



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE ENFERMAGEM

Efeito da fração proteolítica de *Carica candamarsensis* na cicatrização cutânea: avaliação pré-clínica e clínica fase I.

Flávia Sampaio Latini Gomes

BELO HORIZONTE

2009

FLÁVIA SAMPAIO LATINI GOMES

Efeito da fração proteolítica de *Carica candamarsensis* na cicatrização cutânea: avaliação pré-clínica e clínica fase I.

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Enfermagem da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Enfermagem.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daclé Vilma Carvalho

Belo Horizonte

Escola de Enfermagem da UFMG

2009

Tese apresentada, em 14 de agosto de 2009, à banca examinadora constituída pelos Professores:

Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo – Orientador

Dra. Daclé Vilma Carvalho – Co-Orientadora

Dr. Anilton César Vasconcelos – Examinador

Dr. Eladio Oswaldo Flores Sanchez – Examinador

Dr. José Augusto Nogueira Machado – Examinador

Dra. Marília Martins Melo – Examinadora

Aos meus filhos **Aline** e **Arthur**,
razão da minha vida,
e ao meu dileto **Gustavo Velásquez**.

AGRADECIMENTOS

Ao jovem Professor Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo, pelo aceite, empenho e desafio de orientar-me, pelos ensinamentos, exemplos de competência, cooperação e paciência. **"Uma pessoa permanece jovem na medida em que ainda é capaz de aprender, adquirir novos hábitos, e tolerar contradições."**
(Marie Von Ebner-Eschenbach)

À Professora Dr^a. Daclé Vilma Carvalho, por aceitar-me como sua orientanda na primeira seleção ao curso de Doutorado da Escola de Enfermagem da UFMG e tornar-se, posteriormente, minha co-orientadora.

Ao sempre criativo Professor Dr. Jorge Gustavo Velásquez Meléndez, meu "co-orientador", pelo estímulo, apoio, ensinamentos, ajuda na análise dos dados, revisões incontáveis de todos os meus esboços e planos, companheirismo e amor que me ampararam nesses anos. **"Quem se sai bem neste mundo são as pessoas que saem à procura das circunstâncias que desejam e, se não as encontram, criam-nas."** *(George Bernard Shaw)*

À Professora Dr^a. Miriam Teresa Paz Lopes, minha “co-orientadora”, pela acolhida no Laboratório de Substâncias Antitumorais (LSAT), referência no vasto e labiríntico ICB; pelo apoio e companhia por alguns dias em Cuba, pelas orientações plenas de paciência até o “acerto da mão” na fase pré-clínica. **“Os professores ideais são os que se fazem de pontes, que convidam os alunos a atravessarem, e depois, tendo facilitado a travessia, desmoronam-se com prazer, encorajando-os a criarem as suas próprias pontes”.** (***Nikos Kazantzakis***)

Aos meus queridos amigos engenheiros Professores. Dr. Roberto Galery e Dr. Roberto Márcio de Andrade, do Departamento de Engenharia de Minas e do Departamento de Engenharia Mecânica, respectivamente, por aceitarem meu desafio e estabelecermos uma “aliança estratégica” na criação do novo *software*, pelo empenho inesgotável em me ensinarem a medir com mais rigor e me introduzirem no mundo da Imagem e da Metrologia.

Ao meu amigo Itamar Daniel Delben, por transformar em realidade o desafio: o *software* para análise de área das feridas; além de ajudar-me na análise das várias imagens.

À bolsista técnica Cássia Spínola pelo companheirismo agradável na fase pré-clínica, período em que cuidamos e trocamos inúmeros curativos nos camundongos, acompanhado de muita conversa e boas risadas.

Ao Professor Dr. Geovanni Dantas Cassali, do Departamento de Patologia, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), pela cooperação na realização e análise dos cortes histológicos.

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Martins Guedes, do Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina, pela disponibilidade em participar da fase I como médico responsável.

Ao Professor Dr. Anilton Vasconcelos, do Departamento de Patologia do ICB, pelos valiosos ensinamentos acerca de morfometria e do programa KS-300.

Ao Prof. Dr. Alexandre Carlos Eduardo, do Departamento de Engenharia Mecânica da Escola de Engenharia, pelo empréstimo do padrão primário para calibração do novo programa de análise de imagens.

Às ex-alunas e alunas de graduação, bolsistas de Iniciação Científica ou voluntárias, pela cooperação e pelo aprendizado conjunto no projeto, nas revisões, análises e nos experimentos: Marcela Niquini Viana, Juliana Alves Batista, Deivenita Juliana Alves Carvalho, Paula Gabriela Ribeiro Andrade, Eline Rezende de Moraes Peixoto, Ana Roscoe Papini Galery e Natália Chaves Fehlberg; Alexandra Dias Moreira, Fernanda Penido Matozinhos e Hanrieti Rotelli Temponi.

Aos colegas do LSAT e do Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais que tanto cooperaram comigo nestes anos: Ana Cândida, Fernandinha, Cinthia, Sandrinha, Maria Imaculada (extensivo ao Atilio), Dalton e Celso; Marco Túlio, Rafael, Henrique, Abdul e Raquel.

À querida Luciana Maria da Silva Siqueira, técnica do LSAT, pela disponibilidade incondicional, apoio e alegria. **“O sorriso enriquece os recebedores sem empobrecer os doadores.” (Mario Quintana)** Obrigada pelo seu sorriso!

Aos técnicos dos biotérios Jorge, Rinaldo e Hermes pelas dicas com os animais e seus apetrechos.

A todos os participantes voluntários da fase I, que com assiduidade e cooperação tornaram possível parte deste trabalho.

Aos “compañeros” cubanos que me ajudaram em Ciego de Ávila a executar minhas tarefas naquele país:

- Dra. Martha e família;
- Rosanna, extensivo à família Baez e ao Toyne, que tanto se empenharam pela nossa adaptação e bem-estar;
- Evileidys e Dr. Frank, pela incondicional ajuda ao trabalho, incluindo as saídas matutinas para as coletas de sangue na garupa da moto;

- os enfermeiros Ignacio, Lizabeth e Yaíma, pelo aprendizado conjunto, pela constante alegria e companhia em todas as visitas aos pacientes para tratá-los em cima das nossas bicicletas;
- a trabalhadora social Misleydis Gregório, que tantas casas percorreu a meu lado na busca por pacientes avileños;
- a técnica de enfermagem Yudith, pela ajuda com os pacientes ambulatoriais;
- China, pela coleta e análise de todo o material para exames;
- Dr^a. Delvis, Dr. Javier, Dr^a. Yolanda do Hospital Provincial Antonio Luaces Iraola; Luis (El jefe), Norys, Rigo y los otros “niños” de la informática.

Aos pacientes do ambulatório de angiologia do Hospital Provincial Antonio Luaces Iraola – Ciego de Ávila (Cuba) e a todos aqueles que nos receberam em suas casas de braços abertos, sem preconceitos do meu sotaque de “cubana falsificada”.

Às Professoras e aos funcionários técnico-administrativos do Departamento de Enfermagem Básica.

Aos Senhores Sérgio Oswaldo e Paulo Thiago, representando a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio recebido por ocasião do Convênio CAPES/Ministério da Educação – Cuba.

Ao Professor Dr. Carlos Roberto Jamil Cury, por dividir comigo um pouco da sua sabedoria dentro e fora dos muros da Escola de Enfermagem.

Aos gestores da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro a este estudo.

Aos meus pais, tia Branca, tio "Doutor", meus irmãos, cunhadas e sobrinhos pelo apoio, alegria e amor incondicionais, que foram imprescindíveis para o cumprimento dos meus vários papéis e das várias tarefas. **"A verdadeira felicidade está na própria casa, entre as alegrias da família." (Léon Tolsto)**

Às minhas amigas e também Professoras: Marisa, Mônica, Lucinha (minha eterna "paisagista de idéias"); Mércia Heloisa, Miguir, Adriana, Peninha, Myrian Biaso, Elen e Miriam Vale, pelo apoio e pelos momentos de refrigério. **"Um amigo é uma pessoa com a qual se pode pensar em voz alta." (Ralph Waldo Emerson)**

À família Heránz pela carinhosa acolhida em Ciego de Ávila, proporcionando a mim e ao Arthur equilíbrio para o cumprimento da etapa desenvolvida em Cuba, ajudando-nos nas pejejas, comemorando nossas conquistas e acompanhando-nos até os últimos momentos em Cuba. Los queremos mucho!

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram avaliar a capacidade cicatrizante da fração proteolítica P1G10 de látex de *Carica candamarcensis* aplicada em queimaduras induzidas em camundongos; a segurança e inocuidade dessa fração aplicada em pele íntegra de pessoas hígdas; a segurança e a taxa de cicatrização da fração em úlceras por pressão e venosas de pessoas voluntárias; criar e validar *software* para análise de imagens digitais de feridas. A fração foi caracterizada quanto à sua constância, sua atividade amidásica e concentração protéica. As frações de P1G10 utilizadas nestes experimentos tinham atividade amidásica de $13,5 \pm 0,5$ nM.min⁻¹.mg⁻¹ e concentração de proteína de $8,39 \pm 0,39$ mg/ml, assegurando constância da proteína por vários experimentos. Os resultados de queimaduras de terceiro grau induzidas em camundongos mostraram que a fração P1G10 - 0,1% abrevia o tempo de epitelização, enquanto que o efeito de P1G10 - 0,01% ou 1,0% não é significativamente diferente de sulfadiazina de prata 1,0%, papaína 2,0% ou veículo hidrossolúvel, utilizados como controles. No experimento randomizado duplo-mascarado, comparando o tempo de epitelização entre P1G10 - 0,01%, 0,1% e apenas veículo, confirmou-se a propriedade cicatrizante de P1G10. As análises histológicas das seções de queimaduras tratadas com P1G10 reforçaram essas observações. O ensaio clínico em humanos (fase I), utilizando protocolo duplo-mascarado, mostrou que não houve evidências clínicas e laboratoriais de toxicidade da fração P1G10 - 0,1% aplicada em pele íntegra. O ensaio clínico em humanos (fase II), utilizando protocolo duplo-mascarado, mostrou que não

houve diferenças entre o grupo tratado com a fração P1G10 - 0,1% e o tratado com sulfadiazina de prata 1,0%. A ausência de efeito cicatrizante de P1G10 foi atribuída ao pequeno tamanho amostral (n = 10). No entanto, foi observada nas feridas tratadas com P1G10 60,0% de diminuição do perímetro, enquanto nenhum efeito foi observado nas tratadas com sulfadiazina de prata. O *software* de análise de imagens se mostrou adequado em termos de variabilidade intra e inter observador. Os resultados estendem as propriedades terapêuticas desses grupos de enzimas para um tipo diferente de trauma (queimaduras) e incentivam futuras aplicações.

Palavras-chaves: pesquisa clínica, cicatrização de feridas, proteases, *Caricaceae*.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the healing activity of the proteolytic fraction named P1G10 from *Carica candamarcensis* latex, when applied to skin burns previously induced in mice. The proposal also verified the safety and harmless effect of this fraction when applied to intact skin of healthy people, and the safety and healing rate of this fraction when applied to skin pressure or venous ulcers of voluntary humans. Finally, the proposal aimed to develop a software to evaluate the digital images obtained from healing wounds treated with the active principle. Initially, the fraction was characterized for the constancy of its proteolytic activity, and protein concentration. P1G10 fractions used in these experiments was $8.39 \pm 0.39 \text{ mg ml}^{-1}$ and $13.5 \pm 0.5 \text{ nM mg}^{-1} \text{ min}$, respectively, thus assuring a constant protein content and proteolytic activity value for various experiments. The results of P1G10 on heat-induced, third-degree burn using the rodent model show that 0.1% P1G10 accelerates epithelisation while the effect of 1% or 0.01% P1G10 is not significantly different to 1% silver sulphadiazine, 2% papain or the hydrosoluble vehicle used as control. In a double-blind randomized experiment comparing the healing response of 0.01%, 0.1% and the vehicle alone, we confirmed the enhanced healing property of P1G10. Histological analysis of burn-tissue sections following treatment with P1G10 support these observations. The clinical trials in humans (phase 1) using double-blind protocols showed no visual evidence of adverse skin effect at the site of application during one-month and no changes in blood (hemogram) and liver or kidney clinical parameters. The clinical trials

in humans (phase 2) using double-blind protocols showed no difference between the group treated with P1G10 and the control treated with 1.0% silver sulfadiazine. The lack of significant healing effect by P1G10 is attributed to the small size of the sample (n =10). However a 60% decrease in perimeter size was observed in wounds treated with P1G10, while no effect was seen on wounds treated with silver sulfadiazine. The evaluation of the software aimed to capture the images during wound healing demonstrated acceptable variations when repeated measurements were done by the same operator or when a single image was quantified by different operators. These results extend the healing properties of these groups of enzymes to a different type of trauma (burns) while the results of clinical trials encourage future applications.

Key-words: biomedical research, wound healing, proteases, *Caricaceae*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- As diferentes fases do processo de cicatrização.....	35
FIGURA 2- Fases ordenadas da cicatrização.....	40
FIGURA 3- Cascata de eventos no processo de cicatrização.	43
FIGURA 4- Frutos de <i>Carica candamarcensis</i> imaturos e maduros.....	52
FIGURA 5- A e B: Modelo adaptado em PVC para realização de escaldaduras. C: Posicionamento do animal. D: Fixação do animal.....	72
FIGURA 6- Realização de queimadura por escaldadura em camundongo da linhagem <i>Hairless</i>	72
FIGURA 7- A: Seção histológica de pele da região dorsal, de camundongos da linhagem <i>Hairless</i> . B: Aparência macroscópica da lesão 24 horas após sua indução.....	73
FIGURA 8- Avaliação de edema	81
FIGURA 9- Frasco numerado contendo um dos produtos a ser aplicado e molde plástico de orifício de 9,0cm ² , correspondente à área de aplicação.....	85
FIGURA 10- A: Mensuração da região a 3,0 cm da fossa cubital. B: Aplicação do produto em antebraço esquerdo	85
FIGURA 11- Proteção do local com filme de poliuretano e aparência final.....	86
FIGURA 12- Representação esquemática do bloco padrão de 25,0 mm.....	105
FIGURA 13- Padrão secundário.....	106
FIGURA 14- Padrão primário e padrão secundário.....	107
FIGURA 15- Função <i>Line Profile</i> do programa Image-Pro Plus®	108
FIGURA 16- Representação de feridas em papel.....	109
FIGURA 17- Determinação da área de uma lesão utilizando o <i>Biometrics</i>	111
FIGURA 18- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,0% em condições desnaturantes de diferentes estoques de P1G10.....	116
FIGURA 19- Retração das queimaduras tratadas com P1G10 - 0,01%, P1G10 - 0,1% e controle no intervalo de 48 horas.....	126

FIGURA 20- Seções histológicas de pele da região dorsal, de camundongos da linhagem <i>Hairless</i> , retiradas 35 dias após a realização das queimaduras tratadas com P1G10 - 0,01%, P1G10 - 0,1% e controle.....	127
FIGURA 21- Imagens capturadas das úlceras venosas	148
FIGURA 22- Imagens capturadas das úlceras por pressão.....	149
FIGURA 23- Úlcera por pressão no início do tratamento com P1G10 - 0,1% da paciente BSGD	155
FIGURA 24- Úlcera por pressão no início e no final do tratamento com P1G10 - 0,1% da paciente CCJT	157
FIGURA 25- Úlcera por pressão no início e no final do tratamento com P1G10 - 0,1% do paciente GMTP.....	159
FIGURA 26- Úlcera venosa no início e no final do tratamento com P1G10 - 0,1% da paciente LOO.....	161
FIGURA 27- Úlcera venosa no início e no final do tratamento com P1G10 - 0,1% do paciente OTS.....	163
FIGURA 28- Úlcera por pressão no início e no final do tratamento com P1G10 - 0,1% do paciente RBM.....	165
FIGURA 29- Úlcera por pressão no início do tratamento com sulfadiazina de prata 1,0% da paciente LFR	167
FIGURA 30- Úlcera venosa no início e no final do tratamento com sulfadiazina de prata 1,0% do paciente MCL	169
FIGURA 31- Úlcera venosa no início e no final do tratamento com sulfadiazina de prata 1,0% do paciente NMP.....	171
FIGURA 32- Úlcera venosa no início e no final do tratamento com sulfadiazina de prata 1,0% da paciente PMF	173
FIGURA 33- Padrão primário e secundário.	175
FIGURA 34- Representação esquemática do comprimento do <i>pixel</i>	176
FIGURA 35- Representação esquemática da largura do padrão secundário	176

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1- Perfil cromatográfico da solução de látex de <i>Carica candamarcensis</i> após filtração em coluna Sephadex G10.....	114
GRÁFICO 2- Cromatografia de fase reversa da fração P1G10 em HPLC	117
GRÁFICO 3- Curvas de epitelização das queimaduras em camundongos segundo seis tratamentos diferentes.....	119
GRÁFICO 4- Peso médio (g) dos camundongos de acordo com o tempo de tratamento das queimaduras cutâneas.....	120
GRÁFICO 5- Curvas de epitelização das queimaduras em camundongos segundo três tratamentos diferentes.....	122
GRÁFICO 6- Frequência de camundongos que obtiveram contração da queimadura segundo tempo	125
GRÁFICO 7- Porcentagem de redução de perímetro da ferida segundo tempo e grupos de tratamento.....	128
GRÁFICO 8- Porcentagem de redução de área da ferida segundo tempo e grupos de tratamento.....	129
GRÁFICO 9- Alergia a medicamentos tópicos.	146

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Formulação da base hidrossolúvel	74
TABELA 2 - Composição do creme contendo a fração P1G10	94
TABELA 3 - Composição do creme contendo sulfadiazina de prata a 1,0%.....	94
TABELA 4 - Especificações do bloco padrão de cerâmica.....	105
TABELA 5 - Frequências absoluta e acumulada de epitelização de queimaduras de camundongos Hairless, segundo três tratamentos diferentes.....	123
TABELA 6 - Aparência do tecido das queimaduras que não epitelizaram, segundo o tratamento	124
TABELA 7 - Caracterização da amostra, fase clínica I	131
TABELA 8 - Resultados da análise de hemograma de pessoas voluntárias sadias no início das aplicações.....	135
TABELA 9 - Resultados de testes bioquímicos de sangue de pessoas voluntárias sadias no início das aplicações	136
TABELA 10 - Resultados de urinálise de pessoas voluntárias sadias no início das aplicações	137
TABELA 11 - Resultados de hemograma de pessoas voluntárias sadias ao término das aplicações.....	138
TABELA 12 - Resultados de testes bioquímicos de pessoas voluntárias sadias ao término das aplicações.....	139
TABELA 13 - Resultados de urinálise de pessoas voluntárias sadias ao término das aplicações	140
TABELA 14 - Caracterização da amostra durante a primeira avaliação, fase clínica II	141
TABELA 15 - Caracterização das feridas durante a primeira avaliação, fase clínica II	144
TABELA 16 - Resultados da análise de hemograma de pacientes portadores de feridas crônicas, no início do tratamento	150

TABELA 17 - Resultados de testes bioquímicos de sangue dos pacientes portadores de feridas crônicas, no início do tratamento.....	151
TABELA 18 - Resultados de hemograma de pacientes portadores de feridas crônicas, ao término do tratamento	152
TABELA 19 - Resultados de testes bioquímicos de pacientes portadores de feridas crônicas, ao término do tratamento.....	153
TABELA 20 - Comparações de médias de comprimento, largura e profundidade das feridas de acordo com o tratamento recebido e o tempo de tratamento	154
TABELA 21 - Valores médios das áreas e perímetros das figuras ovais, com seus respectivos desvios-padrão (DP) e coeficientes de variação (CV), de acordo com o operador e o software utilizado	177
TABELA 22 - Valores médios das áreas e perímetros das figuras retangulares, com seus respectivos desvios-padrão (DP) e coeficientes de variação (CV), de acordo com o operador e o software utilizado	178

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{99m}Tc – tecnécio metaestável

a.C. – antes de Cristo

AMP – aminometilpropanol

ANOVA – analysis of variance

ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária

AUC – área sob a curva

BHT – butilhidroxitolueno

BMP – bitmap

bpm – batimentos por minuto

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CECMED – Centro de Evaluación de Conductas Médicas

CENCEC – Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média

CM Sephadex – coluna de troca catiônica

CMP – citidina S monofosfato dissódica

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CV – coeficiente de variação

d.C. – depois de Cristo

Da – Dalton

dI – decilitro

DNA – ácido desoxirribonucléico

DP – desvio padrão

EDTA – etileno diamino tetracético

EGF – fator de crescimento epidermal

ERK-2 – extracellular signal-regulated kinases

EVA – etil-vinil-acetato

FGF – fator de crescimento de fibroblasto

fl – fentolitros

FPP – fruto fermentado de papaia

gama GT – gama glutamil transpeptidase

GIFF – Graphics Interchange Format

HCM – hemoglobina corpuscular média

HPLC – high performance liquid chromatography

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IMC – índice de massa corporal

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

JPG – Joint Photographic Experts Group

KDa – quilodalton

KeV – quilo elétron-volt

Kg – quilograma

L – largura

LBAPNA – N_α-benzoil-L-arginina p-nitroanilida hidrocloreto

M – molar

mA – miliampère

mABS – monoclonal antibodies

mEq – miliequivalente

MES/Cuba – Ministerio de la Educación de Cuba

Mili-Q – sistema de purificação de água (Millipore Co.)

mmHg – milímetros de mercúrio

MMP – metaloproteinases matrizes

Mono S – coluna para separação catiônica

n – número amostral

nm – nanômetro

nM – nanomolar

NPUP – National Pressure Ulcer Advisory Panel

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

p – probabilidade

p/v – peso por volume

P1G10 – primeiro pico protéico do látex de *Carica candamarcensis*, após separação cromatográfica em coluna Sephadex G-10, rico em cisteíno proteases

P2G10 – segundo pico protéico do látex de *Carica candamarcensis*, após separação cromatográfica em coluna Sephadex G-10.

PCR – reação em cadeia da polimerase

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

pg – picograma

PNM – polimorfonucleares

PVC – polil-cloreto de vinila

PVP-I – polivinilpirrolidona - iodo

q.s.p. – quantidade suficiente para

RDW – red cell distribution width

RNI – relação normalizada internacional

Sephadex G10 – coluna de gel filtração (40-120 uM Sigma Chem. Co.)

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

t – teste *t*-student

TFA – ácido trifluoroacético

TGF- α – fator de crescimento de transformação beta

TGF- β – fator de crescimento de transformação beta

TGO – transaminase glutâmico oxalacética

TGP – transaminase glutâmico pirúvica

TIFF – Tagged Image File Format

U/l – unidade por litro

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UNICA – Universidad de Ciego de Ávila

v/v – volume por volume

VCM – volume corpuscular médio

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

RAP/MAP quinases – Mitogen-activated protein kinases

W – watt

WMA – World Medical Association

χ^2 – qui-quadrado

α -TNF – fator-alfa de necrose tumoral

μ g – micrograma

μ l – microlitro

SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. Cicatrização	33
1.2. Avaliação morfométrica da ferida.....	44
1.3. Queimaduras.....	46
1.4. Família <i>Cariacaceae</i>	49
1.5. <i>Carica candamarcensis</i>	51
2. OBJETIVOS	62
2.1. Objetivo geral	63
2.2. Objetivos específicos.....	63
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
3.1. Obtenção e caracterização das frações do látex de <i>Carica candamarcensis</i>	66
3.2. Determinação da atividade amidásica.....	67
3.3. Estimativa da concentração protéica.....	67
3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	68
3.5. Avaliação pré-clínica: capacidade cicatrizante em modelo animal	70
- 3.5.1. Tipo de estudo.....	70
- 3.5.2. Amostra	70
- 3.5.3. Instrumento de coleta de dados.....	70
- 3.5.4. Indução de queimaduras.....	71
- 3.5.5. Preparo das formulações para o tratamento tópico	73
- 3.5.6. Tratamento	75

- 3.5.7. Variáveis de estudo.....	76
- 3.5.8. Análise morfométrica da cicatrização das lesões cutâneas	77
- 3.5.9. Aspectos éticos	78
- 3.5.10. Análise estatística.....	78
3.6. Avaliação clínica: Fase I – avaliação da segurança de P1G10 em pele íntegra.....	79
- 3.6.1. Tipo de estudo.....	79
- 3.6.2. População	79
- 3.6.3. Amostra	79
- 3.6.4. Variáveis mensuradas	80
- 3.6.5. Instrumento de coleta de dados.....	82
- 3.6.6. Coleta de dados.....	83
- 3.6.7. Aspectos éticos	86
- 3.6.8. Análise estatística.....	87
3.7. Avaliação clínica: Fase II – avaliação do efeito cicatrizante da fração em pessoas portadoras de úlceras.....	87
- 3.7.1. Tipo de estudo.....	89
- 3.7.2. População	89
- 3.7.3. Amostra	89
- 3.7.4. Coleta de dados.....	92
- 3.7.5. Tratamento	93
- 3.7.6. Variáveis de controle:.....	98
- 3.7.7. Instrumento de coleta de dados.....	102
- 3.7.8. Aspectos éticos	102
- 3.7.9. Análise estatística.....	102
3.8. Criação do programa para análise de imagem digital.....	103
- 3.8.1. Teste de reprodutibilidade.....	104
- 3.8.2. Calibração do padrão secundário.....	104
- 3.8.3. Validação do <i>software</i> em modelo.....	109
- 3.8.4. Programa <i>Biometrics</i>	110

- 3.8.5. Análise estatística.....	112
4. RESULTADOS	113
4.1. Fase pré-clínica.....	114
4.2. Fase clínica utilizando o camundongo como modelo experimental	117
4.3. Fase clínica I	130
4.4. Fase clínica II	141
4.5. Programa para análise de imagem digital	175
- 4.5.1. Calibração do padrão secundário.....	175
- 4.5.2. Validação do <i>software</i> em modelo.....	176
5. DISCUSSÃO.....	180
5.1. Fase clínica utilizando o camundongo como modelo experimental	181
5.2. Fase clínica I	185
5.3. Fase clínica II	187
5.4. Programa para análise de imagem digital	196
6. CONCLUSÕES	199
6.1. Considerações finais	201
7. REFERÊNCIAS	202
ANEXOS E APÊNDICES	230

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Há registros de tratamento de feridas desde a pré-história. Na Alexandria, por volta de 3000 anos a.C., as feridas infectadas foram descritas como aquelas cujas bordas encontravam-se avermelhadas e apresentavam calor. Para tratá-las, recomendavam a aplicação de folhas de salgueiro. Foram os egípcios que introduziram a utilização de minerais, como o cobre e o mercúrio, além de mel para tratamento de feridas (Fernandes, 2000a).

Hipócrates (460-377 a.C.) preconizava métodos para promover a supuração e reduzir a inflamação, seguindo a teoria humoral, que buscava eliminar o humor que estava em excesso no organismo e recomendava também a aplicação de vinho em feridas limpas. Os gregos introduziram como anti-séptico o acetato de cobre, o óleo de pinheiro e de cipreste e, ainda, aplicavam sob a forma de unguento a hortelã, a papoula e um fungo cultivado. Nessa mesma época, os ameríndios utilizavam vegetais adstringentes e derivados de ovos de aves para cobrir as feridas (Andrade, Seward, Melo, 1992; Fernandes, 2000a,b).

Aurelius Cornelius Celsus (53 a.C.–7 d.C.), no início da era cristã, descreveu os sinais da inflamação e classificou, pela primeira vez, as feridas e as soluções para uso tópico em: adstringentes, cáusticas, erosivas, e hemostáticas. Descreveu ainda a limpeza de feridas, com retirada inclusive de coágulos (Andrade, Seward, Melo, 1992).

Cláudio Galeno (130–200), que liderava a escola médica de Alexandria, valorizava os processos supurativos e utilizava substâncias que favorecessem o

processo cicatricial. Paulus Aegineta (607-690) classificou estas substâncias conforme seu efeito, como por exemplo, hemostáticas – cobre, giz, água fria, vinagre e vinho; para limpeza - caramujo moído, acetato de cobre, terebentina, sangue de pomba, fezes de lagarto, mel cru (Andrade, Seward, Melo, 1992; Thomaz, Thomaz, 1993; Medeiros, 2006).

Em Bolonha, no séc. XI, Bruno classificou a cicatrização em primeira e segunda intenção. No séc. XIII, acreditava-se que o pus não mais era necessário à cicatrização de feridas, assim era indicada sua limpeza com vinho e a retirada de corpos estranhos. No entanto, no séc. XIV, Guy de Chauliac (1300-1368) recomendava ainda a supuração para liberação do pus e propôs cinco princípios para tratar as feridas: remoção de corpos estranhos; reaproximação das bordas; manutenção desta aposição; conservação dos tecidos e tratamento das complicações (Andrade, Seward, Melo, 1992; Fernandes, 2000c).

Ambroise Paré (1510-1590), autor da máxima “eu cuido das feridas, Deus as cura”, substituiu o óleo fervente, que até então vinha sendo utilizado para o tratamento das feridas produzidas por armas de fogo, por pomada a base de terebentina, óleo de rosa e gema de ovo. Dominique Anel (1673-1790) criou um instrumento, a seringa de Anel, para retirar sangue e pus de feridas, que até então eram sugados pela boca do médico (Thomaz, Thomaz, 1993; Fernandes, 2000d; Cohen, 2007).

No século XVIII, foi John Hunter (1728-1793) quem descobriu a revascularização e o fenômeno da angiogênese, que com seus fatores estimulantes e inibitórios vêm sendo estudados até os dias atuais, devido à sua

importância no processo de cicatrização de feridas e na patogênese e tratamento do câncer (Cohen, 2007).

No atendimento aos militares feridos, nas batalhas do início século XIX, utilizava-se o fogo, compressas ferventes e aguardente. Nessa época, o número de infecções de feridas pós-operatórias reduziu, devido à recomendação de remoção dos tecidos desvitalizados. O pus ainda era considerado benéfico no tratamento de processos infecciosos e o estímulo da supuração era feito com sanguessugas, laxantes, emolientes e cataplasmas. Os curativos eram realizados com esponjas e lençóis sujos nos hospitais e com cremes gordurosos aumentando as contaminações. Para isolar as feridas dos miasmas, cobriam-nas com borracha e folhas de ouro, ou como alternativa, recobriam-nas com pasta de algodão. Léon Le Fort (1829-1893) preconizava a lavagem das mãos, higiene e limpeza dos ferimentos com álcool (The British Medical Journal, 1893; Lineaweaver *et al.*, 1985; Andrade, Seward, Melo, 1992).

Em 1774, Scheele (1742-1786), químico farmacêutico sueco descobriu o cloro. O hipoclorito foi utilizado entre os anos de 1820 e 1830, como relatou o francês Labarraque, em descontaminação de superfícies; assim como as soluções de iodo utilizadas entre 1861 e 1865 (Lineaweaver *et al.*, 1985; Andrade, Seward, Melo, 1992; Siqueira Júnior, Moraes, Lopes, 1999; Fernandes, 2000e).

As descobertas de Pasteur (1822-1895) sobre os microrganismos e sua relação com a putrefação dos tecidos começaram a ser aceitas, inclusive no tratamento de feridas, implicando na sua cobertura para protegê-las das contaminações e infecções. Joseph Lister (1827-1912), em 12 de agosto de 1865,

questionando a teoria miasmática e correlacionando sua prática com os achados de Pasteur, utilizou para tratamento de fratura exposta, a limpeza da ferida com água fenicada e curativo de algodão embebido em ácido carbólico, com bons resultados. Sua iniciativa diminuiu os índices de gangrena e amputações em pacientes com tal agravo, complicações comuns até então nas enfermarias de cirurgia da Universidade de Glasgow (Fernandes, 2000e; Cohen, 2007).

No final do século XIX e início do XX, o uso do álcool tornou-se mais comum, assim como dos anti-sépticos metálicos. A solução de hipoclorito foi novamente introduzida para limpeza de feridas em 1915, por Dakin. Por volta de 1920, surgiram os mercuriais orgânicos, como o mercúrio cromo, em substituição aos inorgânicos, para os quais já havia evidências de resistência bacteriana. O uso de sais de prata foi largamente disseminado nessa época para tratamento de queimaduras. Também sais inorgânicos de alguns metais foram utilizados, como o zinco, ferro e alumínio (Andrade, Seward, Melo, 1992; Siqueira Júnior, Moraes, Lopes, 1999).

O primeiro de uma série de grandes avanços para o tratamento de feridas no século XX foi o descoberto por Alexis Carrel (1873-1944), que obteve a primeira evidência de fibroblastos como células-chaves no processo de cicatrização. Posteriormente, Jerome Gross e Charles Lapiere isolaram e caracterizaram a primeira colagenase. Com Hermes Grillo, Jerome Gross estudou detalhadamente o fenômeno de contração das feridas. Entre os anos de 1920 e 1940, surgiram as pomadas contendo enzimas, destinadas ao desbridamento químico da necrose (Cohen, 2007).

Além disso, foram desenvolvidos trabalhos científicos, que não só buscavam um melhor tratamento, mas também a compreensão do processo cicatricial, como o de Karl Piez e George Martin, que estudaram a bioquímica e a biologia do tecido conectivo; e o de Thomas Hunt, que estudou os efeitos do oxigênio na ferida (Cohen, 2007).

No decorrer do século XX, outras soluções foram introduzidas como anti-sépticos, tais como, violeta de genciana, clorhexidine, quaternários de amônio, polivinil-pirrolidona-iodo (PVP-I), entre outras. Os curativos que apenas cobriam as feridas, mantendo-as em um ambiente seco, “livre” de germes, denominados passivos, continuavam sendo aplicados (Eaglstein, 1990; Andrade, Seward, Melo, 1992).

A partir de 1950, experimentos realizados em animais, por três laboratórios, com o intuito de observar a cicatrização, resultaram em experiências elegantes sobre este processo (Eaglstein, 1990). A partir de então, o princípio de cicatrização úmida superou o tratamento com coberturas passivas, surgindo a idéia das coberturas interativas, ou seja, aquelas que promoviam um micro-ambiente úmido, favorável ao processo cicatricial.

No início dos anos de 1970, Roove demonstrou que um ambiente úmido, sem crosta, aumentava a migração de células epiteliais no leito da ferida, facilitando o seu fechamento (Eaglstein, 1990; Field, Kerstein, 1994).

Nas últimas décadas, outras opções vêm sendo estudadas e propostas para tratar as feridas, reduzindo o tempo do processo de cicatrização, tais como as coberturas bioativas. Estas estimulam a mitose contínua celular ou a

reposição tecidual, abreviando o tempo necessário à cicatrização, como por exemplo, a cultura de células e os fatores de crescimento (Gomes, Borges, 2008).

A primeira descoberta de fator de crescimento foi realizada por Stanley Cohen, o EGF (fator de crescimento epidermal), seguido de tantos outros similares descobertos por outros pesquisadores. O trabalho de Anita Roberts e Michael Sporn sobre o TGF- β (fator de crescimento de transformação beta) influenciou sobremaneira os estudos do processo de cicatrização. E, muito embora, os fatores de crescimento ainda não sejam utilizados amplamente na prática clínica, eles e seus inibidores têm um importante papel no tratamento de feridas e na terapia neoplásica (Cohen, 2007).

1.1. Cicatrização

Ferida pode ser considerada como uma ruptura na pele, na membrana mucosa ou em qualquer outra estrutura corporal provocada por agentes físicos, químicos ou biológicos. O processo de cicatrização é considerado bastante complexo, dinâmico e envolve fenômenos bioquímicos, ainda não totalmente desvendados, para que ocorra o reparo tissular. Contudo, fatores sistêmicos, como idade, doença de base, uso de alguns medicamentos; e fatores locais, como presença de corpos estranhos, infecção ou necrose e localização da ferida; podem interferir no processo de restauração da ferida, prolongando-o (Mandelbaum, Di Santis, Mandelbaum, 2003; Rushton, 2007; Borges, 2008).

As feridas e seu processo de cura podem ser classificados de acordo com as camadas de tecido envolvidas (espessura parcial e total), os tipos de fechamento da ferida (primeira, segunda e terceira intenção) e início e duração (agudas e crônicas). As feridas crônicas são aquelas que não cicatrizam no tempo esperado e não procedem ao processo cicatricial normalmente, retardando seu reparo e podendo recidivar. Elas são causadas, freqüentemente, por inflamação crônica, alterações vasculares ou danos traumáticos repetitivos. As agudas são geralmente de origem cirúrgica ou traumática, ocorrem subitamente, evoluem de forma previsível e rápida até o reparo e resultam em fechamento durável (Doughty, Sparks-Defriese, 2007).

A reparação do tecido envolve três fases independentes e simultâneas, que são inflamatória, proliferativa e de remodelação ou maturação (FIG. 1). Para que o processo ocorra são necessárias condições favoráveis que propiciem a divisão e a migração celular, que promovam a formação de colágeno, que estimulem a angiogênese e que permitam a contração da ferida, impedindo a formação de crosta (Doughty, Sparks-Defriese, 2007; Li, Chen, Kirsner, 2007; Borges, 2008).

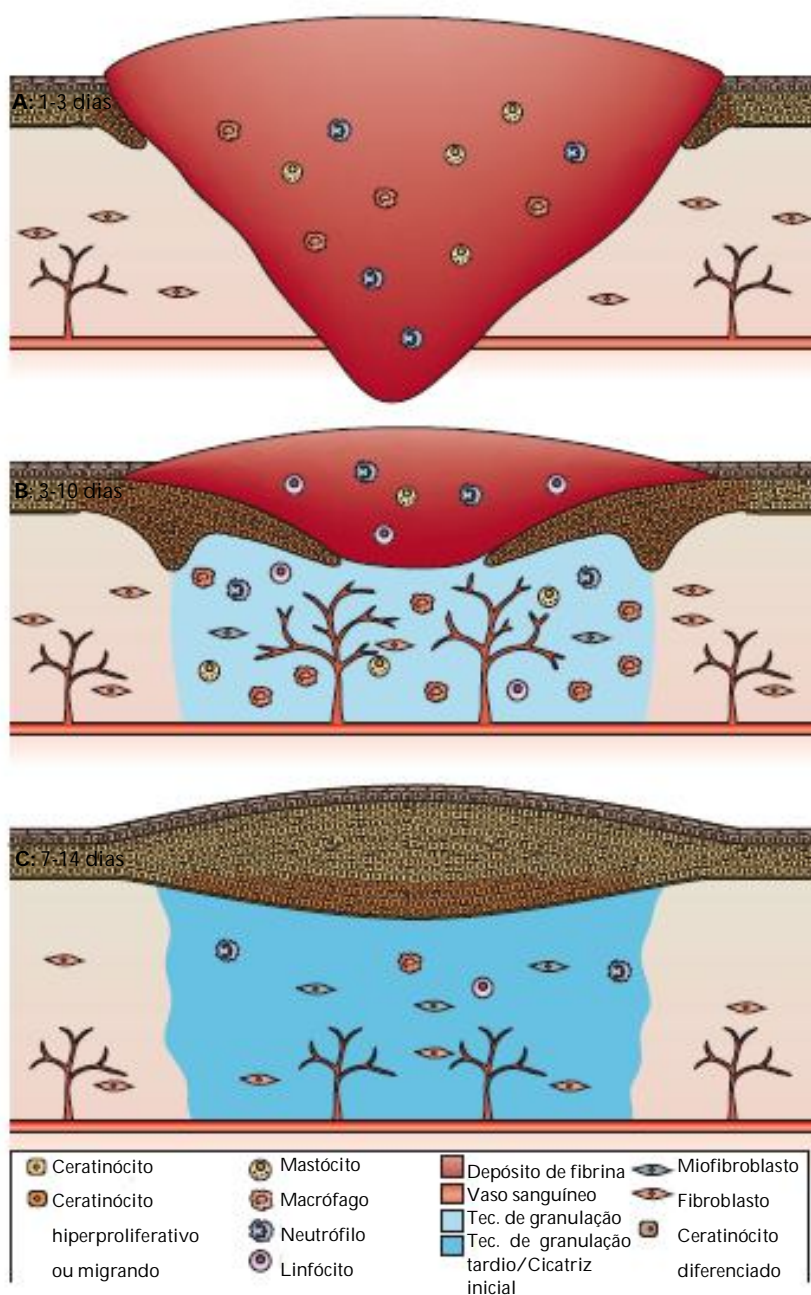


FIGURA 1- As diferentes fases do processo de cicatrização. A: Fase inflamatória. Um a três dias após a lesão, o ferimento é preenchido com um coágulo e com células inflamatórias (neutrófilos, mastócitos, macrófagos e linfócitos), que foram atraídos para o local da ferida. B: Fase proliferativa. Três a dez dias após a lesão, macrófagos são abundantes no leito da ferida e novos vasos sanguíneos são formados. Fibroblastos migram, proliferam e depositam matriz extracelular; alguns deles diferenciam-se em miofibroblastos. O

novo tecido que preenche a ferida é conhecido como tecido de granulação. Na borda da ferida, ceratinócitos da epiderme e dos folículos pilosos migram ao longo da derme e sobre a matriz provisória, sua taxa de proliferação é aumentada. C: Fase de remodelação tecidual. Uma a duas semanas após a lesão, a re-epitelização da ferida está concluída, a densidade celular do tecido de granulação progressivamente diminui e a matriz extracelular é remodelada. Isto resulta na formação de uma cicatriz com menor resistência à tração e ausência de apêndices da pele. **Fonte:** Adaptado de Schäfer, Werner, 2008.

Fase inflamatória

A pele, ao sofrer uma injúria, apresenta ruptura dos vasos sanguíneos e, por conseguinte, sangramento. O organismo desencadeia imediatamente a hemostasia com agregação plaquetária e liberação de mediadores químicos solúveis, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que inicia o processo de cura. A hemostasia precede a fase inflamatória e é caracterizada por vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, ativação do sistema complemento, migração de polimorfonucleares (PMN) e de macrófagos para a região cruenta. Surgem, então, os sinais clássicos da inflamação – calor, rubor, edema e dor (Bradley *et al.*, 1999; Li, Chen, Kirsner, 2007).

A regulação do sistema fibrinolítico é de suma importância na hemostasia, que depende diretamente da adesão e agregação plaquetária. As plaquetas têm por função iniciar a cascata de cicatrização, sendo ativadas pela matriz extracelular da parede vascular. Em seguida, as plaquetas liberaram mediadores químicos (serotonina, difosfato adenosina, tromboxano A₂), proteínas adesivas (fibrinogênio, fibronectina, trombospondina, fator von

Willebrand VIII) e fatores de crescimento (PDGF, TGF- α , TGF- β , EGF e fator de crescimento de fibroblasto - FGF) que estimulam a ativação de outras plaquetas, aumentando a agregação plaquetária, formando o coágulo e interrompendo o sangramento (Li, Chen, Kirsner, 2007; Metcalfe, Ferguson, 2007).

A resposta celular na fase inflamatória é caracterizada pela convergência de neutrófilos para a área ferida, cujos números aumentam constantemente e atingem o máximo dentro das primeiras 24 a 48 horas. Assim que o número de neutrófilos decresce, os macrófagos assumem seu lugar e repovoam o leito da ferida. Estas células são recrutadas ao leito ulceral pelos mediadores químicos liberados (Li, Chen, Kirsner, 2007; Metcalfe, Ferguson, 2007).

Os macrófagos são células grandes, móveis e ativamente fagocitárias, que fagocitam bactérias e tecido necrótico, regulam a secreção de uma série de mediadores e a função de outras células, sendo essenciais no processo de desbridamento e na regulação dos eventos subsequentes do processo de cicatrização. Os mediadores secretados pelos macrófagos são responsáveis pela atração quimiotática de mais macrófagos e pela migração e indução de proliferação dos fibroblastos e das células endoteliais, que promovem a angiogênese e a formação do tecido de granulação, aproximadamente, no quinto dia após a injúria. Ademais, os macrófagos podem ser considerados como produtores de fatores de crescimento, tais como PDGF, FGF, TGF- α , TGF- β e fator de crescimento endotelial vascular – VEGF. Estas citocinas são importantes na indução da migração celular, bem como na proliferação e produção da matriz. Sendo assim, o macrófago desempenha importante papel

na transição entre a fase inflamatória e a proliferativa (Bradley *et al.*, 1999; Li, Chen, Kirsner, 2007; Metcalfe, Ferguson, 2007).

Fase proliferativa

Durante a segunda fase do processo de cicatrização, a integridade vascular é restaurada, a perda tecidual é recuperada com novo tecido conectivo e a superfície da ferida é recoberta por novo epitélio. A fase proliferativa é caracterizada por re-epitelização, neo-angiogênese, deposição de matriz e síntese de colágeno, predominando a atividade celular (Doughty, Sparks-Defriese, 2007; Li, Chen, Kirsner, 2007).

A migração de ceratinócitos é o evento mais precoce da etapa de re-epitelização e ocorre a partir de apêndices remanescentes da pele, como o folículo piloso, e das bordas da ferida. Uma primeira matriz provisória é formada por fibrina, fibronectina e colágeno tipo V, possibilitando a migração dos ceratinócitos e re-epitelização do leito da ferida. Vários elementos têm sido relacionados com a migração de ceratinócitos, tais como, matriz extracelular, receptores de integrinas, metaloproteinase matriz e fatores de crescimento (Li, Chen, Kirsner, 2007).

As metaloproteinases matrizes (MMP) são produzidas no processo de migração de ceratinócitos, tais como as MMP-9, responsáveis pela degradação do colágeno tipo IV e de lamininas presentes na membrana basal; e as MMP-1, que rompem qualquer aderência a um colágeno fibrilar facilitando a migração dos ceratinócitos pelo leito ulceral (Li, Chen, Kirsner, 2007).

Após três a quatro dias de a pele ter sofrido a injúria, inicia-se a reconstituição dérmica, caracterizada pela formação do tecido de granulação, criação de novos arcos capilares (neo-angiogênese) e acúmulo de fibroblastos (FIG. 2). Nesta fase, os fibroblastos são as células predominantes no leito da ferida, são ricas em mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, necessários para a síntese protéica. Eles sintetizam colágeno e uma matriz extracelular provisória (tecido conectivo), rica em fibronectina, elastina e proteoglicanos, que sustentará as novas células e os frágeis arcos capilares. Ademais, são também modulados em miofibroblastos, as células com maior concentração de actinmiosina, assemelhando-se às células do músculo liso, que diferem dos fibroblastos dérmicos, pois têm papel proliferativo diminuído e síntese de colágeno aumentada, podendo, assim, participar da contração da ferida (Doughty, Sparks-Defriese, 2007; Li, Chen, Kirsner, 2007).

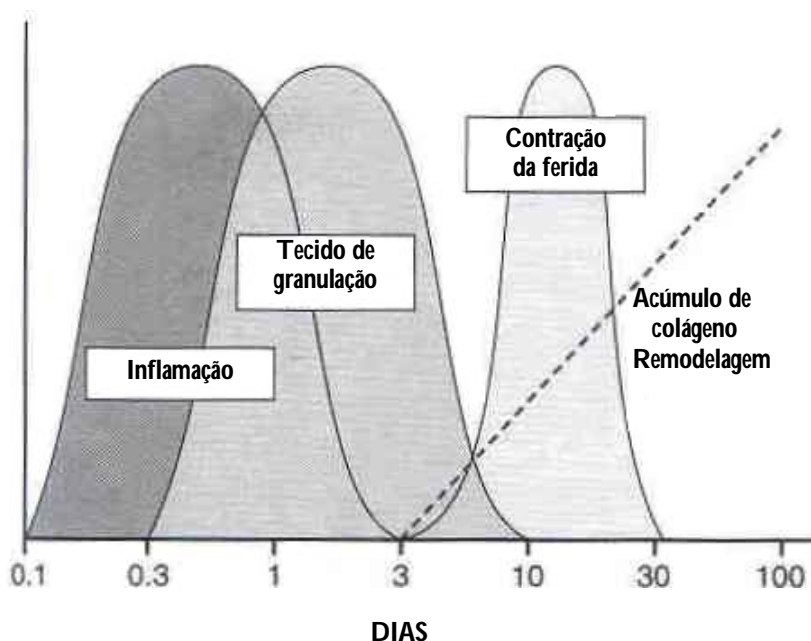


FIGURA 2- Fases ordenadas da cicatrização. A linha do tempo (em dias) reflete a trajetória do modelo de cicatrização de feridas agudas. **Fonte:** Adaptado de Doughty, Sparks-DeFries, 2007.

Para que a contração ocorra, as células do leito da ferida se alinham aos miofibroblastos e o processo ocorre na direção das linhas de tensão da pele, mediado por PDGF₁, 5-hidroxitriptamina, angiotensina, vasopressina, epinefrina e norepinefrina. A contração é unificada e exige o contato célula-célula e célula-matriz, bem como sua taxa é proporcional ao número de miofibroblastos e inversamente proporcional à concentração de colágeno (Li, Chen, Kirsner, 2007).

Assim como a proliferação de fibroblastos, a neo-angiogênese é estimulada pelos fatores de crescimento endoteliais vasculares, secretados pelos ceratinócitos, e pela baixa tensão de oxigênio e alto conteúdo de ácido láctico presentes entre o centro da ferida e o tecido periférico vascularizado. À medida

que aumenta a oxigenação local, o estímulo da neo-angiogênese diminui (Doughty, Sparks-Defriese, 2007; Li, Chen, Kirsner, 2007).

A re-epitelização requer a migração de células epiteliais através do tecido de granulação, a fim de reparar a perda tecidual. Devido à perda da epiderme, as células basais adjacentes, mediadas por fatores de crescimento epidermais, tornam-se reprogramadas, separam-se da membrana basal, dividem-se e migram verticalmente em direção ao leito da ferida formando a única camada celular. Este processo é bastante limitado e pode ser retardado caso haja tecido necrótico no leito ulceral. Também é limitada a distância que a célula epitelial migra do rebordo da ferida, de aproximadamente 3,0 cm. Uma vez formada a primeira camada de células, estas sofrerão divisão mitótica e formarão as camadas adicionais. Este tecido neoformado é bastante delicado e vulnerável à dissecação e à ruptura (Orgill, Demling, 1988; Bradley *et al.*, 1999).

Fase de remodelação ou maturação

A fase final do processo de cicatrização inicia-se em torno do vigésimo primeiro dia após o trauma e pode durar até um ano, sendo caracterizada pela diminuição da atividade celular, aumento da colagenase para romper o acúmulo excessivo de colágeno, regressão da exuberante rede de capilares e aumento da força tênsil do tecido neoformado. Para tal, o colágeno sintetizado pelos fibroblastos, que continuam a regular esta fase, é mais forte e mais ordenado. Contudo, a força tênsil do tecido cicatrizado jamais será superior a

80,0% da força tênsil de um tecido que nunca sofreu uma injúria (Bradley *et al.*, 1999; Doughty, Sparks-Defriese, 2007).

A FIG. 3, na próxima página, sintetiza a cascata de eventos no processo de cicatrização.

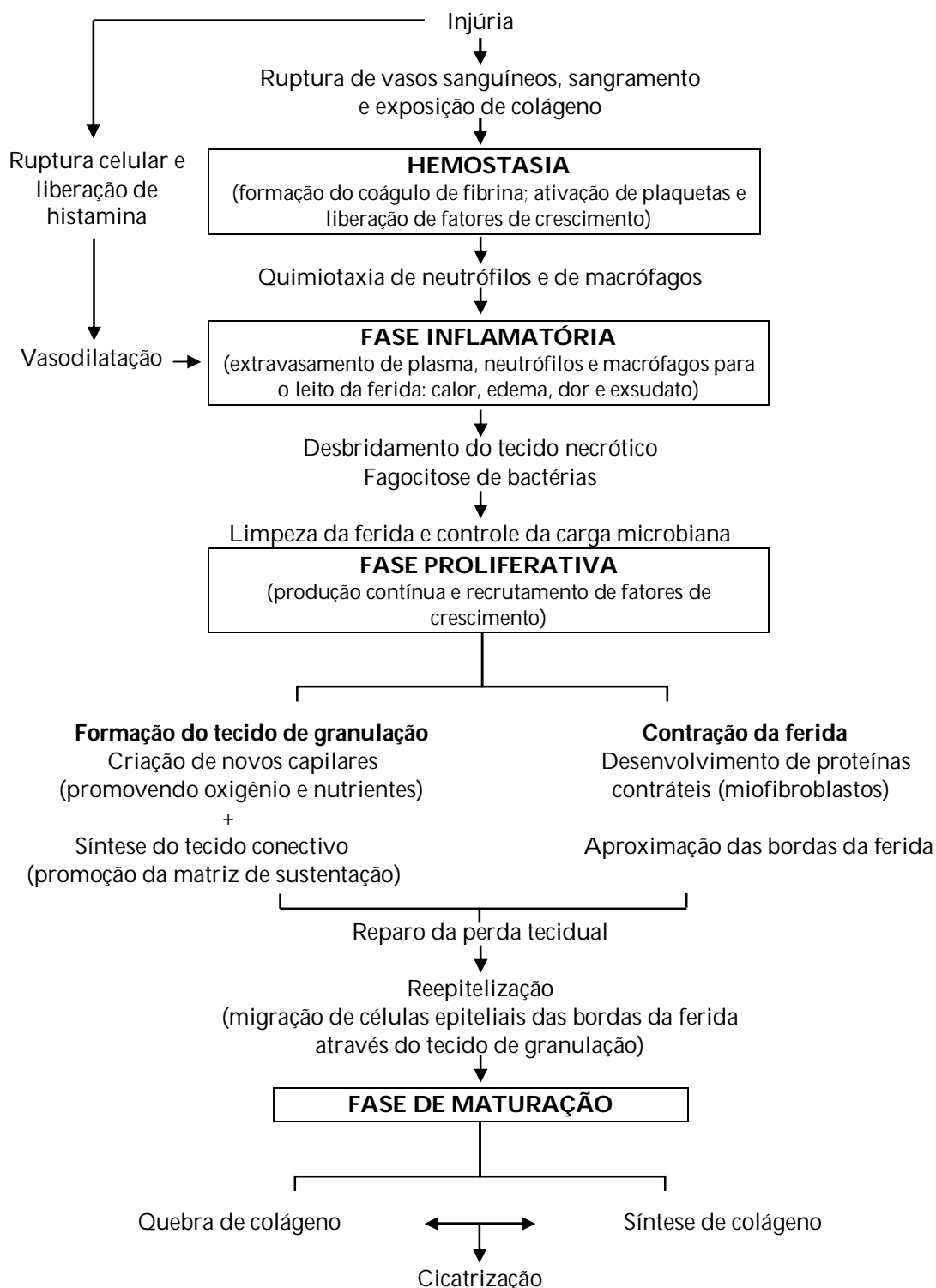


FIGURA 3- Cascata de eventos no processo de cicatrização. **Fonte:** Adaptado de Doughty, Sparks-Defriese, 2007.

1.2. Avaliação morfométrica da ferida

Um dos aspectos fundamentais da avaliação é a mensuração da área da ferida. Esse dado é relevante, pois fornece, de maneira objetiva e sistematizada, parâmetros que indicam melhora ou piora da cicatrização da ferida. Infelizmente, a mensuração de feridas apresenta problemas de confiabilidade como variação da habilidade dos profissionais em definir as bordas da ferida, que não é passível de controle; mudanças do tamanho da ferida decorrentes do ato de desbridamento e inexistência, até o momento, de um método preciso que meça a profundidade das feridas (Bates-Jansen, 1995; Nix, 2007).

A avaliação morfométrica da ferida pode ser realizada por meio de medidas tridimensionais ou bidimensionais. A medida tridimensional avalia a ferida em suas diferentes dimensões, ou seja, profundidade, comprimento e largura (Cooper, 2000).

A mensuração bidimensional é a mensuração mais simples, rápida e mais utilizada na prática clínica, não requer equipamento especializado e abrange medições lineares, traçados e fotografias das feridas. As medidas lineares determinam o tamanho ou a área das feridas, multiplicando-se o comprimento pela largura, fornecendo a tendência do processo de cicatrização. No entanto, o perímetro das feridas geralmente é irregular, sendo difícil um cálculo com exatidão (Goldman, Salcido, 2002; Haghpanah *et al.*, 2006).

O traçado da ferida é captado pelo contorno do perímetro externo da ferida desenhado com caneta permanente em papel ou acetato transparente, fino, flexível e estéril, apoiado sobre o leito da lesão. Trata-se de técnica de

menor custo financeiro e de fácil acesso, porém laboriosa, repetitiva e depende do treinamento do profissional. Ademais, esse procedimento pode causar dor e provocar a manipulação excessiva do leito da lesão e, até mesmo, do paciente, dependendo da localização da ferida e das condições gerais do indivíduo. Outro inconveniente é a dificuldade em determinar a borda da ferida para contorná-la, procedimento que exige habilidade (Moore, 2005; Haghpanah *et al.*, 2006).

O registro fotográfico pode fornecer o tamanho relativo da ferida, a cor do tecido e a condição da pele circunvizinha. As fotografias em série podem ser capturadas por uma câmera digital, a um ponto fixo da imagem, de modo que mudanças no curso da cicatrização se tornem evidentes (Cooper, 2000). Outro recurso utilizado com a finalidade de comparação é captura da imagem ao lado de um padrão métrico conhecido, como por exemplo, uma régua milimetrada.

Existem programas computadorizados (*softwares*) que eliminam a etapa manual da realização dos cálculos planimétricos. A quem for realizar a mensuração cabe digitalizar a imagem fotográfica ou o traçado da ferida coletados (Haghpanah *et al.*, 2006). O programa pode fornecer a área, o perímetro, a anfractuosidade, ou seja, a relação entre o perímetro e a área, o que revela o quão irregular ou não é a ferida; e homogeneidade, que é a relação entre o maior e o menor diâmetro. Esses dados, ao serem analisados, fornecerão informações que auxiliarão na escolha e na continuidade do tratamento.

O uso da planimetria por meio da fotografia é um recurso sem risco para o paciente, visto que não se faz necessário tocar na lesão, apesar de requerer

mais recursos materiais para o procedimento. Entretanto, informações como localização, profundidade, medida da canalização, odor e dor devem ser avaliados e registrados adequadamente.

Atualmente, existem *softwares* no mercado para cálculo de área, perímetro, maiores comprimentos e larguras dentre outras medidas, obtendo algum sucesso (Lagan *et al.*, 2000). Porém, nem todos são específicos para a leitura de imagens de feridas, ou têm preço elevado para compra, ou não são compatíveis com diversas plataformas de dados, dificultando sua utilização.

1.3. Queimaduras

As queimaduras são feridas agudas, de natureza térmica, resultantes da transferência de energia de uma fonte de calor ou frio para o corpo e constituem importante causa de morbi-mortalidade. O tipo de queimadura mais freqüente é a escaldadura, produzida por substância quente ou fonte de calor, e as menos freqüentes são as de natureza elétrica e química (Barbosa *et al.*, 2003; Hettiaratchy, Dzewulski, 2004; Martins, Andrade, 2007).

Tradicionalmente, as queimaduras são excluídas do grupo das “feridas complexas”, por serem consideradas há algum tempo como feridas em condições especiais e que são tratadas em centros especializados. No entanto, em muitas circunstâncias, as queimaduras são incluídas neste grupo que é caracterizado por: perda de extensa parte da pele, presença freqüente de infecção, viabilidade de tecidos superficiais comprometida, associação com

patologias sistêmicas que interferem negativamente no processo normal de cura, demandando atenção especial (Ferreira *et al.*, 2006).

Nos Estados Unidos, o Relatório do Repositório Nacional de Queimaduras 2009 revisa os dados de admissões por queimadura no período de 1999 a 2008, considerando 79 Centros de Queimados daquele país, nos quais foram registrados 127.016 casos, sendo que, aproximadamente, 71% das vítimas eram do sexo masculino, a média de idade foi de 32 anos, 17% de todos os casos ocorreram em crianças menores de 5 anos de idade e 12% em pessoas com idade igual ou superior a 60 anos. A taxa de mortalidade considerando todos os casos foi de 4,0 a 7,3% (Disponível em: <www.ameriburn.org/index.php>). De janeiro a março de 2009, foram internadas 6.200 pessoas por queimadura no Brasil (Disponível em: <www.datasus.gov.br>).

A queimadura provoca o dano e a isquemia celular, relacionados à liberação dos metabólitos do ácido araquidônico, oxidantes, histamina, serotonina, cininas e outras aminas vasoativas, que aumentam a hiperpermeabilidade dos capilares locais e sistêmicos. A liberação de fluidos devido à hiperpermeabilidade capilar combinada ao aumento da pressão capilar cria edema local ou sistêmico. Em grandes queimados (15 a 20% da área corporal), o efeito do extravasamento de fluidos, eletrólitos e proteínas para o espaço intersticial é o choque hipovolêmico, que pode acontecer na fase de emergência, caso as intervenções necessárias não tenham sido iniciadas. Ademais, a solução de integridade da pele causa o aumento da perda de calor e

fluidos através da ferida, agravando o desequilíbrio hidro-eletrolítico e causando a hipotermia (Evans, 2007).

Formação de necrose é o principal fator que interfere negativamente no tratamento da pessoa queimada, pois a deposição excessiva de colágeno pode retardar o processo de cicatrização, além de aumentar o risco de infecções. Sendo assim, o tratamento tópico dessas feridas tem por objetivo diminuir o crescimento de microrganismos, e com isto reduzir o risco de infecção invasiva em tecidos, prevenir o início de sepse e preparar a área para seu fechamento (Wilson, 2000).

O creme à base de sulfadiazina de prata a 1,0% é amplamente utilizado com essa intenção, pois trata-se de um fungicida, antimicrobiano de largo espectro (gram-positivo e gram-negativo). Contudo, seu mecanismo de ação não é claro, mas sabe-se que seus componentes têm efeito sinérgico para proporcionar um efeito bactericida *in vivo*. Em outro estudo, os autores afirmam que esse efeito bactericida deve-se à sulfadiazina de prata, decorrente da ação do metal pesado, mas que também exerce efeito tóxico aos fibroblastos. Há relatos de efeitos adversos, que incluem reação de hipersensibilidade na pele e leucopenia transitória, normalmente auto-limitada. Além disso, existe pouca evidência para mostrar que a utilização deste agente tópico reduz infecções bacterianas na ferida ou sepse em pacientes com queimaduras. Alguns estudos sugerem que a sulfadiazina pode retardar a cicatrização de feridas, desaconselhando seu uso, além disso, apontam que a única justificativa para sua indicação seria a de proporcionar um ambiente limpo e úmido para

promover a cicatrização (McCauley *et al.*, 1989; Hussain, Ferguson, 2006; Evans, 2007).

Em estudo experimental, utilizando culturas de fibroblastos diplóides humanos e fibroblastos da derme humana, verificou-se que a sulfadiazina de prata exerceu efeito tóxico sobre as mesmas, diminuindo o número dessas células (McCauley *et al.*, 1989). Em outro estudo experimental, utilizando culturas de ceratinócitos humanos, os autores afirmam que a sulfadiazina de prata exerce profundo efeito citotóxico nessas células, salientam que este efeito é idêntico quando associada ao nitrato de cério e relatam sobre a resistência de microrganismos, como *Pseudomonas aeruginosa* e os da família *Enterobacteriaceae*, quando utilizada por períodos prolongados (Teepe *et al.*, 1993).

Portanto, um tratamento que, além de atender os objetivos previamente citados, promovesse ou acelerasse o processo de cicatrização, diminuindo assim o risco de infecção, seria oportuno. Na busca de outra opção, a fração proteolítica de *Carica candamarcensis* tem sido estudada quanto a sua possível propriedade cicatrizante cutânea.

1.4. Família *Cariacaceae*

A família *Caricaceae* é composta por um grupo de plantas de interesse comercial, fonte importante de enzimas proteolíticas. Uma das espécies há mais tempo conhecida e utilizada na prática clínica é a *Carica papaya*. A partir de seu látex, extraem-se algumas proteinases, dentre elas a papaína, cuja importância

econômica deriva da diversidade de processos industriais nos quais é empregada.

A papaína é utilizada como adjuvante em transtornos digestivos, como nas alterações da secreção gástrica, intestinal e pancreática; insuficiência na digestão de proteínas, dispepsias por putrefação do alimento no aparelho digestivo e inapetência; ação anti-helmíntica e por último a ação local antiulcerosa (Merck, 1972, Chen *et al.*, 1981). Etnofarmacologicamente, a ação antiulcerosa é a função mais freqüentemente atribuída a esta proteinase. Cabe também destacar, o uso da quimopapaína nas lesões de discos intervertebrais (quimionucleólise), como alternativa ao tratamento cirúrgico convencional (Milbouw *et al.*, 1989; Brown *et al.*, 1989; Block *et al.*, 1989). Devido à capacidade de algumas das proteinases de *C. papaya* para hidrolisar proteoglicanos, tem sido sugerida a aplicação destas na modelagem de tecido cartilaginoso (Kerenyi *et al.*, 1988).

No Brasil, a papaína é também utilizada para desbridamento químico, ou enzimático, de feridas agudas ou crônicas, em concentrações variadas: 10,0%, em presença de crosta enegrecida; de 1,0 a 4,0%, para estimular a formação do tecido de granulação (Pieper, Caliri, 2003).

Mais recentemente, foram descritas as propriedades terapêuticas e protetoras do fruto fermentado da papaia (FPP). Os dados da literatura mostraram que FPP seqüestra radicais livres, protege o DNA e proteínas de agentes químicos, estimula a produção da síntese do óxido nítrico e a secreção

de α -TNF e melhora a resposta imunológica (Imao *et al.*, 1998; Rimbach *et al.*, 2000; Mojica-Henshaw *et al.*, 2003).

1.5. *Carica candamarcensis*

Outra espécie cujo látex vem sendo investigada é a *Carica candamarcensis*. Trata-se de uma planta nativa da América do Sul, localizada principalmente na região Andina, em altitudes superiores a 1000 metros, que apresenta tronco grosso, geralmente ramificado, mede até 10 m de altura e contém coroa compacta de folhas na sua parte terminal ou nas extremidades das ramificações. Seu fruto mede de 5 a 15 cm, é elipsóide, amarelo quando maduro, sendo que a polpa é delgada, aquosa e aromática, comestível somente após o cozimento. Os canais lactíferos deste vegetal estão presentes na região cortical do tronco, nas folhas e, mais abundantemente, nas camadas mais externas do endocarpo, principalmente dos frutos imaturos (Leon, 1987; Walraevens *et al.*, 1999).



FIGURA 4- Frutos de *Carica candamarcensis* imaturos e maduros, respectivamente.

O látex extraído de *Carica candamarcensis* tem altos níveis de carboidratos, vitaminas, sais minerais e peptídeos de baixo peso molecular, além de cisteíno-proteinases de alta atividade proteolítica, algumas das quais estão ausentes no látex de *Carica papaya* e de outras espécies que compõem o gênero *Carica* (Baeza, Correa, Salas, 1990; Loguercio, Bravo, Salas, 1990; Bravo, Hermosilla, Salas, 1994). Algumas dessas proteases apresentam eficiência enzimática cerca de dez vezes superior para clivar substratos sintéticos (LBAPNA) quando comparada com as proteinases de *Carica papaya*. Além disso, diferem quanto ao pH ótimo, ponto isoelétrico e reatividade imunológica (Gravina, Termignoni, Salas, 1994; Bravo, Hermosilla, Salas, 1994).

Aproveitando as propriedades proteolíticas do látex de *Carica candamarcensis*, foram avaliadas suas propriedades em substituição à proteinase K nas técnicas de isolamento do DNA bacteriano, plasmidial ou ambos. Os

resultados obtidos revelaram que duas destas enzimas são capazes de gerar preparações de DNAs de ótima qualidade para clonagem ou PCR, sendo que a aplicação destas enzimas resulta em um menor custo quando comparado com os resultados da técnica convencional utilizando proteinase K (Genelhu *et al.*, 1998). Além disso, foi proposto que uma das enzimas do látex *Carica candamarcensis* teria uma ação quimionucleolítica melhorada quando comparada com a quimopapaína de *Carica papaya* (Walreavens *et al.*, 1993).

Supõe-se que a função biológica das proteases que fazem parte do látex de *Carica candamarcensis* seja a de fornecer proteção ou promover a cicatrização do fruto após injúrias. A observação que corrobora essa hipótese é a de que o processo de cicatrização inicia-se depois de produzida a lesão no fruto de *Caricaceae*, sendo precedida pela formação de um coágulo de látex no ferimento. Essas proteinases são ativadas anteriormente à formação do coágulo, sendo este processo de natureza seqüencial (Silva *et al.*, 1997; Moutim *et al.*, 1999).

Além dessa observação, estudos demonstraram que enzimas proteolíticas de origem vegetal podem agir como sinalizadoras na via de transdução em células de mamífero. Para exemplificar pode-se citar a bromelaína (mistura de cisteíno-proteinases em *Ananus comosus*), que age como reguladora celular a partir de interações específicas com receptores localizados na membrana de células alvos, bloqueando a via RAS/MAP quinases. Dependendo da célula, estas proteinases poderão estar envolvidas em processos de proliferação celular, desenvolvimento, inflamação e angiogênese (Déry *et al.*, 1998; Mynott *et al.*, 1999).

Da mesma forma que na planta, em mamíferos são desencadeados eventos com o intuito de promover a cicatrização do tecido. Dentre esses temos: ativação de plaquetas com liberação de fatores de crescimento e citocinas, processo inflamatório, granulação e angiogênese, remodelação do colágeno, re-epitelização, não sendo necessariamente etapas seqüenciais (Cohen, Diegelmann, Lindbland, 1992).

Considerando os mecanismos envolvidos na regeneração do tecido vegetal e a possibilidade de apresentar atividade semelhante a um fator de crescimento em sistemas animais, realizaram-se estudos sobre a caracterização bioquímica e atividade mitogênica de frações e proteases purificadas do látex de *Carica candamarcensis*.

Por meio de separação cromatográfica em coluna Sephadex G10 do látex, obtiveram-se dois picos bem definidos, denominados P1G10 e P2G10, sendo o primeiro rico em cisteíno proteases (Silva *et al.*, 2003). Após duas etapas de purificação cromatográfica em colunas CM-Sephadex e Mono S, a partir de P1G10, foram obtidas duas proteases (CMS2MS2 e CMS2MS3) com atividade mitogênica em fibroblastos e outras linhagens celulares (Gomes *et al.*, 2005). A proliferação celular estimulada por CMS2MS2 é mediada via MAP quinases, como determinado pelo aumento da fosforilação de ERK-2 e independente de sua atividade proteolítica (Gomes *et al.*, 2005; Gomes, 2008; Gomes *et al.*, 2008).

A ocorrência de efeito mitogênico também foi comprovada em outro estudo que utilizou cultura de fibroblastos e de células epiteliais tratados com a outra fração P2G10 do látex de *Carica candamarcensis*. Observou-se a resposta

mitogênica, entre dois e quatro dias após o início do tratamento, proporcional à concentração utilizada, sendo esta ação comparável com a produzida pelo EGF humano em fibroblastos. Os dados obtidos confirmaram que o fator mitogênico é de natureza protéica (Silva *et al.*, 2003).

A neoformação vascular (angiogênese), etapa imprescindível da cicatrização por proporcionar o fornecimento de oxigênio e nutrientes necessários para sustentação do metabolismo celular e reparo tecidual, também foi avaliada com a referida fração proteolítica P1G10. A solução de P1G10 - 0,1% promoveu aumento de 57,0% na concentração de hemoglobina em relação ao controle. Por outro lado, a concentração de 1,0% provocou redução de 35,0%, o que pode ser explicado pela sobreposição da atividade proteolítica em relação à atividade mitogênica (Mello *et al.*, 2008).

Após a determinação das atividades mitogênica, angiogênica e proteolítica da fração P1G10, realizou-se avaliação de sua atividade cicatrizante sobre escoriações promovidas na pele de camundongos *Hairless*. Os grupos tratados com P1G10 - 1,0% e 0,1% obtiveram taxa de cicatrização de 100,0 e 600,0% superior às lesões controle, respectivamente. Já P1G10 - 10,0% apresentou efeito irritante exacerbado sobre a pele lesionada, bem como na pele íntegra das bordas da lesão (Mello *et al.*, 2006).

Para efeito comparativo, avaliou-se o efeito cicatrizante de papaína 0,1% em creme hidrossolúvel, no mesmo modelo experimental. A taxa de cicatrização promovida por esta outra fonte de cisteíno-proteases foi 66,0%

maior quando comparado com as lesões controle e, portanto, dez vezes menor do que a obtida com P1G10 - 0,1% (Mello *et al.*, 2006).

Ao avaliar a toxicidade tópica, verificou-se que exposição repetida à fração protéica P1G10 (0,1 e 1,0%), em pele íntegra e escarificada de camundongos *Hairless*, não promoveu qualquer alteração que pudesse ser caracterizada como efeito tóxico (irritação e corrosão). Porém, a concentração de P1G10 a 10,0% apresentou um potencial irritante moderado, classificada índice 2. No entanto, a irritação revelada pela exposição a essa concentração foi reversível após cinco dias da última aplicação (Mello *et al.*, 2006).

A toxicidade tópica sub-crônica/crônica de P1G10 também foi avaliada, durante três e seis meses, respectivamente, aplicando-se na concentração de 0,1% (maior efeito cicatrizante) em camundongos *Swiss*, previamente depilados. Os resultados da análise histopatológica e da variação de peso dos órgãos selecionados demonstraram que não houve diferenças entre o grupo controle (creme hidrossolúvel) e o tratado com P1G10, indicando ausência de toxicidade no modelo estudado (Lemos *et al.*, 2006).

A fração P1G10 também foi submetida a ensaios de avaliação de sua atividade anti-ulcerogênica por meio da determinação de seus efeitos cicatrizante gástrico e citoprotetor. Para avaliação da atividade cicatrizante gástrica, após anestesia e laparotomia abdominal na região epigástrica, úlceras crônicas foram promovidas pela injeção de ácido acético na subserosa de ratos *Wistar*. Soluções de P1G10 - 0,1; 1,0 e 10,0 mg/kg, foram administradas diariamente por via oral. A fração P1G10 na dose de 10,0 mg/kg foi capaz de

reduzir o índice de ulceração em aproximadamente 62,0% quando comparado ao grupo controle. Quando comparada a eficiência de P1G10 10,0 mg/kg com os medicamentos utilizados na clínica em suas respectivas doses experimentais ideais, ranitidina (100,0 mg/kg) e omeprazol (10,0 mg/kg), a fração protéica foi capaz de promover efeito similar, não diferente estatisticamente, ao do grupo tratado com o omeprazol (63,0%) e superior ao apresentado pela ranitidina (52,0%) (Mello, 2005).

Já a atividade citoprotetora gástrica desta fração foi avaliada em experimentos onde foram induzidas úlceras agudas pela administração subcutânea de indometacina na dose de 50,0 mg/kg. Os resultados revelaram que P1G10 (via oral) nas doses de 0,1; 1,0 e 10,0 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente o índice de ulceração e o número de úlceras quando comparados ao controle, de modo dose dependente.

Seguiu-se então com a comparação da eficiência da dose de P1G10 -10,0 mg/kg com os fármacos ranitidina (100,0 mg/kg) e omeprazol (10,0 mg/kg). O grupo tratado com P1G10 promoveu redução no índice de ulceração em torno de 60,0%, enquanto os grupos tratados com ranitidina e omeprazol apresentaram taxa de redução desse índice de, aproximadamente, 70,0%. Quando comparados entre si, os tratamentos não apresentaram resultados estatisticamente diferentes quanto à redução do índice de úlceras. Na análise do número de úlceras, no entanto, os fármacos ranitidina e omeprazol apresentaram-se mais eficientes, reduzindo 88,0 e 85,0% respectivamente, enquanto que o grupo tratado com P1G10 - 10,0 mg/kg foi capaz de reduzir

este parâmetro em 61,7%. O efeito citoprotetor de P1G10 também foi avaliado com a utilização do modelo de indução de úlceras por etanol, estresse e ligadura pilórica. Neste modelo o tratamento com P1G10 - 10,0 mg/kg foi capaz de reduzir o índice de ulceração em 60,0% (Mello, 2005; Silva, 2009).

Em busca de possíveis ações da fração P1G10 na mucosa gástrica que pudessem justificar seu efeito citoprotetor revelado nos ensaios de cicatrização de úlceras agudas induzidas por indometacina, foi efetuada a determinação de muco em secções da mucosa glandular gástrica de ratos tratados com P1G10 10,0 mg/kg. Sob efeito de P1G10, houve aumento significativo de 29,0% nos níveis de muco nas mucosas gástricas tratadas em relação ao controle (Mello, 2005).

Estudos toxicológicos sistêmicos demonstram que as atividades das enzimas do citocromo P450, o consumo alimentar, ganho de peso corporal, peso do fígado e os valores de proteínas totais microsossomais não foram alterados pela administração oral de P1G10 em doses até 30 vezes maiores (334,0 mg/kg/dia durante seis dias consecutivos, totalizando nesse período 2,0 g/kg, por via oral), em relação às utilizadas na avaliação da atividade anti-úlceras (10,0 mg/kg) (Villalba *et al.*, 2007).

A ausência de toxicidade, aliada à comprovada atividade cicatrizante, coloca P1G10 como um promissor fármaco para o tratamento de úlceras gástricas, uma vez que os medicamentos atualmente utilizados – ranitidina e omeprazol - apresentam o inconveniente de alterar os parâmetros hepáticos e interagirem farmacocineticamente com outros fármacos (Santos, Silva, 2006).

Ademais, constatou-se que a fração P1G10 não apresenta efeito mutagênico, utilizando-se o teste de Ames (Maron, Ames, 1983) e dos Micronúcleos. Os resultados mostraram que o número de colônias que sofreram reversão pelo tratamento com P1G10 (0,1 e 1,0% p/v) é semelhante ao de reversões espontâneas (controle negativo) e 10 vezes menor que o obtido após o tratamento com azida sódica (controle positivo) (Villalba *et al.*, 2007).

No teste dos Micronúcleos, P1G10 não provocou micronucleação significativamente maior que o controle, sugerindo ausência de genotoxicidade da fração (Villalba *et al.*, 2008).

Visando estabelecer os principais parâmetros farmacocinéticos de P1G10, utilizou-se marcação da fração com o radioisótopo tecnécio metaestável (^{99m}Tc), que tem meia vida pequena (6 horas), alta disponibilidade, manuseio seguro, baixo custo e emite radiação gama de baixa energia dentro da faixa detectável em cintiladores (140 KeV). Observou-se que as maiores taxas relativas – área sob a curva – AUC – ($\text{AUC}_{\text{órgão}}/\text{AUC}_{\text{sangue}}$) foram encontradas na bexiga (113,7), rins (46,1), intestino grosso (5,5), fígado (4,2) e intestino delgado (1,2), enquanto que a pele (0,72), coração (0,68), tireóide (0,48), tecido adiposo (0,30) e cérebro (0,06) apresentaram as menores taxas. Sendo assim, as maiores taxas de captação foram observadas nos órgãos relacionados à metabolização e excreção de fármacos. A meia-vida foi em torno de 1,51 horas e a biodisponibilidade foi de 106,9%, por via subcutânea, e de 8,4%, por via oral (Lemos *et al.*, 2008).

As etapas anteriores se fazem importantes, pois os experimentos farmacocinéticos avaliam quantitativamente a cronologia dos processos de

administração, absorção, distribuição, biotransformação e excreção dos fármacos. Esse estudo é importante por gerar aplicações clínicas práticas, como: determinação adequada da posologia de acordo com a forma farmacêutica, dose indicada no caso clínico, intervalo entre as doses e via de administração; interpretação da resposta inesperada ao medicamento, como, por exemplo, ausência de efeito terapêutico ou presença de efeitos colaterais pronunciados; melhor compreensão da ação do fármaco e determinação de posologia em situações especiais, como, por exemplo, em pacientes com insuficiência renal, hemodiálise e insuficiência hepática (Oliveira, Oliveira, 2006).

Entretanto, os estudos pré-clínicos anteriores não consideraram a atividade cicatrizante de P1G10 em queimaduras induzidas por calor. Sendo assim, fez parte deste projeto a avaliação do efeito cicatrizante de P1G10 em queimaduras térmicas de pele.

Tendo em vista a avaliação farmacológica como cicatrizante cutâneo, utilizando-se testes pré-clínicos, e a análise dos parâmetros toxicológicos e farmacocinéticos descritos, pode-se afirmar que P1G10 apresenta evidente potencial terapêutico.

Portanto, para a conclusão desta caracterização farmacológica, torna-se necessária a realização de estudos clínicos, para obtenção do registro da fração em estudo. Vale lembrar que os ensaios pré-clínicos são realizados em modelos animais, nos quais são estudados os aspectos farmacológicos – farmacodinâmicos e farmacocinéticos - e toxicológicos. Já os ensaios clínicos são realizados em humanos e se dividem em quatro fases: a fase I tem o objetivo de

determinar a segurança e a faixa de dosagem do medicamento em número necessariamente reduzido de voluntários sadios; a fase II estabelece o nível de eficácia para o controle ou resolução do quadro clínico em questão; a fase III tem como objetivo aprofundar nos estudos anteriores, com número maior de participantes e por períodos mais longos e os estudos de fase IV são realizados após a liberação para a comercialização, com enfoque para detecção de reações adversas não observadas anteriormente (Oliveira, Oliveira, 2006).

Ressalta-se, ainda, que todo o processo vem sendo desenvolvido em laboratórios da UFMG – Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais e Laboratório de Substâncias Antitumorais – com recursos públicos, e que toda a equipe de pesquisa se empenha para que o produto final seja disponibilizado para os procedimentos clínicos pertinentes.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a capacidade cicatrizante da fração proteolítica P1G10 de látex de *Carica candamarcensis*.

2.2. Objetivos específicos

Estudos utilizando camundongo como modelo experimental

- a) Avaliar a capacidade cicatrizante da fração proteolítica P1G10 de látex de *Carica candamarcensis*, aplicada em queimaduras induzidas em camundongos.
- b) Avaliar o índice e a taxa de cicatrização de queimaduras térmicas, induzidas no dorso de camundongos da linhagem *Hairless*, tratadas com duas diferentes concentrações de P1G10.
- c) Avaliar histologicamente a cicatrização obtida após tratamento das queimaduras térmicas, induzidas no dorso de camundongos da linhagem *Hairless*, com duas diferentes concentrações de P1G10.

Estudos clínicos

- a) Avaliar a segurança da fração proteolítica de látex de *Carica candamarcensis*, P1G10, aplicadas em pele íntegra de pessoas saudáveis.
- b) Avaliar a ocorrência de efeitos adversos em pele íntegra de pessoas hígidas, após aplicação de P1G10 ou creme hidrossolúvel.

c) Avaliar a inocuidade de P1G10, após aplicação de P1G10 - 0,1% ou creme hidrossolúvel, em pele íntegra de pessoas híginas.

d) Avaliar a taxa de cicatrização de úlceras por pressão e úlceras venosas tratadas com P1G10 - 0,1% ou sulfadiazina de prata.

Criar e validar um *software* para análise de imagens digitais obtidas durante a evolução do tratamento de feridas com P1G10.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção e caracterização das frações do látex de *Carica candamarcensis*

(Pereira *et al.*, 2001)

A partir de incisões no epicarpo de frutos imaturos, o látex foi coletado e armazenado a 4°C. Posteriormente, o mesmo foi liofilizado e novamente armazenado, em freezer, a -20°C. Para a separação cromatográfica, dissolveu-se 15,0 g do látex liofilizado em 75,0 ml de tampão de ativação (Apêndice A). A mistura foi agitada durante 30 minutos e centrifugada (9000 x g) durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em gaze dupla, sendo o resíduo lavado uma vez mais com 25,0 ml do tampão de ativação e o procedimento anterior repetido. Os filtrados obtidos foram recolhidos, desprezando-se os resíduos.

A amostra obtida, conforme descrito acima, foi equilibrada com tampão acetato de sódio 1,0 M e aplicada em coluna Sephadex G-10. As frações coletadas foram triadas mediante a determinação da absorbância a 280 nm e da atividade amidásica. As frações contendo o primeiro pico com atividade amidásica foram reunidas, constituindo a fração P1G10.

Com um sistema de ultrafiltração que utiliza membrana cujo tamanho do poro equivale a 10000 Da, as amostras de P1G10 foram filtradas, lavando-as três vezes com água deionizada e recolhendo a solução residual, que posteriormente foi liofilizada. A determinação da concentração protéica unitária e total e a atividade proteolítica específica do liofilizado foram realizadas como parâmetros de qualidade da fração.

3.2. Determinação da atividade amidásica

A atividade amidásica das frações foi determinada com o substrato sintético BAPNA (Baeza, Correa, Salas, 1990). Na determinação da atividade amidásica específica, 10,0 μg das frações foram incubados a 37°C com 1ml do tampão de ativação, juntamente com 3,0 μL da solução de BAPNA (Apêndice A). Após surgimento de uma cor amarela, a reação foi paralisada com 60,0 μl de solução de ácido acético 60,0% (v/v). A determinação da concentração molar de para-nitro-anilida liberada (quantidade de produto formado) foi realizada por meio da densidade ótica em 405 nm e sua relação com o coeficiente de extinção molar desta substância, que é 8800 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. A atividade amidásica específica foi expressa em concentração molar de produto formado por unidade de massa da enzima em determinado tempo, especificamente, $\text{nM produto} \times \text{min}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ enzima.

3.3. Estimativa da concentração protéica (Dawson *et al.*, 1995)

A concentração protéica de P1G10 foi determinada por meio da técnica de Lowry – Folin. Para tal, as seguintes soluções foram preparadas:

- 1 – 2,0% de Na_2CO_3 em 0,1 mol/l de NaOH.
- 2 – 0,5% de $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 1,0% de citrato de sódio.
- 3 – 50,0 ml da solução 1 e 1,0 ml da solução 2.
- 4 – reagente de Folin 1:2 em água deionizada.

A partir da solução de P1G10 – 10,0 mg/ml, preparou-se uma solução de 30,0 µg/ml, aliquotando, em triplicata, 3,0 µl dessa solução e completando para 1,0 ml com a solução 3. Após homogeneização, a mistura foi deixada por 10 minutos em temperatura ambiente. Terminado este período, 100,0 µl da solução 4 foi adicionado, agitado e mantido por 30 minutos, também em temperatura ambiente. A absorvância das soluções foi determinada por leitura espectrofotométrica a 750 nm e os resultados foram interpolados na curva padrão construída com várias concentrações de lisozima.

Curva padrão de lisozima: A partir de uma solução padrão de lisozima (10,0 mg/ml), foram preparados 1,0 ml, em triplicata, das seguintes soluções: 10, 20 e 30 µg/ml, sendo as diluições preparadas com a solução 3. Homogeneizaram-se as soluções, que foram deixadas em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, 100,0 µl da solução 4 foram adicionados e a mistura agitada e mantida por 30 minutos em repouso em temperatura ambiente, para determinação da absorvância em comprimento de onda de 750 nm. O espectrofotômetro foi zerado com uma solução contendo 1,0 ml da solução 3 e 100,0 µl da solução 4 (solução branca).

3.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (Laemmli, 1970)

A solução para gel separador (Apêndice A) foi aplicada em placa de vidro com 8,0 x 10,0 x 0,3 cm de dimensões, munidas de espaçadores e vedantes

de borracha, além de pente com 10 dentes. Após polimerização do gel separador, adicionou-se a solução para gel concentrador (Apêndice A) sobre a primeira. Após a polimerização do último gel, os pentes e os vedantes foram cuidadosamente retirados, sendo a montagem colocada na cuba de eletroforese contendo o tampão de corrida. Uma corrente elétrica de 80 V de tensão, 20 mA e 2 W de potência foi aplicada durante 30 minutos a 7°C (pré-corrída). Adicionou-se volume do tampão de amostra (Apêndice A) correspondente a 1/6 do volume total da amostra. Nas amostras contendo proteases também foi adicionado 1,0 µl de solução MMS 50 mM (Apêndice A). Para desnaturação das amostras, essas foram fervidas por 5 minutos, antes da aplicação no gel. Realizou-se a aplicação nas canaletas localizadas no pólo negativo do gel. A eletroforese foi desenvolvida em corrente elétrica de 20 mA, 80 V de tensão e 2 W de potência, durante aproximadamente 2 horas, a 7°C.

Terminada a corrida eletroforética, expôs-se o gel à solução fixadora (Apêndice A) por 30 minutos. Após esse período, o gel foi lavado duas vezes com água destilada para hidratá-lo. Em seguida, adicionou-se a solução de azul-brilhante de *coomassie* para coloração de géis (Apêndice A), a qual permaneceu por 30 minutos ou até o aparecimento das bandas. O fundo do gel (*background*) foi descorado com a solução descorante (Apêndice A). Foi capturada imagem digital (câmara Kodak DC-40) do gel sobre um transiluminador para a análise dos resultados. A intensidade das bandas foi calculada por densitometria usando o *software* Kodak, versão 1D-3.5.

Estimou-se a massa molecular por meio da análise do gel desnaturante corrido com padrões de massas conhecidas: lisozima, 14300 Da; quimiotripsinogênio, 25000 Da e ovalbumina, 45000 Da.

3.5. Avaliação pré-clínica: capacidade cicatrizante em modelo animal

- 3.5.1. Tipo de estudo

Tratou-se de estudo experimental, com objetivo de testar a eficácia cicatrizante da fração P1G10, utilizando três concentrações diferentes (0,01%, 0,1% e 1,0%), em modelo de ferida por queimadura, de aproximadamente 3,0 cm² de superfície, produzida por escaldadura na pele de camundongos.

- 3.5.2. Amostra

Foi composta por 10 animais em cada grupo experimental e 10 em cada grupo controle. A espécie era camundongo da linhagem *Hairless*, de ambos os sexos, com aproximadamente 60 dias de idade e peso de 30,0 g, sendo mantidos em gaiolas individuais recebendo ração e água *ad libitum*.

- 3.5.3. Instrumento de coleta de dados

O instrumento de coleta de dados (Apêndice B), do tipo formulário, foi elaborado para caracterizar os animais pertencentes à amostra, em relação à idade, sexo e peso; e registrar as observações realizadas das lesões até sua epitelização, bem como os registros fotográficos em cada troca de curativos.

- 3.5.4. Indução de queimaduras

As queimaduras foram realizadas no dorso dos camundongos *Hairless*, próximas à região caudal, após administração intramuscular de anestésico (xilazina 10,0% e quetamina 2,0% 10:7,5). Tratou-se de queimadura térmica (escaldadura), com água a temperatura controlada entre 90 e 93°C (termômetro de coluna de álcool - Incoterm®, L-037/06), aplicada por 10 segundos. Para tal, um modelo adaptado foi confeccionado, utilizando-se um tubo de polil-cloreto de vinila (PVC), forrado com etil-vinil-acetato (EVA) e recortado um orifício de 1,0 x 2,5 cm (Walker, Mason, 1968). O animal anestesiado foi posicionado em decúbito dorsal sobre o orifício e fixado ao tubo por meio de uma régua e tiras de borracha (FIG. 5). O tubo foi mergulhado em 0,5 cm de profundidade da água, por 10 segundos (FIG. 6).

Após 24 horas da indução da queimadura, iniciava-se o tratamento, conforme descrito no item 3.5.6. A lesão obtida foi caracterizada, previamente, nas análises histopatológicas, como sendo de queimadura de III grau, que atingiu toda a espessura da epiderme, da derme e do subcutâneo, ou hipoderme; totalmente recoberta por necrose esbranquiçada (FIG. 7).

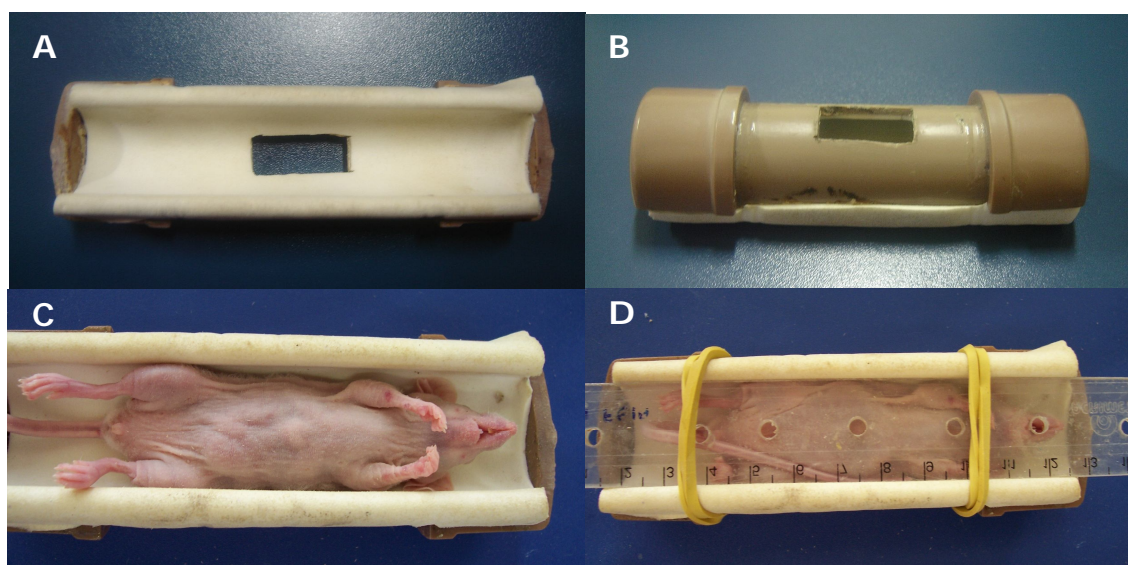


FIGURA 5- A e B: Modelo adaptado em PVC para realização de escaudaduras, visão superior e inferior. C: Posicionamento do animal. D: Fixação do animal.



FIGURA 6- Realização de queimadura por escaudadura em camundongo da linhagem *Hairless*.

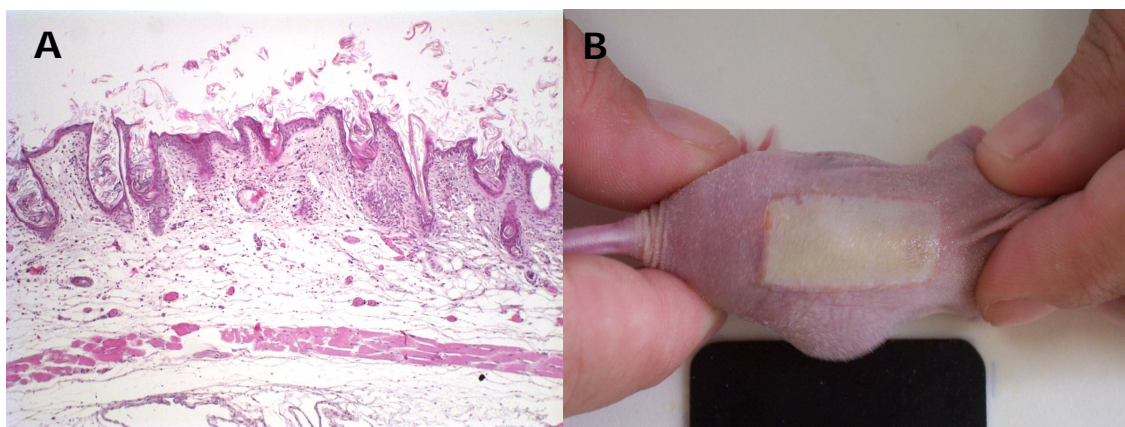


FIGURA 7- A: Seção histológica de pele da região dorsal, de camundongos da linhagem *Hairless*, retirada 24 horas após a realização das queimaduras por escaldadura, evidenciando área de necrose extensa da derme ao subcutâneo, incluindo fibroblastos; basofilia intensa da derme, com núcleos picnóticos. Objetiva de 10. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). B: Aparência macroscópica da lesão 24 horas após sua indução.

- 3.5.5. Preparo das formulações para o tratamento tópico

Para o preparo das formulações a serem utilizadas para o tratamento tópico dos animais, amostras de P1G10 foram diluídas em água destilada, obtendo-se três concentrações diferentes: 0,01; 0,1 e 1,0 p/v da fração protéica, e posteriormente, foram incorporadas ao veículo (base hidrossolúvel),

Neste experimento, utilizaram-se três controles diferentes: papaína, por tratar-se de enzima proteolítica proveniente de fruto do mesmo gênero *Caricaceae*; sulfadiazina de prata, por ser o tratamento de escolha na prática clínica para queimaduras e o creme hidrossolúvel sem qualquer princípio ativo.

A amostra de papaína Merck® foi incorporada ao veículo, a partir da dissolução prévia da protease em água destilada, obtendo-se a concentração final de 2,0% de protease.

Em todas as preparações, a mesma proporção de água destilada foi incorporada ao veículo, para garantir a mesma textura. A base hidrossolúvel foi manipulada pela Farmácia Universitária da Faculdade de Farmácia da UFMG, cuja formulação está descrita na TAB. 1.

TABELA 1
Formulação da base hidrossolúvel.

Componentes	Concentração
Polawax® (emulsionante/espessante)	8,0%
Vaselina líquida (emoliente)	6,0%
Butilhidroxitolueno – BHT (antioxidante)	0,05%
Propilparabeno (conservante)	0,1%
Propilenoglicol (umectante)	5,0%
Metilparabeno (conservante)	0,15%
Etileno Diamino Tetracético – EDTA (quelante)	0,1%
Aminometilpropanol – AMP-95 (base corretora de ph)	0,03%
Solução de Imidazolidinil uréia a 40,0% (conservante)	0,3%
Ciclometicone volátil (emoliente)	2,0%
Água destilada (veículo) – q.s.p.	100,0%

O creme contendo sulfadiazina de prata a 1,0% era da marca Prati, Donaduzzi e Cia Ltda., cuja formulação é composta de: sulfadiazina de prata (10,0 mg) e excipiente q.s.p. (1,0 g). Excipientes descritos na bula fornecida pela referida indústria farmacêutica: álcool cetoestearílico, lauril sulfato de sódio, vaselina líquida, propilenoglicol, metilparabeno, propilparabeno, butil hidroxitolueno e água deionizada. O fabricante não disponibilizou as quantidades dos excipientes utilizados na formulação, pois, segundo ele, “estes dados são confidenciais da empresa”.

A manipulação dos cremes foi realizada por pessoa que não interveio no tratamento ou na avaliação da evolução das queimaduras. Os frascos ficaram armazenados em geladeira do Laboratório de Substâncias Antitumorais, do Departamento de Farmacologia, ICB/UFMG.

- 3.5.6. Tratamento

Após 24 horas de produzida a lesão, em julho de 2007, deu-se início ao tratamento, com a formulação previamente definida, utilizando os seguintes grupos:

I – animais que receberam a fração na concentração de 0,01%,

II – animais que receberam a fração na concentração de 0,1%,

III – animais que receberam a fração na concentração de 1,0%,

IV – animais que receberam a base hidrossolúvel,

V – animais que receberam papaína a 2,0%,

VI – animais que receberam sulfadiazina de prata a 1,0%.

Sobre a área afetada foi aplicada uma fina camada das preparações descritas acima, entre 1,5 a 2,0 mm de espessura, coberta com pedaço de gaze dupla sob pedaço de filme de PVC e fixados com adesivo microporoso (Micropore[®]). O filme de PVC foi utilizado com o intento de manter a umidade na lesão. O curativo era mantido todo o tempo e trocado a cada 48 horas, quando, ao ser retirado, a lesão era limpa com gaze embebida em solução fisiológica (NaCl 0,9%) e as bordas eram secas.

A avaliação da evolução das queimaduras foi realizada até a obtenção de epitelização completa ou o intervalo de 35 dias de tratamento, amparada nos resultados de experimentos pilotos prévios.

Em um segundo protocolo experimental, em abril de 2008, sendo confirmadas as concentrações de P1G10 com maior efeito de cicatrização, utilizaram-se apenas três grupos de animais, que foram tratados com duas das concentrações mais eficazes da fração de P1G10 e outro com a base hidrossolúvel (controle).

Para tal, 35 animais foram distribuídos entre o grupo controle (creme hidrossolúvel) e os dois grupos de tratamento distintos. As preparações foram manipuladas e codificadas (1 a 3) por uma terceira pessoa, que não participou do tratamento. Esse código foi mantido em sigilo até que a análise dos resultados fosse concluída.

- 3.5.7. Variáveis de estudo

O peso dos animais foi verificado em seis momentos distintos: peso basal (antes da indução das queimaduras), 7, 14, 21, 28 dias após a realização das mesmas e 35 dias (antes de serem sacrificados). Os animais foram pesados em balança eletrônica analítica Adventurer® OHAUS, avaliada e aprovada pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Foi realizada a calibração da balança, conforme orientações do fabricante, antes das medições.

O fenômeno de contração das feridas também foi avaliado durante o experimento. Trata-se da redução acentuada, visualmente percebida em um curto espaço de tempo, da área da ferida, quando fibroblastos especializados, denominados miofibroblastos, exercem forças de tração na matriz extracelular (Monaco, Lawrence, 2003).

A avaliação da evolução das queimaduras foi realizada até a obtenção de epitelização completa ou o intervalo de 35 dias de tratamento.

- 3.5.8. Análise morfométrica da cicatrização das lesões cutâneas

As imagens das lesões foram capturadas a cada troca de curativos, durante todo o período experimental, utilizando-se câmera digital Sony Cyber-shot®, modelo DSC-P73, cuja resolução é de 4,1 mega *pixels*, e incluíam padrão secundário de tamanho de 5,1 x 15,0 cm.

Decorridos os 35 dias de experimento, todos os animais foram sacrificados em câmara de gás (CO₂), a pele da região dorsal foi retirada utilizando-se instrumental cirúrgico, fixada sobre papel filtro e acondicionada em frascos escuros contendo solução de formol a 10,0%, que, após três dias, era trocada por álcool a 70,0%. Posteriormente, os fragmentos de pele, cicatrizada ou não, foram analisados histologicamente no Laboratório de Patologia Comparada, coordenado pelo Prof. Geovanni Dantas Cassali, situado no Departamento de Patologia Geral, ICB/UFMG.

Para a análise morfométrica das imagens, um *software* foi criado em colaboração com professores dos Departamentos de Engenharia Mecânica e

Engenharia de Minas, da Escola de Engenharia da UFMG. Este programa binariza a imagem, identificando a área mais escura como a lesada e mensura esta área, de acordo com o número de *pixels*, conforme detalhamento na seção 3.8.4.

- 3.5.9. Aspectos éticos

De acordo com o parecer favorável à realização dos experimentos, do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG, protocolo nº 34/2002 (Anexo A), os protocolos experimentais envolvendo animais foram realizados no Laboratório de Substâncias Antitumorais, Departamento de Farmacologia, ICB/UFMG.

- 3.5.10. Análise estatística

Para descrição das variáveis, utilizaram-se medidas de tendência central e dispersão (média, mediana e desvio padrão).

A probabilidade (P) foi determinada utilizando o método paramétrico de probabilidade contínua (ANOVA), que calcula as diferenças das médias no período (dias) para epitelização ou retração das feridas, a partir da curva de regressão não-linear ajustada obtida nesta fase experimental.

3.6. Avaliação clínica: Fase I – avaliação da segurança de P1G10 em pele íntegra

- 3.6.1. Tipo de estudo

Tratou-se de estudo experimental, triplo-mascarado, randomizado. O delineamento prospectivo tem como característica iniciar-se com uma provável causa e seguir no tempo buscando o efeito; e como vantagens evidenciar as características e correlações do agravo nos intervalos de tempo, o alto potencial descritivo e a simplicidade analítica (Polit, Hungler, 1995; Rouquayrol, Almeida Filho, 1999). Sendo assim, buscava-se avaliar a evolução do grupo de voluntários, submetido à condição experimental, em onze intervalos diferentes.

- 3.6.2. População

A população alvo deste estudo constituiu-se de indivíduos hígidos, entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos, usuários do Campus Saúde e do ICB da UFMG, que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa.

- 3.6.3. Amostra

Para definição do tamanho da amostra, utilizaram-se as orientações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que preconiza de 20 a 100 indivíduos para compor a amostra de pesquisa clínica fase I. Esta fase trata-se do primeiro estudo de um novo princípio ativo, em seres humanos, em pequenos grupos de pessoas voluntárias, em geral sadias; para estabelecer a

margem de segurança e o perfil farmacocinético da substância testada (Disponível em: <www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>).

Iniciou-se o cálculo com a quantidade mínima exigida de indivíduos, acrescida de 20,0% para potenciais perdas, chegando à amostra final de 25 pessoas.

- 3.6.4. Variáveis mensuradas

a) Variáveis dependentes

↳ Presença de dor. A dor foi avaliada pela Escala Numérica de 1 a 10, sendo que 0 significa ausência de dor e 10 a pior dor imaginável.

↳ Presença de eritema. O eritema é considerado como decorrente da maior visibilidade da oxi-hemoglobina causada por vasodilatação ou aumento do fluxo sanguíneo (Potter, 2002). Este parâmetro foi avaliado aplicando-se leve pressão com a polpa digital sobre a área e liberando em seguida a pressão. As áreas de pele submetidas à pressão deveriam ficar esbranquiçadas após a remoção da mesma.

↳ Presença de macicez, ressecamento e descamação. A pele normalmente é lisa e seca, existindo o mínimo de perspiração e oleosidade. Quando se esfrega a pele e há descamação, semelhante à escama de peixe, há indícios de ressecamento anormal da pele. O local da aplicação foi avaliado pela palpação local e submetido à pequena fricção com a polpa digital (Hardy, 1990; Potter, 2002).

↳ Presença de edema. O edema foi avaliado pela prova de cacifo ou de Godet, que consiste na pressão da área com firmeza, utilizando-se o dedo polegar, por 5 segundos, e posterior liberação. Registra-se o escore da escala de cruces de acordo com a profundidade da depressão provocada na pele, em milímetros: 2,0 mm = 1+, 4,0 mm = 2+, 6,0 mm = 3+ e 8,0 mm = 4+ (Seidel *et al.*, 1995).

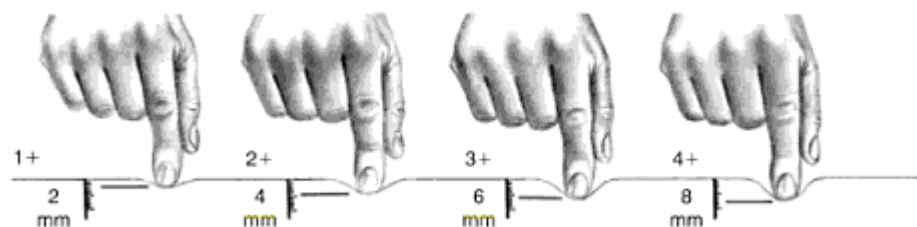


FIGURA 8- Avaliação de edema. **Fonte:** Cannobio, 1990.

Outro método adotado para verificação do edema constituiu-se na mensuração da circunferência do antebraço com fita métrica, semanalmente. A fita foi posicionada na circunferência do antebraço, a 3,0 cm da fossa cubital, e verificou-se a medida do local.

↳ Presença de calor. A variação da temperatura da pele pode revelar processo inflamatório ou infeccioso pelo aumento do fluxo sanguíneo. O calor do local de aplicação foi avaliado com o dorso da mão da pesquisadora, comparando com a área corporal simetricamente oposta (Potter, 2002).

↳ Presença de prurido. Para avaliação desta variável, considerou-se a informação fornecida pela pessoa voluntária quanto à presença ou não de prurido.

↳ Presença de vesículas ou bolhas. As vesículas são elevações da pele superficiais, circunscritas e de tamanhos iguais ou maiores a 1,0 cm de diâmetro, que não comprometem a derme e contêm secreção serosa. As bolhas são lesões semelhantes, porém maiores que 1,0 cm de diâmetro. Podem ser decorrentes de processo inflamatório, alérgico ou infeccioso (Nix, 2007). À inspeção do antebraço, buscou-se a presença ou não de vesículas.

b) Variável independente

Avaliou-se a aplicação do creme contendo ou não a fração P1G10 - 0,1%. A escolha desta dose está amparada nos estudos pré-clínicos, uma vez que foi evidenciada maior eficácia e segurança nos experimentos de abrasão dérmica.

- 3.6.5. Instrumento de coleta de dados

O instrumento de coleta de dados (Apêndice C) constitui-se em um formulário elaborado para identificar a pessoa voluntária e caracterizar a sua pele. Ele contém questões fechadas e abertas referentes às informações da pessoa e do seu perfil sócio-econômico, das características da pele antes e após aplicação do creme, da avaliação dos efeitos e do registro fotográfico do processo.

- 3.6.6. Coleta de dados

Inicialmente, foi solicitado aos voluntários que lessem e, caso concordassem em participar da pesquisa, assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice D). Eles foram, então, encaminhados ao laboratório de análises clínicas terceirizado (Laboratório Hermes Pardini) para coleta de material para exames. Posteriormente, foi realizada avaliação das pessoas participantes, os dados foram coletados e registrados no formulário próprio (Apêndice C) e o creme foi aplicado. A definição do creme a ser aplicado – base hidrossolúvel ou P1G10 - 0,1% em base, foi determinada após sorteio, utilizando-se o programa Epi Info, versão 6.0.

Consideraram-se elegíveis pessoas adultas, acima de 18 anos, de ambos os sexos, usuárias do Campus Saúde e do ICB da UFMG, sem relato de: doenças infecto-contagiosas ou parasitárias, processos infecciosos ou alérgicos aos componentes da formulação, uso de antimicrobianos, imunossupressores, antialérgicos, corticosteróides e antiinflamatórios sistêmicos, nos últimos quinze dias; bem como, gestação e amamentação. Antes do início da aplicação tópica, realizou-se avaliação física para certificação de que a pele da pessoa voluntária estava isenta de quaisquer sinais alérgicos, inflamatórios ou de infecção.

Os exames laboratoriais solicitados no 1º e 30º dias foram: hemograma, tempo de coagulação, protrombina e de tromboplastina; glicemia em jejum, albumina sérica, proteínas totais, TGO, TGP, gama GT, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, bilirrubina total, cálcio, fósforo, cloro, sódio, potássio e urina rotina

(Brito, 1995). As amostras foram coletadas, processadas e analisadas no referido laboratório.

As amostras de P1G10 foram incorporadas ao veículo (base hidrossolúvel), a partir da dissolução prévia da fração em água destilada, para produção da concentração final de 0,1% da fração protéica.

A mesma proporção de água destilada, correspondente à amostra com princípio ativo, foi incorporada ao veículo, para garantir a mesma textura ao controle. A base hidrossolúvel foi manipulada pela Farmácia Universitária da Faculdade de Farmácia da UFMG e sua formulação foi descrita na seção 3.5.4.

Essas preparações tópicas foram manipuladas e codificadas no Laboratório de Substâncias Antitumorais, Departamento de Farmacologia, ICB/UFMG, por pessoa que não entrava em contato com os sujeitos pertencentes à amostra; transportadas em caixas térmicas até a Escola de Enfermagem da UFMG e armazenadas em geladeira até sua aplicação. Portanto, as pessoas participantes do estudo, bem como a pesquisadora e o estatístico, não tiveram conhecimento de qual substância estava sendo utilizada.

Com a finalidade de diminuir a probabilidade de dedução da substância que fora aplicada, os dois produtos foram subdivididos em duas partes semelhantes, totalizando quatro frascos, numerados de 1 a 4 (FIG. 9).



FIGURA 9- Frasco numerado contendo um dos produtos a ser aplicado e molde plástico de orifício de 9,0cm², correspondente à área de aplicação.

Fina camada (1,5mm de espessura) da solução tópica foi aplicada no antebraço esquerdo, na face anterior, a 3,0 cm da fossa cubital, em área correspondente a 9,0 cm², delimitada por molde plástico (FIG. 10).

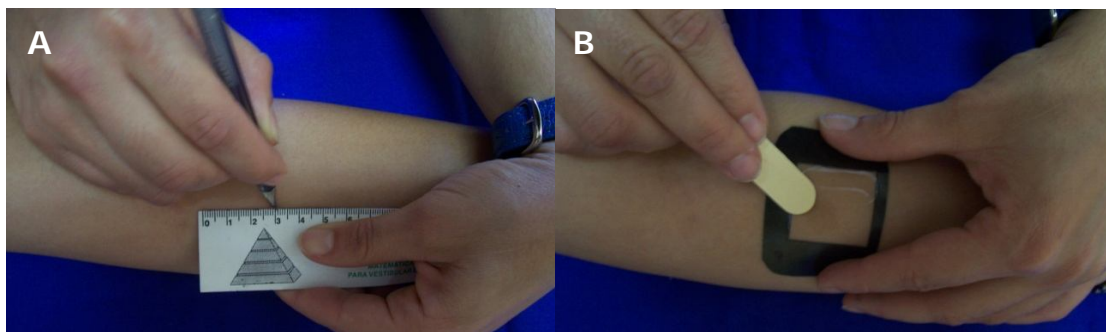


FIGURA 10- A: Mensuração da região a 3,0 cm da fossa cubital. B: Aplicação do produto em antebraço esquerdo.

O filme de poliuretano (Tegaderm[®]) foi, posteriormente, aplicado sobre o local para que o creme não fosse removido durante o banho, locomoção ou utilização de vestuário (FIG. 11).

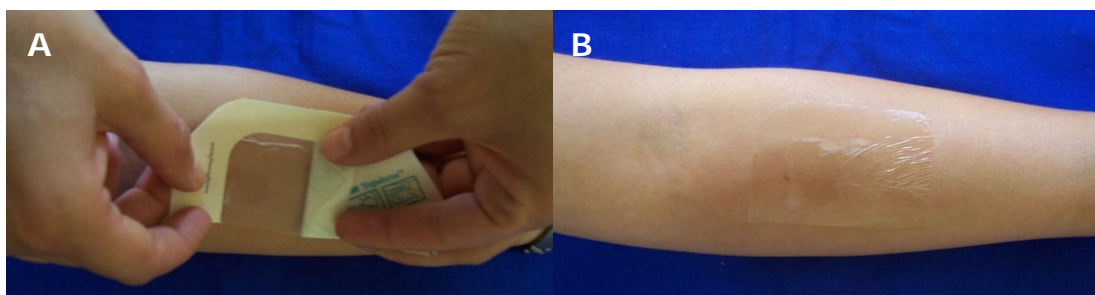


FIGURA 11- A: Proteção do local com filme de poliuretano. B: Aparência final.

As aplicações foram realizadas às segundas, quartas e sextas-feiras, no período da tarde, de 13 às 19 horas, na sala 401, ala sul, da Escola de Enfermagem da UFMG, no período de 1 mês (30 dias).

Os participantes foram orientados que, na possibilidade de ocorrência de reação inflamatória, alérgica ou lesão cutânea, a aplicação seria imediatamente interrompida, os dados seriam registrados e eles seriam encaminhados ao profissional médico participante do projeto.

A resposta considerada satisfatória foi a ausência de reações alérgicas ou inflamatórias ou de lesões cutâneas no local da aplicação.

- 3.6.7. Aspectos éticos

Iniciou-se a coleta de dados após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, cujo parecer nº ETIC 439/06 foi favorável (Anexo B), e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos participantes do estudo.

- 3.6.8. Análise estatística

Para a descrição das variáveis utilizou-se medidas de tendência central e dispersão (média, mediana e desvio padrão).

A homogeneidade das características básicas entre os grupos de intervenção (idade, sexo e variáveis laboratoriais) foi testada por meio de testes estatísticos paramétricos ou não paramétricos, conforme distribuição normal ou não da variável.

3.7. Avaliação clínica: Fase II – avaliação do efeito cicatrizante da fração em pessoas portadoras de úlceras

Nesta fase, o estudo foi realizado na cidade de Ciego de Ávila, Cuba, dentro dos moldes de um convênio entre o Ministério da Educação do Brasil, representado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e o Ministério da Educação Superior de Cuba (MES/Cuba).

O projeto visava desenvolver atividades de pesquisa em Cuba, relacionadas com as aplicações farmacológicas de cisteíno-proteinases de plantas, cujos coordenadores, Prof. Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e Profa. Dra. Martha de la Caridad Hernández de la Torre, da Universidad de Ciego de Ávila (UNICA) integram um grupo internacional de pesquisa sobre o tema.

No período de agosto a novembro de 2007, realizaram-se as seguintes atividades:

- Elaboração do protocolo de Ensaio Clínico Fase II: “Aplicación tópica de Bromelina o P1G10 en pacientes con úlcera por presión y úlcera venosa”, para aprovação do Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos (CENCEC), Havana – Cuba.
- Apresentação do projeto à diretoria e aos coordenadores de unidades clínicas e administrativas do Hospital Provincial Antonio Luaces Iraola, Ciego de Ávila – Cuba.
- Recrutamento dos pacientes portadores de feridas crônicas, de etiologia venosa ou por pressão, no hospital provincial e na comunidade, maiores de 18 anos, de ambos os sexos, para participação na pesquisa.
- Treinamento dos enfermeiros participantes da equipe de coleta de dados.
- Realização da coleta de dados: entrevista, coleta de material para exames complementares antes e após tratamento, exame físico do paciente e da ferida, registro fotográfico da ferida, escolha do tratamento, conforme sorteio prévio.
- Realização do tratamento, três vezes por semana, durante seis semanas consecutivas, amparado em resultados pilotos prévios. Os pacientes foram divididos em dois grupos de tratamento. O primeiro recebeu 0,1% de P1G10 em creme hidrossolúvel e o segundo recebeu creme de sulfadiazina de prata a 1,0%. Para comprovar a propriedade cicatrizante do princípio ativo testado, não foi agregado outro componente a formulação proposta pelo grupo. A evolução do processo de cicatrização das feridas foi documentada por registro fotográfico e preenchimento de formulário específico.

- Avaliação semanal dos pacientes durante o tratamento.

- 3.7.1. Tipo de estudo

Realizou-se ensaio clínico, randomizado, controlado, duplo-mascarado.

- 3.7.2. População

A população deste estudo foi composta por pessoas adultas, com idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os sexos, residentes na cidade Ciego de Ávila, capital da Província Ciego de Ávila, Cuba.

- 3.7.3. Amostra

A amostra foi composta por pessoas que atendessem aos seguintes critérios de inclusão:

1. Pacientes com idade \geq 18 anos.
2. Pacientes que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices E e F).
3. Pacientes portadores de úlcera venosa, atendidos no Ambulatório de Angiologia do Hospital Provincial Antonio Luaces Iraola ou no próprio domicílio que pertencesse à área de abrangência dos Policlínicos Centro e Norte.
4. Pacientes portadores de úlcera por pressão, de estágio II a IV, segundo a classificação de The National Pressure Ulcer Advisory Panel (NPUAP, 1989)

(Anexo C), atendidos no próprio domicílio que pertencesse à área de abrangência urbana dos Policlínicos Centro e Norte.

5. Pacientes cujo estado geral se apresentava:

- Hemoglobina $\geq 9,0$ g/dl
- Contagem Total de Leucócitos ≥ 3000 /mm³
- Contagem de Plaquetas ≥ 100000 /mm³
- Valores de bilirrubina total dentro dos limites normais considerados pela instituição.
- Valores de TGO/TGP $\leq 2,5$ vezes o limite superior do intervalo normal estabelecido pela instituição.
- Valores de creatinina dentro dos limites normais considerados pela instituição: 44 a 132 Umol/L.

6. Pacientes que não tinham sido submetidos a outras manipulações medicamentosas na área da lesão antes da inclusão.

Foram excluídos os:

1. Pacientes portadores de úlceras por pressão de estágio I, segundo a classificação do NPUAP (1989) (Anexo C); ou de úlceras neuropáticas.
2. Pacientes que estivessem recebendo outro produto em investigação.
3. Pacientes com história de alergia ou hipersensibilidade atribuída a compostos de composição química ou biológica semelhantes aos do produto utilizado neste estudo.

4. Pacientes portadores de doenças associadas não controladas, incluindo infecções ativas e por HIV.
5. Pacientes portadores de neoplasias ativas ou em remissão, bem, como aqueles que estivessem recebendo tratamento citostático, com imunossupressores ou radioterapia, ou ambos, nos últimos três meses.
6. Mulheres grávidas ou em período de amamentação.

No Policlínico Centro havia 210 casas cadastradas, nas quais 78 pessoas constavam em listagem de cuidados domiciliares especiais das trabalhadoras sociais. Destas, 22 não foram visitadas, pois sete eram menores de 18 anos e 15 viviam nos limites da cidade com a zona rural. Como as visitas eram realizadas a pé e, caso estas pessoas fossem incluídas no estudo, seriam tratadas três vezes por semana, a operacionalização do tratamento tornou-se inviável. Os 56 domicílios restantes foram percorridos, sendo que cinco pessoas não foram encontradas, seis haviam falecido, duas mudaram de cidade e uma foi transferida para o *Hogar de los Ancianos*.

No Policlínico Norte, havia uma equipe de enfermagem organizada, que dispunha da listagem específica de pacientes adultos portadores de úlceras. Do total de 13 pacientes, todos visitados, apenas um não foi encontrado.

Foram totalizadas 14 pessoas, que atendiam os critérios de inclusão, mas quatro evoluíram com piora clínica importante nos primeiros dias, vindo a falecer uma delas. Sendo assim, a amostra foi constituída por 10 pessoas, incluídas nas análises estatísticas planejadas para este estudo. O paciente que

abandonasse voluntariamente o ensaio seria contatado para obtenção de informação acerca da eficácia e segurança do produto aplicado.

- 3.7.4. Coleta de dados

Somente após a certificação de que o sujeito da pesquisa atendia aos critérios de inclusão e que consentia participar, a amostra foi dividida em quatro grupos, sendo dois de cada um, por alocação aleatória, de acordo com a opção de tratamento:

- a) aplicação de creme de sulfadiazina de prata a 1,0%.
- b) aplicação de creme contendo a fração P1G10 - 0,1%.

Foi realizada avaliação inicial para certificação de que a ferida estava isenta de quaisquer sinais de infecção, bem como para definição de sua etiologia.

Os pacientes pertencentes à amostra, a pesquisadora e a pessoa responsável pela análise estatística não tiveram conhecimento do tratamento utilizado. As opções de tratamento foram manipuladas e codificadas, semanalmente, no serviço, por pessoa que não tinha contato com os sujeitos pertencentes à amostra e armazenadas em geladeira até sua aplicação. A amostra de protease foi incorporada ao veículo (base hidrossolúvel), a partir da dissolução prévia da fração em água destilada. Os códigos somente foram revelados após a análise dos dados.

O esquema de tratamento era semelhante para os quatro grupos (1 a 4). Aplicava-se o creme três vezes por semana, até a confirmação visual da

existência de tecido de granulação em 100,0% da lesão, ou sua epitelização completa ou que completassem as seis semanas de tratamento. Aqueles pacientes em que nas quatro primeiras semanas obtivessem classificação como não-resposta, considerar-se-ia como fracasso terapêutico e passariam a ser tratados com a medicação convencional.

O tratamento se realizou, preferencialmente, no âmbito ambulatorial. Quando apresentada alguma restrição médica ou dificuldades de transporte do paciente, o mesmo foi avaliado e acompanhado no ambiente domiciliar.

- 3.7.5. Tratamento

Vias de administração, dose, frequência e duração

A composição dos cremes utilizados para tratamento está descrita nas tabelas que se seguem.

TABELA 2
Composição do creme contendo a fração P1G10.

Ingredientes	Quantidade por frasco	Função	Especificação
P1G10 (princípio ativo)	0,1 g	Desbridante e estimulante da cicatrização	Segundo o fabricante
Base hidrossolúvel:			
Polawax®	8,0%	Veículo	Segundo o fabricante
Vaselina líquida	6,0%		
Butilhidroxitolueno – BHT	0,05%		
Propilparabeno	0,1%		
Propilenoglicol	5,0%		
Metilparabeno	0,15%		
Etileno Diamino Tetracético – EDTA	0,1%		
Água destilada (veículo) – q.s.p.	100,0%		
Aminometilpropanol – AMP-95	0,03%		
Solução de Imidazolidinil uréia a 40,0%	0,3%		
Ciclometicone volátil	2,0%		

TABELA 3
Composição do creme contendo sulfadiazina de prata a 1,0%.

Ingredientes	Quantidade por frasco	Função	Especificação
Sulfadiazina de prata (princípio ativo)	1,0 g	Antimicrobiano	Segundo o fabricante

Procedimento para aplicação dos produtos

Uma vez terminada a aplicação do produto, o paciente foi mantido sob observação por meia hora. Transcorrido este tempo, caso o paciente não apresentasse qualquer reação, ele poderia se locomover.

Justificativa da dose

No presente estudo foram utilizadas dosagens semelhantes às avaliadas nos ensaios pré-clínicos e no ensaio clínico de fase I, cujas pessoas voluntárias não apresentaram reações adversas.

Modo e duração da aplicação

Para a limpeza das feridas, realizou-se irrigação do leito com solução fisiológica a 0,9%, sem esfregação ou emprego de soluções anti-sépticas, que podem inativar a protease. A limpeza tem por finalidade a remoção de debris que retardam o processo de cicatrização. A aplicação era por via tópica, de fina camada da formulação sobre o leito da ferida, recobrando toda a sua extensão. Em seguida, aplicava-se gaze dupla e fixava-se com esparadrapo e atadura de crepom, caso fosse necessário. Em pacientes com mais de uma ferida, todas elas receberam tratamento, mas somente uma foi alocada para o estudo.

Método de designação do tratamento

Uma lista aleatória dos pacientes foi criada, utilizando-se o programa Epi-Info, versão 6.0, a qual determinou qual tratamento cada paciente alocado receberia.

Para fins de diminuir a probabilidade de descoberta da substância aplicada, os dois produtos foram subdivididos em dois, totalizando quatro frascos, numerados de 1 a 4.

Tratamento concomitante

Era permitido qualquer tratamento concomitante, necessário ao bem-estar do paciente. A administração de tratamentos de suporte não se constituiu critério de interrupção do tratamento tópico e foi criteriosamente descrito no formulário de avaliação clínica do paciente (Apêndices G e H).

Medidas para comprovar o cumprimento do tratamento

O tratamento foi controlado a cada administração pelo pesquisador clínico, ou profissional designado por este, ficando sob sua responsabilidade o registro no modelo de cumprimento do tratamento de cada paciente (Apêndices I e J).

Causas de interrupção do tratamento

O tratamento poderia ser interrompido por:

- ⇒ Presença de tecido epitelial em 100,0% da extensão do leito da ferida.
- ⇒ Ao final de seis semanas.
- ⇒ Abandono voluntário do paciente.
- ⇒ Ocorrência de um evento adverso grave.
- ⇒ Extensão da área lesada 25,0% maior que a inicial.
- ⇒ Doença intercorrente que impedisse a aplicação subsequente do creme.
- ⇒ Ocorrência de qualquer critério de exclusão.
- ⇒ Atraso de mais de sete dias na aplicação do creme em relação à data planejada.

- ⇒ Alteração geral ou específica das condições do paciente que impedissem a aplicação subsequente do creme.
- ⇒ Mudança do paciente para outra Província, Departamento ou País.
- ⇒ Falecimento do paciente.

Os pacientes que interromperam o tratamento não fizeram parte do estudo e a interrupção foi registrada no formulário específico (Apêndice K).

Caso o paciente necessitasse de tratamento com outros medicamentos durante o período de tratamento, isso não constituiria causa para interrupção de tratamento ou sua saída do estudo.

Avaliação da eficácia

Considerou-se resposta satisfatória ao tratamento a epitelização da ferida ou a redução de sua área em 50,0%.

Os critérios para mensurar a resposta estavam de acordo com a porcentagem de tecido de granulação recobrimdo a ferida:

- Não-resposta: 0 a 25,0% da área total lesionada.
- Resposta mínima: > 25,0% e < 50,0% da área total lesionada.
- Resposta parcial: ≥ 50,0% e < 75,0% da área total lesionada.
- Resposta total: ≥ 75% da área total lesionada.

A quantidade de tecido de granulação presente no leito da úlcera foi avaliada semanalmente por meio de valores percentuais.

A evolução do processo de cicatrização das feridas foi documentada por registro fotográfico semanal e preenchimento de formulário específico (Apêndices G e H).

As imagens foram capturadas utilizando-se câmera digital Olympus®, modelo X-760, cuja resolução é de 6,0 mega *pixels*.

A captura de imagens das úlceras incluía padrão secundário comparativo de 5,1 x 15,0 cm e etiqueta contendo data, iniciais do nome do paciente, código e semana de tratamento.

- 3.7.6. Variáveis de controle:

- Idade
- Sexo
- Pressão arterial sistólica e diastólica
- Frequência cardíaca
- Temperatura corporal
- Peso e altura
- Tabagismo e etilismo
- Doença de base e associadas
- Número de feridas
- Etiologia da ferida
- Localização da ferida
- Comprimento e largura iniciais da ferida
- Necrose

Foram solicitados os seguintes exames laboratoriais, antes do início do tratamento e ao final do mesmo: hemograma, glicemia em jejum, albumina sérica, proteínas totais, TGO, TGP, fosfatase alcalina, ácido úrico, creatinina,

bilirrubina total, fósforo e cálcio. Exames dos parâmetros de tempos de coagulação, de protrombina e de tromboplastina; gama GT, uréia, cloro, sódio e potássio, além dos de urina foram propostos, mas não são realizados pelo laboratório de análises clínicas do Hospital Provincial.

O material para exame era coletado, identificado e analisado no laboratório de análises clínicas do Hospital Provincial Antonio Luaces de Iraola, pela farmacêutica responsável. Nos casos dos pacientes atendidos no domicílio, a farmacêutica ia até eles para realização da coleta.

Para mensuração das feridas, utilizou-se papel transparente estéril, onde foi desenhado, com caneta marcadora, o contorno da lesão, seguindo suas bordas. Mediram-se as maiores extensões na vertical e horizontal, cujas retas eram perpendiculares.

A profundidade da ferida foi mensurada, quando possível, semanalmente, utilizando-se espátula de madeira estéril no ponto mais profundo da úlcera e posterior comparação em régua.

A dor foi avaliada pela Escala Numérica de 1 a 10, sendo que 0 significa ausência de dor e 10 a pior dor imaginável.

Havia itens específicos à etiologia da ferida como, no caso de úlceras por pressão, pontuação na escala de risco de Braden, número, estadiamento e localização das úlceras, além de medidas preventivas utilizadas: uso de superfície preventiva, uso de óleo ou creme hidratante, manutenção da pele limpa e seca, reposicionamento, controle de incontinência e suporte ou suplementação nutricional.

Foi utilizada a escala de Braden que está amparada na fisiopatologia das úlceras por pressão e permite avaliação de aspectos importantes à formação da úlcera, segundo seis parâmetros ou sub-escalas: a *percepção sensorial* mede a capacidade individual de sentir e relatar o desconforto; a *umidade* mede o nível em que a pele está exposta à umidade; a *mobilidade* e a *atividade* avaliam frequência e duração da atividade, além de mudanças de posição; a *nutrição* reflete o padrão de ingestão alimentar da pessoa avaliada, bem como de suplementos líquidos; o parâmetro *fricção e cisalhamento* avalia a capacidade da pessoa de manter a pele livre do contato com o leito durante seu posicionamento ou movimentação (Amlung, Miller, Bosley, 2001; Rogenski, Santos, 2005).

Cada um desses parâmetros recebe uma pontuação, sendo que os menores valores indicam piores condições. A pontuação máxima desta escala é 23 e a mínima, 4; sendo as faixas de classificação de risco: 15 a 18, risco leve; 13 a 14, risco moderado; 10 a 12, alto risco; e abaixo de 9, elevado risco. Para pessoas acima de 60 anos de idade, considera-se em risco aquela que apresenta pontuação igual ou menor que 17 (Bergstron *et al.*, 1992; Ratliff, Bryant, 2003).

Utilizou-se para o estadiamento o esquema de classificação de quatro estágios, apresentada no ANEXO D, que se baseia na profundidade e nos tecidos acometidos (NPUAP, 1989). Esta classificação foi elaborada para ser aplicada às úlceras por pressão e passou por testes e validações (Pieper, 2000).

No caso de úlceras venosas, foram investigados: presença de edema em membros inferiores, utilizando-se prova de cacifo e medidas das circunferências

de tornozelos e panturrilhas; presença de hiperpigmentação, lipodermatoesclerose, utilização de creme hidratante e de terapia compressiva pelo paciente.

O edema foi avaliado pela prova de cacifo, como descrita no item 3.6.4, que consiste na pressão da área com firmeza, utilizando-se o dedo polegar, por 5 segundos, e posterior liberação. Registra-se o escore da escala de cruces de acordo com a profundidade da depressão provocada na pele, em milímetros: 2,0 mm = 1+, 4,0 mm = 2+, 6,0 mm = 3+ e 8,0 mm = 4+ (Seidel *et al.*, 1995).

O edema venoso costuma ser assimétrico, sendo comumente pior do lado esquerdo (França, Tavares, 2003). Sendo assim, outro método adotado para verificação do edema constituiu-se na mensuração da circunferência da panturrilha e do tornozelo com fita métrica, semanalmente. A fita foi posicionada na circunferência da panturrilha, a 5,0 cm da fossa poplíteia, e do tornozelo, a 3,0 cm do maléolo lateral, e verificou-se a medida do local.

A hiperpigmentação, ou dermatite ocre, é resultado do extravasamento de hemácias e fragmentos de eritrócitos para o espaço pericapilar, degradando-se em hemossiderina que dá coloração castanha à pele. Este sintoma foi observado no momento do exame físico à primeira avaliação, bem como a presença de lipodermatoesclerose, provocada pela substituição das estruturas da pele por fibrose, alterando sua textura e aparência (França, Tavares, 2003).

- 3.7.7. Instrumento de coleta de dados

O instrumento de coleta de dados (Apêndices G e H), do tipo formulário, foi elaborado para investigar, resumidamente, a história clínica do paciente, bem como caracterizar a ferida. Contém questões fechadas e abertas referentes às informações da pessoa e do seu perfil sócio-econômico, do seu tratamento antes e após ingressar no estudo, da avaliação da ferida e do registro fotográfico da mesma.

- 3.7.8. Aspectos éticos

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Avaliação de Conduas Médicas (CECMED), em Havana, Cuba. Todos os pacientes foram informados sobre os objetivos da pesquisa e sua forma de participação, para que então pudessem assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices E e F).

Este protocolo foi desenhado e executado segundo os princípios éticos em pesquisas com seres humanos, estabelecidos pela Declaração de Helsinki, na WMA General Assembly, Edimburgo, Escócia, em outubro de 2000.

- 3.7.9. Análise estatística

Para descrição das variáveis, utilizaram-se medidas de tendência central e dispersão (média, mediana e desvio padrão).

A homogeneidade da alocação aleatória das características básicas entre os grupos de intervenção (idade, sexo, tempo de doença, gravidade do quadro

clínico e variáveis laboratoriais) foi testada por meio de testes estatísticos paramétricos (ANOVA) ou não paramétricos (Kuskall Wallis), dependendo da distribuição normal ou não da variável.

3.8. Criação do programa para análise de imagem digital

Buscando criar um instrumento objetivo e específico de avaliação da área das feridas, foi criado um *software* em colaboração com pesquisadores dos Departamentos de Engenharia Mecânica e Engenharia de Minas da UFMG.

Foram planejadas as etapas de criação de um padrão secundário, para substituir régua e outros objetos de comparação de medida; sua calibração; validação do *software* em modelo de papel; validação em modelo animal e, posteriormente, sua aplicação clínica.

Os resultados das medições realizadas com esse *software* foram avaliadas em termos de reprodutibilidade intra e inter-operador, ou seja, a habilidade de um operador obter o mesmo resultado em ocasiões diferentes para o mesmo teste e em relação a outro operador.

A precisão das medidas foi avaliada por meio de comparações com aquelas realizadas utilizando outro *software* disponível comercialmente no mercado, o KS-300® (Kontrom Elektronik, Germany), versão 2.0. Este apresenta atualmente restrições em relação a sua compatibilidade em diversas plataformas computacionais o que limita seu uso.

- 3.8.1. Teste de reprodutibilidade

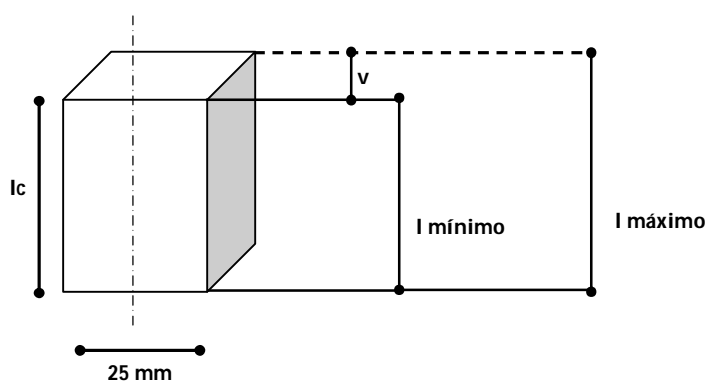
Para este teste utilizou-se uma figura retangular e outra oval, que simulavam tamanhos de feridas reais. Três operadores capturaram 11 imagens distintas de cada figura, das quais obtiveram-se as medidas de áreas e perímetros de cada figura.

- 3.8.2. Calibração do padrão secundário (Almeida, 2006)

Calibração é o conjunto de operações, que estabelece a correspondência entre o estímulo e a resposta de um instrumento de medir, em condições específicas. Ela permite que se determine um ou mais parâmetros da curva característica que relaciona o estímulo aos valores das grandezas correspondentes às divisões indefinidas de um instrumento de medir (INMETRO, 1988).

Realizou-se a calibração entre o padrão internacional primário e o padrão secundário, confeccionado para servir de referência de grandeza ao lado dos modelos ou das feridas cujas imagens seriam capturadas. Por acordo, o padrão internacional é reconhecido, internacionalmente, como base no estabelecimento dos valores de todos os demais padrões de grandeza a que se refere (INMETRO, 1988).

Utilizou-se um bloco padrão internacional, de cerâmica (ZrO_2), de 25,0 mm, cuja representação e especificações se seguem.

**Legenda:**

l_c = comprimento central

$l_{\text{máximo}}$ = comprimento máximo

l_n = comprimento nominal = 25 mm

desvio mínimo \rightarrow $d_{\text{mínimo}} = l_{\text{mínimo}} - l_n$

d_c = desvio central $\Rightarrow d_c = l_c - l_n$

$l_{\text{mínimo}}$ = comprimento mínimo

desvio máximo = $l_{\text{máximo}} - l_n$

v = variação = $l_{\text{máximo}} - l_{\text{mínimo}}$

FIGURA 12- Representação esquemática do bloco padrão de 25,0 mm.

TABELA 4

Especificações do bloco padrão de cerâmica.

Parâmetros	Especificações
Marca	Mitutoyo
Número do certificado	S1100642
Data de inspeção	12 de setembro de 2001
Código (número)	516-157-10
Tipo	BM3-10M-1/D
Número de série	0108123
Meio ambiente (temperatura)	$20,0 \pm 1,0$ °C
Grau de dureza (JIS)	1
Incerteza expandida (μm)	$0,10 + 1,0L^*/1000$
Medida da altura do bloco (mm)	25,0
Número de identificação	011065
Desvio central (μm)	+ 0,10 d_c
Máximo desvio (μm)	+ 0,12
Mínimo desvio (μm)	+ 0,07
Variância (μm)	0,05

(*) L = largura nominal (mm)

O padrão secundário foi confeccionado especificamente para este estudo, utilizando chapa metálica, cujas medidas aproximadas são 5,0 x 15,0 cm; forrado com vinil aderente preto, fosco (FIG. 13). Este padrão era posicionado ao lado das figuras de calibração ou das feridas em todas as imagens a serem capturadas.



FIGURA 13- Padrão secundário.

Previamente à calibração, faz-se necessária a estimativa da área de um *pixel*. O *pixel* é a unidade da imagem digital, é quadrado e alinhado lado a lado compõe uma grade digital, denominada *bitmap* (Amber Engineering, 1996). O procedimento de estimar sua área é realizado mediante o uso de um padrão primário, cuja grandeza é conhecida. Posteriormente, realiza-se a calibração do padrão secundário tendo como referência o padrão primário.

Sendo assim, imagens do bloco padrão ao lado do padrão secundário (FIG. 14) foram adquiridas por três operadores diferentes, sob a mesma incidência de luz, utilizando a câmera Sony Cyber-shot®, modelo DSC – P73, cuja resolução é de 4,1 mega *pixels*. A distância entre a lente e os padrões era de 20,0 cm.



FIGURA 14- A: Padrão primário e B: padrão secundário.

Para o tratamento das imagens, nesta etapa do estudo, utilizou-se o programa Image-Pro Plus® (Media Cybernetics), versão 3.0, que transforma a imagem para escala de cinza com 8 bits, expressando a figura com 256 níveis de intensidade (0 – 255). Em seguida, a imagem é binarizada e passa a ter apenas duas intensidades (preto e branco). Realizada a binarização, utilizou-se a função de medição *Line Profile*. Essa função permite o uso de uma linha na qual são indicados os pontos para medir a distância. As extremidades da linha passam sobre os pontos de referência, que são os limites do bloco, o que permite observar o *pixel* de transição (branco/preto) da referência. Juntamente com a linha, são produzidos um gráfico e uma tabela, nos quais a quantidade de *pixels* existente, entre os pontos de referência do bloco indicados pela linha, é demonstrado. Com os dados registrados na tabela gerada pela função *Line Profile*, obtém o número de *pixels* referentes ao comprimento do bloco padrão (FIG. 15).

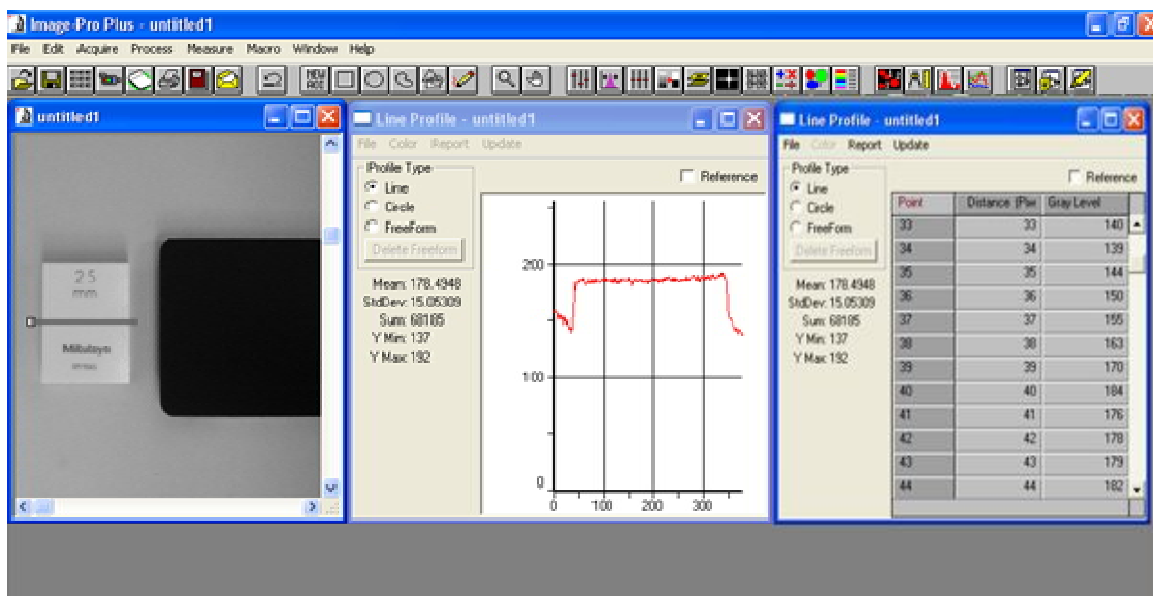


FIGURA 15- Função *Line Profile* do programa Image-Pro Plus®.

Para verificação do número de *pixels* na faixa de operação, foi realizado um corte do bloco padrão (FIG. 15). Assim, dividiu-se o valor da largura do bloco (25,0 mm) pelo número de *pixels* de cada corte.

Posteriormente, procedimento semelhante foi realizado com a imagem do padrão secundário. Uma vez que a área do *pixel* era conhecida, fazia-se necessário conhecer a quantidade de *pixels* que compunha a largura da imagem do padrão secundário. Sendo assim, essa imagem foi tratada, conforme já descrito. Multiplicou-se o número de *pixels* encontrado em cada medida pelo comprimento encontrado para 1 *pixel*.

A calibração da imagem, para quantificação da dimensão do *pixel*, foi realizada no Laboratório de Metrologia, do Departamento de Engenharia Mecânica, Escola de Engenharia, UFMG.

- 3.8.3. Validação do *software* em modelo

As figuras que simulam feridas foram desenhadas em papel *vergé*. Duas figuras foram criadas, de formatos diferentes, simulando dois tipos de feridas (FIG. 16):

1. retangular, cuja largura media 2,5 cm e a altura, 1,0 cm;
2. oval, com certa anfractuosidade.

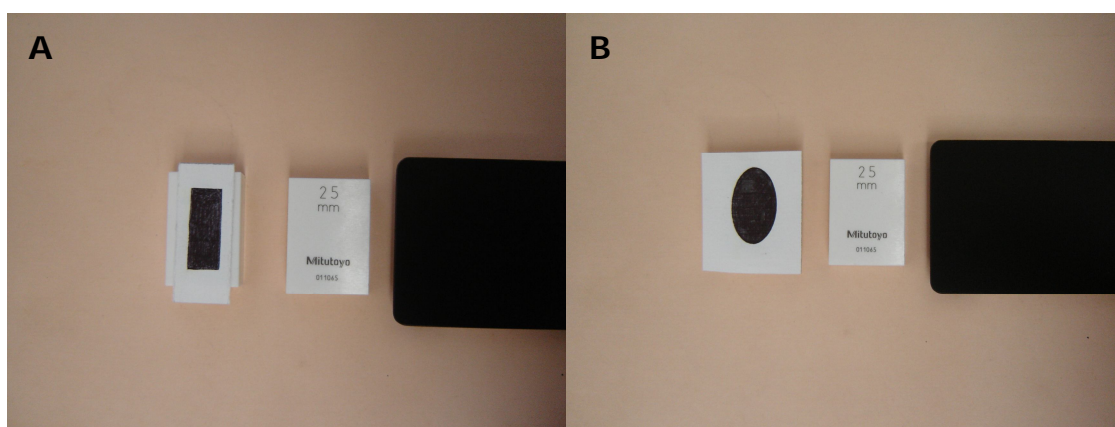


FIGURA 16- Representação de feridas em papel. A: retangular e B: oval.

As imagens, depois de adquiridas, foram transferidas e armazenadas em um microcomputador. O processo de cálculo da área e do perímetro foi obtido a partir da medida do padrão secundário, utilizando-se para tal o novo programa *Biometrics* (seção 3.8.4).

Também procedeu-se o processo de medida das mesmas áreas e perímetros com o programa *KS-300*[®], versão 2.0, desenvolvido pela Kontron Elektronik, Alemanha, utilizando-o como padrão-ouro. Para utilizá-lo, inserem-se na galeria (*Gallery*) do *KS-300*[®] as imagens a serem processadas. Em seguida,

cria-se um filtro de calibração, disponível no *menu Calib geom*, informando a altura e a largura do padrão e definem-se os parâmetros a serem mensurados – área (*Filled area*) e perímetro (*Filled perimeter*). Utilizando a função *Measure – Interactive*, delimitam-se as bordas da área a ser analisada com a ajuda do *mouse*. Em uma tabela são apresentados os valores determinados para a área e para o perímetro.

- 3.8.4. Programa **Biometrics**

Foi desenvolvido um programa com a linguagem de programação C++, que utiliza técnicas de análise digital de imagens, com a finalidade de avaliar e quantificar áreas específicas presentes numa imagem digital. No caso, as imagens analisadas são digitais tomadas de lesões cutâneas. O resultado final determina a área da lesão e, também, o perímetro equivalente. O programa **Biometrics** armazena imagens digitais em arquivos, converte essas imagens coloridas obtidas em um dos vários formatos de compressão (JPG, TIFF e GIFF) em sua correspondente na escala de cinza (BMP).

A seqüência de operações com os *menus* que o programa *Biometrics* realiza é apresentada na FIG. 17 e detalhada a seguir.

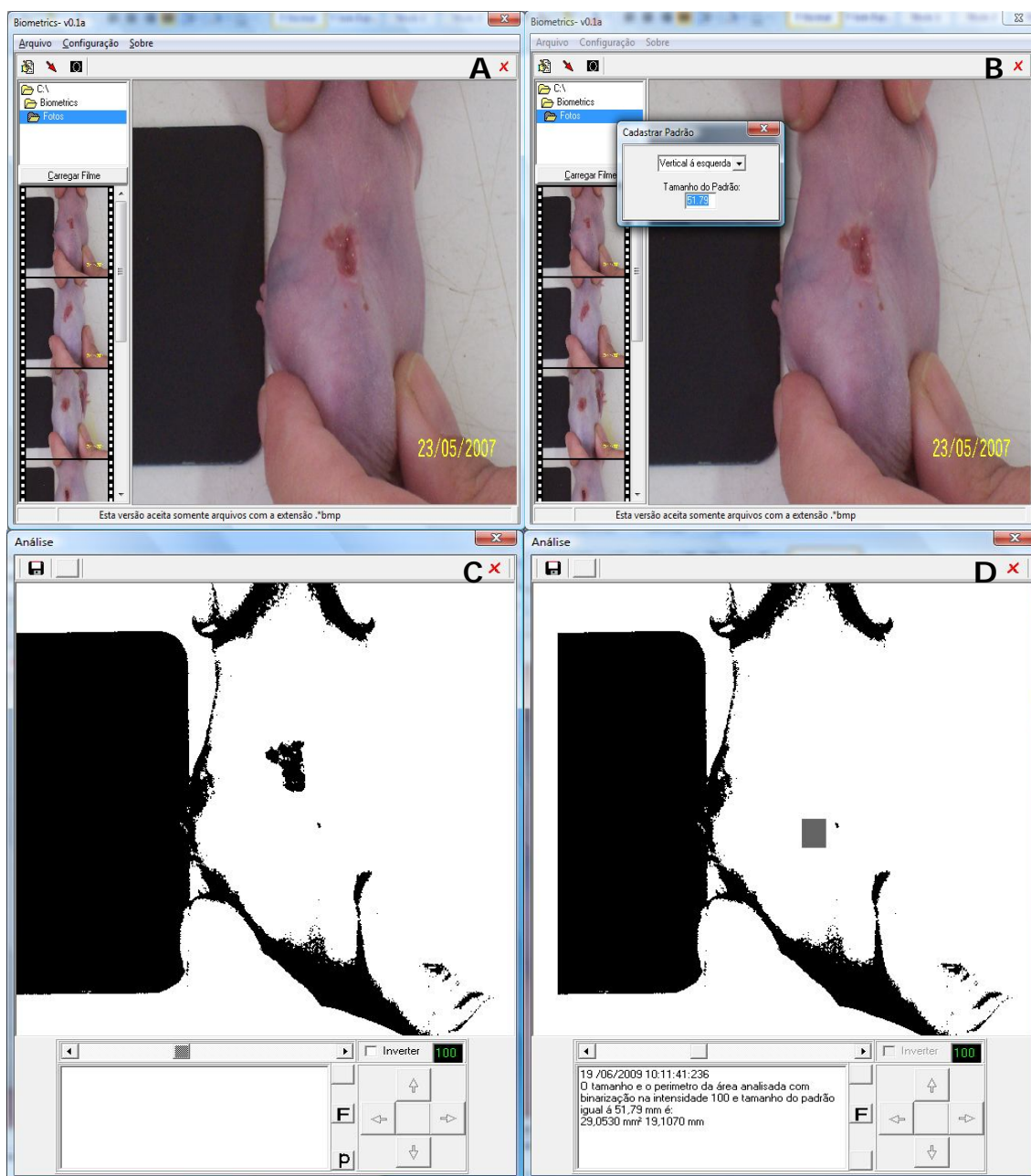


FIGURA 17- Determinação da área de uma lesão utilizando o *Biometrics*: A: seleção de imagens a serem analisadas; B: cadastro do padrão de análise (padrão secundário); C: imagem binarizada utilizando o limiar adequado; D: resultado informando a área e o perímetro da área de estudo.

A FIG. 17A apresenta o *menu* principal do *Biometrics* onde se pode observar, no seu lado esquerdo, as imagens a serem analisadas que estão

armazenadas na pasta de trabalho. Uma vez selecionada a imagem, o programa (FIG. 17B) apresenta a tela de cadastro do padrão de comparação, para que seja possível determinar a área e o perímetro da lesão com precisão. A FIG. 17C apresenta a tela que permite selecionar o valor do limiar utilizado para a binarização da imagem. O limiar é o valor preestabelecido na escala de cinza (0-255), que permite evidenciar a área objeto da análise. Na FIG. 17D é apresentado o resultado final da análise da lesão, mostrando, no seu quadro inferior, os resultados do valor determinado para a área da lesão, em mm², e do perímetro equivalente, em mm.

Após a etapa de calibração do programa, realizou-se, então, a análise das queimaduras confeccionadas no dorso dos camundongos (seção 3.5).

- 3.8.5. Análise estatística

Os cálculos das médias e desvios padrões foram calculados utilizando o programa SPSS, versão 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). A reprodutibilidade foi avaliada utilizando o coeficiente de variação, considerando-se um limite aceitável de 25,0%, ou seja, o desvio padrão no máximo 25,0% da média. Para verificar se as distribuições de valores de perímetro e área, calculados com os programas acima descritos, tinham distribuição normal foram usados os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Para a comparação de médias ou medianas foram usados o teste *t*-Student ou Wilcoxon, para distribuições normais e não normais, respectivamente.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Fase pré-clínica

A fração P1G10 utilizada nestes experimentos foi obtida após filtração cromatográfica do látex liofilizado em coluna Sephadex G10, conforme descrito na seção 3.1. A partir do perfil protéico (absorbância 280 nm), observou-se a separação em dois picos bem definidos P1G10 e P2G10. As frações 7 a 14 correspondem à P1G10 e 13 a 20 à P2G10 (GRAF. 1).

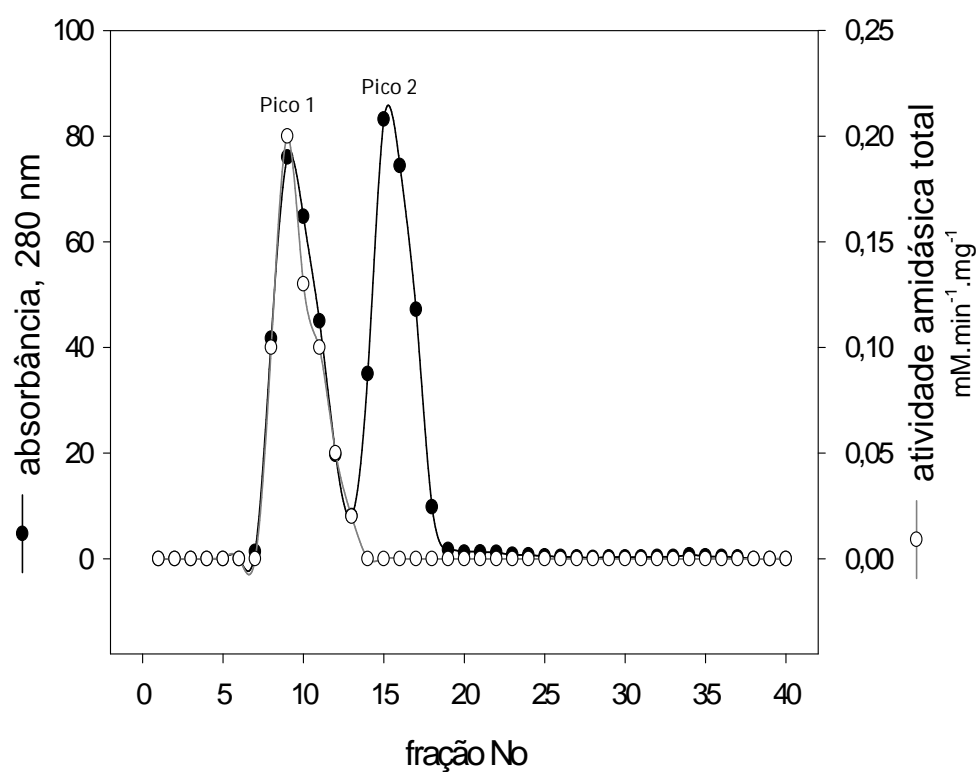


GRÁFICO 1- Perfil cromatográfico da solução de látex de *Carica candamarcensis* após filtração em coluna Sephadex G10. O perfil protéico (absorbância 280 nm) e a atividade amidásica total foram determinados conforme descrito nas seções 3.2 e 3.3. O volume por fração coletada foi de 5,0 ml, e o fluxo de 0,25 ml/min, com gradiente isocrático de acetato de sódio 1,0 M.

Conforme descrito no capítulo anterior, as frações que compõem o pico P1G10 foram reunidas e submetidas à concentração por ultrafiltração com membrana 4 M 10 e liofilização. De 15,0 g de látex aplicados na coluna, foram obtidos 4,23 g de P1G10, cujo rendimento foi de 28,0%. A atividade amidásica foi de $13,5 \pm 0,5 \text{ nM}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ e a concentração de proteína de $8,39 \pm 0,39 \text{ mg/ml}$.

Estes resultados evidenciam a constância dos parâmetros de atividade enzimática e concentração protéica da fração P1G10.

Com o intuito de caracterizar a composição protéica da fração P1G10, realizou-se eletroforese em condições desnaturantes. A análise do gel (FIG. 18) evidenciou perfil protéico reproduzível a partir de várias preparações testadas. Constatou-se que o grupo mais abundante de proteínas continha massa relativa aproximada de 23,0 a 28,0 kDa, concordando com resultados prévios realizados no nosso laboratório (Gomes *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2008).

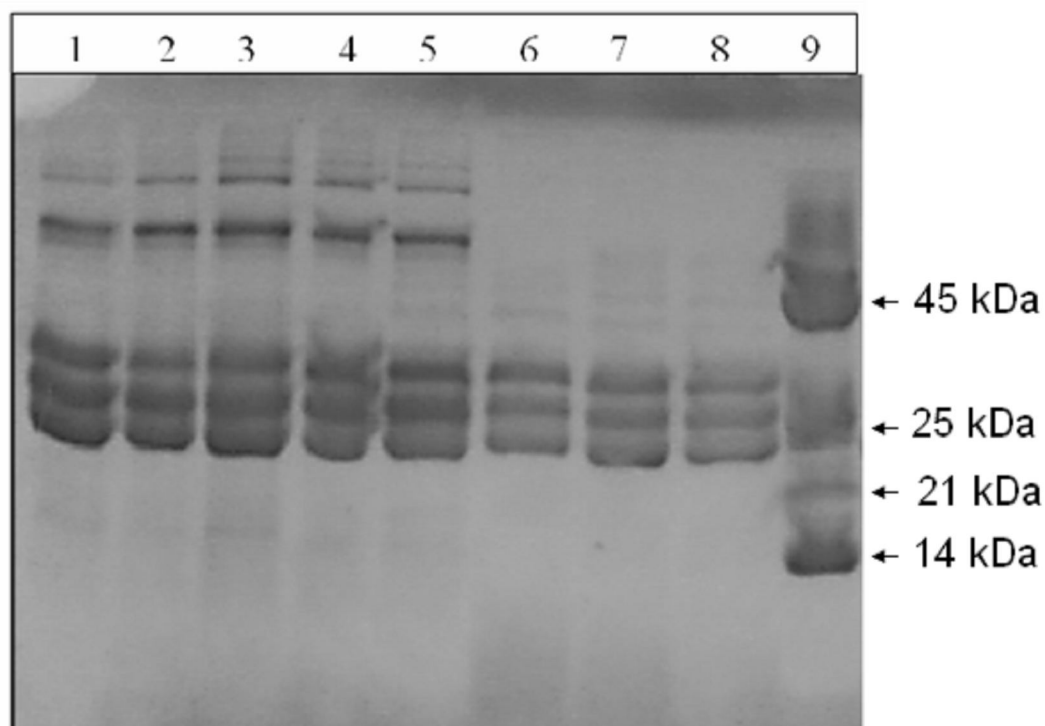


FIGURA 18- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,0% em condições desnaturantes de diferentes estoques de P1G10. Amostras de proteínas desnaturadas por aquecimento (30,0 μ g) foram aplicadas em cada canaleta. Canaletas 1-5, P1G10 de diferentes lotes; canaletas 6-8: látex de *Carica candamarcensis* a partir de três diferentes lotes; canaleta 9, padrões de massa molecular conhecida (lisozima, inibidor de tripsina, quimiotripsinogênio e ovalbumina).

Pôde-se perceber no perfil das amostras de P1G10 a presença de pelo menos 5 bandas, sendo as mais intensas detectadas entre 23,0 a 30,0 kDa. Entretanto, existem bandas menos intensas acima de 45,0 kDa, que evidenciam a presença de outras proteínas de maior tamanho, semelhantes a dímeros.

A composição protéica da fração P1G10 também foi confirmada por cromatografia de fase reversa em HPLC. Pode-se observar no gráfico que se

segue, que o perfil é composto por três picos protéicos maiores eluídos com o gradiente não linear de acetonitrila.

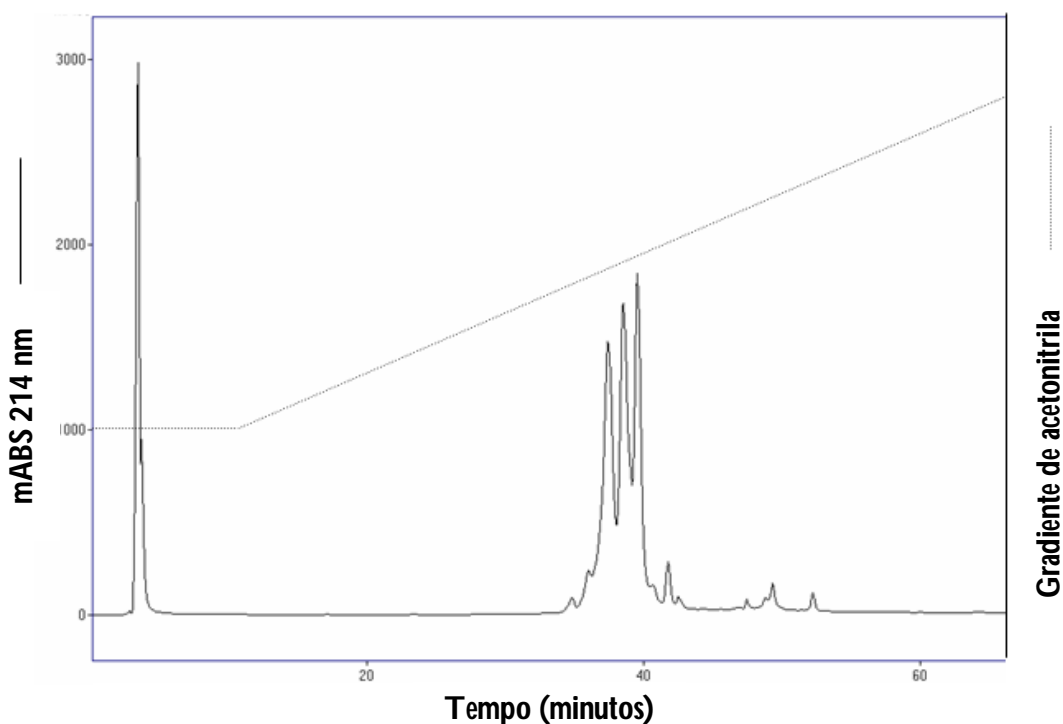


GRÁFICO 2- Cromatografia de fase reversa da fração P1G10 em HPLC. A coluna C4 (Vydac) foi equilibrada com 27,0% de acetonitrila TFA a 0,1% antes da aplicação de 1,0 mg de P1G10 dissolvido em água mili-Q, seguida de eluição com o gradiente não linear de acetonitrila TFA a 0,1%.

4.2. Fase clínica utilizando o camundongo como modelo experimental

Tendo demonstrado a constância das preparações de P1G10, em julho de 2007, foi desenvolvido um experimento para avaliar a evolução da cicatrização de queimaduras produzidas em modelos animais por escaldadura tratadas com a fração P1G10. Três grupos de animais foram tratados com P1G10 nas

concentrações de 0,01, 0,1 e 1,0%, o quarto grupo com papaína - 0,2%, o quinto grupo com sulfadiazina de prata - 1,0% e o sexto grupo com apenas o veículo (controle).

O experimento foi realizado com 67 animais, sendo 34 fêmeas e 33 machos, cujo peso médio era de 26,97 g e idade que variou de 8 a 9 semanas (56 a 63 dias).

Os perfis de epitelização evidenciaram aumento da epitelização no período de 21 a 24 dias de tratamento. No período de 27 a 31 dias de tratamento, o ritmo crescente de epitelizações diminuiu e a partir daí não há diferenças entre os grupos.

O GRAF. 3 mostra as curvas de epitelização durante o período observado com os seis tratamentos. Enquanto os demais grupos aparecem com perfil semelhante, o tratado com P1G10 - 0,1% exibe taxas de epitelização mais elevadas no período de 23 a 27 dias de tratamento ($p \leq 0,05$). Esta diferença desaparece a partir do 31º dia, quando todos os grupos chegam a um patamar similar ($p > 0,05$).

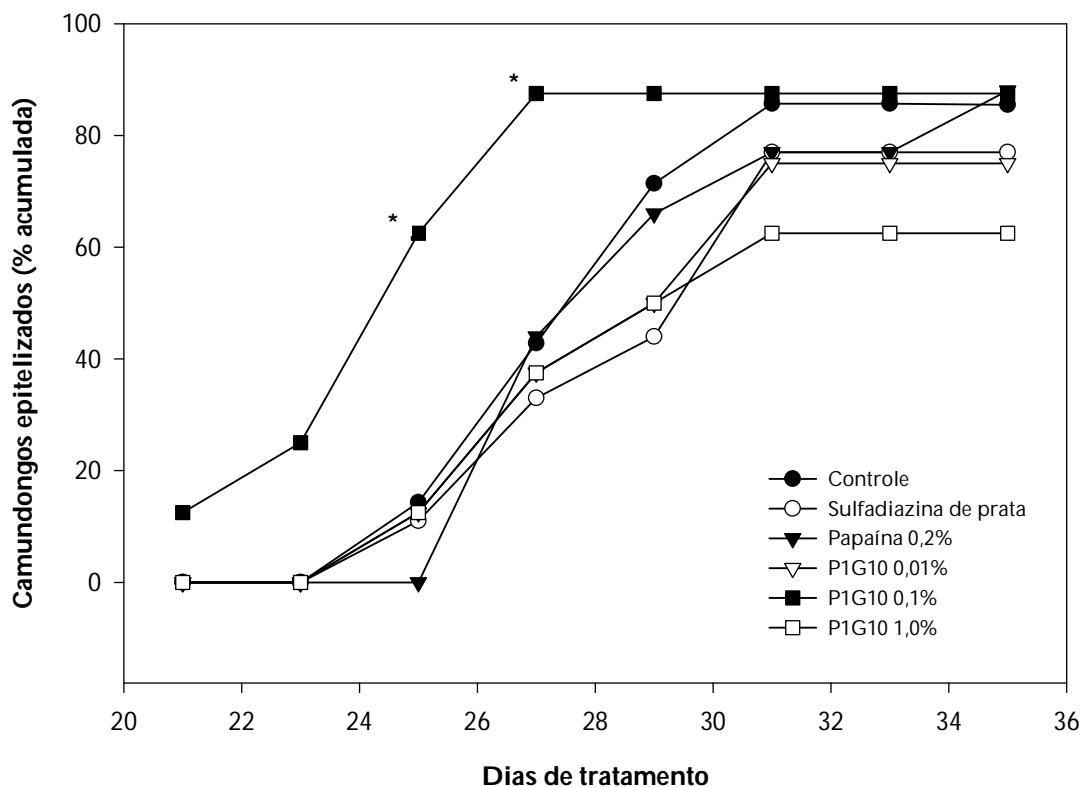


GRÁFICO 3- Curvas de epitelação das queimaduras em camundongos segundo seis tratamentos diferentes (n = 59 animais).

Considerando o total de animais utilizados para este experimento (n = 59), o maior percentual de epitelações (46,93%) ocorreu até o 27º dia de tratamento. As curvas de epitelação dos grupos P1G10 - 0,01% e 1,0%, papaína e sulfadiazina de prata foram semelhantes à do controle (base hidrossolúvel), mostrando que as epitelações nestes grupos iniciaram mais tardiamente que no grupo tratado com P1G10 - 0,1%. Dos 67 animais totais, 10 não epitelizaram após 35 dias de tratamento (14,9%) e 8 morreram no decorrer do experimento (11,9%).

Para confirmar essas observações, outro experimento foi realizado em abril de 2008, utilizando-se mascaramento e apenas dois grupos receberam tratamento com P1G10 nas concentrações de 0,01% e 0,1%, além do grupo controle.

O peso basal médio dos 33 animais alocados foi de 31,19 g e não houve variações estatisticamente significativas de peso entre os três grupos ($p > 0,05$). Após uma semana de iniciado o protocolo, os animais dos diferentes grupos perderam quantidade equivalente de massa, sendo que o peso médio dos grupos foi de 28,09 g ($p = 0,7858$).

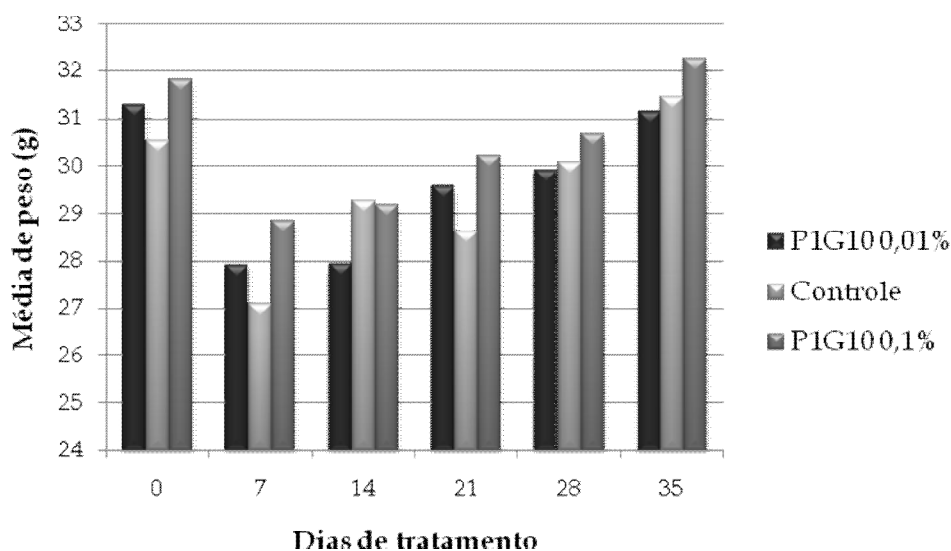


GRÁFICO 4- Peso médio (g) dos camundongos de acordo com o tempo de tratamento das queimaduras cutâneas.

A partir da segunda semana após a realização da queimadura, os animais foram recuperando seu peso gradativamente até atingirem o peso basal ao final do experimento. A média do peso de todos os animais aos 14 dias foi 28,52 g ($p = 3,8029$), aos 21 dias foi 29,48 g ($p = 3,6767$), aos 28 dias foi 30,19 g ($p = 3,3837$) e aos 35 dias foi 31,60 g ($p = 3,6279$).

Após a divulgação dos códigos das formulações utilizadas no tratamento, pôde-se observar que o evento da epitelização iniciou-se a partir do 22º dia, ocorrendo este com maior frequência nos animais tratados com P1G10 - 0,01%, se comparados aos grupos tratados com P1G10 - 0,1% e com controle (base hidrossolúvel). Porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Até o 26º dia de tratamento, as curvas de epitelização dos grupos controle e P1G10 - 0,1% foram semelhantes, de acordo com o GRAF. 5.

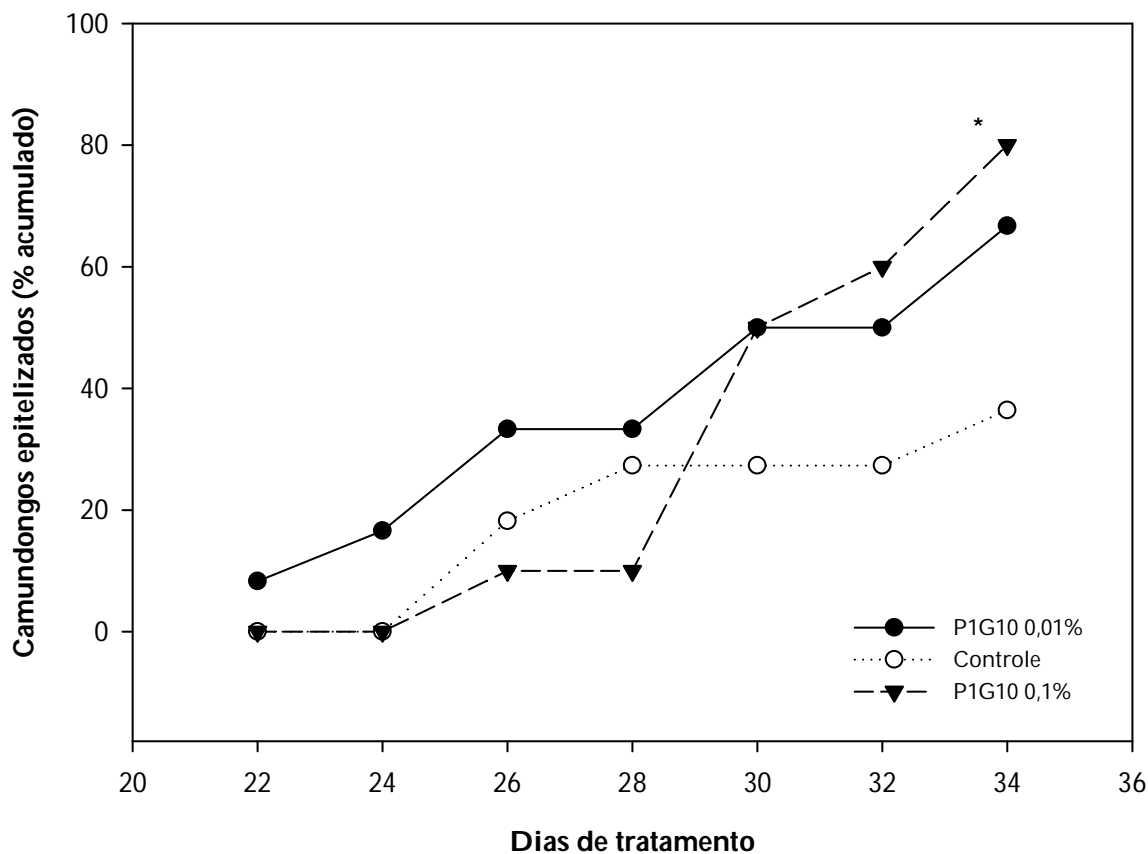


GRÁFICO 5- Curvas de epitelação das queimaduras em camundongos segundo três tratamentos diferentes.

Antes do 30º dia de tratamento, os animais que receberam P1G10 - 0,01% mostraram taxa de epitelação superior quando comparados aos animais dos grupos controle e P1G10 - 0,1%. Porém, as curvas dos dois grupos tratados com a fração P1G10 se igualaram no 30º dia, e a partir deste momento, ocorreu maior taxa de epitelação (80,0%) no grupo tratado com P1G10 - 0,1%. No 34º dia, observou-se maior porcentagem de epitelação no grupo P1G10 - 0,1%, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado

ao grupo controle e não significativa ($p > 0,05$) quando comparado ao grupo P1G10 - 0,01%.

Até o final do experimento, vinte (60,6%) dos 33 animais encontravam-se com feridas epitelizadas. Conforme a TAB. 5, destes, 80,0% foram tratados com P1G10 - 0,1%; 66,7% com P1G10 - 0,01% e 36,4% com creme hidrossolúvel ($p = 0,107$). Do total de 35 animais, apenas 2 (5,7%) morreram no decorrer do processo.

TABELA 5

Freqüências absoluta e acumulada de epitelização de queimaduras de camundongos *Hairless*, segundo três tratamentos diferentes.

Dias de tratamento	P1G10 0,01% (n=12)		Controle (n=11)		P1G10 0,1% (n=10)		TOTAL (n=33)	
	%	% acumulada	%	% acumulada	%	% acumulada	%	% acumulada
22	8,3	8,3	0	0	0	0	3,0	3,0
24	8,3	16,6	0	0	0	0	3,0	6,0
26	16,7	33,3	18,2	18,2	10,0	10,0	15,0	21,0
28	0	33,3	9,1	27,3	0	10,0	3,0	24,0
30	16,7	50,0	0	27,3	40,0	50,0	18,0	42,0
32	0	50,0	0	27,3	10,0	60,0	3,0	45,0
34	16,7	66,7	9,1	36,4	20,0	80,0	15,0	60,0
Não epitelizados	33,3	100,0	63,6	100,0	20,0	100,0	40,0	100,0

Ao término do experimento, das 13 feridas que não epitelizaram (40,4%) sete delas pertenciam ao grupo controle, sendo que todas elas apresentavam-se puntiformes ou filiformes, ou seja, apresentavam área cruenta mínima. Esta área foi avaliada macroscopicamente quanto à característica e porcentagem de necrose presente em seu leito, fator este considerado prejudicial ao processo de

cicatrização. Observou-se presença de necrose em apenas três animais (9,1%), sendo um deles pertencente ao grupo P1G10 - 0,1% e os outros dois ao grupo controle, como pode ser visto na TAB. 6. Sendo assim, dois terços das feridas que apresentavam qualquer tipo de necrose foram do grupo controle. As feridas dos outros 10 animais apresentavam-se totalmente recobertas por tecido de granulação, vermelho.

TABELA 6

Aparência do tecido das queimaduras que não epitelizaram, segundo o tratamento.

Tratamento	Granulação	Necrose	Total	
	n	n	n	%
P1G10 0,01% (n=12)	4	0	4	33,3
Controle (n=11)	5	2	7	63,6
P1G10 0,1% (n=10)	1	1	2	20,0

Quando o leito da ferida apresentava necrose, esta recobria toda a sua extensão, considerada em 100,0%. Aquelas feridas que não apresentavam necrose eram totalmente recobertas por tecido de granulação.

Quanto ao fenômeno de contração das feridas, este foi dividido em dois períodos: de 15 a 24 e de 25 a 34 dias de tratamento, uma vez que nestes intervalos houve contração das feridas observada nos três grupos. A contração foi mais freqüente nos animais tratados com P1G10 - 0,01%, que atingiu 91,7% no período de 21 a 24 dias, em comparação aos animais dos outros grupos (GRAF. 6), porém sem diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2 = 3,44$; $p =$

0,179). Pode-se afirmar que existe tendência à contração iniciar-se mais cedo no grupo tratado com P1G10 - 0,01%.

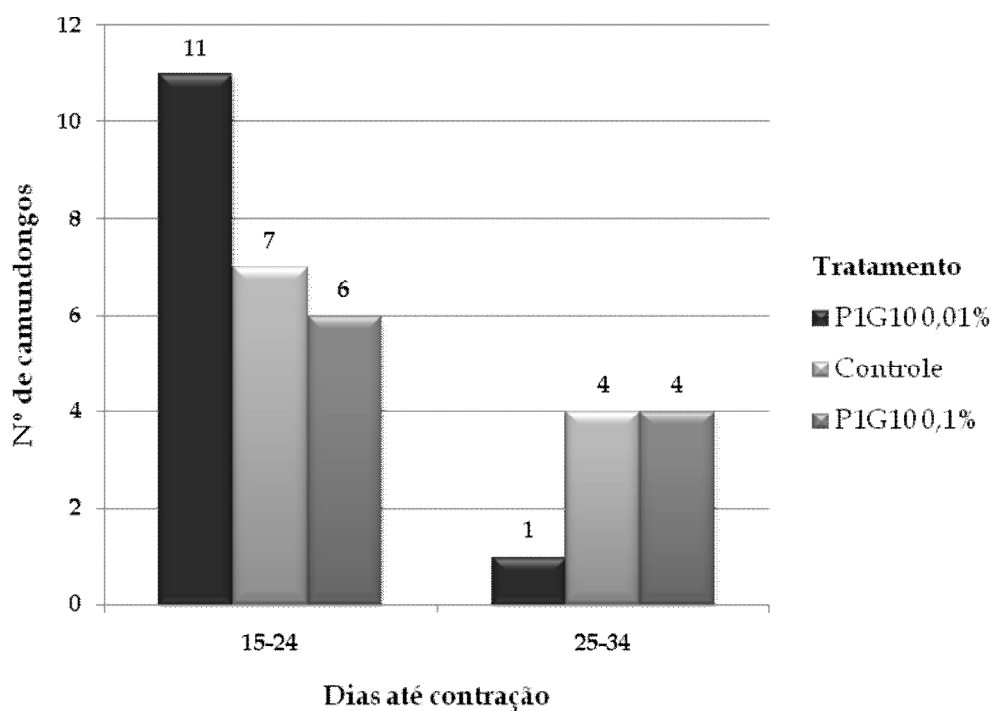


GRÁFICO 6- Frequência de camundongos que obtiveram contração da queimadura segundo tempo. Qui-quadrado = 3,44 $p = 0,179$

Como a maioria dos animais do grupo tratado com P1G10 - 0,01% (92,0%) obteve a contração no período de 15 a 24 dias de tratamento, no período seguinte em apenas um animal (8,0%) foi observado tal fenômeno.

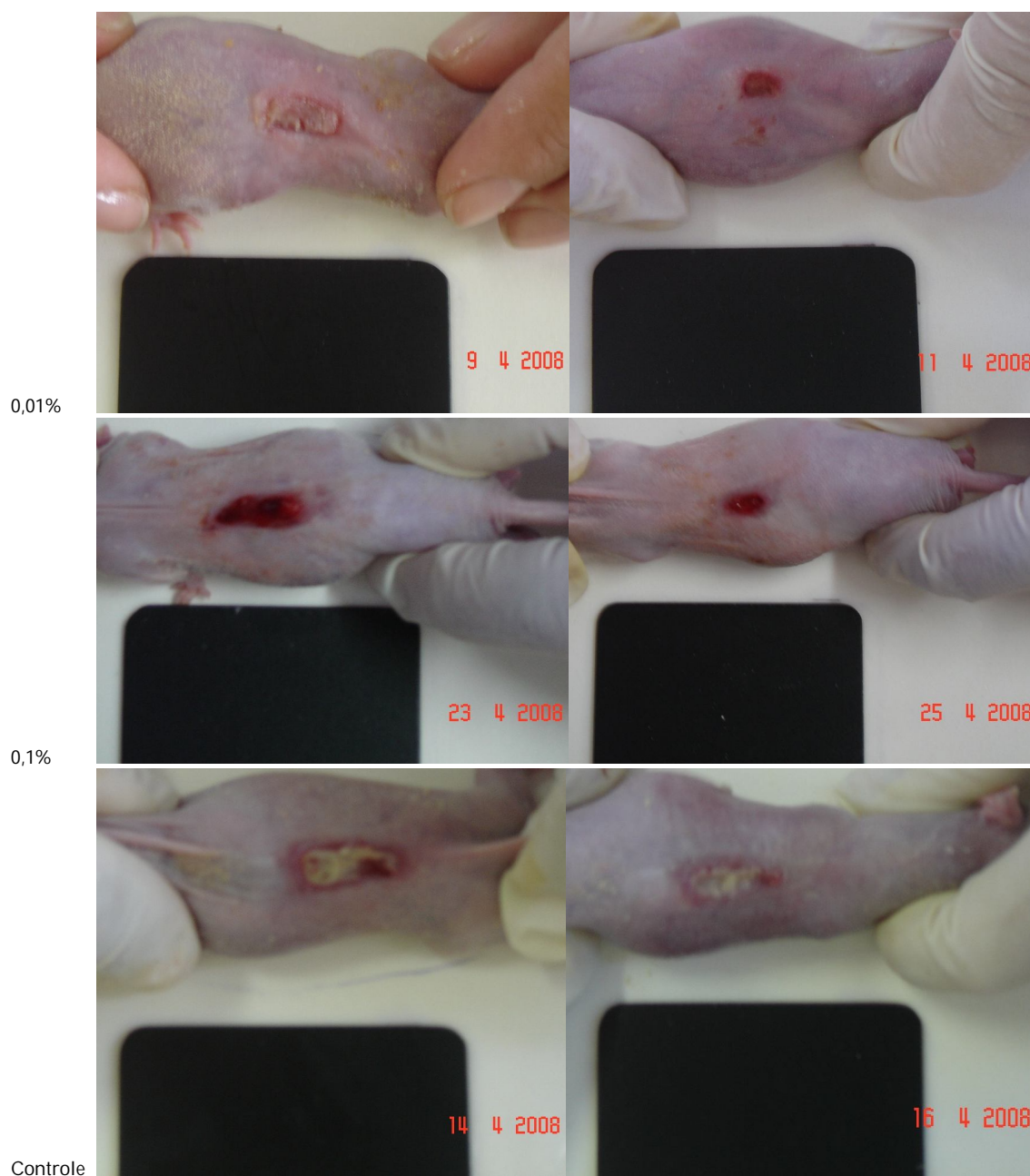


FIGURA 19- Retração das queimaduras tratadas com P1G10 - 0,01%, P1G10 - 0,1% e controle no intervalo de 48 horas.

Decorridos os 35 dias de experimento, todos os animais foram sacrificados, a pele da região dorsal foi retirada, processada e analisada microscopicamente. Esta análise histopatológica evidenciou, nos grupos

tratados (P1G10 - 0,1% e 0,01%), reparo tecidual mais precoce, caracterizado pela diminuição do tecido de granulação, menor presença de infiltrado inflamatório e organização do colágeno em feixes paralelos à epiderme.

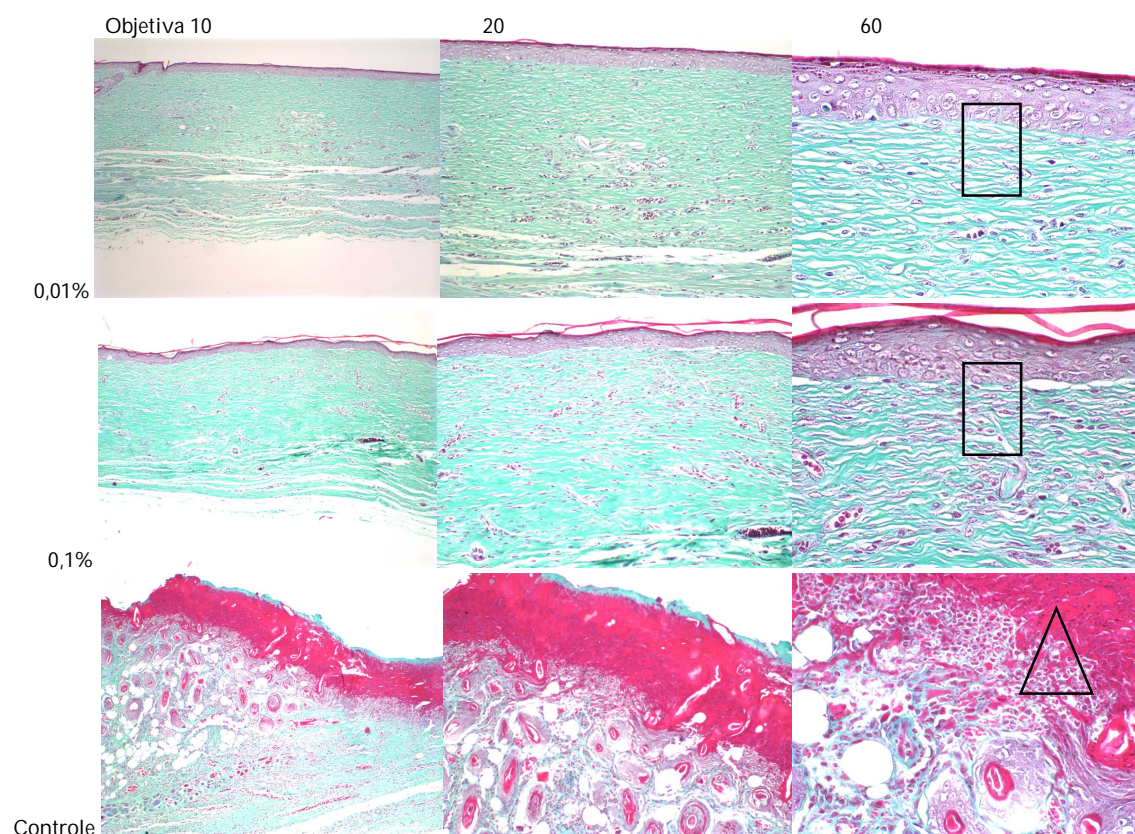


FIGURA 20- Seções histológicas de pele da região dorsal, de camundongos da linhagem *Hairless*, retiradas 35 dias após a realização das queimaduras tratadas com P1G10 - 0,01%, P1G10 - 0,1% e controle. Objetiva de 10, 20 e 60. Coloração de Gomori. □: epiderme íntegra, infiltrado discreto e fibroblastos organizados. △: crosta espessa, tecido de granulação presente, infiltrado intenso e difuso.

A avaliação planimétrica das feridas, do primeiro ao último dia de tratamento, foi realizada utilizando-se o *software Biometrics*, considerando os parâmetros redução média de perímetro e redução média de área, conforme apresentados nos gráficos que se seguem.

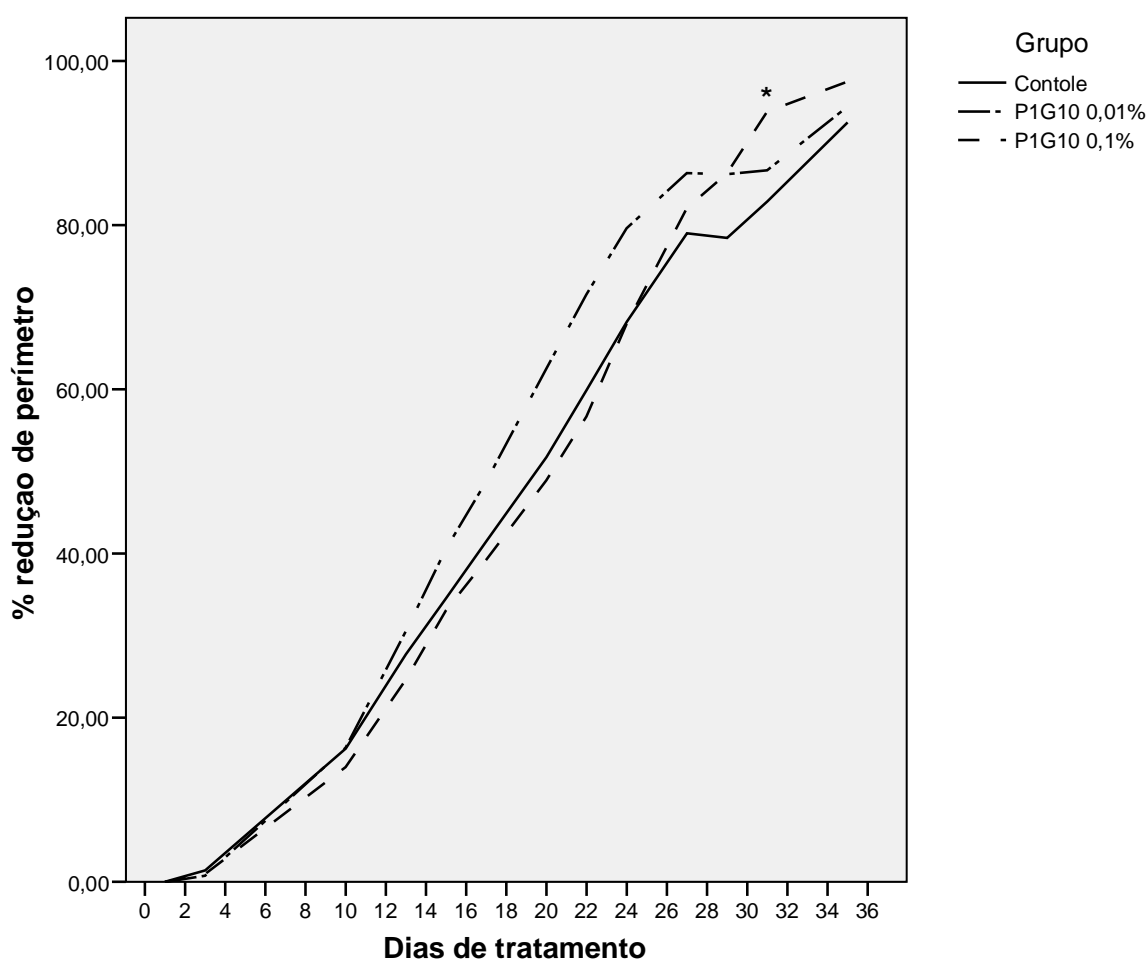


GRÁFICO 7- Porcentagem de redução de perímetro da ferida segundo tempo e grupos de tratamento, utilizando o *software Biometrics*. * $p < 0,02$

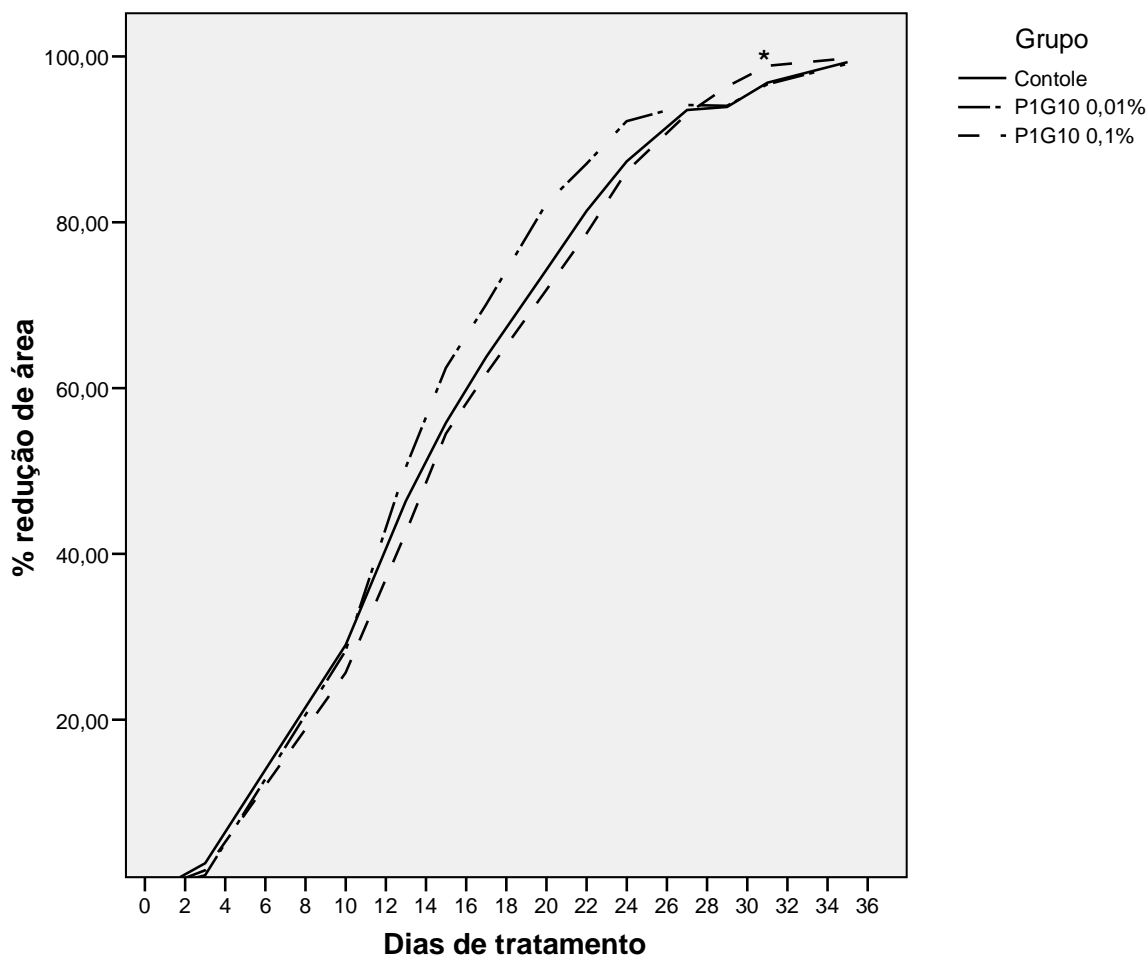


GRÁFICO 8- Porcentagem de redução de área da ferida segundo tempo e grupos de tratamento, utilizando o *software Biometrics*. * $p < 0,02$

Os gráficos mostram as porcentagens de redução de perímetro e área, das imagens de feridas obtidas por captura digital, calculadas por meio do *software Biometrics*. No início do tratamento, especificamente, nos primeiros dez dias, as porcentagens de redução de perímetro e de área foram semelhantes para os três grupos. No período de 10 a 28 dias de tratamento, as porcentagens de redução de perímetro e de área do grupo tratado com P1G10 - 0,01% foram discretamente maiores que as porcentagens dos outros dois grupos. A partir do 28º dia de tratamento, as porcentagens de redução de perímetro e de área do

grupo tratado com P1G10 - 0,1% foram maiores que as porcentagens dos grupos tratados com P1G10 - 0,01% e controle.

Observou-se que esta redução percentual de perímetro e de área foi estatisticamente significativa no 31º dia de tratamento ($p < 0,05$), em animais que receberam P1G10 - 0,1%, em relação ao grupo controle.

4.3. Fase clínica I

Nesta segunda etapa do estudo, buscou-se avaliar a segurança e inocuidade de P1G10 quando aplicada em pele íntegra. A população alvo foi constituída de indivíduos hígidos, entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos, usuários do *Campus Saúde* e do ICB da UFMG, que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa. A amostra foi composta por 25 pessoas voluntárias, cuja caracterização foi realizada a partir dos dados coletados nos formulários no momento da primeira avaliação e está descrita na TAB. 7.

TABELA 7
Caracterização da amostra, fase clínica I.

Variáveis	n	%
Idade (anos)		
19 – 30	24	96,0
31 – 51	1	4,0
Sexo		
Masculino	3	12,0
Feminino	22	88,0
Cor de pele		
Branca	22	88,0
Não-branca	3	12,0
Estado civil		
Solteiro	22	88,0
Casado ou em união	3	12,0
Separado, divorciado ou viúvo	0	-
Escolaridade		
Ensino superior	16	64,0
Pós-graduação	9	36,0
Tabagismo		
Nunca	21	84,0
Ex-tabagista	3	12,0
Sim	1	4,0
Consumo de álcool – frequência		
Nunca	2	8,0
Quase nunca	15	60,0
Pelo menos 1 vez por semana	8	32,0
Todo dia	0	-
Problema de saúde atual		
Não	21	84,0
Sim	4	16,0
Internação hospitalar nos 12 meses antecedentes à entrevista		
Não	24	96,0
Sim	1	4,0

TABELA 7
Caracterização da amostra, fase clínica I (continuação).

Variáveis	n	%
História pregressa de doença		
Não	2	8,0
Sim	23	92,0
Uso de medicamentos		
Não	5	20,0
Sim	20	80,0
História de aferição da pressão arterial		
Não	0	-
Sim	25	100,0
História de pressão arterial elevada		
Não	23	92,0
Sim	2	8,0
Índice de massa corporal (IMC)		
Baixo peso	2	8,0
Peso normal	19	76,0
Sobrepeso	3	12,0
Obeso	1	4,0
Integridade da pele do antebraço		
Não	0	-
Sim	25	100,0
Grupo de tratamento		
P1G10 0,1%	13	52,0
Base hidrossolúvel	12	48,0

Do total da amostra, a média de idade foi 24,4 anos, sendo que a idade mínima encontrada foi 19 e a máxima 51 anos. Não foram identificadas pessoas com cor de pele negra, vermelha (ameríndios) ou amarela (orientais), apenas parda. Havia 15 pessoas (60,0%) alunas dos cursos de graduação, 1 (4,0%) com curso de graduação completo, 8 (32,0) alunas do curso de mestrado e 1 (4,0%) com curso de mestrado completo.

Quanto ao hábito de fumar, havia na amostra uma pessoa fumante (4,0%), que consumia 1 cigarro por dia, com início há 18 meses. A bebida alcoólica mais freqüentemente utilizada foi o vinho (84,0%), seguida da cerveja (52,0%), da cachaça (24,0%). Outras bebidas também foram citadas, tais como *whisky*, *vodka* e licor (44,0%).

Os problemas de saúde existentes no momento da coleta de dados foram: síndrome do túnel do carpo; crise asmática; esofagite, duodenite, gastrite, hérnia de hiato; alergia à dipirona. Apenas 01 (4,0%) pessoa foi internada nos 12 meses que antecederam a coleta para realização de cirurgia eletiva estética. A ocorrência de doenças progressas foi freqüente (92,0%), sendo que as relatadas foram: varicela, caxumba, coqueluche, mononucleose infecciosa, herpes simples, infecção renal, câncer de pele, tumor benigno de pulmão, com conseqüente lobectomia média e inferior; colelitíase, apendicectomia, gastralgia, dislipidemia, rinite, sinusite, bronquite, asma, alergias (medicamentosa, alimentar, cosmética e outras). Dos medicamentos em uso, o mais citado foi anticoncepcional (oral ou injetável), seguido por omeprazol, cloridrato de fluoxetina, núcleo CMP (citidina 5 monofosfato dissódica), fumarato de

formoterol + budesonida (aerosol), budesonida (aerosol), peróxido de benzoíla (tópico) e ácido naftóico (tópico).

Em relação aos dados antropométricos, a média de peso obtida foi 57,28 Kg, sendo que a medida mínima foi 45,9 Kg e a máxima de 90,0 Kg. A média das alturas obtida foi 1,63 m, cujo menor valor foi 1,52 m e o maior foi 1,79 m.

No decorrer do período de teste, nenhuma das pessoas desenvolveu reações adversas aos produtos, que pudessem ser evidenciadas por eritema, edema, calor, dermatite, prurido ou dor. Porém, circunscrito ao local de aplicação do filme de poliuretano, observou-se que quatro pessoas da amostra (16,0%) desenvolveram alergia, evidenciada por hiperemia e prurido. Esta situação foi contornada aplicando-se gaze sobre o creme e ocluindo com adesivo microporoso hipoalergênico, até remissão dos sinais e sintomas.

Quanto aos exames laboratoriais realizados antes e após as aplicações, foram coletados materiais de 24 pessoas, pois uma delas não compareceu ao laboratório. A média dos valores de hematócrito entre os dois grupos foram estatisticamente diferentes ($p = 0,02$), uma vez que os valores foram maiores no grupo que iria receber P1G10 0,1% em comparação ao grupo controle. Entretanto, estes valores estavam compreendidos nos limites de normalidade e eram, portanto, sem relevância clínica (TAB. 8).

TABELA 8

Resultados da análise de hemograma de pessoas voluntárias sadias no início das aplicações. Belo Horizonte, abril de 2007.

Hemograma	P1G10 0,1% (n=13)		Controle (n=11)		t	p
	Média	DP	Média	DP		
Hemácias (/mm ³)	4737692,31	568611,67	4654545,45	834917,52	0,29	0,78
Hemoglobina (g/dl)	14,28	1,26	14,74	5,44	-0,29	0,77
Hematócrito (%)	41,89	3,90	38,71	2,03	2,43	0,02
VCM (fl)	88,70	4,87	88,41	4,34	0,15	0,88
HCM (pg)	30,30	1,86	29,92	1,43	0,55	0,58
CHCM (g/dl)	34,15	0,70	33,84	0,47	1,25	0,23
RDW (%)	12,78	0,52	12,84	0,41	-0,27	0,79
Global de leuc.(/mm ³)	6584,62	1456,51	6845,45	1344,15	-0,45	0,66
Neutrófilos (%)	56,85	6,23	59,55	8,07	-0,93	0,36
Neutrófilos (/mm ³)	3804,62	1139,29	4124,55	1238,64	-0,66	0,52
Linfócitos (%)	33,99	5,51	31,71	6,99	0,90	0,38
Linfócitos (/mm ³)	2198,46	419,74	2116,36	350,84	0,51	0,61
Monócitos (%)	6,87	1,59	6,55	1,14	0,55	0,59
Monócitos (/mm ³)	446,15	123,19	447,27	109,55	-0,02	0,98
Eosinófilos (%)	1,84	1,48	1,74	1,03	0,19	0,85
Eosinófilos (/mm ³)	116,92	88,92	118,18	73,19	-0,04	0,97
Basófilos (%)	0,47	0,18	0,46	0,16	0,08	0,94
Basófilos (/mm ³)	28,46	11,44	30,91	9,44	-0,56	0,58
Plaquetas (/mm ³)	249807,69	85212,37	272363,64	40900,54	-0,80	0,43

Legenda: DP – desvio padrão t – teste t-Student

Não foram encontradas diferenças entre o grupo que iria receber P1G10 0,1% e o grupo controle nos demais itens constantes do hemograma: hemácias, hemoglobina, VCM, HCM, CHCM, RDW, global de leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e plaquetas.

Os resultados dos exames bioquímicos de sangue e urina, antes do início das aplicações com os dois produtos, não foram estatisticamente diferentes entre os grupos, conforme TAB. 9 e 10.

TABELA 9

Resultados de testes bioquímicos de sangue de pessoas voluntárias sadias no início das aplicações. Belo Horizonte, abril de 2007.

Teste Bioquímico	P1G10 0,1% (n=13)		Controle (n=11)		t	p
	Média	DP	Média	DP		
Tempo de protrombina (seg.)	14,55	0,54	13,33	4,09	1,07	0,29
Tempo de protrombina (ativ. %)	81,62	5,30	81,55	8,76	0,02	0,98
Tempo de protrombina (RNI)	1,20	0,19	1,18	0,08	0,42	0,68
T. de tromboplastina parcial (seg.)	31,92	2,69	32,27	2,10	-0,35	0,73
Glicemia jejum (mg/dl)	85,38	5,42	82,91	5,68	1,09	0,29
Creatinina (mg/dl)	0,81	0,13	1,25	1,75	-0,90	0,38
Uréia (mg/dl)	26,00	6,67	23,09	6,49	1,08	0,29
Albumina sérica (g/dl)	4,48	0,24	4,38	0,25	1,03	0,31
Bilirrubina total (mg/dl)	0,47	0,15	0,55	0,22	-1,00	0,33
Cálcio (mg/dl)	9,33	0,27	9,08	0,35	1,98	0,06
Cloretos (mEq/l)	102,31	2,36	102,09	2,77	0,21	0,84
Potássio (mEq/l)	4,05	0,26	4,24	0,16	-2,03	0,05
Sódio (mEq/l)	139,38	2,53	138,00	1,00	1,70	0,10
Fósforo (mg/dl)	3,15	0,48	3,42	0,51	-1,31	0,20
Fosfatase alcalina (U/l)	118,92	33,07	106,91	27,82	0,95	0,35
Proteínas totais (g/dl)	7,44	0,23	7,25	0,33	1,69	0,11
TGO (U/l)	24,69	5,68	22,55	9,47	0,69	0,50
TGP (U/l)	16,54	6,35	17,82	7,65	-0,45	0,66
Gama GT (U/l)	13,31	7,99	13,27	4,98	0,01	0,99

Legenda: DP – desvio padrão t – teste t-Student

TABELA 10

Resultados de urinálise de pessoas voluntárias sadias no início das aplicações. Belo Horizonte, abril de 2007.

Urina	P1G10 0,1% (n=13)		Controle (n=10)		t	p
	Média	DP	Média	DP		
Volume (ml)	14,00	13,83	10,2	0,63	0,86	0,40
Densidade	1021,15	6,79	1018,40	7,26	0,94	0,36
pH	6,23	0,56	5,95	0,37	1,36	0,19

Legenda: DP – desvio padrão t – teste t-Student

Após o término das aplicações das preparações, todas as pessoas alocadas foram submetidas a novos exames de hemograma e bioquímicos de sangue e urina. Houve diferenças estatisticamente significativas nos hemogramas entre o grupo controle e o que recebeu o princípio ativo. Os valores de hemoglobina, hematócrito e linfócitos foram maiores no grupo que recebeu P1G10, enquanto que os valores de neutrófilos foram maiores no grupo controle (TAB. 11). Porém, os valores estavam compreendidos no intervalo de normalidade, ou seja, sem relevância clínica.

Os demais itens do hemograma apresentaram valores semelhantes entre os dois grupos: hemácias, VCM, HCM, CHCM, RDW, global de leucócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e plaquetas.

TABELA 11

Resultados de hemograma de pessoas voluntárias sadias ao término das aplicações.
Belo Horizonte, maio de 2007.

Hemograma	P1G10 0,1% (n=13)		Controle (n=11)		t	p
	Média	DP	Média	DP		
Hemácias (/mm ³)	4794615,38	569262,91	4433636,36	286749,81	1,90	0,07
Hemoglobina (g/dl)	14,58	1,33	13,36	0,64	2,76	0,01
Hematócrito (%)	42,45	3,80	38,96	1,96	2,75	0,01
VCM (fl)	88,83	4,39	87,99	4,28	0,47	0,64
HCM (pg)	30,55	2,09	30,20	1,64	0,45	0,65
CHCM (g/dl)	34,34	0,80	34,31	0,71	0,09	0,93
RDW (%)	12,47	0,58	12,70	0,55	-1,00	0,33
Global de leuc.(/mm ³)	6200,00	1347,22	6309,09	1244,55	-0,20	0,84
Neutrófilos (%)	50,52	7,23	58,88	5,36	-3,17	0,00
Neutrófilos (/mm ³)	3198,46	1166,38	3750,91	975,25	-1,24	0,23
Linfócitos (%)	39,25	7,55	31,95	5,38	2,68	0,01
Linfócitos (/mm ³)	2363,85	364,98	1972,73	284,96	2,88	0,01
Monócitos (%)	6,89	1,67	6,45	1,42	0,70	0,49
Monócitos (/mm ³)	414,62	94,75	403,64	114,30	0,26	0,80
Eosinófilos (%)	2,84	1,75	2,22	1,44	0,94	0,36
Eosinófilos (/mm ³)	179,23	124,60	142,73	103,06	0,77	0,45
Basófilos (%)	0,54	0,19	0,53	0,24	0,13	0,90
Basófilos (/mm ³)	32,31	11,66	33,64	16,29	-0,23	0,82
Plaquetas (/mm ³)	243769,23	50262,90	286363,64	62782,60	-1,85	0,08

Legenda: DP – desvio padrão t – teste t-Student

Nos testes bioquímicos de sangue, apenas os valores de creatinina foram maiores no grupo tratado com P1G10 que os obtidos no grupo controle ($p = 0,02$), entretanto, também dentro dos parâmetros de normalidade, conforme mostrado na TAB. 12.

TABELA 12

Resultados de testes bioquímicos de pessoas voluntárias sadias ao término das aplicações. Belo Horizonte, maio de 2007.

Teste Bioquímico	P1G10 0,1% (n = 13)		Controle (n = 11)		t	p
	Média	DP	Média	DP		
Tempo de protrombina (seg.)	14,08	0,52	13,91	0,76	0,64	0,53
Tempo de protrombina (ativ. %)	87,15	6,36	89,45	9,15	-0,72	0,48
Tempo de protrombina (RNI)	1,10	0,05	1,11	0,12	-0,43	0,67
T. de tromboplastina parcial (seg.)	32,85	2,51	32,18	1,72	0,74	0,47
Glicemia jejum (mg/dl)	86,15	5,00	85,55	2,73	0,36	0,72
Creatinina (mg/dl)	0,86	0,14	0,74	0,09	2,48	0,02
Uréia (mg/dl)	29,08	4,97	26,55	7,12	1,02	0,32
Albumina sérica (g/dl)	4,37	0,23	4,23	0,18	1,69	0,11
Bilirrubina total (mg/dl)	0,44	0,19	0,48	0,29	-0,43	0,67
Cálcio (mg/dl)	9,48	0,34	9,25	0,34	1,59	0,13
Cloretos (mEq/ l)	103,15	4,36	103,73	2,83	-0,37	0,71
Potássio (mEq/ l)	4,39	0,27	4,36	0,24	0,27	0,79
Sódio (mEq/ l)	139,46	2,54	138,55	1,92	0,98	0,34
Fósforo (mg/dl)	3,60	0,60	3,59	0,64	0,04	0,97
Fosfatase alcalina (U/l)	109,92	32,57	103,73	27,70	0,50	0,62
Proteínas totais (g/dl)	7,24	0,26	7,07	0,29	1,49	0,15
TGO (U/l)	24,23	9,54	19,00	4,00	1,69	0,10
TGP (U/l)	16,54	7,66	15,82	5,98	0,25	0,80
Gama GT (U/l)	11,38	6,63	13,00	7,68	-0,55	0,59

Legenda: DP – desvio padrão t – teste t-Student

Nos testes de urina realizados não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme apresentado na TAB.

13.

TABELA 13

Resultados de urinálise de pessoas voluntárias sadias ao término das aplicações. Belo Horizonte, maio de 2007.

Urina	P1G10 0,1% (n = 13)		Controle (n = 11)		t	p
	Média	DP	Média	DP		
Volume (ml)	10,00	0,00	17,27	24,12	-1,09	0,29
Densidade	1021,54	4,59	1020,64	6,70	0,39	0,70
pH	6,08	0,84	6,14	0,67	-0,19	0,85

Legenda: DP – desvio padrão t – teste t-Student

Ao comparar os exames (hemograma, perfil bioquímico e urinálise) antes e após a aplicação dos cremes percebeu-se que as pessoas alocadas no grupo controle apresentaram discreta diferença, não significativa, nos resultados, estando compreendidos no intervalo de normalidade. Os valores de hemácias, hemoglobina, global de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e creatinina apresentaram-se ligeiramente diminuídos ao final das aplicações. Ainda comparando o grupo controle, os valores de eosinófilos, tempo de protrombina, cálcio, potássio, fósforo e pH de urina estavam ligeiramente aumentados em relação ao início das aplicações.

Algumas diferenças também foram percebidas no grupo que recebeu P1G10 - 0,1%, antes e após a aplicação dos cremes. Os valores de global de leucócitos foram menores e os de linfócitos e eosinófilos foram maiores ao final do período de estudo. Porém, estas diferenças e as apresentadas pelo grupo controle estavam compreendidas no intervalo de normalidade e não representavam relevância clínica.

4.4. Fase clínica II

Esta etapa do estudo constituiu-se em uma avaliação do efeito tópico de P1G10 em pessoas portadoras de úlceras. Tratou-se de pequena amostra, composta por 10 pessoas, cuja caracterização está descrita na tabela que se segue.

TABELA 14

Caracterização da amostra durante a primeira avaliação, fase clínica II.

Variáveis	n	%
Idade (anos)		
49 – 59	3	30,0
60 ou mais	7	70,0
Sexo		
Masculino	5	50,0
Feminino	5	50,0
Cor de pele		
Branca	7	70,0
Não branca	3	30,0
Tabagismo		
Nunca	6	60,0
Ex-tabagista	3	30,0
Sim	1	10,0
Consumo de álcool - frequência		
Nunca	8	80,0
Quase nunca	2	20,0
Pelo menos 1 vez por semana	0	-
Todo dia	0	-

TABELA 14

Caracterização da amostra durante a primeira avaliação, fase clínica II (continuação).

Variáveis	n	%
Índice de massa corporal (IMC)		
Baixo peso	1	10,0
Peso normal	3	30,0
Sobrepeso	3	30,0
Obeso	2	20,0
Em branco	1	10,0
Pressão arterial		
Normotenso	3	30,0
Hipertenso	2	20,0
Em branco	5	50,0
Frequência cardíaca		
Bradicárdico	0	-
Eucárdico	8	80,0
Taquicárdico	0	-
Em branco	2	20,0
Temperatura axilar (°C)		
≤35,0	0	-
35,1 – 37,8	10	100,0
≥37,8	0	-
Grupo de tratamento		
P1G10 0,1%	6	60,0
Base hidrossolúvel	4	40,0

A média de idade foi 72,2 anos, sendo que a idade mínima encontrada foi 49 e a máxima 93 anos. Das pessoas denominadas “não brancas”, 2 (20,0%) eram pardas e 1 (10,0%) negra. Não havia pessoas de cor de pele vermelha (ameríndios) ou amarela (orientais) compondo a amostra.

Quanto ao hábito de fumar, havia uma pessoa fumante (10,0%) na amostra, que fumava 1 charuto por dia, com início há 80 anos, sendo que no

passado chegou a fumar até oito charutos por dia. As bebidas alcoólicas citadas foram o rum (20,0%) e a cerveja (10,0%).

Em relação aos dados antropométricos, a média de peso obtida foi 71,0 Kg, sendo que a medida mínima foi 45,0 Kg e a máxima de 104,0 Kg. A média das estaturas obtida foi 1,62 m, cujo menor valor foi 1,50 m e o maior foi 1,87 m. Os dados vitais mensurados foram pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura corporal, cujos valores da média e seus respectivos desvios padrões foram: 120 mmHg (DP = 20,0), 78 mmHg (DP=8,367), 74,25 bpm (DP=10,278) e 36,25°C (DP = 0,5831).

Após a divulgação dos códigos das formulações utilizadas no tratamento, pôde-se observar que as pessoas tratadas com os cremes 1 e 4 receberam P1G10 - 0,1% e as que foram tratadas com os cremes 2 e 3, receberam sulfadiazina de prata 0,1%.

Em relação às feridas, todas foram avaliadas durante a primeira consulta, 5 (50,0%) eram de etiologia venosa e 5 (50,0%) eram por pressão (TAB. 15).

TABELA 15

Caracterização das feridas durante a primeira avaliação, fase clínica II.

Variáveis	n	%
Etiologia		
Venosa	5	50,0
Pressão	5	50,0
Número de feridas		
1	4	40,0
2	4	40,0
3	1	10,0
Mais de 3	1	10,0
Necrose		
Não	3	30,0
Sim	7	70,0
Extensão – comprimento (cm)		
0,0 – 1,0	2	20,0
1,1 – 2,0	3	30,0
2,1 – 3,0	3	30,0
>3,0	2	20,0
Extensão – largura (cm)		
0,0 – 1,0	3	30,0
1,1 – 2,0	5	50,0
2,1 – 3,0	1	10,0
>3,0	1	10,0
Dor		
Ausente	6	60,0
Leve	2	20,0
Moderada	1	10,0
Severa	0	-
Penosa	1	10,0
Exsudato		
Não	0	-
Sim	10	100,0

TABELA 15

Caracterização das feridas durante a primeira avaliação, fase clínica II (continuação).

Variáveis	n	%
Odor do exsudato		
Não	8	80,0
Sim	2	20,0
Volume do exsudato		
Pouco	8	80,0
Moderado	1	10,0
Acentuado	1	10,0
Característica do exsudato		
Seroso	8	80,0
Sero-sanguinolento	2	20,0

Dentre as dez pessoas pertencentes à amostra, em apenas uma delas foram identificadas 11 úlceras. Tratava-se da pessoa mais idosa, restrita ao leito e portadora de úlcera por pressão.

Avaliou-se a presença ou não de tecido necrótico sobre o leito da ferida, de acordo com a porcentagem acometida, considerando tanto os de aparência de crosta, como os de esfacelo. Portanto, sete das dez feridas apresentavam necrose sobre seu leito e eram recobertas, em média, em 75,0% da extensão.

Segundo a extensão, as feridas eram classificadas como pequenas, ou seja, mediam menos de 50,0 cm². O contorno da ferida era desenhado em plástico estéril transparente e, considerando o sentido céfalo-caudal, era verificada a maior altura e a maior largura, traçando duas retas perpendiculares. A menor altura encontrada foi 0,5 cm e a maior 5,0 cm, cuja

média foi 2,42 cm. Em relação à largura, a menor encontrada foi 0,2 cm, a maior 5,0 cm e a média 1,82 cm.

Nenhuma das feridas exibia sinais locais de infecção, mas todas apresentavam drenagem de exsudato. O odor do exsudato, quando presente, era discreto.

As pessoas alérgicas a medicamentos tópicos eram quatro (40,0%), sendo que os produtos citados por elas estão demonstrados no GRAF. 9.

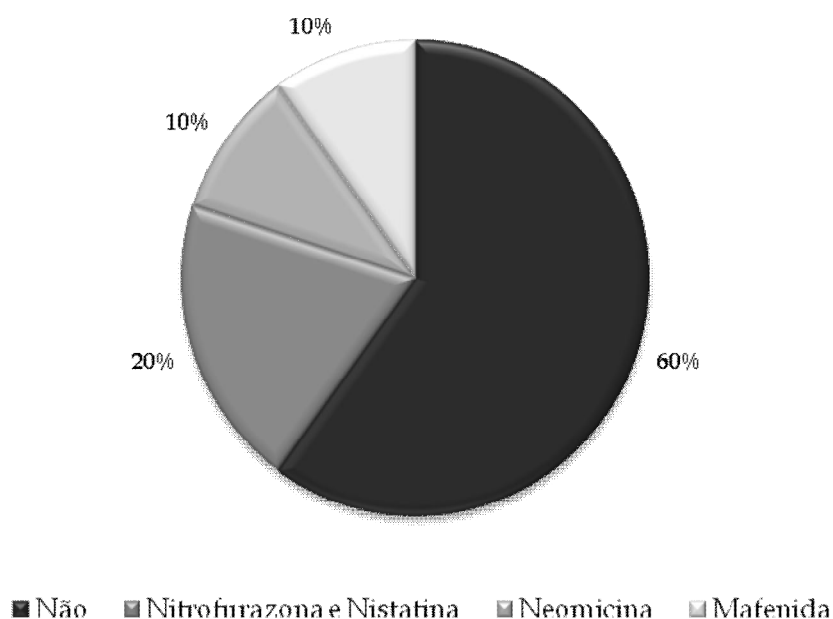


GRÁFICO 9- Alergia a medicamentos tópicos.

Úlceras venosas

Alguns fatores relacionados à etiologia da ferida foram investigados. Considerando as cinco pessoas portadoras de úlceras venosas representando a

totalidade desta sub-amostra, todas apresentavam pulsos periféricos – dorsal do pé e tibial posterior – palpáveis, indicativos da perfusão de extremidades.

De acordo com a seção 3.7.6, o edema depressível de membros inferiores foi avaliado por meio da prova de cacifo e da mensuração de circunferências bilaterais das panturrilhas e tornozelos. Este sinal estava presente em três dos cinco sujeitos da sub-amostra (80,0%). As diferenças nas medidas das circunferências de panturrilhas, comparando a direita com a esquerda, foram de 3,0 cm, 6,5 cm e 7,5 cm. Duas pessoas não apresentaram variação nesta medida. As diferenças das circunferências de tornozelos foram menores que as de panturrilhas: 0,5 cm, 1,0 cm, 2,0 cm e 4,5 cm. Uma das pessoas não apresentou diferenças nesta medida.

A hiperpigmentação, também conhecida como dermatite ocre, foi observada em quatro dos cinco sujeitos da sub-amostra (80,0%). As feridas localizavam-se na região distal dos membros inferiores, em número de 1 ou 2, com perda tecidual superficial ou profunda superficial.

Nenhum dos pacientes utilizava terapia compressiva ou creme hidratante na pele íntegra circunvizinha à ferida.



FIGURA 21- Imagens capturadas das úlceras venosas de 5 pacientes da amostra.

Úlceras por pressão

As úlceras por pressão identificadas na outra sub-amostra eram de estágio II (60,0%) ou III (40,0%) e as que fizeram parte do estudo estavam localizadas nas regiões do processo espinhoso inferior, sacral, trocantérica, face anterior da coxa e tibial lateral.

Utilizou-se a Escala de Braden para avaliação de risco para desenvolvimento de novas úlceras por pressão. Apenas uma pessoa da sub-

amostra (20,0%) não apresentava risco (escore 23), enquanto as demais (80,0%) apresentavam-se em risco (escores 8, 11 e 15).

Em relação às medidas de prevenção investigadas, uma pessoa (20,0%) controlava a incontinência urinária – sonda vesical de demora; duas (40,0%) utilizavam superfícies redutoras de pressão – espuma piramidal e ar alternado; duas (40,0%) utilizavam óleo ou creme hidratante na pele íntegra; três (60,0%) mantinham a pele limpa e seca e quatro (80,0%) eram reposicionadas frequentemente no leito ou cadeira. Nenhuma delas recebia suporte nutricional adequado.



FIGURA 22- Imagens capturadas das úlceras por pressão de 5 pacientes da amostra.

Quanto aos exames laboratoriais realizados antes e após o tratamento, foram coletados materiais das 10 pessoas alocadas. Os valores de eritrócitos, global de leucócitos e plaquetas estavam aumentados e os valores de hemoglobina e hematócrito estavam diminuídos no grupo tratado com P1G10 - 0,1%, em relação ao tratado com sulfadiazina de prata 1,0%. A média dos valores não foi estatisticamente diferente entre os grupos e os valores estavam compreendidos nos limites de normalidade (TAB. 16).

TABELA 16

Resultados da análise de hemograma de pacientes portadores de feridas crônicas, no início do tratamento. Ciego de Ávila, Cuba, setembro de 2007.

Hemograma	P1G10 0,1%			Sulfadiazina de prata			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	
Hemácias ($\cdot 10^6/\text{mm}^3$)	4	5,025	3,127	4	1,675	1,362	0,97
Hemoglobina (g/dl)	6	11,35	2,765	4	12,55	1,347	0,449
Hematócrito (%)	6	37,0	0,86	1	38,0	-	0,919
Global de leuc. ($/\text{mm}^3$)	6	6817,0	1823,6	4	5600,0	1639,1	0,315
Plaquetas ($/\text{mm}^3$)	6	170500,0	11059,0	4	169000,0	12936,0	0,849

Legenda: n – número de amostras DP – desvio padrão

Os neutrófilos segmentados, eosinófilos e linfócitos foram investigados apenas na primeira coleta, ou seja, no início do tratamento, por razões inerentes ao laboratório; sendo que a média dos valores estava compreendida no intervalo de normalidade e não havia diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre o grupo tratado com P1G10 - 0,1% e o tratado com sulfadiazina de prata 1,0%.

Os resultados dos exames bioquímicos de sangue, referentes à creatinina, bilirrubina total fósforo, fosfatase alcalina eram maiores, e os referentes à glicemia, ácido úrico, albumina sérica, cálcio, proteínas totais, TGO e TGP eram menores no grupo tratado com P1G10 - 0,1% que no grupo tratado com sulfadiazina de prata 1,0%. Porém, estes resultados não foram estatisticamente diferentes entre os grupos, conforme a TAB. 17.

TABELA 17

Resultados de testes bioquímicos de sangue dos pacientes portadores de feridas crônicas, no início do tratamento. Ciego de Ávila, Cuba, setembro de 2007.

Teste Bioquímico	P1G10 0,1%			Sulfadiazina de prata			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	
Glicemia jejum (mmol/l)	6	3,800	0,5404	4	4,400	0,6218	0,143
Creatinina (MG/dl)	6	1,57	0,77	4	1,12	0,27	0,306
Ácido úrico (Umol/l)	6	303,67	83,138	4	338,25	113,538	0,591
Albumina sérica (g/dl)	5	3,736	0,804	3	4,477	0,117	0,176
Bilirrubina total (mmol/l)	5	0,37	0,19	3	0,33	0,09	0,733
Cálcio (mg/dl)	6	1,990	0,30047	4	1,9975	0,16317	0,965
Fósforo (mg/dl)	2	1,10	0,71	2	0,98	0,219	0,523
Fosfatase alcalina (U/l)	6	299,67	48,223	3	248,67	31,342	0,146
Proteínas totais (g/dl)	6	6,718	0,847	3	6,790	0,078	0,892
TGO (U/l)	6	19,17	8,565	4	22,23	5,692	0,551
TGP (U/l)	6	16,25	4,0441	4	20,725	8,5117	0,290

Legenda: n – número de amostras DP – desvio padrão

Após o término das aplicações das preparações, todas as pessoas alocadas foram submetidas a novos exames de hemograma e bioquímicos de sangue. Os valores de eritrócitos e hemoglobina foram maiores e os de hematócrito, global de leucócitos e plaquetas foram menores no grupo tratado

com P1G10 - 0,1% que no tratado com sulfadiazina de prata. A média dos valores não foi estatisticamente diferente entre os grupos e os valores estavam compreendidos nos limites de normalidade, conforme a tabela que se segue (TAB. 18). A medida de eosinófilos não foi repetida pelo laboratório de análises clínicas.

TABELA 18

Resultados de hemograma de pacientes portadores de feridas crônicas, ao término do tratamento. Ciego de Ávila, Cuba, novembro de 2007.

Hemograma	P1G10 0,1%			Sulfadiazina de prata			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	
Hemácias ($\cdot 10^6/\text{mm}^3$)	3	3,50	2,512	4	1,875	1,011	0,283
Hemoglobina (g/dl)	4	12,425	0,573	4	11,975	0,772	0,386
Hematócrito (%)	3	39,0	0,81	1	40,0	-	0,950
Global de leuc. ($/\text{mm}^3$)	2	5600,0	848,5	3	7767,0	1137,2	0,109
Plaquetas ($/\text{mm}^3$)	4	182500,0	15674,0	3	194670,0	49166,0	0,653

Legenda: n – número de amostras DP – desvio padrão

Nos testes bioquímicos de sangue, apenas os valores de fosfatase alcalina e proteínas totais foram significativamente maiores no grupo tratado com P1G10 que os obtidos no grupo controle ($p < 0,05$), porém os valores de fosfatase alcalina excederam os limites máximos recomendados, mas os de proteínas totais mantiveram-se dentro dos parâmetros de normalidade, conforme mostrado na TAB. 19.

TABELA 19

Resultados de testes bioquímicos de pacientes portadores de feridas crônicas, ao término do tratamento. Ciego de Ávila, Cuba, novembro de 2007.

Teste Bioquímico	P1G10 0,1%			Sulfadiazina de prata			p
	n	Média	DP	n	Média	DP	
Glicemia jejum (mmol/l)	4	3,725	0,6602	4	4,750	1,0472	0,149
Creatinina (Umol/l)	4	1,61	0,84	4	1,04	0,25	0,235
Ácido úrico (Umol/l)	2	340,0	12,728	4	298,75	138,558	0,712
Albumina sérica (g/dl)	4	3,612	0,316	4	3,855	0,438	0,404
Bilirrubina total (mmol/l)	4	0,36	0,20	4	0,53	0,06	0,154
Cálcio (mg/dl)	3	5,1733	5,46174	3	1,9467	0,29905	0,365
Fósforo (mg/dl)	2	1,06	0,035	2	1,02	0,191	0,798
Fosfatase alcalina (U/l)	4	341,25	40,705	4	257,75	42,351	0,029
Proteínas totais (g/dl)	4	7,367	0,347	4	6,680	0,213	0,015
TGO (U/l)	4	23,25	15,370	4	15,28	10,091	0,419
TGP (U/l)	4	21,30	5,5371	3	15,033	10,4357	0,345

Legenda: n – número de amostras DP – desvio padrão

Posteriormente, foi testada a associação entre os grupos de tratamento e as variáveis de controle, incluindo aquelas consideradas fatores sistêmicos ou locais que poderiam intervir no processo cicatricial. São elas: idade, sexo, pressão arterial sistólica e diastólica, frequência cardíaca, temperatura corporal (axilar), peso, altura, tabagismo, etilismo, doença de base, número de feridas, etiologia e localização das mesmas, largura e comprimento iniciais da ferida, necrose, estadiamento e parâmetros avaliados pela escala de Braden. Nenhuma das variáveis de controle estava associada ao tratamento recebido ($p > 0,05$).

Quanto ao tamanho da ferida, utilizaram-se apenas as medidas de maior comprimento, maior largura e maior profundidade verificadas no decorrer do tratamento. As imagens adquiridas no período não foram analisadas por meio

de *softwares*, devido às variações de enquadramento, luminosidade, distância e foco. Ademais, não foram registradas todas as imagens das feridas de alguns pacientes. Sendo assim, as medidas coletadas foram analisadas de acordo com o tratamento e com o tempo de tratamento – primeira avaliação (tempo 0) e avaliação final (tempo 1).

As médias dos valores de comprimento, largura e profundidade diminuíram do tempo 0 para o tempo 1 no grupo tratado com P1G10 - 0,1%. No grupo tratado com sulfadiazina de prata 1,0%, a média destes valores foi maior, exceto para profundidade, e os resultados estão apresentados na tabela que se segue.

TABELA 20

Comparações de médias de comprimento, largura e profundidade das feridas de acordo com o tratamento recebido e o tempo de tratamento.

	Comprimento		Largura		Profundidade	
	Média (cm)	DP	Média (cm)	DP	Média (cm)	DP
P1G10 - 0,1%						
Tempo 0 (n = 6)	2,617	1,2734	1,783	0,9042	0,917	1,4607
Tempo 1 (n = 4)	1,275	1,0046	0,575	0,5909	0,575	0,9535
Sulfadiazina de Prata						
Tempo 0 (n = 4)	2,125	2,0156	1,500	1,0801	0,525	0,6702
Tempo 1 (n = 3)	2,433	3,3858	1,567	2,1362	0,133	0,1155

Legenda: DP – desvio padrão, Tempo 0 – início do tratamento, Tempo 1 – final do tratamento

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros das feridas e os grupos de tratamento, no início e no final do

mesmo. Os resultados foram similares utilizando tanto testes estatísticos paramétricos quanto não-paramétricos.

Porém, percebe-se que, em média, houve diminuição dos valores de comprimento (51,0%), largura (67,0%) e profundidade (37,0%) das feridas tratadas com P1G10 - 0,1%, enquanto que apenas os valores de profundidade (74,0%) das feridas tratadas com sulfadiazina de prata 1,0% diminuíram e os valores de comprimento e largura aumentaram 14,0 e 4,0%, respectivamente.

A seguir, estão relatados os casos dos pacientes e as respectivas feridas tratadas com P1G10 - 0,1% e sulfadiazina de prata 1,0%.

Casos tratados com P1G10 - 0,1%



FIGURA 23- Úlcera por pressão no início do tratamento com P1G10 - 0,1% da paciente BSGD.

Paciente **BSGD**, sexo feminino, 84 anos, normotensa (110 x 70 mmHg), normoesfígmica (70 bpm), afebril (36,0°C), eutrófica (45,0 Kg, 1,55 m, IMC: 18,73), ex-tabagista, negava etilismo, com história de doença de Parkinson. Portadora de duas úlceras por pressão, localizadas nas regiões trocantérica esquerda e isquiática, de estágio III e II, respectivamente; sendo que a ferida selecionada para o estudo foi a trocantérica, que media 1,2 cm de comprimento, 0,2 cm de largura e 3,7 cm de profundidade. A ferida não exibia sinais clínicos de infecção ou necrose em seu leito. À Escala de Braden a paciente obteve score total de 11, ou seja, em risco para o desenvolvimento de úlceras por pressão. Ao avaliar os parâmetros da escala, a paciente apresentava-se com percepção sensorial *muito limitada*, pele *constantemente úmida* (umidade), *restrita à cadeira* (atividade), mobilidade *muito limitada*, nutrição *adequada* e *problema de fricção e cisalhamento*.

Não foram observadas alterações das variáveis de controle nesta paciente, exceto a redução de 46,0% da profundidade da ferida.



FIGURA 24- Úlcera por pressão no início e no final do tratamento com P1G10 - 0,1% da paciente CCJT.

Paciente **CCJT**, sexo feminino, 93 anos, normotensa (110 x 80 mmHg), normoesfígmica (68 bpm), afebril (36,2°C), eutrófica (45,0 Kg, 1,50 m, IMC: 20,0), negava etilismo e tabagismo, com história de cardiopatia isquêmica e demência senil. Portadora de onze úlceras por pressão, localizadas nas regiões costal direita superior e inferior, costal esquerda superior e inferior, sacral, trocantéricas direita e esquerda, isquiáticas direita e esquerda, medial direita do joelho e panturrilha esquerda, todas variando de estágio II a IV; sendo que a ferida selecionada para o estudo foi a costal direita inferior. A ferida media 5,0 cm de comprimento, 2,0 cm de largura e 1,4 cm de profundidade; apresentava tecido de granulação pálido, róseo, além de descolamento da pele de 1,7 cm na posição de 11 horas; não exibia sinais clínicos de infecção e era recoberta por 95,0% de necrose amarelada e úmida em seu leito. À Escala de Braden a paciente obteve escore total de 11, ou seja, em risco para o desenvolvimento de úlceras por pressão. Ao avaliar os parâmetros da escala, a paciente apresentava-

se com percepção sensorial *completamente limitada*, pele *ocasionalmente úmida* (umidade), *restrita à cadeira* (atividade), *completamente imobilizada* (mobilidade), nutrição *adequada* e *problema* de fricção e cisalhamento.

Não foram observadas alterações das variáveis de controle nesta paciente, muito embora seu estado geral fosse frágil. Após uma semana de tratamento, a paciente apresentou piora clínica geral e da ferida, refletida no aumento do comprimento e da largura (5,2 x 3,0 cm, respectivamente), exceto a redução de 46,0% da profundidade da mesma. Decorrido um mês do início do tratamento, a ferida media 4,0 cm de comprimento e 3,0 cm de largura. Os membros da equipe de coleta de dados não verificaram a medida de profundidade nesta data e após 35 dias de tratamento, não avaliaram as medidas finais e não coletaram material para análises bioquímicas, devido à piora da paciente. Contudo, eles registraram o óbito da paciente poucos dias depois do cumprimento do protocolo, apesar da evolução favorável da cicatrização, evidenciada por diminuição da porcentagem de tecido necrótico (40,0%) e mudança da característica do tecido de granulação (avermelhado).



FIGURA 25- Úlcera por pressão no início e no final do tratamento com P1G10 - 0,1% do paciente GMTP.

Paciente **GMTP**, sexo masculino, 89 anos, normotenso (110 x 70 mmHg), normoesfígmico (68 bpm), afebril (35,5°C), com sobrepeso (62,0 Kg, 1,55 m, IMC: 25,8), etilista e tabagista desde os 9 anos de idade, com história de artrite generalizada, portador de três úlceras por pressão, localizadas nas regiões sacral direita e esquerda e tibial lateral esquerda, sendo as sacrais de estágio III e II e a tibial de estágio II. A ferida selecionada para o estudo foi a tibial, que media 2,5 cm de comprimento, 1,7 cm de largura, sem profundidade; apresentava-se totalmente recoberta por tecido necrótico preto e seco. A região circunvizinha à ferida apresentava hiperemia e pele ressecada e descamativa. Ausência de edema, calor ou relatos de dor. Em relação à Escala de Braden o paciente obteve escore total de 15, que para pessoa idosa significava em risco para o desenvolvimento de úlceras por pressão. Ao avaliar os parâmetros da escala, o paciente apresentava-se com percepção sensorial *muito limitada*, pele

ocasionalmente úmida (umidade), *restrito à cadeira* (atividade), mobilidade *muito limitada*, nutrição *adequada* e *nenhum problema aparente* de fricção e cisalhamento.

O paciente e os familiares foram orientados sobre a importância de aliviar a pressão nas áreas das úlceras, elevar o membro inferior afetado, aplicar cremes ou óleos hidratantes na pele íntegra e manter a ferida ocluída. Já na segunda troca de curativo, foram observadas melhoras, tanto no aspecto do tecido necrótico (amarelado e úmido), quanto na característica da pele circunvizinha (hidratada e regressão da hiperemia). A evolução do processo de cicatrização foi lenta, porém constante e, ao completar o período de tratamento, a ferida media 2,3 cm de comprimento e 1,3 cm de largura. O tecido necrótico amarelado e úmido recobria 60,0% do leito, permitindo visualizar 0,2 cm de profundidade e tecido de granulação vermelho-vivo.



FIGURA 26- Úlcera venosa no início e no final do tratamento com P1G10 - 0,1% da paciente LOO.

Paciente **LOO**, sexo feminino, 86 anos, normotensa (130 x 80 mmHg), normoesfígmica (88 bpm), afebril (36,9°C), emagrecida (51,0 Kg, 1,70 m, IMC: 17,64), negava etilismo e tabagismo, com história de insuficiência venosa, portadora de duas úlceras venosas em membro inferior esquerdo, localizadas na região maleolar, uma maior superior e outra menor inferior. A ferida selecionada para o estudo foi a maior, superior, que media 2,5 cm de comprimento, 1,8 cm de largura e 0,1 cm de profundidade; apresentava 70,0% de tecido necrótico amarelado, do tipo esfacelo, e tecido de granulação vermelho-vivo. A pele circunvizinha era ressecada e descamativa, de coloração ocre, hipopigmentada na área de cicatrização recente, não exibia sinais clínicos de infecção. À primeira avaliação, as circunferências das extremidades eram: panturrilha direita – 29,0 cm, panturrilha esquerda – 29,0 cm, tornozelo direito –

19,0 cm e tornozelo esquerdo – 19,5 cm. Edema de membros inferiores discreto (1+/4+), pulsos pediais palpáveis.

No decorrer do tratamento, a paciente não compareceu ao ambulatório por quatro vezes, não seguiu a orientação de repouso com membros inferiores elevados e de aplicação de cremes ou óleos hidratantes em pele íntegra. Após um mês de tratamento, a ferida apresentava piora evidenciada pelo aumento das medidas (3,0 cm de comprimento, 2,5 cm de largura e 0,1 cm de profundidade), aumento de porcentagem de necrose (80,0% do leito) e alteração da coloração da mesma (acinzentada); aumento das circunferências de panturrilhas e tornozelos e, por conseguinte, do edema (2+/4+). A ferida menor, inferior, apresentava-se completamente epitelizada.



FIGURA 27- Úlcera venosa no início e no final do tratamento com P1G10 - 0,1% do paciente OTS.

Paciente **OTS**, sexo masculino, 49 anos, negava etilismo e tabagismo, com história de hemiplegia à direita após acidente vascular encefálico. Portador de uma úlcera venosa em membro inferior esquerdo, localizada na região maleolar, que media 2,0 cm de comprimento, 2,0 cm de largura e 0,2 cm de profundidade; apresentava 80,0% de tecido necrótico amarelado, do tipo esfacelo, e tecido de granulação vermelho escuro. A pele circunvizinha era ressecada e descamativa, de coloração ocre, com restos de tratamentos tópicos anteriores, não exibia sinais clínicos de infecção. À primeira avaliação, as circunferências das extremidades eram: panturrilha direita – 35,5 cm, panturrilha esquerda – 42,0 cm, tornozelo direito – 23,5 cm e tornozelo esquerdo – 28,0 cm. Edema de membros inferiores intenso (4+/4+), pulsos pediais palpáveis.

O paciente era bastante cooperativo com o tratamento seguindo as orientações recomendadas. Porém, como ele morava na periferia da cidade e havia apenas um meio de transporte que o levasse para o ambulatório pela manhã, ele permanecia com os membros inferiores pendentes até o momento da consulta, à tarde. Esta prática prejudicava o retorno venoso e a remissão do edema. Ao final do tratamento o edema diminuiu (panturrilha direita – 35,0 cm, panturrilha esquerda – 40,0 cm, tornozelo direito – 23,0 cm e tornozelo esquerdo – 28,0 cm), houve completo desbridamento da ferida, que apresentava tecido de granulação superficial, vermelho-vivo; diminuição das medidas de comprimento (1,8 cm) e de largura (0,8 cm), melhora das características da pele circunvizinha (coloração e hidratação).



FIGURA 28- Úlcera por pressão no início e no final do tratamento com P1G10 - 0,1% do paciente RBM.

Paciente **RBM**, sexo masculino, 58 anos, normotenso (110 x 60 mmHg), normoesfígmico (70 bpm), afebril (36,5°C), obeso (aproximadamente, 90,0 Kg, 1,50 m, IMC: 40,0), negava etilismo e tabagismo, portador de síndrome de Down, com história de gastrite crônica, artrose generalizada, dermatite em face e em membros inferiores. Encontrava-se em uso de antibióticos para tratamento de pneumonia. Presença de uma úlcera por pressão, na face lateral da coxa direita, de estágio II, que media 2,5 cm de comprimento, 5,0 cm de largura e 0,1 cm de profundidade; 80,0% do leito apresentava-se recoberto por tecido necrótico amarelado. À Escala de Braden o paciente obteve escore total de 8, ou seja, alto risco para o desenvolvimento de úlceras por pressão. Ao avaliar os parâmetros da escala, o paciente apresentava-se com percepção sensorial

completamente limitada, pele muito úmida (umidade), restrito à cadeira (atividade), completamente imobilizado (mobilidade), nutrição muito pobre e problema de fricção e cisalhamento.

O paciente e os familiares foram orientados sobre a importância de aliviar a pressão nas áreas das úlceras, manter a pele livre de umidades, aplicar cremes ou óleos hidratantes na pele íntegra e manter a ferida ocluída. Após uma semana de tratamento, a ferida não apresentou redução de área, mas sim da porcentagem de tecido necrótico (10,0%). Havia terminado o esquema de antibióticos e iniciado outro de 10 dias, pois não obteve melhora satisfatória do quadro respiratório. Concluído um mês de tratamento, a ferida apresentou-se completamente epitelizada.

Casos tratados com sulfadiazina de prata 1,0%



FIGURA 29- Úlcera por pressão no início do tratamento com sulfadiazina de prata 1,0% da paciente LFR.

Paciente **LFR**, sexo feminino, 75 anos, normotensa (110 x 60 mmHg), com sobrepeso (70,0 Kg, 1,60 m, IMC: 27,34), negava tabagismo e etilismo, com história de aterosclerose, portadora de uma úlcera por pressão, localizada na região sacral esquerda, de estágio III, que media 0,5 cm de comprimento, 0,5 cm de largura e 1,5 cm de profundidade. A ferida apresentava descolamento da pele de 4,3 cm na posição de 2 horas e não exibia sinais clínicos de infecção. À Escala de Braden a paciente obteve escore total de 22, ou seja, sem risco para o desenvolvimento de úlceras por pressão. Ao avaliar os parâmetros da escala, a paciente apresentava-se com *nenhuma limitação* da percepção sensorial, *pele raramente úmida* (umidade), *caminha frequentemente* (atividade), *nenhuma*

limitação de mobilidade, nutrição *adequada* e *nenhum problema aparente* de fricção e cisalhamento.

Não foram observadas alterações das variáveis de controle nesta paciente. Após um mês de tratamento, a ferida media 0,4 cm de comprimento e 0,3 cm de largura e 1,0 cm de profundidade. A área de descolamento mantinha-se praticamente inalterada (4,1 cm).



FIGURA 30- Úlcera venosa no início e no final do tratamento com sulfadiazina de prata 1,0% do paciente MCL.

Paciente **MCL**, sexo masculino, 58 anos, hipertenso (150 x 90 mmHg), normoesfígmico (86 bpm), afebril (36,0°C), com sobrepeso (104,0 Kg, 1,87 m, IMC: 29,74), negava tabagismo, etilista social, com história de insuficiência venosa e hipertensão arterial sistêmica. Portador de uma úlcera venosa em membro inferior direito, localizada na região maleolar, que media 2,0 cm de comprimento, 1,5 cm de largura e 0,4 cm de profundidade; apresentava 80,0% de tecido necrótico amarelado, do tipo esfacelo, e tecido de granulação vermelho-vivo. A pele circunvizinha era ressecada e descamativa, de coloração ocre, não exibia sinais clínicos de infecção. À primeira avaliação, as circunferências das extremidades eram: panturrilha direita – 42,5 cm, panturrilha esquerda – 41,5 cm, tornozelo direito – 26,0 cm e tornozelo

esquerdo – 25,0 cm. Edema de membros inferiores moderado (3+/4+), pulsos pediais palpáveis.

Paciente seguia a orientação de hidratação da pele íntegra, porém não realizava o repouso com membros inferiores elevados adequadamente, por razões laborais. A evolução da cicatrização mostrou-se lenta, porém constante. Decorridos os 35 dias de tratamento, a ferida media 1,0 cm de comprimento, 0,7 cm de largura e 0,2 cm de profundidade.

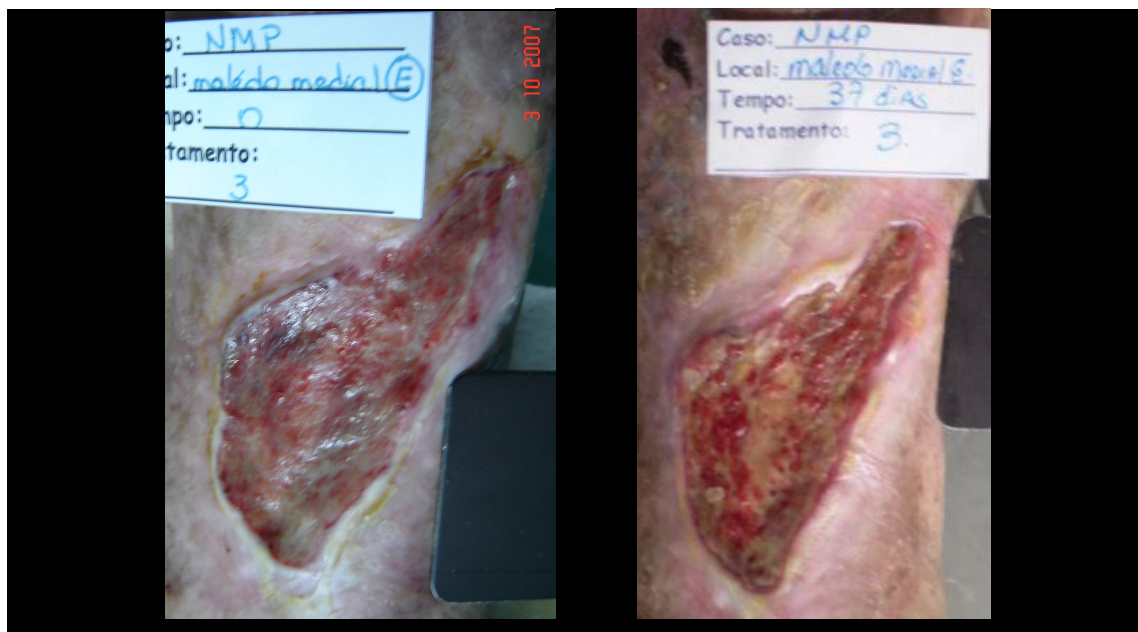


FIGURA 31- Úlcera venosa no início e no final do tratamento com sulfadiazina de prata 1,0% do paciente NMP.

Paciente **NMP**, sexo masculino, 71 anos, normoesfígmico (60 bpm), afebril (35,7°C), eutrófico (81,0 Kg, 1,81 m, IMC: 24,72), negava tabagismo e etilismo, com história de insuficiência venosa e linfática. Portador de duas úlceras venosas em membros inferiores direito e esquerdo, localizadas nas regiões maleolares. A ferida selecionada para o estudo foi a maleolar esquerda, que media 5,0 cm de comprimento, 3,0 cm de largura e 0,2 cm de profundidade; apresentava 80,0% de tecido necrótico amarelado, do tipo esfacelo, e tecido de granulação vermelho escuro, opaco. A pele circunvizinha era ressecada e descamativa, de coloração ocre, não exibia sinais clínicos de infecção. À primeira avaliação, as circunferências das extremidades eram: panturrilha direita – 44,5 cm, panturrilha esquerda – 38,0 cm, tornozelo direito – 26,5 cm e

tornozelo esquerdo – 24,5 cm. Edema de membros inferiores (2+/4+), pulsos pediais palpáveis.

Após 10 dias de tratamento, o paciente não compareceu à consulta no ambulatório. No momento da consulta seguinte, apresentava forte quadro gripal, hipertermia e piora da ferida, evidenciada por aumento da porcentagem de necrose (100,0%), aumento do volume e do odor do exsudato, aumento das medidas de comprimento (6,5 cm), largura (6,0 cm) e profundidade (0,4 cm). A evolução da cicatrização foi lenta e com piora dos parâmetros até o final do protocolo. Ao final de 45 dias de tratamento, a ferida voltou a evoluir positivamente e o paciente permaneceu em acompanhamento no ambulatório.



FIGURA 32- Úlcera venosa no início e no final do tratamento com sulfadiazina de prata 1,0% da paciente PMF.

Paciente **PMF**, sexo feminino, 64 anos, normotensa (130 x 80 mmHg), normoesfígmica (84 bpm), afebril (37,2°C), obesa (91,0 Kg, 1,54 m, IMC: 38,37), negava etilismo e tabagismo, com história de insuficiência venosa. Portadora de duas úlceras venosas em membro inferior esquerdo, localizadas na região maleolar, uma maior superior e outra menor inferior. A ferida selecionada para o estudo foi maior, superior, que media 1,0 cm de comprimento e 1,0 cm de largura, sem profundidade; apresentava 70,0% de tecido necrótico amarelado, do tipo esfacelo, e tecido de granulação róseo, pálido. A pele circunvizinha era ressecada, com dermatite exsudativa, não exibia sinais clínicos de infecção. À primeira avaliação, as circunferências das extremidades eram: panturrilha direita – 40,0 cm, panturrilha esquerda – 40,0 cm, tornozelo direito – 23,0 cm e

tornozelo esquerdo – 22,0 cm. Edema de membros inferiores (2+/4+), pulsos pediais palpáveis.

No decorrer do tratamento, a paciente não compareceu ao ambulatório apenas uma vez, cumpria as orientações de aplicação de cremes ou óleos hidratantes em pele íntegra e repouso com membros inferiores elevados. Após 20 dias de tratamento, apresentava remissão completa da dermatite exsudativa e do edema. As circunferências das extremidades eram: panturrilha direita – 39,0 cm, panturrilha esquerda – 38,0 cm, tornozelo direito – 22,0 cm e tornozelo esquerdo – 21,0 cm. Ao final do período de estudo, as feridas apresentavam-se completamente epitelizadas, com tecido friável.

4.5. Programa para análise de imagem digital

- 4.5.1. Calibração do padrão secundário

Foram analisadas 52 imagens dos padrões primário e secundário (FIG. 33), sendo 22 imagens capturadas pelo operador 1, 22 imagens capturadas pelo operador 2 e 8 imagens capturadas pelo operador 3.



FIGURA 33- Padrão primário e secundário, respectivamente.

Conforme descrito na seção 3.8.2, utilizou-se o programa Image-Pro Plus®, versão 3.0, para tratamento das imagens e cálculo do número de *pixels*. Para verificação do número de *pixels* na faixa de operação, fragmentou-se o bloco padrão. Assim, dividiu-se o valor da largura do bloco (25,0 mm) pelo número de *pixels* de cada corte. Portanto, se no corte da largura do bloco padrão existiam 329 *pixels*, logo, 1 *pixel* media 0,0759878 mm.

Como foi realizado um corte de cada uma das 52 imagens, capturadas pelos três diferentes operadores, obteve-se 52 valores para 1 *pixel*. Estes valores foram analisados e obteve-se a média (0,0787 mm) e o desvio padrão (0,00519).

Portanto, o resultado da calibração estabeleceu que 1 *pixel* mede 0,0787 mm de comprimento e, sendo o *pixel* um quadrado, logo, a área do *pixel* é 0,0619 mm².


0,0787 mm 

FIGURA 34- Representação esquemática do comprimento do *pixel*.

Posteriormente, multiplicou-se o comprimento de 1 *pixel* pelas quantidades de *pixels* encontradas nas faixas de operação dos 52 cortes da largura do padrão secundário. Assim, foram calculados 52 valores para a largura do padrão secundário, cuja média foi 51,7868 mm (DP = 0,67439).

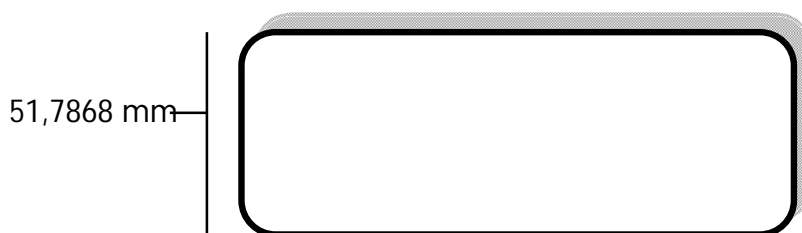


FIGURA 35- Representação esquemática da largura do padrão secundário.

- 4.5.2. Validação do *software* em modelo

Primeiramente, utilizando o programa denominado de *Biometrics*, foram analisadas as 52 imagens que simulam feridas desenhadas em papel *vergé*, sendo:

- 11 ovais e 11 retangulares, capturadas pelo operador 1;
- 11 ovais e 11 retangulares, capturadas pelo operador 2 e
- 8 retangulares, capturadas pelo operador 3.

As médias das áreas e dos perímetros das figuras ovais e das retangulares, de acordo com o operador e o software utilizado, estão descritas nas TAB. 21 e 22.

TABELA 21

Valores médios das áreas e perímetros das figuras ovais, com seus respectivos desvios-padrão (DP) e coeficientes de variação (CV), de acordo com o operador e o *software* utilizado.

Programa	Operador 1 (n = 11)			Operador 2 (n = 11)			Operador 1+2 (n = 22)	
	Média	DP	CV%	Média	DP	CV%	Média	DP
<i>KS-300®</i>								
Perímetro (mm)	74,63	0,96*	1,3	73,82	1,06*	1,4	74,22	1,06
Área (mm ²)	308,91	6,39	2,1	303,68	4,37	1,4	306,29	5,97
<i>Biometrics</i>								
Perímetro (mm)	61,66	0,39	0,6	60,35	1,29	2,1	60,75	1,02
Área (mm ²)	297,71	3,76	1,3	289,90	12,30	4,2	293,80	9,73

Legenda: n – número de imagens DP – desvio padrão CV – coeficiente de variação

Todas as comparações foram significativas ($p < 0,05$), exceto em *: perímetro obtido com o programa KS-300® de imagens do operador 1 e 2.

TABELA 22

Valores médios das áreas e perímetros das figuras retangulares, com seus respectivos desvios-padrão (DP) e coeficientes de variação (CV), de acordo com o operador e o *software* utilizado.

Programa	Operador 1 (n = 11)			Operador 2 (n = 11)			Operador 3 (n = 8)			Operador 1+2+3 (n = 30)	
	Média	DP	CV%	Média	DP	CV%	Média	DP	CV%	Média	DP
<i>KS-300®</i>											
Perímetro (mm)	72,17	2,84	3,9	69,31	1,92	2,8	68,65	0,86	1,3	70,18*	2,58
Área (mm ²)	240,46	8,48	3,5	223,85	5,80	2,6	231,80	4,80	2,1	232,06**	9,71
<i>Biometrics</i>											
Perímetro (mm)	55,42	0,37	0,7	52,76	1,36	2,6	53,60	0,25	0,5	53,95*	1,44
Área (mm ²)	244,44	3,23	1,3	221,63	11,14	5,0	228,60	2,17	0,9	231,85**	12,25

Legenda: n – número de imagens DP – desvio padrão CV – coeficiente de variação

Todas as comparações entre operadores foram significativas ($p < 0,05$), exceto para as áreas quando utilizado o programa KS-300®. * $p = 0,000$ ** $p = 0,658$

Nas TAB. 21 e 22 são mostradas as médias, desvios-padrão e coeficientes de variação de área e perímetro das figuras utilizadas para o teste de reprodutibilidade e o teste de variabilidade inter e intra-operador.

Observa-se que todos os coeficientes de variação não ultrapassam 6,0%, tanto para as figuras ovais quanto para as retangulares, indicando que a variação dos operadores é adequada.

Os resultados obtidos de áreas e perímetros de figuras ovais mostraram diferenças significativas entre operadores. Observaram-se também diferenças estatisticamente significativas de área e perímetro quando se comparam os *softwares* KS-300® e *Biometrics* ($p < 0,00$), inclusive sem considerar a variabilidade do operador.

Nos resultados obtidos de figuras retangulares, podem-se observar diferenças estatisticamente significativas entre os três operadores, tanto para os valores de perímetro quanto de área, quando utilizado o *software Biometrics*. Quando utilizado o KS-300®, houve diferenças entre os operadores para os valores de área, entretanto não houve diferenças entre os operadores 2 e 3 para os valores de perímetro.

Quando se comparam os valores de área e perímetro de um mesmo operador utilizando os *softwares*, observa-se que há diferenças nos valores do perímetro comparando os três operadores e não há diferenças nos valores de área com os mesmos três operadores.

Finalmente, quando se comparam ambos os *softwares*, sem considerar o operador, verifica-se que não há diferenças significativas nos valores de área ($p = 0,658$) e sim de perímetro ($p = 0,000$).

As diferenças decorrentes de operadores e tipo de *software* utilizado podem ser consideradas como clinicamente desprezíveis.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Fase clínica utilizando o camundongo como modelo experimental

Uma nova droga só é levada à experimentação em seres humanos depois de conhecidos seus aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos em provas clínicas *in vitro* ou em modelos experimentais (OPAS, 1997).

Amparados na propriedade cicatrizante atribuída à fração P1G10 do látex de *Carica candamarcensis*, estudou-se o efeito desta fração no tratamento de feridas cutâneas provocadas pelo calor. Os resultados mostraram que P1G10 - 0,01% e 0,1% abreviam o tempo de epitelização das feridas. Este resultado parece ser específico para P1G10 ao contrário de outra enzima proteolítica de *Carica papaya*, a papaína, utilizada em formulações desbridantes, que não melhoram significativamente a epitelização sob as mesmas condições experimentais, uma vez que as concentrações de papaína entre 0,1 e 1,0% não apresentam efeito sobre a cicatrização.

A utilização de enzimas proteolíticas para o tratamento de feridas cutâneas provocadas por queimaduras é preconizada para remover a necrose presente em seu leito. Estes protocolos baseiam-se em breve (4 horas) e única ou, ocasionalmente, múltiplas exposições ao agente desbridante enzimático, utilizado em concentrações relativamente altas (2,0 – 10,0%) (Rosenberg *et al.*, 2004). A aplicação da protease é precedida de limpeza da área com solução fisiológica (NaCl 0,9%) para facilitar a ação sobre as proteínas desnaturadas.

Neste estudo, a abordagem foi diferente, uma vez que a protease foi aplicada continuamente, em concentrações de 10 a 50 vezes menores que as

utilizadas com papaína, até a epitelização completa, obtida em muitos dos casos. Em experimentos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa, observou-se que concentrações maiores de P1G10 (5,0 a 10,0%) aumentam a resposta inflamatória e provocam vastos danos teciduais após 1 ou 2 dias de tratamento (Mello, 2005).

Ao utilizar este protocolo, observou-se que P1G10 - 0,1% aumenta significativamente a epitelização de queimaduras em comparação com o grupo controle, no período de 25 a 27 dias (GRAF. 3) e no 34º dia (GRAF. 5). Ademais, naquelas feridas ainda não epitelizadas, o grupo tratado com P1G10 - 0,1% apresentou significativa redução de perímetro e de área no 31º dia de tratamento, utilizando-se o *software Biometrics* para a análise planimétrica.

Ressalta-se que o período de epitelização não foi idêntico nos experimentos mostrados nos GRAF. 3 e 5. No primeiro experimento (GRAF. 3), no 31º de tratamento, a maioria dos animais dos seis grupos atingiu a epitelização, enquanto que, no segundo experimento (GRAF. 5) e no mesmo período, alguns animais ainda estavam em processo de epitelização, o que sugere um aparente atraso inicial do processo. Atribui-se estas variações às questões sazonais, como umidade do ar, temperatura ou variações individuais, considerando que ambos os experimentos tenham sido realizados com o mesmo lote do princípio ativo. No entanto, percebe-se que P1G10 - 0,1% foi mais eficiente na epitelização de queimaduras, tanto no primeiro quanto no segundo experimento.

Em estudo experimental recém publicado, os autores avaliaram a eficácia de cura de queimaduras térmicas tratadas com duas concentrações de outra protease, a papaína (1,0 e 2,5%), incorporada em gel. Utilizaram-se camundongos *Swiss*, como modelo animal, previamente depilados e anestesiados, antes de proceder a queimadura com um cilindro metálico de 10 mm, aquecido por 30 segundos em chama. Os animais foram tratados uma vez por dia até a epitelização completa e a análise de redução de área foi realizada por traçado linear convencional. O tempo de epitelização foi menor nos três grupos tratados com: papaína 1,0% (24 dias), papaína 2,5% (22 dias) e creme de sulfadiazina de prata e gluconato de clorexidine 1,0% (23 dias); em comparação com o grupo não tratado (32 dias) e o tratado com o gel Carbopol® (29 dias) ($p < 0,05$). Ressalta-se que, apesar do tempo de epitelização ter sido menor nos grupos tratados com papaína e sulfadiazina de prata, a área inicial das queimaduras era também menor (Gurung, Skallo-Basnet, 2009).

Segundo os resultados aqui apresentados (GRAF. 3), o grupo tratado com a fração P1G10 - 0,1% exibiu taxas de epitelização mais elevadas que aqueles tratados com papaína ou sulfadiazina de prata, os quais apresentaram perfil semelhante ao grupo controle.

À microscopia dos cortes histológicos, confirmam-se as observações macroscópicas, nas quais os grupos tratados com P1G10 obtiveram melhor resultado no reparo que o grupo controle (FIG. 20).

Considerando que as concentrações da fração proteolítica utilizada neste estudo foram de 0,01% e 1,0%, o seu efeito desbridante deve ser reduzido em

comparação com outras formulações que contenham maiores concentrações de enzimas proteolíticas (5,0 a 10,0%), cuja finalidade principal é a remoção do tecido necrótico do leito da ferida. Apesar da menor concentração utilizada neste estudo, a presença contínua (durante algumas semanas) da protease no leito ulceral, provavelmente, contribuiu para a limpeza de debris.

Acredita-se que o principal mecanismo de ação de P1G10 para a cicatrização seja devido à sua ação mitogênica e angiogênica, previamente observadas em culturas de fibroblastos e em camundongos submetidos à implantes, respectivamente, comparável com o fator de crescimento epidermal (EGF) humano (Silva *et al.*, 2003, Gomes *et al.*, 2005, Mello *et al.*, 2006, Mello *et al.*, 2008). A utilização do EGF para tratamento de queimaduras foi recentemente publicada, onde os autores relatam aumento de epitelização coerente com os achados neste estudo (Zhang *et al.*, 2007).

Além disso, P1G10 parece diminuir o tempo de recrutamento de macrófagos, responsáveis pela fagocitose de debris, resultando em desbridamento precoce (TAB. 6).

5.2. Fase clínica I

Os ensaios clínicos de fase I se constituem na primeira etapa de avaliação de um produto químico/biológico em seres humanos, são, geralmente, precedidos de provas em modelos experimentais em animais; devem ser conduzidos no país de produção da droga e envolvem um número limitado de voluntários adultos sadios (OPAS, 1997).

No teste de segurança e inocuidade de P1G10 - 0,1%, observou-se à inspeção que nenhuma das pessoas voluntárias desenvolveu qualquer sinal e sintoma ao produto. A pele do local de aplicação manteve-se íntegra, não foram observados eritema, macicez, ressecamento ou descamação, calor, vesículas ou bolhas, relatos de dor ou prurido.

Contudo, quatro das vinte e cinco pessoas voluntárias relataram prurido e apresentaram hiperemia no local de aplicação do filme de poliuretano. Estes sinais e sintomas regrediram totalmente quando outro adesivo hipoalergênico foi aplicado. Sabe-se que os curativos adesivos provocam alta incidência de dermatite eczematosa e formação de vesículas na pele. Supõe-se que a forma de aplicação desta cobertura possa afetar a incidência de dermatites, uma vez que as indústrias produtoras recomendam a aplicação sobre a pele livre de tensões (estiramentos). Em um estudo, avaliaram-se dois tipos de coberturas adesivas, aplicados sem exercer tensão sobre a pele, em relação ao desenvolvimento de vesículas, e concluem que a duração e o local da cirurgia têm mais efeito que o tipo de cobertura (Koval *et al.*, 2007). Outros autores avaliaram a aplicação de filme de poliuretano sobre a pele de duas formas – com estiramento prévio e

sem estiramento prévio da cobertura. Eles concluíram que não existem diferenças na taxa de formação de vesículas em relação à forma de aplicar a cobertura (Gupta, Lee, Moseley, 2002).

Em relação aos parâmetros bioquímicos de sangue e urina, pôde-se observar que as diferenças estatisticamente significativas encontradas entre os grupos não têm relevância clínica, pois estão compreendidas nos intervalos de normalidade. Percebeu-se que as três pessoas do sexo masculino pertencentes à amostra foram alocadas, após o sorteio aleatorizado, no grupo que recebeu P1G10 - 0,1%. Esta coincidência pode ser a justificativa da diferença significativa dos valores médios de hematócrito e hemoglobina, maiores no grupo que recebeu P1G10 em relação ao que recebeu o creme hidrossolúvel.

Nos testes pré-clínicos de toxicidade tópica aguda e tópica sub-crônica e crônica de P1G10, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com a fração e os grupos controle. No primeiro, verificou-se que exposição repetida à fração protéica P1G10 (0,1 e 1,0%), em pele íntegra e escarificada de camundongos, não promoveu qualquer alteração que pudesse ser caracterizada como efeito tóxico (irritação e corrosão), exceto na concentração de 10,0% (Mello *et al.*, 2006). No segundo teste, a aplicação de P1G10 - 0,1% em pele íntegra de camundongos, durante três meses, não provocou alterações histopatológicas ou nos órgãos selecionados, indicando ausência de toxicidade no modelo estudado (Lemos *et al.*, 2006).

Diante do exposto, não há evidências de toxicidade da fração P1G10 - 0,1% em pele íntegra de pessoas híginas.

5.3. Fase clínica II

Nesta etapa da pesquisa, realizou-se um estudo piloto para avaliação do efeito tópico de P1G10 em uma pequena amostra, composta por pessoas portadoras de úlceras por pressão (50,0%) e venosas (50,0%). Foram colhidas amostras de sangue para análise bioquímica, a fim de avaliar a toxicidade do produto. De acordo com os dados apresentados, não houve diferenças estatisticamente significativas dos parâmetros bioquímicos entre o grupo tratado com P1G10 - 0,1% e sulfadiazina de prata, exceto os de fosfatase alcalina e proteínas totais. Nenhuma das variáveis de controle apresentou associação com o tipo de tratamento recebido. Bem como, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as medidas de comprimento, largura e profundidade das feridas em relação ao tipo de tratamento. Porém, percebeu-se diminuição dos valores médios de comprimento (51,0%), largura (67,0%) e profundidade (37,0%) das feridas tratadas com P1G10 - 0,1%, enquanto que nas feridas tratadas com sulfadiazina de prata 1,0%, apenas os valores de profundidade diminuíram em 74,0%.

Os ensaios clínicos de fase II são pilotos, limitados a um pequeno número de pacientes, com o objetivo de mostrar a atividade terapêutica da droga. Para tal, faz-se necessário um grupo de comparação, que neste estudo utilizou creme de sulfadiazina de prata 1,0%, para o tratamento das feridas (OPAS, 1997). Este produto foi o escolhido por ser prescrito usualmente pelos profissionais de saúde de Ciego de Ávila, com a finalidade de tratar feridas, independentemente da etiologia.

Não obstante, sabe-se que o creme de sulfadiazina de prata é a primeira escolha no tratamento de queimaduras, justificada pela redução da morbimortalidade e o índice de complicações desses pacientes (Monafo *et al.*, 1976; Sparkers, 1997). Porém, também são conhecidos seus efeitos deletérios sobre ceratinócitos e fibroblastos, células essenciais ao processo cicatricial, como descrito na seção 1.1, bem como efeitos adversos: reações alérgicas e de hipersensibilidade da pele, leucopenia ocasional e resistência bacteriana (Mackway-Jones, 2008).

Outros produtos tópicos também utilizados na prática clínica dos serviços de Ciego de Ávila eram a neomicina, associada ou não à gentamicina; a nitrofurazona, mafenida, mercúrio cromo, álcool a 90,0%, álcool tanino, óleo de girassol ou mel.

Os cremes ou pomadas contendo neomicina, nitrofurazona e mafenida são antibióticos tópicos, geralmente indicados para tratamento de queimaduras, mas amplamente utilizados para tratamento de feridas agudas ou crônicas, infectadas ou apenas colonizadas. Porém, a utilização de pomadas contendo antibióticos no tratamento de feridas colonizadas tem sido, atualmente, contraindicada. Esses produtos não têm a sua eficácia comprovada, além de propiciar o aparecimento de alergias, sensibilidade e microrganismos resistentes, como demonstrado no GRAF. 9. Esta sensibilização pode desencadear reações alérgicas a outros produtos, tais como gaze e atadura de crepom (Leaper, 1994; Field, Kerstein, 1994; White, Cooper, Kingsley, 2001).

Quanto ao uso das pomadas antibióticas no tratamento das feridas infectadas, sabe-se que a sua absorção é insuficiente para tratá-las, pois não atingem níveis séricos adequados para debelar a infecção (Doughty, 1992). Antibióticos sistêmicos apropriados são considerados, nestes casos, como essenciais para o tratamento de feridas infectadas. Além disso, a antibioticoterapia tópica rotineira pode aumentar a resistência dos microrganismos aos antibióticos, situação esta já crítica em alguns países, principalmente em pacientes queimados (White, Cooper, Kingsley, 2001; Neely *et al.*, 2009).

A neomicina tópica causa mais freqüentemente alergias, e, quando estas ocorrem, desencadeiam, simultaneamente, resposta alérgica à canamicina, gentamicina, sisomicina e tobramicina. A ocorrência de dermatite de contato à neomicina é freqüente e, nos pacientes sensíveis a este antibiótico tópico, há também sensibilidade à bacitracina associada à neomicina. O tratamento com esse medicamento não erradica as bactérias das feridas (Gette, Marks, Maloney, 1992; Niedner, 1997; Neely *et al.*, 2009).

A utilização de anti-sépticos no tratamento de feridas, tais como o álcool e o mercúrio cromo, é um tema controverso e debatido por muitos anos. Na década de 1920, Fleming investigou a ação de vários anti-sépticos utilizados em feridas com infecção e concluiu que todos eram mais tóxicos aos leucócitos quando comparados às bactérias (Pollock, 1990). Sabe-se que estas soluções vêm causando mais transtornos que benefícios no processo de cicatrização, por serem citotóxicas para fibroblastos, interferindo na formação do colágeno,

retardando a epitelização e diminuindo a força tênsil do tecido neoformado. Em presença de matéria orgânica, como sangue, pus ou gordura, sua ação bactericida é reduzida ou inativada (White, Cooper, Kingsley, 2001; Mertz *et al.*, 1984; Teepe *et al.*, 1993).

A sacarose é descrita como tratamento tópico de feridas desde a época dos cirurgiões egípcios, que a aplicavam na forma de mel. Outros povos antigos, como os índios peruanos, colombianos e chilenos, também a usavam nas formas de mel, melaço e xarope (Galego *et al.*, 1997). Atualmente, sua utilização ainda é amplamente difundida, sob a justificativa de constituir-se em produto de fácil acesso, inócuo, desbridante, bactericida/bacteriostático, de custo reduzido, diminuindo os gastos com antibióticos (Rahal *et al.*, 1979; Weiss *et al.*, 1984; Tostes, Leite, 1994; Pieper, Caliri, 2003).

O efeito bactericida do açúcar foi demonstrado, *in vitro*, para *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella*, e bacteriostático para *Bacillus subtilis* (Rahal *et al.*, 1979). No entanto, o açúcar tem somente ação bacteriostática para os grupos bacterianos supracitados. Acredita-se que o efeito bacteriostático se deva à hiperosmolaridade do produto, que desidrata os microrganismos (Prata *et al.*, 1988).

Existe registro na literatura de um aumento significativo da glicemia em ratos, 120 minutos após aplicação de açúcar nas feridas (Galego *et al.*, 1997). Entretanto, em pesquisas realizadas em humanos, a variação de glicemia não foi percebida por alguns autores (Weiss *et al.* 1984; Trouillet *et al.*, 1985), e este dado

não foi investigado por outros (Rahal *et al.*, 1979; Knutson *et al.*, 1981; Haddad *et al.*, 1983; Prata *et al.*, 1988; Ribeiro *et al.* 1996; Haddad, Bruschi, Martins, 2000).

Estudo comparativo demonstrou que o custo do tratamento utilizando o açúcar é superior àqueles em que se utilizavam coberturas interativas. O fator determinante desse custo elevado foi o aumento do número de trocas do curativo para garantir a osmolaridade do produto e, conseqüentemente, sua ação (Borges, Gomes, Saar, 1999).

Quanto à utilização específica de óleo de girassol para o tratamento de feridas, até o momento, não há evidências clínicas que possam justificá-la.

As proteases exógenas geralmente são indicadas para a realização de desbridamento enzimático de feridas, ou seja, a remoção de tecido não-viável, promovendo condições favoráveis ao processo de cicatrização. As principais proteases que compõem este grupo são a colagenase e a papaína (Ramundo, 2007).

Os primeiros trabalhos publicados sobre a colagenase datam de 1945 e 1948. Trata-se de uma enzima proteolítica derivada da bactéria esporulada *Clostridium histolyticum*. Esta enzima digere o colágeno desnaturado e destrói as fibras de colágeno endógeno, porém é instável e inativada por agentes quelantes, íons de metais pesados, hexaclorofeno, tintura de iodo, timerozal, nitrofurazona, álcool a 70,0%, neomicina, hidrocloreto de mafedine e pH alcalino (Jennison, 1945; Bidwell, Van Heynigen, 1948; Marazzi *et al.*, 2006; Ramundo, 2007).

Após revisão sistemática de literatura de trabalhos publicados no período de janeiro de 1960 a fevereiro de 2008, sobre a eficácia de agentes enzimáticos no desbridamento, os autores relataram que a colagenase é mais eficaz que o placebo para desbridamento de úlceras por pressão, úlceras de membros inferiores e queimaduras superficiais; e que uma terapêutica combinada por desbridamento cirúrgico inicial, seguido de aplicações tópicas de colagenase e uma série de desbridamento mecânico conservador é a melhor opção para feridas crônicas indolentes (Ramundo, Gray, 2008).

Em outro estudo, retrospectivo, de 1999 a 2003, cuja amostra contou com 647 pacientes ambulatoriais portadores de queimaduras e 332, de úlceras crônicas de diferentes etiologias, tratadas com colagenase, os autores avaliaram a eficácia desta protease e relataram que o tempo médio de reparo foi de 15,4 semanas e que havia correlação positiva entre área da ferida e tempo de reparo (Marazzi *et al.*, 2006).

A primeira publicação sobre a papaína data de 1879. Esta protease, conforme descrito na seção 1.4, tem sido utilizada no Brasil nas concentrações de 10,0%, para desbridamento de escaras (necrose negra e seca), e de 1,0 a 4,0%, para desbridamento de esfacelo ou para estimular a formação do tecido de granulação (Klasen, 2000; Pieper, Caliri, 2003).

Não obstante, quando a colagenase é comparada à papaína, esta última é mais eficaz nos índices de cura (Alvarez *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2002).

A amostra deste estudo contou com a mesma porcentagem de pessoas portadoras de úlceras venosas e úlceras por pressão. As úlceras venosas são

causadas pelo retorno ineficaz do sangue venoso tecidual para o coração ou insuficiência venosa crônica (Doughty, Holbrook, 2007). As úlceras por pressão, por sua vez, são definidas como áreas localizadas de necrose que desenvolvem quando um tecido mole é comprimido entre uma proeminência óssea e uma superfície externa por um prolongado período de tempo (NPUAP, 1989).

Estas etiologias são das mais freqüentes, cujo tratamento é complexo e de alto custo. De todas as úlceras de membros inferiores, 80,0 a 95,0% são venosas, sendo que sua prevalência varia de 0,3 a 2,0% (Sieggreen, Kline, 2004; Reichenberg, Davis, 2005). A prevalência de úlceras por pressão varia de acordo com vários fatores. Segundo dados do National Pressure Ulcer Advisory Panel, a prevalência de úlcera por pressão entre pacientes hospitalizados está entre 3,0% a 14,0%, números que dependem dos critérios utilizados para inclusão das úlceras em estágio I (NPUAP, 1989). Em estudo realizado em 2002 e 2003, na Alemanha, foram avaliados 16.728 pacientes hospitalizados e 4.846 sob cuidados domiciliares. Encontraram-se 21,1% de prevalência de úlcera por pressão, sendo que o número desta úlcera por paciente foi maior em hospitais (1,91) que em domicílios (1,42) (Lahmann, Halfens, Dassen, 2006).

Os cinco pacientes portadores de úlceras por pressão foram atendidos em seus próprios domicílios e quatro, portadores de úlceras venosas, no ambulatório do Hospital Antonio Luaces Iraola.

Em relação aos exames bioquímicos dos pacientes, alguns parâmetros importantes para avaliação de toxicidade não foram realizados, devido às precárias condições do laboratório de análises clínicas do Hospital da cidade e à

falta ou inadequação de material. Ademais, este serviço não é submetido à certificação de qualidade.

De acordo com os resultados obtidos dos parâmetros bioquímicos, percebeu-se que os valores médios de fosfatase alcalina de ambos os grupos ao final do tratamento aumentaram em comparação com os mesmos resultados no início do estudo, excedendo os limites máximos de normalidade. Além disto, ao comparar os valores médios deste exame do grupo tratado com P1G10 - 0,1% com do grupo tratado com sulfadiazina de prata 1,0%, ao término do estudo, observou-se diferenças estatisticamente significativas entre eles ($p = 0,029$), sendo que no grupo tratado com P1G10 - 0,1% os valores foram maiores.

A fosfatase alcalina é uma enzima produzida em vários órgãos, como intestinos, ossos e fígado; marcadora de colestase intra e extra-hepática, porém pouco específica, por isto encontra-se elevada na cirrose biliar primária, alguns tipos de tumores, intestinais, renais, leucocitários e placentários. Suas concentrações também podem aumentar sempre que há aumento da atividade das células ósseas (osteólise) ou como resultado de distúrbios ósseos (câncer, osteomalácia etc). Para avaliar a doença hepática são também considerados o aumento simultâneo de gama-glutamilttransferase e de 5-nucleotidase. Sendo assim, a elevação isolada de fosfatase alcalina não tem valor clínico na identificação de possíveis acometimentos hepáticos (Pedroso, Oliveira, 2007).

Como as feridas avaliadas não apresentavam áreas de exposição óssea ou osteomielite, o aumento da concentração de fosfatase alcalina foi inespecífico.

Ao final do tratamento, outro parâmetro bioquímico que apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,015$) entre o grupo tratado com P1G10 - 0,1% e o grupo tratado com sulfadiazina de prata foram as proteínas totais. Todavia esta diferença respeitava os limites dos valores normais, portanto, sem relevância clínica.

Ao avaliar as dimensões das feridas no início e ao final do tratamento, no que se refere a comprimento, largura e profundidade foram notadas diferenças nas porcentagens de redução, mas não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas, talvez devido ao tamanho amostral limitado.

A análise planimétrica das imagens digitais capturas não foi realizada utilizando-se os *softwares Biometrics* ou KS-300®, devido à má qualidade das mesmas (foco, luminosidade, enquadramento, distanciamento), principalmente daqueles pacientes atendidos nos domicílios, onde as condições ambientais não podiam ser controladas.

Na pesquisa clínica, um dos problemas mais comuns é a taxa de recrutamento baixa, uma vez que o número de sujeitos que atendem os critérios de inclusão e que concordam em participar é mais baixo ou muito mais baixo que o número projetado no início (Hulley, Newman, Cummings, 2006). Neste estudo, 20 pacientes compunham a amostra inicialmente, mas no decorrer do tratamento houve perdas devido à falecimento de um paciente, piora clínica de outro, piora das condições da ferida após uma semana de tratamento de dois pacientes e confirmação de diagnóstico de câncer de outro.

Outros problemas foram identificados no processo, tais como desorganização ou inexistência do serviço de acompanhamento domiciliar; distância das residências e ausência de meio de transporte; precariedade do serviço de análises clínicas; métodos inadequados de prevenção e tratamento de feridas; impossibilidade de aquisição de: terapêutica compressiva de membros inferiores, como as meias elásticas compressivas para os pacientes portadores de úlceras venosas e de superfícies redutoras de pressão, bem como de fraldas descartáveis, para controle de umidade da pele, para os pacientes portadores de úlceras por pressão. Tais problemas, incluindo o recrutamento, são exemplos de dificuldades para manter as condições de estudo controladas.

5.4. Programa para análise de imagem digital

O cálculo da área de uma ferida utilizando técnicas convencionais de medidas de maior largura, comprimento e profundidade tem sido utilizado extensivamente na prática clínica, com o objetivo de avaliar a evolução do processo de cicatrização de uma ferida. Entretanto, essa técnica apresenta dificuldades relacionadas à definição do contorno e à sua precisão.

A identificação precisa da margem da ferida quando se usa o traçado linear convencional influencia na determinação da área da ferida, pois sofre variações inter-operadores, devido ao posicionamento do paciente que traciona a pele, à curvatura corporal e ao afunilamento dos membros (Flanagan, 2003a,b).

O cálculo da área e perímetro da ferida utilizando técnicas de imagens mostrou-se útil, preciso e de grande informação. A análise de imagens foi realizada por dois *softwares*, um deles, o KS-300[®], amplamente utilizado em diversos estudos e o outro desenvolvido em cooperação com outra equipe de investigadores da Escola de Engenharia da UFMG.

Nossos resultados mostraram que a estimativa de medidas de área e perímetro em figuras que simulam áreas de feridas foi amplamente satisfatória. Os desvios-padrão e coeficientes de variação indicaram que todos os operadores obtiveram baixos valores de índices de variabilidade e coeficientes de variação, atingindo este último o valor máximo de 6,0%. Também foi mostrado que as figuras ovais tiveram maiores índices de variabilidade que as figuras retangulares, o que era esperado, dada a sinuosidade da figura que impacta na definição da borda no momento de realizar o contorno da mesma.

Os resultados também mostraram diferenças nas medições de áreas e perímetros das figuras entre os operadores e métodos utilizados para dimensionamento dessas medidas, tanto para as formas ovais como para as formas retangulares. Entretanto, a dimensão dessas diferenças entre operadores e entre os dois métodos, tanto nas figuras ovais quanto nas retangulares, são mínimas e sugerem que não teriam impacto significativo na avaliação clínica. Por exemplo, as diferenças mostradas entre os operadores para medida de perímetro variaram entre 0,81 e 3,52 mm e de 5,23 a 23,0 mm² para área. Ressalta-se que nos testes de reprodutibilidade apresentados neste estudo, foram utilizadas apenas duas figuras, a oval e a retangular, sem variação de

suas dimensões, ou seja, não houve variabilidade no tamanho dos modelos. Isto certamente contribuiu para o surgimento das diferenças significativas entre operadores e técnicas de análise das imagens.

Em estudo cujo objetivo foi comparar a técnica de mensuração da ferida por contorno convencional linear e por programa digitalizado automático, os autores não encontraram variações intra-operadores, mas encontraram variações significativas inter-operadores para as duas técnicas. As medidas lineares mostraram maior desvio padrão que as medidas obtidas por meio do programa (Haghpanah *et al.*, 2006).

A partir desses dados, pode-se concluir que os métodos de análise de imagem, mesmo que utilizados por diversos operadores, apresentam reprodutibilidade aceitável. O *software* desenvolvido, *Biometrics*, apresenta bom critério de comparabilidade com o *software* KS-300®, comercialmente distribuído, mas que não se adéqua a diversas plataformas computacionais, como aquele aqui proposto, além de apresentar restrições relacionadas à resolução das imagens. Sendo assim, o *software* *Biometrics* foi utilizado para análise de redução de área e perímetro das queimaduras confeccionadas nos camundongos, com bons resultados.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Ao utilizar a fração P1G10 de *Carica candamarcensis* no tratamento de queimaduras em modelos animais, observou-se que P1G10 - 0,1% aumenta significativamente a epitelização destas feridas em comparação com o controle, no período de 25 a 27 dias e no 34º de tratamento.

Houve significativa redução do perímetro e da área das queimaduras tratadas com a fração P1G10 - 0,1%, no 31º dia.

Histologicamente, o reparo tecidual foi mais precoce nos grupos tratados com a fração P1G10 - 0,01% e 0,1% que no grupo controle.

No ensaio clínico de fase I, realizado para avaliar a segurança e a inocuidade da fração P1G10 - 0,1%, pôde-se inferir que não há evidências clínicas e laboratoriais de toxicidade do produto em pele íntegra de pessoas híidas.

No ensaio clínico de fase II, também não foram encontradas evidências clínicas e laboratoriais de toxicidade da fração P1G10 - 0,1% em úlceras por pressão ou venosas, considerando a limitação do tamanho amostral.

As feridas tratadas com a fração P1G10 - 0,1% apresentaram, em média, diminuição dos valores de comprimento (51,0%), largura (67,0%) e profundidade (37,0%), enquanto que apenas os valores de profundidade das feridas tratadas com sulfadiazina de prata 1,0% diminuiram (74,0%) e os de comprimento e largura aumentaram, entretanto, essas diferenças não foram significativas.

No processo de criação e validação de novo *software* para análise de imagens digitalizadas, observou-se que os índices de variabilidade intra-operadores atingiram no máximo 6,0% nos cálculos de perímetro e área dos modelos e variações significativas inter-operadores. Entretanto, estas variações inter-operadores são mínimas e sugerem que não teriam impacto significativo na avaliação clínica.

O *software Biometrics* de análise de imagem criado, mesmo que utilizado por diversos operadores, apresenta reprodutibilidade aceitável e bom critério de comparabilidade com o *software KS-300*[®].

Conclui-se, pois, que a fração proteolítica P1G10 - 0,1% de *Carica candamarcensis* é inócua, segura e eficaz para a cicatrização cutânea.

6.1. Considerações finais

Os resultados aqui apresentados ampliam o potencial de indicações terapêuticas das enzimas proteolíticas de *Carica candamarcensis*.

Sugere-se a continuidade do ensaio clínico de fase II com maior número de pacientes e cumprimento das demais fases deste tipo de delineamento, bem como a continuidade do processo de validação do *software Biometrics* para que, em futuro próximo, possa ser utilizado por outros profissionais e serviços de saúde, dada sua acessibilidade e compatibilidade com várias plataformas computacionais.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. *Medicamentos*. Brasília, 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>. Acesso em: 10 maio. 2006.

ALMEIDA, R.M. *Avaliação do processo de cicatrização de lesões, tratadas com laser de baixa intensidade, através de sistema de aquisição e tratamento de imagem*. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

ALVAREZ, O.M.; FERNANDEZ-OBREGON, A.; ROGERS, R.S.; BERGAMO, L.; MASSO, J.; BLACK, M. A prospective, randomized, comparative study of collagenase and papain-urea for pressure ulcer debridement. *Wounds*, v.14, p.293-301, Oct. 2002.

ALVAREZ, O.M.; FERNANDEZ-OBREGON, A.; ROGERS, R.S. *et al.* Chemical debridement of pressure ulcers: a prospective, randomized comparative trial of collagenase and papain/urea formulations. *Wounds*, v.12, n.2, p.15-25. 2000.

AMBER ENGINEERING. *Image desk*. Goleta: Amber Engineering Incorporated, 1996. 62p.

AMERICAN BURN ASSOCIATION. *2009 National Burn Repository Report*. Chicago, 2009. Disponível em: <www.ameriburn.org/index.php>. Acesso em: 18 junho. 2009.

AMLUNG, S.R.; MILLER, W.L.; BOSLEY, L.M. The 1999 National Pressure Ulcer Prevalence Survey: a benchmarking approach. *Adv Skin Wound Care*, v.14, n.6, p.297-301, Nov/Dec. 2001.

ANDRADE, M.N.B.; SEWARD, R.; MELO, J.R.C. Curativos; wound dressings. *Rev. Méd. Minas Gerais*, Belo Horizonte, v.2, n.4, p.228-236, out/dez. 1992.

BAEZA, G.; CORREA, D.; SALAS, C.E. Proteolytic enzymes in *Carica candamarcensis*. *J. Sci. Food Agric.*, v.51, p.1-9, 1990.

BARBOSA, R.C.C.; GUIMARÃES, S.B.; VASCONCELOS, P.R.C.; CHAVES, C.R.; VASCONCELOS, P.R.L. Efeitos metabólicos da glutamina em ratos submetidos à queimadura por água fervente (escaldadura). *Acta Cir. Bras.*, v.18, n.6, p.527-533, nov/dez. 2003.

BATES-JENSEN, B.M. Indices to include in wound healing assessment. *Adv Wound Care*, v.8, n.4, p.25-33, Jul/Aug. 1995. (suppl)

BERGSTROM, N.; ALLMAN, R.M.; CARLSON, C.E.; EAGLSTEIN, W.; FRANTZ, R.A.; GARBER, S.L.; GOSNELL, D.; JACKSON, B.S.; KEMP, M.G.; KROUSKOP, T.A.; MARVEL, E.M.; RODEHEAVER, G.T.; XAKELLIS, G.C. *Pressure ulcers in adults: prediction and prevention*. Clinical Practice Guideline. Quick Reference Guide for Clinicians, n. 3. Rockville, MD. U.S. Department of health and human services, Public Health Service. Agency for health care policy and research. AHCPR. Pub. nº 92-0050. May. 1992.

BERNAL, M.C.; CURCIO, C.L.; CHACÓN, J.A.; GÓMEZ, J.F.; BOTERO, A.M. Validez y fiabilidad de la escala de Braden para predecir riesgo de úlceras por presión en ancianos. *Rev Esp Geriatr Gerontol.*, v.36, n.5, p.281-286, Sep. 2001.

BIDWELL, E.; VAN HEYNINGEN, W.E. The biochemistry of the gas gangrene toxins: 5. the kappa-toxin (collagenase) of *Clostridium welchii*. *Biochem J.*, v.42, n.1, p.140-151. 1948.

BLOCK, J.A.; SCHNITZER, T.J.; ANDERSON, G.B.J.; LENZ, M.E.; JEFFERY, R.; McNEIL, T.W. The effect of chemonucleolysis on serum keratan sulfate levels in humans. *Arthritis Rheum.*, United States, v.32, n.1, p.100-104, Jan. 1989.

BORGES, E.L. Evolução da cicatrização. In: BORGES, E.L.; SAAR, S.R.C.; MAGALHÃES, M.B.B.; GOMES, F.S.L.; LIMA, V.L.A.N. *Feridas: como tratar*. 2.ed. Belo Horizonte, Coopmed, 2008. 246p. cap.3, p.31-43.

BORGES, E.L.; GOMES, F.S.L.; SAAR, S.R.C. Custo comparativo do tratamento de feridas. *Rev. Bras. Enf.*, Brasília, v.52, n.2, p.215-222, abr/jun. 1999.

BRADLEY, M.; CULLUM, N.; NELSON, E.A.; PETTICREW, M.; SHELDON, T.; TORGERSON, D. Systematic reviews of wound care management: (2) dressings and topical agents used in the healing of chronic wounds. *Health Technol Assess*, v.3, n.17, p.1-35, dec. 1999.

BRAVO, L.M.; HERMOSILLA, J.; SALAS, C.E. A biochemical comparison between latex from *Carica candamarcensis* and *C. papaya*. *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, v.27, n.12, p.2831-2842, Dec. 1994.

BRITO, A.S. *Manual de Ensaio Toxicológicos In Vivo*. Campinas: UNICAMP, 1995. 122p.

BROWN, G.L.; NANEY, L.B.; GRIFFEN, J.; CRAMER, A.B.; YANCEY, J.M.; CURTSINGER, L.J.; HOLTIN, L.; SCHUTLZ, G.S.; JURKIEWICZ, M.H.; LYNCH, J.B. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N Engl. J. Med*, v.176, p.1375-1379. 1989.

CANNOBIO, M.M. *Cardiovascular disease*. St. Louis: Mosby, 1990.

CHEN, C.F.; CHEN, S.M.; CHOW, S.Y.; HAN, P.W. Protective effects of *Carica papaya* Linn on the exogenous gastric ulcer in rats. *Am J Chin Med.*, Singapore, v.9, n.3, p.205-212, Aug. 1981.

COHEN, I.K. Lessons from the history of wound healing. *Clin dermatol.*, v.25, n.1, p.3-8, Jan/Feb. 2007.

COHEN, I.K.; DIEGELMANN, F.R.; LINDBLAND, W.J. *Wound healing: biochemical and clinical aspects*. 1.ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1992. 630p.

COOPER, D.M. Assessment, measurement, and evaluation: their pivotal roles in wound healing. In: BRYANT, R.A. *Acute and chronic wounds: nursing management*. 2.ed. St. Louis: Mosby, 2000. 558p. cap.4, p. 51-83.

DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOTT, W.H.; JONES, K.M. *Data for Biochemical Research*. 1.ed. Oxford Science Publications, 1995.

DÉRY, O.; CORVERA, C.U.; STEINHOFF, M.; BUNNETT, N.W. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am. J. Physiol.* v.274, p.1429-1452. 1998.

DOUGHTY, D.B. Principles of wound healing and wound management. In: BRYANT, R.A. *Acute and chronic wounds; nursing management*. St. Louis: Mosby Year Book, 1992. 350p. cap.2, p 31-68.

DOUGHTY, D.B.; HOLBROOK, R. Lower-extremity ulcers of vascular etiology. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. *Acute and chronic wounds: current management concepts*. 3.ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. 674p. cap.15, p.258-306.

DOUGHTY, D.B; SPARKS-DEFRIESE, B. Wound-healing physiology. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. *Acute and chronic wounds: current management concepts*. 3.ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. 674p. cap.4, p.56-81.

EAGLSTEIN, W.H. (Ed.) *New directions in wound healing; wound care manual*. 5.ed. Princeton: Convatec, 1990.

EVANS, J. Massive tissue loss: burns. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. *Acute and chronic wounds: current management concepts*. 3.ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. 674p. cap.18, p.361-390.

FERNANDES, A.T. Arte de curar nos primórdios da civilização. In: FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.O.V.; RIBEIRO FILHO, N. *Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde*. São Paulo: Atheneu, 2000a. 2 v. v.1, cap.2, p. 8-24.

FERNANDES, A.T. A medicina e as bases da civilização ocidental. In: FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.O.V.; RIBEIRO FILHO, N. *Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde*. São Paulo: Atheneu, 2000b. 2 v. v.1, cap.3, p. 25-42.

FERNANDES, A.T. Entre a fé e a ciência: a medicina na Idade Média. In: FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.O.V.; RIBEIRO FILHO, N. *Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde*. São Paulo: Atheneu, 2000c. 2 v. v.1, cap.4, p. 43-55.

FERNANDES, A.T. O homem rumo ao mundo moderno: a Revolução Cultural, Industrial e Sanitária. In: FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.O.V.; RIBEIRO FILHO, N. *Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde*. São Paulo: Atheneu, 2000d. 2 v. v.1, cap.6, p. 75-90.

FERNANDES, A.T. As bases do hospital contemporâneo: a enfermagem, os caçadores de micróbios e o controle de infecção. In: FERNANDES, A.T.; FERNANDES, M.O.V.; RIBEIRO FILHO, N. *Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde*. São Paulo: Atheneu, 2000e. 2 v. v.1, cap.7, p. 91-128.

FERREIRA, M.C.; TUMA JR., P.; CARVALHO, V.F.; KAMAMOTO, F. Complex wounds. *Clinics*, v.61, n.6, p.571-578, Dec. 2006.

FIELD, C.K.; KERSTEIN, M.D. Overview of wound healing in a moist environment. *Am J Surg.*, Easton, v.167, n.1A, p.2S-6S, Jan. 1994. (Suppl).

FLANAGAN, M. Wound measurement: can it help us to monitor progression to healing? *J Wound Care*, v.12, n.5, p.189-194, May. 2003a.

FLANAGAN, M. Improving accuracy of wound measurement in clinical practice. *Ostomy Wound Manage.*, v.49, n.10, p.28-40, Oct. 2003b.

FRANÇA, L.H.G.; TAVARES, V. Insuficiência venosa crônica; uma atualização. *J Vasc Br.*, v.2, n.4, p.318-328. 2003.

GALEGO, G.N.; D ACAMPORA, A.J.; SOUZA, R.A.V.; CANELLA, R.P. Avaliação da glicemia no tratamento de feridas cirúrgicas com açúcar, em ratas. *Acta Cir. Bras.*, São Paulo, v.12, n.3, p.174-177, jul/ago/set. 1997.

GENELHU, M.S.; ZANINI, M.S.; VELOSO, I.F.; CARNEIRO, A.M.; LOPES, M.T.P.; SALAS, C.E. Use of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* as a protective agent during DNA extraction. *Braz J Med Biol Res*, v.31, n.9, p.1129-1132, Sep. 1998.

GETTE, M.T.; MARKS, J.G.; MALONEY, M.E. Frequency of postoperative allergic contact dermatitis to topical antibiotics. *Arch Dermatol*, v.128, p.365-367, Mar. 1992.

GOLDMAN, R.J.; SALCIDO, R. More than one way to measure a wound: an overview of tools and techniques. *Adv Skin Wound Care*, v.15, n.5, p.236-243, Sep/Oct. 2002.

GOMES, F.S.L.; BORGES, E.L. Coberturas. In: BORGES, E.L.; SAAR, S.R.C.; MAGALHÃES, M.B.B.; GOMES, F.S.L.; LIMA, V.L.A.N. *Feridas: como tratar*. 2.ed. Belo Horizonte, Coopmed, 2008. 246p. cap.9, p.133-178.

GOMES, M.T.; TEIXEIRA, R.D.; RIBEIRO, H.A.; TURCHETTI, A.P.; JUNQUEIRA, C.F.; LOPES, M.T.; SALAS, C.E.; NAGEM, R.A. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of CMS1MS2: a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* latex. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.*, v.64, n.6, p.492-494, Jun. 2008.

GOMES, M.T.R. *Caracterização bioquímica e farmacológica de proteases do látex de Carica candamarcensis com atividade mitogênica*. 2008. 146 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GOMES, M.T.R.; MELLO, V.J.; RODRIGUES, K.C.; BEMQUERER, M.P.; LOPES, M.T.P.; FAÇA, V.M.; SALAS, C.E. Isolation of two plant proteinases in latex from *Carica candamarcensis* acting as mitogenic for mammalian cells. *Planta Med.*, v.71, n.3, p.244-248, Mar. 2005.

GRAVINA, M.C.; TERMIGNONI, C.; SALAS, C.E. Biochemical characterization of a new cysteine endopeptidase from *Carica candamarcensis*. *L. Plant Science*, v.102, p.11-18. 1994.

GUPTA, S.K.; LEE, S.; MOSELEY, L.G. Postoperative wound blistering: is there a link with dressing usage? *J Wound Care*, v.11, n.7, p.271-273, Jul. 2002.

GURUNG, S.; SKALKO-BASNET, N. Wound healing properties of *Carica papaya* latex: *in vivo* evaluation in mice burn model. *J Ethnopharmacol.*, v.121, n.2, p.338-341, Jan. 2009.

HADDAD, M.C.; VANNUCHI, M.T.O.; CHENSO, M.Z.B.; HAULY, M.C.O. O uso do açúcar nas feridas infectadas. *Rev. Bras. Enf.*, Porto Alegre, n.36, p.152-154. 1983.

HADDAD, M.C.L.; BRUSCHI, L.C.; MARTINS, E.A.P. Influência do açúcar no processo de cicatrização de incisões cirúrgicas infectadas. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, Ribeirão Preto, v.8, n.1, p.57-65, jan. 2000.

HAGHPANAH, S.; BOGIE, K.; WANG, X.; BANKS, P.G. Reliability of electronic versus manual wound measurement techniques. *Arch Phys Med Rehabil*, v.87, n.10, p.1396-1402, Oct. 2006.

HARDY, M.A. A pilot study of the diagnosis and treatment of impaired skin integrity: dry skin in older persons. *Nur. Diag.*, v.1, n.2, p.57-63, Apr/Jun. 1990.

HETTIARATCHY, S.; DZIEWULSKI, P. ABC of burns. *BMJ*, v.328, p.1366-1368. 2004.

HULLEY, S.B.; NEWMAN, T.B.; CUMMINGS, S.R. Escolhendo os sujeitos do estudo: especificação, amostragem e recrutamento. In: HULLEY, S.B.; CUMMINGS, S.R.; BROWNER, W.S.; GRADY, D.; HEARST, N.; NEWMAN, T.B. *Delineando a pesquisa clínica, uma abordagem epidemiológica*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 374p. cap.3, p.41-54.

HUSSAIN, S.; FERGUSON, C. Silver sulphadiazine cream in burns. *Emerg. Med. J.*, v.23, p.929-932. 2006.

IMAO, K.; WANG, H.; KOMATSU, M.; HIRAMATSU, M. Free radical scavenging activity of fermented papaya preparation and its effect on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in iron-induced epileptic foci of rats. *Biochem Mol Biol Int.*, v.45, n.1, p.11-23, Jun. 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL - INMETRO. *Vocabulário de metrologia legal*. 3.ed. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. 27p.

JENNISON, M.W. Bacterial collagenase. *J Bacteriol.*, v.50, n.3, p.369-370, Sep. 1945.

KERENYI, T.; MERKEL, V.; SZABOLCS, Z.; PUSZTAI, P.; NADASY, G. Local enzymatic treatment of atherosclerotic plaques. *Exp Mol Pathol*, New York, v.49, n.3, p.330-338, Dec. 1988.

KLASEN, H.J. A review on the nonoperative removal of necrotic tissue from burn wounds. *Burns*, v.26, p.207-222. 2000.

KNUTSON, R.A.; MERBITZ, L.A.; CREEKMORE, M.A.; SNIPES, H.G. Use of sugar and povidone-iodine to enhance wound healing; five years' experience. *South Med J*, v.74, n.11, p.1329-1335, Nov. 1981.

KOVAL, K.J.; EGOL, K.A.; HIEBERT, R.; SPRATT, K.F. Tape blisters after hip surgery: can they be eliminated completely? *Am J Orthop.*, v. 36, n.5, p. 261-265, May. 2007.

LAEMMLI, U.K. Protein in electrophoresis in slab gels. *Nature*, v.227, p.680-683. 1970.

LAGAN, K.M.; DUSOIR, A.E.; MC DONOUGH, S.M.; BAXTER, D. Wound measurement: the comparative reliability of direct versus photographic tracings analyzed by planimetry versus digitizing techniques. *Arch Phys Med Rehabil*, v.81, p.1110-1116, Aug. 2000.

LAHMANN, N. A.; HALFENS, R.J.; DASSEN, T. Pressure ulcers in german nursing homes and acute care hospitals: prevalence, frequency, and ulcer characteristics. *Ostomy Wound Manage.*, King of Prussia, v.52, n.2, p.20-33, Feb. 2006.

LEAPER, D.J. Prophylactic and therapeutic role of antibiotics in wound care. *Am J Surg*, Easton, v.167, n.1A, p.15S-20S, Jan. 1994. (Suppl).

LEMOS, F.O.; MELLO, V.J.; CASSALI, G.D.; SALAS, C.E.; LOPES, M.T.P. Pre-clinic evaluation of proteases from *C. candamarcensis* as dermal healing principles. In: INTERNATIONAL SYMPOSIA ABOUT PHARMACOLOGY OF NATURAL PRODUCTS, 1, 2006, Varadero. *Annal...* Varadero: BLACPMA, 2006.

LEMOS, F.O.; SALAS, C.E.; CARDOSO, V.N.; LOPES, M.T.P. Parâmetros farmacocinéticos da fração cromatográfica proteolítica P1G10 do látex de *Carica candamarcensis* com atividades farmacológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA, 40, 2008, Águas de Lindóia.

LEON, J. *Botánica de los cultivos tropicales*. San Jose: IICA, p. 445, 1987.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin dermatol.*, v.25, n.1, p.9-18, Jan/Feb. 2007.

LINEAWEAVER, W.; HOWARD, R.; SOUCY, D.; MC MORRIS, S.; FREEMAN, J.; CRAIN, C.; ROBERTSON, J.; RUMLEY, T. Topical antimicrobial toxicity. *Arch Surg*, v.120, p.267-270, Mar. 1985.

LOGUERCIO, L.; BRAVO, L.M.; SALAS, C. Partial characterization of a novel substance from *Carica candamarcensis* endowed with mitogenic activity. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CELL BIOLOGY, 5, 1990, Madrid.

MACKWAY-JONES, K. Towards evidence based emergency medicine: best BETs from the Manchester Royal Infirmary. *Emerg Med J.*, v.25, n.1, p.38, Jan. 2008.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte 1. *An Bras Dermatol*, Rio de Janeiro, v.78, n.4, p.393-410, jul/ago. 2003.

MARAZZI, M.; STEFANI, A.; CHIARATTI, A.; ORDANINI, M.N.; FALCONE, L. Effect of enzymatic debridement with collagenase on acute and chronic hard-to-heal wounds. *J Wound Care*, v.15, n.5, p.222-227, May. 2006.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res.*, v.113, n.3-4, p.173-215, May. 1983.

MARTINS, C.B.G.; ANDRADE, S.M. Queimaduras em crianças e adolescentes: análise da morbidade hospitalar e mortalidade. *Acta Paul Enferm*, v.20, n.4, p.464-469. 2007.

MC CAULEY, R.L.; LINARES, H.A.; PELLIGRINI, V.; HERNDON, D.N.; ROBSON, M.C.; HEGGERS, J.P. In vitro toxicity of topical antimicrobial agents to human fibroblasts. *J Surg Res.*, v.46, n.3, p.267-274, Mar. 1989.

MEDEIROS, C.A.F. Cirurgia de varizes: história e evolução. *J Vas Bras*, v.5, n.4, p.295-302. 2006.

MELLO, V.J. *Avaliação da atividade cicatrizante gástrica/cutânea e de parâmetros toxicológicos da fração purificada P1G10 do látex de Carica candamarcensis*. 2005. 201f. (Doutorado em Ciências Biológicas: Farmacologia e Fisiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

MELLO, V.J.; GOMES, M.T.R.; LEMOS, F.O.; DELFINO, J.L.; ANDRADE, S.P.; LOPES, M.T.P.; SALAS, C.E. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine*, v.15, n.4, p.237-244, Apr. 2008.

MELLO, V.J.; GOMES, M.T.R.; RODRIGUES, K.C.L.; SANCHEZ, E.F.; LOPES, M.T.P.; SALAS, C.E. Plant Proteinases: their potential as therapeutic drugs. In: GOVIL, J.N.; SINGH, V.K.; ARUNACHALAM, C. *Recent progress in medicinal plants drug development from molecules*. vol.11. Houston: Studium Press, 2006. p.211-224.

MERTZ, P.M.; ALVAREZ, O.M.; SMERBECK, R.V.; EAGLSTEIN, W.H. A new in vivo model for the evaluation of topical antiseptics on superficial wounds. *Arch Dermatol*, v.120, n.1, p.58-62, Jan. 1984.

METCALFE, A.D.; FERGUSON, M.W.J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface*, v.4, n.14, p.413-437, Jun. 2007.

MILBOUW, G.; BOM, J.D.; FLANDROY, P.; REMACLE, J.M. Chemonucleolysis: a therapeutic alternative in extra-canalicular lumbar disk hernias. *Acta Neurol Belg*, Bruxelles, v.89, n.2, p.71-80, Mar/Apr. 1989.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *DATASUS*. Brasília. 2009. Disponível em: <www.datasus.gov.br>. Acesso em 16junho. 2009.

MOJICA-HENSHAW, M.P.; FRANCISCO, A.D.; De GUZMAN, F.; TIGNO, X.T. Possible immunomodulatory actions of *Carica papaya* seed extract. *Clin Hemorheol Microcirc*, v.29, n.3-4, p.219-229. 2003.

MONACO, J.L.; LAWRENCE, W.T. Acute wound healing: an overview. *Clin Plast Surg*, v.30, n.1, p.1-12, Jan. 2003.

MONAFO, W.W.; TANDON, S.N.; AYVAZIAN, V.H.; TUCHSCHMIDT, J.; SKINNER, A.M.; DEITZ, F. Cerium nitrate: a new topical antiseptic for extensive burns. *Surgery*, v.80, n.4, p.465-473, Out. 1976.

MOORE, K. Using wound area measurement to predict and monitor response to treatment of chronic wounds. *J Wound Care*, v.14, n.5, p.229-232, May. 2005.

MOUTIM, V.; SILVA, L.G.; LOPES, M.T.P.; FERNANDES, G.W.; SALAS, C.E. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. *Plant Sci.*, v.142, p.115-121. 1999.

MYNOTT, T.L.; LADHAMS, A.; SCARMATO, P.; ENGWERDA, C.R. Bromelain from pineapple stems, proteolytically blocks activation of extracellular regulated kinases-2 in T cells. *Biol Pharm Bull*, v.19, p.905-908. 1999.

N.N. Papain. In: _____. Enzymes from Merck. Darmstad, 1972. cap.12.

NATIONAL PRESSURE ULCER ADVISORY PANEL – NPUAP. Pressure ulcers prevalence, cost and risk assessment: consensus development conference statement. *Decubitus*, Chicago, v.2, n.2, p.24-28, May. 1989.

NATIONAL PRESSURE ULCER ADVISORY PANEL NATIONAL CONSENSUS CONFERENCE, 9, 2005, Tampa. *Relatório...* Tampa: NPUAP, 2005. 7p.

NEELY, A.N.; GARDNER, J.; DURKEE, P.; WARDEN, G.D.; GREENHALGH, D.G.; GALLAGHER, J.J.; HERNDON, D.H.; TOMPKINS, R.G.; KAGAN, R.J. Are topical antimicrobials effective against bacteria that are highly resistant to systemic antibiotics? *J Burn Care Res.*, v.30, n.1, p.19-29, Jan/Feb. 2009.

NIEDNER, R. Cytotoxicity and sensitization of povidone-iodine and other frequently used anti-infective agents. *Dermatology*, v.195, 89-92. 1997. (Suppl 2).

NIX, D.P. Patient assessment and evaluation of healing. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. *Acute and chronic wounds: current management concepts*. 3.ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. 674p. cap.7, p.130-148.

OLIVEIRA, G.G.; OLIVEIRA, S.A.H. Os ensaios clínicos. In: SILVA, P. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p 160-171.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE – OPAS. Fundação Nacional de Saúde. *Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis*. 1.ed. Brasília: FNS, 1997. 182p.

ORGILL, D.; DEMLING, R.H. Current concepts and approaches to wound healing. *Crit Care Med.*, v.16, n.9, p.899-908, Sep. 1988.

PEDROSO, E.R.P.; OLIVEIRA, R.G. *Blackbook*; clínica médica. Belo Horizonte: Blackbook Editora, 2007. 736p.

PEREIRA, M.T.; LOPES, M.T.P.; LOPES, W.O.; SALAS, C.E. Purification of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* L. and cloning of a genomic putative fragment coding for this enzyme. *Protein Express. Purif.*, v.22, n.2, p.249-257, Jul. 2001.

PIEPER, B. Mechanical forces: pressure, shear, and friction. In: BRYANT, R.A. *Acute and chronic wounds: nursing management*. 2.ed. St. Louis: Mosby, 2000. 558p. cap.11, p.221-264.

PIEPER, B.; CALIRI, M.H.L. Nontraditional wound care: a review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. *J. WOCN*, v.30, n.4, p.175-183, Jul. 2003.

POLIT, D.F.; HUNGLER, B.P. *Fundamentos de pesquisa em enfermagem*. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995. 391p.

POLLOCK, A.V. The treatment of infected wounds; review. *Acta Chir Scand*, n.156, p.505-513, May. 1990.

POTTER, P. Tegumento. In: _____. *Semiologia em Enfermagem*. 4.ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso, 2002. 436p. cap.6, p.81-104.

PRATA, M.B.; HADDAD, C.M.; GOLDENBERG, S.; SIMÕES, M.J.; MOURA, L.A.R.; TRABULSI, L.R. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea; estudo experimental em rato. *Acta Cir. Bras.*, v.3, n.2, p.43-47. 1988.

RAHAL, F.; MIMICA, I.M.; PEREIRA, V.; ATHIÉ, E. O açúcar no tratamento local das infecções das feridas operatórias e dos abscessos intracavitários. *Rev. Paul. Med.*, São Paulo, n.94, p.132-133, nov/dez. 1979.

RAMUNDO, J.M. Wound debridement. In: BRYANT, R.A.; NIX, D.P. *Acute and chronic wounds: current management concepts*. 3.ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. 674p. cap.10, p.176-192.

RAMUNDO, J.M.; GRAY, M.J. Enzymatic wound debridement. *J. WOCN*, v.35, n.3, p.273-280, May/Jun. 2008.

RATLIFF, C. R.; BRYANT, D. E. *Guideline for prevention and management of pressure ulcers*. Glenview: Wound, Ostomy and Continence Nurses Society (WOCN), 2003. 52 p.

REICHENBERG, J.; DAVIS, M. Venous ulcers. *Semin Cutan Med Surg*, v.24, n.4, p.216-226, Dec. 2005.

RIBEIRO, R.C.; SANTOS, O.L.R.; FROTA, C.; CAPARICA FILHO, A.; ABOIM, E. Eficácia do açúcar, colagenase e nitrofurazona no tratamento das infecções incisionais; estudo experimental em camundongos. *Rev. Bras. Cir.*, v.86, n.1, p.25-32, jan./fev. 1996.

RIMBACH, G.; GUO, Q.; AKIYAMA, T.; MATSUGO, S.; MOINI, H.; VIRGILI, F.; PACKER, L. Ferric nitrilotriacetate induced DNA and protein damage: inhibitory effect of a fermented papaya preparation. *Anticancer Res*, v.20, n.5A, p.2907-2914, Sep. 2000.

ROGENSKI, N.M.B.; SANTOS, V.L.C.G. Estudo sobre incidência de úlceras por pressão em um hospital universitário. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*, v.13, n.4, p.474-480, jul/ago. 2005.

ROSENBERG, L.; LAPID, O.; BOGDANOV-BEREZOVSKY, A.; GLESINGER, R.; KRIEGER, Y.; SILBERSTEIN, E.; SAGI, A.; JUDKINS, K.; SINGER, A.J. Safety and efficacy of a proteolytic enzyme for enzymatic burn debridement: a preliminary report. *Burns*, v.30, n.8, p.843-850, Dec. 2004.

ROUQUAYROL, M.Z.; ALMEIDA FILHO, N. *Epidemiologia e saúde*. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. 570p.

RUSHTON, I. Understanding the role of proteases and pH in wound healing. *Nursing Standart*, v.21, n.32, p.68-74, Apr. 2007.

SANTOS, D.R.D.; SILVA, L.R. Farmacologia clínica das drogas antiulcerosas e antidispépticas. In: SILVA, P. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p 882-887.

SEIDEL, H.M.; BALL, J.W.; DAINS, J.E.; BENEDICT, G.W. *Mosby's guide to physical examination*. 3.ed. St. Louis: Mosby, 1995.

SCHÄFER, M.; WERNER, S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v.9, n.8, p.628-638, Aug. 2008.

SIEGGREEN, M.Y.; KLINE, R.A. Recognizing and managing venous leg ulcers. *Advances in Skin & Wound Care*, v.17, n.6, p. 302-313, Jul/Aug. 2004.

SILVA, A.C.A. *Avaliação da atividade anti-úlceras gástrica e de vias envolvidas no modo de ação da fração P1G10, obtida do látex de Carica candamarcencis*. 2009. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Farmacologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, C.A.; MELLO, V.J.; LOPES, M.T.P.; VAL, C.G.; GOMES, M.T.R.; FERREIRA, R.S.; RODRIGUES, K.C.L.; SALAS, C.E. A mitogenic protein fraction in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Med.*, v.69, p.926-932. 2003.

SILVA, L.G.; LOPES, M.T.P.; GARCIA, O.S.; SALAS, C.E. Changes in protein profile during coagulation of latex from *Carica papaya*. *Braz. J. Med. Biol. Res*, Ribeirão Preto, v.30, n.5, p.615-619, May. 1997.

SIQUEIRA JÚNIOR, J.F.; MORAES, S.R.; LOPES, H.P. Atividade antimicrobiana de águas sanitárias disponíveis no mercado nacional. *Rev. Bras. Odontologia*, Rio de Janeiro, v.56, n.2, p.57-60, mar/abr. 1999.

SPARKERS, B.G. Immunological responses to thermal injury. *Burns*, Great Britain, v.23, n.2, p.106-113. 1997.

TEEPE, R.G.C.; KOEBRUGGE, E.J.; LÖWIK, C.W.G.M.; PETIT, P.L.C.; BOSBOOM, R.W.; TWISS, I.M.; BOXMA, H.; JAN VERMEER, B.; PONEC, M. Cytotoxic effects of topical antimicrobial and antiseptic agents on human keratinocytes in vivo. *J Trauma*, v.35, n.1, p.8-19, Jul. 1993.

TEIXEIRA, R.D.; RIBEIRO, H.A.; GOMES, M.T.; LOPES, M.T.; SALAS, C.E. The proteolytic activities in latex from *Carica candamarcensis*. *Plant Physiol Biochem.*, v.46, n.11, p.956-961, Nov. 2008.

THE BRITISH MEDICAL JOURNAL. *Obituary*. p.976-977, Oct. 1893.

THOMAZ, J.B.; THOMAZ, Y.C.M. Úlceras venosas dos membros inferiores; terapêutica. *ARS CVIRANDI*, v.26, n.6, p.136-172, jul. 1993.

TOSTES, R.O.T.; LEITE, F.E.P. Novas considerações sobre o uso tópico de açúcar e mel em feridas. *Rev. Méd. Minas Gerais*, Belo Horizonte, v.4, n.3, p.35-38, jul/set. 1994.

TROUILLET, J.L.; CHASTRE, J.; FAGON, J.Y.; PIERRE, J.; DOMART, Y.; GIBERT, C. Use of granulated sugar in treatment of open mediastinitis after cardiac surgery. *Lancet*, p. 180-183, Jul. 1985.

VILLALBA, M.I.C.; LEMOS, F.O.; TAGLIATI, C.A.; CASSALI, G. D.; BRAVO, C.E.S.; MELLO, V.J.; LOPES, M.T.P. Avaliação Toxicológica de fração proteolítica com atividade cicatrizante obtida do látex de *C. candamarcensis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, 39, 2007, Ribeirão Preto. *Resumos...* Ribeirão Preto: SBFTE, 2007, p. 529.

VILLALBA, M.I.C.; VIANA, C.T.R.; TAGLIATI, C.A.; CASSALI, G.D.; BRAVO, C.E.S.; LOPES, M.T.P. Avaliação toxicológica sistêmica de fração proteolítica obtida do látex de *Carica candamarcensis*. In: CONGRESSO DE FITOTERAPIA DO MERCOSUL, 2, 2008, Belo Horizonte. *Resumos...* Belo Horizonte: Sociedade Latino Americana de Fitoquímica, 2008.

WALKER, H.L.; MASON, A.D.Jr. A standart animal burn. *J. Trauma*, Baltimore, v.8, n.6, p.1049-51, Nov. 1968.

WALREAVENS, V.; JAZIRI, M.; VAN BEEUMEN, J.; SCHNEK, A.G.; KLEINSCHMIDT, T.; LOOZE, Y. Isolation and preliminary characterization of the cysteine-proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* hook. *Biol. Chem Hoppe-Seyler*, v.374, n.7, p.501-506, Jul. 1993.

WALRAEVENS, V.; VANDERMEERS-PIRET, M.C.; VANDERMEERS, A.; GOURLET, P.; ROBBERECHT, P. Isolation and primary structure of the CCI papain-like cysteine proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* hook. *Biol Chem*, v.380, n. 4, p.485-488, Apr. 1999.

WEISS, R.G. *et al.* Tratamento da ferida operatória infectada: açúcar, uma nova opção. *Rev. AMRIGS*, Porto Alegre, v.28, n.4, p.337-342, out./dez. 1984.

WHITE, R.J.; COOPER, R.; KINGSLEY, A. Wound colonization and infection: the role of topical antimicrobials. *Br J Nurs.*, v.10, n.9, p.563-578. 2001.

WILSON, R. Massive tissue loss: burns. In: BRYANT, R.A. *Acute and chronic wounds: nursing management*. 2.ed. St. Louis: Mosby, 2000. 558p. cap.10, p.197-220.

ZHANG, L.; LI, X.; WING, C.; XIE, S. Application of the rhEGF on burn wounds. *Burns*, v.33, n.1, p.S13, Feb. 2007. (Suppl 1)

ANEXO A**PARECER CETEA****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CETEA)***CERTIFICADO*

Certificamos que o protocolo nº **34/2002** relativo ao projeto intitulado "AVALIAÇÃO DE PROTEÍNA MITOGÊNICA DE CARICACEAE COMO AGENTE CICATRIZANTE DO SEQUENCIAMENTO E CLONAGEM AOS ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS" que tem como responsáveis Carlos Edmundo Salas e Miriam Teresa Paz Lopes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal* (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado em reunião de **04.12.2002**.

Este certificado expira-se em **04.12.2007**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 34/2002 related to the project entitled "validation of a cariaceae mitogenic protein as a healing agent: from sequencing and cloning to pre-clinical trials", under the supervision of Carlos Edmundo Salas and Miriam Teresa Paz Lopes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation** (CETEA/UFMG) and was approved in **04.12.2002**.

This certificate expires in 04.12.2007

Belo Horizonte, 10/12/2002


Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Reitoria – Campus Pampulha Avenida Antônio Carlos 6627CEP: 31270-901
Belo Horizonte - MG/Brasil

ANEXO B**PARECER COEP/UFMG**

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


Parecer nº. ETIC 439/06

Interessado: Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, *ad referendum*, no dia 18 de setembro de 2006, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo pré-clínico e clínico fase I de fração proteolítica *caricaceae* na cicatrização cutânea**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

ANEXO C

SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO PARA ÚLCERA POR PRESSÃO

Estágios	Descrição
Estágio I	Alteração observada que se relaciona à pressão em pele intacta, que deve ser comparada com uma área adjacente ou oposta do corpo, podendo incluir uma ou mais das seguintes alterações: temperatura da pele (quente ou fria), consistência tecidual (firme ou amolecida à palpação) e/ou sensação (dor, prurido). A úlcera apresenta-se como uma área avermelhada, definida e persistente em pele clara. A hiperemia reativa não deve ser confundida com a úlcera por pressão estágio I. A identificação da úlcera por pressão em pessoas de pele escura pode ser dificultada, podendo aparecer como vermelhidão persistente, azul ou tonalidades arroxeadas.
Estágio II	Perda parcial da pele, envolvendo epiderme ou derme, ou ambas. A úlcera é superficial e apresenta-se, clinicamente, como abrasão, bolha ou cratera rasa.
Estágio III	Perda total da espessura da pele, envolvendo danos ou necrose do tecido subcutâneo que pode aprofundar-se, mas sem chegar até a fáscia. A úlcera apresenta-se, clinicamente, como uma cratera profunda, com ou sem solapamento dos tecidos adjacentes.
Estágio IV	Perda total da espessura da pele com extensa destruição, necrose de tecido, ou danos de músculos, ossos ou estruturas de suporte (ex: tendões, articulações, cápsulas). Solapamento e sinus podem estar associados com as úlceras de estágio IV.

Fontes: National Pressure Ulcer Advisory Panel, 1989; National Pressure Ulcer Advisory Panel National Consensus Conference, 2005.

ANEXO D

ESCALA DE BRADEN

<p>Percepção sensorial: Habilidade de responder significativamente à pressão relacionada com o desconforto.</p>	<p>1. Completamente limitado: Não responde a estímulo doloroso (não geme, não se esquivia ou se agarra), dada a diminuição do nível de consciência ou sedação ou a limitação da habilidade de sentir dor na maior parte da superfície corporal.</p>	<p>2. Muito limitado: Responde somente a estímulos dolorosos. Não consegue comunicar o desconforto a não ser por gemidos ou inquietação, ou tem um problema sensorial que limita a habilidade de sentir dor ou desconforto em mais da metade do corpo.</p>	<p>3. Levemente limitado: Responde aos comandos verbais, porém nem sempre consegue comunicar o desconforto ou a necessidade de ser mudado de posição; ou tem algum problema sensorial que limita a sua capacidade de sentir dor ou desconforto em uma ou duas extremidades.</p>	<p>4. Nenhuma limitação: Responde aos comandos verbais. Não tem problemas sensoriais que poderiam limitar sua capacidade de sentir ou verbalizar dor ou desconforto.</p>
<p>Umidade: Grau ao qual a pele está exposta à umidade.</p>	<p>1. Constantemente úmida: A pele é mantida úmida/molhada quase constantemente por suor, urina, etc. A umidade é percebida cada vez que o paciente é movimentado ou posicionado.</p>	<p>2. Muito úmida: A pele está muitas vezes, mas nem sempre, úmida/molhada. A roupa de cama precisa ser trocada, pelo menos, uma vez durante o plantão.</p>	<p>3. Ocasionalmente úmida: A pele está ocasionalmente úmida/molhada, necessitando de uma troca de roupa de cama uma vez por dia aproximadamente.</p>	<p>4. Raramente úmida: A pele geralmente está seca. A roupa de cama só é trocada nos horários de rotina.</p>
<p>Atividade: Grau de atividade física.</p>	<p>1. Acamado: Mantém-se sempre no leito.</p>	<p>2. Restrito à cadeira: A habilidade de caminhar está severamente limitada ou não existe. Não agüenta o próprio peso e/ou precisa ser ajudado para se sentar na cadeira ou cadeira de rodas.</p>	<p>3. Caminha ocasionalmente: Caminha ocasionalmente durante o dia, porém por distâncias bem curtas, com ou sem assistência. Passa a maior parte do tempo na cama ou cadeira.</p>	<p>4. Caminha freqüentemente: Caminha fora do quarto, pelo menos, duas vezes por dia e dentro do quarto, pelo menos, cada duas horas, durante as horas que está acordado.</p>
<p>Mobilidade: Habilidade de mudar e controlar as posições corporais.</p>	<p>1. Completamente imobilizado: Não faz nenhum movimento do corpo, por menor que seja, ou das extremidades sem ajuda.</p>	<p>2. Muito limitado: Faz pequenas mudanças ocasionais na posição do corpo ou das extremidades, no entanto é incapaz de fazer mudanças freqüentes ou significantes sem ajuda.</p>	<p>3. Levemente limitado: Faz mudanças freqüentes, embora pequenas, na posição do corpo ou das extremidades, sem ajuda.</p>	<p>4. Nenhuma limitação: Faz mudanças grandes e freqüentes na posição sem assistência.</p>
<p>Nutrição: padrão usual de ingestão alimentar.</p>	<p>1. Muito pobre: Nunca come toda a refeição. É raro quando come mais de 1/3 de qualquer comida oferecida. Come duas porções ou menos de proteína (carne ou derivados de leite) por dia. Toma pouco líquido. Não toma nenhum suplemento dietético líquido. Está em jejum ou mantido em dieta com líquidos claros ou hidratação EV por mais de cinco dias.</p>	<p>2. Provavelmente inadequado: Raramente faz uma refeição completa e geralmente come somente metade de qualquer alimento oferecido. A ingestão de proteína inclui somente três porções de carne ou de derivados de leite. De vez em quando, toma um suplemento alimentar ou recebe menos do que a quantidade ideal de dieta líquida ou alimentação por sonda.</p>	<p>3. Adequado: Come mais da metade da maior parte das refeições. Ingera um total de quatro porções de proteína (carne, derivados de leite) por dia. Ocasionalmente, recusa uma refeição, mas, usualmente, toma um suplemento dietético, se oferecido; ou está recebendo dieta por sonda e Nutrição Parenteral Total, que provavelmente atende à maior parte das suas necessidades nutricionais.</p>	<p>4. Excelente: Come a maior parte de cada refeição. Nunca recusa a alimentação. Come, geralmente, um total de quatro ou mais porções de carne e derivados de leite. De vez em quando, come entre as refeições. Não necessita de suplemento alimentar.</p>
<p>Fricção e cisalhamento</p>	<p>1. Problema: Necessita de assistência moderada ou assistência máxima para se mover. É impossível levantar-se completamente sem esfregar-se contra os lençóis. Escorrega freqüentemente na cama ou na cadeira, necessitando de assistência máxima para freqüente reposição do corpo. Espasmos, contrações ou agitação levam a uma fricção quase constante.</p>	<p>2. Potencial para problema: Movimenta-se livremente ou necessita de uma assistência mínima. Durante o movimento, a pele, provavelmente, esfrega-se em alguma extensão contra os lençóis, cadeiras, ou está restrito a outros equipamentos. A maior parte do tempo mantém relativamente boa posição na cadeira ou na cama, porém, de vez em quando, escorrega.</p>	<p>3. Nenhum Problema Aparente: Movimenta-se independentemente na cama ou cadeira e tem força muscular suficiente para levantar o corpo completamente durante o movimento. Mantém, o tempo todo, uma boa posição na cama ou cadeira.</p>	<p>TOTAL DE PONTOS:</p>

(Escala gentilmente cedida e traduzida pela Prof^a. Dr^a. Maria Helena Larcher Caliri e autorizada pela autora Barbara Braden.)

APÊNDICE A

SOLUÇÕES

- Tampão de ativação

Cisteína 200 mM.....	20,0 mL
EDTA 500 mM.....	3,20 mL
DTT.....	0,12 g
Tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0) q.s.p.	0,0 MI

- Tampão acetato de sódio 1,0 M pH 5,0

Acetato de sódio.....	136,08 g
Água destilada q.s.p.	1000,0 mL

O pH foi ajustado para 5,0. O tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 foi obtido a partir da diluição desta solução.

- Tampão de incubação com substrato BAPNA

Tampão fosfato 25 mM pH 8.....	30,0 mL
Cisteína 200 mM.....	750,0 µL
EDTA 0,5 M.....	120,0 µL
Substrato BAPNA 100 mM.....	90,0 µL

- Solução para o gel separador desnaturante 12% de acrilamida

Solução aquosa de acrilamida: bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v).....	2,0 mL
Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 8,8; 0,4% SDS (p/v).....	0,75 mL
Solução aquosa de persulfato de amônio 10% (p/v).....	25,0 µL
TEMED.....	5,0 µL
Água deionizada.....	1,02 mL

- Solução para gel concentrador desnaturante 5% acrilamida

Solução aquosa de acrilamida: bis-acrilamida 29:1 (p/p) 30% (p/v).....	166,8 µL
Tampão Tris-HCl 1,0mM pH 6,8; 0,4% SDS (p/v).....	250,0 µL
Solução aquosa de persulfato de amônio 10% (p/v).....	10,0 µL
TEMED.....	2,0 µL
Água deionizada.....	571,2 µL

- Tampão de corrida eletroforese desnaturante - Tris base 0,025 M; glicina 0,19 M; SDS 0,1% (p/v)

Tris base.....	0,755 g
Glicina.....	3,6 g
SDS.....	250,0 mg
Água destilada q.s.p.	250,0 mL

- Solução tampão de amostra eletroforese desnaturante - Tris-HCl 0,07 M; glicerol 30% (v/v), SDS 10% (p/v)

Tampão Tris-HCl 1,0 mM pH 6,8; 0,4% SDS (p/v).....	0,7 mL
Glicerol.....	0,3 mL
SDS.....	0,1 g
Azul de bromofenol.....	0,12 mg

- Solução de MMS 50 mM

MMS 9420 mM.....	26,5 µL
Água destilada q.s.p.....	5,0 mL

- Solução fixadora para géis

Metanol P.A.....	50,0 mL
Ácido acético glacial P.A.....	10,0 mL
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

- Solução de azul-brilhante de *coomassie* (1,25 mg/mL) para coloração de géis

Corante azul-brilhante de <i>Coomassie</i> G-250.....	125,0 mg
Ácido acético glacial P.A.....	10,0 mL
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

- Solução descorante de géis

Metanol P.A.....	5,0 mL
Ácido acético glacial P.A.....	7,0 mL
Água destilada q.s.p.....	100,0 mL

APÊNDICE B

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS PARA QUEIMADURAS EM CAMUNDONGOS

Grupo: ____

Animal ____

Nascimento: __/05/2007

Escaldadura: __/07/2007

Epitelização: __/__/2007

Sexo: F M

Data	Peso (g)	Ferida			Necrose/crosta	Retração	Foto	Observações
		Extensão	Profundidade (mm)	Tec. Necr.				
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
					<input type="checkbox"/> fina <input type="checkbox"/> espessa cor: _____ <input type="checkbox"/> aderida <input type="checkbox"/> bordas soltas <input type="checkbox"/> sem crosta	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	<input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	

APÊNDICE C

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS PARA FASE I

I. DADOS DEMOGRÁFICOS				
Data da avaliação: ____/____/____			Código de identificação: _____	
1	Nome completo:			
2	Endereço completo:	Bairro:	Cidade:	
		UF:	CEP:	Telefone: ()
3	Data de nascimento:	____/____/____	4	Idade (anos completos):
5	Sexo:	<input type="checkbox"/> 1. Masculino <input type="checkbox"/> 2. Feminino	6	Naturalidade (UF):
7	Cor (observação do entrevistador)	<input type="checkbox"/> 1. Branca <input type="checkbox"/> 2. Parda/ mulata/ morena/ cabocla <input type="checkbox"/> 3. Negra <input type="checkbox"/> 4. Indígena <input type="checkbox"/> 5. Amarela/oriental		
II. SITUAÇÃO CONJUGAL				
1	Qual o seu estado civil atual?	<input type="checkbox"/> 1. Solteiro <input type="checkbox"/> 2. Casado <input type="checkbox"/> 3. Em união <input type="checkbox"/> 4. Separado ou divorciado <input type="checkbox"/> 5. Viúvo		
III. ESCOLARIDADE				
1	Qual sua escolaridade?	<input type="checkbox"/> 1. Ensino fundamental incompleto <input type="checkbox"/> 2. Ensino fundamental completo <input type="checkbox"/> 3. Ensino médio incompleto <input type="checkbox"/> 4. Ensino médio completo <input type="checkbox"/> 5. Ensino superior incompleto <input type="checkbox"/> 6. Ensino superior completo <input type="checkbox"/> 7. Especialização incompleta <input type="checkbox"/> 8. Especialização completa <input type="checkbox"/> 9. Mestrado incompleto <input type="checkbox"/> 10. Mestrado completo <input type="checkbox"/> 11. Doutorado incompleto <input type="checkbox"/> 12. Doutorado completo		
IV. FUMO				
1	Você fuma atualmente?	<input type="checkbox"/> 1. Não → siga V <input type="checkbox"/> 2. Sim <input type="checkbox"/> 3. Ex-fumante → siga 5		
2	Quantos cigarros fuma por dia?			
3	Há quanto tempo você fuma?			
4	Sempre fumou a mesma quantidade?	<input type="checkbox"/> 1 Não. <input type="checkbox"/> 2. Sim <input type="checkbox"/> 8. Sem dado <input type="checkbox"/> 9. NA		
5	Há quanto tempo que parou de fumar?			
6	Quantos cigarros fumava por dia?			
7	Durante quanto tempo você fumou?			
V. FREQUÊNCIA DE CONSUMO DE ÁLCOOL				
BEBIDA	QUANTIDADE	FREQUÊNCIA		
		Todo dia	Pelo menos 1 vez/semana	Nunca ou quase nunca
Cachaça	Copo ()			
Cerveja	Copo ()			
Vinho	Dose ()			
Whisky	Dose ()			
Outras: _____	Dose ()			
VI. HISTORIA OBSTÉTRICA				
1	Você está grávida atualmente?	<input type="checkbox"/> 1. Não <input type="checkbox"/> 2. Sim <input type="checkbox"/> 9. NA → siga VII		
2	Você está em período de amamentação?	<input type="checkbox"/> 1. Não <input type="checkbox"/> 2. Sim		

VII. MORBIDADE			
1	Você está atualmente com algum problema de saúde?	[] 1. Não [] 2. Sim	
2	Qual?		
3	Você foi internado por algum problema de saúde nos últimos 12 meses?	[] 1. Não [] 2. Sim	
4	Qual?		
5	Algum médico já lhe disse que você teve alguma dessas doenças?	<input type="checkbox"/> 1. Hipertensão arterial <input type="checkbox"/> 8. Esquistossomose <input type="checkbox"/> 15. Câncer _____ <input type="checkbox"/> 2. <i>Diabetes mellitus</i> <input type="checkbox"/> 9. Doença de Chagas <input type="checkbox"/> 16. Febre reumática <input type="checkbox"/> 3. Lúpus eritematoso <input type="checkbox"/> 10. Sífilis <input type="checkbox"/> 17. Trombose periférica <input type="checkbox"/> 4. Insuficiência renal <input type="checkbox"/> 11. Cisticercose <input type="checkbox"/> 18. Embolia pulmonar <input type="checkbox"/> 5. Insuficiência cardíaca <input type="checkbox"/> 12. Estrongilóide <input type="checkbox"/> 19. Tuberculose <input type="checkbox"/> 6. AIDS <input type="checkbox"/> 13. Malária <input type="checkbox"/> 20. Meningite <input type="checkbox"/> 7. Infarto do miocárdio <input type="checkbox"/> 14. Angina <input type="checkbox"/> 21. Doença hepática (cirrose, hepatite) <input type="checkbox"/> 22. Outras/alergias: _____	
6	Você faz uso de algum medicamento?	[] 1. Não [] 2. Sim [] 3. Não sabe	
7	Qual?		
8	Alguma vez, um profissional da saúde já mediu sua pressão arterial?	[] 1. Não [] 2. Sim [] 3. Não sabe	
9	Alguma vez, um profissional da saúde mencionou que sua pressão arterial estava alta?	[] 1. Não [] 2. Sim [] 3. Não sabe	
VIII. ANTROPOMETRIA			
1	Peso medido (kg)	2	Estatura (m)

IX. EXAMES LABORATORIAIS				
Resultados de:	1º dia		30º dia	
Hemograma: Hemácias	1		2	
Hemoglobina	1		2	
Hematócrito	1		2	
VCM	1		2	
HCM	1		2	
CHCM	1		2	
Global de leucócitos	1		2	
Neutrófilos segmentados	1		2	
Neutrófilos bastonetes	1		2	
Eosinófilos	1		2	
Basófilos	1		2	
Linfócitos	1		2	
Monócitos	1		2	
Plaquetas	1		2	
Glicemia jejum	1		2	
Tempo de coagulação	1		2	
Tempo de protrombina	1		2	
Tempo de tromboplastina	1		2	
Albumina sérica	1		2	
Proteínas totais	1		2	
TGO	1		2	
TGP	1		2	
Gama GT	1		2	
Fosfatase alcalina	1		2	
Uréia	1		2	
Creatinina	1		2	
Bilirrubina total	1		2	
Cálcio	1		2	
Fósforo	1		2	
Cloro	1		2	
Sódio	1		2	
Potássio	1		2	
Urina rotina: pH	1		2	
Densidade	1		2	
Volume	1		2	
Cetonas	1		2	
Proteínas	1		2	
Nitrato	1		2	
Hemácias	1		2	
Leucócitos	1		2	
Cilindros	1		2	
Sedimentos	1		2	
Flora	1		2	

Pote nº: ____

X. EVOLUÇÃO								
Data	Eritema	Edema	Circunfer. ante-braço	Calor	Dermatite	Prurido	Lesão Tipo _____	Dor
1.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
2.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
3.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
4.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
5.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
6.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
7.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
8.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
9.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
10.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
11.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
12.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
13.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
14.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	
15.	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	0 1	

OBSERVAÇÕES:

- 0 = NÃO 1 = SIM

- **Eritema:** Este parâmetro será avaliado aplicando-se leve pressão com a polpa digital sobre a área e liberando em seguida a pressão. As áreas de pele submetidas à pressão devem ficar esbranquiçadas após a remoção da mesma.

- **Maciez, ressecamento e descamação:** A pele normalmente é lisa e seca, existindo o mínimo de perspiração e oleosidade. Quando se esfrega a pele e há descamação, semelhante a escama de peixe, há indícios de ressecamento anormal da pele. O local da aplicação será avaliado pela palpação local e submetido à pequena fricção com a polpa digital (Hardy, 1990; Potter, 2002).

- **Edema:** O edema será avaliado pela prova de cacifo, que consiste na pressão da área com firmeza com o dedo polegar por 5 segundos e liberação. Registra-se a profundidade da depressão provocada na pele em milímetros. 2mm = 1+, 4mm = 2+, 6mm = 3+ e 8mm = 4+ (Seidel et al., 1995).

Outro método adotado para verificação do edema será a mensuração da circunferência do antebraço com fita métrica. A fita será posicionada a 3 cm da fossa cubital e será verificada a circunferência do local.

- **Calor:** O calor do local de aplicação será avaliado com o dorso da mão, comparando com a área corporal simetricamente oposta (Potter, 2002).

- **Prurido:** Será avaliado considerando a informação da pessoa voluntária quanto à presença ou não.

- **Vesículas:** Trata-se de elevações da pele, circunscritas, que contêm líquido. Podem ser decorrentes de processo inflamatório, alérgico ou infeccioso. Será avaliada a presença ou não de vesículas.

- **Dor:** A dor será avaliada pela Escala de Numérica de 1 a 10, sendo que 0 significa ausência de dor e 10 a pior dor imaginável. Caso presente, perguntar:

1. Onde está localizada a dor? _____
2. Quanto tempo dura? _____
3. Com que frequência ocorre? _____
4. A dor se parece com o quê? _____
5. O que promove alívio da dor? _____
6. O que a agrava? _____
7. Como você alivia a dor? _____

Circunferência do ante-braço:

_____ cm em ____/____
 _____ cm em ____/____
 _____ cm em ____/____
 _____ cm em ____/____
 _____ cm em ____/____
 _____ cm em ____/____
 _____ cm em ____/____
 _____ cm em ____/____

Observações:

APÊNDICE D

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 1

Efeito da fração proteolítica de *Carica candamarsensis* na cicatrização cutânea.

Este estudo está sendo realizado para avaliar um novo tratamento de feridas, desenvolvido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esse novo tratamento foi retirado do látex (leite) de uma espécie de mamão chileno, a *Carica candamarsensis*.

Após seu processamento, esta nova substância foi incorporada a um creme, com a finalidade de ser aplicado em feridas de difícil cicatrização para seu tratamento.

A primeira etapa do estudo será a aplicação do creme na pele íntegra de pessoas sadias, para verificar sua segurança (como a pele reage a esta substância).

Procedimento

Caso você concorde em participar deste estudo, lhe será solicitado que responda à entrevista e colha amostras de sangue e urina. Sua pele do ante-braço esquerdo será examinada antes, durante e após todo o processo.

Seu estado de saúde será avaliado pelo exame físico, pelos exames laboratoriais e por suas respostas colhidas pela pesquisadora.

As amostras de sangue serão coletadas utilizando agulhas e seringas descartáveis, por profissional técnico responsável, da empresa a qual você será encaminhado. A urina será coletada por você, após instruções de como realizá-la, que deverá ser entregue no dia e local da coleta de sangue.

Uma fina camada do creme será aplicada 3 vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira), durante 1 mês, no seu ante-braço esquerdo, em área correspondente a 9 cm² (3x3 cm) e protegido com um filme transparente, impermeável a água, microrganismos e sujidades.

Após 24 horas da aplicação, você irá retirar o filme e poderá lavar o local com água corrente e sabonete ou sabão que usa habitualmente.

O tempo estimado para esse procedimento é de 20 minutos.

Todos os profissionais envolvidos no estudo são treinados e capacitados para atender quaisquer problemas que possam vir a ocorrer em consequência do procedimento.

Riscos

Sabe-se que essa substância utilizada não apresentou efeitos colaterais de qualquer natureza, em testes com animais. Entretanto, caso ocorra algum efeito indesejado relacionado a ela, como dor, edema, vermelhidão, prurido ou calor, você será avaliado pelo médico participante deste estudo, Dr. Antônio Carlos Martins Guedes, e receberá todos os cuidados necessários.

Benefícios

Embora você possa não perceber benefício da aplicação dessa substância em sua pele, pois não será aplicada para fins de tratamento; todos os membros deste estudo conhecem as evidências experimentais benéficas desta nova substância e dos grandes benefícios que trará para a sociedade em geral. Principalmente, para uma parcela da nossa população que depende dos recursos do Sistema Único de Saúde (SUS) para seu tratamento. Por isso, sua participação é tão importante.

Garantia de anonimato

Todas as informações obtidas neste estudo serão consideradas confidenciais e utilizadas apenas para fins de pesquisa. O seu nome em momento algum será divulgado.

Custos

Todos os procedimentos serão realizados gratuitamente. No caso de haver qualquer ocorrência relacionada ao procedimento, os pesquisadores serão responsáveis por encaminhá-lo ao atendimento médico, sem qualquer custo.

Você receberá, em caráter de ressarcimento, vales-transporte e alimentação, devido ao seu deslocamento.

Seus direitos

A participação neste estudo é voluntária. Você poderá deixar de participar a qualquer momento, sem que haja perda dos benefícios a que tem direito.

Se você precisar de maiores informações sobre este estudo ou apresentar reclamações, você poderá entrar em contato com o Dr. Carlos Edmundo Salas Bravo, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, pelo telefone (31) 3499-2646. Ou com a pesquisadora Flávia Sampaio Latini Gomes, na Escola de Enfermagem da UFMG, pelos telefones (31) 3248-9858 e (31) 9198-6674. Ou, ainda, com o Comitê de Ética em Pesquisas da UFMG, Belo Horizonte, pelo telefone (31) 3499-4592.

Estoque de sangue para futuros estudos

Para o caso de alguma intercorrência e as amostras de sangue coletadas necessitarem ser revisadas, elas serão estocadas até o final deste estudo. Você poderá participar mesmo não aceitando que seja coletado sangue para o trabalho.

Caso você não aceite a coleta e guarda de sangue para futuros testes assine aqui:

_____.

Assinatura

Se você concordar em participar do estudo, assine seu nome abaixo:

Nome do participante: _____

Assinatura do participante: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Data: ___/___/____.

APÊNDICE E

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____, ejerciendo mi libre poder de elección y mi voluntariedad expresa, por este medio, doy mi consentimiento para ser incluido como sujeto en la Evaluación clínica del P1G10 y bromelina en el tratamiento de pacientes portadores de úlceras por presión.

El presente documento de consentimiento informado, entregado por mi médico de asistencia, previa consulta oral, es parte del protocolo del ensayo y ha sido aprobado por el Comité de Ética correspondiente. Lo recibo antes de ser sometido a cualquier proceder de tipo médico, relacionado con el ensayo.

He tenido tiempo suficiente para decidir mi participación, sin sufrir presión alguna y sin temor a represalias en caso de rechazar la propuesta. Inclusive, se me ha dado la oportunidad de consultarlo con mi familia y de hacer todo tipo de preguntas, quedando satisfecho con las respuestas. La entrega del documento se realizó en presencia de un testigo que dará fe de este proceso.

Como constancia, queda en mí poder una copia de este documento. Cualquier enmienda en el mismo se me informará en la siguiente consulta. También se me ha explicado que la información es de carácter confidencial; no serán divulgados o publicados, ni mi identidad ni los detalles personales de la historia clínica, salvo al investigador promotor, monitor(s), auditor(s) o agencia reguladora que inspeccionarán y/o registrarán los resultados para asegurar la calidad y análisis de los datos.

Mi médico de asistencia me hizo saber los criterios de exclusión y de interrupción del tratamiento. En ellos se resumen las circunstancias por las cuales puede darse por terminada mi participación en la investigación. Estoy consciente de mi derecho a salir de este ensayo en cualquier momento durante el curso del mismo, sin tener que dar razones para esto y sin que esto afecte las relaciones con mi médico de asistencia, por lo que tendré derecho a continuar recibiendo la atención médica establecida en este centro. Igual atención recibiría si el ensayo se detiene por alguna causa ajena a mí.

He sido informado de que en el estudio se establecerán tres grupos de tratamiento: el primero recibirá sulfadiazina de plata, el segundo recibirá P1G10 y el tercer recibirá bromelina. Como parte del sistema de asignación al azar, puedo ser incluido en cualquier grupo de tratamiento.

El propósito de este ensayo es evaluar el efecto terapéutico del producto, así como las reacciones adversas desfavorables que pudieran presentarse. El estudio se justifica por la búsqueda de un tratamiento más efectivo para este tipo de enfermedad. En el momento de iniciarse este protocolo yo habré recibido la terapia establecida para este tipo de enfermedad.

Una vez finalizada la administración del producto, se deberá mantener una observación al paciente, de al menos 1 hora. Transcurrido este tiempo y siempre que no se hayan constatado reacciones adversas severas o muy severas, el paciente podrá marcharse del hospital.

También estoy consciente de que en caso de no desear mi participación en el ensayo, tengo la posibilidad de recibir la terapia convencional. He sido informado de todos los beneficios terapéuticos conocidos tales como el de tener acceso a un tratamiento nuevo específico para mi enfermedad, que ha tenido resultados alentadores en otros pacientes.

He sido informado de que la probabilidad de ocurrencia de reacciones adversas es baja. En ninguno de los pacientes tratados previamente con este producto se han producido eventos adversos severos o muy severos. Los eventos adversos que se han presentado previamente consisten en: náuseas, diarreas, alergia, dolor.

Todos se recuperaron sin dejar secuela alguna. En caso de presentarse, el Hospital cuenta con los recursos indispensables para contrarrestarlo. Cualquier nuevo hallazgo durante mi participación en el estudio, el cual pueda comprometer mi seguridad, me será notificado inmediatamente.

Se me ha expresado claramente la condición totalmente gratuita de cada uno de los procedimientos a los que podré tener acceso mediante el estudio, y a su vez, la no-remuneración por mi participación.

Mi médico de asistencia indicará mi participación oficialmente en un registro. El tratamiento no interfiere en mi estilo de vida, ni costumbres, ni en la ingestión de otros medicamentos.

Finalmente, deberé consultar con mi médico de asistencia cualquier posible participación en otro estudio. Una vez que esté de acuerdo en participar en esta investigación, asumo la responsabilidad de cumplimentar las pruebas e imágenes que me indique el médico que realizará el estudio.

En caso necesario puedo dirigirme a cualquiera de las siguientes personas:

Nombre y Apellidos	Teléfonos
Eduardo Pina Morales	224860
Evelio Ramírez Lara	215891
Frank Pérez Hera	212150

La investigación es organizada y financiada por el Centro de Bioplasmas de Ciego de Avila y el Ministerio de Salud Pública. El médico que conduce la investigación no recibirá pago extra por ello.

Nombre, dos apellidos y Firma del paciente

Fecha ____/____/____

Nombre, dos apellidos y Firma del médico de asistencia

Fecha ____/____/____

Nombre, dos apellidos y Firma del testigo

Fecha ____/____/____

APÉNDICE F

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____, ejerciendo mi libre poder de elección y mi voluntad expresa, por este medio, doy mi consentimiento para ser incluido como sujeto en la Evaluación clínica del PIG10 y bromelina en el tratamiento de pacientes portadores de úlceras venosas.

El presente documento de consentimiento informado, entregado por mi médico de asistencia, previa consulta oral, es parte del protocolo del ensayo y ha sido aprobado por el Comité de Ética correspondiente. Lo recibo antes de ser sometido a cualquier proceder de tipo médico, relacionado con el ensayo.

He tenido tiempo suficiente para decidir mi participación, sin sufrir presión alguna y sin temor a represalias en caso de rechazar la propuesta. Inclusive, se me ha dado la oportunidad de consultarlo con mi familia y de hacer todo tipo de preguntas, quedando satisfecho con las respuestas. La entrega del documento se realizó en presencia de un testigo que dará fe de este proceso.

Como constancia, queda en mí poder una copia de este documento. Cualquier enmienda en el mismo se me informará en la siguiente consulta. También se me ha explicado que la información es de carácter confidencial; no serán divulgados o publicados, ni mi identidad ni los detalles personales de la historia clínica, salvo al investigador promotor, monitor(s), auditor(s) o agencia reguladora que inspeccionarán y/o registrarán los resultados para asegurar la calidad y análisis de los datos.

Mi médico de asistencia me hizo saber los criterios de exclusión y de interrupción del tratamiento. En ellos se resumen las circunstancias por las cuales puede darse por terminada mi participación en la investigación. Estoy consciente de mi derecho a salir de este ensayo en cualquier momento durante el curso del mismo, sin tener que dar razones para esto y sin que esto afecte las relaciones con mi médico de asistencia, por lo que tendré derecho a continuar recibiendo la atención médica establecida en este centro. Igual atención recibiría si el ensayo se detiene por alguna causa ajena a mí.

He sido informado de que en el estudio se establecerán tres grupos de tratamiento: el primero recibirá sulfadiazina de plata, el segundo recibirá PIG10 y el tercer recibirá bromelina. Como parte del sistema de asignación al azar, puedo ser incluido en cualquier grupo de tratamiento.

El propósito de este ensayo es evaluar el efecto terapéutico del producto, así como las reacciones adversas desfavorables que pudieran presentarse. El estudio se justifica por la búsqueda de un tratamiento más efectivo para este tipo de enfermedad. En el momento de iniciarse este protocolo yo habré recibido la terapia establecida para este tipo de enfermedad.

También estoy consciente de que en caso de no desear mi participación en el ensayo, tengo la posibilidad de recibir la terapia convencional. He sido informado de todos los beneficios terapéuticos conocidos tales como el de tener acceso a un tratamiento nuevo específico para mi enfermedad, que ha tenido resultados alentadores en otros pacientes.

He sido informado de que la probabilidad de ocurrencia de reacciones adversas es baja. En ninguno de los pacientes tratados previamente con este producto se han producido eventos adversos severos o muy severos. Los eventos adversos que se han presentado previamente consisten en: náuseas, diarreas, alergia, dolor.

Todos se recuperaron sin dejar secuela alguna. En caso de presentarse, el Hospital cuenta con los recursos indispensables para contrarrestarlo. Cualquier nuevo hallazgo durante mi participación en el estudio, el cual pueda comprometer mi seguridad, me será notificado inmediatamente.

Se me ha expresado claramente la condición totalmente gratuita de cada uno de los procedimientos a los que podré tener acceso mediante el estudio, y a su vez, la no-remuneración por mi participación.

Mi médico de asistencia indicará mi participación oficialmente en un registro. El tratamiento no interfiere en mi estilo de vida, ni costumbres, ni en la ingestión de otros medicamentos.

Finalmente, deberé consultar con mi médico de asistencia cualquier posible participación en otro estudio. Una vez que esté de acuerdo en participar en esta investigación, asumo la responsabilidad de cumplimentar las pruebas e imágenes que me indique el médico que realizará el estudio.

En caso necesario puedo dirigirme a cualquiera de las siguientes personas:

Nombre y Apellidos	Teléfonos
Flávia Latini	224260
Javier Borroto Pacheco	
Frank Pérez Hera	212150

La investigación es organizada y financiada por el Centro de Bioplasmas de Ciego de Avila y el Ministerio de Salud Pública. El médico que conduce la investigación no recibirá pago extra por ello.

Nombre, dos apellidos y Firma del paciente

Fecha ____/____/____

Nombre, dos apellidos y Firma del médico de asistencia

Fecha ____/____/____

Nombre, dos apellidos y Firma del testigo

Fecha ____/____/____

APÊNDICE G

MODELO DE EVALUACIÓN Y EVOLUCIÓN

I. DATOS GENERALES							
Nombre de la Institución: _____				Cama: _____			
Fecha de la evaluación: ____/____/2007			Investigador responsable: _____				
II. DATOS SÓCIODEMOGRÁFICOS							
1	Nombre completo: _____						
2	Fecha de navidad	____/____/____	3	Edad (años completos)	_____	4	Sexo: <input type="checkbox"/> 1. Masculino <input type="checkbox"/> 2. Feminino
5	Color (observación del entrevistador):	<input type="checkbox"/> 1. Blanca <input type="checkbox"/> 2. Parda/ mulata/ morena <input type="checkbox"/> 3. Negra <input type="checkbox"/> 4. Indígena <input type="checkbox"/> 5. Amarilla/ oriental					
III. DATOS CLÍNICOS							
1	Tempo de internación:	_____ días	2	Tempo en que se mantiene encamado/en silla:	_____ días		
3	Enfermedad de base: _____						
4	Enfermedades concomitantes: _____						
5	Medicamentos en uso contínuo:	<input type="checkbox"/> 1. Anti-hipertensivos <input type="checkbox"/> 2. Cardiotônicos <input type="checkbox"/> 3. Broncodilatadores <input type="checkbox"/> 4. Analgésicos <input type="checkbox"/> 5. Antiinflamatórios esteróides e no-esteróides <input type="checkbox"/> 6. Diuréticos <input type="checkbox"/> 7. Anti-coagulantes <input type="checkbox"/> 8. Otros: _____					
6	Peso:	_____ Kg	7	Talla:	_____ m		
8	Presión arterial:	_____ (mmHg)	9	Frecuencia cardíaca:	_____ (bpm)	10	Temperatura axilar: _____ (°C)
11	Tabaquismo atualmente:	<input type="checkbox"/> 1. No Ex-fumador: <input type="checkbox"/> 1. No (sigla p/ ítem IV) <input type="checkbox"/> 2. Si (sigla p/ 12) <input type="checkbox"/> 2. Si					
12	Cuantos cigarros fuma por día:	13	Hace cuanto tempo fuma:	14	Siempre fumó la misma cantidad:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si <input type="checkbox"/> 3. S/dato <input type="checkbox"/> 4. NA	
15	Hace cuanto tiempo paró de fumar:	16	Cuantos cigarros fumava/día:	17	Cuanto tiempo fumó:		
18	Etilismo atualmente	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si	19	Tipo de bebida:	20	Frecuencia y cantidad:	
21	Alergia tópica	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si	22	Producto:			
23	Herida previa	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si	24	Tempo de existencia:	25	Tratamiento anterior:	

IV. ESCALA DE BRADEN próxima página

V. ÚLCERAS POR PRESIÓN

1	Nº de úlceras:				<ol style="list-style-type: none"> 1. Occipital 2. Oreja 3. Escápula 4. Proceso acromioclavicular 5. Codo 6. Sacral 7. Tuberosidad isquiática 8. Trocánter 9. Rodilla 10. Cóndilo de la fíbula medial y lateral 11. Maléolo medial 12. Maléolo lateral 13. Calcáneo 14. Podófilos
2	Localización:	3	Estadiamento:		
		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> NA			
		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> NA			
		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> NA			
		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> NA			
		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> NA			
		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> NA			
		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> NA			
		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> NA			
		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> NA			
		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> NA			
		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> NA			
		<input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> NA			
4	Extensión (somatía o más extensa):	Vertical _____ cm Horizontal _____ cm	5		
6	Presencia del tejido necrótico:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si _____%	7	Señales de infección:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si Quales:
8	Exudado:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si	9	Olor do exudado:	<input type="checkbox"/> 1. Ausente <input type="checkbox"/> 2. Discreto <input type="checkbox"/> 3. Acentuado
10	Característica del exudado:	<input type="checkbox"/> 1. Seroso <input type="checkbox"/> 2. Sero-sanguinolento <input type="checkbox"/> 3. Sero-purulento <input type="checkbox"/> 4. Purulento <input type="checkbox"/> 5. Pio-sanguinolento <input type="checkbox"/> 6. Sanguinolento	11	Volumen del exudado:	<input type="checkbox"/> 1. Poco (1 a 2pctes. de gaze) <input type="checkbox"/> 2. Moderado (3 a 4pctes. de gaze) <input type="checkbox"/> 3. Acentuado (+ de 4pctes. de gaze)
12	Escala de dolor análoga visual:	<input type="checkbox"/> 1. sin dolor <input type="checkbox"/> 2. leve <input type="checkbox"/> 3. moderado <input type="checkbox"/> 4. severo <input type="checkbox"/> 5. penosísimo	13	Escala de dolor cognitiva:	1. ☺ Ninguna o leve 2. ☹ Suportable 3. ☹ Insoportable
14	Uso de superficie preventiva:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si		Cual: _____	
15	Uso de óleo/crema hidratante:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si		Cual: _____	
16	Manutención de la piel limpia y seca:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si		Como: _____	
17	Reposicionamiento:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si		Tempo: _____	
18	Control de la incontinencia:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si		Como: _____	
19	Suporte/suplementación nutricional:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si		Cual: _____	
20	Otra medida preventiva:				

OBSERVACIONES:

- **Enfermedad de base:** será considerada la enfermedad de base principal del paciente, según el diagnóstico médico, y otras concomitantes, en caso de haber.
- **Medicamentos en uso continuo:** serán relatados los medicamentos en uso diario por el paciente. En caso de no saber a cual categoría pertenece, relatar todos y, posteriormente, la equipe de pesquisa os clasificará.
- **Localización de las úlceras:** el local de las úlceras será apuntado en el esquema del cuerpo humano y listado según la lista conteniendo los nombres de las regiones anatómicas relacionadas.
- **Estadamiento:** será realizado de acuerdo con el sistema de clasificación internacional de úlcera por presión, descrito abajo:

Estadios	Descripción
Estadio I	Alteración observada que se relaciona a la presión en piel intacta, que debe ser comparada con un área adyacente u opuesta del cuerpo, pudiendo incluir una o más de las siguientes alteraciones: temperatura de la piel (caliente o fría), consistencia del tejido (firme o blando a la palpación) y/o sensación (dolor, prurito). La úlcera se presenta como un área enrojecida, definida y persistente en piel clara. La hiperemia reactiva no deberá ser confundida con la úlcera por presión estadio I. La identificación de la úlcera por presión en personas de piel oscura puede ser difícil, pudiendo aparecer como enrojecida persistente, azul o tonalidades moradas.
Estadio II	Pérdida parcial de la piel, involucrando la epidermis o la dermis, o ambas. La úlcera es superficial y se presenta, clínicamente como una abrasión, ampolla o hueco raso.
Estadio III	Pérdida total de la espesura de la piel, involucra daños o necrosis del tejido subcutáneo que puede presentarse, más sin llegar hasta la fascia. La úlcera se presenta, clínicamente como un cráter profundo, con o sin solapamiento de los tejidos adyacentes.
Estadio IV	Pérdida total de la espesura de la piel con una extensa destrucción, necrosis del tejido, o daños de los músculos, óseos o estructuras de soporte (ej: tendones, articulaciones, cápsulas). Solapamiento y sinus pueden estar asociados con las úlceras de estadio IV.

NA: No se aplica. Cuando 60% o más de la área de la herida esté recubierta por necrosis

Escala de Riesgo de Braden

	1. Completamente limitada	2. Muy limitada	3. Levemente limitada	4. No alterada
Percepción sensorial				
Capacidad para responder significativamente al disconfor relacionado con la presión	No Responde (no se queja, no se defiende ni se agarra) ante estímulos dolorosos, por un nivel disminuido de conciencia o sedación o capacidad limitada para sentir dolor sobre la mayoría de la superficie corporal.	Responde solamente a estímulos dolorosos. No puede comunicar el disconfor excepto por quejido o agitación o tiene un deterioro sensorial que limita la capacidad para sentir dolor o disconfor sobre la mitad del cuerpo.	Responde a órdenes verbales pero no siempre puede comunicar el disconfor o la necesidad de ser volteado o tiene alguna alteración sensorial que limita la capacidad para sentir dolor o disconfor en una o dos extremidades.	Responde a órdenes verbales. No tiene déficit sensorial que limite la capacidad de sentir o manifestar dolor o disconfor.
Humedad				
Grado en el cual la piel está expuesta a la humedad.	1. Constantemente húmeda La piel permanece húmeda casi constantemente por sudoración, orina o líquidos corporales. Cada vez que es movlizado o girado, se encuentra mojado.	2. Muy húmeda La piel está frecuentemente húmeda, las sábanas deben cambiarse por lo menos una vez en el turno (cada ocho horas).	3. Ocasionalmente húmeda La piel está ocasionalmente húmeda, requiere un cambio extra de sábanas aproximadamente una vez al día (cada 12 horas).	4. Rara vez húmeda La piel está usualmente seca, las sábanas requieren cambio con intervalos de rutina (cada 24 horas).
Actividad				
Grado de actividad física.	1. En cama Confinado a la cama.	2. En silla Capacidad para caminar severamente limitada o inexistente. No puede soportar su propio peso o debe ser asistido en la silla común o silla de ruedas.	3. Camina ocasionalmente Camina ocasionalmente durante el día pero muy cortas distancias con o sin asistencia. Pasa la mayor parte del turno (8 horas) en la silla o en la cama.	4. Camina con frecuencia Camina fuera del cuarto por lo menos dos veces en el día y dentro de él por lo menos una vez cada dos horas.
Movilidad				
Capacidad para cambiar y controlar la posición del cuerpo.	1. Completamente inmóvil No realiza ni ligeros cambios en la posición del cuerpo o las extremidades sin asistencia.	2. Muy limitada Realiza cambios mínimos y ocasionales de la posición del cuerpo o las extremidades, pero es incapaz de realizar en forma independiente, cambios frecuentes o significativos.	3. Ligeramente limitada Realiza frecuentes aunque ligeros cambios en la posición del cuerpo o de las extremidades en forma independiente.	4. Sin limitaciones Realiza cambios mayores y frecuentes en la posición sin asistencia.
Nutrición				
Patrón usual de consumo alimentario.	1. Muy pobre Nunca come una comida completa. Rara vez come más de un tercio de cualquier comida ofrecida. Come dos porciones o menos de proteínas (carne o lácteos) por día. Toma poco líquido. No toma un suplemento alimenticio líquido o está sin vía oral o con dieta líquida clara o intravenosa por más de cinco días.	2. Probablemente inadecuada Rara vez come una comida completa y generalmente come solo la mitad de cualquier comida ofrecida. La ingesta de proteínas incluye solamente tres porciones de carne o productos lácteos por día. Ocasionalmente toma un suplemento alimenticio o recibe menos de la cantidad óptima de dieta líquida o alimentación por sonda.	3. Adecuada Come más de la mitad de la mayoría de las comidas. Come el total de cuatro porciones de proteína por día. Ocasionalmente rechaza una comida pero usualmente toma un suplemento alimenticio si se la ofrece o está siendo alimentado por sonda o nutrición parenteral.	4. Excelente Come la mayoría de todas las comidas, nunca rechaza una comida, usualmente come un total de cuatro o más porciones de carne y productos lácteos, ocasionalmente come entre comidas. No requiere suplemento alimenticio.
Fricción y deslizamiento				
	1. Es un problema Requiere asistencia de moderada a máxima al movlizarlo. Levantarlo completamente sin deslizarlo sobre las sábanas es	2. Es un problema potencial Se mueve torpemente o requiere mínima asistencia. Durante un	3. Sin problema aparente Se mueve en la cama o en la silla y tiene suficiente fuerza muscular	Total:

imposible. Frecuentemente se desliza en la cama o en la silla y requiere constantes cambios de posición con un máximo de asistencia. La espasticidad y contracturas llevan a fricción casi constante.	movimiento, la piel probablemente se desliza en algún grado contra las sábanas, la silla o los objetos de restricción. Mantiene relativamente buena posición en la silla o en la cama la mayoría del tiempo, pero ocasionalmente se desliza hacia abajo.	para sostenerse completamente durante el movimiento. Mantiene buena posición en la cama o en la silla en todo momento.
---	--	--

Fuente: Bernal *et al.*, 2001.

VI. RESULTADOS DE EXAMENES LABORATORIALES

Parámetros:	1ª. Evaluación	Final del tratamiento	30 días después	60 días después
Hemoglobina (g/L)				
Hematócrito (v/L)				
Leucocitos ($\times 10^9/L$)				
Eritrocitos (mm)				
Plaquetas ($\times 10^9/L$)				
Segmentados (%)				
Linfocitos (%)				
Eosinófilos (%)				
Glicemia ayuno (mmol/L)				
Creatinina (Umol/L)				
Ácido úrico (Umol/L)				
TGP (U/L)				
TGO (U/L)				
Colesterol total (mg/L)				
Triglicéridos (mg/L)				
Calcio				
Bilirrubina total (mmol/L)				
Bilirrubina directa (mmol/L)				
Bilirrubina indirecta (mmol/L)				
Proteínas totales (g/L)				
Albumina (g/L)				
Globulina (g/L)				
Fosfatase alcalina (U/L)				
PCR (mg/dL)				
Orina: Hematias				
Leucocitos				
Cilindros				
Albumina				

Conclusiones:

Tratamiento grupo: () 1 () 2 () 3 () 4

Remisiones: _____

Observaciones:

APÊNDICE H

MODELO DE EVALUACIÓN Y EVOLUCIÓN

I. DATOS GENERALES									
Fecha de la evaluación: ___/___/2007					Investigador responsable: _____				
II. DATOS SÓCIODEMOGRÁFICOS									
1	Nombre completo:								
2	Fecha de nacimiento: ___/___/___	3	Edad (años completos)	4	Sexo:	<input type="checkbox"/> 1. Masculino <input type="checkbox"/> 2. Feminino			
5	Color (observación del entrevistador):	<input type="checkbox"/> 1. Blanca <input type="checkbox"/> 2. Parda/ mulata/ morena <input type="checkbox"/> 3. Negra <input type="checkbox"/> 4. Indígena <input type="checkbox"/> 5. Amarilla/ oriental							
III. DATOS CLÍNICOS									
1	Enfermedad de base:								
2	Enfermedades concomitantes:								
3	Medicamentos en uso continuo:	<input type="checkbox"/> 1. Anti-hipertensivos <input type="checkbox"/> 2. Cardiotônicos <input type="checkbox"/> 3. Broncodilatadores <input type="checkbox"/> 4. Analgésicos <input type="checkbox"/> 5. Antiinflamatórios esteróides e no-esteróides <input type="checkbox"/> 6. Diuréticos <input type="checkbox"/> 7. Anti-coagulantes <input type="checkbox"/> 8. Otros:							
4	Peso: _____ Kg	5	Talla: _____ m						
6	Presión arterial: _____ (mmHg)	7	Frecuencia cardíaca: _____ (bpm)	8	Temperatura axilar: _____ (°C)				
9	Circunferencia:	Pantorrilla D: _____ cm Pantorrilla E: _____ cm Tornozelo D: _____ cm Tornozelo E: _____ cm							
10	Pulso de MMII:	D - <input type="checkbox"/> 1. Ausente <input type="checkbox"/> 2. Presente Local: _____ E - <input type="checkbox"/> 1. Ausente <input type="checkbox"/> 2. Presente Local: _____							
11	Tabaquismo atualmente:	<input type="checkbox"/> 1. No Ex-fumador: <input type="checkbox"/> 1. No (sigap/ 18) <input type="checkbox"/> 2. Si (sigap/ 15) <input type="checkbox"/> 2. Si							
12	Cuántos cigarros fuma por día:	13	Hace cuánto tiempo fuma:	14	Siempre fumó la misma cantidad:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si <input type="checkbox"/> 3. S/dato <input type="checkbox"/> 4. NA			
15	Hace cuánto tiempo paró de fumar:	16	Cuántos cigarros fumava/día:	17	Cuánto tiempo fumó:				
18	Etilismo atualmente	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si		19	Tipo de bebida:	20	Frecuencia y cantidad:		
21	Alergia tóxica	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si		22	Producto:				
23	Herida previa	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si Local: _____		24	Tempo de existencia:	25	Tratamiento anterior:		
IV. ÚLCERAS DE MIEMBROS INFERIORES									
1	Nº de úlceras:	2	Localización de la úlcera						
3	Perdida de tejido:	<input type="checkbox"/> 1. Superficial <input type="checkbox"/> 2. Profunda superficial <input type="checkbox"/> 3. Profunda total		4	Presencia del tejido necrótico:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si _____ %			
5	Extensión:	Vertical _____ cm		6	Classificación de la extensión:	<input type="checkbox"/> 1. pequeña: < 50cm ² <input type="checkbox"/> 2. media: > 50cm ² e < 150cm ²			

		Horizontal _____cm			<input type="checkbox"/> 3. grande: $> 150\text{cm}^2$ e $< 250\text{cm}^2$ <input type="checkbox"/> 4. extensa: $> 250\text{cm}^2$
7	Señales de infección:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si Quales:	8	Exudado:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si

9	Olor do exudado:	<input type="checkbox"/> 1. Ausente <input type="checkbox"/> 2. Discreto <input type="checkbox"/> 3. Acentuado	10	Volume del exudado:	<input type="checkbox"/> 1. Poco (1 a 2pctes. de gaze) <input type="checkbox"/> 2. Moderado (3 a 4pctes. de gaze) <input type="checkbox"/> 3. Acentuado (+ de 4pctes. de gaze)
11	Característica del exudado:	<input type="checkbox"/> 1. Seroso <input type="checkbox"/> 2. Sero-sanguinolento <input type="checkbox"/> 3. Sero-purulento <input type="checkbox"/> 4. Purulento <input type="checkbox"/> 5. Pio-sanguinolento <input type="checkbox"/> 6. Sanguinolento	12	Escala de dolor análoga visual:	<input type="checkbox"/> 1. sin dolor <input type="checkbox"/> 2. leve <input type="checkbox"/> 3. moderado <input type="checkbox"/> 4. severo <input type="checkbox"/> 5. penosísimo
13	Edema:	<input type="checkbox"/> 1. Ausente <input type="checkbox"/> 2. 1+/4+ <input type="checkbox"/> 3. 2+/4+ <input type="checkbox"/> 4. 3+/4+ <input type="checkbox"/> 5. 4+/4+	14	Dermatitis:	<input type="checkbox"/> 1. Ausente <input type="checkbox"/> 2. Presente Tipo:
15	Hiperpigmentación:	<input type="checkbox"/> 1. Ausente <input type="checkbox"/> 2. Presente	16	Uso de terapia compresiva:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Sí Cual:
17	Uso de óleo/crema hidratante:	<input type="checkbox"/> 1. No <input type="checkbox"/> 2. Si Cual: _____			

V. RESULTADOS DE EXAMENES LABORATORIALES

Parámetros:	1ª. Evaluación	Final del tratamiento	30 días después	60 días después
Hemoglobina (g/L)				
Hematócrito (v/L)				
Leucocitos ($\times 10^9/L$)				
Eritrocitos (mm)				
Plaquetas ($\times 10^9/L$)				
Segmentados (%)				
Linfocitos (%)				
Eosinófilos (%)				
Glicemia ayuno (mmol/L)				
Creatinina (Umol/L)				
Ácido úrico (Umol/L)				
TGP (U/L)				
TGO (U/L)				
Colesterol total (mg/L)				
Triglicéridos (mg/L)				
Calcio				
Bilirrubina total (mmol/L)				
Bilirrubina directa (mmol/L)				
Bilirrubina indirecta (mmol/L)				
Proteínas totales (g/L)				
Albumina (g/L)				
Globulina (g/L)				
Fosfatase alcalina (U/L)				
PCR (mg/dL)				

Condutas

Tratamento grupo: () 1 () 2 () 3 () 4

Encaminhamentos: _____

Observações: _____



Evolução da ferida

Grupo:	Herida			Sinais asociados				Registro fotográfico	Tratamiento	Circunferencias				
	Extensión (cm)		Profundidad (cm)	Necrose %	Sinales de infección	Dermatitis 4+	Edema 4+			Dolor 0-5	Pantorrilla D	Tobillo D	Pantorrilla. E	Tobillo E
	Vert	Hor												
Fecha														

Obs:

APÉNDICE I

TARJETA DE CUMPLIMIENTO DEL TRATAMIENTO

Ensayo clínico “Aplicación tópica de fracción de *Carica candamarcensis* en personas con úlceras por presión”.

Código del paciente: _____

Investigador responsable: _____

Frecuencia: 3 veces por semana via intralesional.

Momento	Fecha	Firma
1ra semana 1	__/__/2007	
1ra semana 2	__/__/2007	
1ra semana 3	__/__/2007	
2da semana 1	__/__/2007	
2da semana 2	__/__/2007	
2da semana 3	__/__/2007	
3ra semana 1	__/__/2007	
3ra semana 2	__/__/2007	
3ra semana 3	__/__/2007	
4ta semana 1	__/__/2007	
4ta semana 2	__/__/2007	
4ta semana 3	__/__/2007	
5ta semana 1	__/__/2007	
5ta semana 2	__/__/2007	
5ta semana 3	__/__/2007	
6ta semana 1	__/__/2007	
6ta semana 2	__/__/2007	
6ta semana 3	__/__/2007	

Observaciones:

APÉNDICE J

TARJETA DE CUMPLIMIENTO DEL TRATAMIENTO

Ensayo clínico “Aplicación tópica de fracción de *Carica candamarcensis* en personas con úlceras venosas”.

Código del paciente: _____

Investigador responsable: _____

Frecuencia: 3 veces por semana via intralesional.

Momento	Fecha	Firma
1ra semana 1	__/__/2007	
1ra semana 2	__/__/2007	
1ra semana 3	__/__/2007	
2da semana 1	__/__/2007	
2da semana 2	__/__/2007	
2da semana 3	__/__/2007	
3ra semana 1	__/__/2007	
3ra semana 2	__/__/2007	
3ra semana 3	__/__/2007	
4ta semana 1	__/__/2007	
4ta semana 2	__/__/2007	
4ta semana 3	__/__/2007	
5ta semana 1	__/__/2007	
5ta semana 2	__/__/2007	
5ta semana 3	__/__/2007	
6ta semana 1	__/__/2007	
6ta semana 2	__/__/2007	
6ta semana 3	__/__/2007	

Observaciones:

APÉNDICE K

MODELO DE INTERRUPCIÓN DEL TRATAMIENTO

1. Hospital:	2. Provincia:
3. Iniciales:	4. Fecha de inclusión:

5. El paciente interrumpió el tratamiento: No Si

En caso afirmativo complete el modelo de evolución al final del tratamiento.

6. Fecha de interrupción del tratamiento: ___/___/_____

Indique causa	Si	No
7. Al final de 6 semanas.		
8. <i>Presencia de tejido epitelial en 100% de la extensión de la herida.</i>		
9. Abandono voluntario.		
10. Eventos adversos graves.		
11. Extensión del área ulcerosa >25% con relación al valor inicial.		
12. Enfermedad intercurrente que impida la administración subsiguiente del medicamento.		
13. Aparición de cualquier criterio de exclusión.		
14. Demora mayor de 7 días en la administración de la proteasa con relación a la fecha planificada.		
15. Cambio general o específico en las condiciones del paciente que lo incapaciten para la administración subsiguiente del medicamento a criterio del investigador.		
16. Cambio del paciente para otra ciudad, provincia o país.		
17. Fallecimiento del paciente.		

Observaciones:

APÉNDICE L

PREPARACIÓN DE SUERO A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA

1. Contactar con los investigadores del Departamento de laboratorio clínico, encargados de desarrollar el proceso de preparación de suero a partir de sangre periférica luego de la extracción sanguínea.
2. Extraer 5,0ml de sangre venosa periférica y depositarla bajo condiciones de asepsia en tubo de centrifuga sin heparinizar, tapar el tubo adecuadamente.
3. Dejar el tubo tapado a temperatura ambiente durante 4 horas para que se forme el coágulo y colocarlo a 4°C durante toda la noche para permitir que el coágulo se retracte.
4. Desprender suavemente el coágulo (sin romperlo) de los lados del tubo con un aplicador y extraer con éste el coágulo.
5. Transferir el suero a otro tubo de centrifuga en condiciones de asepsia, taparlo y centrifugarlo a 4000rpm (2700 x g), durante 10 minutos a 4°C, obtener el sobrenadante.
6. Almacenar el suero en alícuotas de 1,5 a 2,0ml en viales con tapa de rosca a -20°C. Todas las muestras serán debidamente identificadas con número de paciente y fecha de toma de la muestra.

NOTA: Algunos sueros pierden actividad tras congelaciones-descongelaciones repetidas o son inestables a 4°C. Todas las soluciones y materiales a utilizar deben estar estériles.

APÉNDICE M

REGISTRO DE PACIENTES INCLUIDOS Y NO INCLUIDOS

Nº	Fecha	Iniciales del pacientes	Incluido Número de inclusión	No incluido Causa (Código)	Nombre del investigador
1	__/__/2007				
2	__/__/2007				
3	__/__/2007				
4	__/__/2007				
5	__/__/2007				
6	__/__/2007				
7	__/__/2007				
8	__/__/2007				
9	__/__/2007				
10	__/__/2007				
11	__/__/2007				
12	__/__/2007				
13	__/__/2007				
14	__/__/2007				
15	__/__/2007				
16	__/__/2007				
17	__/__/2007				
18	__/__/2007				
19	__/__/2007				
20	__/__/2007				
21	__/__/2007				
22	__/__/2007				
23	__/__/2007				
24	__/__/2007				
25	__/__/2007				
26	__/__/2007				
27	__/__/2007				
28	__/__/2007				
29	__/__/2007				
30	__/__/2007				

Causas de no inclusión: (Cuando el paciente resulte no incluido indique el número correspondiente a la causa de no inclusión)

1. Pacientes que estén recibiendo otro producto en investigación.
2. Pacientes con historia de alergia o hipersensibilidad atribuidas a compuestos de composición química o biológica semejantes al producto utilizado en el estudio.
3. Pacientes portadores de enfermedades intercurrentes no controladas, incluyendo: infecciones activas, pacientes portadores de HIV.
4. Pacientes portadores de neoplasias activas o remisión, así como aquellos que reciben tratamiento citostático, con inmunosupresores y/o radioterapia.
5. Embarazo o lactancia materna.

APÉNDICE N

CONFORMIDAD DE LA INSTITUCIÓN DE PARTICIPAR EN LA INVESTIGACIÓN

Ciego de Ávila, ____ de _____ de 2007.

A: División de Ensayos Clínicos de La Facultad de Ciencias Medicas de Ciego de Ávila.

De: Dr.(a) _____

Dirección del Hospital: _____

La presente es para informales que, habiendo analizado el protocolo de la investigación titulado: “Aplicación tópica de bromelina y P1G10 en pacientes con úlceras venosas”, estamos de acuerdo con que esta institución participe en la misma, para lo cual nos comprometemos a:

1. Incluir este estudio en el plan de investigaciones de la unidad y controlar consecuentemente su marcha.
2. Tomar todas las medidas necesarias para que se cumpla lo establecido en el protocolo, incluyendo la hospitalización y el uso del tratamiento concomitantes en los pacientes susceptibles de ser incluidos en el estudio.
3. Autorizar a los investigadores responsables y participantes en el estudio, que más abajo se relacionan, a consumir el tiempo necesario para desarrollar el mismo con la calidad requerida.
4. En caso de que alguno de los investigadores abandone el estudio, informar inmediatamente quién lo reemplazará.
5. No desarrollar otras investigaciones donde puedan incluirse los mismos pacientes que en este estudio.
6. Brindar el apoyo necesario en cuanto a medios auxiliares de diagnóstico, según se establece en el protocolo, incluyendo estudios imagenológicos y de laboratorio clínico.
7. Autorizar a los Responsables del Control de la Calidad a visitar la unidad y controlar la marcha de la investigación. Como para esto deben revisar la documentación relacionada con la misma, incluyendo las historias clínicas y otros registros de la unidad, se brindarán las facilidades para ellos.
8. Tomar todas las medidas necesarias para que se cumplan las normas de Buenas Prácticas Clínicas en el desarrollo de la investigación.

Los investigadores de la institución que participarán en este estudio son:

Nombre	Calificación	Servicio

Se da por entendido que los investigadores de la unidad participarán en la confección y análisis de la información que se genere de esta investigación, así como en la autoría de las comunicaciones científicas que se produzcan y contengan los datos de los pacientes de la unidad.

Firma y cuño: _____

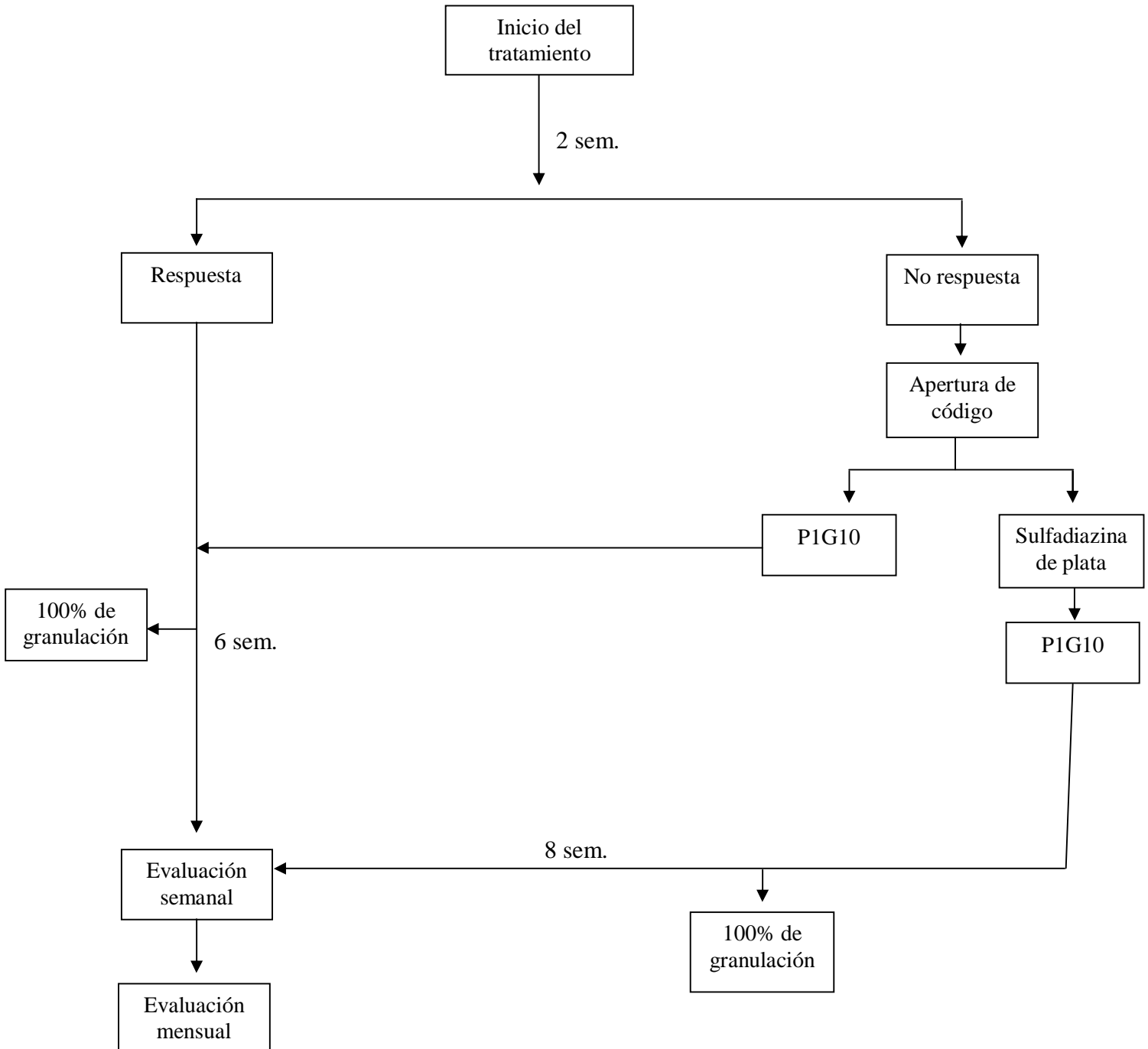
APÊNDICE P
ESCALA ANÁLOGA VISUAL

Sin dolor	Leve	Moderado	Severo	Penosísimo
-----------	------	----------	--------	------------



APÉNDICE Q

DIAGRAMA DE FLUJO DEL ENSAYO CLÍNICO



APÉNDICE R

RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS PRODUCTOS

Descripción del producto:

Proteasa derivada del fruto de *Carica candamarsensis*, originaria de los Andes en Sur América.

Efecto: Actividad proteolítica (debridante) y estimulante de la proliferación celular (epitelización).

Evaluación toxicológica:

Entre las dosis evaluadas, la formulación que contenía un 10% de P1G10 fue constatada irritación dérmica moderada. Por tanto la utilización tópica es segura en concentraciones más pequeñas que 1%.

El análisis histopatológico de diferentes órganos (pulmones, riñones, corazón, hígado y bazo) de ratas Swiss tratadas tópicamente con 0,1% de P1G10 en vehículo por 3 y 6 meses, no mostró alteraciones importantes en relación a los controles.

Descripción del producto: Proteasa obtenida de tallos de *Ananas comosus* (L) Merr

Efecto: Desbridante

Evaluación toxicológica:

Mortalidad observada con Bromelina administrada por vía intraperitoneal en ratones BDF-1 a dosis única: **DL₅₀**=216.35mg/Kg. Límite superior=302.26mg/Kg. Límite inferior=154.86mg/Kg.

Mortalidad observada con Bromelina administrada por vía intraperitoneal en ratones BDF-1 a dosis repetidas. **DL₅₀**=105.91mg/Kg. Límite superior=153.3mg/Kg. Límite inferior=73.17mg/Kg.

Entre las dosis evaluadas, la formulación que contenía un 5% de Bromelina fue constatada irritación dérmica ligera. Por tanto la utilización tópica es segura hasta esa concentración.