

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

T. G. Figueira*, J. S. Crusca* e S. A. Yoshioka* **

*Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/IQSC/FMRP – USP, São Carlos, Brasil

**Instituto de Química de São Carlos – IQSC – USP, São Carlos, Brasil
e-mail: thiago.gfigueira@usp.br

Resumo: Quando a pele sofre uma lesão o organismo tenta reparar essa agressão ao promover a substituição do tecido por meio de um processo complexo dividido em fases. O ácido hialurônico está presente em todas as fases dessa reparação tecidual. Contudo a sua presença em adultos reduz cerca de 50% comparado ao recém-nascido, o que reduz a regeneração tecidual drasticamente. Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito de uma pomada utilizando veículo comercial composto de lanolina e vaselina manipulada com ácido hialurônico, extraído da crista do frango, no processo cicatricial de feridas cutâneas em dorso de ratos. Para atingir o objetivo desse trabalho o ácido hialurônico foi extraído e purificado da crista do frango e foi acrescido ao veículo comercial composto de 10% lanolina e 90% vaselina. Para os estudos *in vivo*, foram separados aleatoriamente 28 animais em 4 grupos. Em cada animal do grupo efetuou-se duas lesões em seu dorso, uma para a aplicação da pomada, e a outra lesão para controle. A pomada foi aplicada diariamente durante 7 e 14 dias conforme protocolo estabelecido. Os resultados dos testes *in vivo* apontaram que o grupo tratado com a pomada com ácido hialurônico durante 7 dias, obteve menor média da área da lesão com 0,07 cm² contra 0,11 cm² do seu controle, 0,09 cm² do grupo tratado com a pomada placebo e 0,10 cm² do controle do placebo. Ainda, todos os animais de ambos os grupos, tratados durante 14 dias obtiveram oclusão total da ferida, porém, o grupo tratado com a pomada de AH resultou em uma melhor cicatrização da lesão.

Palavras-chave: Ácido hialurônico, pomada, cicatrização, feridas cutâneas.

Abstract: When the skin is injured, the organism attempts to repair the damage with a tissue replacement, in a complex process divided into several stages. Hyaluronic acid is present in all phases of this process, although its expression in adults is reduced to approximately 50% compared to newborn individuals, leading to drastically reduced tissue regeneration. This study aimed to analyze the effect of an ointment composed of a commercial vehicle of lanolin and vaseline, manipulated with hyaluronic acid extracted from crest chicken, in skin wounds healing in rats. Hyaluronic acid was extracted and purified from

chicken crests, and the extract was added to the commercial vehicle composed of 10% lanolin and 90% vaseline. For *in vivo* studies, 28 rats were randomly separated into four groups. Each animal was injured twice in the back, one lesion destined to the ointment application, and the other lesion as a control injury for 7 to 14 days, according to the protocol established. The group of animals treated with the ointment for seven days showed lower average lesion area, with 0.07 cm² against the control area of 0.11 cm². The animals treated with a placebo ointment showed an average lesion area of 0.09 cm² against a 0.10 cm² area of controls. Moreover, all the animals of both groups were treated for 14 days had total occlusion of the wound, however the group treated with the ointment HA exhibited an improved wound healing.

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

Introdução

Na tentativa de reestruturar a parte lesada, o organismo sofre um processo complexo e dinâmico denominado cicatrização, e este é desencadeado por sinalização bioquímica e mediadores inflamatórios no local da lesão, o qual é constituído por uma cascata de eventos que são representadas pelas seguintes fases: coagulação, inflamatória, fibroplasia e remodelamento [1]. Em todas as fases da cicatrização, o ácido hialurônico (AH) está presente, mas na fase proliferativa (fibroplasia) onde é caracterizada pela proliferação de fibroblastos e células endoteliais, está em maior quantidade. Após a deposição de fibras colágenas, o tecido de granulação, antes altamente vascularizado e habitado por muitas células, agora apresenta características de uma massa fibrótica avascular e acelular, denominada cicatriz [2].

O ácido hialurônico (AH) é uma substância encontrada no organismo, com massas molares de 10⁵ a 10⁷ Da, que preenche o espaço entre as células em todos os órgãos do corpo. É um dos polímeros naturais pertencentes à classe dos glicosaminoglicanos não sulfatados e representa um importante componente da matriz extracelular da derme. Tem importantes funções estruturais e mecânicas, que desempenham papel

fundamental no processo da cicatrização e estimulam a formação de fibrina [3, 4]. A partir de 1992, quando o ácido foi utilizado como material de preenchimento no tratamento do envelhecimento da pele, iniciaram então, um número crescente de preparações com ácido hialurônico para diversos tratamentos [4, 5].

O ácido hialurônico é usado no tratamento de doenças degenerativas e inflamatórias das articulações dos ossos, na reposição do fluido sinovial e na liberação de agentes quimioterápicos em implantes cirúrgicos, como meio hidratante e como sistema para encapsulação e liberação controlada de fármacos e cosméticos [6, 7].

Neste estudo, o ácido hialurônico utilizado, foi extraído no laboratório de Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), a partir de cristas de frango obtidas em abatedouro de aves. Em busca de uma solução, a base de ácido hialurônico para acelerar o processo cicatricial, este trabalho analisou o efeito de uma pomada composta de 10% lanolina e 90% vaselina (m/m) manipulada com o AH em questão, quando aplicada em feridas cutâneas em dorso de ratos, através de análise clínica e área da lesão.

Materiais e métodos

Extração do ácido hialurônico – Para obtenção do ácido hialurônico foi utilizado o método de extração via soxhlet, desenvolvido pelo grupo de biomateriais e bioquímica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP), segundo patente registrada (PI 1000460-2). Para essa extração seguiu-se o modelo de Yoshioka e Scabora [3], onde as cristas de frangos foram desidratadas e retiradas as gorduras contidas, via soxhlet com acetona em refluxo. Após a retirada da gordura de todas as cristas, continuou-se a seguir o protocolo para a extração do ácido hialurônico.

Preparação da pomada com ácido hialurônico – Todo procedimento de mistura foi executado em uma capela de fluxo laminar, onde essa foi limpa, desinfetada com álcool 70% e ficou 30 minutos com radiação de ultravioleta para garantir a sua esterilização. Os utensílios utilizados foram devidamente lavados e enxaguados com água a uma temperatura aproximada de 80 °C a 90 °C. A preparação envolveu a mistura de um veículo, obtido comercialmente, composto de 10% lanolina e 90% vaselina. Este veículo foi pesado e espalhado em um recipiente de vidro onde, após pesagem, foi colocado o ácido hialurônico, em uma proporção de 1% m/m. Ambos foram cuidadosamente misturados com uma espátula, em movimentos de vaivém, até que apresentasse aparência e consistência homogênea, levando em torno de 30 minutos. Em seguida, a mistura foi acondicionada em frasco opaco e estéril, e posteriormente conservada a 10 °C até o uso.

Avaliação Microbiológica da Pomada – O teste microbiológico foi realizado em parceria com uma biomédica, responsável pelo setor de Microbiologia de um laboratório de análises clínicas da cidade de São Carlos-SP. O procedimento do teste ocorreu da seguinte

maneira: Foi acrescentado aproximadamente 10 mL de meio de cultura líquido BHI (Brain-Heart Infusion) nos frascos da pomada. Posteriormente foi incubado 24 h em estufa bacteriológica a 37 °C.

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

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

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

Delineamento Experimental – Os ratos foram pesados e distribuídos, aleatoriamente, nos grupos experimentais. O primeiro grupo (14 ratos) foi tratado durante 7 dias e o segundo grupo foi tratado durante 14 dias (14 ratos). Os animais de cada um desses grupos foram subdivididos em outros dois grupos (7 ratos cada), sendo um controle e outro tratado. Com a finalidade de padronização todos os animais sofreram duas lesões de 8 mm de diâmetro em seu dorso, uma para aplicação da pomada (com ou sem ácido hialurônico) e outro para controle. A lesão da esquerda foi a controle e a lesão direita a tratada com a pomada conforme Figura 1.

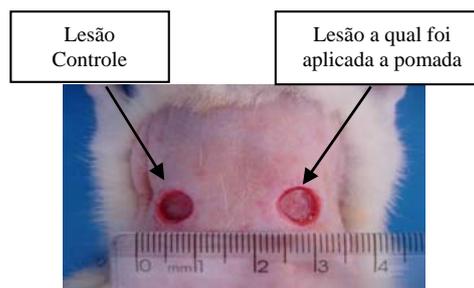


Figura 1: Imagem demonstrativa das lesões controle e tratada dos os animais de experimentação.

A seguir estão descritos os grupos das lesões:

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

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

PAH07 (n = 7): Lesões tratadas com pomada contendo o veículo comercial e o ácido hialurônico à

1% (m/m), com os animais mantidos em gaiolas por 7 dias.

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

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

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

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

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

A pomada foi aplicada uma vez ao dia (manhã) durante todo o período experimental. Para a aplicação da pomada utilizou-se uma espátula limpa e desinfetada com álcool 70% e aplicou-se quantidade de pomada suficiente para cobrir toda área da lesão [8].

Neste trabalho não foi utilizado nenhum tipo de curativo, ficando a ferida aberta durante todo o período de tratamento.

Técnica Cirúrgica – Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética para Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Jundiaí – CEUA/FMJ. Após a indução anestésica, os animais foram posicionados em uma superfície plana com extensão dos quatro membros, foi realizada a tricotomia manual no dorso dos mesmos, e seguida de assepsia com solução de iodo. Foram realizadas duas feridas no dorso de cada animal, com aproximadamente 1,5 cm entre elas, usando um *punch* de aço inoxidável com 8 mm de diâmetro.

Avaliação Clínica – Os animais foram avaliados clinicamente quanto ao aspecto da cicatrização e média das áreas das lesões, por meio de fotodocumentação. As imagens foram capturadas com máquina fotográfica digital, utilizando resolução de 3.0 megapixels, apoiada por um suporte com 16 cm de altura em relação à bancada, sem a utilização de *zoom* e *flash*. As fotos foram colhidas e armazenadas para posterior análise com o *software ImageJ*.

Eutanásia dos Animais – No 7º dia após a cirurgia realizou-se a eutanásia dos animais pertencentes aos grupos: C07, P07, C'07 e PAH07; e no 14º dia após a cirurgia realizou-se eutanásia dos animais dos grupos: C14, P14, C'14 e PAH14. Os animais foram anestesiados e após a realização da coleta do segmento desejado, os animais, ainda anestesiados, foram sacrificados por injeção intracardíaca de KCl à 30%.

Delimitação e Quantificação da Área da Ferida – Para delimitação e quantificação da área da lesão seguiu-se o modelo descrito adiante, onde, com o intuito de padronizar sua escala, cada imagem foi calibrada através da ferramenta “Analyze/Set Scale”, que permitiu ajustar a medida em pixels/cm por meio da régua contida na foto. Posteriormente, selecionou-se o *plugin* “polygon” para a delimitação da borda da úlcera com o mouse, salvando em extensão ROI. Logo após o

procedimento, o *software* calculou automaticamente a área em cm² pelo comando «CTRL+M».

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

Resultados

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

Após a cirurgia foi aplicada a primeira dose da pomada, com os animais ainda anestesiados.

Logo no primeiro dia pós-operatório, notaram-se arranhões no dorso de dois dos animais, no lado da ferida que foi aplicada a pomada. Possivelmente esses arranhões ocorreram devido ao incômodo da presença da pomada ou sem nas lesões. Por volta do 3º dia pós-operatório começou a formação das crostas em todas as feridas, tanto controle quanto as tratadas. Ainda, nesse período não havia diferença significativa entre os grupos.

Em torno do 5º dia pós-cirurgia começaram a aparecer às primeiras diferenças entre os grupos, embora discretas. No grupo tratado com pomada, tanto a com AH quanto a placebo, as cicatrizações apresentavam melhor aspecto, devido à hidratação proporcionada pela mesma. No 7º dia pós-operatório, foram registradas as imagens das feridas e posteriormente prosseguiu a eutanásia dos animais pertencentes a este período. Com as imagens captadas, calculou-se a área de cada lesão, onde as diferenças entre os grupos estavam mais aparentes e as feridas apresentaram-se com uma área bem reduzida, principalmente aquelas tratadas com a pomada com ácido hialurônico (figuras 2A e 2B).

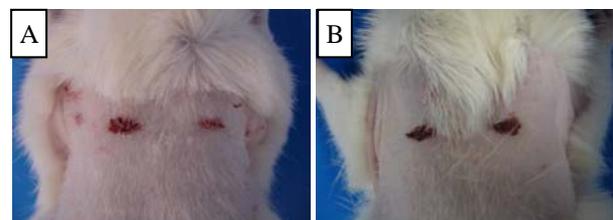


Figura 2: A - Ferida que recebeu aplicação da pomada com ácido hialurônico (direita) e controle (esquerda). B - Ferida com aplicação da pomada placebo (direita) e controle (esquerda). Após 7 dias de tratamento.

A ferida a qual foi tratada com a pomada com ácido hialurônico mostrou uma cicatrização mais efetiva e de melhor aspecto.

A cicatrização das feridas do grupo 14 dias evoluiu

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

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

No 14º dia, as feridas estavam completamente fechadas, tanto as tratadas (P14 e PAH14) quanto as dos grupos controle (C14 e C'14), porém aquelas tratadas com a pomada com ácido hialurônico apresentaram melhor aspecto cicatricial (Figuras 3A e 3B). Nos grupos tratados por 14 dias não foram mensuradas as áreas da lesão devido à cicatrizações totais das feridas.

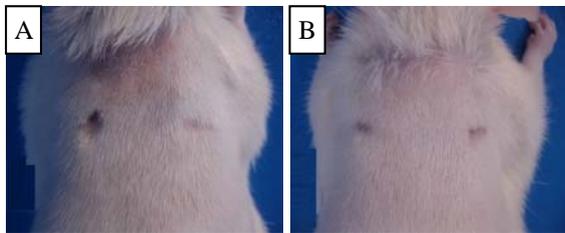


Figura 3: A – Cicatriz da ferida tratada com a pomada com ácido hialurônico (direita) e controle (esquerda). B – Cicatriz da ferida tratada com a pomada placebo (direita) e controle (esquerda). Após 14 dias.

Análise da Área da Ferida – No sétimo dia pós-operatório, foram registradas as imagens e as áreas calculadas posteriormente, onde não observou diferenças estatísticas nas médias das áreas ($p > 0,05$) entre os grupos PAH07 (0,07 cm²) e P07 (0,09 cm²), porém quando comparado com os grupos controles esses se mostraram com diferenças estatísticas (C'07 – 0,11 cm² e C07 – 0,10 cm²) ($p < 0,05$) conforme mostrado na Figura 4.

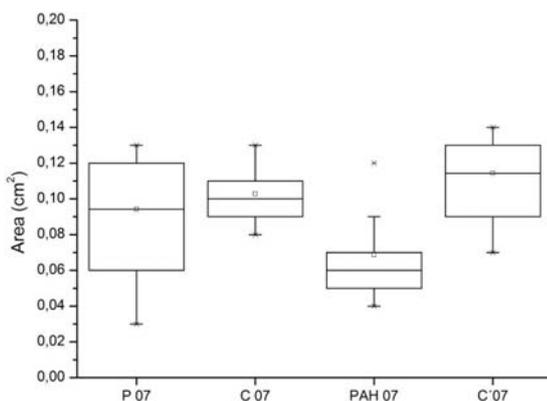


Figura 4: Gráfico representativo da média das áreas das lesões, onde P07 – pomada placebo; C07 – controle da pomada placebo; PAH07 – pomada com AH; C'07 – controle da pomada com AH.

Esses resultados mostraram que o fato das feridas se mantiverem hidratadas pelas pomadas proporcionou uma cicatrização mais adiantada no sétimo dia e que o ácido hialurônico influenciou nesses resultados.

Discussão

Estudos mostraram que alguns animais sofriam incômodos locais após o procedimento cirúrgico, o que corroborou com o presente estudo [9]. Anilkumar *et al.* [10] perceberam a presença das crostas por volta do 7º dia, tanto no grupo tratado com o ácido hialurônico quanto no controle. Porém seu estudo foi realizado em coelhos e com uma área de lesão maior, o que possivelmente acarretou essa alteração.

Observações de Laznicek *et al.* [11], constataram que a cicatrização máxima da ferida ocorreu em 216 h e a diferença entre o grupo tratado e o grupo controle só iniciou após 72 h.

O presente trabalho corrobora com o estudo de Reinmüller [5], onde este constatou em seus pacientes a restauração persistente da pele, quando aplicado o ácido hialurônico na forma intradérmica, acreditando que o AH gera uma mudança na composição do tecido.

A tendência do espaço extracelular é edemaciado devido à presença de altas concentrações de ácido hialurônico, facilitando a remodelação celular constante. Essa remodelação acontece devido à divisão celular dos queratinócitos derivados da camada basal [12].

Após a injeção de ácido hialurônico em cicatrizes hipertróficas ou quelóides, as coceiras e dor cessaram; além disso, a infiltração das bordas da ferida com AH após a excisão de cicatrizes hipertróficas ou quelóides ajudou a prevenir a sua recorrência [5].

A morfologia macroscópica da contração da ferida após o tratamento com ácido hialurônico, complexo de iodo, combinação de complexo de iodo e ácido hialurônico, e de controle mostraram uma melhor cicatrização onde foi aplicado o complexo de iodo e AH, seguido daquela onde foi aplicado somente AH [11], reforçando o objetivo alvo dessa pesquisa.

Conforme Anilkumar *et al.* [12], em seu estudo, após 07 dias de tratamento a reepitelização foi maior nas feridas tratadas do que nas controles, e ao 14º dia a reepitelização apresentou quase completa no grupo tratado e com uma grande vantagem sobre o controle, corroborando com essa pesquisa, que aos 14 dias ocorreu cicatrização total das feridas, com melhor aspecto daquelas tratadas com a pomada com ácido hialurônico.

Wit, Neck e Hovius [13] observaram em seu estudo, que a utilização do ácido hialurônico melhorou a cicatrização tanto qualitativamente, quanto quantitativamente, diminuindo seu tempo, corroborando com o presente estudo.

Medeiros *et al.* [14] constataram em seu estudo, que após a epitelização, existiu uma menor deformidade das lesões nos animais tratados com ácido hialurônico tóxico, quando comparados com os controles. Esses

achados corroboram com o presente estudo onde as feridas tratadas apresentaram um melhor aspecto. Embora a diferença foi pequena na diminuição da área entre pomada placebo e com ácido hialurônico, quando comparadas com os controles houve uma maior diferença.

A manutenção da área lesada úmida e limpa foi evidenciada, durante o estudo, como ótimo para cicatrização de feridas, mesmo sem o tratamento, essa cicatrização teve um decurso natural sem complicações [10]. Martins [15] notou em seus estudos, que em sua primeira mensuração as feridas tratadas com ácido hialurônico nanoestruturado apresentaram boa resposta cicatricial quando comparado com grupo controle.

Conclusão

Com esse estudo conclui-se que ao aplicar a pomada manipulada com ácido hialurônico em feridas cutâneas em ratos, este biomaterial proporcionou uma melhor cicatrização de feridas cutâneas, diminuindo a área da lesão tratada. Isto mostra que a pomada com ácido hialurônico pode ser utilizado pós-cirurgia plásticas de mamas ou outras para reduzir a presença de cicatrizes.

Referências

- [1] Steed DL. Wound-healing trajectories. *Surgical Clinics of North America*. 2003; 83: 547-555.
- [2] Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *The American Journal of Surgery*. 1998; 176: p. 265-385.
- [3] Yoshioka SA, Scabora T. Processo de extração e purificação de ácido hialurônico de crista de Frango por método de soxhlet. PI 1000460-2. (BR) 2009.
- [4] Vigetti D, Ori M, Passi A. The Xenopus model for evaluating hyaluronan during development. *Glycoforum*, 2010.
- [5] Reinmüller J. Hyaluronic Acid. *Aesthetic Surgery Journal*. 2003; 23: 309-311.
- [6] Beek M, Jones L, Sheardown H. Hyaluronic acid containing hydrogels for the reduction of protein adsorption. *Biomaterials*. 2008; 29: 780-789.
- [7] XU, F.; NACKER, J.; CRONE, W.; MASTERS, K. The haemocompatibility of polyurethane-hyaluronic acid copolymers. *Biomaterials*. 2008; 29: 150-160.
- [8] Rocha CBJ, Reis NS. Estudo comparativo do efeito glicosaminoglicanas ácidas sulfatada (Hirudóid®) e não-sulfatada (ácido hialurônico) e da própolis sobre a cicatrização da pele de ratos albinos. *Revista Científica da Universidade de Franca*. 2005; 5: p. 101-109.
- [9] Murashita T, Nakayama Y, Hirano T, Ohashi S. Acceleration of granulation tissue ingrowth by hyaluronic acid in artificial skin. *British Journal of Plastic Surgery*. 1996, 49: p. 58-63.
- [10] Anilkumar TV, Muhamed J, Jose A, Jyothi A, Mohanan PV, Krishnan LK. Advantages of hyaluronic acid as a component of fibrin sheet for care of Acute wound. *Biologicals*. 2011; 39: 81-88.
- [11] Laznicek M, Svik K, Laznickova A, Velebny V. Preclinical evaluation of wound treatment with hyaluronan-iodine hydrogel. *Wounds*. 2012; 24: 267-274.
- [12] Tammi R, Tammi M. Hyaluronan in the Epidermis. *Glycoforum*, 1998.
- [13] Wit T, Neck JV, Hovius S. Auto-crosslinked hyaluronic acid gel accelerates healing of rabbit flexor tendons in vivo. *Journal of Hand Surgery*. 2007; 32 (1): 32.
- [14] Medeiros AC, Ramos AMO, Dantas Filho AM, Azevedo RCF, Araújo FLFB. Tratamento tópico de queimaduras do dorso de ratos com ácido hialurônico. *Acta Cirurgica Brasileira*, São Paulo. 1999; 14 (4).
- [15] Martins ESR. Efeito do ácido hialurônico na cicatrização de feridas em portadores de úlcera venosa. Dissertação (Mestrado em Nanociências) – Centro Universitário Franciscano de Santa Maria, Santa Maria, 2010.