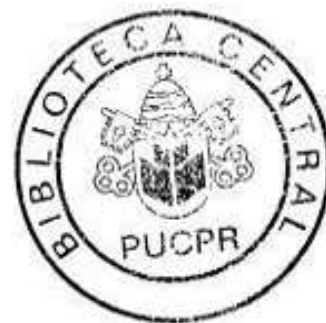


**Pedro Ernesto Caron**



**EFEITOS DO POLÍMERO DE MAMONA E DO BROMETO DE  
LAURIL-DIMETIL-BENZIL-AMÔNIA NA CICATRIZAÇÃO DE  
FERIDAS EM RATOS WISTAR**

**CURITIBA**

**2003**

**Pedro Ernesto Caron**



**EFEITOS DO POLÍMERO DE MAMONA E DO BROMETO DE  
LAURIL-DIMETIL-BENZIL-AMÔNIA NA CICATRIZAÇÃO DE  
FERIDAS EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Coordenador : Dr. Paulo Roberto Slud Brofman

Orientador : Dr. Paulo Roberto Slud Brofman

**CURITIBA**

**2003**

*Após um pedaço de minha vida, inteiramente dedicado aos meus estudos de Medicina, quis ter a satisfação de volver o olhar ao passado, de quando em quando, para contemplar, tranqüilo, o curso das minhas atividades.*

*Observando as coisas por prisma alheio a todo rigor científico, por um lado mais humano, se assim posso dizer, e quase velado pelo sentimento - razão de ser de toda poesia - aconteceu-me experimentar a sensação de viajante que depois de galgar caminho penoso, atulhado de pedras, embaraços e espinhos, volta-se para olhar a encosta e descobre um belo panorama.*

*E agora ?*

*Agora só me resta intensificar as minhas tarefas nos muitos anos de atividade que me são concedidos e, quando chegar ao fim, terei a suprema esperança, isto é, a ambição de ter servido ao ser humano e a Deus.*

***Andréa Majocchi***

*Dedico este trabalho à minha mãe Diva Dominga Deboni Caron,  
à memória do meu pai Darvil José Caron,  
à minha esposa Danielle  
e aos meus filhos Pedro Henrique e Paola.*

## AGRADECIMENTOS

*Consigo aqui, cumprindo um dever gratíssimo, meus agradecimentos àqueles que de forma direta ou indireta, auxiliaram na minha formação como Médico-Cirurgião ou na elaboração deste trabalho.*

*À Pontifícia Universidade Católica do Paraná.*

*Ao professor Doutor Giocondo Villanova Artigas.*

*Ao professor Doutor Paulo Roberto Slud Brofman*

*Ao professor Doutor Antonio de Pádua Gomes da Silva.*

*Ao Doutor Marco Antonio Caron.*

*Ao Doutor Adolar Nicoluzzi.*

*Ao professor Doutor João Carlos Domingues Repka.*

*Aos alunos do curso de Medicina Michel Wentz Antunes, Álvaro Silveira Neto e Rodrigo Theodoro Belila.*

*Aos funcionários do Hospital e Maternidade Angelina Caron.*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	xiii
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVO .....	3
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.2 O POLÍMERO DE MAMONA .....	4
2.3 O BROMETO DE LAURIL-DIMETIL-BENZIL-AMÔNIA .....	8

<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	11
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	12
3.1.1 Animal de experimentação .....	12
3.1.2 Ambiente de experimentação .....	12
3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	13
3.2.1 Anestesia .....	13
3.2.2 Preparação da pele dos ratos .....	13
3.2.3 Confecção da ferida .....	13
3.2.4 Preparação e Inoculação da Suspensão de <i>Staphylococcus aureus</i> ....	14
3.3 CURATIVOS .....	15
3.4 EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS .....	16
3.5 AFERIÇÕES.....	17
3.5.1 Avaliações histológicas .....	17
3.5.2 Dosagem de hidroxiprolina tecidual .....	18
3.5.2.1 Método .....	18
3.5.3 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
3.5.3.1 Método .....	20
3.5.4 Avaliação da permeabilidade vascular pelo azul de Evans.....	20
3.5.4.1 Preparação da solução de azul de Evans.....	20
3.5.4.2 Inoculação .....	21
3.5.4.3 Calibração do método.....	21
3.5.4.4 Obtenção de amostras para dosagem de azul de Evans.....	22
3.5.4.5 Extração e dosagem de azul de Evans.....	22
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	23

<b>4 RESULTADOS</b> .....	24
4.1 RESULTADOS DAS DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA TECIDUAIS .....	24
4.2 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA EXSUDAÇÃO INFLAMATÓRIA PELO MÉTODO DO AZUL DE EVANS .....	26
4.3 CONTAGEM DE ESTAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	28
4.4 AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS .....	29
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	31
5.1 O MODELO ANIMAL UTILIZADO .....	32
5.2 A SÍNTESE DE COLÁGENO E EVOLUÇÃO HISTOLÓGICA DE FERIDAS CUTÂNEAS.....	35
5.3 A EXSUDAÇÃO INFLAMATÓRIA .....	37
5.4 O TECIDO DE GRANULAÇÃO .....	40
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	41
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	42
<b>ANEXO</b> .....	52



## LISTA DE ABREVIATURAS

®	–	Marca registrada
µg	–	Microgramas
µl	–	Microlitros
a.C	–	antes de Cristo
AE	–	Azul de Evans
AOAC	–	"The Association of Oficial Agricultural Chemists U.S.A"
ATCC	–	American Type Cuture Collection
ATP	–	Trifosfato de adenosina
BMA	–	Brometo de Lauril-Dimetil-Benzil-Amônia
DNA	–	Ácido Desoxirribonucléico
g	–	Gramas
GL	–	Graduação alcoólica em graus Gay-Lussac
INCQS	–	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz – RJ
kg	–	Kilogramo
M	–	Solução Molar
mg	–	Miligrama
ml	–	Mililitro
N	–	Solução normal
nm	–	Nanômetro
OH-prol	–	Hidroxiprolina

- p – Nível de significância estatística
- pH – Potencial Hidrogeniônico
- PM – Polímero de Mamona
- q.s.p – Quantidade suficiente para
- rpm – Rotações por minuto
- TNF $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa
- UFC – Unidades Formadoras de Colônias

## LISTA DE TABELAS E QUADRO

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO PORCENTUAL DE ÁCIDOS GRAXOS DO POLÍMERO DE MAMONA .....	5
TABELA 2 - DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E DOS PROCEDIMENTOS EXECUTADOS .....	11
TABELA 3 - CORRELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DO AZUL DE EVANS E DENSIDADE ÓPTICA A 620nm FRENTE À SOLUÇÃO FISIOLÓGICA COMO BRANCO .....	21
TABELA 4 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA EM FERIDAS INFECTADAS PELO <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
TABELA 5 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA EM FERIDAS NÃO INFECTADAS .....	25
TABELA 6 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE AZUL DE EVANS EM FERIDAS INFECTADAS PELO <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
TABELA 7- AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE AZUL DE EVANS EM FERIDAS NÃO INFECTADAS.....	26

TABELA 8 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS CONTAGENS DE <i>Staphylococcus aureus</i> EM FERIDAS INFECTADAS .....	29
--	----

QUADRO 1- PORCENTAGEM DE OCORRÊNCIA DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS .....	29
--	----

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FOLHAS E FRUTOS DA MAMONA ( <i>Ricinus comunis</i> ) .....	4
FIGURA 2 - ASPECTO ILUSTRATIVO DA FERIDA CIRÚRGICA.....	13
FIGURA 3 - A INOCULAÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> NAS BORDAS DA FERIDA CIRÚRGICA.....	15
FIGURA 4 - ASPECTO ILUSTRATIVO DOS CURATIVOS EXECUTADOS DIARIAMENTE.....	16

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CALIBRAÇÃO DO AZUL DE EVANS .....	22
GRÁFICO 2 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA ENTRE AS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA EM FERIDAS INFECTADAS PELO <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
GRÁFICO 3 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA ENTRE AS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA EM FERIDAS NÃO INFECTADAS .....	26
GRÁFICO 4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS DOSAGENS DE AZUL DE EVANS EM FERIDAS INFECTADAS PELO <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28

## RESUMO

**Objetivos:** O objetivo deste estudo foi, comparar a cicatrização de feridas infectadas e não infectadas, em pele de ratos, tratadas pelo polímero de mamona (PM) e brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia (BMA). **Material e Método:** Foram utilizados 98 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia mammalia*) Wistar, com idade média de  $157,32 \pm 3,43$  dias e peso médio de  $245,64 \pm 14,76$ g. Em cada animal foi executada uma ferida incisa de 4cm de comprimento sobre a coluna vertebral. Os animais eram separados em 3 grupos : infectados com  $80 \times 10^9$  UFC de *Staphylococcus aureus* (n=45) e não infectados (n=45), ambos subdivididos em 3 subgrupos (n=15) conforme o tratamento a ser submetido: polímero de mamona (Grupo PM), brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia (Grupo BMA) e solução salina isotônica (Grupo SF). Foram também utilizados oito ratos normais para a obtenção dos valores normais das avaliações laboratoriais (Grupo controle). A cada 24 horas após a confecção da ferida e infecção, todos os animais eram submetidos à troca de curativos com 1ml do produto a ser testado. A cada 5 dias, durante 15 dias, cinco ratos de cada sub-grupo eram submetidos à eutanásia e coleta de amostras da ferida cirúrgica para: dosagem de hidroxiprolina tecidual, avaliação da permeabilidade vascular, contagem de *Staphylococcus aureus* e histologia. **Resultados:** Não houve óbitos durante os períodos de avaliações e todas as feridas infectadas com *Staphylococcus aureus* evidenciaram macroscopicamente sinais de infecção. As feridas infectadas e tratadas com BMA ou PM não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ) quando comparados à ao grupo SSI, quanto à biossíntese de hidroxiprolina nas três avaliações procedidas. Houve significância estatística quanto à permeabilidade vascular no décimo quinto dia de evolução entre os animais não infectados do grupo BMA e do grupo SSI

( $p < 0,01$ ) e entre o grupo PM e SSI. Houve significância estatística ( $p < 0,01$ ) nas contagens de *Staphylococcus aureus* no quinto dia de evolução entre os animais infectados dos grupos BMA e PM ( $p < 0,05$ ) e entre BMA e não tratados ( $p < 0,001$ ). Entre aqueles tratados com PM, no décimo dia de evolução, somente diferiram estatisticamente dos não tratados ( $p < 0,001$ ). No décimo quinto dia houve significância estatística entre os grupos BMA e não tratados ( $p < 0,01$ ) e entre PM e não tratados ( $p < 0,05$ ). Conforme as porcentagens dos achados histológicos nos grupos de animais não infectados pode-se observar que quanto às alterações inflamatórias, no décimo dia de evolução os animais tratados com BMA apresentaram evolução mais favorável em relação ao grupo PM, tendo sido evidenciada regressão do padrão inflamatório de forma mais precoce. Da mesma maneira, a formação de tecido de granulação ocorreu mais precocemente em relação aos demais grupos e não houve formação de reação de corpo estranho.

**Conclusões:** Não houve diferença significativa entre o não tratamento destas feridas e o uso de brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia ou do polímero de mamona, independentemente da presença de infecção, quanto à síntese de colágeno. Quanto a exudação inflamatória das feridas cirúrgicas, não se observaram diferenças significativas entre o não tratamento destas feridas e o uso de brometo de BMA e o PM, independentemente da presença de infecção. Quanto à redução da população bacteriana infectante observaram-se vantagens no uso do BMA, quando comparado ao uso de polímero de mamona e o não tratamento das feridas cirúrgicas.



## ABSTRACT

**Objectives:** The aim of this study was to compare the effect of the castor-bean polymer and the lauryl-dimetyl-benzyl-ammonia bromide on the healing process of infected skin wounds in rats. **Method:** 98 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*, *Rodentia mammalian*) — aged 157,32 days (average) and weighing  $245,64 \pm 14,76$ g (average) — were used. A 4cm-long skin wound was produced in the dorsum of each animal. The animals were divided into two groups. One was infected with a  $80 \times 10^9$  *Staphylococcus aureus* colony-forming unit (n=45); the other was left uninfected (n=45). Both groups were subdivided into three smaller groups (n=15), according to the type of handling they were to be submitted to: treatment with the castor-bean polymer (PM\* group), treatment with lauryl-dimetyl-benzyl-ammonium bromide (BMA\* group) and treatment with a physiologic solution (SSI\* group), eight normal rats were used for normal values of laboratorial evaluations (Control group). Every 24 hours after the wounds and infection had been produced, all the animals were treated with a 1ml dose of the product being tested, and bandages were replaced with fresh ones. On the 5<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> post-operative days, five animals in each group were submitted to euthanasia, and the surgical wound was removed and prepared for a histological analysis by Hematoxilyn-Eosin staining, for a quantitative evaluation of collagen by tissular hydroxyproline content, for inflammatory extravasation by the Evans Blue method and a *Staphylococcus aureus* count. The resulting data were submitted to statistical analysis by the ANOVA method. **Results:** There were no natural animal deaths during the period of study, and all the *Staphylococcus aureus*-infected wounds showed macroscopic infection signs. No differences between the BMA and the PM treatment of the infected wounds were observed when compared

with the Control group ( $p>0.05$ ) in regard to the hydroxyproline biosynthesis in all evaluations. Statistical significance was found in vascular permeability on the 15<sup>th</sup> day of evolution when comparing the non-infected animals in the BMA group and those in the SSI group, and also between the PM and SSI groups ( $p<0.01$ ). Statistical significance ( $p<0.01$ ) was also found in *Staphylococcus aureus* counts on the 5<sup>th</sup> day of evolution after comparing the infected animals in the BMA and those in the PM groups ( $p<0.05$ ), and also between the BMA and Control groups ( $p<0.001$ ). On the 10<sup>th</sup> day, the animals treated with the polymer showed differences only in comparison with the Control group ( $p<0.001$ ). On the 15<sup>th</sup> day, statistical significance was found when comparing the BMA and Control groups ( $p<0.01$ ) and also between the PM and Control groups ( $p<0.05$ ). Based on the percentages of the histological findings in the non-infected groups of animals, it was observed that — in regard to inflammatory alterations — on the 10<sup>th</sup> day, the BMA-treated animals evidenced a more favorable evolution than the polymer-treated group: they showed regression of the inflammatory reaction at an earlier stage. Likewise, granulation-tissue formation occurred sooner than in the other groups, and there was no foreign-body reaction.

**Conclusions:** No significant differences were found between the non-treated wounds and those where both the lauryl-dimethyl-benzyl-ammonium bromide and the castor-bean polymer were used — regardless of whether or not infection was present — in respect to the collagen synthesis. As to the tissular inflammatory extravasation in the surgical wounds, no significant differences were found between the treatment of these wounds either with the bromide or with the polymer, independently of whether or not infection was present. In regard to reduction in infectious skin bacterial population, advantages in the use of the bromide were observed, when compared with both the castor-bean polymer-treated and the untreated surgical wounds.

\* acronyms from the Portuguese equivalents.

## 1 INTRODUÇÃO

A reparação de feridas constitui elemento determinante para a manutenção da homeostase de todo ser vivo. Sem o processo inflamatório-reparativo, qualquer quebra da continuidade de tecidos traduzir-se-ia em potencial perigo de vida. Em escala zoológica mais avançada, especialmente nos mamíferos, o fechamento de feridas ocorre por cicatrização, em última instância, torna-se este fenômeno a garantia da sobrevivência pós-trauma.

No Egito, a 5.000 a.C., os médicos consultavam ao que veio a ser chamado de Papiro de Edwin Smith, que se constituiu no mais antigo documento cirúrgico conhecido e que destaca orientações sensatas sobre o tratamento de feridas como, amarrar as bordas ou suturar simplesmente e aplicar mel e gordura, instruindo o doente a ter moderação em tudo, até ocorrer a cicatrização (KNUTSON, 1981).

Desde os primórdios da Medicina, já era registrada a preocupação com a cicatrização das feridas, que tal como atualmente, era considerada essencial para a saúde. No Código de Hamurabi, 2.000 anos a.C., foram enumeradas propostas terapêuticas para este fim, inclusive estabelecendo punições quando da falha do tratamento médico, já naquela época havia o "fantasma" das feridas crônicas rebeldes ao tratamento. Os índios Navajos escolhiam o canto apropriado para convencer os deuses a acelerarem a cicatrização (ROMM; COCKRELL; FEUSSNER JR., 1984).

Incapazes de determinar com precisão a fisiologia do processo cicatricial e pressionados pela necessidade de obter medicamentos que atuem de forma favorável no fechamento das feridas, muitos estudos vêm tentando avaliar as ações

de novas drogas que possam simultaneamente, acelerar o processo cicatricial e que apresentem significativa inocuidade para os tecidos adjacentes, pois, apesar dos avanços alcançados no controle da infecção, mediante múltiplos cuidados e estudos que ocorreram ao longo da história da Medicina, o problema da cicatrização de feridas infectadas ainda persiste, uma vez que são significantes os registros de seqüelas e perdas de pacientes por esta causa.

Neste contexto, os estudos em modelos animais, contribuem com novas alternativas de terapêuticas, e na literatura consultada foram observados a utilização de diversos produtos como: acetato de hidrocortisona e soro anti-macrófago (LEIBOVICH; ROSS, 1975), mel (BERGMAN, 1983), associação de papaína e sacarose (MASINI; CALAMO, 1986), açúcar (PRATA, 1988), colagenase associada ao cloranfenicol (TEVES, 1989), papaína, açúcar, minoxidil e glucana (SMIALOSWIKI, 1991), fenitoína (LODHA, 1991), povidine (KAY, 1993), alopurinol ou superóxido-dismutase (SÊNEL, 1995), hidrogel, (SOUZA FILHO, 1997), diclofenaco de sódio (TOGNINI; 1998), resinas derivadas da mamona, em alvéolos dentários (CARVALHO, 1997), diclofenaco de sódio (ARAÚJO, 1998), *Aloe vera* (CHITRA; SAJITHLAL; CHANDRAKASAN, 1998), TNF $\alpha$  o TNFbp em intestinos (MAISH, 1998), óxido nítrico (SHUKLA, 1999), óleo de copaíba (BRITO, 1999), ácido hialurônico (MEDEIROS, 1999), hidrocortisona (GUPTA, 1999), insulinoterapia (REPKA, 2000), hormônio do crescimento (BIONDO-SIMOES, 2000 e SANTOS, 2002) entre tantos outros citados.

No presente trabalho foram escolhidas duas novas substâncias a serem estudadas em feridas padronizadas, induzidas em ratos, o polímero de mamona (PM) e o brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia a 10% (BMA), com a finalidade de comparar suas ações sobre o processo cicatricial de feridas cirúrgicas infectadas

pelo *Staphylococcus aureus*, a principal bactéria contaminante nestas lesões, principalmente em casos de trauma.

## 1.1 OBJETIVO

O presente estudo experimental tem como objetivo avaliar comparativamente a evolução da cicatrização em pele de ratos, de feridas infectadas e não infectadas, tratadas pelo polímero de mamona e brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O POLÍMERO DE MAMONA

Este polímero vegetal orgânico é extraído do *Ricinus comunis L*, comumente conhecida no Brasil como mamona. Trata-se de uma oleaginosa da classe *Dicotiledonea*, ordem *Gerianaces*, família *Euforbiaceas*. A mamoeira é também conhecida no Brasil como carrapateira, ricino e palmacusti. Caracteriza-se por folhas grandes palmadas e frutos rodeados de espinhos e contendo três sementes em seu interior (FIGURA 1). Existe ainda controvérsia entre os especialistas, se efetivamente a origem desta planta é da Abissínia ou da Índia, (PINTO, 1956).

FIGURA 1 - FOLHAS E FRUTOS DA MAMONA (*Ricinus comunis L.*)



Os frutos são cápsulas espinhosas contendo sementes oleaginosas. Das sementes da mamona extrai-se o óleo de rícino ou o óleo de mamona, de grande aplicação na indústria de lubrificantes, plastificantes, sabões e detergentes, resinas, cosméticos e indústria farmacêutica (RAYMOND, 1961).

Muito embora tenha elevado teor protéico, sua utilização na dieta humana ainda não foi possível devido à presença de compostos capazes de produzir efeitos indesejáveis no organismo. Destes, o mais nocivo é um alcalóide tóxico denominado *ricina*, cujos efeitos podem ser comparados aos das toxinas botulínica, diftérica e tetânica. Existem também na torta da mamona alérgenos de natureza glicoprotéica, semelhantes aos existentes no amendoim e algodão (MIYADA, 1956).

O polímero, ora em estudo, caracteriza-se pela presença de ácido ricinoléico, que possui 18 átomos de carbono e difere dos demais ácidos graxos por possuir uma hidroxila no carbono 12 e por apresentar dupla ligação entre os carbonos 9 e 10. Da análise por cromatografia de alta resolução em fase gasosa (ANEXO 5), observa-se a seguinte composição:

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO PORCENTUAL DE ÁCIDOS GRAXOS DO POLÍMERO DE MAMONA, CONFORME LAUDO TÉCNICO Nº 3.211 – 27478/93 (ANEXO 21)

Componentes	Porcentagem
Ácidos graxos totais	21,8
Insaponificáveis nos ácidos graxos	0,3
Ácido Palmítico (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	1,6
Ácido Esteárico (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	0,8
Ácido Oléico (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	6,8
Ácido Linoléico (C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	8,2
Ácido Ricinoléico (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> )	82,2

Apresenta atividade antimicrobiana satisfatória avaliada *in vitro*, frente às bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (ANEXO 13).



Para sua utilização *in vivo*, este polímero deve comprovar sua inocuidade em testes padronizados em animais de laboratório. Em 1993, foi procedido o teste toxicológico de irritabilidade em olhos de coelhos, no Centro de Assistência Toxicológica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu. Foram utilizados coelhas albinas, da linhagem Norfolk, pesando entre 1,8 a 2,0Kg, com 2 meses e meio de idade, o polímero de mamona foi utilizado na sua concentração original. Cada animal foi examinado previamente quanto a lesões oculares, mediante a aplicação de fluoresceína a 2%, não sendo observada nenhuma lesão. O polímero foi aplicado no volume de 0,1ml em cada um dos olhos esquerdos dos animais e 0,1ml de solução fisiológica como controle, nos olhos direitos. Foram feitas leituras 1, 3 e 6 horas após a aplicação e posteriormente a cada 24 horas, até o sétimo dia do experimento. Na leitura de 1 hora, o globo ocular dos animais apresentava-se com congestão vascular da conjuntiva, nas 3 horas havia congestão vascular da conjuntiva e aumento de secreção, nas 6 horas estes sinais ainda permaneciam inalterados. Após 24 horas da aplicação observou-se ainda congestão vascular da conjuntiva e nas 48 horas o globo ocular apresentava-se sem alterações. Concluiu-se que o polímero de mamona quando utilizado na concentração original apresentou-se não irritante ou lesivo ao globo ocular, embora tenha causado congestão vascular da conjuntiva e aumento da secreção ocular nos animais nas primeiras 24 horas do experimento (ANEXO 14).

Ainda foram executados experimentos para avaliar a irritabilidade dérmica em coelhos. Os animais foram tricotomizados com 24 horas de antecedência, numa área de 6x12cm, na região dorsal. O polímero de mamona foi aplicado num volume de 2ml sobre a região e as leituras foram feitas 30 e 60 minutos após e a cada 24 horas até o décimo dia. Não foram observadas nenhuma alteração dérmica nos

animais e concluiu-se que o polímero quando aplicado na concentração original, apresenta-se como agente não irritante (ANEXO 15).

O óleo é o mais importante constituinte da semente de mamona, sendo o ácido ricinoléico o seu maior componente. O grupo hidroxila confere ao óleo da mamona a propriedade em álcool. Além disso, é um óleo bastante estável em variadas condições de pressão e temperatura (BON, 1989).

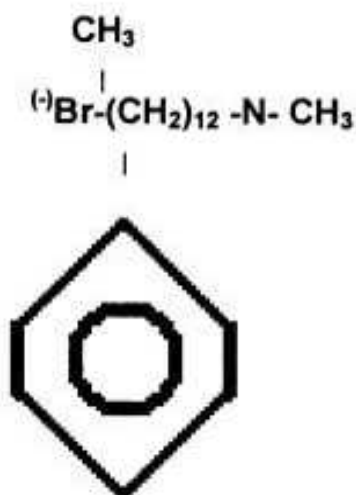
Praticamente toda a produção da mamona é industrializada, obtendo-se como produto principal o óleo e como subproduto a torta de mamona, que tem grande capacidade de restauração de terras esgotadas. A extração do óleo pode ser feita da semente completa (sem descascar) ou da baga (semente descascada por meio de máquinas apropriadas). O método utilizado para extrair o óleo pode ser prensagem, a frio ou a quente, ou extração por solvente.

No caso do óleo medicinal, a prensagem das amêndoas é feita a frio, obtendo-se o óleo límpido, incolor e brilhante, livre do tóxico ricina, com baixo teor de acidez e impurezas. O óleo medicinal ainda deve passar pelos processos de refinação e neutralização, para que seja absolutamente isento de acidez e de impurezas. Já para a extração do óleo industrial utiliza-se também a prensagem a frio ou de preferência, a quente, das sementes completas, obtendo-se óleo tipo *standard* límpido, brilhante, que pode ter, no máximo, 1% de acidez e 0,5% de impurezas e umidade, depois de refinado. O óleo industrial também pode ser obtido da torta resultante da extração do óleo medicinal.

Até a presente data, os estudos sobre o polímero de mamona versam sobre sua ação como componente de cimento ósseo, amplamente utilizado na área de Ortopedia e Odontologia, para a consolidação de próteses.

## 2.2 O BROMETO DE LAURIL-DIMETIL-BENZIL-AMÔNIA

É um produto orgânico, sintético, cuja formulação foi concebida para uso *in vitro*, na degermação de instrumentos médico-hospitalares.



Apresenta-se como líquido incolor e inodoro, comercializado sob a forma de solução aquosa a 10% (p/v) em pH neutro, densidade 1.008 com o nome comercial de Gerdex<sup>®</sup>, apresenta-se solúvel em compostos polares e insolúvel em não polares.

Tem por mecanismo de ação microbicida o fato de alterar o equilíbrio iônico da membrana celular bacteriana, interagindo com grupos amino, impedindo as suas funções de barreira osmótica. Também atua nas ligações fosfatos, desnaturando proteínas plasmáticas, enzimas, ATP (trifosfato de adenosina) e o DNA (Ácido desoxirribonucléico). A presença do Bromo na molécula interfere nos fosfolipídeos e mucopolissacarídeos cuja presença é indispensável para o metabolismo e reprodução de microorganismos.

Em estudo para verificação de atividade microbicida, executado no "Instituto Venezuelano de Investigaciones Científicas - Centro de Microbiología y Biología Celular", conforme a metodologia recomendada pela AOAC, foi comprovada

atividade bactericida e não bacteriostática frente aos seguintes microorganismos: *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 21363), *Serratia rubidea* (ATCC 14756), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6303), *Escherichia coli* (ATCC 9637), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Clostridium sporogenes* (ATCC 3584). A atividade esporicida foi verificada frente a esporos de *Bacillus subtilis* (ATCC 21331), atividade tuberculicida frente ao *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 19420) e fungicida frente ao fungo *Rhizomucor miehei* (ATCC 26912) (ANEXO 16).

Neste produto foi avaliado o seu potencial de irritação ocular em coelhos no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), conforme metodologia. Em coelhos albinos da linhagem (Nova Zelândia), machos, pesando entre 1,5 a 3kg, foram aplicados 0,1ml do produto no saco conjuntival do olho direito mantendo-se as pálpebras unidas durante 30 segundos. O olho esquerdo foi mantido como controle. Procederam-se leituras nas 24, 48 e 72 horas e sétimo dia. Concluiu-se que o produto pode se classificado como não irritante (ANEXO 17).

Em avaliação de irritação dérmica, conforme metodologia também estabelecida pelo INCQS, o produto Gerdex<sup>®</sup>, embora tenha induzido eritema e edema leve, foi classificado como não irritante (ANEXO 18).

Para a determinação de sua dose letal mediana, foi empregada metodologia padronizada pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS - RJ), sendo administrado o produto por via oral em ratos Wistar (10 machos e 10 fêmeas), com pesos entre 160 a 210g. Os animais foram observados quanto aos sinais de intoxicação e mortes até o 14º dia. A dose letal mediana foi calculada pelo método estatístico de Litchfield-Wilcoxon. Concluiu-se que a dose letal mediana oral machos e fêmeas foi superior a 600mg/Kg, não tendo sido observadas alterações

macroscópicas no trato digestivo e vísceras abdominais após necrópsias (ANEXO 19).

Procedeu-se também ensaio para a determinação da dose letal mediana dermal conforme metodologia preconizada pelo INCQS, sendo administrado o produto na região dorsal tricotomizada de ratos Wistar (10 machos e 10 fêmeas), com pesos entre 150 a 200g. Os animais foram observados quanto aos sinais de intoxicação e mortes até o 14º dia. A dose letal mediana foi calculada pelo método estatístico de Litchfield-Wilcoxon. Concluiu-se que a dose letal mediana dermal machos e fêmeas foi superior a 12.000mg/Kg, não tendo sido observadas alterações macroscópicas na região onde o produto foi aplicado (ANEXO 20).



### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo foi realizado no Centro de Estudos do Hospital e Maternidade Angelina Caron. Foram testados o polímero de mamona (PM), obtido do departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Estadual Paulista (Botucatu-SP) e o brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia (BMA) na cicatrização de feridas cirúrgicas, infectadas por *Staphylococcus aureus* e não infectadas, conforme grupos de animais descritos na TABELA 2.

Aplicaram-se os preceitos éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), a *Nomina Anatomica Veterinaria* (1983) e as normas para apresentação de documentos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (2002).

TABELA 2 - DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E DOS PROCEDIMENTOS EXECUTADOS

Grupos	N	Procedimentos	Períodos de Aferições e número de animais		
			5º	10º	15º
Ferida infectada com <i>Staphylococcus aureus</i>	45	Tratados com brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia	5	5	5
		Tratados com polímero de mamona	5	5	5
		Tratados com solução salina isotônica	5	5	5
Ferida não infectada	45	Tratados com brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia	5	5	5
		Tratados com polímero de mamona	5	5	5
		Tratados com solução salina isotônica	5	5	5
Controle	8	Grupo de ratos nos quais não foram executados nenhum dos procedimentos, sendo destinados para definir os valores de referência nas dosagens de hidroxiprolina tecidual e exudação inflamatória.			

Para o acompanhamento do processo cicatricial em estudo foram avaliados os seguintes parâmetros: dosagem de hidroxiprolina como moderador de síntese de colágeno, exsudação plasmática tecidual como indicador do processo inflamatório, contagem de *Staphylococcus aureus* como indicador da infecção induzida e avaliação histológica, a cada cinco dias.

### **3.1.1 Animal de Experimentação**

Utilizaram-se 98 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia mammalia*) Wistar, com idade média de  $157,32 \pm 3,43$  dias e peso médio de  $245,64 \pm 14,76$  gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Paraná.

### **3.1.2 Ambiente de Experimentação**

Distribuíram-se os animais, em grupos de 3 e 5 ratos, em caixas de polipropileno, de dimensões padronizadas e mantidos sob ciclos de iluminação ambiental e temperatura controlados. Os animais receberam ração comercial específica para a espécie e tiveram acesso à água durante todo o experimento. As caixas eram trocadas a cada 48 horas. O grupo controle (n=8) foi mantido nas mesmas condições durante todo o estudo, sendo submetido à eutanásia no último dia, concomitantemente aos ratos do décimo quinto dia de experimento.

## 3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

### 3.2.1 Anestesia

Os ratos receberam indução anestésica inalatória com éter sulfúrico (REAGEN<sup>®</sup>), em compartimento fechado, a seguir eram inoculados com solução de hidrato de cloral (REAGEN<sup>®</sup>) a 10%, na dose de 300mg/Kg e mantidos com inalação de éter sulfúrico, em compartimento aberto, quando necessário (BACELAR, 1999)

### 3.2.2 Preparação da pele dos ratos

Procedia-se a tricotomia quatro horas antes do procedimento cirúrgico, na região dorsal dos ratos, entre a inserção dos membros inferiores e os últimos arcos costais, por raspagem com lâmina-gilete e sabão comerciais. Procedia-se em seguida a limpeza da área tricotomizada com álcool 90°GL.

### 3.2.3 Confecção das feridas

FIGURA 2 - ASPECTO ILUSTRATIVO DA FERIDA CIRÚRGICA





Em cada animal foi executada uma ferida incisa de 4cm de comprimento sobre a coluna vertebral. Atingia exclusivamente a pele e a tela subcutânea, deixando à mostra a fáscia muscular lombar (FIGURA 2, p. 13). Procedia-se hemostasia por compressão manual, com gaze esterilizada.

Conforme o grupo a que pertencia cada animal, era inoculado por via subcutânea, pelos bordos da ferida, 1ml de Solução Salina Isotônica em quatro sítios, com 0,25ml, ou da mesma forma, com suspensão de *Staphylococcus aureus*.

#### **3.2.4 Preparação e inoculação da suspensão de *Staphylococcus aureus***

Foi utilizada uma cepa 18.645 de *Staphylococcus aureus* proveniente da ATCC, mantida em meio de conservação (NOBLE, 1964).

Para o experimento, esta cepa foi ressuspensa 5 dias antes em Caldo Tripticaseína de Soja (BIOBRÁS®), e incubada por 24 horas 37°C. A suspensão bacteriana obtida foi submetida às provas bioquímicas confirmatórias para *Staphylococcus aureus* : prova da catalase e prova da coagulase. Após a confirmação bioquímica, a cepa foi novamente semeada no mesmo meio de cultura por 18 horas, a seguir os cultivos obtidos foram centrifugados a 5.000rpm em centrífuga FANEN®. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensa em Solução Salina Isotônica pH 7,2.

A suspensão isotonizada de *Staphylococcus aureus* foi padronizada no tubo dez da escala de MacFarland, correspondente a  $10^{10}$  bactérias/ml. Uma alíquota da suspensão padronizada foi submetida à contagem de *Staphylococcus aureus* pelo método de diluição e contagem em placas, utilizando o meio de *Baird Parker*

(OXOID®), suplementado com solução de gema de ovo e telurito de potássio a 1% (Oxoid®).

A seguir esta suspensão foi inoculada em 4 locais circundantes à ferida cirúrgica, em volumes de 0,2ml cada, correspondente à  $80 \times 10^9$  bactérias/0,8ml (FIGURA 3).

FIGURA 3 - ASPECTO ILUSTRATIVO DA INOCULAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* NAS BORDAS DA FERIDA CIRÚRGICA



### 3.3 CURATIVOS

Diariamente, a cada 24 horas após a confecção da ferida, todos os animais eram submetidos à troca de curativos. Estes eram feitos com os animais anestesiados por inalação de éter sulfúrico (Reagen®), e retirada a bandagem anterior. A ferida cirúrgica era então irrigada com 1ml do produto a ser testado (polímero de mamona – PM, solução a 10% de brometo de lauril-dimetil-benzil-

A seguir eram cobertas com duas gazes de 7X5cm esterilizadas e fixadas por duas tiras de esparadrapo em toda a circunferência do animal e outras duas tiras para fixar a bandagem à região torácica (FIGURA 4). Os animais eram devolvidos às suas respectivas caixas e mantidos como descrito no item 3.1.2, p. 12. até a oportunidade da eutanásia e coleta de amostras.

FIGURA 4: ASPECTO ILUSTRATIVO DOS CURATIVOS EXECUTADOS DIARIAMENTE



### 3.4 EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS

Oito horas prévias à eutanásia, os animais eram inoculados com solução de azul de Evans (Merck®) e conforme o cronograma e os grupos em estudo, (TABELA 2, p. 11) procedia-se a eutanásia por inalação letal de éter sulfúrico (Reagen®). A seguir era ressecada toda a área da ferida induzida, mantendo rebordo médio de 1cm. A amostra era seccionada em três porções tendo o cuidado de que nestas porções estivessem partes da ferida.

Os fragmentos das amostras eram acondicionados conforme a aferição a ser procedida. Para a avaliação histológica eram acondicionados e identificados em frascos com formalina, para a dosagem de azul de Evans em frascos de vidro comum e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a oportunidade da aferição e para as contagens de *Staphylococcus aureus*, em placas de Petri esterilizadas.

### 3.5 AFERIÇÕES

Todos os materiais utilizados (produtos químicos, materiais e vidararia e soluções estão listados nos anexos 1, 2 e 3 respectivamente.

#### 3.5.1 Avaliação Histológica

Avaliação efetuada com o objetivo de definir padrão histológico evolutivo das lesões induzidas em todos os animais dos grupos estudados nos períodos propostos (TABELA 1, p. 5). Empregou-se o método da Hematoxilina e Eosina para avaliar reação inflamatória e alterações vasculares (SMIALOWSKI, 1991; KAY, 1993):

- Alterações inflamatórias: ausente, mínima, moderada ou intensa
- Tipo de inflamação: aguda ou crônica
- Organização da cicatriz: segundo a distribuição do colágeno
- Úlcera cutânea: presente ou ausente
- Tecido de granulação: presente ou ausente
- Reação granulomatosa de corpo estranho: presente ou ausente



### 3.5.2 Dosagem de hidroxiprolina tecidual

Avaliação executada para verificar o comportamento bioquímico da síntese de colágeno durante o período proposto neste estudo e se havia interferência das substâncias em estudo neste processo, através do método espectrofotométrico (DIETZ, 1995).

#### 3.5.2.1 Método

Prévio ao processamento das amostras, foram preparadas as seguintes soluções: tampão borato de potássio pH 8,7, alanina a 10%, cloramina T 0,2M, tiosulfato de Sódio 3,6M e o reativo de Ehrlich (conforme descrição no ANEXO 3).

A seguir foram preparados tubos de ensaio de 16x150mm com tampa de rosca, com graduação marcada de 15ml para as soluções branca, padrão e amostras. As amostras foram pesadas em balança eletrônica Mettler® e colocadas nos tubos de ensaio identificados. Foram feitos os 3 controles positivos com 1ml de solução padrão de Hidroxiprolina e os controles negativos com 1ml de água deionizada. Foram pipetados em cada tubo 1ml de HCl concentrado, em capela com exaustão. Os tubos foram fechados e levados à hidrólise ácida a 90°C durante 20 horas.

As amostras hidrolizadas foram neutralizadas pela adição de 1 gota de solução de fenolftaleína, ajustou-se o pH entre 8,2 a 9,8 pela adição de solução de KOH 0,1N e completou-se com água destilada até a marca de 15ml.

Alíquotas de 3ml dos hidrolizados neutralizados foram transferidas para outros tubos com tampas de rosca e saturadas com KCl. Em seguida acrescentaram-se a

alanina e induziu-se o processo de oxidação pela cloramina T por 30 minutos e interrompeu-se com tiosulfato de sódio.

Cumprida a etapa da oxidação, realizou-se novo aquecimento das amostras para a formação do pirrol o qual foi extraído pelo tolueno e finalmente a reação formadora de cor pela adição do reativo de Ehrlich. Neste instante ocorreu a imediata formação de cor a qual foi medida em espectrofotômetro modelo Bio-Teck Bt100 (EMBRABIO®).

A partir das leituras das absorbâncias de cada amostra. O cálculo final da quantidade de hidroxiprolina presente na amostra tecidual em miligramas por grama de tecido foi feito pelas seguintes fórmulas:

$$\text{a) Hidroxiprolina (mg)/ml} = \frac{Ax - Ab \times 0,036}{Ap - Ab}$$

Sendo:

Ax: absorbância do cromógeno da amostra tecidual

Ap: absorbância do cromógeno da solução padrão de trabalho de hidroxiprolina

Ab: absorbância da solução branca

0,036: constante referente à concentração da solução padrão de trabalho de hidroxiprolina de 36g/ml

$$\text{b) Total de Tecido/ml} : \frac{\text{peso em gramas da amostra}}{15\text{ml (diluição inicial)}}$$

15ml (diluição inicial)

$$\text{c) mg de hidroxiprolina/g de tecido} : \frac{\text{mg de hidroxiprolina/ml}}{\text{g de tecido/ml}}$$

### **3.5.3 Contagem de *Staphylococcus aureus***

#### **3.5.3.1 Método**

Utilizou-se o agar Baird-Parker (Oxoid®) suplementado com lecitina e telurito de potássio (Oxoid®) a 0,5%. As amostras eram pesadas e maceradas esterilmente. Pipetava-se 1 ml de da suspensão macerada e semeava-se em placa de Petri esterilizada, procedeu-se diluição à  $10^{-1}$  a qual foi igualmente semeada, num volume de 1ml. A seguir o meio de cultura era fundido e distribuído em volumes de 15 ml nas placas de Petri com as amostras. Aguardava-se a solidificação do meio e o incubava a 37°C por 48 horas. Procedia-se então a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Staphylococcus aureus* em ambas as placas.

### **3.5.4 Avaliação da permeabilidade vascular pelo azul de Evans (Bordon de Corvalan, 1994; Hajar, 1994)**

#### **3.5.4.1 Preparação da solução de azul de Evans**

Foi preparada uma solução do azul de Evans (MERCK® artigo 3169) a 2,5% (p/v), em solução salina isotônica, em volume suficiente para todo o experimento. A solução resultante apresentava 20mg/ml, sendo filtrada em membrana esterilizante de 0,22 $\mu$  (MILLIPORE®).

### 3.5.4.2 Inoculação

Foi realizada a inoculação do azul de Evans em todos os animais, 8 horas antes do sacrifício. O rato sob efeito anestésico de éter sulfúrico foi colocado em decúbito dorsal. O pênis foi tracionado e a veia peniana puncionada com agulha 13x4,5 mm. A seguir foi injetada a solução do azul de Evans na dose de 20 mg/kg de peso.

### 3.5.4.3 Calibração do método

Separou-se uma alíquota da solução do azul de Evans a 2,5% (item 3.5.4.1, p. 20), para padronização do método de microleitura espectrofotométrica.

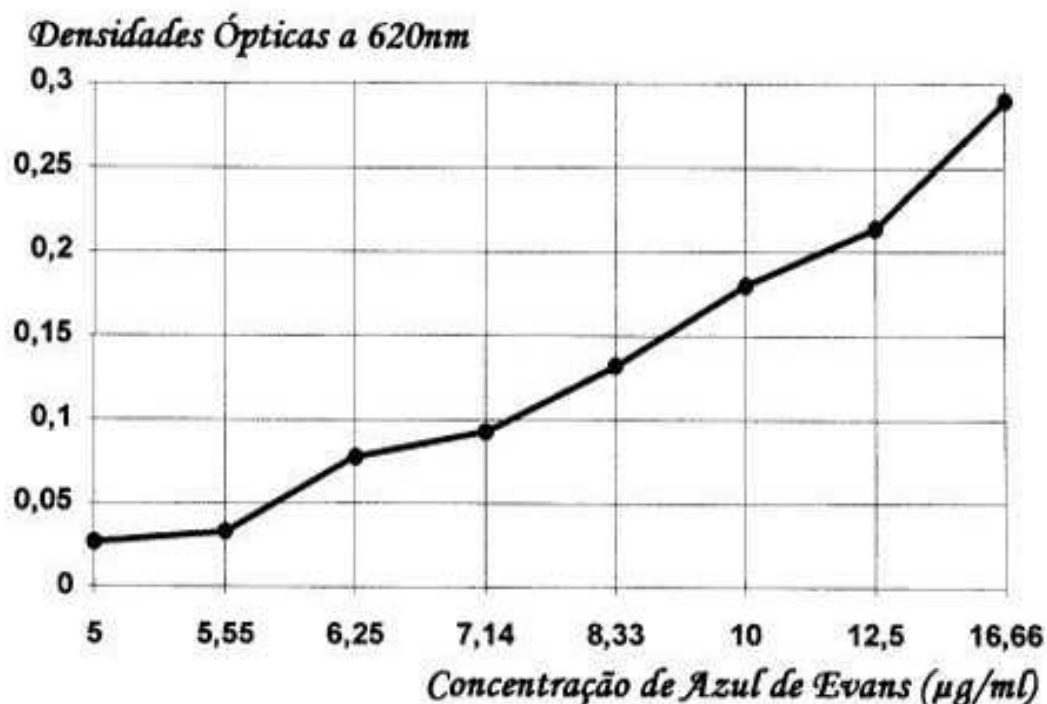
Nesta solução calculou-se o coeficiente de extinção no comprimento de onda de 620 nm, frente à formamida, nas diluições compreendidas entre 1/1500 a 1/5000 utilizando leitor de micro-placas de ELISA-BIOTEK®, modelo Bt-100. Os valores de densidade óptica obtidos nas diluições da solução padrão do azul de Evans em solução fisiológica em relação com as concentrações das mesmas foram analisadas e obteve-se índice de correlação ( $r$ ) de 0,984357. Os valores apresentados na tabela 2, p. 11, foram usados como referência.

TABELA 3 - CORRELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DO AZUL DE EVANS DA SOLUÇÃO PADRÃO E DENSIDADE ÓPTICA A 620 nm FRENTE A FORMAMIDA

Concentrações ( $\mu\text{g/ml}$ )	Densidade óptica
16,66	0,290
12,50	0,214
10,00	0,180
8,33	0,132
7,14	0,093
6,25	0,078
5,55	0,033
5,00	0,027



GRÁFICO 1 - CALIBRAÇÃO DO AZUL DE EVANS A 620 nm



#### 3.5.4.4 Obtenção de amostras para dosagem de azul de Evans:

Procedeu-se à coleta das amostras de fragmentos de pele e tecido subcutâneo, conforme descrito no item 3.4. Estas, foram individualmente pesadas em balança eletrônica e colocadas em tubos de ensaio, acrescentando-se a estas Formamida (MERCK® artigo 9684.1000), na proporção de 4 ml/g de peso da amostra.

#### 3.5.4.5 Extração e dosagem de azul de Evans

Os extratos de azul de Evans em Formamida foram distribuídos em volumes de 150µl, com auxílio de uma pipeta automática GILSON®, em cada um dos orifícios da placa de Terazaki (CORNING®), realizou-se leitura espectrofotométrica em leitor de ELISA com filtro de 620nm de comprimento de onda.

As leituras obtidas foram interpoladas por regressão linear na curva de calibração da solução do Azul de Evans e suas concentrações nas amostras calculadas em microgramas do corante por grama de tecido ( $\mu\text{g/g}$ ).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Foram aplicados tratamentos estatísticos para a comparação entre as médias de cada grupo de animais quanto aos valores obtidos nas aferições de dosagem de hidroxiprolina, dosagem de Azul de Evans tecidual, contagem de *Staphylococcus aureus* e porcentagem de ocorrência dos parâmetros histológicos. As comparações foram procedidas pelo método de ANOVA, através do programa GrafPad InStat - Statistical Softwar - Germany - 1998, tendo como valor de significância estatística para rejeição da hipótese nula  $p < 0,05$  e classificada conforme os níveis  $p > 0,05$  = não significativa,  $p > 0,001$  = muito significativa\*\* e  $p > 0,0001$  = altamente significativa\*\*\*.

## 4 RESULTADOS

Todos os resultados individuais de cada rato, de cada grupo estudado, encontram-se disponíveis no capítulo anexos.

### 4.1 RESULTADOS DAS DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA TECIDUAIS

Conforme avaliação estatística, foram significantes (TABELA 3, p. 21) as comparações entre as médias de hidroxiprolina tecidual dos seguintes grupos :

GRÁFICO 2 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA ENTRE AS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA EM FERIDAS INFECTADAS COM *Staphylococcus aureus* E NÃO INFECTADAS

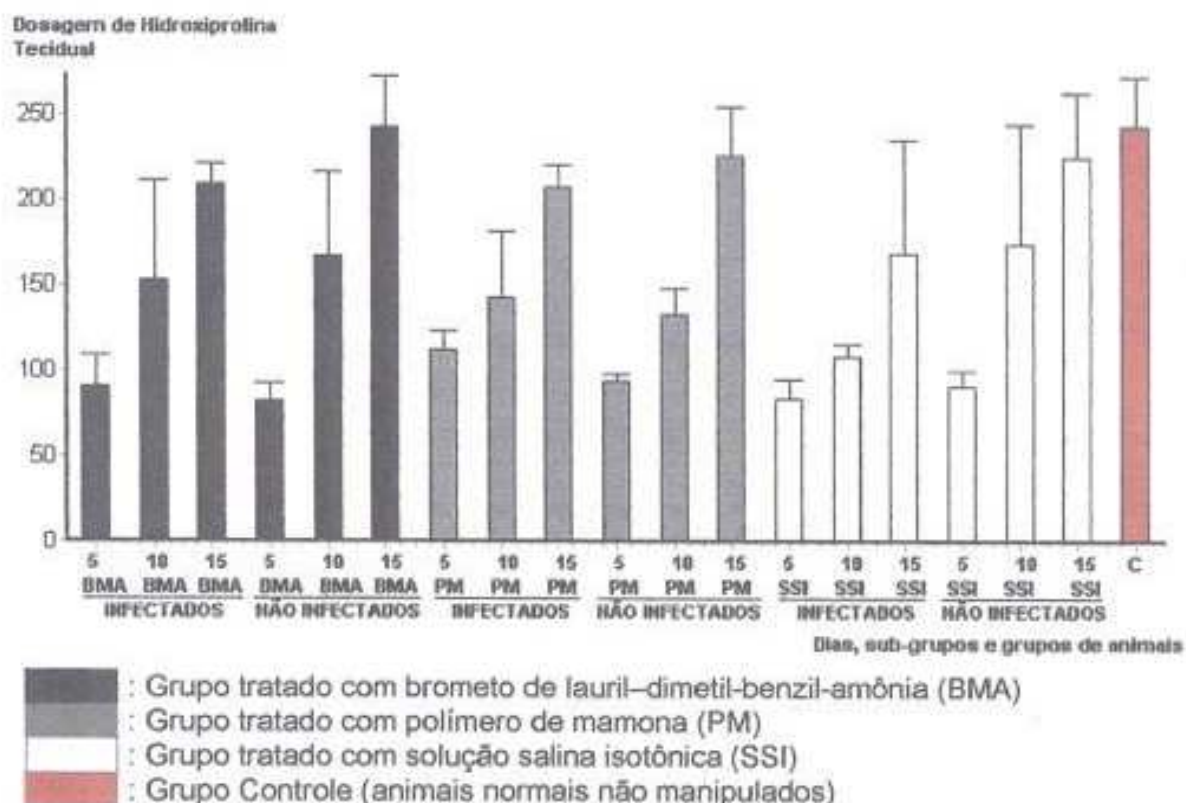


TABELA 4 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA EM FERIDAS INFECTADAS COM *Staphylococcus aureus*.

Dias de Evolução	Grupos comparados	Valor de p
5º dia	BMA x PM	>0,05
	BMA x SSI	>0,05
	PM x SSI	>0,05
10º dia	BMA x PM	>0,05
	BMA x SSI	>0,05
	PM x SSI	>0,05
15º dia	BMA x PM	>0,05
	BMA x SSI	>0,05
	PM x SSI	>0,05
	BMA x Controle	>0,05
	PM x Controle	>0,05

TABELA 5 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA EM FERIDAS NÃO INFECTADAS

Dias de Evolução	Grupos comparados	Valor de p
5º dia	BMA x PM	>0,05
	BMA x SSI	>0,05
	PM x SSI	>0,05
10º dia	BMA x PM	>0,05
	BMA x SSI	>0,05
	PM x SSI	>0,05
15º dia	BMA x PM	>0,05
	BMA x SSI	>0,05
	PM x SSI	>0,05
	BMA x Controle	>0,05
	PM x Controle	>0,05

Legenda: BMA : brometo de lauril –dimetil-benzil-amônia  
 PM : polímero de mamona

A partir das avaliações estatísticas obtidas pela análise de variância (ANOVA), observou-se que em relação à biossíntese de colágeno, os tratamentos com BMA, PM e SSI, de feridas infectadas e não infectadas, nas três datas de avaliações procedidas. Ao décimo quinto dia, todos os grupos apresentavam a mesma quantidade de hidroxiprolina tecidual que o grupo controle ( $p > 0,05$ ), demonstrando

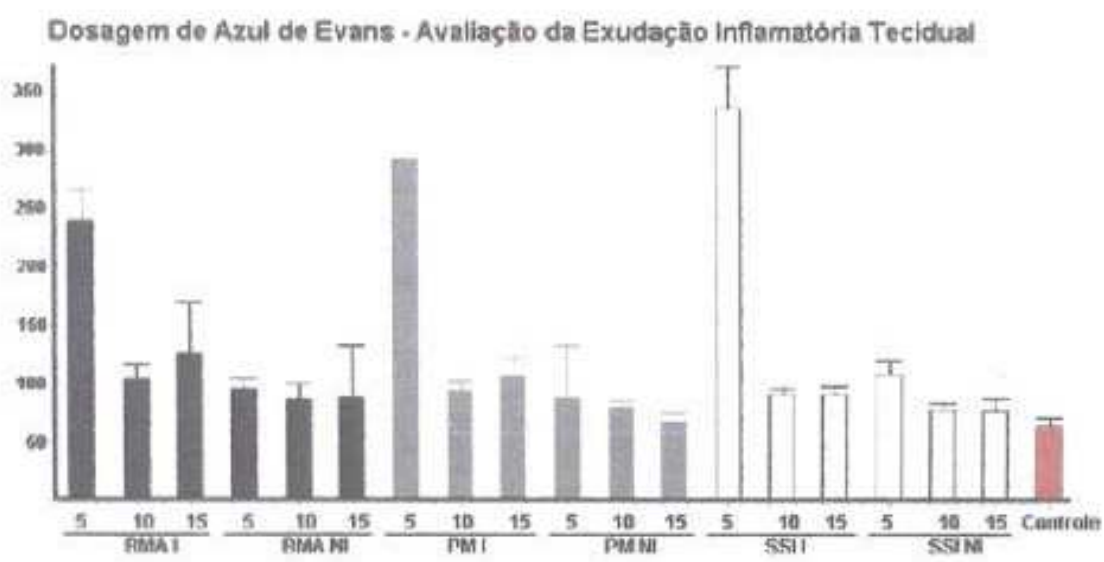
que tanto a presença de infecção e os diferentes tratamentos não influenciaram a biossíntese de colágeno.

### 4.2 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA EXSUDAÇÃO INFLAMATÓRIA PELO MÉTODO DO AZUL DE EVANS

Ao serem observadas as avaliações estatísticas, verificou-se no décimo quinto dia de evolução, a exsudação inflamatória nos animais tratados com BMA, PM e SSI eram maiores que os resultados do grupo controle ( $p < 0,01$ ). Isto demonstra que nenhum dos tratamentos estudados conseguiram resgatar a normalidade do processo de permeabilidade vascular, tanto em presença quanto na ausência de infecção.

No quinto dia de evolução, os maiores valores de exsudação inflamatória foram observados no grupo infectado e tratado com SSI. Houve nesta data diferenças significantes entre os grupos BMA x PM ( $< 0,05$ ), BMA x SSI ( $< 0,001$ ). Os grupos não infectados apresentaram os menores valores.

GRÁFICO 3 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS DOSAGENS DE AZUL DE EVANS EM FERIDAS INFECTADAS PELO *Staphylococcus aureus* E NÃO INFECTADAS









- Legenda:  : Grupo tratado com brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia (BMA)  
 : Grupo tratado com polímero de mamona (PM)  
 : Grupo SSI (SSI)  
 : Grupo Controle (animais normais não manipulados)

TABELA 6 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE AZUL DE EVANS EM FERIDAS INFECTADAS POR *Staphylococcus aureus*

Dias de Evolução	Grupos comparados	Valor de p
5º dia	BMA x PM	<0,05*
	BMA x SSI	<0,001*
	PM x SSI	>0,05
10º dia	BMA x PM	>0,05
	BMA x SSI	>0,05
	PM x SSI	>0,05
15º dia	BMA x PM	>0,05
	BMA x SSI	>0,05
	PM x SSI	>0,05
	BMA x controle	<0,05
	SSI x controle	<0,05
	PM x controle	<0,05

- Legenda: BMA : brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia  
 PM : polímero de mamona

TABELA 7 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE AZUL DE EVANS EM FERIDAS NÃO INFECTADAS

Dias de Evolução	Grupos comparados	Valor de p
5º dia	BMA x PM	>0,05
	BMA x SSI	>0,05
	PM x SSI	>0,05
10º dia	BMA x PM	>0,05
	BMA x SSI	>0,05
	PM x SSI	>0,05
15º dia	BMA x PM	>0,05
	BMA x SSI	<0,01**
	PM x SSI	<0,05*
	BMA x controle	<0,05
	SSI x controle	<0,05
	PM x controle	<0,05

- Legenda: BMA : brometo de lauril -dimetil-benzil-amônia  
 PM : polímero de mamona

### 4.3 CONTAGEM DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Os resultados das contagens de *Staphylococcus aureus* e as avaliações estatísticas estão demonstradas no gráfico 4 e na tabela 8, p. 29 respectivamente.

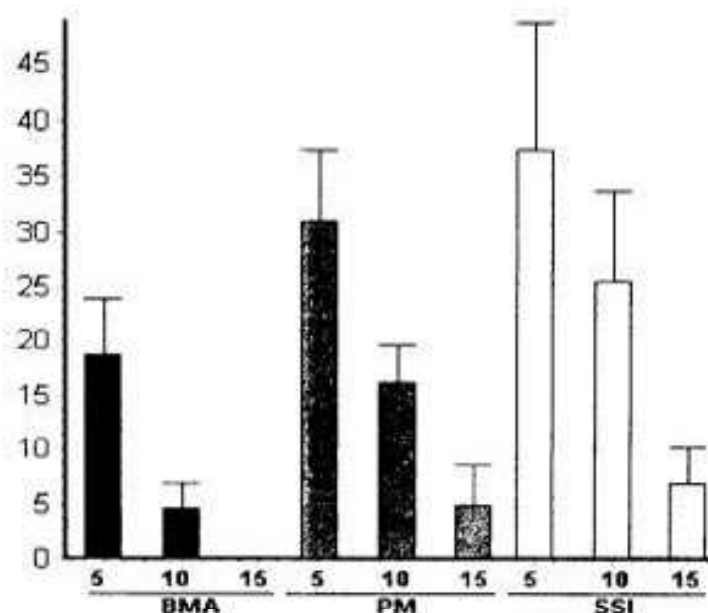
No quinto dia houve diferença significativa entre os grupos BMA x PM ( $<0,05^*$ ) e BMA x SSI ( $<0,001^{***}$ ). Quando foram comparados os grupos PM x SSI não houve diferença ( $<0,05$ ).

No décimo dia as contagens de *S.aureus* foram menores no grupo BMA, quando comparados ao grupo PM houve diferença significativa ( $<0,01^{**}$ ), bem como ao grupo SSI ( $<0,05^*$ ). O grupo PM quando comparado ao grupo SSI também demonstrou diminuição significativa nas contagens desta bactéria  $<0,05^*$ .

Ao décimo quinto dia o grupo tratado pelo BMA apresentou elevada significância quando comparado ao grupo PM ( $<0,001^{***}$ ) e ao grupo SSI ( $<0,001^{***}$ ). Contudo, o grupo PM não mostrou vantagens em relação ao tratamento com SSI ( $>0,05$ ).

GRÁFICO 4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS CONTAGENS DE *Staphylococcus aureus* EM FERIDAS INFECTADAS

#### Contagem de *Staphylococcus aureus*





Conforme demonstrados no gráfico acima e na tabela 8, os animais infectados e tratados com BMA apresentaram significativa redução na infecção pelo *Staphylococcus aureus* quando comparado aos demais grupos, nos três dias de avaliações ( $p < 0,001$ ) ficando evidente a vantagem do uso deste produto em relação ao PM e SSI.

TABELA 8 - AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS CONTAGENS DE *Staphylococcus aureus* EM FERIDAS INFECTADAS

Dias de Evolução	Grupos comparados	Valor de p
5º dia	BMA x PM	<0,05*
	BMA x SSI	<0,001***
	PM x SSI	<0,05
10º dia	BMA x PM	<0,01**
	BMA x SSI	<0,05*
	PM x SSI	<0,05*
15º dia	BMA x PM	<0,001***
	BMA x SSI	<0,001***
	PM x SSI	>0,05

#### 4.4 AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS

As avaliações histológicas foram procedidas em três leituras microscópicas, em tempos diferentes e por distintos leitores.

QUADRO 1 – PORCENTAGENS DE OCORRÊNCIA DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS

Achados Histológicos		Resultados conforme os dias de aferições, no grupo de ratos não infectados								
		BMA			PM			SSI		
		5º	10º	15º	5º	10º	15º	5º	10º	15º
Alterações inflamatórias	AU	0	0	100	0	0	100	0	0	100
	MN	0	40	0	0	0	0	0	40	0
	MD	100	60	0	100	100	0	100	60	0
	IT	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tipo de Inflamação	A	100	40	0	100	100	0	100	40	0
	C	0	60	0	0	0	0	0	60	0
Úlcera cutânea	P	100	100	0	100	100	0	100	100	20
	A	0	0	100	0	0	100	0	0	80
Tecido de Granulação	P	0	100	100	0	0	60	0	0	60
	A	100	0	0	100	100	40	100	100	40
RGCE*	P	0	0	0	0	60	100	0	0	60
	A	100	100	100	100	40	0	100	100	40

Achados Histológicos		Resultados conforme os dias de aferições, no grupo de ratos infectados com <i>Staphylococcus aureus</i>								
		BMA			PM			SSI		
		5°	10°	15°	5°	10°	15°	5°	10°	15°
Alterações inflamatórias	AU	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	MN	0	80	0	0	0	20	0	0	0
	MD	20	20	0	0	100	80	0	100	100
	IT	80	0	0	100	0	0	100	0	0
Tipo de Inflamação	A	100	0	0	100	0	0	100	0	40
	C	0	100	0	0	100	40	0	100	60
Úlcera cutânea	P	100	80	0	100	100	80	100	100	100
	A	0	20	100	0	0	0	0	0	0
Tecido de Granulação	P	80	100	0	0	40	20	0	80	40
	A	20	0	0	100	60	80	100	20	60
RGCE*	P	0	80	0	100	100	40	100	100	100
	A	0	20	100	0	0	60	0	0	0

Legenda:

- Alterações inflamatórias..... : ausente (A), mínima (M), moderada (MD) ou intensa (I)
- Tipo de inflamação ..... : aguda (A) ou crônica (C)
- Úlcera cutânea ..... : presente (P) ou ausente (A)
- Tecido de granulação ..... : presente (P) ou ausente (A)
- \*Reação granulomatosa de corpo estranho.. : presente (P) ou ausente (A)

Conforme as porcentagens dos achados histológicos nos grupos de animais não infectados pode-se observar que quanto às alterações inflamatórias, no décimo dia de evolução os animais tratados com BMA apresentaram evolução mais favorável em relação ao grupo PM, tendo sido evidenciada regressão do padrão inflamatório de forma mais precoce.

Da mesma maneira, a formação de tecido de granulação ocorreu mais precocemente em relação aos demais grupos e não houve formação de reação de corpo estranho.

## 5 DISCUSSÃO

A cicatrização de feridas é dependente de múltiplos fatores, onde se relacionam desde a condição de saúde basal, idade, contaminação, até mesmo o agente responsável pela injúria.

Apesar de retratarem a rotina da prática médica, os estudos clínicos sobre o processo cicatricial proporcionam elevada margem de questionamento quanto à sua interpretação. Muitos resultados entusiasmadores encontrados em trabalhos clínicos são às vezes, mero produto da maior atenção da equipe de atendimento no tratamento das feridas. Assim, torna-se indiscutível a necessidade da utilização de modelos experimentais quando se pretende assegurar a interferência de apenas um fator, no caso a droga a ser experimentada, sobre a evolução de feridas. Somente com a definição de modelo experimental seguro, possível de repetição e comparação entre diversos grupos, consegue-se afirmar que os fenômenos encontrados não ocorreram de forma aleatória. (ALTEMEIR; GEBBS, 1994).

A proposta deste estudo atem-se à comparação entre grupos de animais, infectados por *Staphylococcus aureus* e não infectados, tratados com duas drogas, o Polímero de Mamona - produto biológico vegetal e o Brometo de Metil Amônio - produto absolutamente sintético, em relação a um grupo de animais submetidos à irrigação das feridas com soro fisiológico.

## 5.1 O MODELO ANIMAL UTILIZADO:

O rato - *Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Mammalia*, tem sido utilizado em diversos estudos experimentais similares, pelas facilidades de obtenção, homogeneidade de amostra, acomodação e custos. A linhagem Wistar é efetivamente a mais utilizada em nosso meio, apresenta adaptação rápida aos ambientes de experimentação e excelente prolificidade. Estes animais apresentam peculiaridades especiais em relação ao homem, como o sistema imunológico, significativamente mais competente, ao ponto de que não se observa infecção espontânea em feridas abertas, mesmo de porte pronunciado. No presente estudo, para se obter infecção da ferida, foi necessária a inoculação com  $10^9$  unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus*. O grupo não infectado cursou os quinze dias do experimento sem a evidência de infecção, por esta bactéria, não tendo sido avaliada outros gêneros. Contudo, macroscopicamente, em nenhum destes animais observaram-se sinais clássicos de contaminação.

Escolheu-se o *Staphylococcus aureus* como padrão de bactéria infectiva neste estudo, por se tratar de espécie comum em casos de infecções de feridas cutâneas e fazer parte da flora de revestimento humano. Para melhor padronizar o modelo ora em estudo, utilizou-se uma cepa de coleção, por ser geneticamente controlada, não havendo possibilidade de modificação comportamental de seu padrão infectivo após sua passagem de uma condição *in vitro* para outra, *in vivo*, desta vez no animal em estudo.

Este fenômeno pode ocorrer com cepas isoladas de casos clínicos e que virtualmente podem sofrer acomodação de seus fatores de virulência quando se modificam as condições ambientais como, tratamentos prévios com antibióticos, os

quais são praticamente inevitáveis em casos de infecções atendidas em hospitais (NOBLE, 1964; KINSMAN, 1980),

A metodologia laboratorial do presente estudo foi adaptada do estudo que avaliou os efeitos de diversas técnicas de irrigação de feridas contaminadas experimentalmente com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, bem como metodologia para avaliação quantitativa destes contaminantes no tecido infectado, utilizando o mesmo meio de cultivo ora empregado no presente estudo, o Baird-Parker suplementado com lecitina e telurito de potássio (HAMMER, 1975).

A quantidade de *Staphylococcus aureus* a ser inoculada nos ratos deste estudo visou a mimetização da infecção de feridas em humanos. A avaliação dos efeitos de anestésicos locais com e sem drogas vasoativas na língua, tecido adiposo, músculo e pele de ratos demonstrou que a habilidade destes tecidos em resistir à infecção não varia significativamente, porém evidenciaram os efeitos da quantidade de bactérias inoculadas, estabelecendo o mínimo de  $3 \times 10^6$  *Staphylococcus aureus* e  $3 \times 10^5$  *Escherichia coli*, para que ocorresse os efeitos desejados. Também foi observado o efeito da norepinefrina como agravante do processo de reparo tissular (ROETTINGER et al, 1973).

No presente estudo, a dose de  $10^9$  *Staphylococcus aureus* foi suficiente para a infecção a qual em média prolongou-se até o décimo quinto dia nos animais não tratados. Conforme os resultados apresentados no gráfico 4, p. 28, observa-se de forma significativa a melhor ação bactericida *in vivo* do BMA em comparação ao PM, pois após quinze dias de evolução nos ratos tratados com o BMA não houve isolamento de *Staphylococcus aureus*.

Em modelo experimental de infecção de pele em cobaias (*Cavia porcellus*) com *Staphylococcus aureus* de procedência hospitalar foram observados sinais de



edema, hiperemia e a presença de pus após cinco dias da inoculação, tendo sido confirmada a presença da bactéria por isolamento qualitativo (KAY, 1993).

No presente estudo, acompanhou-se a evolução da contaminação da bactéria inoculada por quantificação a cada cinco dias, por quinze dias, elucidando assim a evolução da infecção em estudo, até a sua remissão em um dos sub-grupos em estudo, que foi o tratado com BMA.

Devido ao alto índice de traumatismos que acomete os animais domésticos e a busca por alternativas simples, econômicas e capazes de proporcionar condições ideais para cicatrização, foram realizados os testes com o biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar em animais portadores de feridas cutâneas, a fim de avaliar a reepitelização. Foi utilizado um polissacarídeo extracelular produzido por via microbiológica, através da bactéria ZSP cujos monossacarídeos presentes na fração solúvel foram glicose (87,6%), xilose (8,6%), manose (0,8%), ribose (1,7%), galactose (0,1%), arabinose (0,4%) e o ácido glucurônico (0,8%). Observou-se o aumento do tecido de granulação, controle da infecção e diminuição do tempo de cicatrização, permitindo concluir que o biopolímero contribui para o processo cicatricial, podendo ser utilizado em feridas cutâneas (COELHO et al, 2002). No presente estudo o PM não demonstrou interferência no processo de cicatrização, sendo seu principal componente o ácido ricinoléico não contribuiu para a diminuição da infecção tanto quanto o BMA, sendo seus resultados comparáveis à utilização da SSI, que pode ser considerada como placebo.

## 5.2 A SÍNTESE DE COLÁGENO E EVOLUÇÃO HISTOLÓGICA DE FERIDAS CUTÂNEAS

A exata compreensão do processo de cicatrização das feridas é vital para uma abordagem racional na prática da cirurgia. Nos últimos anos tornou-se claro que a resposta inflamatória que acompanha qualquer tipo de lesão tecidual constitui uma parte vital do processo de reparo. Com freqüência o cirurgião encara a inflamação como um adversário, porém ela é de fato uma aliada.

Um ferimento é seguido imediatamente por coagulação, alteração da vascularidade e inflamação, fatores esses que modulam a cicatrização da ferida. Segue-se de imediato a resposta inflamatória normal à medida que os pequenos vasos sangüíneos se dilatam (PLATT, 1965).

A permeabilidade capilar aumenta e os neutrófilos periféricos infiltram-se no local da lesão e os monócitos são transformados em macrófagos, que fagocitam os detritos, assim como, destroem enzimaticamente as bactérias. Os macrófagos desempenham também um papel importante na indução da síntese do colágeno, sendo que a sua depleção, reduz significativamente a deposição de colágeno na ferida (LEIBOVICH; ROSS, 1975).

O presente estudo pode ser comparado à utilização de gangliosídeos sobre a infiltração seqüencial de leucócitos e fibroblastos durante o processo de cicatrização, em um modelo de cicatrização da pele de ratos. Os ratos do grupo experimento receberam 3mg/Kg/dia de gangliosídeos e um grupo controle, que receberam veículo, ambos por via intramuscular durante 14 dias consecutivos. No 7º e 14º dias de pós-operatório foram ressecados fragmentos da pele e tela subcutânea para análise histológica, com a coloração de Tricrômio de Masson e Hematoxilina-Eosina.



A alteração encontrada no processo cicatricial foi devida a um retardo na resposta inflamatória e não a uma inibição de fibroblastos (VON KOSSEL et al, 2000).

No presente estudo observou-se histologicamente que não houve diferenças entre os grupos não infectados tratados e não tratados. Observaram-se nestes animais, quando tratados pelo BMA, que as alterações inflamatórias evoluíram de 100% moderadas no quinto dia para 60% moderadas e 40% mínimas no décimo dia de evolução, sendo em 100% ausentes no décimo quinto dia. Nos animais tratados com PM, também se observou 100% de ausência de alterações inflamatórias no décimo quinto dia, porém na fase intermediária do 10º dia ainda prevaleciam em 100% alterações moderadas. Sob este aspecto, o BMA apresentou vantagens sobre o PM.

Nos animais infectados, as alterações inflamatórias e o tipo de inflamação foi alterado durante o experimento, conforme a substância utilizada nos curativos dos animais infectados pelo *Staphylococcus aureus* (quadro 1, p. 29). Verificou-se expressiva melhora das alterações inflamatórias nos animais tratados pelo BMA, que ao término dos quinze dias de evolução estavam ausentes. Nos animais tratados pelo PM ainda havia 20% de alterações, embora mínimas e no grupo não tratado 100% do tipo moderadas. Portanto, em vigência de infecção o BMA apresentou-se vantajoso em relação ao PM, no que diz respeito às alterações histológicas inflamatórias.

A avaliação de colágeno em estudos de cicatrização proporciona é importante porque ele proporciona força e integridade a todos os tecidos do corpo. Da mesma forma, a força e a integridade de qualquer reparo tecidual baseiam-se no entrecruzamento e na deposição de fibras colágenas. Existem pelo menos sete tipos geneticamente distintos de colágeno humano. As formas de avaliar o colágeno em

amostras biológicas são a dosagem de hidroxiprolina tecidual (DIETZ, 1995), a mensuração de incorporação de radioisótopos (OXLUND et al, 1996; MAYS et al, 1991) ou a evidenciação microscópica após colorações específicas.

A interferência do hormônio de crescimento no processo de cicatrização cutânea de ratos os resultados obtidos permitiram concluir que o hormônio de crescimento levou a maior concentração de colágeno e acelerou a maturação das cicatrizes (BIONDO-SIMÕES et al, 2000).

Em estudo experimental para avaliar o efeito da hidrocortisona na cicatrização de feridas em animais imunocomprometidos, tendo a dosagem de hidroxiprolina para avaliar a síntese de colágeno pelo mesmo método empregado no presente estudo. Não existe consenso quanto à forma de expressar os resultados da dosagem de hidroxiprolina. Alguns estudos o fazem em relação a tecido úmido, como o presente, outros em tecido seco e ainda existe a forma de expressar em relação ao conteúdo de proteína total daquele tecido. Portanto, para avaliar resultados destas dosagens e compará-los, deve-se ter precaução quanto à forma de expressão destes valores. (MINOSSI et al, 1994; NARESSE et al, 1993; GUPTA et al, 1999)

### 5.3 A EXSUDAÇÃO INFLAMATÓRIA

A inflamação é o primeiro passo da cicatrização das feridas, após vasoconstrição temporária, ocorre dilatação secundária dos pequenos vasos locais por ação das cininas, componentes do complemento e das prostaglandinas. Há migração de leucócitos, primeiramente neutrófilos, depois monócitos e proteínas plasmáticas para a ferida. O infiltrado neutrofílico inicial faz uma varredura dos restos celulares, corpos estranhos e bactérias. Os fragmentos ativados do complemento

atraem os neutrófilos e ajudam na eliminação das bactérias. Os monócitos, que se infiltram mais tardiamente, diferenciam-se em macrófagos, os quais não só continuam a consumir restos tissulares e bacterianos, como também secretam múltiplos fatores de crescimento (ALTEMEYER e GEBBS, 1994).

Para a avaliação experimental da exsudação inflamatória, consequência direta do aumento do fluxo transcapilar, diversos métodos podem ser empregados como: a observação direta de vasos ao microscópio óptico, medidas pletismográficas de fluxo sanguíneo, alterações da permeabilidade vascular por técnicas morfológicas ou pela utilização de corantes e substâncias marcadas. Escolheu-se neste estudo o emprego da dosagem do azul de Evans tecidual por ser um método já anteriormente avaliado em outros estudos e padronizado para este propósito (LEME, 1979; MESTRINER et al, 1991).

Desde 1943, com os primeiros estudos de RAWSON, o azul de Evans foi amplamente utilizado em diversos trabalhos experimentais. A inflamação aguda provoca alterações no fluxo vascular, no calibre dos vasos e na permeabilidade vascular. O exsudato desta alteração da permeabilidade vascular contém mais proteínas plasmáticas do que em situação normal (GUYTON, 1976). O azul de Evans se combina à albumina plasmática formando um complexo corante-albumina que extravasa através da barreira endotelial lesada ficando então retido no tecido inflamado (STEELE; WILHELM, 1966).

Os estudos de WOODS et al, 1988; BACCARO et al, 1990; BERNAUER, 1980; BORDÓN DE CORVALÁN, 1994; HAJAR, 1994; OBATA et al, 1992; UKADA et al, 1970, revelaram que, ao promover-se uma reação inflamatória, o aumento do exsudato plasmático para um tecido lesado eleva as taxas de azul de Evans neste tecido.

Este corante quando inoculado via endovenosa combina-se com a albumina de maneira reversível e dependente de pH (LEVEEN; FISHMAN, 1947). Estudos demonstraram que, após 40 horas da administração endovenosa do azul de Evans, 90% do corante já havia deixado a circulação, tendo anteriormente atingido diversos tecidos do organismo. Depois de 24 horas de inoculação endovenosa, 30% do corante pode ainda ser encontrado na pele, 13% nos músculos, 12% no fígado e 9% nos ossos, constatando-se que o azul de Evans poderia ser quantificado em diversos tecidos (CASTER; SIMON; ARMSTRONG, 1955). O método do azul de Evans para observar reação inflamatória tissular tem sido empregado em distintos experimentos e GEHLEN, 2002, utilizou este método em córneas de coelhos, verificando diferenças na evolução induzidas por queimaduras por álcalis.

No presente estudo estabeleceu-se o período de 8 horas entre a inoculação e a coleta de amostras, conforme metodologia anteriormente padronizada por REPKA, 2000 para sua dosagem na pele e tecido subcutâneo de ratos Wistar.

O emprego do método do Azul de Evans no presente estudo evidenciou que no grupo de animais infectados pelo *Staphylococcus aureus*, a ocorrência de diferença estatisticamente significativa da exsudação plasmática inflamatória, entre os animais tratados com BMA e não tratados, ocorrida no quinto dia de evolução ( $p < 0,001$ ), bem como quando comparado aos animais tratados com PM ( $p < 0,05$ ). Esta evidência tributa ao BMA melhor efeito na cicatrização de feridas infectadas que o PM ou mesmo a solução salina isotônica. Ao término dos quinze dias de acompanhamento do estudo todos os grupos apresentavam similaridade nos níveis de permeabilidade vascular na pele, não havendo entre estes grupos diferença estatisticamente significativa quanto a esta avaliação.



## 5.4 O TECIDO DE GRANULAÇÃO

O tecido de granulação é caracterizado nas lesões em reparo, pelo seu aspecto avermelhado de *carne crua*, sendo consequência da divisão e migração das células endoteliais formando um novo e rico leito capilar (angiogênese) no local da ferida. Os fibroblastos migram para a ferida utilizando a fibrina recém-depositada e a matriz de fibronectina como suporte, estas células proliferam e sintetizam novas matrizes extracelulares. Dessa forma, o crescimento dirigido das células endoteliais vasculares ocorre simultaneamente com a fibroplasia durante a formação do tecido de granulação estimulada pelos elementos das plaquetas e dos macrófagos ativados. A granulação é mais intensa nos ferimentos que cicatrizam por segunda intenção (NIINIKOSKI et al, 1977).

Os colágenos dos tipos I e III são os principais colágenos fibrilares comprometidos na matriz cutânea extracelular. O colágeno tipo III é predominante inicialmente nas feridas, em comparação com a pele normal, mas à medida que o tecido de granulação amplifica-se no ferimento, o colágeno tipo I é depositado em quantidades crescentes. A maior parte do colágeno é do tipo I, tanto nos ferimentos quanto na pele normal (MAJNO, 1971). No presente estudo, no período de quinze dias de evolução não havia diferenças significantes quanto à síntese de colágeno total, evidenciando que as drogas utilizadas não interferem neste processo, tanto auxiliando como evitando-o.

O efeito da somatotropina sobre a cicatrização de feridas cutâneas, em ratos. Os tempos de aferição foram 3, 7 e 14 dias, quando de 9 animais de cada grupo, coletou-se sangue para dosagem bioquímica de proteínas plasmáticas e ressecou-se a ferida para estudo histológico. À microscopia avaliaram-se: epitelização, reação

inflamatória local, tecido de granulação, neovascularização e fibrose. Concluíram que a somatotropina mantém constantes a relação albumina/globulina e as proteínas totais plasmáticas no 14º dia, além de intensificar a fibrose cicatricial quando utilizada durante 7 dias.

No presente estudo observou-se que as alterações histológicas inflamatórias foram mais significativamente presentes nos animais infectados pelo *Staphylococcus aureus*, (QUADRO 1, p. 29-30) e perduraram durante todo o estudo nos animais infectados sem tratamento.

Entre os grupos infectados e tratados, o sub-grupo tratado com BMA apresentou melhor evolução histológica que o sub-grupo tratado com PM. Esta melhora foi evidenciada pela maior porcentagem de tecido de granulação que ocorreu em fase mais precoce, 100 % dos animais no 10º dia (QUADRO 1, p. 29-30).

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- Em referência à síntese de colágeno em feridas cirúrgicas, não se observaram diferenças significativas entre o não tratamento destas feridas, o uso de brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia e o uso de polímero de mamona, independentemente da presença de infecção.

- Em referência à exsudação inflamatória das feridas cirúrgicas, não se observaram diferenças significativas entre o não tratamento destas feridas, o uso de brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia e o uso de polímero de mamona, independentemente da presença de infecção.

- Quanto à redução da população bacteriana infectante o brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia apresentou vantagens comparado ao uso de polímero de mamona e o não tratamento das feridas cirúrgicas.

- Quanto à precocidade de formação de tecido de granulação, o brometo de lauril-dimetil-benzil-amônia apresentou vantagens comparado ao uso de polímero de mamona e o não tratamento das feridas cirúrgicas.



## 7 REFERÊNCIAS

ALTEMEIR, W. A.; GEBBS, E. W. Bacterial flora of fresh accidental wounds. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, Chicago, v. 78, p. 164, 1994.

ARAÚJO, C. F. R.; et al. Efeitos do Agarol e do Trigliceril sobre a cicatrização de pele estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 134, p. 232-237, 1998.

BACCARO, M. R.; MARIANO, M.; MALUCELLI, B. E. Chronically inflammed tissue activates plasma mediators of vascular permeability. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 23, p. 179-185, 1990.

BACELAR, J. C. S. **Avaliação da ação das drogas Hidrato de Cloral, Cetamina/xilazina e Tiopental Sódico na anestesia em ratos**. Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Princípios da Cirurgia) – Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. Instituto de Pesquisas Médicas.

BERGMAN, A.; et al. Acceleration of wound healing by topical application of honey. **American Journal of Surgery**, New York, v. 145, p. 374-376, 1983.

BERNAUER, W. Effects of glucocorticosteroids in rats with acute myocardial infarction. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, Ghent, v. 244, p. 86-99, 1980.

BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; et al. O hormônio de crescimento e a concentração de colágeno na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.15 supl.3, p. 78-82, 2000.

BON, J. H. Perspectivas de utilização da mamona na dieta humana **Arquivos Brasileiros de Medicina Naval**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 2, p. 93-102, maio-ago. 1989.

BORDÓN DE CORVALÁN, A. C. **Aplicação do micrométodo espectrofotométrico para determinação de Azul de Evans em plasma e tecido colônico de ratos Wistar**. Curitiba, 1994. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BRITO, N. M. B.; et al. Aspectos microscópicos da cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. **Revista Paraense de Medicina**, Belém-PA, v. 131, p. 12-17, 1999.

CARVALHO, T. L.; et al. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 26, n. 2, p. 149-152, 1997.

CASTER, W. O.; SIMON, A. B.; ARMSTRONG, W. D. Evans blue in tissues of the rat. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 183, p. 317-321, 1955.

CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G. B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of Aloe vera on collagen turnover in healing of dermal wounds in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, Nova Deli, v. 36, p. 896-901, 1998.

COELHO, M. C. O. C.; et al. Biopolímero produzido a partir da cana-de-áçúcar para cicatrização cutânea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17 supl.1, p.11-13, 2002.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). Disponível em: <<http://www.meusite.com.br/COBEA/etica.htm#3>>. Acesso em: 24 jan. 2002.

DIETZ, U. A. **Estudo comparativo entre as técnicas fotocolorimétrica e fluorimétrica na determinação da taxa de hidroxiprolina em amostras teciduais hidratadas e desidratadas**. Curitiba, 1995. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

GEHLEN, M. L. **Avaliação espectrofotométrica de reação inflamatória corneana: estudo experimental em coelhos**. Curitiba, 2002. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

GUPTA, A.; JAIN, G. K.; RAGHUBIR, R. A time course study for the development of an immunocompromised wound model, using hydrocortisone. **The Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 183-187, 1999.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**, 5. ed., Rio de Janeiro, Interamericana, 1976.

HAJAR, N. **O uso do azul de Evans para avaliar a permeabilidade vascular na colite induzida com ácido acético a 10% em ratos Wistar**. Curitiba, 1994. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

HAMER, W. A.; ROBSON, M. C.; KRIZIK, T. J. Quantitative bacterial analyses of comparative wound irrigations. **Annals of Surgery**, v. 181, p. 819, 1975.

INTERNATIONAL COMITEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina Anatomica Veterinaria**. 3. ed. New York Ithaca, 1983.

KAY, M. S. **Comparação dos efeitos do uso do Povidine 10% e da solução salina isotônica no tratamento de feridas contaminadas**. Curitiba, 1993. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

KINSMAN, O.; ARBUTHNOTT, J. P. Experimental of staphylococcal infections in newborn mice: inhibition of weight gain as an index of virulense. **Journal of Medecine and Microbiology**, v. 13, p. 281-290, 1980.

KNUSTSON, R. A.; et al. Use the sugar and polvidone iodine to enhance wound healing: Five years experience. **Southern Medicine Journal**, v. 74, n. 11, p. 1329-1335, 1981.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair. **American Journal of Pathology**, v. 78, p. 71-91, 1975.

LEME, J. G. Métodos experimentais no estudo da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 146-150, 1979.

LEVEEN, H. H.; FISHMAN, W. H. Combination of Evans blue with plasma protein: its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 26, p. 26-33, 1947.

LODHA, S. C.; et al. Role of phenytoin in healing of large abscess cavities. **British Journal Surgery**, Oxford, v. 78, p. 105-108, 1991.

MAISH, G. O.; et al. Tumor necrosis factor binding protein improves incisional wound healing in sepsis. **Journal of Surgical Research**, v. 78, p. 108-117, 1998.

MAJNO, G.; et al. Contraction of granulation tissue in vitro: Similarity to smooth muscle. **Science**, v. 173, p. 548, 1971.

MASINI, E.; CALAMO, M. A. Uma forma de tratamento de lesões cutâneas com papaína e sacarose. **Revista Brasileira de Clínica e Terêutica**, v. 158, p. 245-2488, 1986.

MAYS, P. K.; et al. Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues – Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. **Biochemistry Journal**, v. 76, p. 307-313, 1991.

MEDEIROS, A. C.; et al. Tratamento tópico de queimaduras do dorso de ratos com ácido hialurônico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 144, p. 203-207, 1999.

MESTRINER, F.; GOMES, R. A. S.; FATURETO, M. C. Estudo comparativo entre as suturas contínuas e interrompidas da camada músculo-fascial de ratos – 1990. **Medicina Ribeirão Preto**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 3, p. 159-164, 1991.

MINOSSI, J. G.; et al. Ação do diclofenaco de sódio em anastomoses realizadas no cólon distal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 116-120, 1996.

MIYADA, D. S.; TAPPEL, A. L. The hidrolysis of beel protein by various proteolytic enzymes. **Food Research**, v. 21, p. 217-225, 1956.

NARESSE, L. E.; et al. Efeito da peritonite fecal na cicatrização do cólon distal no rato. Avaliação anatomopatológica, estudo da força de ruptura e da hidroxiprolina tecidual. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 48-53, 1993.



NIINIKOSKI, J.; KIVISAARI, J.; VILJAVIU, J. Local hyperalimentation of experimental granulation tissue. **Acta Chirurgica of Scandavia**, v. 143, p. 201-206, 1977.

NOBLE, W. C. The production of subcutaneous staphylococcal skin lesions in mice. **British Journal of Experimental Pathology**, London, p. 254-262, 1964.

OBATA, T.; et al. Effect of a peptide leukotriene antagonist Ono-1078 on antigen-induced airway microvascular leakage in actively sensitized Guinea pigs. **Life Sciences**, Oxford, v. 51, p. 1577-1583, 1992.

OXLUND, H.; et al. Collagen deposition and mechanical strength of colon anastomoses and skin incisional wounds of rats. **Journal of Surgical Research**, v. 66, p. 25-30, 1996.

PINTO, G. P. Contribuição ao estudo da torta de mamona. Rio de Janeiro. **Instituto Nacional de Tecnologia**, 1956.

PLATT, J.; BUCKNALL, R. A. An experimental evaluation of antiseptic wound irrigation. **Journal of Experimental Pathology**, v. 46, p. 254-262, 1965.

PRATA, M. B.; et al. Uso tópico do açúcar me ferida cutânea. Estudo experimental em rato. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 32, p. 43-48, 1988.

RAWSON, R. A. The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.138, p. 708-717, 1943.

RAYMOND, W. D. The enzymatic deterioration of lipides. **Vegetable Oils And Poil Seeds**, v.3, n. 19, p. 177-180, 1961.

REPKA, J. C. D.; et al. Diabetes, infecção e cicatrização de ferida cirúrgica:avaliação experimental da influência da insulinoterapia. **Endocrinologia & Diabete Clínica Experimental**, Curitiba, v. 1, n. 3, p. 30-33, 2000.

ROETTINGER, W.; et al. Role of inoculation site as a determinant of infection in soft tissue wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 126, p. 354-358, 1973.

ROMM, F. J.; COCKRELL, W. E. 3RD, FEUSSNER, J R. Veterans Administration and ambulatory care: the "low-priority" veteran. **South Medicine Journal**, v. 77, n. 4, p. 489-93. Apr. 1984.

SANTOS, L. O. M.; et al. Efeito da somatotropina sobre a cicatrização de feridas cutâneas, em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n. 4, jul. - ago. 2002.

SENEL, O.; et al. Oxygen free radicals impair wound healing in ischemic rat skin. **Annals of Plastic Surgery**, v. 395, p. 516-523, 1997.

SHUKLA, A.; RASIK, A. M.; SHANKAR, R. Nitric oxide inhibits wound collagen synthesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 200, p. 27-33, 1999.

SMIALOWSKI, E. **Ferimentos padronizados tratados por papaína, açúcar, minoxidil e glucana em ratos**. São Paulo, 1991. Dissertação Mestrado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental Escola Paulista de Medicina.

SOUZA FILHO, Z. A.; et al. Estudo comparativo do ágar com a solução salina isotônica no tratamento de feridas, em cobaias. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 123, p. 169-173, 1997.

STEELE, R. H.; WILHELM, D. L. The inflammatory reaction in chemical injury. Increased vascular permeability and erythema induced by various chemicals. **British Journal of Experimental Pathology**, London, v. 47, p. 612-623, 1966.

TEVES, D. C.; et al. Aspectos morfológicos do processo de cicatrização em ratos albinos sob a ação da collagenase. **Folha Médica**, v. 984, p. 191-194, 1989.

TOGNINI, J. R.; et al. Efeito do diclofenaco de sódio na cicatrização da parede abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 133, p. 167-171, 1998.

UKADA, K.; TAKEUCHI, Y.; MOVAT, H. Z. Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Baltimore, v. 133, p. 1384-1387, 1970.

VON KOSSEL, K.; et al. Gangliosideos - estudo do colágeno e da resposta inflamatória no processo cicatricial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.15 supl.1, p.16-19, 2000.

WOODS, K. L.; SMITH, L. J.; GRAHAM, D. Y. Intragastric accumulation of Evans blue dye as a method for assesing aspirin-induced acute gastric mucosal injury in humans. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 33, p. 769-773, 1988.

**ANEXO 1**

**ESPECIFICAÇÕES DOS PRODUTOS QUÍMICOS REAGENTES UTILIZADOS NAS  
AFERIÇÕES BIOQUÍMICAS**

## ANEXO 1 - ESPECIFICAÇÕES DOS PRODUTOS QUÍMICOS REAGENTES

### UTILIZADOS NAS AFERIÇÕES BIOQUÍMICAS:

4-Dimetilaminobenzaldeído	- Merck M 1.03058
Ácido Bórico	- VETEC
Ácido Clorídrico	- Merck 25032517
Ácido Sulfúrico	- Merck K 25382431-827
Alanina	- Merck 1.01007.0025
Cloramina T	- Merck 2426.0250
Cloreto de Potássio	- Merck M 1.04936.1000
Etanol	- M 1.00971.1000
Éter monometílico do etilenoglicol	- Merck 8.00858.1000
Fenolftaleína	- Merck 678-45
Hidróxido de Potássio	- Merck M 1.05033
L-Hidroxiprolina	- Merck 1.04506.0010
Tiosulfato de Sódio	- M 21502
Tolueno	- Merck M1.08325



## ANEXO 2

### ESPECIFICAÇÕES DAS VIDRARIAS E ACESSÓRIOS UTILIZADOS NAS AFERIÇÕES BIOQUÍMICAS

## ANEXO 2 - ESPECIFICAÇÕES DAS VIDRARIAS E ACESSÓRIOS UTILIZADOS NAS AFERIÇÕES BIOQUÍMICAS

Agitador de tubos	- Phoenix – AT 56
Agitador magnético com magneto de 7 cm	- Phoenix
Balança Analítica	- Mettler
Becker	- 500ml – Pyrex
Becker	- 250ml - Pyrex
Erlenmeyer	- 250ml - Pyrex
Erlenmeyer	- 500ml – Pyrex
Espectrofotômetro	- Espectromatic 710 Siel
Pipeta automática 1.000 $\mu$ l	- Gilson
Pipetas de 10ml 1/100 – sorológica	- Pyrex
Pipetas de 2ml 1/100 – sorológica	- Pyrex
Pipetas de 5ml 1/100 – sorológica	- Pyrex
Ponteiras de 1.000 $\mu$ l	- Gilson
Pró-pipetas	- Biomatic
Proveta 100ml	- Pyrex
Proveta 500ml	- Pyrex
Proveta 50ml	- Pyrex
Tubos de ensaio com tampa de rosca	- 20x200mm Pyrex 9825
Phmetro	- Mettler
Banho-Maria fervente	- Fanen

**ANEXO 3**

**PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES E REATIVOS UTILIZADOS NAS AFERIÇÕES  
BIOQUÍMICAS**

## ANEXO 3 - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES E REATIVOS UTILIZADOS NAS AFERIÇÕES BIOQUÍMICAS

Solução de Fenolftaleína	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pesar 1 g</li> <li>- Solubilizar em etanol</li> <li>- Completar o volume para 100ml com etanol</li> </ul>
Solução 12N de Hidróxido de Potássio	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pesar 168,7g</li> <li>- Solubilizar em água deionizada</li> <li>- Completar o volume para 250ml com água</li> </ul>
Solução 10N de Hidróxido de Potássio	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pesar 140,25g</li> <li>- Solubilizar em água deionizada</li> <li>- Completar o volume para 250ml com água</li> </ul>
Solução 1N de Hidróxido de Potássio	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pesar 14,02g solubilizar em água deionizada</li> <li>- Completar o volume para 250ml com água</li> </ul>
Solução 0,1N de Hidróxido de Potássio	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pesar 1,402g solubilizar em água deionizada</li> <li>- Completar o volume para 250ml com água</li> </ul>
Solução 0,05N de Hidróxido de Potássio	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pesar 0,701g solubilizar em água deionizada</li> <li>- Completar o volume para 250ml com água</li> </ul>
Solução 0,05N de Ácido Clorídrico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pipetar 0,76ml de solubilizar em água deionizada</li> <li>- Completar o volume para 250ml com água</li> </ul>
Solução 0,2M de Cloramina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pesar 1,41g solubilizar Éter monometílico do etilenoglicol</li> <li>- Completar o volume para 25ml com Éter monometílico do etilenoglicol</li> </ul>
Solução 3,6M de Tiosulfato de Sódio	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pesar 89,3g solubilizar em água deionizada</li> <li>- Completar o volume para 100ml com água</li> </ul>
Solução Tampão Borato pH 8,7	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pesar 61,84g de ácido bórico</li> <li>- Pesar 225g de Cloreto de Potássio</li> <li>- Solubilizar em água deionizada</li> <li>- Ajustar a pH8,7 com solução de KOH 10N e 1N</li> <li>- Completar o volume para 800ml com água</li> </ul>
Solução Padrão de Hidroxiprolina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pesar 36mg</li> <li>- Solubilizar em água</li> <li>- Completar o volume para 100ml com água</li> <li>- Aliquotar em frascos esterilizados</li> </ul>

#### ANEXO 4

RESULTADOS DAS AFERIÇÕES BIOQUÍMICAS DE HIDROXIPROLINA  
TECIDUAL, EXUDAÇÃO PLASMÁTICA E CONTAGEM DE UNIDADES  
FORMADORAS DE COLÔNIAS DE *Staphylococcus aureus* NO GRUPO FERIDA  
INFECTADA

ANEXO 4 - RESULTADOS DAS AFERIÇÕES BIOQUÍMICAS DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL, EXUDAÇÃO PLASMÁTICA E CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NO GRUPO FERIDA INFECTADA

Sub-Grupos	Períodos de Aferições								
	5º dia			10º dia			15º dia		
	OH-Prol	AE	UFC/g	OH-Prol	AE	UFC/g	OH-Prol	AE	UFC/g
BMA	99,04	251,09	11	194,35	122,54	6	196,33	204,35	0
	114,35	240,32	18	98,02	96,41	2	214,22	98,02	0
	78,58	266,25	21	109,04	88,23	8	227,91	112,36	0
	68,45	194,54	19	232,09	104,45	3	198,65	108,84	0
	96,12	249,01	25	132,56	104,45	4	209,75	104,04	0
PM	103,02	301,13	32	114,12	93,84	12	215,12	117,65	3
	122,36	289,48	25	132,56	105,32	14	186,36	95,32	5
	123,84	236,57	26	153,44	95,32	21	204,04	123,6	11
	99,04	313,63	41	109,04	94,45	16	218,65	112,54	2
	114,35	330,71	31	204,35	83,84	18	214,91	86,41	4
SSI	78,58	348,09	45	98,02	95,32	32	154,74	98,23	5
	68,45	373,21	51	112,36	85,32	15	254,36	94,45	8
	96,12	369,19	39	108,84	94,45	29	212,24	83,84	12
	84,46	294,33	28	104,04	83,84	33	136,65	95,32	6
	91,21	303,64	24	117,65	95,32	19	86,23	85,32	4

Legenda:

OH-prol = hidroxiprolina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )

AE = azul de Evans ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )

UFC/g = Contagem de *Staphylococcus aureus* em Unidade Formadora de Colônias por grama de tecido



## ANEXO 5

RESULTADOS DAS AFERIÇÕES BIOQUÍMICAS DE HIDROXIPROLINA  
TECIDUAL, EXUDAÇÃO PLASMÁTICA E CONTAGEM DE UNIDADES  
FORMADORAS DE COLÔNIAS DE *Staphylococcus aureus* NO GRUPO  
CONTROLE

ANEXO 5 - RESULTADOS DAS AFERIÇÕES BIOQUÍMICAS DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL, EXUDAÇÃO PLASMÁTICA E CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NO GRUPO CONTROLE

Rato	OH-Prol	AE	UFC/g
1	226,30	55,22	0
2	244,12	65,38	0
3	236,51	68,45	0
4	265,28	72,84	0
5	198,55	63,32	0
6	224,52	65,32	0
7	263,41	54,45	0
8	288,35	73,64	0

Legenda:

OH-prol = hidroxiprolina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )

AE = azul de Evans ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )

UFC/g = Contagem de *Staphylococcus aureus* em Unidade Formadora de Colônias por grama de tecido

ANEXO 6

RESULTADOS DAS AFERIÇÕES BIOQUÍMICAS DE HIDROXIPROLINA  
TECIDUAL, EXUDAÇÃO PLASMÁTICA E CONTAGEM DE UNIDADES  
FORMADORAS DE COLÔNIAS DE *Staphylococcus aureus* NO GRUPO FERIDA  
NÃO INFECTADA

ANEXO 6 - RESULTADOS DAS AFERIÇÕES BIOQUÍMICAS DE  
HIDROXIPROLINA TECIDUAL, EXUDAÇÃO PLASMÁTICA E CONTAGEM DE  
UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NO  
GRUPO FERIDA NÃO INFECTADA

Sub-Grupos	Períodos de Aferições								
	5º dia			10º dia			15º dia		
	OH-Prol	AE	UFC/g	OH-Prol	AE	UFC/g	OH-Prol	AE	UFC/g
BMA	84,46	92,54	0	204,35	82,54	0	246,33	65,32	0
	78,58	96,41	0	232,09	76,41	0	234,22	55,32	0
	68,45	108,23	0	114,12	78,23	0	257,91	74,45	0
	96,12	84,45	0	132,56	94,45	0	278,65	63,84	0
	84,46	94,45	0	153,44	104,45	0	199,75	65,32	0
PM	97,58	113,84	0	119,04	83,84	0	225,12	75,32	0
	91,21	105,32	0	142,56	75,32	0	236,36	74,45	0
	97,12	85,32	0	153,44	85,32	0	203,04	63,84	0
	88,58	124,45	0	132,56	84,45	0	268,65	65,32	0
	96,12	10,84	0	114,12	73,84	0	194,91	55,32	0
SSI	98,58	115,32	0	194,35	75,32	0	194,74	75,32	0
	78,45	125,32	0	98,02	75,32	0	284,36	74,45	0
	98,45	104,45	0	99,04	84,45	0	212,24	73,84	0
	96,12	93,84	0	242,09	73,84	0	236,85	75,32	0
	84,46	105,32	0	232,56	85,32	0	196,23	75,32	0

Legenda :

OH-prol = hidroxiprolina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )

AE = azul de Evans ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )

UFC/g = Contagem de *Staphylococcus aureus* em Unidade Formadora de Colônias por grama de tecido

**ANEXO 7**

**RESULTADOS DAS AFERIÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RATOS DO GRUPO NÃO  
INFECTADOS - SUB-GRUPO BMA**

ANEXO 7 - RESULTADOS DAS AFERIÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RATOS DO GRUPO NÃO INFECTADOS - SUB-GRUPO BMA

Ratos	5º dia					10º dia					15º dia					
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
	A U	M N	M D	I T		A	C	P	A	P	A	A	C	P	A	P
1		X	X	X		X	X	X	X	X				X	X	X
2		X	X	X		X	X	X	X	X				X	X	X
3		X	X	X		X	X	X	X	X				X	X	X
4		X	X	X		X	X	X	X	X				X	X	X
5		X	X	X		X	X	X	X	X				X	X	X

Aspectos avaliados :

- 1) Alterações inflamatórias:  
ausente (AU), mínima (MN), moderada (MD) ou intensa (IT)
- 2) Tipo de inflamação :  
aguda (A) ou crônica (C)
- 3) Úlcera cutânea :  
presente (P) ou ausente (A)
- 4) Tecido de granulação :  
presente (P) ou ausente (A)
- 5) Reação granulomatosa de corpo estranho :  
presente (P) ou ausente (A)



**ANEXO 8**

**RESULTADOS DAS AFERIÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RATOS DO GRUPO NÃO  
INFECTADOS - SUB-GRUPO PM**

ANEXO 8 - RESULTADOS DAS AFERIÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RATOS DO GRUPO NÃO INFECTADOS - SUB-GRUPO PM

Ratos	5º dia					10º dia					15º dia																				
	1		2		3	4		5	1		2		3	4		5															
	AU	MN	MD	IT	A	C	P	A	P	A	AU	MN	MD	IT	A	C	P	A	P	A	AU	MN	MD	IT	A	C	P	A	P	A	
1		X	X	X			X	X		X	X	X	X		X						X	X							X	X	X
2		X	X	X			X	X		X	X	X	X		X						X	X							X	X	X
3		X	X	X			X	X		X	X	X	X		X						X	X							X	X	X
4		X	X	X			X	X		X	X	X	X		X						X	X							X	X	X
5		X	X	X			X	X		X	X	X	X		X						X	X							X	X	X

Aspectos avaliados :

1. Alterações inflamatórias:  
ausente (AU), mínima (MN), moderada (MD) ou intensa (IT)
2. Tipo de inflamação :  
aguda (A) ou crônica (C)
3. Úlcera cutânea :  
presente (P) ou ausente (A)
4. Tecido de granulação :  
presente (P) ou ausente (A)
5. Reação granulomatosa de corpo estranho :  
presente (P) ou ausente (A)

**ANEXO 9**

**RESULTADOS DAS AFERIÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RATOS DO GRUPO NÃO  
INFECTADOS - SUB-GRUPO SUB-GRUPO CONTROLE**

ANEXO 9 - RESULTADOS DAS AFERIÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RATOS DO GRUPO NÃO INFECTADOS - SUB-GRUPO SUB-GRUPO CONTROLE

Ratos	5º dia					10º dia					15º dia								
	1		2	3	4	5	1		2	3	4	5	1		2	3	4	5	
	A	M	M	I	A	C	P	A	P	A	P	A	A	A	A	A	A	A	
1		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X						X	X
2		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X		X	X
3		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X		X	X
4		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X		X	X
5		X	X	X	X	X		X	X	X	X	X			X	X		X	X

Aspectos avaliados :

1. Alterações inflamatórias:  
ausente (AU), mínima (MN), moderada (MD) ou intensa (IT)
2. Tipo de inflamação :  
aguda (A) ou crônica (C)
3. Úlcera cutânea :  
presente (P) ou ausente (A)
4. Tecido de granulação :  
presente (P) ou ausente (A)
5. Reação granulomatosa de corpo estranho :  
presente (P) ou ausente (A)

**ANEXO 10**

**RESULTADOS DAS AFERIÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RATOS DO GRUPO  
INFECTADOS - SUB-GRUPO SUB-GRUPO BMA**

ANEXO 10 - RESULTADOS DAS AFERIÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RATOS DO  
GRUPO INFECTADOS - SUB-GRUPO SUB-GRUPO BMA

Ratos	5º dia					10º dia					15º dia				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
	A U	M N	I D	T	A	A	C	P	A	P	A	A	P	A	P
1		X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X
2		X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X
3		X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X
4		X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X
5		X	X	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X

Aspectos avaliados :

1. Alterações inflamatórias:  
ausente (AU), mínima (MN), moderada (MD) ou intensa (IT)
2. Tipo de inflamação :  
aguda (A) ou crônica (C)
3. Úlcera cutânea :  
presente (P) ou ausente (A)
4. Tecido de granulação :  
presente (P) ou ausente (A)
5. Reação granulomatosa de corpo estranho :  
presente (P) ou ausente (A)



**ANEXO 11**

**RESULTADOS DAS AFERIÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RATOS DO GRUPO  
INFECTADOS - SUB-GRUPO SUB-GRUPO PM**

ANEXO 11 - RESULTADOS DAS AFERIÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RATOS DO GRUPO INFECTADOS - SUB-GRUPO SUB-GRUPO PM

Ratos	5º dia					10º dia					15º dia											
	1		2	3	4	5	1		2	3	4	5	1		2	3	4	5				
	AU	MD	IT	AC	PA	PA	PA	AU	MD	IT	AC	PA	PA	PA	AU	MD	IT	AC	PA	PA	PA	PA
1				XX	X	X		X	X	X		XX	XX	X		X		XX	XX		X	
2				XX	X	X		X	X	X		XX	XX	X		X		XX	XX		X	
3				XX	X	X		X	X	X		XX	XX	X		X		XX	XX		X	
4				XX	X	X		X		XX		XX	XX	X		X		XX	XX		X	
5				XX	X	X		X		XX		XX	XX	X		X		XX	XX		X	X

Aspectos avaliados :

1. Alterações inflamatórias:  
ausente (AU), mínima (MN), moderada (MD) ou intensa (IT)
2. Tipo de inflamação :  
aguda (A) ou crônica (C)
3. Úlcera cutânea :  
presente (P) ou ausente (A)
4. Tecido de granulação :  
presente (P) ou ausente (A)
5. Reação granulomatosa de corpo estranho :  
presente (P) ou ausente (A)

**ANEXO 12**

**RESULTADOS DAS AFERIÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RATOS DO GRUPO  
INFECTADOS - SUB-GRUPO SUB-GRUPO SUB-GRUPO SSI**

ANEXO 12 - RESULTADOS DAS AFERIÇÕES HISTOLÓGICAS DOS RATOS DO GRUPO INFECTADOS - SUB-GRUPO SUB-GRUPO SUB-GRUPO SSI

Ratos	5º dia					10º dia					15º dia										
	1		2	3	4	5	1		2	3	4	5	1		2	3	4	5			
	A	M	M	I	A	C	P	A	P	A	P	A	P	A	A	A	A	P	A	P	A
1			X	X	X			X	X	X			X		X	X	X		X	X	
2			X	X	X			X	X	X			X		X	X	X		X	X	
3			X	X	X			X	X	X			X		X	X	X		X	X	
4			X	X	X			X	X	X			X		X	X	X		X	X	
5			X	X	X			X	X	X			X		X	X	X		X	X	

Aspectos avaliados :

1. Alterações inflamatórias:  
ausente (AU), mínima (MN), moderada (MD) ou intensa (IT)
2. Tipo de inflamação :  
aguda (A) ou crônica (C)
3. Úlcera cutânea :  
presente (P) ou ausente (A)
4. Tecido de granulação :  
presente (P) ou ausente (A)
5. Reação granulomatosa de corpo estranho :  
presente (P) ou ausente (A)

## ANEXO 13

TESTE DE MIC (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA) PARA DETERGENTE

ANEXO 13 - TESTE DE MIC (CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA) PARA  
DETERGENTE

**unesp**  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTUCATU  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

BOTUCATU, SP - R. Rúbio Júnior - Cep 18.518-000 - PBX (0149) 31-3121 - FAX 31-3744 - TELEX 0142107

Do: Deptº de Microbiologia e Imunologia

TESTE DE MIC PARA DETERGENTE

S.D.C.

Linhagens: Escherichia coli  
Bacillus cereus  
Staphylococcus aureus

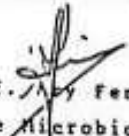
E. coli = > 30%

B. cereus = 2,0%

S. aureus = 0,9%

UBS: Valores expressos em concentração do detergente  
no meio de cultura

Botucatu, 20 de agosto de 1993

  
Prof. Rúbio Fernandes Júnior  
Deptº de Microbiologia e Imunologia  
IB-UNESP - Botucatu  
Resp. pelos testes realizados

**ANEXO 14**

**TESTE TOXICOLÓGICO: IRRITABILIDADE EM OLHOS DE COELHOS**



# ANEXO 14 - TESTE TOXICOLÓGICO: IRRITABILIDADE EM OLHOS DE COELHOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTUCATU  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
CENTRO DE ASSISTENCIA TOXICOLÓGICA - CEATOX

Av. 24-A, 1320 - Jd. 13 - Caixa Postal 338 - 13001-900 Botucatu - SP - Fone: 32.3331 - 32.3332

LAUDO No. 437/93-LT  
IV/CN/dhco

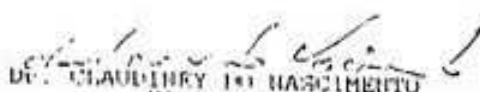
TESTE TOXICOLÓGICO: IRRITABILIDADE EM OLHOS DE COELHOS  
PRODUTO TRATADO: SDA (líquido amarelo).


## A) - TESTE:

- 1 - Coelho Albino, raça Norfolk 2000.
- 2 - 3 animais fêmeas, com boa saúde, 2,5 a 3,0 meses, 1,8 a 2,0 kg, isolados em gaiolas individuais, já climatizados por 5 dias (20-25°C; umidade relativa 40-70%), com ciclo de 12 horas no claro (dia + luz branca) e 12 horas no escuro (noite), dieta convencional e água "ad libitum".
- 3 - Foi utilizado o produto na concentração original.
- 4 - Cada animal foi examinado previamente quanto a lesões oculares mediante aplicação de solução de fluoresceína a 2% (uma gota), sendo que nenhuma alteração foi constatada.
- 5 - Aplicação do produto na concentração original, de 2 gotas (cerca de 0,1 ml) no olho esquerdo e tendo instilado solução fisiológica (2 gotas) no olho direito que foi usado como controle.
- 6 - As leituras foram feitas: 1, 3 e 6 horas após aplicação e posteriormente de 24 em 24 horas sucessivamente até o sétimo dia do experimento, assim sendo:  
Leitura em 1 hora: o globo ocular apresentava-se com congestão vascular da conjuntiva.  
Leitura em 3 horas: observou-se congestão vascular da conjuntiva e aumento de secreção.  
Leitura em 6 horas: permanência dos sintomas.  
Leitura em 24 horas: o globo ocular apresentava apenas congestão vascular da conjuntiva.  
Leitura em 48 horas: o globo ocular apresenta-se sem alterações.

- B) - CONCLUSÃO: Após o experimento pode-se concluir que o produto SDA (líquido amarelo), quando utilizado na concentração original apresentou-se não irritante lesivo ao globo ocular embora tenha causado congestão vascular da conjuntiva e aumento de secreção ocular nos animais nas primeiras 24 horas de experimento.

Botucatu, Setembro de 1.993.

  
Dr. CLAUDINEY DE NASCIMENTO  
BIOLOGO  
CRB 10.944-01

  
Dr. IGOR VASSILIEFF  
Prof. TITULAR EM FARMACOLOGIA  
E ESPECIALISTA EM TOXICOLOGIA  
CRF 8 - 3.732 / CRM - 16346

CRF 8 - 3.732 / CRM - 16346

**ANEXO 15**

**TESTE TOXICOLÓGICO: IRRITABILIDADE DÉRMICA EM COELHOS**

**AVALIAÇÃO MICROBICIDA DO GERDEX**

# ANEXO 15 - TESTE TOXICOLÓGICO: IRRITABILIDADE DÉRMICA EM COELHOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE BOTUCATU  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS  
CENTRO DE ASSISTÊNCIA TOXICOLÓGICA - CRATOX

AV. DO JOSÉ ROBERTO DE SOUZA, 111 - Caixa Postal 373 - (135 - 887) 21.000 - Botucatu - SP - CEP 13.506 - 900 - 000

LABOR No. 431/93 LT  
IV/CN/dneu

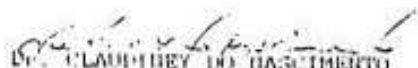
TESTE TOXICOLÓGICO. IRRITABILIDADE DÉRMICA EM COELHOS  
PRODUTO TESTADO: SDA (líquido amarelo claro)


## A) - TESTE:

- 1 - Coelho Albino, raça Norfolk 2000.
- 2 - 3 animais fêmeas, com boa saúde, 2,5 a 3,0 meses, 1,7 a 1,9 kg, isolados em gaiolas individuais, já climatizados por 5 dias (20-25°C; umidade relativa 40-70%), com ciclo de 12 horas no claro (dia + luz branca) e 12 horas no escuro (noite), dieta convencional e água "ad libitum".
- 3 - Foi utilizado o produto na concentração original.
- 4 - Os animais foram depilados com 24 horas de antecedência usando-se máquina sem lesar a pele, numa área de 6 x 12 cm, no dorso dos mesmos, na região do pescoço para as costas, local onde foi aplicado o produto na concentração original e num volume de 2,0 ml deixando secar por evaporação.
- 5 - As leituras foram realizadas em: 30 e 60 minutos após aplicação e posteriormente de 24 em 24 horas sucessivamente até o décimo dia do experimento, sendo que não foi constatada nenhuma alteração dérmica nos animais experimentados.

- II) CONCLUSÃO: Após 10 dias do experimento não se verificou que o produto SDA (líquido amarelo claro), quando utilizado na concentração original e num volume de 2,0 ml, apresentava-se não irritante dérmico nos animais experimentados.

Botucatu, Setembro de 1993.

  
Dr. CLAUDINEY DE NASCIMENTO  
BIOFARM  
CRB 10.044-01

  
Dr. IGOR VASSILIEFF  
Prof. TITULAR EM FARMACOLOGIA  
E ESPECIALISTA EM TOXICOLOGIA  
CRB 8 - 3.732 / CRM - 16316

ANEXO 16

TESTE DE IRRITAÇÃO OCULAR EM COELHOS - GERDEX

## ANEXO 16 - AVALIAÇÃO MICROBICIDA DO GERDEX



INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (I.V.I.C.)  
CENTRO DE MICROBIOLOGÍA Y BIOLOGÍA CELULAR  
Apartado Postal 21827, Caracas 1020A, Venezuela. Fax: 581-504 1382

Altos de Pipe, 12 de Junio de 1.997

## EVALUACION MICRIBIOLIGICA DE GERDEX

**SOLICITANTE:** ORGANIZACIÓN ANTONIO GASIA & ASOCIADOS  
(O.A.G.A.)

**MATERIA:** GERDEX (Bromuro de laurildimetilbencilamonio)

**LOTE:** 250

**MUESTRA:** LIQUIDA INCOLORO

**METODO:** El método aplicado se basó en los lineamientos y microorganismos recomendados por las siguientes instituciones: The Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), The Association of Analytical Chemists (AOANC) y The Food and Drug Administration (FDA). El tiempo y las diluciones utilizadas fueron sugeridas por el solicitante.

## PROPIEDADES ANALIZADAS

**BACTERIAS :** Se utilizaron los siguientes gérmenes

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC	21363
<i>Serratia rubidaea</i>	ATCC	14756
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC	6303
<i>Escherichia coli</i>	ATCC	9637
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	27853
<i>Salmonella choleraesuis</i>	ATCC	10708
<b>Esporicida:</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 21331
<b>Tuberculosidad:</b>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 19420
<b>Fungicida:</b>	<i>Rhizomucor miehei</i>	ATCC 26912



**ANEXO 17**

**TESTE DE IRRITAÇÃO DÉRMICA EM COELHOS - GERDEX**

# ANEXO 17 - TESTE DE IRRITAÇÃO OCULAR EM COELHOS - GERDEX



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ

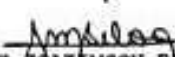
52.260 - 96005246


## 2.0 - RESUMO:

O produto Gerdex, foi testado para a avaliação do seu potencial de irritação ocular em coelhos albinos Nova Zelândia.

O produto foi aplicado diretamente no olho de cinco coelhos, machos e fêmeas e os animais foram observados após 24, 48, 72 horas e 7º dia da instilação, conforme Manual Técnico 05/85 do I.N.C.Q.S.

Os animais não apresentaram lesões oculares durante o período do ensaio. O produto foi classificado como não irritante.

  
ELIANE ACKERMANN DA SILVA  
Biol. CRB/103 - 09137  
Técnico Responsável

  
ANTONIO CARLOS DA ROCHA  
Eng. Quím. CRQ/9 - 09300397  
Gerente Lab. de Ensaios Biológicos

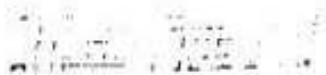




**ANEXO 18**

**DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MEDIANA ORAL - GERDEX**

## ANEXO 18 - TESTE DE IRRITAÇÃO DÉRMICA EM COELHOS - GERDEX



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ

17 389 - 94775700

## 2.0 - RESUMO:

O produto Gerdex, foi testado para a avaliação do seu potencial de irritação dérmica em coelhos albinos Nova Zelândia.

O produto foi aplicado dicarboxilato sobre o dorso troncário de 10 coelhos, machos e fêmeas, e os animais foram observados 24 e 72 horas após a aplicação do produto, conforme Manual Técnico 05/85 do I.N.C.Q.S.

Os animais apresentaram eritema e edema muito leve. O produto foi classificado como não irritante.

ELIENE FONTINSON DA SILVA  
Biol. CRB/03 - 08137  
Técnico Responsável

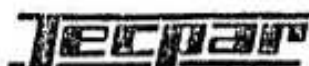
ANTONIO CAPICINI DE SOUZA  
Eng. Quím. CRQ/9 - 09300397  
Ger. Lab. Ensaios Biológicos



**ANEXO 19**

**DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MEDIANA ORAL - GERDEX**

## ANEXO 19 - DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MEDIANA ORAL - GERDEX



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ


52.260 - 96005247

## 2.0 - RESUMO

O produto Gerdex, foi testado para a determinação de sua dose letal mediana em ratos albinos, Linhagem Wistar.

A amostra foi administrada por via oral em 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) e observados quanto aos possíveis sinais de intoxicação e n° de mortes durante 14 dias.

De acordo com os resultados obtidos, a  $DL_{50}$  foi considerado superior a  $6000_{mg}/kg$ .

  
KELEN CRISTINA SBOLLI  
Farm. Ind. CRP/00 - 4878  
Técnico Responsável

  
ELIANE JOAKINSON DA SILVA  
Biol CRP/3 - 08137  
Respondendo pelo Lab. Ensaios Biológicos

**ANEXO 20**

**DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MEDIANA DERMAL - GERDEX**

# ANEXO 20 - DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL MEDIANA DERMAL - GERDEX



INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ

52.260 - 96005248

## 2.0 - RESUMO:

O produto Gerdex, foi testado para a determinação de sua dose letal mediana dermal em ratos albinos Linhagem Wistar.

A amostra foi aplicada topicamente na região dorsal em 20 animais (10 machos e 10 fêmeas) e estes observados quanto aos possíveis sinais de intoxicação e número de mortes durante 14 dias.

De acordo com os resultados obtidos, a DL<sub>50</sub> foi considerada superior a 12000mg/Kg.

**KELLEN CRISTINA SBOLLI**  
Farm. Ind. CRF/009 - 4878  
Técnico Responsável

**ELIANE JONKIMSON DA SILVA**  
Biol CRB/03 - 08137  
Respondendo pelo Lab. Ensaio Biológicos

8-1381  
Sd: ruc  
21

ANEXO 21

DESCRIÇÃO DA AMOSTRA – DECROST 330® - POLÍMERO DE MAMONA



ANEXO 21 - DESCRIÇÃO DA AMOSTRA - DECROST 330<sup>®</sup> - POLÍMERO DE MAMONA



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ**

Rua dos Funcionários, 1357 - Tel (041) 252-6211 - C.P. 357 - Caixa (41) 5321 Fax (041) 255-4279  
C.G.C. 77.964.393/0001-88 - CEP 80.035-010 - UNID./BAIRRO JUVENÉ - CURITIBA - PARANÁ - BRASIL  
Rua Prof. Alqazir Muzahid Mader, 2400 - Tel 346-3141 - C.P. 357 - Caixa (41) 33143 - Fax (041) 247.6788  
C.G.C. 77.964.393/0001-88 - CEP 81310-020 - UNID./BAIRRO CIC - CURITIBA - PARANÁ - BRASIL

LAUDO TÉCNICO Nº 3.211 - 27478/93

**MATERIAL:** Decrost - 330  
Resp.Téc.: Luis Carlos Ribeiro Araujo  
Licenças: CRD - 04223784 - 4ª Região

**PROCEDENCIA:** Jaú - SP

**REMETENTE:** BIOMECANICA INDUSTRIA E COMÉRCIO DE PRODUTOS ORT. LTDA

**ENDEREÇO:** Av. Dep. Zien Nasser, 880 - Jaú - SP

A presente análise tem seu valor restrito somente à amostra entregue no Instituto. O presente Documento é emitido em 1 via original, respondendo o Instituto apenas pela veracidade desta via.

**ANÁLISE PRÉVIA:**

Requerida por: Fabricante

Descrição da amostra: Produto líquido de coloração castanha, acondicionado em embalagem plástica transparente; Classificado como Esterilizante.

**FORMULA DECLARADA:**

Ácidos Graxos Totais .....	21,8 %
Hidrocarbonetos Alifáticos (Óleo mineral) .....	N.D.
Insaponificáveis nos Ácidos Graxos .....	0,3 %
Ácido palmítico (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> ) .....	1,6 %
Ácido esteárico (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> ) .....	0,8 %
Ácido oléico (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> ) .....	6,8 %
Ácido linoléico (C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> ) .....	0,2 %
Ácido ricinoléico (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> ) .....	92,2 %

**RESULTADO:**

Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Método: Diluição de Uso (Segundo Manual Técnico do INCQS)

Diluição Testada: Produto Puro

Tempo de Contato: 10 minutos

Microorganismos Teste:

Vibrio cholerae - INCQS nº 156 (ATCC-9458) - tipo OGAWA

Vibrio cholerae - INCQS nº 157 (ATCC-9459) - tipo INABA

**CONCLUSÃO:**

A amostra analisada apresenta-se "Satisfatória" quanto a Avaliação da Atividade Antimicrobiana sobre os microorganismos teste.

Curitiba, 6 de abril de 1994.

MARTA REGINA TAZONIERO DO AMARAL  
Farm. Biog. Ind. CRF/9-3675  
Técnico Responsável

ANTONIO CARLOS DE SOUZA  
Eng. Quím. CRD/9-09300397  
Gerente Div. An. Biológicas