bras PI Med**. v. 17, n. 4, p. 798-806, 2015.

PEREIRA, G. G., DIMER, F. A., GUTERRES, S. S., KECHINSKI, C. P., GRANADA, J. E., CARDOZO, N. S. M. Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Química Nova**. v.36, n.8, p.1121–1125, 2013.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A., BARRAJÓN-CATALÁN, E., HERRANZ-LÓPEZ, M., MICOL, V. Nutraceuticals for skin care: A comprehensive review of human clinical studies. **Nutrients**. v.10, n.4, p.1–22, 2018.

PERFOLL, R. Envolvimento do receptor de potencial transitório anquirina 1 (trpa1) na nocicepção e inflamação causadas por lesão térmica em ratos. 2016. 91p. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma 21 jul. 2016.

PESCUMA JÚNIOR, A. J.; MENDES, A.; ALMEIDA, P. C. C. A evolução financeira do setor de queimados, sua legitimidade, seu financiamento e sua complexidade durante o período de 2002 a 2010. **Pesq Deb**, v.24, n.1, p.121-36, 2013.

PHTLS - Atendimento Pré-hospitalar ao Traumatizado. Comitê de Atendimento Pré-hospitalar ao Traumatizado da National Association of Emergency Medical Technicians em colaboração com o Comitê de Trauma do American College of Surgeons. 2017, 8ªed. p. 406-428.

PICCOLO, M. T., WANG, Y., SANNOMIYA, P., PICCOLO, N. S., PICCOLO, M. S.,

HUGLI, T. E., WARD, P. A., TILL, G. O. Chemotactic mediator requirements in lunginjury following skin burns in rats. **Exp Mol Pathol**. v. 66, n.3, p.220–226,1999.

PIANA, M., SILVA, M. A., TREVISAN, G., BRUM, T. F., SILVA, C. R., BOLIGON, A. A., OLIVEIRA, S. M., ZADRA, M., HOFFMEISTER, C., ROSSATO, M. F., TONELLO, R., LAPORTA, L. V., FREITAS, R. B., BELKE, B. V., JESUS, R. S., FERREIRA, J., ATHAYDE, M. L. Antiinflammatory effects of Viola tricolor gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study. **J Ethnopharm**. v.150, n.2, p.458-465, 2013.

PIETTA, G. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod**. v.63, p.1035-1042, 2000.

PINHEIRO, J. D., DO NASCIMENTO, G. N. L. Ação do Aloe vera no reparo tecidual em humanos: uma revisão sistemática. **Rev Interdisc Est Saúde UNIARP**. v.9, n.2, p.1-8, 2019.

PINTAUDI, A. M., TESORIERE, L., D'ARPA, N., D'AMELIO, L., D'ARPA, D., BONGIORNO, A., MASELLIS, M., LIVREA, M. A. Oxidative stress after moderate to extensive burning in humans. **Free Radic Res**. v.33, p.139-146, 2000.

PINHO-RIBEIRO, F. A., HOHMANN, M. S. N., BORGHI, S. M., ZARPELON, A. C., GUAZELI, C. F. S., MANCHOPE, M.F., CASAGRANDE, R., VERRI-JUNIOR, W. A. Protective effects of the favonoid hesperidin methyl chalcone in infammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF-κB. **Chem Biol Interact**. v. 228, n.25, p.88–99, 2015.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT- Food Sci Tec**. v.40, p.1-11, 2007.

PUND, S., RASVE, G., BORADE, G. Ex vivo permeation characteristics of venlafaxine through sheep nasal mucosa. **Eur J Pharmac Sci**. v.48, n.1-2, p.195-201, 2013.

RANI, M., MARTIN, G., SCHWACHA, M. G. Aging and the pathogenic response to burn. **Aging Disease**. v. 3, n.2, p.23–25, 2012.

RASILAINEN, S., NIEMINEN, J. M., LEVONEN, A. L., OTONKOSKI, T., LAPATTO, R. Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide. **Biochem. Pharmacol**. v.63, n.7,p.1297-1304, 2002.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **Eur Surg Res**. v.49, n.1, p: 35-43, 2012.

REIS, G. O., VICENTE, G., DE CARVALHO, F. K., HELLER, M., MICKE, G. A., PIZZOLATTI, M. G., FRODE, T. S. Croton antisiphiliticus Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **Inflammopharmacol**. v. 22, n.2, p. 115–126. 2014.

RENZ, S. V. Oxidação e Antioxidantes. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. Disponível: https://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/oxid_antiox.pdf Acesso em: 04 Abr 2020.

RIBEIRO, R. C. S. Modelo experimental para estudo da cicatrização de queimaduras

de espessura total em ratos e o efeito do Regederm® comprado a sulfadiazina de prata no reparo tecidual. Tese (Doutorado). 2017. 100p. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2017.

RICHARDSON, P., MUSTARD, L. The management of pain in the burns unit. **Burns**. v.35, n.7, p.921-936, 2009.

ROBSON, M. C. Proliferative scarring. **Surg Clin North Am**. v.83, n.3, p.557-569, 2003.

ROCHA, C. L. J. V. Histofisiologia e classificação das queimaduras: Consequências locais e sistêmicas das perdas Teciduais em pacientes queimados. **Rev Inter Est Exper**. v.1, n.3, p.140-147, 2009.

ROCHA, J. L. C. Efeitos da Mitomicina-C tópica e queimadura de camundongos. Dissertação (Mestrado). 2010. 55p. Programa de Pós graduação em cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010.

RODRIGUES, L. Bioengenharia cutânea: metodologias não invasivas de abordagem da pele. **Rev Cosmiatr Med Estética**. v.5, n.2,p.26-35, 1997.

ROSSI, L.A., MENEZEZ, M.A.J., GONÇALVES, N., CIOFI-SILVA, C.L., FARINA-JUNIOR, J.A., STUCHI, R.A.G. Cuidados locais com as feridas das queimaduras. **Rev Bras Queimad**. v. 9, n.2, p.54-59, 2010.

ROWAN, M.P., CANCIO, L.C., ELSTER, E.A., BURMEISTER, D.M., ROSE, L.F., NATESAN, S., CHAN, R.K., CHRISTY, R.J., CHUNG, K.K. Burn wound healing and treatment: Review and advancements. **Crit Care**. v.19, n.1, p.1–12, 2015.

RUEL-GARIÉPY, E., SHIVE, M., BICHARA, A., BERRADA, M. LE GARREC, D., CHENITE, A., LEROUX, J. C. A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel. **Eur J of Pharm Biopharm**. v. 57, n. 1, p. 53–63, 2004.

RUIZ-MIYAZAWA, K. W., PINHO-RIBEIRO, F. A., BORGHI, S. M., STAURENGO-FERRARI, L., FATTORI, V., AMARAL, F. A., TEIXEIRA, M. M., ALVES-FILHO, J. C., CUNHA, T. M., CUNHA, F. Q., CUNHA, F. Q., CASAGRANDE, R., VERRI-JUNIOR, W. A. Hesperidin Methylchalcone Suppresses Experimental Gout Arthritis in Mice by Inhibiting NF- κ B Activation. **J. Agric. Food Chem**. v. 66, n. 24, p. 6269–6280, 2018.

SAITO, S., MELO, C.P.B., MARTINEZ, R.M., FATTORI, V., CEZAR T.L.C., PINTO, I.C., BUSSMANN A.J.C., GEORGETTI S.R., BARACAT, M.M., VERRI JR. W.A.,CASAGRANDE, R. The lipid mediator resolvin D1 reduces the skin inflammation and oxidative stress induced by UV irradiation in hairless mice. **Front. Pharmacol**. v.31, n.9, p. 1242, 2018.

SAITO, Y., SHICHIRI, M., HAMAJIMA, T., ISHIDA, N., MITA, Y., NAKAO, S., HAGIHARA, Y., YOSHIDA, Y., TAKAHASHI, K., NIKI, E., NOGUCHI, N. Enhancement of lipid peroxidation and its amelioration by vitamin E in a subject with mutations in the SBP2 gene. **J Lipid Res**. v.56, n.11, p.2172–2182, 2015

SANCHEZ-GONZALEZ, I., JIMÉNEZ-ESCRIG, A., SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). *Food Chem*, v.90, p.133-139, 2005.

SANTIAGO, V. S., SILVA, G. P. M., RICARDO, D. D., LIMA, M. E. F. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. *Quim Nova*. v. 38, n. 4, p. 538-552, 2015.

SALIBIAN, A. A., ROSARIO, A. T. D., SEVERO, L. A. M., NGUYEN, L., BANYARD, D. A., TORANTO, J. D., EVANS, G.R.D., WIDGEROW, A.D. Current concepts on burn wound conversion — A review of recente advances in understanding the secondary progressions of burns. *Burns*, v.42, n.5, p.1025– 1035, 2016.

SÁNCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (italian, espresso and filter). *Food Chem*. v.90, n.2, p.133-139, 2005

SANTOS, M. O., RIBEIRO, D. A., MACÊDO, D. G., MACÊDO, M. J. F., MACEDO, J. G. F., LACERDA, M. N. S. DE, MACÊDO, M. S., SOUZA, M. M. A. Medicinal plants: Versatility and concordance of use in the caatinga area, Northeastern Brazil. *An Acad Bras Cienc*. v. 90, n. 3, p. 2767–2779, 2018.

SANTOS, D. S., RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. *Estação Científica (UNIFAP)*. v.7, n.3, p.29-35, 2017.

SCHMOLKA, I. R. Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. *J Biom Mat Res.*, v.6, n.6, p.571-582, 1972.

SCHIERWAGEN, C., BYLUND-FELLENIIUS, A. C., LUNDBERG, C. Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity. *J Pharmacol Methods*. v.23, n.3, p.179–186, 1990.

SCHNEIDER, L. A., KORBER, A., GRABBE, S., DISSEMOND, J. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy?. *Arch Dermat Res*. v.298, n.9, p.413-420, 2007.

SCHNEUER, F. J., NASSAR, N., TASEVSKI, V., MORRIS, J. M., ROBERTS, C. L. Association and predictive accuracy of high TSH serum levels in first trimester and adverse pregnancy outcomes. *J Clin Endocrinol Metab*. v.97, n.9, p.3115-3122, 2012.

SEN, C. K., KHANNA, S., GORDILLO, G., BAGCHI, D., BAGCHI, M., ROY, S. Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm. *Ann NY Acad Sci*. v.957,p. 239–249, 2002.

SENER, G., SEHIRLI, A. O., SATIROGLU, H., KEYER-UYSAL, M., YEGEN, C. B. Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. *Burns* v. 28, n.5, p. 419–25, 2002.

SENER, G., KABASAKAL, L., CETINEL, S., CONTUK, G., GEDIK, N., YEGEN, B. C. Leukotriene receptor blocker montelukast protects against burn-induced oxidative injury of the skin and remote organs. *Burns*. v.31, p.587–596, 2005

SEPEHRIPOUR, S., DUGGINENI, S., SHAHSAVARI, S. Life expectancy in elderly patients following burns injury. *Burns*. v. 44, p.1446–1450, 2018.

SEROR, J., AMAND, G., GUIBOURDENCHE, J., CECCALDI, P. F., LUTON, D. Anti-TPO antibodies diffuse through the placental barrier during pregnancy. *PLoS One*. v. 31, n.9(1), p.e84647, 2014.

SHAO, D., OKA, S., BRADY, C. D., HAENDELER, J., EATON, P., SADOSHIMA, J. Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol*. v.52, n.3, p.550–558, 2012.

SHAHIDI, F., AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J. funct foods*. v. 18, p.820-897, 2015.

SHARMA, P. K., BHATIA, S. R. Effect of anti-inflammatories on Pluronic® F127: micellar assembly, gelation and partitioning. *Int J Pharmac*. v.278, n.2., p.361-377, 2004.

SHETTY, S., UDUPA, S., UDUPA, L. Evaluation of antioxidant and wound healing effects of alcoholic and aqueous extract of *Ocimum sanctum* Linn in rats. *Evid Based Complement Altern Med*. v.5, n.1, p.95-101, 2008.

SHIRANI, K. Z., VAUGHAN, G. M., MASON-JR, A. D., PRUITT-JR, B. A. Update on current therapeutic approaches in burns. *Shock*. v.5, p.4–16, 1996.

SHUPP, J. W., NASABZADEH, T. J., ROSENTHAL, D. S., JORDAN, M. H., FIDLER, P., JENG, J. C. A Review of the Local Pathophysiologic Bases of Burn Wound Progression. *J Burn Care Res*. v.31, p. 849–873, 2010.

SIGMA-ALDRICH. Poloxamer 407. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/poloxamer40712345900311611?lang=pt®ion=BR>. Acesso em: 23 abr. 2020

SILVA, A. A., GONÇALVES, R.C. Espécies reativas de oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. Revisão Bibliográfica. *Rev Ciên Rural*. v.40, n.4, p.994-1002, 2010.

SILVA, C. P. Potencial enzimático da microbiota da pele humana e sua ação sobre insumos de fragrâncias. 2012. 203P. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas – Instituto de Química, Campinas, 2012

SILVA, C. M. B. Formulação de gel termossensível mucoadesivo contendo cloridrato de pilocarpina para tratamento de xerostomia. 2017. 87 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Recife, 2017.

SILVA, J. B., COOKB, M. T., BRUSCHIA, M. L. Thermo-responsive systems composed of poloxamer 407 and HPMC or NaCMC: mechanical, rheological and sol-gel transition analysis. **Carb Polym.** v. 240 - 116268, p.1-14, 2020.

SILVA, M. A. Efeitos antinocepsivo, anti-inflamatório e antioxidante da Aloe vera Haw em modelos de queimadura em ratos. 2013. 95p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

SILVA, S. O. Oxidação de Melatonina Cataliada por Mieloperoxidase em Neutrófilos ativados. 2001. 73p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Farmácia – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SILVA, R. C. L.; FIGUEREDO, N. M. A.; MEIRELES, I. B.; Feridas: Fundamentos e Atualizações em enfermagem; São Caetano do Sul – SP; Editora: Yendis, 2007.

SINGH, V., DEVGAN, L., BHAT, S., MILNER, S. M. The pathogenesis of burn wound conversion. **Ann Plast Surg.** v. 59, n. 1, p.109–115, 2007.

SIMAAN, I. F., BOTELHO, J. L. S., FERREIRA, P. E. N., PINHEIRO, D. M. S., Perfil Epidemiológico dos pacientes queimados atendidos no Hospital Geral Público de Palmas, no período 2010/2017. **Rev Pat Tocantins.** v.6, n.1, p.12-12, 2019.

SINGER, A. J., BOYCE, S. T. Burn Wound Healing and Tissue Engineering. **J Burn Care Res.** v. 38, n. 3, p. 605–613, 2017.

SINGER, A. J., MCCLAIN, S. A., ROMANOV, A., ROONEY, J., ZIMMERNMAN T. Curcumin Reduces Burn Progression in Rats. **Acad Emer Med.** v.14, p.1125-1129, 2007.

SLOMINSKI, A., PISARCHIK, A., SEMAK, I., SWEATMAN, T., WORTSMAN, J., SZCZESNIEWSKI, A., SLUGOCKI, G., MCNULTY, J., KAUSER, S., TOBIN, D. J., JING, C., JOHANSSON, O. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. **Faseb J.** v.16, n.8, p.896-898, 2002.

SOARES, L. R., BARBOSA, F. S., SANTOS, L. A., MATTOS, V. C. R., DE-PAULA, C. A., LEAL, P. M. L., LEAL, P. M. L. LUZ, L. P. ROCHA, R. Estudo epidemiológico de vítimas de queimaduras internadas em um hospital de urgência da Bahia. **Rev Bras Queim.** v.15, n.3, p.148-52, 2016.

SONG, Y., ZENG, R., HU, L., MAFFUCCI, K. G., REN, X., QU, Y. In vivo wound healing and in vitro antioxidant activities of Bletilla striata phenolic extracts. **Biomed Pharmacot.** v.93, p.451–461, 2017.

SORG, H., TILKORN, D. J., HAGER, S., HAUSER, J., MIRASTSCHIJSKI, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **Eur Surg Res.** v. 58, n. 1-2, p.81-94, 2017.

SOUSA, C. M. M., SILVA, H. R., VIEIRA-JUNIOR, G. M., AYRES, M. C. C., COSTA, C. L. C., ARAÚJO, D. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas

medicinais. **Quim Nova**. v.30, n.2. p.351-355, 2007.

SOUZA, T. F. G. Efeito cicatrizante da fração metanólica das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*: ESTUDO in vitro e em queimaduras superficiais em camundongos. 2019. 136p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

SPELLMEIER, Fernanda. Estudo comparativo entre dois métodos de produção de bases emulsionadas através da estabilidade acelerada. 2005. 98 f. Monografia (Graduação) – Curso de Farmácia, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2005.

SRINIVASAN, P., SABITHA, K. E., SHYAMALADEVI, C. S. Attenuation of 4-Nitroquinoline 1-oxide induced in vitro lipid peroxidation by green tea polyphenols. **Life Sci**. v 80, p.1080-1086, 2007.

STAGNARO-GREEN, A., ABALOVICH, M., ALEXANDER, E., AZIZI, F., MESTMAN, J., NEGRO, R., NIXON, A., PEARCE, E N., SOLDIN, O. P., SULLIVAN, S., WIERSINGA, W. Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum. **Thyroid**. v.21, n.10, p.1081-1125, 2011.

STEIN, M. H. S.; BETTINELLI, R. D.; VIEIRA, Bruna Maria. Nutritional therapy in big burn patients – a bibliographic review. **Rev Bras Queim**. v.12, n.4, p.235-244, 2013.

STROBEL, A. M., FEY, R. Emergency Care of Pediatric Burns. **Emerg Med Clin North Am**. v.36, n.2, p.441-58, 2018.

SUMMER, G. J., PUNTILLO, K. A., MIASKOWSKI, C., GREEN, P. G., LEVINE, J. D. Burn injury Pain: The continuing challenge. **J Pain**. V.8, n.7, p.533-548, 2007.

TAVARES, W. D. S., SILVA, R. S. Curativos utilizados no tratamento de queimaduras: uma revisão integrativa. **Rev Bras Queim**. v.14, n.4, p.300–306, 2015.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Wound biology and healing. *Medicina*, Ribeirão Preto, v.41, n.3, p.259-264, 2008.

TEVLIN, R., DILLON, L., CLOVER, A.J.P. Education in burns: lessons from the past and objectives for the future. **Burns**. v.43, n.6, p.1141-1148, 2017.

THOMAS, G. W., RAEL, L.T., BAR-OR, R., SHIMONKEVITZ, R., MAINS, C.W., SLONE, D.S., CRAUN, M.L., BAR-OR, D. Mechanisms of delayed wound healing by commonly used antiseptics. **J Trauma**. v.66, n.1, p. 82-90, 2009.

TOKLU, H. Z., SENER, G., JAHOVIC, N., USLU, B., ARBAK, S., YEĞEN, B. C. Beta-glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. **Int Immunopharmacol**. v.6, n.2, p.156-169, 2006.

TOKLU HZ, TUNALI-AKBAY T, ERKANLI G, YÜKSEL M, ERCAN F, SENER G. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, protects against burn-induced oxidative skin injury. **Burns**. v.33, n.7, p.908-916, 2007.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M., TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Bio.** v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VIEIRA, A. P., DOS SANTOS, N. R., BORGES, J. H. S., VINCENZI, M. P. A., SCHMITZ, W. O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina.** v.29, n.1, p.65-74, 2008.

VIEIRA, L. M., SOUSA, M. S. B., MANCINI-FILHO, J., LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Rev Bras Frutic.** v.33, n.3, p.888-897, 2011

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: the influence of processing conditions and raw material. **Food Chem.** v. 124, n. 3, p. 863-868, 2011.

WADE, C. E., BAER, L. A., WU, X., SILLIMAN, D. T., WALTERS, T. J., WOLF, S. E. Severe burn and disuse in the rat independently adversely impact body composition and adipokines. **Crit Care.** v.17, n.5, p.R225, 2013.

WALLE, T. Methylation of dietary flavones greatly improves their hepatic metabolic stability and intestinal absorption. **Mol. Pharm.** v. 4, n.6, p. 826–832, 2007.

WANG, C. Z., AYADI, A. E., GOSWAMY, J., FINNERTY, C. C., MIFFLIN, R., SOUSSE, L., ENKHBAATAR, P., PAPAConstantinou, J., HERDNDON, D. N., ANSARI, N. H. Topically applied metal chelator reduces thermal injury progression in a rat model of brass comb burn. **Burns.** v.41, n.8, p.1775-1787, 2015.

WANG, T., ZHU, X. K., XUE, X.T., WU, D.Y. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. **Carbohydrate Polymers.** v. 88, n.1, p. 75-83, 2012.

WATTANAPLOY, S., CHINAROONCHAI, K., NAMVIRIYACHOTE, N., MUANGMAN, P. Randomized Controlled Trial of Polyhexanide/Betaine Gel Versus Silver Sulfadiazine for Partial Thickness Burn Treatment. **Int J Low Extrem Wounds.** v.16, n.1, p.45-50, 2017.

WASIAK J, CLELAND H, CAMPBELL F, SPINKS A. Dressings for superficial and partial thickness burns. **Cochrane Datab Syst Rev.** v.28, n.3, p.1-71, 2013.

WERNER, S., GROOSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev.** v.83, n.3, p.835-870, 2003.

WHO. World Health Organization. ICD 11 - International Classification of Diseases 11th Revision. The global standard for diagnostic health information. ICD-11 for mortality and morbidity statistics - 2019. Disponível em: <https://icd.who.int/browse11/lm/en#/http%3a%2f%2fid.who.int%2fcd%2fentity%2f163532889> Acesso em: 16 abr. 2019

WHO. World Health Organization. Burns, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/burns>. Acesso em: 20 abr. 2020.

XIA, N., DAIBER, A., FORSTERMANN, U., LI, H. Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Brit J Pharmac.* v.174, n.12, p. 1633–1646, 2017.

XU, Y., FISHER, G.J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. *J. Dermat Sci Suppl.* v. 1, n.2, p. S1-S8, 2005.

YAMAN, I., DURMUS, A. S., CERIBASI, S., YAMAN, M. Effects of Nigella sativa and silver sulfadiazine on burn wound healing in rats. *Vet Med.* v.55, n.12, p.619-624, 2010.

YU, J., AHMEDNA, M., GOKTEPE, I. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chem.* v.90, n.1/2, p.199-206, 2005.

YUHUA, S., LIGEN, L., JIAKE, C., TONGZHU, S. Effect of Poloxamer 188 on deepening of deep second-degree burn wounds in the early stage. *Burns.* v. 38, n.1, p.95–101, 2012.

ZENG, N., DUMORTIER, G., MAURY, M., MIGNET, N., BOUDY, V. Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol: Relation between micellization, gelation, mechanic and release properties. *Int J Pharmac.* v.467, n.1-2, p.70–83, 2014.

ZHANG, K., SHI, X., LIN, X., YAO, C., SHEN, L., FENG, Y. Poloxamer-based in situ hydrogels for controlled delivery of hydrophilic macromolecules after intramuscular injection in rats. *Drug Delivery.* v.22, n.3, p.375–382, 2014.

ZOU, K., WYNN, P.M., MILLER, P., HINDMARCH, P., MAJSK-NEWMAN, G., YOUNG, B., HAYES, M. KENDRICK, D. Preventing childhood scalds within the home: Overview of systematic reviews and a systematic review of primary studies. *Burns.* v.41, n.5, p.907–924, 2015.