



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CARLA MENEGUCCI

**GEL TERMORREVERSÍVEL ADICIONADO DA FLAVANONA
NARINGENINA EM PELE DE CAMUNDONGOS SEM PELO
SUBMETIDOS À QUEIMADURA TÉRMICA:
EFEITO NOS DANOS OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS**

Londrina
2020

CARLA MENEGUCCI

**GEL TERMORREVERSÍVEL ADICIONADO DA FLAVANONA
NARINGENINA EM PELE DE CAMUNDONGOS SEM PELO
SUBMETIDOS À QUEIMADURA TÉRMICA:
EFEITO NOS DANOS OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS**

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

Menegucci, Carla.

GEL TERMORREVERSÍVEL ADICIONADO DA FLAVANONA NARINGENINA EM PELE DE CAMUNDONGOS SEM PELO SUBMETIDOS À QUEIMADURA TÉRMICA: EFEITO NOS DANOS OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS / Carla Menegucci. - Londrina, 2020.
112 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. Queimadura térmica - Tese. 2. Flavonoides - Tese. 3. Naringenina - Tese. 4. 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

CARLA MENEGUCCI

**GEL TERMORREVERSÍVEL ADICIONADO DA FLAVANONA
NARINGENINA EM PELE DE CAMUNDONGOS SEM PELO
SUBMETIDOS À QUEIMADURA TÉRMICA:
EFEITO NOS DANOS OXIDATIVOS E INFLAMATÓRIOS**

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

Prof. Dra. Marcela Maria Baracat
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Cristina de Paula Barros de Melo
Universidade Filadelfia - UniFil

Londrina, 16 de julho de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser minha força e sustento em todas as horas.

A minha mãe Ilda Marzola e meu pai Luiz Carlos Menegucci pela vida, por todo amor e por me inspirarem a alçar grandes voos.

A minha irmã Franciele Menegucci por ser a minha referência profissional e sempre me influenciar a buscar o caminho da sabedoria e conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades que me deu na vida, por ser minha força espiritual e a minha paz diária.

Aos meus familiares por estarem sempre ao meu lado e me ajudarem a conquistar meus sonhos sem medir esforços. A compreensão e paciência, nos piores e nos melhores dias.

A minha amiga da vida e parceira de laboratório Marília Fontequê, sem você não seria possível finalizar mais este ciclo.

A minha orientadora Prof^ª. Dra. Sandra R. Georgetti, por acompanhar minha vida e crescimento acadêmico desde a graduação, por todos os ensinamentos e oportunidades.

As Prof^ª. Dra. Marcela M. Baracat e Dra. Rubia Casagrande por me inspirarem sempre.

A todos os colegas e técnicos dos laboratórios LPG e CEPPOS, por todo suporte na execução deste trabalho.

As minhas amigas da graduação em Farmácia, Ana Paula e Michely.

A Novartis, pela flexibilidade para que eu pudesse buscar meu desenvolvimento, e as minhas amigas de trabalho pelos conselhos, risadas e suporte neste período.

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 sabedoria suprema é ter sonhos bastante grandes para não se perderem de vista enquanto os perseguimos. "

William Faulkner

MENEGUCCI, Carla. **Gel termorreversível adicionado da flavanona naringenina em pele de camundongos sem pelo submetidos à queimadura térmica: efeito nos danos oxidativos e inflamatórios.** 2020. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A queimadura é um dos mais graves traumas físico e psicológico que pode acometer o ser humano, além de apresentar forte impacto no perfil da morbidade da população brasileira. Queimaduras térmicas cutâneas causam lesões que desencadeiam resposta aguda inflamatória e desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e defesas antioxidantes. Estudos demonstram que o estresse oxidativo está diretamente relacionado à extensão da lesão e amplificação do processo inflamatório em queimaduras e que o tratamento com agentes antioxidantes seguros e eficazes promoveram melhora significativa na cicatrização das feridas, restaurando a homeostase redox na área lesionada. Devido às diversas propriedades farmacológicas do flavonoide naringenina (NG) como anti-aterogênica, anticancerígena, anti-inflamatória e antioxidante, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma formulação termorresponsiva a base de poloxamer 407 acrescida de NG para tratamento tópico de queimadura térmica induzida por haste de ferro em camundongos *hairless*, para avaliação das suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Primeiramente, o tempo de indução da queimadura foi padronizado em 3 s de contato, e a coleta de pele em 48 horas após o trauma e avaliou-se o efeito do tratamento de 8/8h do gel adicionado de NG. Os resultados demonstraram que FNG apresentou pH ideal para aplicação na pele lesionada, densidade de 1,0016 g/mL e boa espalhabilidade, que aumentou à medida em que o peso foi adicionado. A adição da NG acelerou o processo de gelificação observado no teste do tubo invertido e aumentou a viscosidade do veículo. A curva termoanálitica da FNG não apresentou o evento térmico da NG devido a possível interação com o polímero. O flavonoide apresentou capacidade sequestradora do radical ABTS, contudo esta diminuiu após incorporação no gel. A formulação FNG demonstrou minimizar a inflamação cutânea, reduzindo o edema cutâneo, e apresentou tendência na redução do recrutamento de neutrófilos. Foi observado também efeito contra o estresse oxidativo induzido por queimadura térmica, mantendo os níveis dos antioxidantes endógenos, GSH e CAT, a níveis basais, e diminuindo a produção de ânion superóxido na lesão. A capacidade antioxidante da pele pelo poder redutor do ferro (FRAP) e a capacidade em reduzir o radical ABTS foi aumentada com a administração da formulação. Animais queimados tratados com FNG apresentaram melhor evolução do fechamento da ferida em comparação aos demais grupos. Os resultados sugerem que o tratamento tópico com formulação de poloxamer 407 acrescida de NG foi eficiente na redução do edema e danos oxidativos, além de auxiliar no processo de reparo da ferida após queimadura térmica.

Palavras-chave: Queimadura Térmica. Naringenina. Poloxamer 407. Estresse Oxidativo. Inflamação.

MENEGUCCI, Carla. **Thermoreversible gel added naringenin flavanone in skin of hairless mice submitted to thermal burn**: effect on oxidative and inflammatory damage. 2020. 110 p. Dissertation (Master's degree in Pharmaceutical Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Burns are one of the most serious physical and psychological traumas that can affect humans, in addition to having a strong impact on the morbidity profile of the Brazilian population. Queimaduras térmicas cutâneas causam lesões que desencadeiam resposta aguda inflamatória e desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e defesas antioxidantes. Studies show that oxidative stress is directly related to the extent of the lesion and amplification of the inflammatory process in burns and that treatment with safe and effective antioxidants promoted significant improvement in wound healing, restoring redox homeostasis in the injured area. Due to the various pharmacological properties of flavonoid naringenin (NG) as anti-atherogenic, anticancer, anti-inflammatory and antioxidant, this study aimed to develop a thermoset formulation based on poloxamer 407 plus NG for topical treatment of induced thermal burn by iron rod in hairless mice, to evaluate its anti-inflammatory and antioxidant properties. First, the induction time of the burn was standardized in 3 s of contact, and the skin collection in 48 hours after the trauma and the effect of the 8 / 8h treatment of the gel added with NG was evaluated. The results showed that FNG had an ideal pH for application to the injured skin, density of 1.0016 g / mL and good spreadability, which increased as the weight was added. The addition of NG accelerated the gelation process observed in the inverted tube test and increased the vehicle's viscosity. The FNG thermoanalytic curve didn't show the NG thermal event due to possible interaction with the polymer. The flavonoid showed sequestering capacity of the ABTS radical, however it decreased after incorporation into the gel. The FNG formulation has been shown to minimize skin inflammation, reducing skin edema, and has tended to reduce recruitment of neutrophils. An effect against oxidative stress induced by thermal burn was also observed, maintaining the levels of endogenous antioxidants, GSH and CAT, at baseline levels, and decreasing the production of superoxide anion in the lesion. The antioxidant capacity of the skin by the iron reducing power (FRAP) and the ability to reduce the radical ABTS was increased with the administration of the formulation. Burned animals treated with FNG showed better evolution of wound closure compared to the other groups. The results suggest that topical treatment with poloxamer 407 formulation plus NG was efficient in reducing edema and oxidative damage, in addition to assisting the wound repair process after thermal burn.

Key words: Thermal burn. Naringenin. Poloxamer 407. Oxidative stress. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Classificação de queimaduras	22
Figura 2	– Estrutura fundamental de flavonoides	33
Figura 3	– Estrutura química da Naringenina	35
Figura 4	– Rota biossintética da Naringenina.....	35
Figura 5	– Estrutura química do Poloxamer	38
Figura 6	– Mecanismo de gelificação do P407.....	39
Figura 7	– Espalhabilidade do P407 e FNG em relação ao peso adicionado.....	58
Figura 8	– Viscosidade <i>versus</i> temperatura do P407 e FNG	61
Figura 9	– Curvas termoanalíticas das amostras P407, NG (4°C), NG (temperatura ambiente) e FNG	63
Figura 10	– Atividade doadora de elétrons ao radical livre ABTS. Curva concentração-resposta da NG (A) e Linearidade (B)	65
Figura 11	– Atividade sequestradora do cátion radical ABTS da NG pura e adicionada no gel FNG.....	65
Figura 12	– Análise macroscópica da relação tempo de coleta de pele imediatamente (T:0), 24 (T: 24h), 48 (T: 48h) e 72 (T: 48h) horas após a indução de queimadura	68
Figura 13	– Relação tempo de coleta pele-indução de edema (A) e atividade da MPO (B)	70
Figura 14	– Relação tempo de coleta pele-diminuição da capacidade antioxidante da pele por meio da redução férrica (FRAP) (A) e sequestro do radical ABTS (B)	71
Figura 15	– Relação tempo de coleta de pele-diminuição dos níveis de GSH (A), diminuição da CAT (B) e do ânion superóxido (NBT) (C)	73
Figura 16	– Efeito do tratamento com FNG na diminuição do edema (A) e da atividade da MPO (B) após injúria térmica	75
Figura 17	– Vascularização de lesão 48 horas após indução da queimadura.	76
Figura 18	– Efeito do tratamento com FNG na capacidade antioxidante da pele por meio da redução férrica (FRAP) (A) e sequestro do	

radical ABTS (B)	77
Figura 19 – Efeito do tratamento com FNG nanos níveis de GSH (A), CAT (B) e ânion superóxido (C)	78
Figura 20 – Tratamento e acompanhamento da cicatrização das lesões por queimadura térmica no dorso dos animais por 5, 10 e 15 dias após a indução da lesão.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Formulação termorreversível acrescida ou não de Naringenina	43
Tabela 2	–	Agrupamento, nomenclatura e tratamento dos animais	49
Tabela 3	–	pH e Densidade Relativa das formulações P407 e FNG.....	56
Tabela 4	–	Análise da temperatura de transição ($T_{\text{sol-gel}}$) entre a formulação P407 FNG pelo Teste do tubo invertido	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA	Análise de variância
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsufóxido
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Ferro
FNG	Formulação de poloxamer 407 acrescida de naringenina
FRAP	Poder antioxidante de redução férrica
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
HTAB	Brometo de hexadecil trietil amônio
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	Nitro azul tetrazólio
NG	Naringenina
NO	Radical óxido nítrico
O ₂	Oxigênio molecular

O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
1O ₂	Oxigênio singlete
OH	Hidroxila
•OH	Radical hidroxil
PDGF	Fator de crescimento derivados de plaqueta
P-407	Poloxamer 407
P407	Formulação base de poloxamer 407
RO ₂ [•]	Radical peroxil
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloro acético
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TPTZ	2,4,6 tripiridil-S-triazina
Tris	Hidroximetil aminometano
UVB	Radiação Ultravioleta B
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	PELE	18
2.2	QUEIMADURAS: EPIDEMIOLOGIA, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO	19
2.3	TRATAMENTO DE QUEIMADURAS	27
2.4	FLAVONOIDES	33
2.5	SISTEMAS TERMOSENSÍVEIS	37
3	OBJETIVO	41
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	MATERIAIS	42
4.1.1	Materiais de Consumo	42
4.2	MÉTODOS	42
4.2.1	Obtenção do Gel Termorreversível Contendo NG	43
4.2.2	Avaliação das Características Físico-Químicas das Formulações	43
4.2.2.1	Determinação do pH	43
4.2.2.2	Determinação da densidade relativa	43
4.2.2.3	Determinação da espalhabilidade	44
4.2.2.4	Determinação da temperatura de transição sol-gel pelo método do tubo invertido	45
4.2.2.5	Análise da viscosidade <i>versus</i> temperatura	45
4.2.2.6	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	46
4.2.3	Determinação da Atividade Sequestradora do Radical ABTS (2,2' azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico)	46
4.3	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA <i>IN VIVO</i> DO ATIVO NG INCORPORADO EM FORMULAÇÃO BASE DE POLOXAMER 407	47
4.3.1	Animais Experimentais	47
4.3.2	Padronização do Modelo de Indução de Lesões Cutâneas em Camundongos Hairless por Queimadura Térmica	47

4.3.3	Protocolo de avaliação da eficácia do gel termossensível adicionado de NG.....	49
4.3.4	Avaliação do Edema Cutâneo	49
4.3.5	Determinação da Atividade da Mieloperoxidase (Recrutamento de Neutrófilos)	50
4.3.6	Avaliação do Poder Antioxidante Redutor de Ferro (FRAP) na Pele....	50
4.3.7	Avaliação do Poder Antioxidante Pelo Ensaio de Sequestro do Radical 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) ..	51
4.3.8	Avaliação dos Níveis de Glutathione (GSH)	51
4.3.9	Avaliação da Atividade da Catalase (CAT).....	52
4.3.10	Avaliação da Produção de Ânion Superóxido.....	53
4.3.11	Análise Macroscópica das Lesões	53
4.3.12	Análise Estatística dos Resultados.....	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE GEL TERMORREVERSÍVEL P407 ADICIONADO DE NG.....	55
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DO RADICAL LIVRE ABTS PELA NG	64
5.3	PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE INDUÇÃO DE QUEIMADURA TÉRMICA EM CAMUNDONGOS HAIRLESS.....	66
5.4	AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA FORMULAÇÃO TERMORREVERSÍVEL ADICIONADA DE NARINGENINA CONTRA A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR QUEIMADURA TÉRMICA.....	74
6	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem como função promover barreira física, regulação térmica, produção de hormônios, percepção sensorial e imunocompetência (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Quando ocorre a descontinuidade do tecido epitelial, este desencadeia um processo complexo de cicatrização, mantendo a homeostasia do paciente e buscando restaurar cada estrutura celular dos tecidos (cutâneo, muscular, entre outros) para que suas funções sejam minimamente comprometidas e seja evitada a presença de micro-organismos que podem atingir a corrente sanguínea resultando em infecção generalizada denominada sepse (MONTES; BARBOSA; SOUZA NETO; 2011).

Queimaduras são lesões de tecidos orgânicos em decorrência de trauma de origem térmica resultante da exposição a chamas, líquidos ou superfícies quentes, frias, substâncias químicas, radiação, atrito ou fricção (VANA *et al.*, 2007). Segundo a Organização Mundial da Saúde, este tipo de lesão apresenta alto índice de morbidade e mortalidade, levando a aproximadamente 195.000 casos de óbito ao ano e, portanto, é considerada um dos principais problemas de saúde pública, cuja gravidade está diretamente associada ao agente agressor e a extensão e profundidade da área atingida (KNABL *et al.*, 1999; PESSOLATO *et al.*, 2011; WHO, 2018).

Lesões térmicas geram um grande processo inflamatório, que se inicia poucos minutos após a lesão e que estão associados com a liberação de mediadores inflamatórios, os quais causam tanto efeitos locais, quanto sistêmicos (PARIHAR *et al.*, 2008; RICHARDSON; MUSTARD 2009). É também possível encontrar uma grande variedade de tipos celulares nessas lesões, tais como: linfócitos, neutrófilos, macrófagos e fibroblastos (HORTON *et al.*, 2001). Esse processo inflamatório é também composto, pela liberação de inúmeros mediadores locais, fator necrose tumoral, interleucina, histamina e espécies reativas de oxigênio (EROs) (HORTON, 2003; PARIHAR *et al.*, 2008).

A participação das EROs associadas com a resposta inflamatória, é também evidenciada com o aumento de peróxidos lipídicos circulantes em humanos e animais queimados durante a primeira semana após o incidente (CETINKALE *et al.*, 1997; BERTIN-MAGHIT *et al.*, 2000). Estes dados, coletivamente, sustentam a hipótese de que o estresse oxidativo é um ponto crítico na cascata nociva mediada

pela queimadura, e sugere que sejam realizadas novas estratégias para inibição da produção ou sequestro de radicais livres (HORTON *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2007).

Em queimaduras de segundo grau ou de espessura parcial, que ocorre perda tecidual, os princípios do tratamento se baseiam na reepitelização do tecido de revestimento. O princípio básico é evitar infecções microbianas e propiciar um ambiente adequado para a reepitelização, preferencialmente úmido, que forneça a restauração do epitélio estratificado de queratinócitos a partir da membrana basal favorecendo a cicatrização da lesão (MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013).

O cuidado e a promoção da cicatrização de feridas tornou-se um objetivo fundamental do tratamento dessas lesões (FRYKBERG; BANKS, 2015). A pele desempenha um papel vital nas funções fisiológicas como transpiração, sensação de calor e dor e, portanto, qualquer dano causado à pele pode levar a graves consequências, dores e traumas, problemas de saúde e até morte em casos graves (BARONI *et al.*, 2012). É necessário o desenvolvimento de produtos efetivos e de baixo custo. No cenário atual, as drogas sintéticas utilizadas no tratamento de feridas são consideradas menos eficazes e estão associadas a diversos efeitos tóxicos (BUDOVSKY *et al.*, 2015; MAVER *et al.*, 2015).

Compostos fenólicos são conhecidos principalmente por serem potencialmente eficazes para tratar vários distúrbios da pele, incluindo doenças, lesões agudas e sinais de envelhecimento (DZIALO *et al.*, 2016). Essa característica se reflete principalmente pelo seu amplo espectro de propriedades biológicas, como, antioxidante, anti-inflamatório, redução do tempo de cicatrização e reparo de lesões de pele (SKORKOWSKA-TELICHOWSKA *et al.*, 2013; WITTENAUER *et al.*, 2015). Os flavonoides representam o grupo mais comum e amplamente distribuído de fenólicos vegetais. Essas moléculas têm uma atividade antioxidante e anti-inflamatória inerente a sua estrutura (VERRI *et al.*, 2012). A naringenina, um flavonóide da subclasse das flavanonas (LEE *et al.*, 2001), apresenta diversas propriedades farmacológicas como anti-aterogênica, anti-cancerígena, antioxidante e anti-inflamatória (EL-MAHDY *et al.*, 2008; HERMENEAN *et al.*, 2013; MARTINEZ *et al.*, 2015), podendo assim, ser uma boa candidata ao tratamento contra os danos oxidativos e inflamatórios gerados em queimaduras cutâneas.

As características desejadas para um produto tópico indicado na aplicação de áreas queimadas envolvem a capacidade de regeneração tissular,

ausência de toxicidade, facilidade de aplicação e de remoção do produto (WASIAK *et al.*, 2013). Neste contexto, os membros do grupo de polímeros denominados poloxamer, em especial o 407, são inertes, portanto não apresentam toxicidade celular (JOHNSTON; MILLER, 1985) e se apresentam como soluções de baixa viscosidade em temperatura baixa, e como gel à temperatura corporal, tornando-os polímeros termossensíveis ideais para aplicação tópica (QI *et al.*, 2006; BAN *et al.*, 2017). A propriedade de polímero termossensível favorece a aplicação das formulações na área lesionada sendo adequado para o tratamento de lesões dolorosas, como ocorre em tecidos queimados (NALBANDIAN *et al.*, 1987; BERRETTA, 2007).

Assim, a avaliação do potencial tópico do flavonoide naringenina, em gel termorreversível, contra os danos oxidativos e inflamatórios induzidos por queimadura térmica se faz relevante para uma possível alternativa de tratamento desse tipo de lesão na pele.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano em superfície e peso, formando um revestimento externo em todo o corpo (IOBST; SANTHANAM; WEINKAUF, 2006). Atua protegendo a integridade física e bioquímica do corpo, mantém a temperatura corpórea constante e fornece informações sensoriais sobre o ambiente circundante (TORTORA; GRABOWSKI, 2002; RIZZO, 2011.).

Com organização estratificada, a pele é dividida em três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme (GRICE; SEGRE, 2011).

A epiderme é a camada mais superficial da pele, que esta diretamente exposta ao meio externo, sendo responsável pela proteção do corpo humano. Trata-se de um epitélio escamoso estratificado em constante renovação, sendo o queratinócito seu principal tipo celular. Este compõe aproximadamente 95% do total das células epidérmicas, e a medida que se move da membrana basal em direção a superfície da pele, forma 5 camadas morfológicamente distintas da epiderme: germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (KHAVKIN; ELLIS, 2011; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A camada germinativa, rica em células-tronco, é responsável pela renovação da epiderme. A camada espinhosa é formada por células achatadas com expansões citoplasmáticas que se mantêm unidas. A camada granulosa possui células achatadas com grânulos de querato-hialina, responsável pela produção de queratina e substâncias impermeáveis à água e a outras moléculas (CORMACK, 2003). A camada lúcida é composta de várias camadas de células achatadas intimamente ligadas, sem expansões citoplasmáticas. A camada córnea é a mais superficial da epiderme, formada por células mortas anucleadas chamadas de células corneificadas na medida em que seu citoplasma é substituído por queratina. Essas células formam uma cobertura ao redor do corpo, protegendo-o contra invasão de substâncias do meio externo e restringindo a perda de água. Possui pH mais ácido do que as demais camadas auxiliando na sua função barreira (SPENCE, 1991; CAMPELO 2018). Outras células que podem ser encontradas na epiderme incluem as células de Langerhans, melanócitos e células de Merkel, que são responsáveis pela regulação imune,

pigmentação e função sensorial (TER HORST *et al.*, 2018).

A derme, localizada abaixo da epiderme e acima da camada subcutânea, é responsável pelo fornecimento de nutrientes e suporte físico à epiderme (BURR; PENZER, 2005). É composta principalmente por colágeno e fibras elásticas, produzidos por seu principal tipo celular, os fibroblastos. Contém vasos linfáticos, terminações nervosas, folículos capilares e glândulas. Além de fibroblastos, a derme possui outros tipos celulares imunologicamente relevantes como células dendríticas, macrófagos, mastócitos e linfócitos. A derme é composta por duas camadas: a reticular e a papilar. A camada papilar contém os nervos e capilares que nutrem a epiderme, enquanto a camada reticular é composta por forte tecido conjuntivo contendo colágeno e fibras elásticas (PRINGLE; PENZER, 2002; HEATH; CARBONE, 2013). Quando lesionada e o colágeno é exposto, a proteína é envolvida nas fases inflamatórias, proliferativas e de remodelação da resposta cicatricial da pele (HOPKINSON *et al.*, 1999).

A hipoderme, tecido subcutâneo com tecido conjuntivo frouxo e adiposo, é composta por células adiposas que reforçam a estrutura do tecido conjuntivo e atua como barreira protetora isolante (RITTIÉ; FISHER, 2002).

A pele está continuamente exposta a uma variedade de ataques químicos, biológicos e físicos que ameaçam a integridade de suas estruturas celulares, e apesar de possuir diversos mecanismos de regeneração e reparação, as queimaduras graves são as lesões mais traumáticas e fisicamente debilitantes, que não afetam somente a pele, como quase todos os sistemas orgânicos, e levam a significativa morbidade e mortalidade (WANG *et al.*, 2018).

2.2 QUEIMADURAS: EPIDEMIOLOGIA, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

As queimaduras estão entre os traumas mais graves que podem atingir o ser humano, pois provocam resposta metabólica intensa que repercute em quase todos os órgãos e sistemas. Queimadura pode ser definida como uma injúria, geralmente na pele, ou em outro tecido orgânico causado por trauma térmico (HENDON, 2002). Podem ser causadas pelo calor, como as queimaduras térmicas por contato com chamas, líquidos (escaldadura), sólidos em alta temperatura ou promovidas por produtos químicos, eletricidade, fricção ou abrasão e radiação,

incluindo queimaduras solares e radioatividade (HENDON, 2002; CAMUCI, *et al.* 2014).

Queimaduras térmicas apresentam-se como um problema significativo de saúde pública, especialmente em países de baixa renda, e representam mais de 95% de todas as mortes causadas por esse tipo de lesão no mundo (WHO, 2018; SAAVEDRA *et al.*, 2019).

A grande maioria das queimaduras não é fatal, mas estima-se que a cada ano 1% da população sofra queimaduras, sendo que, 90% das mortes por queimaduras ocorrem em países onde não há programas de prevenção e a qualidade dos cuidados agudos é fraca ou nenhuma (BATISTA *et al.*, 2012; SANTANA *et al.*, 2018; CORREIA *et al.*, 2019). Em países mais ricos as taxas de mortalidade por queimaduras têm diminuído, por outro lado, a taxa de mortalidade infantil por essa mesma causa, é sete vezes mais alta em países de baixa e média renda (WHO, 2018).

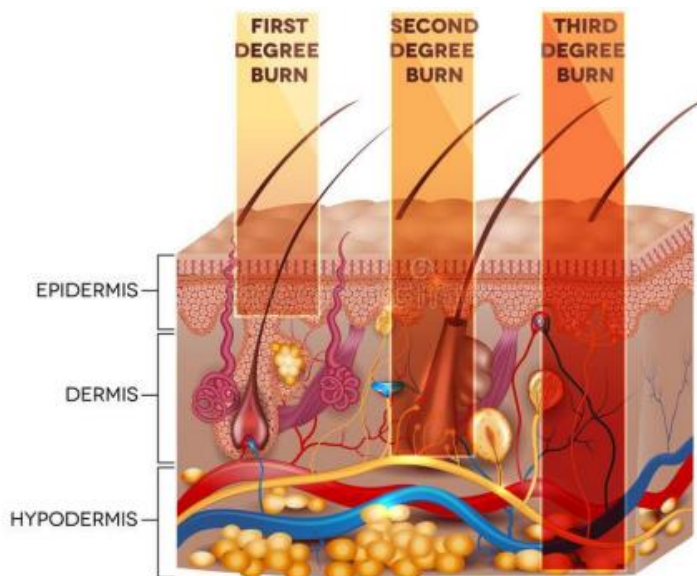
O risco é ainda maior em países em desenvolvimento como o Brasil, onde as condições de vida são precárias em grande parte da população o acesso ao tratamento de queimaduras é limitado. Segundo o Ministério da Saúde, avalia-se que no Brasil acontecem em torno de 1.000.000 de incidentes por queimaduras 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. As queimaduras estão entre as principais causas externas de morte registradas no Brasil, perdendo apenas para outras causas violentas, que incluem acidentes de transporte e homicídios (VALE, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Diversos estudos epidemiológicos apontam maior incidência de queimaduras no sexo masculino, sendo os membros superiores os mais acometidos por este tipo de lesão. As queimaduras ocorrem com maior frequência em situações de trabalho, variando as formas de acometimento. Entre as queimaduras mais comuns tendo as crianças como vítimas, estão as decorrentes de escaldaduras, e ocorrem em maior proporção em âmbito domiciliar (GAWRYSZEWSKI *et al.*, 2012; ALVES E SILVA; FARIA; MACIEL, 2014; SANCHES *et al.*, 2016). Acontece um milhão de casos de queimaduras em crianças anualmente no Brasil, onde 13.799 mil são hospitalizados ou precisam de atendimento ambulatorial (SANTOS; SANTOS, 2017), sendo assim é um dos acidentes mais frequentes em pediatria, (BISCEGLI *et al.*, 2014).

Os principais agentes causais de queimaduras no Brasil são líquidos superaquecidos, combustível, chama direta, superfície superaquecida, eletricidade, agentes químicos, agentes radioativos, radiação solar, frio e fogos de artifício (BVSMS, 2019). Também, é descrito que a cada ano 1.000.000 de acidentes estão relacionados a queimaduras, destes 200.000 são recebidos na emergência e 40.000 necessitam de hospitalização. (OLIVEIRA; PERIPATO, 2017). Frente à elevada taxa de incidência, a queimadura configura-se como um problema de saúde pública no Brasil, assim, faz-se necessário o conhecimento e desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas.

A intensidade com que uma queimadura causa danos à pele depende de diversos fatores, tipo de fonte de calor, temperatura, tempo de exposição, espessura da pele e área exposta, vascularidade do local, idade do indivíduo e pressão exercida sobre a pele pelo elemento de contato (STANLEY; RICHARD, 2004). Mesmo uma rápida exposição a uma determinada fonte de calor já é capaz de promover danos cutâneos. Em temperaturas superiores a 44°C e abaixo dos 51°C as lesões celulares dobram a cada aumento de grau. Acima dos 51°C ocorre a destruição rápida da *cútis* e acima dos 60°C a necrose por coagulação proteica é imediata. Ainda, mesmo após a retirada da fonte de calor este não se dissipa imediatamente e, assim, o calor residual acumula-se levando a um dano secundário indireto, que persiste por 6 a 12 horas após trauma térmico inicial (XU, 2004).

As queimaduras são classificadas de acordo com o grau de destruição celular e profundidade da lesão na pele, anexos e tecidos subcutâneos (MARCHESAN; FARINA JR, 2003, PEDEN *et al.*, 2008). Essas lesões são denominadas como superficiais (referidas como 1º grau), de espessura parcial (conhecidas como de 2º grau) ou de espessura total (referidas como de 3º grau) (LINDE, 2002; JOHNSON, 2018) (Figura 1).

Figura 1: Classificação de Queimaduras

Fonte: ROCHA (2009)

Queimaduras de primeiro grau são caracterizadas como queimaduras superficiais, que atingem apenas a camada mais externa da pele, a epiderme, sem danos observados na derme, são lesões que se apresentam hiperemiadas, edematosas e dolorosas, resolvendo-se dentro de 5 a 7 dias. As queimaduras de espessura parcial podem ser superficiais ou profundas. As superficiais acometem toda a epiderme e a camada superior da derme, conservando certa quantidade de folículos pilosos e glândulas sudoríparas, apresentam bolhas, umidade e dor acentuada e cicatrizam em torno de 14 a 21 dias, deixando mínimo tecido cicatricial. Já queimaduras profundas de espessura parcial comprometem quase toda a extensão da derme, assim como queimaduras de terceiro grau, apresentam coloração pálida e são lesões menos dolorosas e, embora possam evoluir para cicatrização dentro de três até seis semanas, também podem acarretar em complicações sistêmicas, o epitélio neoformado é muito friável, apresentando ulceração recorrente e forte tendência à cicatrização hipertrófica e contraturas. Nas queimaduras de espessura total, ou queimaduras de terceiro grau, a lesão acomete toda espessura da pele e, em alguns casos, se estende ao tecido subcutâneo, músculo e osso. Clinicamente, apresentam aspecto esbranquiçado e rígido, é a mais grave de todas as lesões térmicas por não haver elementos dérmicos para regeneração, são deformantes e cicatrizam apenas com enxerto (LINDE, 2002; JOHSON; RICHARD, 2003; LIMA JR; SERRA, 2006).

A verdadeira profundidade e extensão de uma lesão por queimadura pode não ser precisa ou facilmente determinada no primeiro dia, pois durante sua evolução diversos fatores continuam influenciando na sua extensão e, isto, permite que uma lesão de espessura parcial superficial evolua para espessura total depois de 72 h após a lesão inicial (GOMES; SERRA; PELLON, 1998; BARBOSA *et al.*, 2007).

Szwed e Santos (2015), propuseram que a cicatrização de feridas começa logo após o dano tecidual e consiste em mecanismos complexos de interações extracelulares, mediadores químicos, células locais e inflamatórias que interagem para a regeneração do tecido lesionado, buscando restabelecer satisfatoriamente a função e a aparência do local afetado. A cicatrização compreende três fases com limites não muito distintos, mas sobrepostas no tempo: fase inflamatória, proliferativa e fase de remodelamento (PAGNANO *et al.*, 2009).

O processo cicatricial ocorre quando há perda tecidual e inicia-se com a fase inflamatória. A fase inflamatória, ou exsudativa, é a preparação da ferida para a cicatrização e inicia-se logo após a lesão, com formação de rede de fibrina e migração de neutrófilos, linfócitos e, mais tardiamente, os macrófagos, tendo como objetivo remover tecidos desvitalizados. A fase proliferativa é dividida em três subfases e é responsável pela formação do tecido de granulação. Primeiro ocorre a reepitelização por migração de queratinócitos das bordas e anexos remanescentes; e posteriormente a fibroplasia, na qual ocorre proliferação de fibroblastos e produção de colágeno, elastina e outras proteínas; por fim, ocorre a angiogênese paralelamente à fibroplasia, e os novos vasos irão suportar a formação da nova matriz tecidual (MANDELBAUM *et al.*, 2003; STANLEY; RICHARD, 2004). Neste momento ocorre o fenômeno conhecido como contração da ferida por ação dos miofibroblastos. A terceira e última fase de cicatrização da pele, a fase de remodelação, leva à formação progressiva da cicatriz. No fechamento da ferida, a maturação do tecido de granulação é marcada pela síntese do colágeno tipo I ocasionada pelos fibroblastos e o desaparecimento da população de miofibroblastos por apoptose (ISAAC *et al.*, 2010).

Em um corte histológico, Jackson descreveu em 1953, que em uma ferida típica de queimadura existem três zonas concêntricas: a zona central, externa e intermediária. A zona central é a região de coagulação que sofre necrose irreversível como resultado de lesão direta da energia térmica. A zona externa é a

região da hiperemia que invariavelmente se recupera. A zona intermediária se correlaciona com a estase que não sofre necrose inicialmente, mas passa por interrupção completa do fluxo sanguíneo nas primeiras 24 horas. A zona intermediária pode conseqüentemente tornar-se necrótica e, eventualmente, indistinguível da zona de coagulação (JOHNSON, 2018). As alterações fisiopatológicas dentro das três zonas revelam a biodinâmica mais complicada de todas as feridas, envolvendo vários mediadores inflamatórios e estando intimamente relacionados à administrações de diferentes medidas terapêuticas (XU, 2004).

A cicatrização é um processo que envolve diversos mecanismos sucessivos após a lesão e é regulado por diversos fatores locais e sistêmicos que podem atrasar ou impedir a cicatrização, como: suporte nutricional inadequado, *déficit* na oxigenação tecidual, infecção, necrose, ambiente seco, tamanho da ferida, idade do paciente e imunossupressão (HESS, 2002). Além disso, relata-se que durante sua evolução, infecções ou a instabilidade hemodinâmica do local podem aprofundar a lesão e aumentar a produção de EROs que irão atuar como fator perpetuante da resposta inflamatória (BARBOSA *et al.*, 2007).

O processo inflamatório em queimaduras é caracterizado pela liberação de citocinas, prostaglandinas e EROs liberados de macrófagos e leucócitos. Mediadores como a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), são liberados em quantidades diretamente proporcionais a extensão e intensidade da queimadura e são responsáveis pelo aumento do catabolismo imunossupressor, aumento da permeabilidade vascular, e conseqüentemente, por distúrbios cardiovasculares e renais, choque e lesão de múltiplos órgãos (ARTURSON, 1996; NGUYEN *et al.*, 1996).

A ativação de mediadores inflamatórios tóxicos, oxidantes e proteases podem danificar ainda mais as células endoteliais da pele e capilares e potencializar a necrose do tecido isquêmico, assim, a isquemia e reperfusão consecutiva causam o estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre a geração de EROs e o sistema de defesa antioxidante (KAO; GARNER, 2000; CARDEN; GRANGER, 2000).

Sob condições fisiológicas normais, os radicais livres e as espécies não-radicaais reativas, derivadas dos radicais, existem nas células e tecidos biológicos em concentrações baixas, porém mensuráveis (SIES, 1993; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000). Em sistemas biológicos, radicais livres são

derivados principalmente do O_2 e por isso são denominados EROs, possuem um ou mais elétrons não pareados, altamente instáveis, com meia-vida extremamente curta e quimicamente muito reativas (HALLIWELL, 1999).

Muitos tipos de EROs são formados fisiologicamente no organismo, por meio do transporte de elétrons mitocondriais, do metabolismo do ácido graxo peroxissômico, por meio das reações do citocromo P-450 e pela atividade da NADPH oxidase, particularmente nas células fagocíticas, processo conhecido como "explosão respiratória" (PARIHAR *et al.*, 2008). Entre as EROs 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 peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), e oxigênio singlete (1O_2), que apesar de não possuírem elétron livre, podem facilmente sofrer reações e formar radicais livres (HALLIWELL, 2009). Destes produtos, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical, mas pode causar danos significativos às células. Este forma radicais hidroxila, especialmente na presença de íons ferro e cobre, causando danos celulares graves (HENSLEY *et al.*, 2000).

Em feridas normalmente cicatrizadas, EROs atuam como mensageiros celulares para estimular processos-chave associados à cicatrização de feridas, incluindo motilidade celular, ação de citocinas, angiogênese e, também, contra infecções por micro-organismos patogênicos presentes na ferida (DJEMAA *et al.*, 2016).

A principal fonte de radicais livres ou EROs no trauma das queimaduras é a enzima xantina oxidase (XO), que desempenha um papel importante na lesão de reperfusão por isquemia, produzindo ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (GRANGER *et al.*, 1981) e pela resposta a estímulos como bactérias e fragmentos teciduais, que dá início a uma sequência de fagocitoses, realizadas principalmente por neutrófilos, a qual é dependente de oxigênio (BARBOSA *et al.*, 2007). Ainda neste tipo de lesão, relata-se que a liberação de EROs inicia-se com a ativação da NADPH oxidase que reduz o oxigênio em $O_2^{\cdot-}$ (HORTON, 2003).

Tem-se dado muita atenção ao papel dos neutrófilos, após a queimadura. Acredita-se que a lesão tecidual e endotelial seja amplificada pela liberação de radicais livres e enzimas dos neutrófilos (HORTON, 2003). Uma vez firmemente aderidos à célula endotelial, os neutrófilos criariam um microambiente,

que permitiria a alta concentração de agentes lesivos. Além de sintetizarem prostaglandinas, os neutrófilos possuem enzimas granulares, como a mieloperoxidase (MPO), que catalisa a reação do peróxido de hidrogênio com o cloro, originando HClO, um potente agente oxidante (FRANCISCHETTI, *et al.*, 2010).

Como mencionado, nestas situações, o excesso de EROs liberadas pode transcender o efeito benéfico, causar danos adicionais na ferida, e reduzir os mecanismos antioxidantes endógenos enzimáticos e não enzimáticos promovendo o estresse oxidativo (BAYIR, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Entre os antioxidantes enzimáticos celulares encontram-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx), que constituem a primeira linha de defesa endógena, protegendo as células dos danos induzidos por EROs (KUMAR; SHARMA; VASUDEVA, 2017). Dos componentes não enzimáticos da defesa antioxidante destacam-se alguns minerais (zinco, selênio e ferro), vitaminas (ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A, riboflavina) e o tripeptídeo glutathiona reduzida (GSH) (VALKO *et al.*, 2007).

A SOD converte o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , um composto menos bioativo, que é posteriormente decomposto pelas enzimas CAT e GPx em moléculas de oxigênio, que desempenham um papel importante nos mecanismos de autodefesa das células contra o estresse oxidativo. A SOD e GPx são enzimas que protegem os tecidos dos efeitos dos radicais livres e peróxidos lipídicos, e as atividades da SOD e GPx aumentam após lesão mediada por radicais livres e peroxidação lipídica (GONZALES *et al.*, 1984; GIACCO; BROWNLEE, 2006).

A relação GSH e glutathiona oxidada (GSSG) é um dos principais determinantes do estresse oxidativo. A GSH, altamente abundante em todos os compartimentos celulares, é o principal antioxidante solúvel do organismo, que atua diretamente ou via GPx para eliminar as EROs (LAWRENCE; SPRINGER, 1991; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013). Além disso, a GSH também é importante para a proteção da membrana celular da peroxidação lipídica, pois doa elétrons para lipídios da membrana e os protege de ataques de oxidantes, atuando também como cofator para enzimas, como GPx e transferase. Tem um papel na conversão de vitamina C e E de volta às suas formas ativas e protege as células contra a apoptose, interagindo com as vias de sinalização proapoptótica e antiapoptótica (CURELLO *et al.*, 1985; MASELLA *et al.*,

2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A CAT é uma enzima que exerce importante papel contra o estresse oxidativo e atua convertendo H_2O_2 em O_2 e H_2O (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004). Está presente no peroxissomo e nas mitocôndrias em grandes quantidades, e no citoplasma e retículo endoplasmático em menores quantidades (SCHRADER; FAHIMI, 2006). Estudos demonstram que durante a cicatrização de feridas, ocorre a expressão da enzima no tecido de granulação em quantidades significativas, promovendo papel importante na desintoxicação, sendo que a redução dos níveis de H_2O_2 na área da ferida consiste em uma de suas atividades reguladoras (KAPOOR *et al.*, 2006).

Assim, estudos demonstram que se o equilíbrio entre a geração de EROs e a capacidade redox do organismo for interrompido, o tecido sofrerá estresse oxidativo afetando uma ampla gama de espécies moleculares, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (VALAVANIDIS *et al.*, 2013). Estes dados, coletivamente, sustentam a hipótese de que o estresse oxidativo é um ponto crítico na cascata nociva mediada pela queimadura, e sugere que sejam realizadas novas estratégias para inibição da produção ou sequestro de radicais livres (HORTON, 2003; BARBOSA *et al.*, 2007).

2.3 TRATAMENTO DE QUEIMADURAS

A preocupação com o tratamento de feridas é antiga e muitos estudos acerca do assunto tem sido desenvolvidos, o que levou a um grande avanço no conhecimento dos diferentes tipos de lesões, do processo de reparação de tecido lesado, bem como de todos os fatores nele envolvidos (PEREIRA; BACHION, 2005; SANTANA *et al.*, 2019). Propiciou também o desenvolvimento de produtos a serem utilizados no tratamento de feridas, visando auxiliarem no processo de cicatrização da pele (FERREIRA *et al.*, 2003).

O tratamento das queimaduras pode ser realizado em diferentes frentes, dependendo da profundidade e local da lesão. Embora queimaduras leves possam ser tratadas ambulatorialmente, as queimaduras moderadas devem ser em hospitais equipados e as queimaduras graves devem ser tratadas em hospitais que tenham centro especializado de queimados (MOYLAN, 1992).

O tratamento de queimaduras sempre foi um desafio, tanto pela sua

gravidade, como pela multiplicidade de complicações que normalmente ocorrem em decorrência da lesão (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010).

Atualmente são indicadas no manejo da queimadura, hidratação com soro fisiológico, analgesia, controle de infecção, escarotomia, restabelecimento hemodinâmico e eliminação de tecido necrosado por meio de método cirúrgico (SINDER, 2006).

As queimaduras são particularmente suscetíveis à infecção por diversas razões, como a ruptura da barreira epidérmica combinada com a desnaturação de proteínas e lipídios, que proporcionam um ambiente fértil para o crescimento microbiano (CHURCH *et al.*, 2006). Com a circulação sanguínea do local da lesão comprometida pelo processo de queimadura, as dificuldades enfrentadas pelos antibióticos administrados sistemicamente em alcançar o tecido danificado incentivaram o uso de produtos antimicrobianos aplicados topicamente (HONARI, 2004; GLASSER *et al.*, 2010). Assim, cremes antimicrobianos e curativos oclusivos são aplicados na ferida para evitar infecções, limitar a progressão da ferida e melhorar a progressão da epitelização (SEVGI *et al.*, 2013).

A sulfadiazina de prata é um composto antimicrobiano tópico, composto por uma sulfonamida e prata, amplamente utilizado para aliviar a dor e evitar possíveis infecções de lesões de queimadura. Embora exista preocupação com a resistência emergente e possíveis efeitos colaterais, a sulfadiazina de prata ainda é amplamente aceita como tratamento tópico para infecções por queimaduras (ATIYEH *et al.*, 2007; SEVGI *et al.*, 2013; GOUVEÂ *et al.*, 2020). No entanto, seu uso está associado a vários efeitos adversos (agranulocitose, leucopenia, anemia hemolítica) que limitam sua aplicação (FULLER, 2009; MILLER *et al.*, 2012).

A sulfadiazina de prata pode causar efeitos locais, incluindo citotoxicidade celular, cicatrização retardada de feridas, cicatrizes hipertróficas ou atróficas e levar ao desenvolvimento de reações de hipersensibilidade, dermatite alérgica de contato, eritema multiforme e pigmentação cinza-azulada (ATIYEH *et al.*, 2007; KHORASANI *et al.*, 2009).

O efeito adverso clínico mais significativo do agente tópico de sulfadiazina de prata é a cicatrização retardada da ferida, juntamente com toxicidade renal e leucopenia, confirmando que não deve ser utilizado em feridas extensas por períodos prolongados (KLASEN, 2000; FERREIRA *et al.*, 2003; ATIYEH *et al.*, 2007). Outras preparações com prata são opções importantes no tratamento da

queimadura, visando principalmente uma atividade bactericida mais duradoura no leito da ferida, sem toxicidade para as células lesadas e maior capacidade de recuperação. Essas tecnologias utilizam curativos com liberação gradual da prata, ao invés do sal separado, composto ou em solução (MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013). Além da sulfadiazina de prata, acetaminofeno, anti-inflamatórios não esteróides e corticoides também são utilizados como analgésicos (FAURSCHOU; WULF, 2008), e também estão associados a efeitos adversos que limitam seu uso (SÜLEYMAN H; DEMIRCAN; KARAGOZ Y, 2007; BARKIN, 2015). Assim, por muitos anos as queimaduras vêm sendo tratadas com diferentes produtos a base de prata e apesar da diversidade dos materiais, o custo do tratamento de queimaduras é ainda é muito elevado (MOSER; PEREIMA; PEREIMA, 2013).

O agente ideal para o tratamento local da lesão além de controlar o crescimento bacteriano, deveria remover o tecido desvitalizado e estimular o crescimento dos queratinócitos, porém, até agora, estas três funções não se encontram em um mesmo produto, desta maneira não existe um agente tópico ideal, embora diversos estudos relatam a utilização de curativos oclusivos combinados com agentes antimicrobianos para o tratamento de lesões por queimadura (NEGREIROS *et al.*, 2019; PECHARA, 2020).

Neste sentido, a placa de hidrocolóide é um curativo passivo (SMANIOTTO *et al.*, 2010) que possui uma cobertura composta por gelatina, pectina e carboximetilcelose sódica e espuma de poliuretano, que mantém a umidade da ferida interagindo com a lesão. Produz um gel que favorece o desbridamento autolítico e seu uso para tratamento de alguns tipos de lesões agudas tem demonstrado bom efeito terapêutico, associado à facilidade de administração, a capacidade de absorção e pela formação de barreira protetora contra infecções, além de sua capacidade de reter odores, ter boa aparência e formas variadas que possibilitam adequação à ferida, podendo inclusive ser empregado em lesões das articulações (THOMAS, 2008; FRANCO; GONÇALVES, 2008).

O alginato de cálcio, que se compõe de fibras de puro alginato de cálcio derivado de algas marinhas, por ter alta capacidade de absorção, com a formação de um gel que mantém o meio úmido para a cicatrização e induz a hemostasia (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Hidrogel é um tipo de curativo passivo que contém álcool de polivinil, poliacrilamidas e polivinil, proporcionando um ambiente hidrófilo devido à retenção

de umidade propiciando a liquefação de necrose (SMANIOTTO *et al.*, 2010). Seu mecanismo de ação é amolecer e remover o tecido desvitalizado por meio de desbridamento autolítico e sua indicação é para feridas superficiais moderadas ou de baixa exsudação, pois remove as crostas, fibrinas, tecidos desvitalizados ou necrosados (FRANCO e GONÇALVES, 2008; ROSSI *et al.*, 2010). Boles *et al.* (2008) mostraram a eficácia quanto ao uso de curativo a base de hirogel de melaleuca, uma opção de curativo imediato para queimaduras que visou à hidratação e ao resfriamento da ferida, quando comparado a grupo de animais tratados apenas com água corrente.

Na medicina popular, são citadas frequentemente duas plantas para o tratamento de queimaduras: babosa (*Aloe vera*) e aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*), as quais possuem ação cicatrizante (COSTA; MAYWORM, 2011). Atualmente, estas substâncias compõem os medicamentos fitoterápicos disponíveis na rede farmacêutica e nas instituições de saúde (BRASIL, 2017). Jorge e Markmann (1996) demonstraram que tanto as cascas como as folhas da aroeira são igualmente ricas em taninos e óleo essencial, sendo os taninos os responsáveis pela ação cicatrizante. O extrato de aroeira é disponibilizado na forma de gel e óvulo, sendo indicado, devido à sua ação cicatrizante, anti-inflamatória e antisséptica tópica, para uso ginecológico. A *Aloe vera* é descrita por apresentar propriedades farmacológicas, incluindo sua propriedade antioxidante (HU *et al.*, 2005), cicatrizante (MAENTHAISONG *et al.*, 2007) e efeitos antibacterianos (AGARRY *et al.*, 2005). Pereira *et al.* (2015), realizaram uma revisão na qual concluíram que há evidências que parecem apontar para a eficácia do *Aloe vera* no tratamento de queimaduras cutâneas. O medicamento fitoterápico à base de *Aloe vera* disponibilizado pelo SUS à população, desde 2012, apresenta-se na forma farmacêutica de creme, indicado para o tratamento tópico de queimaduras de 1º e 2º grau e como coadjuvante nos casos de psoríase vulgar (CONBRAFITO, 2012; FERREIRA; PAULA, 2013).

Plantas com efeito anti-inflamatório evidenciados em estudos experimentais e clínicos, com foco na redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, permeabilidade vascular e migração tecidual que intensificam o dano no tecido, estão sendo foco de estudos (GHASEMIAN; OWLIA; OWLIA, 2016). Tratamentos que apresentam potencial antioxidante são também de grande interesse para o processo de reparo de queimaduras (HEIDARI *et al.*, 2019).

Nesse contexto, se faz interessante à busca de tratamentos novos,

seguros e eficazes nas lesões por queimaduras, e os produtos naturais com efeitos anti-inflamatórios e analgésicos tópicos podem ser candidatos como alternativas à terapêutica atualmente utilizada (PIANA *et al.*, 2013; SILVA; ALMEIDA; ROCHA, 2014; TEYSSIER, 2019).

Estudos demonstram que agentes oxidantes em feridas térmicas amplificam os danos locais e sistêmicos. Nas queimaduras, o fluxo intravascular de neutrófilos para a região aumenta a formação de radicais livres. As EROs resultantes são responsáveis pelo aumento do edema. Os níveis de antioxidantes também diminuem significativamente nas queimaduras locais. Em estudos, com animais e humanos, foi demonstrado que o dano causado pelos radicais livres na queimadura é significativamente melhorado após a aplicação tópica de compostos antioxidantes (LATHA; BABU, 2001; ONER *et al.*, 2006; PARIHAR *et al.*, 2008). Além disso, foi demonstrado que antioxidantes ou sequestradores de radicais livres, quando administrados após a queimadura, exercem efeitos protetores contra danos no tecido oxidativo induzidos pela queimadura e falência de múltiplos órgãos (BANGHA; ELSNER; KISTLER, 1997; TANAKA *et al.*, 1999; CETINKALE; SENEL; BULAN, 1999; HORTON *et al.*, 2001).

Como a principal fonte de oxidantes pode ser proveniente de neutrófilos em resposta a uma reação inflamatória sistêmica devido insulto local por queimaduras, pode-se esperar que agentes que inibem a ativação e a adesão de neutrófilos também possam exercer efeitos protetores contra lesões térmicas (HANSBROUGH *et al.*, 1996; KHODR; KHALIL, 2001).

Diversos estudos relatam o efeito protetor contra os danos oxidativos e inflamação a respeito dos ativos naturais com potencial antioxidante, em queimaduras térmicas induzidas em camundongos (SINGER *et al.*, 2007; BHATIA *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2016). Park *et al* (2010), demonstrou que tratamento com o flavonoide kaempferol, foi capaz de reduzir o infiltrado de células inflamatórias na derme e o espessamento da epiderme, além de diminuir a expressão de TNF- α . Ozcan *et al* (2019), relatam a reversão dos baixos níveis de glutathione, superóxido dismutase, catalase com o uso tópico do extrato de Murta (*Myrtus communis*) em queimaduras térmicas, com diminuição significativa dos danos causados na pele.

Devido a atividade 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/10 s promoveu

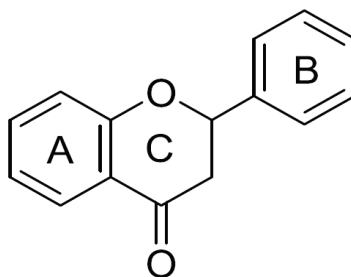
melhora na reepitização e reestruturação do tecido. Ainda, estudos bioquímicos dos tecidos indicaram a possibilidade do seu potencial de eliminação de radicais livres para efeito na cicatrização das feridas.

Outro estudo para avaliação de tratamento de queimadura foi realizado com a curcumina uma vez que a mesma apresenta atividades anti-inflamatória, antioxidante e cicatrizante de feridas (SINGER *et al.*, 2007; GONÇALVES, 2017). Nestes estudos, os autores realizaram a queimadura no dorso de ratos, utilizando um pente de metal previamente imerso em água quente por 3 minutos, e em contato com pele por 30 segundos. A curcumina foi administrada, por via oral, 30 minutos antes da queimadura e nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Concluiu-se que a curcumina foi capaz de reduzir a progressão das queimaduras na zona de isquemia representada por interespaços, impedir a formação de queimadura de espessura total e necrose das áreas isquêmicas.

2.4 FLAVONOIDES

Os flavonoides representam um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de metabólitos secundários é amplamente distribuída no reino vegetal (SIMÕES *et al.*, 2004). São encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Quimicamente, a maioria dos flavonoides baseia-se em uma estrutura fundamental que possui um esqueleto formado por de 15 átomos de carbono constituído por dois anéis benzeno (A e B como mostrado na Figura 2), ligados por meio de uma cadeia três carbonos entre elas e um oxigênio como heteroátomo (C) (SIMÕES *et al.*, 2007). Apresentam um núcleo característico C6-C3-C6, sendo biossintetizados a partir das vias do ácido chiquímico e do ácido acético (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTO, 2017).

Figura 2 - Estrutura fundamental de flavonoides

Fonte: SANTOS; RODRIGUES (2017).

As atividades bioquímicas dos flavonoides e de seus metabólitos estão relacionadas à sua estrutura química, que podem variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (MACHADO, 2005).

Mais de 6000 diferentes flavonoides já foram descritos (YANG *et al.*, 2001; LE MARCHAND, 2002), sendo suas principais classes: chalconas, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonóis, flavan-3-óis, antocianidinas e auronas (VERRI *et al.*, 2012). São substâncias de ocorrência natural que possuem várias ações farmacológicas e aplicações terapêuticas. Alguns deles, devido às suas estruturas fenólicas, têm efeito antioxidante, inibindo processos mediados por radicais livres, também possuem atividades antimicrobiana, antiviral, antiulcerogênica, antineoplásica, citotóxica, antioxidante, anti-hipertensiva, hipolipidêmica e anti-inflamatória (MACHADO *et al.*, 2008).

Os flavonoides apresentam diversas atividades biológicas notáveis, incluindo potencial efeito antioxidante e anti-inflamatório, e inibição de proteínas de sinalização celular (KEMPURAI *et al.*, 2005; PANG *et al.*, 2006). A atividade antioxidante de flavonoides é amplamente explorada mediante sua capacidade de eliminação das EROs, e tem atraído cada vez mais atenção como terapêutica para uma variedade de doenças, incluindo cânceres, doenças cardiovasculares, autoimunes e infecciosas (HU, 2007). Sua capacidade antioxidante está relacionada às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, protegendo assim os tecidos do ataque dessas estruturas, bem como inibindo a peroxidação lipídica (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Ademais a essas propriedades, os flavonoides possuem funções de estabilizadores de membranas, interferindo em

alguns processos do metabolismo intermediário (GALATI *et al.*, 2002).

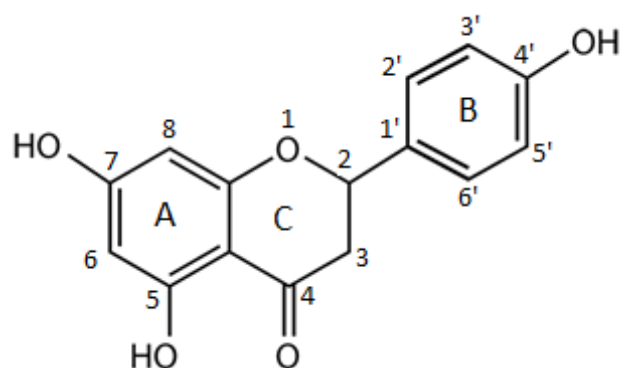
Neste contexto, alguns mecanismos antioxidantes são propostos para os flavonoides, como inibir a formação de EROs pelo bloqueio do sistema enzimático (ciclooxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase) responsável pela geração de radicais livres; quelar metais, os quais podem iniciar a produção de radicais hidroxil; sequestro de radicais livres; proteção das defesas antioxidantes como a glutathione transferase ou indução de enzimas antioxidantes (MIDDLETON, KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; PIETTA, 2000).

A atividade anti-inflamatória dos flavonoides ocorre por meio da modulação da atividade das células presentes nos processos inflamatórias entre elas, linfócitos, monócitos, neutrófilos, macrófagos e mastócitos (SANGEETHA *et al.*, 2016); inibem citocinas pró inflamatórias (TNF- α , IL-1), modulando atividade das enzimas da via do ácido araquidônico como as fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipooxigenase, e também são capazes de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (KIM, *et al.*, 2004; LÓPEZ-POSADAS, *et al.*, 2008; CAZAROLLI, *et al.*, 2008). Yoshida *et al* (2010) descreveram que as flavanonas diminuem a produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α e IL-6, por meio da inativação do fator de transcrição NF κ -B.

Entre os flavonoides, as flavanonas aparecem como a classe mais comum, (MANACH *et al*, 2004). Flavanonas são caracterizadas por glicosídeos como naringina e hesperidina, e por agliconas, como naringenina e hesperetina, com importantes efeitos a saúde como antioxidante e anticancerígeno. (ERNAWITA *et al.*, 2017; MISTRY; PATEL; KEUM, 2017).

A Naringenina (NG) ou 5,7,4'-trihidroflavanona (Figura 3) é um importante flavonoide da classe flavanona presente em frutas cítricas como laranja, limão e tangerina, e também pode ser encontrada em cascas de tomate (LEE *et al.*, 2001; AKBARZADEH *et al.*, 2016). É solúvel em solventes orgânicos como álcool, praticamente insolúvel em água e possui peso molecular de 272,26 g/mol (SUMATHI *et al.*, 2015). Segundo Yen *et al* (2009) devido a pouca solubilidade aquosa, a NG possui baixa biodisponibilidade quando administrada oralmente, pois sofre degradação no estômago devido o ambiente ácido. Assim, uma via alternativa para a sua utilização é a administração tópica, a qual previne sua degradação gastrointestinal.

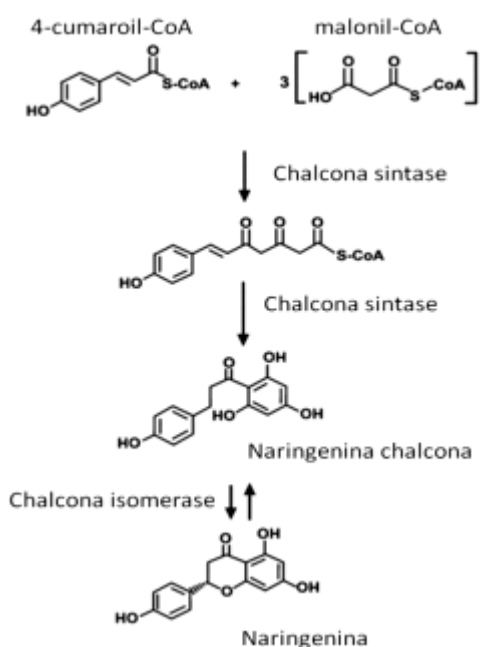
Figura 3: Estrutura química da Naringenina



Fonte: MARTINEZ *et al.*, (2015).

Na rota de síntese dos flavonoides, a NG é a primeira a ser sintetizada ao reagir uma molécula de 4-cumaroil-CoA com 3 moléculas de malonil-CoA por meio da enzima chalcona sintase, formando a naringenina chalcona que em seguida é convertida a NG por uma chalcona isomerase (Figura 4) (WU *et al.*, 2014).

Figura 4: Rota biossintética da Naringenina



Fonte: SOUZA (2017) (Adaptado).

Nos últimos anos, houve um crescimento de interesse nessas flavanonas devido aos efeitos benéficos atribuídos às suas diversas atividades farmacológicas entre elas, anti-inflamatórias, anticancerígena, antiaterogênica,

antioxidante, antidiabética, neuroprotetora, imunomodulatória (JI *et al.*, 2016; NAGULA; WAIKAR, 2019; SPENCER, 2008). Essas propriedades podem ser atribuídas à presença de grupamentos hidroxila em sua estrutura (MIR; TIKU, 2014).

O efeito antioxidante da NG ocorre por sua capacidade de quelar metais e pela inibição da XO, evitando a formação de EROs, pois ocorre o sequestro dos radicais ânion superóxido e hidroxilas formados, pelo aumento da expressão das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), além de ter efeito protetor contra a peroxidação lipídica (CAVIA-SAIZ *et al.*, 2010; ALAM *et al.*, 2014; VEZZA *et al.*, 2016; MANCHOPE *et al.*, 2016; MAATOUK *et al.*, 2016; NAGULA, WAIKAR, 2019). Segundo Kanno *et al* (2003) a atividade antioxidante da NG também é capaz de evitar danos neurológicos causados por radicais livres. A NG também se mostrou eficaz na redução do radical ABTS *in vitro*, confirmando suas propriedades antioxidantes (CAVIA-SAIZ *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2015).

Além disso, a NG possui efeitos anti-inflamatórios, como a redução do sintoma de colite, descrito por DOU *et al.*, 2013, que demonstraram que houve a regulação dos mediadores pró-inflamatórios como a IL-6 e TNF α na mucosa do cólon após o tratamento. Essa flavanona também foi capaz de reduzir a IL-8, LTB-4 e TNF- α em pacientes com bronquite crônica (LUO *et al.*, 2012). Também foi demonstrado que a NG reduziu a oxidação de proteínas e danos nas moléculas de DNA, modulou o processo inflamatório diminuindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias e ainda preveniu a hiperlipidemia (CHTOUROU *et al.*, 2015). Em adição, a NG diminuiu a neuro-inflamação mediada pelo fator nuclear NFk- β em tratamento profilático realizado em ratos (RAZA *et al.*, 2013). O efeito neuroprotetor da NG relatado por Rahigude *et al.*, (2012), ocorreu pelo seu efeito em reverter déficits de memória, reduzir o dano oxidativo e aumentar os níveis de GSH no tecido cerebral.

O tratamento via oral realizado com NG por 7 dias demonstrou efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes em ratos com queimadura térmica, com redução significativa nos níveis de TBARS na pele, reduzindo assim a peroxidação lipídica e aumento dos níveis de GSH (AL-ROUJAYEE, 2017). A NG também demonstrou potencial antioxidante em formulação de uso tópico em camundongos contra os efeitos deletérios relacionados à radiação UVB na pele (MARTINEZ *et al.*, 2016).

Ohkatsu, Sakurai e Sato (2010) observaram que dependendo do solvente utilizado e da combinação com outros substratos, podem modificar os efeitos biológicos da NG. Além disso, alguns autores também relatam sua baixa atividade antioxidante, baixo efeito da inibição da peroxidação lipídica, redução da atividade da GSH (PROCHAKOVÁ; BOUSOVÁ; WILLHELMOVÁ, 2011; STEVANATO; BERTELLE; FABRIS, 2014) e até mesmo ação pró-oxidante (SAHU *et al.*, 1997; MIRANDA *et al.*, 2000 GALATI *et al.*, 2002; YEN *et al.*, 2003).

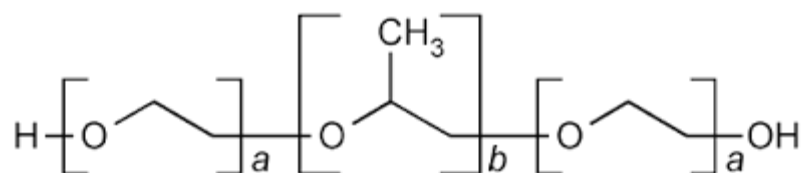
Em virtude do potencial terapêutico da NG que permite uma possível regulação da homeostase redox na pele, associado ao fato de que em lesão térmica ocorre obstrução vascular dos vasos, que gera dificuldade na chegada de antibióticos e de componentes celulares do sistema imune à área queimada, justifica-se a exploração do tratamento em queimadura térmica desse flavonoide administrado topicamente.

2.5 SISTEMAS TERMOSENSÍVEIS

O Poloxamer 407 (P-407), comercialmente identificado de Pluronic® F-127 (Figura 5) é um copolímero, com arranjo em três blocos não-iônicos, com um bloco central hidrofóbico de óxido de propileno (PO) e dois blocos hidrofílicos de óxido de etileno (EO) nas extremidades. A característica principal desses polímeros é a alteração físico-química de acordo com as mudanças da temperatura, assim, com o aumento da mesma, os triblocos se organizam na forma de micelas, caracterizando a gelificação e ao diminuir ela se apresenta na forma líquida (DUMORTIER *et al.*, 2006)

Esses polímeros podem ser definidos como termogéis, os quais são formas farmacêuticas termorreversíveis, ou seja, respondem a mudanças de temperatura. Assim em temperaturas a 25 °C, um termogel pode ser líquido (sol) e geleificado (gel) a 36°C, sendo capazes de sofrerem transições sol-gel reversíveis para formar géis sólidos (ANDRADE, 2019). Ainda, as propriedades anfílicas do polímero possuem características determinadas segundo os valores de EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico), os quais variam conforme o número de monômeros (a-EO) e (b-PO). Portanto, o tamanho, as propriedades lipofílicas e/ou hidrofílicas são capazes de sofrerem alterações conforme a variação desses parâmetros (DUMORTIER *et al.*, 2006).

Figura 5: Estrutura química do Poloxamer

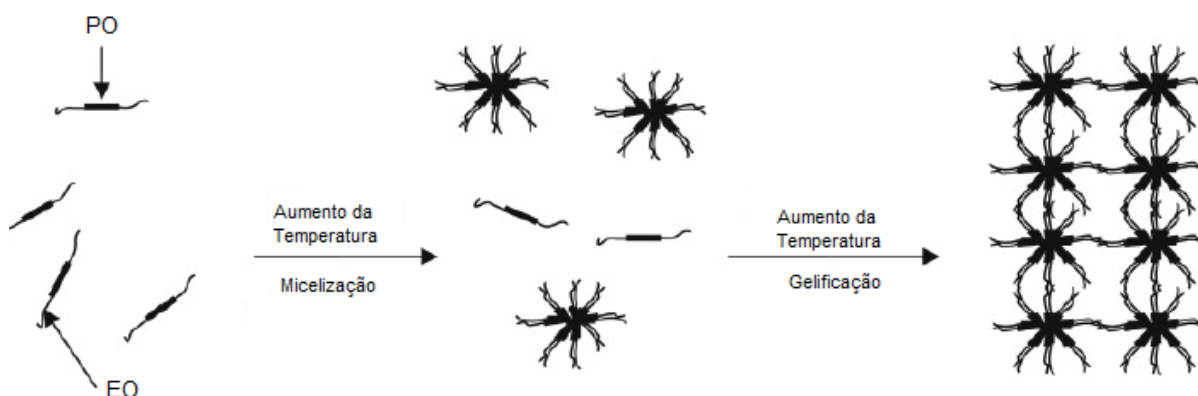


Fonte: (PIRONI, 2019)

O Pluronic® F-127 é o polímero mais estudado, usado desde os anos 70, porém desde os anos 50 ele está disponível no mercado. Inicialmente foi utilizado como agente surfactante em vários tipos de preparações: soluções orais, oftálmicas e produtos tópicos (SCHMOLKA, 1972; PARK, 2011). Em 1932 foi descrito o processo de gelificação, por Kistler, que atestou a existência da formação de uma estrutura organizada que garantia a existência do gel, sendo um sistema semissólido, com pequenas ou grandes moléculas dispersas, os agentes gelificantes, em um veículo líquido (ALLEN JR, 2013).

A maior parte da estrutura do P-407 é formada pelo arranjo de EO, correspondendo a 70% da molécula e é por isso que ele possuiu maior hidrofília (ALMEIDA; AMARAL; LOBÃO, 2012). As características sensoriais desse polímero são os grânulos brancos, com fluxo livre, inodoro e insípido. Ao entrar em contato com a água em baixas temperaturas, o P-407 forma uma solução pela solvatação das unidades poliméricas e formação de pontes de hidrogênio com a parte hidrofílica do polímero. Ao elevar a temperatura, as cadeias poliméricas desidratam como resultado da quebra das ligações de hidrogênio contribuindo para as interações hidrofóbicas de PO, iniciando a formação das micelas (Figura 6) (ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2006).

Figura 6: Mecanismo de gelificação do P-407



Fonte: DUMORTIER *et al.*, (2006).

A transição entre as fases solução e gel ($T_{\text{sol-gel}}$) do P-407 varia conforme a concentração do polímero na solução, assim, quanto maior a concentração utilizada menor a temperatura de transição de estado físico (MELO, 2013). Segundo Ricci *et al* (2002), as concentrações entre 10 % - 25 % formam gel na temperatura corporal. Portanto, a viscosidade dependerá das concentrações do polímero em função da temperatura (ALMEIDA *et al.*, 2012).

A característica de termorreversibilidade confere ao poloxamer fácil aplicação sem necessidade de espalhamento, gelificação *in situ* e liberação controlada do fármaco, dessa forma eles são atrativos para formulações de uso em feridas. Além disso, também possuem boas propriedades de biodegradabilidade, estabilidade e baixa toxicidade (LU *et al.*, 2015).

Percival *et al* (2018), relata que há diversos estudos na literatura em torno do uso e modo de ação de, poloxamer 188 e 407, na cicatrização de feridas. Segundo Kadakia *et al* (2018), o objetivo primário na pesquisa de cicatrização de feridas é construir um modelo de regeneração dérmica barato e biodegradável, com propriedades de retenção de umidade e permeabilidade aumentadas. A presença de umidade é importante para a ideal cicatrização de feridas por queimadura, pois cria um ambiente para reepitelização e minimiza o risco de infecções, assim, conforme demonstrou em seu estudo, o poloxamer 407 foi capaz de fornecer tais características e contribuiu com a cicatrização das feridas.

Soriano-Ruiz *et al* (2020), em estudo de desenvolvimento e caracterização de um veículo à base de poloxamer 407/quitosana/ácido hialurônico,

incluindo três moléculas antioxidantes biológicas, as vitaminas A, D e E, para o tratamento de queimaduras na pele, demonstrou a eficácia do hidrogel na cicatrização de feridas no seu modelo de queimadura e mostrou ser capaz de restaurar as camadas cutâneas assim como produto de referência comercial já existente.

Desta forma, devido as suas características físico-químicas, baixa toxicidade, suas propriedades mecânicas e reológicas, associadas a contribuição no processo de cicatrização de feridas, o P-407 foi escolhido como veículo para a flavanona NG no tratamento de feridas por induzidas por queimadura térmica realizadas neste estudo.

3 OBJETIVO

Estudar os efeitos do flavonoide naringenina (NG) adicionado em gel termorreversível sobre a inflamação e estresse oxidativo na pele de camundongos sem pelo submetidos à queimadura térmica.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar gel termorreversível utilizando o polímero P-407 adicionado de NG;
2. Caracterizar e avaliar as formulações por meio da análise de pH, densidade relativa, teste de espalhabilidade, temperatura de transição sol-gel, viscosidade e calorimetria exploratória diferencial (DSC);
3. Avaliar atividade sequestradora do radical livre ABTS da NG e do gel poloxamer 407 adicionado do flavonoide *in vitro*;
4. Padronizar o modelo de indução de queimadura térmica por contato com haste de ferro aquecida em água quente no dorso de camundongos sem pelo;
5. Avaliar o efeito tópico do gel adicionado de NG para o tratamento dos danos oxidativos, inflamatórios e na retração de feridas cutâneas promovidas por queimadura térmica no dorso dos animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Materiais de Consumo

O 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). Naringenina (NG) foi obtida da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA). Hidroximetil aminometano (Tris) foi obtido da Amresco (Solon, OH, USA). Os excipientes utilizados no 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 NG

O preparo do gel de P-407, um copolímero em bloco do óxido de etileno e óxido de propileno, foi realizado como descrito na literatura (FERREIRA, 2010). O polímero foi lentamente pulverizado em água purificada gelada, sob agitação constante mantida em banho de gelo por 1 hora até a obtenção de uma solução clara. Adicionou-se sorbato de potássio como agente conservante a solução límpida e transparente que foi armazenada em refrigeração por 12 h, e em seguida incorporado o flavonoide NG na concentração de 0,5 %, já definida por estudos anteriores do grupo de pesquisa (MARTINEZ *et al.* 2016), utilizando propilenoglicol (5 %) como agente solubilizante e umectante (FNG) (Tabela 1). Também foi

preparado um gel termossensível sem a adição de NG (P407). Os géis P407 e FNG foram mantidos sob-refrigeração (4 °C) para realização dos testes *in vitro* e *in vivo*.

Tabela 1 – Formulação termorreversível acrescida ou não de Naringenina.

Matéria-Prima	Concentração p/p (%)	
	P407	FNG
Poloxamer 407 (Pluronic®127)	20	20
Sorbato de Potássio	0,2	0,2
Propilenoglicol	5	5
Naringenina	-	0,5
Água Purificada	qsp 100 mL	qsp 100 mL

Fonte: Autora.

4.2.2 Avaliação das Características Físico-Químicas das Formulações

4.2.2.1 Determinação do pH

O pH das formulações adicionadas ou não de NG foi avaliado por potenciômetro digital Marte®, com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. Para realização da análise, 1 g de cada amostra foi disperso em 9 mL de água purificada e homogeneizado 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 Farmacopeia Brasileira 5ª. Edição (Farm. Bras. 2010). Foi utilizado picnômetro com capacidade total de 10 mL 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. Calculou-se a densidade da

água e a densidade da amostra e por fim o cálculo da densidade relativa por meio da Equação 1 (Farmacopéia Brasileira, 2010; CÉSAR; PAOLI; ANDRADE, 2018). A densidade do P407 também foi avaliada.

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

Onde: ($m_{\text{amostra}} = m_2 - m_1$) corresponde a massa da amostra em questão que ocupa o volume V do picnômetro; ($m_{\text{água}} = m_3 - m_1$) corresponde a massa da água pura que ocupam o mesmo volume V; sendo que, m_1 é a massa do picnômetro vazio; m_2 é a massa do picnômetro cheio com a amostra, e; m_3 é a massa do picnômetro cheio de água pura.

4.2.2.3 Determinação da espalhabilidade

A espalhabilidade de uma formulação baseia-se na sua resistência ao movimento forçado. Os resultados correspondem à relação entre a área de espalhamento com a força aplicada sobre o produto e o esforço limite, relação que corresponde ao fator de espalhabilidade (CORDEIRO *et al.*, 2013).

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 0,5 g 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 2 g, 4 g, e 10 g 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 Equação 2.

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

Onde: E_i = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm^2); d = diâmetro médio (mm) (BORGHETTI; KNORST, 2006; ISAAC *et al.*, 2010).

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

A $T_{\text{sol-gel}}$ foi determinada pelo método de inclinação 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. Temperatura de gelificação foi determinada no momento em que a solução no tubo de vidro parou de fluir quando submetida à inversão total, sendo classificadas em três grupos (ZENG *et al.*, 2014; DEWAN *et al.*, 2015):

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

4.2.2.5 Análise da viscosidade *versus* temperatura

A viscosidade das formulações P407 e FNG foi determinada por viscosímetro rotativo digital Brookfield R/S plus Rheometer com sensor cone-placa de 50 mm 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 por meio da mudança drástica na viscosidade (MAZIA *et al.*, 2016).

4.2.2.6 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A caracterização termoanalítica foi realizada utilizando DSC, foi realizada por equipamento Thermal Analyzer TA 60 W – Shimadzu DSC-60 (Kyoto, Japão), em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min, na faixa de aquecimento de 25 – 400 °C, sob uma razão de aquecimento de 10 °C/min. As amostras de poloxamer adicionado e não de NG foram previamente secas a temperatura ambiente em dessecador. A matéria-prima NG pura também foi colocada nas mesmas condições do gel, além da temperatura de 4 °C, que é a temperatura de armazenamento sugerida pelo fabricante. A massa de amostra empregada para análise de DSC foi de aproximadamente 2 mg.

4.2.3 Determinação da Atividade Sequestradora do Radical ABTS (2,2' azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico)

O método ABTS é caracterizado pelo sequestro de radicais cátions ABTS^{•+} por antioxidantes presentes na reação, é um método indireto e apresenta boa estabilidade (PEREIRA, 2009; TIVERON, 2010). A capacidade redutora do radical livre ABTS é verificada através da queda de absorvância, na presença de substâncias antioxidantes na amostra adicionada (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011). O método foi realizado de acordo com Sánchez-Gonzalez *et al.*, (2005), com adaptações.

A formação do cátion radical ABTS foi realizada por meio da reação de 7 mM da solução ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) (PASQUINI-NETTO *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 0,63 a 5,0 µg/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 NG após incorporação no gel termorreversível, pesou-se 1,0 g do mesmo e diluiu em 10 mL de etanol. Após, foi agitado por 10 minutos em agitador magnético (Agitador Orbital, 255, Fanem®) e 5 minutos em vórtex (Agitador de Tubos Vortex, AV-2, Gehaka®). Posteriormente, as amostras foram armazenadas em geladeira por 24 horas e centrifugadas (Centrífuga, Baby I 206-BL, Fanem®) 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. O controle positivo para a formulação foi composto da solução de ABTS e gel sem adição de NG que sofreu o mesmo processo de preparo do gel aditivado.

4.3 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA *IN VIVO* DO ATIVO NG INCORPORADO EM FORMULAÇÃO BASE DE POLOXAMER 407

4.3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, do sexo masculino, adultos e com peso de 25 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).

4.3.2 Padronização do Modelo de Indução de Lesões Cutâneas em Camundongos *Hairless* por Queimadura Térmica

Os camundongos foram subdivididos aleatoriamente, em grupos contendo 5 animais cada para todos os experimentos. Primeiramente, foi definido,

macroscopicamente, o tempo de indução de queimadura em 3 s, 6 s e 9 s de contato com a pele do animal. Posteriormente, com tempo de contato previamente estabelecido de 3 s, para obtenção de queimadura parcial superficial, foi verificado também o tempo ideal para 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 (90 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) via intraperitoneal na parte posterior do membro pélvico (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 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 1 cm x 2 cm. A extremidade foi mantida em contato por 3 minutos em água na temperatura de 100 °C, monitorada por termômetro (BHATIA *et al.*, 2016). Posteriormente, o molde de ferro foi colocado verticalmente em contato com a pele dos animais, sem pressão adicional, somente com o peso da haste de 72 g, por tempo de contato estabelecido 3 s 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 9 s. Posteriormente, nos testes com tempo de contato estabelecido de 3 s 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 a pele foi coletada.

Após a eutanásia, no período correspondente aos tempos de 24, 48 e 72 horas após a queimadura, as amostras de pele foram extraídas cirurgicamente do dorso dos animais. 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 as extrações das peles.

4.3.3 Protocolo de avaliação da eficácia do gel termossensível adicionado de NG

Os animais foram alocados aleatoriamente em cinco grupos (n= 5) (Tabela 2).

Tabela 2: Agrupamento, nomenclatura e tratamento dos animais.

Grupo (n=5)	Tratamento
CN	Grupo não queimado
CQ	Grupo queimado e não tratado
CS	Grupo queimado e tratado com creme de Sulfadiazina de Prata 1 %
CB	Grupo queimado e tratado com P407
NG	Grupo queimado e tratado com FNG

Fonte: Autora.

Os animais foram tratados topicamente de 8/8 h, nas áreas queimadas, com 200 µL de formulação, com ou sem ativo NG, administrada com o auxílio de uma pipeta e 0,2 g de creme de sulfadiazina de prata 1 % pesada previamente em vidro relógio, para ambos os casos foi utilizado um pincel para espalhar a formulação e isso ocorreu imediatamente após o término da queimadura. A indução da queimadura foi realizada no tempo de 3 s 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 foram retiradas, limpas, lavadas 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.

4.3.4 Avaliação do Edema Cutâneo

As amostras de pele dos diferentes grupos foram coletadas do dorso dos animais, com auxílio de um molde 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 por peso de pele em mg.

4.3.5 Determinação da Atividade da 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 μ L de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetil amônio (HTAB), homogeneizadas com auxílio do Ultra Turrax® (T18 basic, IKA). O homogenato foi centrifugado a 16.100 *g* por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi retirado para o ensaio (30 μ L). A alíquota do sobrenadante foi adicionada a um poço em uma microplaca de 96 poços, sendo adicionados posteriormente 200 μ L de uma solução contendo 10% de tampão fosfato 0,05 M (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).

4.3.6 Avaliação do Poder Antioxidante Redutor de Ferro (FRAP) na Pele

As amostras de pele dos animais foram coletadas em microtubos contendo 500 μ L de KCl 1,15 %. No início do ensaio, as amostras foram trituradas com auxílio do homogeneizador de tecidos Ultra Turrax® (T18 basic, IKA). Em seguida, foram centrifugadas a 1.000 *g* 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 μ L do sobrenadante e 150 μ L de reagente FRAP. O branco foi preparado com 30 μ L de KCl a 1,15 % e 150 μ L 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 20 mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3.6), e esta solução foi incubada a 37°C por 30 minutos 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).

4.3.7 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 Ultra Turrax® (T18 basic, IKA). Em seguida, foram centrifugadas, em centrífuga refrigerada, Rotina 46R, 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 200 µL de solução de ABTS diluída. O branco formado somente por tampão. A solução do cátion radical ABTS foi produzida como descrito no item 4.2.3. 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 µM) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como nmol Trolox/mg de pele (KATALINIC *et al.*, 2005; CAMPANINI *et al.*, 2014).

4.3.8 Avaliação dos Níveis de Glutathione (GSH)

As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos foram coletadas em microtubos, diluídas (1:4) em EDTA 0,02 M e trituradas em homogeneizador Ultra Turrax® (T18 basic, IKA). Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 50 % na proporção de 1:0,2 de EDTA e TCA, respectivamente. A mistura foi centrifugada a 2.700 g por 10 minutos a 4 °C. O

sobrenadante foi centrifugado novamente a 2.700 g 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 0,4 M (pH 8,9) e 5 µL de uma solução de 1,9 mg/mL de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (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; SABITHA; SHYAMALADEVI, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2015).

4.3.9 Avaliação da Atividade da Catalase (CAT)

O método de avaliação da atividade de CAT tem como base o 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 (Ultra Turrax® - T18 basic, IKA) 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 1 M com EDTA 5 mM pH 8,0 e 20 µL de água deionizada. A velocidade com que o H₂O₂ é reduzida 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).

4.3.10 Avaliação da Produção de Ânion Superóxido

A produção do ânion superóxido foi avaliada pela sua capacidade de redução de *nitroblue tetrazolium* (NBT) (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 (OD)/10 mg de pele (SAITO *et al.*, 2018).

4.3.11 Análise Macroscópica das Lesões

Após indução da queimadura térmica, a evolução e conclusão das lesões foram acompanhadas macroscopicamente por 15 dias. Para avaliação da área da lesão e sua redução, foram realizadas fotografias, nos dias 5, 10 e 15 da queimadura, com os camundongos posicionados em decúbito ventral, dos grupos não tratados e tratados. As imagens foram obtidas com câmera de celular (Iphone 7 plus®), montado em tripé com distância padronizada de 10 cm do dorso do animal (CAMPELO, 2018). As queimaduras foram analisadas clinicamente quanto ao seu aspecto e conclusão da cicatrização (BEAUSANG *et al.*, 1998) após tratamento dos grupos CS, CB e NG ser realizado de 8/8h, em comparação com o grupo controle não tratado CQ.

4.3.12 Análise Estatística dos Resultados

A concentração de NG *in vitro* necessária para sequestrar o radical livre em 50% (IC50) foi determinada usando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA), utilizando uma curva hiperbólica. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. 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. As análises foram realizadas usando-se o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os resultados foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE GEL TERMORREVERSÍVEL POLOXAMER 407 ADICIONADO DE NG

Mediante as propriedades do gel termossensível P-407 e as atividades biológicas da NG descritas como antioxidante e anti-inflamatória (MARTINEZ *et al.*, 2016; MANCHOPE; CASAGRANDE; VERRI, 2017; ABBAS *et al.*, 2019; ZAKY *et al.*, 2019), juntamente com o conhecimento da participação dos radicais livres associados com a resposta inflamatória nas queimaduras térmicas durante a primeira semana após o incidente (CETINKALE *et al.*, 1997; BERTINMAGHIT *et al.*, 2000), o presente trabalho preparou um gel de poloxamer a 20% adicionado de 0,5 % de NG. A concentração de escolha do flavonoide foi realizada a partir de resultados encontrados em estudos do grupo em relação à atividade da NG em inibir a oxidação e inflamação cutânea induzida por radiação UVB (MARTINEZ *et al.*, 2016).

Para a formulação apropriada de uma forma farmacêutica é necessário levar em consideração suas características físicas, químicas e biológicas (BUGNOTTO *et al.*, 2006). Assim, a determinação do pH em formulações é requerida pois além de possibilitar a detecção de alterações do mesmo durante o período de armazenamento, possibilita garantir que o valor do pH seja compatível com a formulação e com o local de aplicação (GEORGETTI *et al.*, 2006).

Os resultados demonstraram que o valor de pH obtido para P407 foi de $6,94 \pm 0,01$ e que a adição de 0,5% de NG proporcionou uma pequena redução do valor $6,12 \pm 0,001$, conforme tabela 3, valores estes considerados aceitáveis para formulações tópicas (ALI; YOSIPOVITCH, 2013). Em circunstâncias normais, um microambiente ácido é encontrado na superfície da pele (SCHADE; MARCHIONINI, 1928). Este ambiente ácido varia dependendo da localização anatômica e idade da pessoa entre um pH de 4-6 e, sempre foi visto como um importante aspecto da pele como função de barreira natural (SCHNEIDER *et al.*, 2007). Os mesmos autores forneceram uma visão geral detalhada da relação entre pH e cura de ferida relatando a complexidade das alterações de pH nesse processo. Eles demonstraram que o pH é um importante fator que contribui no processo de cicatrização e, em

particular, diferentes faixas de pH são necessárias para as várias fases da cicatrização. Kaufman e Berger (1988), também destacaram a relação entre cicatrização e pH tópico e concluíram que a cura da ferida pode ser controlada, em parte, pela alteração dos níveis de pH. Nos termos de pH como alvo terapêutico, foi demonstrado que a cicatrização ocorre mais efetivamente em pH baixo, enquanto que os ambientes alcalinos estão ligados a feridas crônicas (GETHIN, 2007; PERCIVAL *et al.*, 2014).

A alteração do pH em lesões cutâneas é um dos parâmetros responsáveis pela ativação do processo de cicatrização, e também pela queda da tensão de oxigênio e presença de EROs (PERCIVAL; BOWLER; DOLMAN, 2007). O microambiente ácido irá auxiliar no controle de infecções no local, tanto para a pele intacta quanto lesionada, além de permitir o funcionamento adequado das proteinases, que estão envolvidas no processo de recuperação e cicatrização (SCHNEIDER *et al.*, 2007). Portanto, o resultado de pH obtido na FNG mostrou-se ideal para manutenção do pH da pele com lesão aguda, possibilitando evitar o risco de proliferação de micro-organismos no local da ferida e auxiliando no processo de cicatrização.

Tabela 3: pH e Densidade Relativa das formulação P407 e FNG

Formulações	pH	Densidade Relativa (g/ML)
P407	6,94±0,01	1,0034 g/mL
FNG	6,12±0,001	1,0016 g/mL

Nota: Aferições em triplicata de pH e densidade relativa das formulações a base de poloxamer 407, acrescidas (FNG) ou não (P407) de NG. Resultados de pH \pm DP e densidade relativa expressos em g/mL). **Fonte:** Autora.

Segundo Pereira (2011), a determinação da densidade relativa é um importante parâmetro de caracterização para reconhecimento de formulações poliméricas e é considerada como análise complementar aos demais ensaios de caracterização. Dessa forma, conforme tabela 3, a respeito da densidade relativa determinada, observou-se que a incorporação da concentração de NG utilizada no trabalho não proporcionou alteração da densidade determinada no gel base. Em adição, ambos os valores de densidade relativa obtidos se apresentaram próximos aos valores da densidade da água, o que provavelmente deve-se a grande

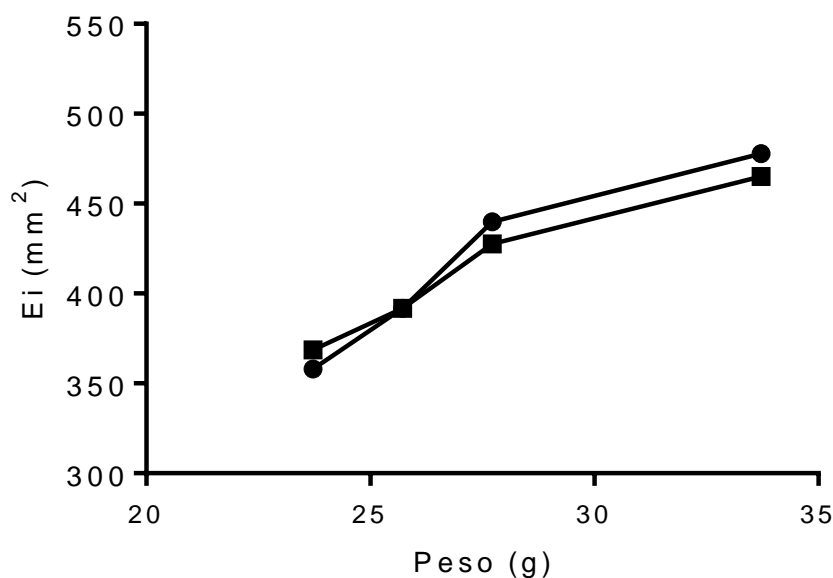
proporção de água que compõe ambos os sistemas, de aproximadamente 80% (p/p).

Ferreira *et al.* (2015) determinou a densidade relativa do gel poloxamer 407 a 20%, enquanto, Laufer Neto (2006), avaliou a densidade relativa de um gel preparado por uma mistura de 15% de poloxamer 407 e 5% de poloxamer 188. Os valores encontrados foram de 1,0327 e 1,01623 g/mL, respectivamente, apresentando resultados próximos ao que foi encontrado em nosso estudo.

A determinação da espalhabilidade foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita na literatura por Knorst (1991) com adaptações. A espalhabilidade é definida como a capacidade de expansão de uma formulação semissólida frente à aplicação de uma determinada força (peso) por um tempo definido. Sua determinação é essencial em formulações semissólidas de uso tópico, pois está relacionada à 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; NGWULUKA *et al.*, 2013).

A figura 7 demonstra a representação gráfica da espalhabilidade, de P407 e FNG, em função da massa aplicada. Foi observado perfil de espalhabilidade em função do peso exercido semelhante entre as formulações, ou seja, a espalhabilidade dos géis aumentou à medida em que o peso foi adicionado, apresentando assim uma boa espalhabilidade. Essa característica pode inferir uma boa capacidade de espalhar-se e abranger todo o local da ferida evitando dor e possibilidade de contaminação. Além disso, dados de espalhabilidade são importantes, pois quando o produto apresenta boas características reológicas, o mesmo é utilizado de forma mais agradável no momento da aplicação sobre a pele lesada e em menor quantidade, levando a uma redução do consumo dessa preparação com a mesma eficácia terapêutica (BORELLA *et al.*, 2010).

Figura 7: Espalhabilidade das formulações P407 e FNG em relação ao peso adicionado.



Nota: Determinação da espalhabilidade das formulações não adicionadas (● P407) e adicionadas de NG (■ FNG), em função da adição de pesos padronizados de 2 g, 4 g e 10 g, em temperatura ambiente realizado em triplicata. **Fonte:** Autora.

O Pluronic® F-127 apresenta particular interesse devido ao seu perfil de baixa toxicidade e em soluções aquosas com concentração entre 20-30% (m/m), transita de uma solução transparente de baixa viscosidade, para um gel semissólido quando em contato com a temperatura corporal, sendo esta transição reversível na presença de baixas temperaturas (ALMEIDA, 2015).

É bem estabelecido que, para soluções aquosas de P-407, acima da concentração e da temperatura micelar crítica, ocorre a micelização com base nas interações hidrofóbicas entre os grupos PO que formam o núcleo hidrofóbico. por sua vez, os blocos EO que formam a coroa hidrofílica da micela ficam disponíveis para fazerem ligações de hidrogênio com as moléculas de água circulantes (CASTILE *et al.*, 2001; ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2006).

A temperatura de gelificação das formulações foi avaliada pelo teste do tubo invertido, que permite determinar a $T_{\text{sol-gel}}$ visualmente, pelo aumento da temperatura e inclinação dos tubos, observa-se a capacidade de escoamento do produto. A formulação P407 apresentou-se visualmente como um gel viscoso, sem escoamento quando o tubo foi invertido em 20°C. Os resultados sugerem que a

adição de NG à formulação acelerou o processo de gelificação em 2°C (Tabela 4).

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 no preparo do gel de Poloxamer 407 pode influenciar no valor encontrado de $T_{sol-gel}$. Fakihari, Corcoran e Schwarz (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).

Tabela 4: Análise da temperatura de transição ($T_{sol-gel}$) entre a formulação P407 FNG pelo Teste do tubo invertido.

Formulações	Temperatura °C			
	0 – 14	16	18	20 – 60
P407	L	L	L	H
FNG	L	S	H	H

Nota: A menor temperatura na qual as amostras foram classificadas como hard-gel foi definida como sendo a temperatura de transição sol-gel. As amostras foram feitas em triplicata para cada formulação (n=3/formulação). Onde: L - Líquido; S – *Soft gel*; e H – *Hard gel*. **Fonte:** Autora.

O estudo das propriedades reológicas de géis a base de P-407 são importantes para o entendimento do processo de gelificação *in situ*. Além disso, géis de P-407 podem prolongar a presença das drogas no local desejado, estendendo seus efeitos terapêuticos. Assim, as características reológicas desses géis devem ser conhecidas, pois também podem implicar nas taxas de dissolução e liberação da droga do gel (FREITAS *et al.*, 2006). Schmolka (1972), em estudo que utilizava Pluronic®127 para tratamento de queimadura térmica, relatou que além da temperatura, a viscosidade de formulações aquosas, contendo P-407, aumenta de acordo com a concentração utilizada do polímero.

A temperatura próxima da temperatura corporal, superior a 32°C, ocorre à transição de fase devido à quebra das pontes de hidrogênio existentes, as

moléculas de água são expelidas da rede polimérica, e ocorre a desidratação do polímero, predominando assim as interações hidrofóbicas entre as cadeias poliméricas, ocorrendo por consequência, a gelificação do sistema polimérico (ALMEIDA, 2015).

Segundo Pereira (2017), a $T_{\text{sol-gel}}$ é delimitada por duas temperaturas que condicionam o comportamento das propriedades viscosimétricas do material. A primeira é a temperatura de micelização – T_{sol} , definida como a temperatura em que o processo de micelização das cadeias lineares do copolímero inicia-se. A segunda é a temperatura de gelificação - T_{gel} , definida como a temperatura em que o processo de gelificação e formação do gel iniciam-se de fato.

Na Figura 8, a análise de viscosidade *versus* temperatura das formulações P407 e FNG, demonstra a influência do aumento da temperatura na viscosidade das formulações. Com o aumento da temperatura, a viscosidade da solução aumenta e a temperatura a qual a viscosidade exibe incremento significativo é notada como temperatura de gelificação. Característica já atribuída a este polímero pela literatura e como já discutido anteriormente, esse aumento na viscosidade é atribuído a desidratação do grupo PO do polímero que leva a formação de micelas e aumento da viscosidade devido a formação de um gel (DEWAN *et al.*, 2015). Ainda, Liu e Chu (2000) relatam que após o processo de gelificação, forma-se uma estrutura cúbica de faces centradas para concentrações entre 20 a 40% de poloxamer 407 em água, que irão conferir a formulação, mais viscosidade, rigidez parcial e facilitar a incorporação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo portanto, a última uma propriedade de interesse para a incorporação do flavonoide NG devido a sua baixa solubilidade em água (FERREIRA *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2020).

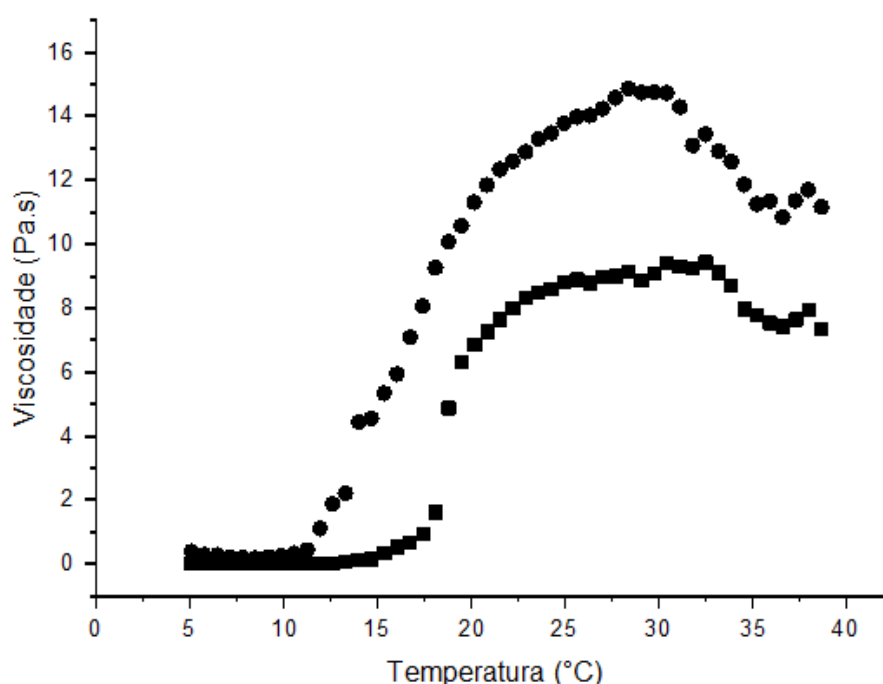
Os resultados da avaliação da viscosidade utilizando reômetro (figura 8) também demonstram que a adição de NG na formulação promoveu um aumento da viscosidade em relação a P407 (Figura 8), uma vez que a curva foi deslocada para a esquerda. Diversos estudos sugerem que a adição de substâncias ativas ou outros aditivos em formulações de poloxamer 407, podem interferir na micelização e alterar o processo de desidratação dos blocos hidrofóbicos de PO, modificando consequentemente a viscosidade do gel (DUMORTIER *et al.*, 1991; GILBERT *et al.*, 1987; CHANG *et al.*, 2002; SHAWESH *et al.*, 2002).

Essas observações são compatíveis com os resultados

apresentados por estudos prévios sobre os efeitos dos componentes hidrofóbicos na formação do gel de copolímeros em bloco de EO-PO-EO. Por exemplo, Malmsten e Lindman (1992) investigaram o processo de geleificação do Lutrol® F127 (P-407) e descobriram que o t-butilbenzeno diminui a temperatura de gelificação desse polímero. De maneira análoga, Gilbert *et al* (1987), observaram que o ácido benzóico e os ésteres do ácido p-hidroxibenzóico causam um decréscimo na temperatura de geleificação dos blocos do copolímero e que, quanto mais hidrofóbico é o soluto, maior será este efeito na temperatura de gelificação.

As temperaturas de gelificação são consideradas adequadas se estiverem entre 25 e 37 °C (CHANG *et al.*, 2002; BRUSCHI, 2006; PEREIRA, 2011), ambas as formulações, FNG e P407 apresentaram início da temperatura de gelificação em 24 °C. Apesar dos resultados apresentados pelo teste do tubo invertido e pelo reômetro exibirem valores diferentes de temperatura de gelificação, é importante levar em consideração que as condições empregadas nos testes são distintas. Contudo, ambas demonstram a característica da influência do aumento da temperatura na viscosidade do gel termorresponsivo como do mesmo adicionado do ativo, ou seja, característica de formulação contendo P-407 (KWEON *et al.*, 2003).

Figura 8: Viscosidade *versus* temperatura do P407 e FNG.



Nota: Análise reométrica da viscosidade em função da temperatura das formulações a base de poloxamer 407, acrescidas (● FNG) ou não (■ P407) de naringenina. **Fonte:** Autora.

Os termogramas de NG, P407 e da FNG, foram obtidos através da calorimetria exploratória diferencial (DSC). A calorimetria DSC é frequentemente utilizada no âmbito farmacêutico como técnica de análise térmica capaz de fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas das substâncias (NAIDU *et al.*, 2004).

Nesta técnica avalia-se o fluxo de calor, por variação de entalpias, resultante de uma alteração física ou química da substância em função da temperatura, podendo demonstrar fenômenos como fusão, ebulição, dessolvatação, transição vítrea, cristalização, degradação e transição polimórfica (KREIDEL, 2009).

O P-407 é um sólido branco, com ponto de fusão correspondente a 56°C, solúvel em água e capaz de formar um gel firme na concentração de 20% p/p a 25°C (SCHMOLKA, 1972). Neste estudo, a formulação P407 foi previamente dessecada, para possibilitar sua análise, o que provavelmente interferiu no deslocamento de seu pico endotérmico de ponto de fusão observado em 46,78°C. A análise DSC permite observar ainda a miscibilidade do polímero com os fármacos (ROUZES *et al.*, 2003; BRAGAGNI *et al.*, 2013), que pode ser confirmada quando ocorre a diminuição da temperatura de transição vítrea e/ou cristalinidade e diminuição do ponto de fusão (PILLIN; MONTRELAY; GROHENS, 2006), assim como observado para P-407 quando acrescida de NG, apresentando evento endotérmico em 45,86°C.

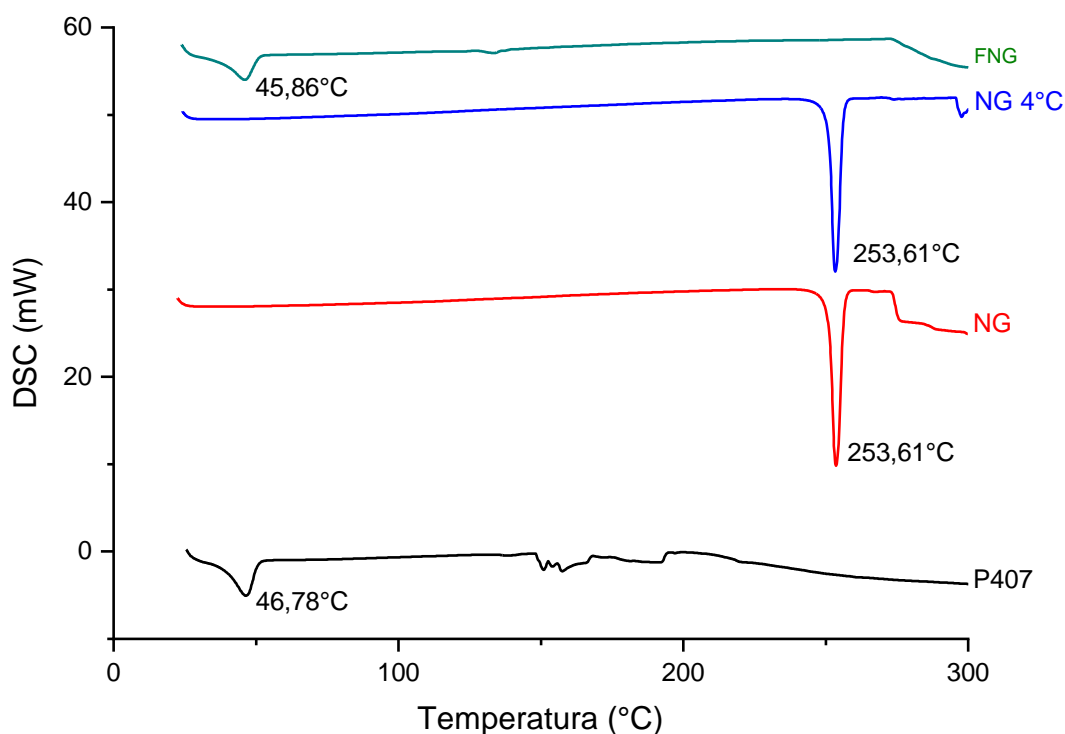
Em adição, notam-se eventos exotérmicos entre 150°C e 200°C para P407, devido à natureza semicristalina do polímero, com uma fase cristalina que consiste de camadas de EO e camadas amorfas formadas de PO-EO (OSSES, 2016).

A curva DSC da naringenina (Figura 9) apresentou evento térmico de 253,61° C, que corresponde ao ponto de fusão do flavonoide, resultado semelhante ao demonstrado por Sumathi, Tamizharasi e Sivakumar (2017), confirmando assim a sua pureza. Na curva DSC da formulação de poloxamer 407 adicionada de NG nenhum evento térmico de fusão para NG pode ser observado. Sugere-se que o desaparecimento do pico de naringenina pode estar relacionado à completa dispersão do flavonoide na formulação e, também, possíveis interações com o polímero como ponte de hidrogênio e força de Van der Waals. O mesmo também foi verificado por Semalty *et al.*, (2010), cujo o pico endotérmico de

naringenina foi suprimido devido provavelmente as interações com o sistema em que foi incorporada. A não formação de novos picos de fusão nas curvas termoanalíticas das amostras de hidrogel termorresponsivo, sugere que não houve a formação de um novo composto químico referente ao processo de preparação do hidrogel termorresponsivo contendo NG. Em adição, isso também foi verificado quando comparamos as curvas termoanalíticas da NG exposta à temperatura ambiente, da FNG, e da NG a 4 °C, temperatura indicada para seu armazenamento.

É importante ressaltar, que a natureza exata das transições térmicas deve ser realizada com métodos complementares, como observações microscópicas, termogravimetria, difração de raios X ou técnicas espectroscópicas para distinguir, por exemplo, a fusão, as transições polimórficas, a perda de água ou a decomposição das substâncias (BUNJES; UNRUH, 2007).

Figura 9: Curvas termoanalíticas das amostras P407, NG (4 °C), NG (temperatura ambiente) e FNG.



Nota: Curva termoanalítica por DSC das formulações base de poloxamer 407, acrescidas (FNG) ou não de naringenina (P407), do flavonoide puro em temperatura ambiente (NG) e mantido em sua temperatura de armazenamento a 4°C (NG 4°C). **Fonte:** Autora

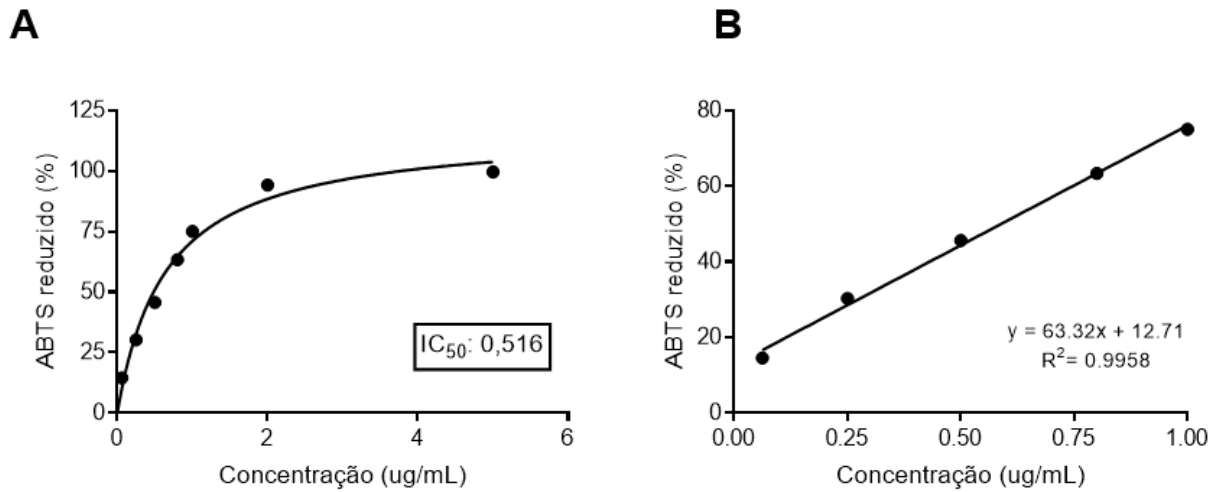
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DO RADICAL LIVRE ABTS PELA NG

Por fim, a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do flavonoide NG pura e adicionada no gel de P-407 foi verificada pelo método de sequestro de radicais ABTS. Os métodos espectrofotométricos baseados na reação dos antioxidantes com radicais cromogênicos, como ABTS, são bastante utilizados devido à sua simplicidade (APAK *et al.*, 2016).

A capacidade sequestradora do radical ABTS pela NG foi concentração-dependente, de acordo com resultados obtidos. A linearidade apresentou-se entre 0,06 – 1,0 µg/mL, com R² de 0,9958 (Fig. 10 B). A atividade máxima encontrada para o ativo na concentração de 2 µg/mL no meio reacional, apresentou valor de 99,63% alcançando posteriormente um platô. O valor de IC₅₀ encontrado para o flavonoide foi de 0,516 µg/mL (Fig. 10 A). Martinez *et al* (2016), também avaliaram a atividade antioxidante da NG por ensaio de ABTS e encontraram valor muito próximo de IC₅₀ (0.71 µg/mL).

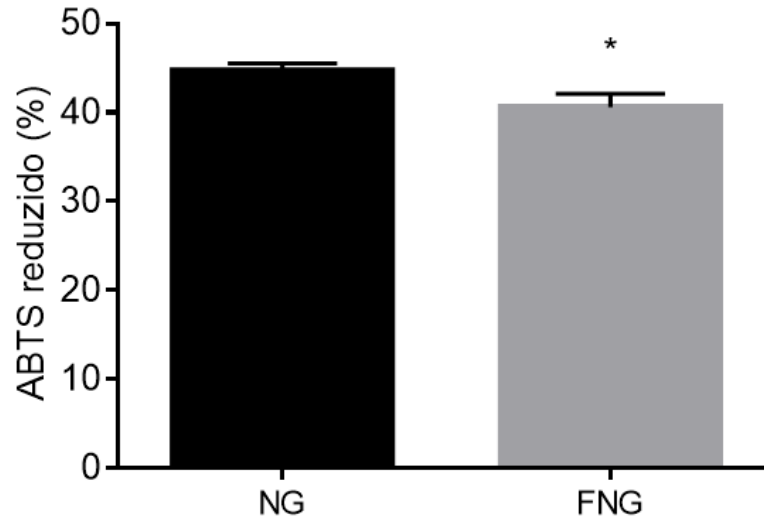
Em adição, foi verificado a capacidade sequestradora de radical ABTS da NG adicionada no gel de P407. Para tanto, um controle adicionado da base sem ativo foi utilizado para verificar se a mesma não poderia interferir com o meio reacional. As porcentagens redutoras encontradas para a NG livre e FNG, preparadas com a mesma concentração no meio reacional, foram de 44,69 % ± 0,49 e 40,59 % ± 0,88, respectivamente, apresentando uma diminuição da atividade antioxidante estatisticamente diferente (Figura 10). Esse resultado pode estar relacionado com o encontrado no termograma da FNG devido as interações da NG com a formulação.

Figura 10: Atividade doadora de elétrons ao radical livre ABTS.



Nota: Curva concentração-resposta da NG (A) e Linearidade (B). Os resultados são representados pela média±EPM. **Fonte:** Autora

Figura 11: Atividade sequestradora do cátion radical ABTS da NG pura e adicionada no gel.



Nota: Os resultados são representados pela média ± EPM. A análise estatística foi realizada utilizando-se tTest. *Diferença estatística significativa se $p < 0,05$. **Fonte:** Autora.

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

A indução da queimadura no presente trabalho foi realizada utilizando haste de metal em água quente e posterior contato com a pele dos animais (FANG *et al.*, 2017; BHATIA *et al.*, 2016, SINGER *et al.*, 2007 e LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017). No entanto, os estudos utilizaram ratos *Wistar* e *Sprague-Dawley* como modelo animal, enquanto que este foi conduzido com camundongos *hairless*, sendo necessário que alguns parâmetros fossem previamente analisados para o correto uso do modelo animal, e adaptados para a análise contra os danos causados pela queimadura térmica mediante tratamento tópico com formulação gel poloxamer 407 20% adicionado de NG 0,5%.

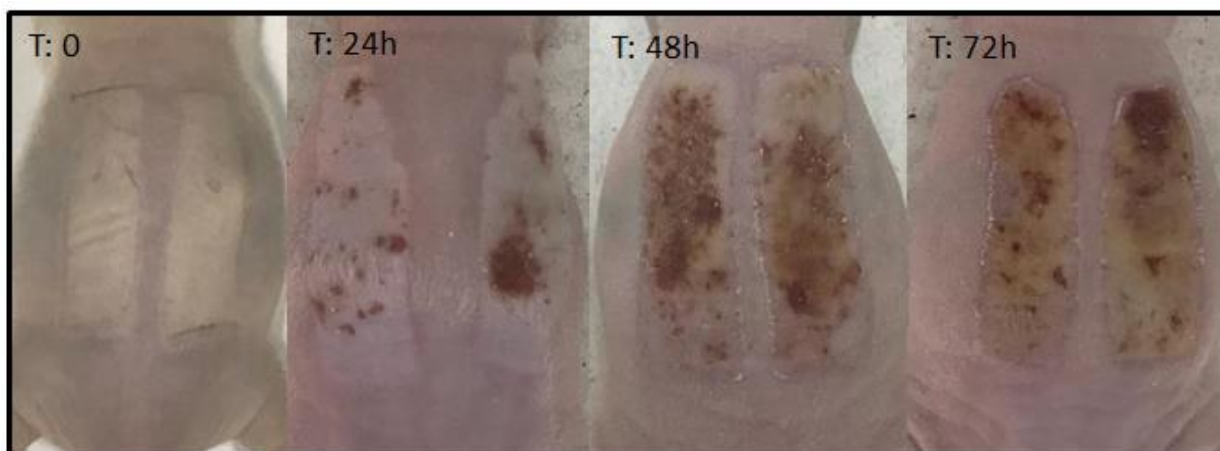
É necessário levar em consideração não só a diferença do tamanho de ratos (250-300g) e camundongos *hairless* (25-30g), como também, a espessura das peles, e principalmente a presença ou não de pelos, desta forma, determinou-se primeiramente o tempo de contato da haste de ferro aquecida a 100°C por 3 min com a pele dos animais. As lesões foram promovidas e analisadas macroscopicamente quanto ao seu grau de profundidade e extensão após 3, 6 e 9 segundos de contato, sem pressão adicional. A pele quando submetida a 6 e 9 segundos de contato com o modelo de haste utilizado apresentou, macroscopicamente, lesões profundas, atingindo toda a sua extensão, com perda tecidual e necrose no local da lesão. Em relação à profundidade as queimaduras são classificadas em 1º grau, 2º grau (superficial e profunda) e 3º grau. A de 1º grau atinge somente a epiderme, resultando em lesão úmida, hiperemiada, com edema e dolorosa. A queimadura de 2º grau atinge tanto a epiderme quanto a derme, caracteriza-se pela formação de bolhas e se divide em superficial e profunda. A queimadura superficial de espessura parcial atinge toda a epiderme e a parte superior da derme, resultando em dor intensa, eritema, flictemas e umidade. A profunda atinge a epiderme e a derme quase completa, gerando dor moderada e lesões mais pálidas. A de 3º grau acomete todas as camadas da pele chegando ao tecido subcutâneo, podendo atingir músculos e ossos (GIMENES, *et al.*, 2009). Queimaduras também podem ser classificadas em relação à sua espessura: queimaduras de espessura parcial superficial são aquelas de primeiro grau e/ou de segundo grau superficial; queimaduras de espessura parcial profunda são aquelas

de segundo grau profundo e queimaduras de espessura total são aquelas de terceiro grau (PICCOLO *et al.*, 2008).

Portanto, foi escolhido o tempo de contato com a pele de 3 s, uma vez que atingiu uma queimadura de espessura parcial superficial, sem interrupção total do fluxo sanguíneo e necrose do tecido, que é de interesse para este estudo. Ainda, para definir o melhor tempo de coleta da pele e estimar os danos cutâneos, bem como identificar a efetividade e padrão da indução de queimadura térmica em camundongos do tipo *hairless*, as peles lesionadas foram coletadas em 24, 48 e 72 horas após a indução da queimadura e submetidas aos testes de avaliação de edema cutâneo, atividade de MPO, níveis de GSH, CAT, ânion superóxido e capacidade antioxidante total (FRAP e ABTS).

Não houve mortalidade de animais durante a realização dos experimentos, nem perda de peso significativa (dados não mostrados). As características das lesões também foram analisadas macroscopicamente de acordo com o tempo de coleta de pele após a indução da queimadura (Figura 12). Foi observado, no tempo zero (T: 0), ou seja, logo após a indução da queimadura térmica, que a pele apresentou-se edemaciada e com local de contato com a haste a 100°C bem delimitado. Em 24 horas (T: 24 h) após a queimadura observa-se um aumento notório na espessura da pele queimada em relação a pele íntegra, devido ao aumento da permeabilidade vascular (LUND; ONARHEIM; REED, 1992) e pequenas zonas de coagulação. Em 48 horas (T: 48 h) nota-se a progressão da lesão, com aumento nas zonas de coagulação. Já em 72 horas (T: 72 h) após a injúria, a lesão apresenta-se mais seca, com formação de crosta nas bordas e diminuição do edema. Desta forma, a análise da profundidade e extensão, bem como as características de lesões promovidas por queimaduras são de extrema importância, pois irão determinar os riscos de evolução para um grau superior e, também irão determinar como as feridas deverão ser tratadas (SINGH *et al.*, 2007; EVERS; BHAVSAR; MAILÄNDER, 2010).

Figura 12: Análise macroscópica da relação tempo de coleta de pele imediatamente (T: 0), 24 (T: 24 h), 48 (T: 48 h) e 72 (T: 48 h) horas após a indução de queimadura.



Fonte: Autora.

Queimaduras comprometem a integridade física e funcional da pele, interrompem a homeostase hidroeletrolítica e modificam o controle da temperatura interna, flexibilidade e lubrificação da superfície corporal. O comprometimento da pele ocorre em função da extensão e profundidade das lesões (SHERIDAN, 2003).

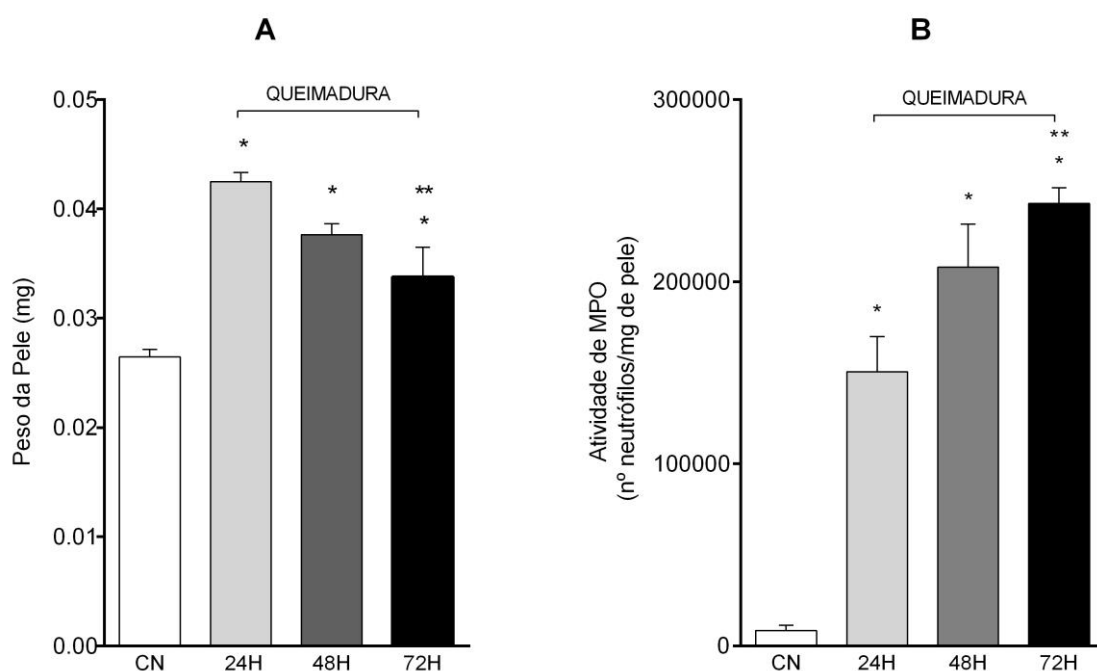
Imediatamente após o trauma, dois eventos estão envolvidos na fisiopatologia de queimaduras, o aumento da permeabilidade vascular e, conseqüentemente, o edema. Após a lesão, ocorre exposição do colágeno, ativação e liberação de histamina pelos mastócitos, que leva ao aumento da permeabilidade vascular e passagem do infiltrado para o interstício dos tecidos afetados, provocando o edema (MÉLEGA, 2002). Ocorrem ainda no tecido lesado a infiltração de células circulantes, neutrófilos e monócitos. A transmigração dos neutrófilos para tecidos lesados é um fenômeno precoce do processo de reparo, ocorre quase que de imediato após sinalização dos neutrófilos retidos pelo coágulo, macrófagos residentes e células estromais. Já as citocinas (principalmente IL-1 e TNF- α), atuando sobre os receptores das células endoteliais, induzem a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão de moléculas de adesão para neutrófilos (BALBINO; PEREIRA; CURTI, 2005).

Dessa forma, foi avaliado nos diferentes tempos de coleta de pele o edema, mensurado como um aumento no peso dorsal da pele lesionada, e a atividade de MPO. Como demonstrado na Figuras 13A e B, o modelo de queimadura promoveu edema e o recrutamento de neutrófilos no local da lesão em 24, 48 e 72

horas, com diferença significativa ($p > 0,05$) do grupo controle não queimado. O edema foi mais intenso no tempo de 24 h (Figura 13A), com diminuição gradual nos tempos seguintes de análise, mas permanecendo estatisticamente diferente da pele integra. É relatado um comportamento bifásico em tecidos queimados, no qual observa-se um primeiro aumento imediato e rápido no conteúdo de água na primeira hora após a lesão, e um segundo aumento, mais gradual, no fluxo de fluido da pele queimada que irá continuar ocorrendo ainda por 12 a 24 horas após o trauma (ARTURSON, 1961; KECK *et al.*, 2009), o que pode explicar os resultados obtidos.

Para a atividade MPO observou-se o inverso, pois houve um aumento gradativo entre os tempos, com diferença estatisticamente significativa do tempo 72 h em relação ao grupo 24 h (Fig. 13B). O perfil observado, provavelmente ocorre devido aos diversos eventos que sucedem a lesão. Neste contexto, tem-se dado atenção especial aos neutrófilos ativados após a queimadura, como já mencionado anteriormente, os estudos indicam que a lesão celular e endotelial seja amplificada pela liberação de radicais livres. A ativação dos neutrófilos com consequente adesão ao endotélio vascular é fator primordial para desencadear a resposta inflamatória, assim os agentes pró-inflamatórios ativam NADPH oxidase e mieloperoxidase de neutrófilos, criando um microambiente altamente lesivo, com alta produção de EROs, que ampliaram os danos teciduais e irão induzir maior recrutamento de células fagocíticas no local (MENDÉZ; RODRÍGUES, 1997; HORTON, 2003). Ainda, neutrófilos permanecem no local da lesão entre 2 a 5 dias, exercendo suas funções de desbridamento do tecido e amplificando a resposta inflamatória liberando citocinas como fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-1 β e IL-6. (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2016; LANDÉN; LI; STAHL, 2016).

Figura 13: Relação tempo de coleta pele-indução de edema (A) e atividade da MPO (B).



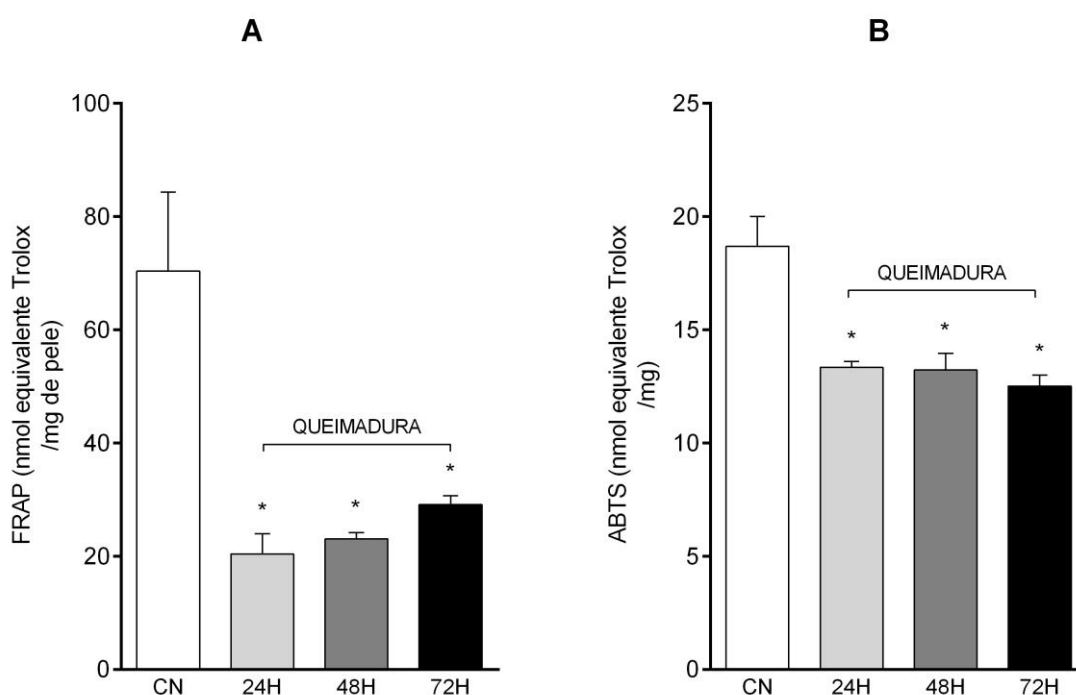
Nota: Os dados são representativos da média de 2 experimentos \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. (* $p < 0,05$ comparado com o grupo não queimado, ** $p < 0,05$ comparado com tempo 24h). CN = grupo controle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

Em virtude do próprio trauma térmico e da ativação celular, o microambiente cutâneo tem sua composição físico-química alterada, devido a baixa tensão de O_2 , diminuição do pH e presença de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Portanto, após lesão térmica, há predomínio de um microambiente oxidativo no tecido queimado em função do desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante, que irá auxiliar a destruição de componentes celulares e teciduais (BUTT *et al.*, 2019).

A capacidade dos antioxidantes presentes na pele do animal em reduzir os íons Fe^{+3} a Fe^{+2} e a capacidade de reduzir o radical ABTS demonstram a sua relação com o estresse oxidativo gerado pela lesão térmica. Esse efeito pode ser verificado pelas Figuras 14A e B, onde está demonstrado que em todos os grupos queimados houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da capacidade antioxidante total da pele analisada pelos testes FRAP (Fig. 14A) e ABTS (Fig. 14B)

em relação ao grupo não queimado. Foi possível demonstrar que o modelo de queimadura térmica nos camundongos promoveu uma redução das defesas antioxidantes totais na pele nos tempos 24, 48 e 72 horas após a lesão. Estes ensaios são interessantes, pois usam princípios diferentes para medir capacidade antioxidante total da pele, uma vez que há dificuldade em medir na pele cada componente antioxidante separadamente e as interações que ocorrem entre eles, além disso, são considerados rápidos, simples e eficientes (KATALINIC *et al.*, 2005; CAMPANINI *et al.*, 2014).

Figura 14: Relação tempo de coleta pele-diminuição da capacidade antioxidante da pele por meio da redução férrica (FRAP) (A) e sequestro do radical ABTS (B).



Nota: 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. **Fonte:** Autora.

Estudos tem apresentado progresso em definir os alvos oxidantes intracelulares, e as inúmeras vias que empregam oxidantes como amplificadores em lesões de queimadura. A GSH é o principal regulador intracelular da homeostase redox no organismo, e atua por meio da oxidação reversível de um grupo tiol ativo (PARIHAR *et al.*, 2008). A isquemia tecidual decorrente da queimadura diminui os

níveis intracelulares de GSH, e isso provavelmente se deve ao consumo excessivo desse antioxidante endógeno durante o estresse oxidativo (SENER *et al.*, 2002; SEHIRLI *et al.*, 2013). Segundo He e colaboradores (2018), modelos animais são de grande importância na exploração da patogênese e tratamento de queimaduras graves, demonstrando em seu estudo a diminuição da atividade dos antioxidantes endógenos SOD, CAT e GSH em modelo de queimadura severa em ratos.

A queimadura térmica realizada neste estudo demonstrou reduzir, significativamente, as reservas dos antioxidantes endógenos GSH e CAT, assim como promover o aumento dos níveis de ânion superóxido (NBT) (Figuras 15A-C). Nas figuras 15A e 15B, verificou-se que diminuição dos antioxidantes na pele foram estatisticamente diferentes quando comparados aos grupos não queimados nos tempos 24 e 48h. No entanto, nota-se que houve um reestabelecimento destes antioxidantes não-enzimático e enzimático, GSH e CAT, na pele no tempo de observação 72h. Em adição, observou-se que este foi estatisticamente diferente em relação ao grupo 24h para GSH e em relação aos grupos 24 e 48h para CAT.

A geração de EROs nos tecidos queimados inicia-se com a ativação da NADPH oxidase que reduz o oxigênio para $O_2^{\bullet-}$ (HORTON, 2003). A figura 15C demonstra que a indução da queimadura em todos os tempos analisados promoveu um aumento na geração do ânion superóxido quando comparado com o grupo não lesionado. Ainda, não foi verificada diferença estatística entre os tempos de coleta da pele.

Como já mencionado, 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). Assim, células fagocíticas migram para o local da lesão e respondem ao processo inflamatório com um aumento significativo nos níveis de produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , que vão exercer papel importante na proteção contra micro-organismos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

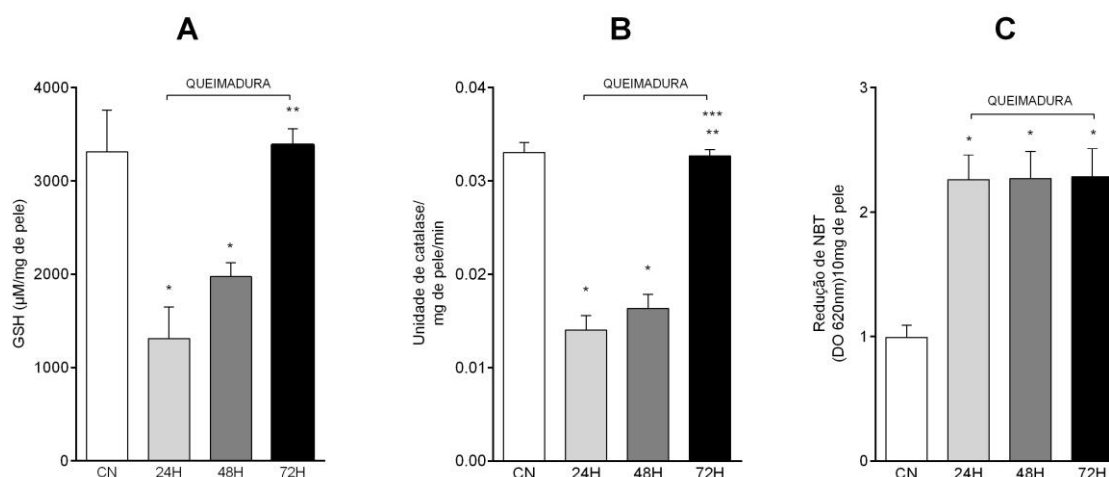
Assim, podemos observar coerência entre as respostas encontradas em relação atividade da MPO e produção de ânion superóxido, uma vez que foi verificado um aumento progressivo da atividade enzimática de MPO nos tempos de análise e alta quantidade detectada do radical nos diferentes grupos.

O aumento verificado no tempo 72h dos antioxidantes GSH e CAT pode ser indicativo do restabelecimento e cura, uma vez que o processo de

cicatrização ocorre por meio de interações organizadas entre vários tecidos e células que se sobrepõem entre estágios sucessivos (ARAGONA *et al.*, 2017).

Assim, diante dos resultados demonstrados o tempo de 48 horas após a indução da queimadura, foi escolhido como tempo de coleta da pele lesionada para realização dos ensaios de análise da eficácia do tratamento tópico com gel termossensível poloxamer 407 adicionado do flavonoide NG, pois além de permitir a análise dos danos oxidativos e inflamatórios também é suficiente para o tratamento das queimaduras.

Figura 15: Relação tempo de coleta de pele-diminuição dos níveis de GSH (A), diminuição da CAT (B) e do ânion superóxido (NBT) (C).



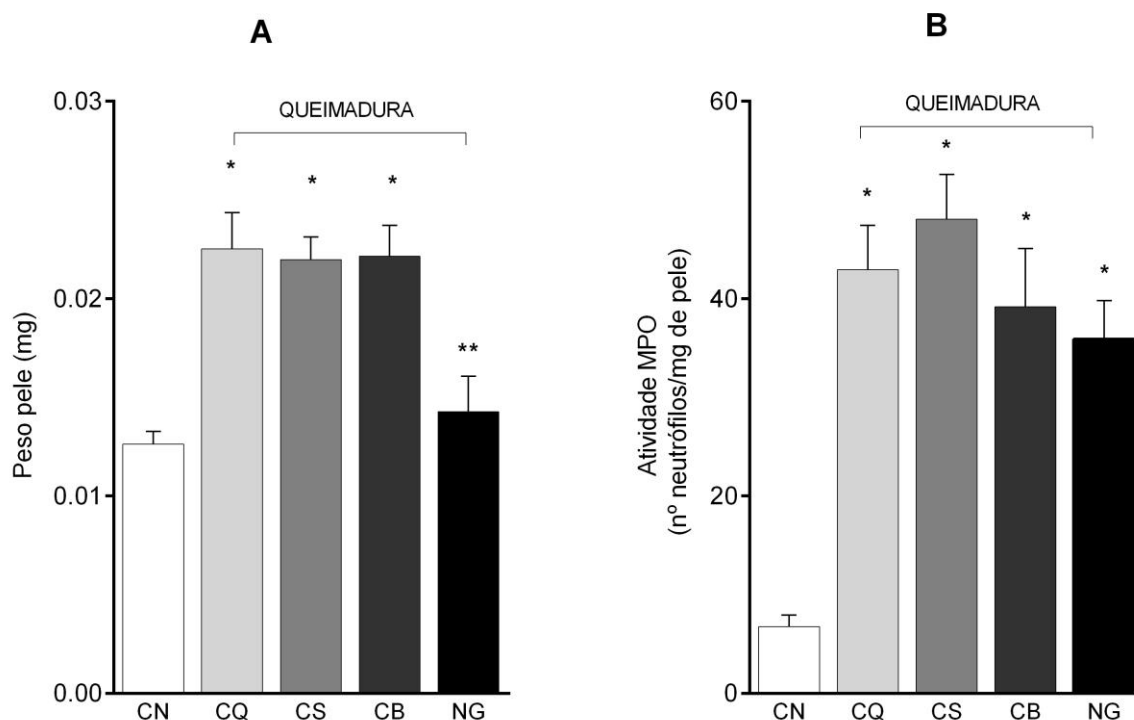
Nota: Os dados são representativos da média de 2 experimentos \pm EPM (n=5). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. (* $p < 0,05$ comparado com o grupo não queimado, ** $p < 0,05$ comparado com tempo 24h; *** $p < 0,05$ comparado com tempo 48h). CN= grupo controle não queimado. **Fonte:** Autora.

5.4 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA FORMULAÇÃO TERMORREVERSÍVEL ADICIONADA DE NARINGENINA CONTRA A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDOS POR QUEIMADURA TÉRMICA

A fisiopatologia da queimadura pode ser expressa, basicamente, pelo aumento da permeabilidade vascular e conseqüentemente edema. A lesão é responsável por expor o colágeno, com conseqüente ativação e liberação de histamina pelos mastócitos, aumentando a permeabilidade vascular, levando ao edema e à hipovolemia. Ocorre, ainda, a liberação de prostaglandinas e do tromboxane. O Fator de Necrose Tumoral (TNF), por meio da indução de inflamação, aumenta a permeabilidade capilar e migração de leucócitos (SALAS *et al.*, 2000; PETER *et al.*, 1999).

Na figura 16 está demonstrado o efeito na diminuição do edema cutâneo gerado após queimadura pelo tratamento tópico de 8/8h com a FNG. Observou-se que os grupos queimado não tratado (CQ), queimado tratado com creme de sulfadiazina (CS) e queimado tratado com gel 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, o tratamento com FNG apresentou uma diminuição do edema chegando próximo ao nível basal. Em adição, os resultados indicaram que o tratamento com sulfadiazina não foi capaz de reverter o quadro de edema estabelecido (Fig. 16A).

Figura 16: Efeito do tratamento com FNG na diminuição do edema (A) e da atividade da MPO (B) após injúria térmica.



Nota: 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 controle sem queimadura, CQ= grupo controle queimado e não tratado, CS= grupo queimado e tratado com creme sulfadiazina de prata 1%, CB= grupo queimado e tratado com P407, NG= grupo queimado e tratado com FNG. **Fonte:** Autora

Nascimento Junior (2016), estudou a ação da romã (*Punica granatum* L.) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura na língua de ratos Wistar. A casca da romã é rica em flavonoides e taninos, especialmente os flavonoides apegenina e naringenina, os resultados demonstraram que a ação cicatrizante do suco da romã estava relacionada principalmente a sua atividade antioxidante e que o tratamento reduziu significativamente o estresse oxidativo, a inflamação, o edema e a infiltração de neutrófilos na lesão.

A MPO desempenha um papel importante no sistema imunológico inato e pode ser usado como marcador da presença de neutrófilos ou inflamação (SHINDO *et al.*, 1994; CAMPANINI *et al.*, 2013). Para atividade de MPO não foi observado diferença estatística para os grupos tratados em relação ao controle não

queimado, no entanto, nota-se uma tendência na diminuição da atividade da MPO do grupo tratado com FNG (Figura 16B).

Neutrófilos são as células mais abundantes no sangue, um número significativo deles é passivamente coletado pelo trombo provisório durante o rompimento dos vasos. Após este extravasamento passivo, os neutrófilos migram para a superfície da ferida para formar uma barreira contra a invasão de micro-organismos e promover o recrutamento ativo de mais neutrófilos a partir dos vasos adjacentes não lesados (FOXMAN; KUNKEL; BUTCHER, 1999; ENGELHARD *et al.*, 1986). Ao final de um dia após a lesão eles constituem em 50% das células migradas ao local (ENGELHARD *et al.*, 1986). Além disso, devido à baixa tensão de oxigênio, característica no centro de uma ferida, ocorre a indução de angiogênese em tecidos lesionados (KNIGHTON *et al.*, 1992). A figura 17 representa a vascularização das lesões do grupo controle queimado na coleta de pele de 48h.

Estudos realizado por Chen *et al.*, (2018) relataram a atividade antiangiogênica da NG, assim a tendência a redução da atividade de MPO observada no grupo tratado com FNG, pode estar relacionada a esta atividade. No entanto, mais estudos devem ser conduzidos para verificar uma possível capacidade da FNG em diminuir a MPO na área lesionada por queimadura térmica, uma vez que esta atividade já foi demonstrada em peles que receberam irradiação UVB e tratadas com formulação semissólida adicionada de NG (MARTINEZ *et al.*, 2016).

Figura 17: Vascularização de lesão 48 horas após indução da queimadura.

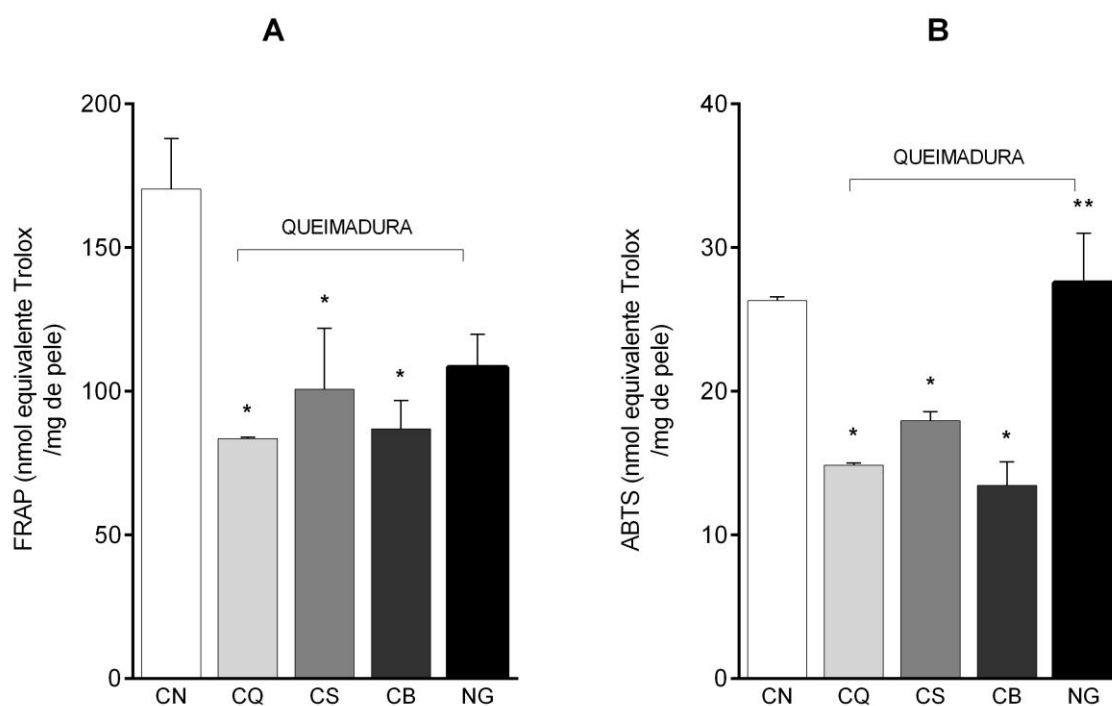


Nota: Fotografia após coleta de pele do grupo controle queimado (CQ), demonstrando a angiogênese decorrente da injúria térmica após 48 horas da indução da queimadura. **Fonte:** Autora.

O aumento do estresse oxidativo é frequentemente relatado em pacientes queimados, devido a elevada produção EROs e à rápida utilização

endógena das reservas de antioxidantes. Assiste-se a um aumento da geração de radicais livres associados à elevação da resposta inflamatória sistêmica, com consequências como a lesão celular, aumentando a falência de órgãos e a mortalidade (GONÇALVES, 2010).

Figura 18: Efeito do tratamento com FNG na capacidade antioxidante da pele por meio da redução férrica (FRAP) (A) e sequestro do radical ABTS (B).



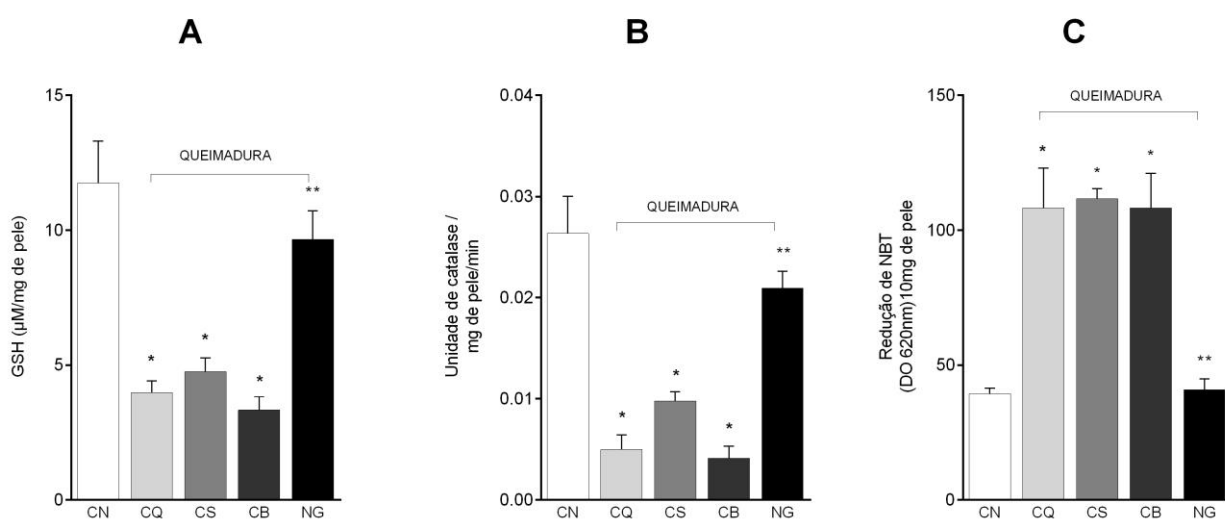
Nota: Os dados são representativos da média de 2 experimentos \pm EPM ($n=5$). A análise estatística foi realizada utilizando-se ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. (* $p<0,05$ comparado com o grupo não queimado, ** $p<0,05$ comparado com o grupo queimado e não tratado). CN= grupo controle sem queimadura, CQ= grupo controle queimado e não tratado, CS= grupo queimado e tratado com creme sulfadiazina de prata 1%, CB= grupo queimado e tratado com P407, NG= grupo queimado e tratado com FNG. **Fonte:** Autora.

Segundo Katalinic *et al.* (2005), resultados de FRAP correlacionam-se com os níveis de antioxidantes como o ácido ascórbico, ácido úrico e α -tocoferol, enquanto a capacidade de eliminação de radicais ABTS reflete os níveis de GSH. Portanto, foi avaliada a atividade antioxidante da FNG utilizando estes ensaios. A figura 18 A e B está demonstrado que a injúria térmica induziu uma diminuição significativa do poder redutor de ferro (FRAP) e da capacidade sequestradora de radical (ABTS), respectivamente, na pele queimada sem tratamento em comparação

a não queimada. Ainda podemos verificar que no ensaio do ABTS o tratamento com FNG restabeleceu a capacidade sequestradora de radical da pele próximo ao nível basal e os grupos tratados com CB e CS não apresentaram essa capacidade (Figura 18 B). Por outro lado, no teste FRAP foi observado que FNG não apresentou diferença estatística comparado a CN, como também em relação ao CQ (Figura 18 A).

Pesquisadores relatam que antioxidantes não enzimáticos, tais como glutathiona, α -tocoferol e selênio, apresentam-se significativamente diminuídos no soro e nos tecidos com lesão térmica (CETINKALE *et al.*, 1997; GUREL *et al.*, 2004; AL-JAWAD *et al.*, 2008; BEIRAGHI-TOOSI *et al.*, 2018). A GSH é um tripeptídeo antioxidante não enzimático que pode ser degradado de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso (FILIPPIN *et al.*, 2008). Na figura 19A está demonstrado que a lesão térmica diminuiu intensamente a presença de GSH na pele queimada em comparação a pele não lesionada. Em adição, observou-se que os grupos tratados CS e CB não apresentaram diferença em relação ao grupo CQ, demonstrando não conseguirem restabelecer a deficiência do antioxidante gerado na injúria. Contudo, o tratamento com FNG apresentou capacidade de reduzir a depleção de GSH chegando próximo ao nível basal.

Figura 19: Efeito do tratamento com FNG nos níveis de GSH (A), CAT (B) e ânion superóxido (C).



Nota: 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 comparado com o grupo

queimado e não tratado). CN= grupo controle sem queimadura, CQ= grupo controle queimado e não tratado, CS= grupo queimado e tratado com creme sulfadiazina de prata 1%, CB= grupo queimado e tratado com P407, NG= grupo queimado e tratado com FNG. **Fonte:** Autora

A CAT é uma heme enzima responsável por reduzir o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Os níveis dessa enzima estão reduzidos quando há estresse oxidativo, indicando um possível desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a ação antioxidante endógena (ANJUM *et al.*, 2016). Como demonstrado na Figura 19B, à queimadura térmica promoveu a depleção deste antioxidante enzimático notada no grupo CQ, e o tratamento com FNG mostrou auxiliar no reestabelecimento de CAT aumento significativamente seus níveis após lesão térmica. Em adição, os grupos CS e CB não apresentaram diferença significativa em relação à CQ.

Al-Roujayee (2017), demonstrou resultados semelhantes com o uso oral de naringenina para tratamento em queimadura térmica induzida em ratos. Os níveis reduzidos de GSH, CAT e SOD na pele ferida foram significativamente restaurados com o do tratamento oral com naringenina, além disso, os biomarcadores inflamatórios séricos também aumentaram significativamente em ratos feridos por queimadura térmica em comparação a controles não lesionados.

Após injúria térmica, ocorre a ativação da XO via reperfusão isquêmica, neutrófilos e macrófagos e promovem produção exagerada de EROs, principalmente de $O_2^{\bullet-}$. Além disso, a ativação de neutrófilos na resposta inflamatória também gera radicais superóxido por meio do mecanismo de "explosão respiratória", através do complexo NADPH oxidase ligado à membrana. O ânion superóxido é formado pela adição de um elétron ao oxigênio molecular, é um radical livre relativamente fraco e seu efeito citotóxico é geralmente atribuído ao seu papel de precursor da formação de HOCl e OH. (HAYCOCK *et al.*, 1997; PARIHAR *et al.*, 2008; BIRBEN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2020).

Estudos relatam que a NG demonstra atividade inibidora de ânion superóxido (; MARTINEZ *et al.* 2015; MARTINEZ *et al.* 2016; PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2016). Assim, o presente trabalho avaliou a eficácia do tratamento da FNG na diminuição da produção desse radical livre após a queimadura na pele de camundongos sem pelo. A Figura 19C demonstra que a queimadura promoveu um aumento intenso da produção de $O_2^{\bullet-}$ e estatisticamente diferente em comparação a

pele não lesionada. Em contra partida, somente o tratamento com FNG demonstrou diminuir o excesso de ânion superóxido gerado após queimadura a níveis basais.

A ferida de queimadura é a primeira área em que os radicais livres ocorrem no evento de queima (TOLIVER-KINSK; KOBAYASHI; SUZUKI, 2018). Segundo Linde (2002), o tempo necessário para a cura da queimadura é um dos principais determinantes para o desenvolvimento de complicações.

A cicatrização de feridas cutâneas envolve uma série de processos complexos que ocorrem simultaneamente, levando a regeneração parcial do tecido e ao restabelecimento da barreira epitelial. Após uma injúria, inicia-se imediatamente o processo inflamatório, que envolve a quimioatração de leucócitos no local da lesão. O primeiro tipo de leucócito a aparecer são os neutrófilos que matam bactérias produzindo EROs e, dessa maneira, previnem a infecção da ferida. Após o influxo de neutrófilos, os monócitos chegam ao local da ferida e se tornam macrófagos pró-inflamatórios. Essas células estão envolvidas na limpeza dos danos causados pelos neutrófilos ao fagocitar a bactéria. Ao mesmo tempo, os macrófagos anti-inflamatórios secretam fatores de crescimento e citocinas que promovem a cura. Além disso, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais também migram para o local da ferida para fechar a ferida. Enquanto os queratinócitos formam a epiderme, os fibroblastos conferem propriedades estruturais e bioquímicas ao tecido da ferida e às células endoteliais que contribuem para o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, caracterizando a granulação. Na fase final da cicatrização, remodelação, as células excedentes sofrem apoptose e os fagócitos remodelam o tecido da ferida, resultando finalmente em tecido cicatricial (MARTINS-GREEN, M.; SAEED, 2020).

Com a finalidade de avaliar os aspectos macroscópicos de contração e formação de crosta no processo cicatricial, de queimaduras de espessura parcial superficial, sem desbridamento cirúrgico, uma lesão de queimadura térmica foi induzida no dorso dos animais para tratamento com Sulfadiazina de Prata 1% (grupo CS), P407 (grupo CB) e NG (grupo NG) de 8/8h por 15 dias e fotografadas nos dias 5, 10 e 15 após injúria e tratamento.

Queimaduras superficiais afetam a camada superior da derme, são dolorosas, mas curam espontaneamente com cicatrizes mínimas. As queimaduras profundas de espessura parcial são minimamente dolorosas e são mais difíceis de tratar devido à incapacidade de determinar com precisão a profundidade da queima

e ao potencial de progredir para uma queima de espessura total, o que faz com que pacientes com queimaduras de espessura parcial precisam ser avaliados periodicamente para avaliar a progressão da queimadura. Já queimaduras de espessura total não são dolorosas e requerem intervenção cirúrgica para cicatrizar, incluindo desbridamento e enxertos de pele (MEDINA *et al.*, 2018). Em adição, queimaduras de espessura parcial superficial, como as obtidas neste modelo experimental, são altamente dolorosas (ROCHA *et al.*, 2020), o que torna o uso de NG interessante no seu tratamento pela relação com suas propriedades analgésicas (PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2016; MANCHOPE; CASAGRANDE; VERRI, 2017).

Ainda, para selecionar o tipo de tratamento a ser utilizado em uma ferida, é necessário reconhecer os benefícios, indicação e contra indicação, de forma a ponderar essas implicações e selecionar a cobertura mais adequada para aplicação, lembrando as especificidades de cada etapa do processo terapêutico da cicatrização (SILVA; ALMEIDA; ROCHA, 2014).

Devido às suas propriedades peculiares, os hidrogéis são substâncias potenciais, eficazes e seguros para o tratamento das queimaduras de espessura parcial podendo ser utilizados no tratamento melhorando o leito tecidual e auxiliando na aceleração do processo cicatricial além de promover alívio da dor (MADAGHIELE *et al.*, 2014, TAVARES; SILVA, 2015).

No processo de reparo tecidual, as crostas aparecem logo após a lesão devido o contato com o ar, que promove o ressecamento da mesma. A crosta tem como função a liberação dos mediadores químicos inflamatórios iniciando assim o processo inflamatório causando o aparecimento de um exsudato fibrinoso que é também responsável por conter a hemorragia (ALVES; MACHADO; NORONHA, 2011).

As fotografias (Figura 20) de indução experimental feridas térmicas mostraram a intensidade da ferida em camundongos *hairless* e progressão da mesma nos animais tratados com CS, CB e FNG nos dias 5, 10 e 15 após injúria. Após a lesão térmica, foram observadas características de processo inflamatório como 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; MACHADO; NORONHA, 2011).

Em adição, notou-se em todos os grupos uma regressão gradual da lesão, contudo foi perceptível visualmente que o tratamento com FNG apresentou um processo de cicatrização mais evidente já no dia 5 em comparação aos outros grupos tratados, principalmente o CS, no qual ainda apresentava lesão de maior extensão. Por outro lado, o tratado com FNG apresentou área totalmente fechada com características de boa cicatrização da pele e de menor extensão notória no 10º dia de tratamento em relação aos demais grupos.

Mesmo após mais de 40 anos de uso, a sulfadiazina de prata ainda aparece como “o padrão ouro” no tratamento de queimaduras de espessura parcial devido suas excelentes propriedades antibacterianas e sua ampla disponibilidade (HEYNEMAN *et al.*, 2016). Entretanto, seu uso tópico está amplamente relacionado ao efeito clínico adverso mais relevante à cicatrização retardada da ferida, em conjunto com outras reações adversas, como resistência bacteriana, toxicidade renal e leucopenia, confirmando que não deve ser utilizada em feridas extensas por longos períodos (KLASEN, 2000; ATIYEH *et al.*, 2007). Ferreira e Paula (2013), concluíram que a sulfadiazina de prata possui ação antimicrobiana, mas não favorece o tempo de cicatrização de feridas. Visualmente, a lesão tratada com sulfadiazina de prata 1% foi à última a concluir o processo de reparação em comparação com os demais grupos, corroborando com os relatos da literatura em relação ao retardo da cicatrização de ferida.

Salehi e colaboradores (2020) demonstraram que hidrogel de alginato adicionada de NG acelerou o processo de cicatrização de feridas de espessura total em estudo conduzido com ratos, em comparação com grupo tratado apenas com gaze. O tratamento com FNG demonstrou, macroscopicamente induzir retração intensa da área lesionada no 5º dia após a lesão, além disso, apresentou visualmente efeito positivo no fechamento das lesões por queimaduras, em relação ao grupo tratado com Sulfadiazina de Prata 1 %. Percebe-se que a crosta não interfere no fechamento da ferida neste modelo experimental e sugere-se que tratamento com FNG apresentou desbridamento autolítico em 5 dias com elevação das crostas. Em adição, análises histológicas fazem-se necessárias para visualização do processo de reepitelização.

Figura 20: Tratamento e acompanhamento da cicatrização das lesões por queimadura térmica no dorso dos animais por 5, 10 e 15 dias após a indução da lesão.



Nota: Os animais foram submetidos à lesão térmica e tratados topicamente com Sulfadiazina de Prata 1% (CS), formulação base de P-407 (CB) e formulação base de P-407 adicionada de naringenina (NG), de 8/8h durante 15 dias após a lesão, em comparação com grupo queimado sem tratamento (CQ). **Fonte:** Autora.

6 CONCLUSÃO

Mediante os resultados apresentados no trabalho a formulação termorreversível de poloxamer 407 adicionada do flavonoide naringenina, apresentou características desejáveis de pH, espalhabilidade, gelificação *in situ* para aplicação tópica em lesões induzidas por queimadura térmica, além de capacidade de sequestrar o radical ABTS *in vitro*. A padronização do modelo de indução de queimadura térmica em camundongos *hairless* foi adequada para o estudo dos danos inflamatórios e oxidativos na pele. A formulação FNG demonstrou ser eficaz na redução do edema cutâneo, manteve a capacidade antioxidante da pele queimada e promoveu a manutenção dos níveis de antioxidantes GSH e CAT, além de reduzir a produção de ânion superóxido no local da lesão. Portanto, o potencial cicatrizante, antioxidante e anti-inflamatório apresentado pela FNG fornece suporte para maiores estudos que viabilizem o desenvolvimento de uma formulação eficiente no tratamento tópico de queimaduras térmicas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. *et al.* Naringenin potentiated β -sitosterol healing effect on the scratch wound assay. **Research in Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v.14, n.6, p. 566-573, dez. 2019.
- ABDULLAHI, A.; AMINI-NIK, S.; JESCHKE, M. G. Animal models in burn research. **Cellular and molecular life sciences**, Basel, v. 71, n. 17, p. 3241-3255, set. 2014.
- AGARRY O.O.; OLALEYE M.T.; BELLO-MICHAEL C. O. Comparative antimicrobial activities of aloe vera gel and leaf. **African Journal of Biotechnology**, [s.l.] v.4, n.12, p.1413–1414, dez. 2005.
- AKBARZADEH, Z. *et al.* The Effects of Naringenin on Some Human Breast Cancer Cells: A Systematic Review. **Arch Breast Cancer**, [s.l.] v. 3, n. 2, p. 34-40, jun. 2016.
- ALAM, M. A. *et al.* Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. **Advances in nutrition**, Bethesda, v. 5, n. 4, p. 404-17, jul. 2014.
- ALLEN Jr, L. V.; POPOVICH, N. C.; ANSEL, H. C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8ª ed, **Porto Alegre: Ed. Artmed**, 2007, 776p.
- ALI, S. M.; YOSIPOVITCH, G. Skin pH: from basic science to basic skin care. **Acta dermato-venereologica**, [s.l.], v. 93, n. 3, p. 261-269, mai. 2013.
- AL-JAWAD, F. H; SAHIP A. S.; AL-KAISY A. A. Role of antioxidants in the treatment of burn lesions. **Ann Burns Fire Disasters**. [s.l.] v. 21, n.4, p. 186-191, dez. 2008.
- ALMEIDA, H. E. P. P. J. **Aplicação de polímeros sensíveis a estímulos em sistemas de liberação modificada de fármacos para uso oftálmico**. 2015. 293 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade do Porto, Porto, 2015.
- ALMEIDA, H.; AMARAL, M. H.; LOBÃO, P.. **Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug delivery**. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 2, n. 06, p. 01-10, 2012.
- AL-ROUJAYEE, A. S. Naringenin improves the healing process of thermally-induced skin damage in rats. **The Journal Of International Medical Research**. V.45, N.2, P.570-582, ABR. 2017.
- ALVES E SILVA, G. M.; FARIAS G. L.; MACIEL M. A. Perfil epidemiológico dos pacientes atendidos no Pronto-Socorro de Queimaduras de Goiânia em agosto de 2013. **Revista Brasileira de Queimaduras**. Goiânia, v. 13, n. 3, p. 173-176, jul. 2014.
- 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 an. **Revista Ciências em Saúde**, v. 1, n. 2, p. 8-18, 2011.

ANDRADE A. G.; LIMA C. F.; ALBUQUERQUE A. K. B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Queimaduras**. Goiânia, v.9, n.1, p. 21-30, 2010.

ANDRADE, A. R. B. **Desenvolver e avaliar lipossomas contendo Levobupivacaína (75S: 25R) em termogéis visando obter efeito prolongado da anestesia local no tratamento de dor pós-cirúrgica**. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

ANJUM, N. A. *et al.* Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. **Environmental science and pollution research**, v. 23, n. 19, p. 19002-19029, 2016.

APAK, Reşat *et al.* Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s.l.], v. 64, n. 5, p. 997-1027, 2016.

ARAGONA M., S. *et al.* Blanpain, Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis, **Nat. Commun.**, v. 8, p. 14684, 2017.

ARTURSON, G. Pathophysiological aspects of the burn syndrome. **Acta Chir Scand**, v. 274, n. 1, p. 1–135, 1961.

ARTURSON, G. Pathophysiology of the burn wound and pharmacological treatment. The Rudi Hermans Lecture, **Burns**, [s.l.], v. 22, n. 4, p. 255-274, jun. 1996.

ATIYEH, B. S. *et al.* Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. **Burns**, [s.l.], v. 33, n. 2, p. 138–148, mar. 2007.

AULICK, L. *et al.* A large animal model of burn hypermetabolism. **Journal Of Surgical Research**, [s.l.], v. 31, n. 4, p. 281-287, out. 1981.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 27-51, Mar. 2005.

BAN, E. *et al.* Optimization of thermoreversible poloxamer gel system using QbD principle. **Pharmaceutical development and technology**, [s.l.], v. 22, n. 7, p. 939-945, 2017.

BANGHA E.; ELSNER P.; KISTLER G. S. Suppression of UV-induced erythema by topical treatment with melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamine). Influence of the application time point. **Dermatology**. Basel, v. 195, n. 1, p. 248-252, 1997.

BARBOSA, E. *et al.* Suplementação de antioxidantes: enfoque em queimados. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 6, p. 693-702, dez. 2007.

BARONI, A. *et al.* Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics In Dermatology**, [s.l.], v. 30, n. 3, p. 257–262, jun. 2012.

BARREIROS A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n.1, Jan-Fev. 2006.

BARROS, E. M. L. *et al.* Efeitos da *Passiflora edulis* S.no processo de cicatrização em queimaduras induzidas em camundongos. **Conscientiae Saúde**, [s.l.], v.15, n.1, p.122-128, jul. 2016.

BATISTA, B. F. C. *et al.* Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 11, n. 4, p. 246-250, 2012.

BARKIN, R. L. Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs: the importance of drug, delivery, and therapeutic outcome. **American journal of therapeutics**, v. 22, n. 5, p. 388-407, 2015.

BAYIR, H. Reactive oxygen species. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 33, n. 12, p. 498-501, dez. 2005.

BHATIA, N. *et al.* Evaluation of the wound healing potential of isoquercetin-based cream on scald burn injury in rats. **Burns & trauma**, v. 4, n. 1, p. 7, 2016.

BERRETTA, A. A. **Pesquisa pré-clínica e clínica de um gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF) para a redução do tempo de cicatrização de lesões em pacientes queimados**. 2007. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

BERTIN-MAGHIT, M. *et al.* Time course of oxidative stress after major burns. **Intensive Care Medicine**, [s.l.], v. 26, n.6, p. 800-803, mai. 2000.

BEIRAGHI-TOOSI, Arash *et al.* Burn-induced oxidative stress and serum glutathione depletion; a cross sectional study. **Emergency**, v. 6, n. 1, 2018.

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

BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BISCEGLI, T. S. *et al.* Perfil de crianças e adolescentes internados em Unidade de Tratamento de Queimados do interior do estado de São Paulo. **Revista Paulista de Pediatria**, [s.l.], v.32, n.3, p.177-182, fev. 2014.

BOLES, M. M., *et al.* Curativo imediato com hidrogel à base de água, óleo de melaleuca alternifolia e emulsificantes após queimaduras. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.328-331, 2008.

BORELLA, J.C. *et al.* Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L.(Asteraceae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 31, n. 2, 2010.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, São Paulo, v. 42, n. 4, p. 531-537, out.- dez. 2006.

BRAGAGNI, M. *et al.* Selection of PLA polymers for the development of injectable prilocaine controlled release microparticles: usefulness of thermal analysis. **International journal of pharmaceutics**, v. 441, n. 1-2, p. 468-475, 2013.

BRASIL. Ministério da saúde. **Queimados**, 2017. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/component/content/article/842-queimados/40990>. Acesso em: 23 mai. 2020.

BRASIL. Ministério da saúde. **RENAME. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – 2017**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_rename_2017.pdf. Acesso em 24 mai. 2020.

BRADLEY, P.P. *et al.* Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**. v.78, p.206-209, 1982.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochim Biophys Acta**, [s.l.], v. 1830, n. 5, p. 3289–3303, mai. 2013.

BUDOVSKY, A.; YARMOLINSKY, L.; BEN-SHABAT, S. Effect of medicinal plants on wound healing. **Wound Repair And Regeneration**, [s.l.], v. 23, n. 2, p. 171-183, mar. 2015.

BUGNOTTO, C. *et al.* Estudo de estabilidade de formulação tópica contendo Propólis. **Ciências da Saúde**. v. 7, n. 1, p. 1-12, 2006

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, n. 6, p. 379-402, 2007.

BURR, S.; PENZER, R. Promoting skin health. **Nursing Standard**, [s.l.], v. 19, n. 36, mai. 2005.

BUTT, H. *et al.* Vitamin E preconditioning alleviates in vitro thermal stress in cultured human epidermal keratinocytes. **Life Sciences**, [s.l.], v. 239, p. 116972, dez. 2019.

BVSMS. Biblioteca Virtual em Saúde. Ministério da Saúde. **Dia Nacional de Luta contra Queimaduras**, 2019. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/>. Acesso em: 12 mai. 2020.

CAMPANINI, M. Z. *et al.* Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation

in hairless mice. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 127, p. 153-160, out. 2013.

CAMPANINI M. Z. *et al.* Topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract: In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy against UV-B-induced oxidative stress. **AAPS PharmSciTech**. 15, 86-95, 2014.

CAMPELO, A. P. B. S. *et al.* Um modelo animal aperfeiçoado para estudo de queimaduras superficiais e profundas da pele. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, p. 38-42, 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. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências Médico-Cirúrgicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

CAMUCI, M. B. *et al.* Caracterização epidemiológica de pacientes adultos internados em uma unidade de terapia intensiva de queimados. **Cogitare Enfermagem**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 78-83, mar. 2014.

CARDEN D. L.; GRANGER D. N. Pathophysiology of ischaemiareperfusion injury. **The Journal of pathology**. [s.l.], v. 190, n. 3, p. 255–66, fev. 2000.

CASAGRANDE, Rubia *et al.* Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 1, p. 21-27, 2006.

CASTILE, J.D.; TAYLOR, K.M.; BUCKTON, G. The influence of incubation temperature and surfactant concentration on the interaction between dimyristoylphosphatidylcholine liposomes and poloxamer surfactants. **International journal of pharmaceutics**. [s.l.], v. 221, n.1–2, p. 197–209, jun. 2001.

CAVIA-SAIZ, M. *et al.* Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. **Journal of the science of food and agriculture**, [s.l.], v. 90, n. 7, p. 1238-1244, mai. 2010.

CAZAROLLI, L. H. *et al.* Flavonoids: Prospective Drug Candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**., [s.l.], v.8, n.13, p.1429 -1440, nov. 2008.

CELIK O.; AKBUGA J. Preparation of superoxide dismutase loaded chitosan microspheres: characterization and release studies. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, [s.l.], v.66, n.1, p. 42–47, abr. 2007.

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

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

CETINKALE, O. *et al.* Evaluation of lipid peroxidation and total antioxidant status in plasma of rats following thermal injury. **Burns**, [s.l.], v. 23, n. 2, p. 114-116, mar. 1997.

CHANG, J. Y. *et al.* Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 241, n. 1, p.155-163, jul. 2002.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n. 2, p. 192-208, 2004.

CHEN, L. *et al.* Differential angiogenic activities of naringin and naringenin in zebrafish in vivo and human umbilical vein endothelial cells in vitro. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 49, p. 369-377, out. 2018.

CHTOUROU, Y. *et al.* Naringenin reduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor kB pathway. **European Journal of Pharmacology**, [s.l.], v.746, p.96-105, jan. 2015.

CHURCH, D. *et al.* Burn Wound Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 403-434, abr. 2006.

Conselho Brasileiro de Fitoterapia (CONBRAFITO). **Rename 2012**. Disponível em:http://conbrafito.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=201:rename-2012&catid=1:latest-news&Itemid=50. Acesso em: 24 mai. 2020.

CORDEIRO, M. S. F. *et al.* Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). **Rev Bras Farm**, v. 94, n. 2, p. 148-153, 2013.

CORREIA, D. S. *et al.* Perfil de crianças e adolescentes internados no centro de terapia de queimados. **Rev. enferm.** UFPE on line, p. 1361-1369, 2019.

CORMACK, David H. **Sistema Tegumentar**. In: Fundamentos de histologia. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

COSTA, V. P; MAYWORM, M. A. S. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes - município de Extrema, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 13, n. 3, p. 282-292, 2011.

CURELLO S. *et al.* Changes in the cardiac glutathione status after ischemia and reperfusion. **Experientia**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 42–43, jan. 1985.

DAMY, S. B. *et al.* Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.

DJEMAA, F. G. B. *et al.* Antioxidant and wound healing activity of *Lavandula aspic* L. ointment. **Journal of tissue viability**, v. 25, n. 4, p. 193-200, 2016.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos

fenólicos. **Visão Acadêmica**. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004

DEWAN, M. *et al.* Effect of methyl cellulose on gelation behavior and drug release from poloxamer based ophthalmic formulations. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 72, p. 706-710, 2015.

DOU W. *et al.* Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. **The British journal of nutrition**, [s.l.], v.110, n. 4, p. 599-608, ago. 2013.

DUMORTIER G. *et al.* Rheological study of a thermoreversible morphine gel. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. [s.l.], v. 17, n. 9, p. 1255-1265, 1991.

DUMORTIER, Gilles *et al.* A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical research**, v. 23, n. 12, p. 2709-2728, 2006.

DZIALO, M. *et al.* The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v.17, n.2, p. 160, 2016.

EL-MAHDY, M. A. *et al.* Naringenin protects HaCaT human keratinocytes against UVB-induced apoptosis and enhances the removal of cyclobutane pyrimidine dimers from the genome. **Photochemistry and photobiology**, [s.l.] v. 84, n. 2, p. 307–316, mar-abr 2008.

ENGELHARD, D. *et al.* Effect of intravenous immune globulin on natural killer cell activity: possible association with autoimmune neutropenia and idiopathic thrombocytopenia. **The Journal of pediatrics**, v. 108, n. 1, p. 77-81, 1986.

ERNAWITA, R. A. W *et al.* In vitro lipophilic antioxidant capacity, antidiabetic and antibacterial activity of citrus fruits extracts from Aceh, Indonesia. **Antioxidants**, v. 6, n. 1, 2017.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J.J. *et al.* Applications of thermoreversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences**, [s.l.] v. 9, n. 3, p. 339–358. 2006.

EVERS, L. H.; BHAVSAR, D.; MAILÄNDER, P. The biology of burn injury. **Experimental dermatology**, v. 19, n. 9, p. 777-783, 2010.

FANG, Q. *et al.* Astaxanthin protects against early burn-wound progression in rats by attenuating oxidative stress-induced inflammation and mitochondria-related apoptosis. **Sci Rep**. v.7, 2017.

FAKHARI, A.; CORCORAN, M.; SCHWARZ, A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. *Heliyon*, v. 3, n. 8, p. e00390, 2017.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. V. 1, 5ª edição, 2010. Acesso em: 11 Julho 2019. 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>

FAURSCHOU, A.; WULF, H. C. Topical corticosteroids in the treatment of acute sunburn: a randomized, double-blind clinical trial. **Archives of dermatology**, v. 144, n. 5, p. 620-624, 2008.

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

FERREIRA F. V.; PAULA L. B. Sulfadiazina de prata *versus* medicamentos fitoterápicos: estudo comparativo dos efeitos no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimadura**, [s.l.] v. 12, n.3, p.132-139, 2013.

FERREIRA, C. F. *et al.* Desenvolvimento, caracterização e avaliação da citotoxicidade de naringina e naringenina nanoencapsuladas. **Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 285-299, 2015.

FERREIRA, E. *et al.* Curativo do paciente queimado: uma revisão da literatura. **Revista da Escola de Enfermagem USP**. v. 37, n. 1, p. 44-51, 2003.

FERREIRA, S. B. S. **A utilização das análises mecânicas e reológicas no desenvolvimento de sistemas bioadesivos termorresponsivos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015.

FILIPPIN, L. I. *et al.* Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 152, n. 3, p. 415-422, 2008.

FOXMAN, E. F.; KUNKEL, E. J.; BUTCHER, E. C. Integrating conflicting chemotactic signals: the role of memory in leukocyte navigation. **The Journal of cell biology**, v. 147, n. 3, p. 577-588, 1999.

FRANCISCHETTI, I. *et al.* Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 25, n. 4, p. 575-584, 2010.

FRANCO, D.; GONCALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 3, p. 203-206, jun. 2008.

FREITAS, M. N. *et al.* Rheological characterization of Poloxamer 407 nimesulide gels. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 2, 2006.

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Wounds, burns, trauma, and injury. **Wound Medicine**, [s.l.], v. 13, p. 12–17, 2016.

FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the treatment of chronic wounds. **Advances in wound care**, [s.l.], v.4, n.9, 560–582, set. 2015.

FULLER, F. W. The side effects of silver sulfadiazine. **Journal of burn care & research**, v. 30, n. 3, p. 464-470, 2009.

GALATI, G. *et al.* Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, Amsterdam, v. 177, n. 1, p. 91-104, ago. 2002.

GAWRYSZEWSKI, V. P. *et al.* Atendimentos decorrentes de queimaduras em serviços públicos de emergência no Brasil, 2009. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 4, p. 629-640, abr. 2012.

GEORGETTI, S. R. *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 64, n. 1, p. 99-106, 2006.

GETHIN, G. The significance of surface pH in chronic wounds. *Wounds uk*, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 52, 2007.

GHASEMIAN, M.; OWLIA, S.; OWLIA, M. B. Review of Anti-Inflammatory Herbal Medicines. **Advances in pharmacological sciences**, [s.l.], v. 2016, n.1, p. 1-11, 2016.

GHLISSI, Z., *et al.* 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

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, [s.l.], v. 107, n. 9, p. 597-605, 2006.

GILBERT, J. C. *et al.* The effect of solutes and polymers on the gelation properties of Puronic F-127 solutions for controlled drug delivery. **J. Control. Release**, [s.l.], v.5, n.2, p. 113-118, set. 1987.

GIMENES, G. A. *et al.*,. Estudo epidemiológico de pacientes internados no Centro de Tratamento de Queimados do Conjunto Hospitalar de Sorocaba. **Re[s.l.], v. Bras. Queimaduras**, [s.l.], v. 8, n.1, p. 14-7, 2009.

GLASSER J.S. *et al.* Activity of topical antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria recovered from burn patients. **Burns**, [s.l.], v. 36, n. 8, p.1172–1184, dez. 2010.

Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, **World Health Organization**; 2018.

GOMES D. R.; SERRA M. C.; PELLON M. A. **Tratamento de queimaduras**: um guia prático. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 8-17.

GONÇALVES, A. C. C. M. L. **Suporte Nutricional no Doente Crítico do Hospital do Divino Espírito Santo, EPE**: trabalho de investigação. 2010. 53 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Porto, 2010.

GONCALVES, G. M. S. Formulations Containing Curcumin or Trans-Resveratrol Increase Dermal Thickness in Rats Submitted to Chemical Peeling. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.14-26, mar. 2017.

GONZALES R. *et al.* Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in

red blood cells from patients with malignant diseases. **Cancer research**, [s.l.], v. 44, n. 9, p.4137–9, set. 1984.

GOUVÊA, P. D. P. *et al.* Assistência de enfermagem ao paciente com grandes queimaduras em um hospital público no interior sul da Amazônia ocidental. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, n. 47, p. e2797, 16 abr. 2020.

GRANGER D.N.; RUTILI G.; MCCORD J.M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 81, p. 22–29, jul. 1981.

GRAVANTE, G. *et al.* Apoptotic death in deep partial thickness burns vs. normal skin of burned patients. **The Journal of surgical research**, v.141, n.2, p.141-145, mai. 2007.

GRICE, E.A.; SEGRE, J.A. The skin microbiome. **Nature reviews. Microbiology**, [s.l.], v. 9, n.4, p. 244–253, abr. 2011.

GUTTERIDGE, J. M; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, n. 1, p. 136-147, 2000.

GUREL, A. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester improves oxidative organ damage in rat model of thermal trauma. **Physiol Res**, v. 53, n. 6, p. 675-82, 2004.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutation research**, [s.l.], v. 443, n. 1-2, p. 37-52, jul. 1999.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free radical biology & medicine**, [s.l.], v. 46, n. 5, p. 531-542, mar. 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Oxford University Press, USA: Oxford University Press, USA, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Analytical Biochemistry**, [s.l.], v. 165, n. 1, p. 215-219, ago. 1987.

HANSBROUGH J. F. *et al.* Neutrophil activation and tissue neutrophil sequestration in a rat model of thermal injury. **The Journal of surgical research**, [s.l.], v. 61, n.1, p.17–22, 1996.

HAYCOCK, J. W. *et al.* Oxidative damage to protein and alterations to antioxidant levels in human cutaneous thermal injury. **Burns**, [s.l.], v. 23, n. 7-8, p. 533-540, 1997.

HE, F. *et al.* Effects of ulinastatin on myocardial oxidative stress and inflammation in severely burned rats. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 22, n. 17, p. 5719-5728, 2018.

HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. **Nature**

Immunology, [s.l.] v.14 ,n.10, p. 978–985, out. 2013.

HEIDARI, M. *et al.* Efficacy of topical application of standardized extract of *Tragopogon graminifolius* in the healing process of experimental burn wounds. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 9, n. 1, p. 54-59, 2019.

HENDON D. **Total Burn Care**. 4. ed. Edinburgh: Saunders, 2002.

HENSLEY K. *et al.* Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 28, n. 10, p. 1456-1462, mai. 2000.

HERMENEAN A. *et al.* Protective effects of naringenin on carbon tetrachloride-induced acute nephrotoxicity in mouse kidney. **Chemico-biological interactions**, [s.l.], v. 205, n. 2, p.138–147, set. 2013.

HEYNEMAN, A. *et al.* The role of silver sulphadiazine in the conservative treatment of partial thickness burn wounds: A systematic review. *Burns*, v. 42, n. 7, p. 1377-1386, 2016.

HESS C. T. **Tratamento de feridas e úlceras**. 4. ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso, 2002.

HONARI S. Topical therapies and antimicrobials in the management of burn wounds. **Critical care nursing clinics of North America**, [s.l.], v.16, n.1, p.1–11, mar. 2004.

HOPKINSON I. *et al.* Collagen VII expression in humans chronic and scars. **The Journal of pathology**, [s.l.], v.182, n.2, p. 192-196, 1999.

HORTON J. W. *et al.* Antioxidant vitamin therapy alters burn traumamediated traumamediated cardiac NF-kappaB activation and cardiomyocyte cytokine secretion. **J Trauma**, [s.l.], v. 50, p. 397–408, mar. 2001.

HORTON, J. W. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. **Toxicology**, [s.l.], v. 189, n. 1-2, p. 75-88, jul. 2003.

HU Q.; HU Y.; XU J. Free radical-scavenging activity of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) extracts by supercritical carbon dioxide extraction. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 91, p.85–90, jun. 2005.

HU, M. Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. **Mol. Pharm**, v. 4, n.6, p. 803-806, dez. 2007.

IOBST, S.; SANTHANAM, U.; WEINKAUF, R. Biotechnology in Skin Care (I): Overview. In: LAD, R. **Biotechnology in Personal Care**. New York:Taylor & Francis; 2006. Cap.5, p.117-122.

ISAAC, C. *et al.* Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 89, n. 3-4, p. 125-131, 19 dez. 2010.

IVAN, A. L. M. *et al.* Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in

vitro. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 138, p. 124-133, set. 2014.

JACKSON D. M. The diagnosis of the depth of burning. **British Medical Journal**, [s.l.], v. 40, n.164, p. 588–596, mai. 1953.

JADOT G. *et al.* Clinical pharmacokinetics and delivery of bovine superoxide dismutase. **Clin Pharmacokinet**, [s.l.], v. 28, n. 1, p. 17–25, jan. 1995

Jl, P. *et al.* Naringenin-loaded solid lipid nanoparticles: preparation, controlled delivery, cellular uptake, and pulmonary pharmacokinetics. **Drug design, development and therapy**, v. 10, n. 10, p. 911-25, mar. 2016.

JOHNSON, C. Management of burns. **Surgery**, [s.l.], v. 36, n. 8, p. 435-440, ago. 2018.

JOHNSTON, T.P.; MILLER, S. C. Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 83-89, 1985.

JOHNSON R. M.; RICHARD R. Partial-thickness burn: identification and management. **Advances in skin & wound care**, v. 16, n. 4, p.178-87, ago. 2003.

JORGE, L. I. F.; MARKMANN, B. E. O. Exame químico e microscópico de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira). **Revista De Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, v. 17, p. 139-45, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**: texto e atlas. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KADAKIA, P. U. *et al.* Comparison of silk fibroin electrospun scaffolds with poloxamer and honey additives for burn wound applications. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 79-94, 2018.

KANNO, S. *et al.* Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in p388 cells. **Journal of pharmacological sciences**, [s.l.], v.92, n. 2, p-166–170, jun. 2003.

KAO, C., GARNER, W. L. Acute Burns. **Plastic and reconstructive surgery**, [s.l.], v.101, n.7, p. 2482-2493, jun. 2000.

KAPOOR M. *et al.* Major enzymatic pathways in dermal wound healing: Current understanding and future therapeutic targets. **Current opinion in investigational drugs**, Londres, v.7, n. 5, p. 418-422, mai. 2006.

KATALINIC, V. *et al.* Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 140, n. 1, p. 47-52, jan. 2005.

KAUFMAN T. *et al.* Deep partial skin thickness burns: a reproducible animal model to

study burn wound healing. **Burns**, [s.l.], v.16, n. 1, p.13-16, fev. 1990.

KAUFMAN, T.; BERGER, J. Topical pH and burn wound healing: a review. In: **Royal Society of Medicine Services International Congress and Symposium**. 1988. p. 55-59.

KECK, M. *et al.* Pathophysiology of burns. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, [s.l.], v. 159, n. 13-14, p. 327-336, 2009.

KEMPURAI, D. *et al.* Flavonols inhibit proinflammatory mediator release, intracellular calcium ion levels and protein kinase C theta phosphorylation in human mast cells. **British Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 145, n. 7, p. 934-944, ago. 2005.

KNIGHTON, D. R. Wound healing agents derived from platelets. U.S. **Patent n. 5,165,938**, 24 nov. 1992.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. Aging skin: histology, physiology, and pathology. **Facial plastic surgery clinics of North America**, [s.l.], v. 19, n. 2, p. 229-234, mai. 2011.

KHODR B.; KHALIL Z. Modulation of inflammation by reactive oxygen species: implications for aging and tissue repair. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n.1, p. 1 – 8, dez. 2001.

KHORASANI, G. *et al.* Aloe versus silver sulfadiazine creams for second-degree burns: a randomized controlled study. **Surgery today**, v. 39, n. 7, p. 587-591, 2009.

KIM, H. P. *et al.* Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of pharmacological sciences**, [s.l.], v.96, n.3, p.229-245, nov. 2004.

KLASEN H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. **Burns**, [s.l.], v. 26, n.2, p. 131–138, mar. 2000. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10716355/>

KNABL, J. S. *et al.* Progression of burn wound depth by systemical application of a vasoconstrictor: an experimental study with a new rabbit model. **Burns**, [s.l.], v. 25, n. 8, p. 715-721, dez. 1999.

KNORST, M.T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (Lam.)DC.** [Dissertação]. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1991.

KREIDEL, Rogério Nepomuceno. **Desenvolvimento e caracterização de dispersões sólidas de nimodipino empregando PEG 6000 ou Poloxamer 407.** 2009. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

KUMAR, S.; SHARMA, S.; VASUDEVA, N. Review on antioxidants and evaluation procedures. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, [s.l.], out. 2017.

KWEON, H. *et al.* Preparation of a novel poloxamer hydrogel. **Journal of applied**

polymer science, 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**, [s.l.], v. 73, p. 3861–3885, 2016.

LATHA B.; BABU M. The involvement of free radicals in burn injury. **Burns**, [s.l.], v. 27, p. 309-317, jun. 2001.

LAUFER NETO, J. **Avaliação das propriedades físico-químicas, de absorção percutânea e de biocompatibilidade de gel anestésico termosensível**. 2006. 134 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Integrada, Dentística Restauradora e Periodontia) - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Ponta Grossa, 2006.

LAWRENCE M. B.; SPRINGER T. A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. **Cell**, [s.l.], v. 65, n.5, p. 859–873. mai. 1991.

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

LEE, C. H. *et al.* Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic ACAT and aortic VCAM-1 and MCP-1 in high cholesterol-fed rabbits. **Biochemical and biophysical research communications**, [s.l.], v. 284, n.3, p.681–688, jun. 2001.

LIMA JUNIOR, E. M.; SERRA, M. C. V. F. **Tratado de queimaduras**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 267-274.

LIMA-JUNIOR, E. M. *et al.* Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Rev Bras Queimaduras**. [s.l.], v.16, n.1, p.10-17, 2017.

LINDE L. G. Reabilitação de crianças com queimaduras. In: TECKLIN J. P. **Fisioterapia pediátrica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p.384-422

LIU, T.; CHU, B. Formation of homogeneous gel- like phases by mixed triblock copolymer micelles in aqueous solutions: FCC to BCC phase transition. **Journal of Applied Cristalografia**, n.33, p. 727-730, 2000.

LÓPEZ-POSADAS, R. *et al.* Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 76, n. 4, p. 495-506, ago. 2008.

LU, C. *et al.* Novel thermosensitive in situ gel based on poloxamer for uterus delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 24-28, 2015.

LUND, T.; ONARHEIM, H.; REED, R. K. Pathogenesis of edema formation in burn injuries. **World journal of surgery**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 2-9, 1992.

LUO, Y. *et al.* Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a guinea pig model of chronic bronchitis induced by cigarette smoke. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 13, n. 3, p. 301-307, jul. 2012.

MAATOUK, M. *et al.* Effect of heated naringenin on immunomodulatory properties and cellular antioxidant activity. **Cell Stress And Chaperones**, [s.l.], v. 21, n. 6, p. 1101-1109, 13 set. 2016.

MACHADO, H. **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “in vivo”**. 2005. Tese de Doutorado. Dissertação]. Viçosa: Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola (Universidade Federal de Viçosa).

MACHADO, H. *et al.* Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MADAGHIELE, M. *et al.* Polymeric hydrogels for burn wound care: Advanced skin wound dressings and regenerative templates. **Burns & trauma**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 153-161, 2014.

MAENTHAISONG, R. *et al.* The efficacy of aloe vera used for burn wound healing: a systematic review. **Burns**, [s.l.], v. 33, n. 6, p. 713-718, set. 2007.

MALMSTEN, M.; LINDMAN, B. Self-assembly in aqueous block copolymer solution. **Macromolecules**, [s.l.], v. 25, p. 5440-45, 1992

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 79, n. 5, p. 727-747, mai. 2004.

MANCHOPE M.F., CASAGRANDE R., VERRI W.A. Jr. Naringenin: an analgesic and anti-inflammatory citrus flavanone. **Oncotarget**. 2017.

MANCHOPE, M. F. *et al.* Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: role of oxidative stress, cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATP channel signaling pathway. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 1-20, abr. 2016.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-408, ago. 2003.

LE MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 56, n. 6, p. 296-301, 2002.

MARCHESAN, W. G.; FARINA JR, J. A. Tratamento da ferida queimada. In: JORGE, Silvia Angélica.; DANTAS, Sônia Regina Perez Evangelista. **Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 163-208.

MARKESON, D. *et al.* Scarring, stem cells, scaffolds and skin repair. **J Tissue Eng Regen Med**, [s.l.], v. 9, p. 649–668, 2015.

MARTINEZ, R. M. *et al.* Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 78, n. 7, p. 1647-1655, jul. 2015.

MARTINEZ, R. M. *et al.* Topical Formulation Containing Naringenin: efficacy against ultraviolet b irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 01-21, jan. 2016.

MARTINEZ, R. M. *et al.* Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. **J Dermat Sci.** v.91, n.2, p.164-174, 2018.

MARTINS-GREEN, M.; SAEED, S. Role of oxidants and antioxidants in diabetic wound healing. In: **Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes**. Academic Press, 2020. p. 13-38.

MASELLA, R. *et al.* Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, [s.l.], v. 16, n. 10, p. 577-586, out. 2005.

MAVER, T. *et al.* A review of herbal medicines in wound healing. **International Journal Of Dermatology**, [s.l.], v. 54, n. 7, p. 740-751, 24 mar. 2015.

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.

MEDINA, J. L. *et al.* Standardization of deep partial-thickness scald burns in C57BL/6 mice. **International journal of burns and trauma**, v. 8, n. 2, p. 26, 2018.

MÉLEGA, J. M. **Cirurgia plástica - fundamentos e arte: princípios gerais**, Rio de Janeiro: Médisi, 2002.

MELO, E. K. S. *et al.* Análise e estudo viscosimétrico de diferentes géis de cetoprofeno 2,5%. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 95-99, 2013.

MENDÉZ, J.D.; RODRÍGUES, H.G.R. Sobre los beneficios de los radicales livres. **Rev. Méd. IMSS.**, v.35, n.4, p.309-313, 1997.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, [s.l.], v. 52, n. 4, p. 673–751, dez. 2000.

MILLER, A. C. *et al.* Silver sulfadiazine for the treatment of partial-thickness burns and venous stasis ulcers. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 66, n. 5, p. e159-e165, 2012.

MIR, I. A.; TIKU, A. B. Chemopreventive and Therapeutic Potential of “Naringenin,” a Flavanone Present in Citrus Fruits. **Nutrition And Cancer**, [s.l.], v. 67, n. 1, p. 27-42, dez. 2014.

MIRANDA, C. L. *et al.* Antioxidant and Prooxidant Actions of Prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones in Vitro. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 48, n. 9, p. 3876-3884, set. 2000.

MISTRY, Bhupendra; PATEL, Rahul V.; KEUM, Young-Soo. Access to the substituted benzyl-1, 2, 3-triazolyl hesperetin derivatives expressing antioxidant and anticancer effects. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 157-166, 2017.

MONTES, S. F.; BARBOSA, M. H.; SOUSA NETO, A. L. Aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes queimados internados em um Hospital de Ensino. **Rev. esc. enferm. USP**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 369-373, abr. 2011.

MOSER, H.; PEREIRA, R. R.; PEREIRA, M. J. L. Evolução dos curativos de prata no tratamento de queimaduras de espessura parcial. **Revista Brasileira de Queimaduras**. v.12, n.2, p.60-67, abr. 2013.

MOYLAN J. A. Burn Injury. In: GEORGIDE G. S.; GEORGIADIS N. G. **Textbook of Plastic Maxillofacial and Reconstructive Surgery**. 2. ed) Baltimore: Williams& Wilkins, p. 243- 268, 1992.

NAGULA, R. L.; WAIRKAR, S. Recent advances in topical delivery of flavonoids: a review. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 296, p. 190-201, fev. 2019. .

NAIDU, N. B. *et al.* Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam–cyclodextrin binary systems. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 35, n. 1, p. 75-86, abr. 2004.

NALBANDIAN, R. M. *et al.* Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs. **Journal Of Biomedical Materials Research**, [s.l.], v. 21, n. 9, p. 1135-1148, set. 1987.

NASCIMENTO JUNIOR, B. J. *et al.* Estudo da ação da romã (*Punica granatum* L.) na cicatrização de úlceras induzidas por queimadura em dorso de língua de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 18, n. 2, p. 423-432, jun. 2016.

NEGREIROS, G. B. C. *et al.* Pele de tilápia como possível nova alternativa terapêutica em pacientes queimados no Brasil. **Revista Ciências da Saúde e Educação IESGO**, v. 1, n. 2, 2019.

NGUYEN, T. T. *et al.* Current Treatment of Severely Burned Patients. **Annals Of Surgery**, [s.l.], v. 223, n. 1, p. 14-25, jan. 1996.

NGWULUKA N.; CHOONARA Y.; KUMAR P.; MODI G.; DU TOIT L.C.; PILLAY V. A Hybrid Methacrylate-Sodium Carboxy- methylcellulose Interpolyelectrolyte Complex: Rheometry and in Silico Disposition for Controlled Drug Release. **Materials**. 2013

NIJVELDT, R. J. *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 74, n. 4, p. 418-425, out. 2001.

OHKATSU, Y., SAKURAI, T., SATO, T. Relationship between chemical structure and

antioxidante function of flavonoids. **Journal of the Japan Petroleum Institute**, [s.l.], v. 53, n.4, p.213-221,2010.

OLIVEIRA, A. P. B. S.; PERIPATO, L. A. A cobertura ideal para tratamento em paciente queimado: uma revisão integrativa da literatura. **Revista Brasileira de Queimaduras**. v.16, n.3, p. 188-193, 2017.

ÖNER, O. Z. *et al.* Whey Feeding Suppresses the Measurement of Oxidative Stress in Experimental Burn Injury. **Surgery Today**, [s.l.], v. 36, n. 4, p. 376-381, mar. 2006.

OSSES, J. K. V. **Nanoencapsulação do fármaco miltefosina em micelas poliméricas de poli (óxido de etileno)-poli (óxido de propileno)**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OZCAN, O. *et al.* Protective effect of Myrtle (*Myrtus communis*) on burn induced skin injury. **Burns**, [s.l.], v. 45, n. 8, p. 1856-1863, dez. 2019.

PAGNANO, L.O.; BARALDI-ARTONI, S.M.; PACHECO, M.R. OLIVEIRA D. Aspectos básicos do processo cicatricial e fatores gerais relacionados com a reparação tecidual. **Rev. Cient. Med. Vet.**, v. 7, 2009.

PANG, J. L. *et al.* Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 71, n. 6, p. 818-826, mar. 2006.

PAPAS, A. M. Diet and Antioxidant Status. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 37, n. 9-10, p. 999-1007, set. 1999.

PARIHAR, A. *et al.* Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. **Burns**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 6-17, fev. 2008.

PARIHAR, M. S.; BREWER, G. J. Simultaneous age-related depolarization of mitochondrial membrane potential and increased mitochondrial reactive oxygen species production correlate with age-related glutamate excitotoxicity in rat hippocampal neurons. **Journal Of Neuroscience Research**, [s.l.], v. 85, n. 5, p. 1018-1032, abr. 2007.

PARK, B. *et al.* Protection of burn-induced skin injuries by the flavonoid kaempferol. **Bmb Reports**, [s.l.], v. 43, n. 1, p. 46-51, 31 jan. 2010.

PARK, S. *et al.* Preparation of silver nanoparticle-containing semi-interpenetrating network hydrogels composed of pluronic and poly (acrylamide) with antibacterial property. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 17, n. 2, p. 293-297, 2011..

PASQUINI-NETTO, H., *et al.* Avaliação das atividades antioxidante, anti e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de *Pterogyne nitens* Tul.(Fabaceae-Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.14, n.4, p.666-672, 2012.

PECHARA, B. B. O PACIENTE QUEIMADO: UM PANORAMA E PERSPECTIVAS TERAPÊUTICAS. **Repositório de Trabalhos de Conclusão de Curso**, 2020.

PEDEN M. *et al.* Burn. In: **World Report on Child Injury Prevention**. Geneve: World Health Organization. p.79-94, 2008.

PERCIVAL, S.; BOWLER, P. G.; DOLMAN, J. Antimicrobial activity of silver-containing dressings on wound microorganisms using an in vitro biofilm model. **International wound journal**, v. 4, n. 2, p. 186-191, 2007.

PERCIVAL, S. *et al.* The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. **Wound Repair And Regeneration**, [s.l.], v. 22, n. 2, p. 174-186, fev. 2014.

PERCIVAL, S. L. *et al.* Mode of action of poloxamer-based surfactants in wound care and efficacy on biofilms. **International wound journal**, [s.l.], v. 15, n. 5, p. 749-755, 2018.

PEREIRA, Â. L.; BACHION, M. M. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na revista brasileira de enfermagem de 1970-2003. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [s.l.], v. 58, n. 2, p. 208-213, abr. 2005.

PEREIRA, G.G. *et al.* Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1121-1125, 2013.

PEREIRA, C. C. *et al.* Aloe vera in skin burns: a new trend or an evidence? **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, v. 73, n. 2, p. 193-197, jun. 2015.

PEREIRA, R.R.A. **Desenvolvimento e caracterização de sistema mucoadesivotermostável contendo micropartículas de própolis para potencial tratamento de candidíase vulvovaginal**, Maringá-PR. UEM, 2011. 172p. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, 2011.

PESSOLATO, A. G. T. *et al.* Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. **Burns**, [s.l.], v. 37, n. 7, p. 1192-1201, nov. 2011.

PETER, K. *et al.* Heparin Inhibits Ligand Binding to the Leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18). **Circulation**, [s.l.], v. 100, n. 14, p. 1533-1539, 5 out. 1999.

PIANA, M. *et al.* Antiinflammatory effects of Viola tricolor gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 458-465, 2013.

PICCOLO, N.S. *et al.* Queimaduras: Diagnóstico e Tratamento Inicial. **Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**, 2008.

PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 63, n. 7, p. 1035-1042, jul. 2000.

PILLIN, I.; MONTRELAY, N.; GROHENS, Y.. Thermo-mechanical characterization of plasticized PLA: Is the miscibility the only significant factor?. **Polymer**, v. 47, n. 13, p. 4676-4682, 2006.

PINHO-RIBEIRO, Felipe A. *et al.* Naringenin reduces inflammatory pain in mice. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 105, p. 508-519, 2016.

PIRONI, A. M. **Dispersões sólidas de ácido ursólico veiculadas em hidrogéis para administração cutânea: desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica in vitro e in vivo.** 2019.

PRINGLE F.; PENZER R. Normal skin: its function and care. In: PENZER R. (Edn) **Nursing Care of the Skin.** London: Butterworth-Heinemann, 2002.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUĽOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 82, n. 4, p. 513-523, jun. 2011.

QI, H. *et al.* Optimization and physicochemical characterization of thermosensitive poloxamer gel containing puerarin for ophthalmic use. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, [s.l.], v. 54, n. 11, p. 1500-1507, 2006.

RAHIGUDE, A. *et al.* Participation of antioxidant and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats. **Neuroscience**, [s.l.], v. 226, p. 62-72, dez. 2012.

RAZA, S. S. *et al.* Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF- κ B signaling pathway in experimental stroke. **Neuroscience**, v. 230, p. 157-171, 2013.

RICCI, E. J. *et al.* Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 161-167, 2002.

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

RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. **Ageing research reviews**, v. 1, n. 4, p. 705-720, 2002.

RIZZO, D. C. **Fundamentos de Anatomia e Fisiologia.** São Paulo: Cengage Learning, 2011.

ROCHA, C. L. Histofisiologia e classificação das queimaduras: Consequências locais e sistêmicas das perdas teciduais em pacientes queimados. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, Juiz de Fora, v. 1, n. 3, p. 140 – 147, jan. 2009.

ROCHA, J. L. C. Efeitos da mitomicina-c tópica em queimadura de camundongos. 2010.

ROCHA, N. M. *et al.* Atendimento inicial às vítimas de queimaduras: Uma revisão integrativa. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde**, Alagoas, v. 6, n. 1, p. 11, 2020.

RODRIGUES, N. *et al.* Influence of spike lavender (*Lavandula latifolia* Med.) essential oil in the quality, stability and composition of soybean oil during microwave

heating. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 50, n. 8, p. 2894-2901, ago. 2012.

ROSSI, L. A., *et al.* Cuidados locais com as feridas das queimaduras. **Rev. Bras Queimaduras**. v.9, n. 2, p. 54-59, 2010.

ROUZES, C. *et al.* Influence of polymeric surfactants on the properties of drug-loaded PLA nanospheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 32, n. 2, p. 125-135, 2003.

ROWAN, M.P. *et al.* Burn wound healing and treatment: review and advancements. **Critical care**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 243, 2015.

SAAVEDRA, P. A. *et al.* Burns in the Brazilian Unified Health System: a review of hospitalization from 2008 to 2017. **International journal of burns and trauma**, [s.l.], v. 9, n.5 88-98, 2019.

SAHU, S. C., GRAY, G. C., Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. **Food Chem Toxicol**. [s.l.], v.35, p.443-447, 1997.

SALAS, A *et al.* Heparin attenuates TNF-alpha induced inflammatory response through a CD11b dependent mechanism. **Gut**, [s.l.], v. 47, n. 1, p. 88-96, 1 jul. 2000.

SALEHI, M. *et al.* Accelerating healing of excisional wound with alginate hydrogel containing naringenin in rat model. **Drug delivery and translational research**, [s.l.], v. 10.1007/s13346-020-00731-6, 2020.

SALIBIAN, A. A. *et al.* Current concepts on burn wound conversion—A review of recent advances in understanding the secondary progressions of burns. **Burns**, v. 1, n. 11, 2016.

SANCHES P.H.S. *et al.* Perfil epidemiológico de crianças atendidas em uma Unidade de Tratamento de Queimados no interior de São Paulo. **Rev Bras Queimaduras**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 246-250, 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 Chemistry**. v. 90, n. 2, p. 133-139, 2005

SANGEETHA, K. S. S., *et al.* Flavonoids: therapeutic potential of natural pharmacological agents. **Int J Pharmac Sci Res**, [s.l.], v.7, n.10, p.3924-3930, 2016.

SANTANA, M. E. Clinical and epidemiological profile of children with burns in a reference hospital/Perfil clínico e epidemiológico de crianças com queimaduras em um hospital de referência/Perfil clínico y epidemiológico de niños con quemaduras en un hospital de referencia. **Revista de Enfermagem da UFPI**, v. 7, n. 2, p. 23-27, 2018.

SANTANA, L. C. B. *et al.* Conduas assistenciais no atendimento aos pacientes vítimas de queimaduras: revisão integrativa da literatura. **Research, Society and Development**, v. 8, n. 11, p. 17, 2019.

SANTOS, C. A.; SANTOS A. Assistência de enfermagem no atendimento pré-hospitalar ao paciente queimado: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Queimaduras**, [s.l.], v.16, n.1, p.28- 33, 2017.

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

SAITO, S., *et al.* 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.

SCHADE, H.; MARCHIONINI, A. Der säuremantel der haut (nach gaskettenmessungen). **Klinische Wochenschrift**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 12-14, 1928.

SCHMOLKA, I. R. Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for treatment of burns. **Journal Of Biomedical Materials Research**, [s.l.], v. 6, n. 6, p. 571-582, nov. 1972.

SCHNEIDER, L. A. *et al.* Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy?. **Archives Of Dermatological Research**, [s.l.], v. 298, n. 9, p. 413-420, 8 nov. 2007.

SCHRADER, M.; FAHIMI, H. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research**, [s.l.], v. 1763, n. 12, p. 1755-1766, dez. 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17034877/>. Acesso em: 10 jun. 2020.

SEMALTY, A. *et al.* Preparation and characterization of phospholipid complexes of naringenin for effective drug delivery. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 67, n. 3-4, p. 253-260, 2010.

ŞENER, G. *et al.* Melatonin improves oxidative organ damage in a rat model of thermal injury. **Burns**, v. 28, n. 5, p. 419-425, 2002.

SEVGI, M. *et al.* Topical Antimicrobials for Burn Infections – An Update. **Recent Patents On Anti-infective Drug Discovery**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 161-197, mai. 2013.

SHAWESH A. *et al.* Influence of storage time and temperature on the stability of indomethacin Pluronic F-127 gels. **Pharmazie**, Eschborn, v. 57, n.10, p. 690-694, out. 2002.

SEHIRLI, A. O. *et al.* Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. **Journal of nephrology**, v. 16, n. 1, p. 75-80, 2003.

SHERIDAN, R. L. Burn Care. **Jama**, [s.l.], v. 290, n. 6, p. 719, ago. 2003.

SHINDO, Y. *et al.* Enzymic and Non-Enzymic Antioxidants in Epidermis and Dermis of Human Skin. **Journal Of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 102, n. 1, p. 122-124, jan. 1994.

SHIRANI, K. Z. *et al.* Update on current therapeutic approaches in burns. **Shock (Augusta, Ga.)**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 4-16, 1996.

SHUPP, J. W. *et al.* A Review of the Local Pathophysiologic Bases of Burn Wound Progression. **J Burn Care Res**, v. 31, p. 849–873, 2010.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 215, n. 2, p. 213-219, jul. 1993.

SILVA, M. A. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Aloe saponaria Haw on thermal injury in rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 146, n. 1, p. 393-401, mar. 2013.

SILVA, P. N.; ALMEIDA, O. A. E.; ROCHA, I. C. Terapia tópica no tratamento de feridas crônicas. **Enfermería Global**, n. 33, Enero, p. 46-58, 2014.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**, 5. ed. Santa Catarina: UFSC, 2004.

SINDER, R. Evolução histórica do tratamento das queimaduras. Guimarães JR, Macieira L. Rio de Janeiro: **Rubio Queimadura**, 2006p, p. 3-9, 2006.

SINGER, A. J. *et al.* Curcumin Reduces Burn Progression in Rats. **Academic Emergency Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 12, p. 1125-1129, dez. 2007.

SINGH, V. *et al.* The pathogenesis of burn wound conversion. **Annals of plastic surgery**, v. 59, n. 1, p. 109-115, 2007.

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** 80:1080-1086, 2007.

SKORKOWSKA-TELICHOWSKA, K. *et al.* The local treatment and available dressings designed for chronic wounds. **American Academy of Dermatology**, [s.l.], v.68, n.4, p. e117–e126, abr. 2013.

SMANIOTTO, P. H. S. *et al.* Clinical treatment of wounds - dressings. **Rev Med**, [s.l.], v. 89, n.3, 2010.

SORG, H. *et al.* Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **Eur Surg Res**, [s.l.], v. 58, p. 81–94, 2017.

SORIANO-RUIZ, J. L. *et al.* Design and evaluation of a multifunctional thermosensitive poloxamer-chitosan-hyaluronic acid gel for the treatment of skin burns. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 142, p. 412-422, 2020.

SPENCE, Alexander P. Sistema tegumentar. In:_____. **Anatomia humana básica**. São Paulo: Manole, 1991. p. 77-80.

SPENCER, J. P. E. Flavonoids: modulators of brain function? **British Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 99, n. -1, p. 60-77, maio 2008.

STANLEY, M. J.; RICHARD, R. L. Queimaduras. In: O' SULLIVAN, S. B.; SCHMITZ, T. J. **Fisioterapia: avaliação e tratamento**. São Paulo: Manole, 2004. p. 845-871.

STEVANATO, R.; BERTELLE, M.; FABRIS, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 69, n. 1, p. 71-77, jun. 2014.

SÜLEYMAN H; DEMIRCAN B.; KARAGOZ Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacological Reports*; 59:247-58, 2007.

SUMATHI, R. *et al.* Bio-dynamic activity of naringenin – a review. **Int J Curr Adv Res**, [s.l.], v. 4, n.8, p. 234-236, 2015.

SUMATHI, R.; TAMIZHARASI, S.; SIVAKUMAR, T. Formulation and evaluation of polymeric nanosuspension of naringenin. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, [s.l.], v. 9, n. 6, p. 60-70, out. 2017.

SZWED, D. N.; SANTOS, V. L. P. Fator de crescimento envolvidos na cicatrização da pele. **Cad da Esc de Saúde**, [s.l.], v.1, p. 7-17, 2015.

TANAKA H. *et al.* High dose vitamin C counteracts the negative interstitial fluid hydrostatic pressure and early edema generation in thermally injured rats. **Burns**, [s.l.], v. 25, p. 569 – 574, 1999.

TAVARES, W.S.; SILVA, R. S.. Curativos utilizados no tratamento de queimaduras: uma revisão integrativa. **Rev Bras Queimaduras**, [s.l.], v. 14, n. 4, p. 300-6, 2015.

TER HORST, B. *et al.* Advances in keratinocyte delivery in burn wound care. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 123, p. 18-32, jan. 2018.

THOMAS, S. Hydrocolloid dressings in the management of acute wounds: a review of the literature. **International Wound Journal**, [s.l.], v. 5, n. 5, p. 602-613, dez. 2008.

TIVERON, A. P. *et al.* Antioxidant activity of Brazilian vegetables and its relation with phenolic composition. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 7, p. 8943-8957, 2012.

TOLIVER-KINSKY T.; KOBAYASHI M.; SUZUKI F. *et al.* The systemic inflammatory response syndrome. In: Herndon DN, editor. **Total burn care**. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2018. p. 205-220.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

VALAVANIDIS, A. *et al.* Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 10, n. 9, p. 3886-3907, 27 ago. 2013.

VALE, E. C. S. Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 1, p. 9-19, feb. 2005.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VANA L. P.; AGGIARO A.; SCHIOZER W. Algoritmo de tratamento cirúrgico do paciente queimado. **Revista Brasileira de Queimaduras**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 8-10. 2007.

VERRI, W. A. *et al.* Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: Mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. **Stud Nat Prod Chem**. v.36, p. 297–330, 2012.

VEZZA, T. *et al.* Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: a review. **Nutrients**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 211, 9 abr. 2016.

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 Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 863-868, 2011.

WANG, Y. *et al.* Burn injury: challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s.l.], v. 123, p. 3-17, jan. 2018. WASIAK J. *et al.* Dressings for superficial and partial thickness burns. **The Cochrane database of systematic reviews**, [s.l.], v. 3, p. CD002106, mar. 2013.

WHO. World Health Organization. **Facts about injuries: burn**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>. Acesso em: 23 mai. 2020.

WITTENAUER, J. *et al.* Inhibitory effects of polyphenols from grape pomace extract on collagenase and elastase activity. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 101, p. 179-187, mar. 2015.

WU, J. *et al.* Modular Optimization of Heterologous Pathways for De Novo Synthesis of (2S)-Naringenin in *Escherichia coli*. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 7, p. 101492, 2 jul. 2014.

XU, D. *et al.* Pharmacokinetic Comparisons of Naringenin and Naringenin-Nicotinamide Cocrystal in Rats by LC-MS/MS. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, [s.l.], v. 2020, abr. 2020.

XU, R. X. **Burns regenerative medicine and therapy**. Switzerland: Karger, 2004

YANG, B. *et al.* Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials. **Analytical sciences**, v. 17, n. 5, p. 599-604, 2001.

YEN, F. *et al.* Naringenin-Loaded Nanoparticles Improve the Physicochemical Properties and the Hepatoprotective Effects of Naringenin in Orally-Administered Rats with CCl₄-Induced Acute Liver Failure. **Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 26, n. 4, p. 893-902, 25 nov. 2009.

YEN, G. *et al.* Pro-oxidative Properties of Flavonoids in Human Lymphocytes. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v. 67, n. 6, p. 1215-1222, jan. 2003.

YOSHIDA H. *et al.* The citrus flavonoids hesperetin and naringenin block the lipolytic actions of TNF-alpha in mouse adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, [s.l.], v. 394, p. 3, p. 728-732, mar. 2010.

ZAKY, M. Y. *et al.* Naringenin and quercetin inhibit the instigating effects of diethylnitrosamine/acetylaminofluorene on cardiac function, oxidative stress and inflammation. **BioCell**, [s.l.], v. 43, n. 2-1, p. 29-40, 2019.

ZENG, N. *et al.* Influence of additives on a thermosensitive hydrogel for buccal delivery of salbutamol: Relation between micellization, gelation, mechanic and release properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 467, n. 1-2, p. 70–83, 2014.

ZHANG, K. *et al.* 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, 2015.

ZHANG, D. *et al.* Injectable Enzyme-Based Hydrogel Matrix with Precisely Oxidative Stress Defense for Promoting Dermal Repair of Burn Wound. **Macromolecular Bioscience**, p. 2000036, 2020.

ZOHRA G. *et al.* Globularia alypum methanolic extract improves burn wound healing process and inflammation in rats and possesses antibacterial and antioxidant activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 84, p. 1488–1495, 2016.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL; E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017