

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

**PATRICIA PACHECO TYSKI SUCKOW**

**EFEITO CICATRICIAL DO EXTRATO DE *CALENDULA OFFICINALIS* L.  
ASSOCIADO À APLICAÇÃO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO EM FERIDAS  
INDUZIDAS EM PELE DE RATOS**

**CURITIBA**

**2012**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

**PATRICIA PACHECO TYSKI SUCKOW**

**EFEITO CICATRICIAL DO EXTRATO DE *CALENDULA OFFICINALIS* L.  
ASSOCIADO À APLICAÇÃO DO ULTRASSOM TERAPÊUTICO EM FERIDAS  
INDUZIDAS EM PELE DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Auristela Duarte de Lima Moser.

**CURITIBA**

**2012**



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE  
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº-153

Aos 14 dias de março de 2012 realizou-se a sessão pública de defesa da dissertação: "Efeito Cicatricial do Extrato de *Calendula Officinalis* L. Associado à Aplicação do Ultrassom Terapêutico em Feridas Induzidas em Pele de Ratos", apresentada por Patricia Pacheco Tyski Suckow, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia em Saúde – Área de Concentração – Bioengenharia perante uma Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Auristela Duarte de Lima Moser,  
PUCPR (Orientador e presidente)

  
assinatura

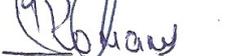
APROVADO  
parecer (aprov/ reprov.)

Prof. Dr. Munir Antonio Gariba,  
PUCPR (Examinador)

  
\_\_\_\_\_

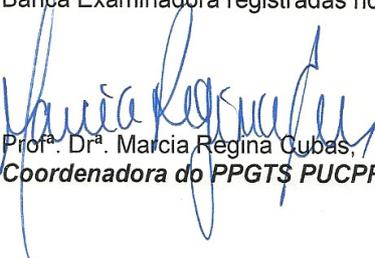
APROVADO

Prof. Dr. Marco Aurelio Romano,  
UNICENTRO (Examinador)

  
\_\_\_\_\_

Aprova de

Conforme as normas regimentais do PPGTS e da PUCPR, o trabalho apresentado foi considerado APROVADO (aprovado/reprovado), segundo avaliação da maioria dos membros desta Banca Examinadora. Este resultado está condicionado ao cumprimento integral das solicitações da Banca Examinadora registradas no Livro de Defesas do Programa.

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Regina Cubas,  
Coordenadora do PPGTS PUCPR



**“É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia.”**

**Clarice Lispector**

## AGRADECIMENTOS

A elaboração de uma dissertação é produto de um trabalho coletivo, exceto pela responsabilidade e redação. Sendo assim, várias pessoas contribuíram para que o projeto fosse executado e que o trabalho chegasse a uma conclusão. A todas elas declaro minha sincera gratidão.

Aos meus filhos, **Pedro Henrique e Felipe**, que cresceram junto com este trabalho, saibam sempre que meu amor por vocês é incondicional.

Aos meus pais **Eloy e Elisabeth**, pelas viagens, pelo exemplo de vida, pela constante dedicação e apoio, sempre preocupados com meu futuro.

À Prof<sup>a</sup> **Auristela de Lima Moser**, pela sua orientação, apoio, confiança e tolerância que me impulsionaram durante todo este período.

Ao Prof. **João Antônio Palma Setti**, por ter me aceito no Programa. Sem sua colaboração inicial e suas palavras de incentivo, eu não teria assumido este trabalho.

Ao Prof. **Marco Aurélio Romano**, o qual compartilhou seu extremo conhecimento, me recebendo de braços abertos em seu Laboratório. Sempre acessível de forma simples e amigável, sua paciência, sapiência e ajuda me mostravam o caminho.

À Prof<sup>a</sup> **Elisa Perez**, pelo comprometimento, gentileza e disponibilidade em assumir uma formulação que não pertencia a minha área de conhecimento.

À Prof<sup>a</sup> e amiga **Viviani de Marque Carrer**, pela sua ajuda e carinho, sempre disposta a cooperar e desvinculada de interesses. Chegar até aqui sem seu conhecimento e direcionamento teria sido muito mais difícil.

À minha amiga e irmã de coração, Prof<sup>a</sup> **Eliane Gonçalves de Jesus Fonseca**, que sempre me escutou e ajudou, assumindo e dividindo minhas aulas na UNICENTRO. Obrigada pelo companheirismo, presença e amizade,

À Veterinária, **Dra. Renata Romano**, sua experiência técnica e sua disponibilidade foram de grande importância para a execução deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> **Márcia Olandoski**, pela sua dedicação nas análises estatísticas, de forma rápida e eficaz.

Às acadêmicas **Jéssica de Moraes, Kamylla Stadler, Luana Ferreira e Renata Líbano**, que auxiliaram significativamente na realização experimental deste Mestrado. Fica aqui a minha gratidão a todas vocês.

À agora Farmacêutica, **Stephanie Sprenger**, que assumiu a confecção do Gel de Calêndula sem sequer me conhecer. Sucesso na profissão.

E por fim, ao meu marido **Marcio**, companheiro incentivador em todos os momentos, que muitas vezes foi mãe e pai de nossos filhos para que este projeto se tornasse realidade. Muito Obrigada!

## RESUMO

Introdução. A cicatrização constitui um conjunto dinâmico de alterações teciduais, importantes na manutenção da integridade do organismo e surge como resposta a uma agressão tecidual. O Ultrassom Terapêutico (UST) é um recurso que promove a aceleração da cicatrização das lesões, a contração da ferida, a reepitelização tecidual, uma melhor organização da membrana extracelular e um menor processo inflamatório local. A fonoforese é a aplicação tópica, via Ultrassom de fármacos pela camada externa da pele para tecidos subjacentes, e dentre vários se optou pelo gel de *Calendula officinalis* L. a 10%. A *Calendula* é um fitoterápico que apresenta atividade cicatrizante empregada popularmente no tratamento de lesões. O objetivo desta pesquisa experimental foi avaliar os efeitos terapêuticos do Ultrassom com frequência 3MHz no modo pulsado e intensidade de 0,5W/cm<sup>2</sup> associado ao gel de *Calendula Officinalis* L. na cicatrização de feridas induzidas em ratos da linhagem Wistar. Método. Foram utilizados 90 animais, divididos em 4 grupos: Grupo Controle (G1), Grupo Tópico com *Calendula* (G2), Grupo Ultrassom Terapêutico (G3) e Grupo Ultrassom Terapêutico aplicado com gel de *Calendula* (G4), e subdivididos em 3, 7 e 21 dias de tratamento. Os fragmentos de pele foram corados com Hematoxilina Eosina e Pricrosirius e analisados em microscopia óptica. Resultados. Houve diferenças na formação de colágeno em derme e epiderme, sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados, mas, as análises qualitativas (macroscópica) indicaram uma estimulação mais acentuada no grupo que recebeu a associação do Ultrassom Terapêutico com o Gel de *Calendula officinalis* L. (G4). Conclusão. Os resultados da análise macroscópica sugerem que o efeito da associação de UST e calêndula pode potencializar a reparação tecidual em lesões de menor profundidade. Estudos futuros com ampliação do período de análise podem ser úteis para esclarecer ocorrência de neocolagenase em 28 e 36 dias.

**Palavras-chave:** Ultrassom terapêutico, Cicatrização de feridas, *Calendula*, Fonoforese.

## ABSTRACT

Introduction. Healing is a dynamic set of tissue changes, important in maintaining the integrity of the body and emerges as a response to a tissue aggression. Therapeutic ultrasound is a resource that promotes acceleration of wound healing of injuries, the contraction of the wound, tissue reepitelização, better organisation of extracellular membrane and a smaller local inflammatory process. Phonophoresis is the topical application, via Ultrasound of pharmaceuticals by the outer layer of skin to underlying tissue, and among various chosen drugs by gel of *Calendula officinalis* L. to 10%. The Calendula is a phytotherapeutic that displays activity scarring lesions treatment commonly employed. The purpose of this experimental research was to evaluate the therapeutic effects of Ultrasound with frequency 3 MHz pulsed mode and intensity of 0,5W/cm<sup>2</sup> associated with the gel of Calendula Officinalis I. in wound healing induced in rats of the Wistar strain. Metodo. 90 animals were used, divided into 4 groups: group control (G1), group Topic with Calendula (G2), Therapeutic Ultrasound Group (G3) and group Therapeutic Ultrasound applied with Calendula gel (G4), and subdivided into 3, 7 and 21 days of treatment. The fragments of skin were stained with HematoxilinaEosina and Pricrosirius and analyzed in optical microscopy. Results. There were differences in the formation of collagen in the DermIS and epidermis, no statistically significant differences between treated groups, but the qualitative analyses (macroscopic) indicated a stimulating stronger in the group that received the Association of Therapeutic Ultrasound Gel of Calendula officinalis I. (G4). Conclusion. The macroscopic analysis results suggest that the purpose of the Association of UST and Calendula can increase tissue repair minor lesions in depth. Future studies with extension of the period of analysis may be useful to clarify the occurrence of neocolagenase in 28 and 36 days.

**Keywords:** therapeutic ultrasound, healing of wounds, calendula, phonophoresis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Seqüência fisiológica de cicatrização por primeira intenção.	24
Figura 2- Flor de <i>Calendula officinalis</i> L.	31
Figura 3- Técnica Cirúrgica. A. Anestésicos utilizados; B. Procedimento de Anestesia; C. Paquimetria; D. Incisão com sutura de 3 pontos; E. Anti-séptico; F. Antibiótico.	35
Figura 4- Aplicação do Ultrassom. A. Gel de Calêndula; B. Aplicação ultrassônica; C. Dose aplicada; D. Aplicação tópica.	36
Figura 5- Fotomicrografia do animal do Grupo Controle (G1), intensidade 0,0W/ cm <sup>2</sup> , 3 dias de terapia ultrassônica de 3 MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. estrato córneo; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.	39
Figura 6- Fotomicrografia do animal do Grupo Tópico de Calêndula (G2), por 5 minutos e 3 dias de aplicação. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. estrato córneo; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.	40
Figura 7- Fotomicrografia do animal do Grupo tratado com Ultrassom e Gel a base de água (G3), intensidade 0,5W/cm <sup>2</sup> , 3 dias consecutivos de terapia ultrassônica de 3 MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. estrato córneo; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.	41
Figura 8- Fotomicrografia do animal do Grupo tratado com Ultrassom associado ao Gel de Calêndula a 10% (G4), intensidade 0,5W/cm <sup>2</sup> , 3 dias consecutivos de terapia ultrassônica de 3MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. estrato córneo; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.	42
Figura 9- Fotomicrografia do animal do Grupo Controle (G1), intensidade 0,0W/ cm <sup>2</sup> , 7 dias de terapia ultrassônica de 3 MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. epiderme; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.	43
Figura 10- Fotomicrografia do animal do Grupo Tópico de Calêndula (G2), por 5 minutos e 7 dias de aplicação. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. epiderme; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.	44
Figura 11- Fotomicrografia do animal do Grupo tratado com Ultrassom e Gel a base de água (G3), intensidade 0,5W/cm <sup>2</sup> , 7 dias consecutivos de terapia ultrassônica de 3 MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. epiderme; B.	45

tecido de granulação; C. anexos dérmicos.

Figura 12- Fotomicrografia do animal do Grupo tratado com Ultrassom associado ao Gel de Calêndula a 10% (G4), intensidade  $0,5W/cm^2$ , 7 dias consecutivos de terapia ultrassônica de 3MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. epiderme; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos. 46

Figura 13- Fotomicrografia do animal do Grupo Controle (G1), intensidade  $0,0W/cm^2$ , 21 dias de terapia ultrassônica de 3 MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A seta indica área de reparação tecidual. 47

Figura 14- Fotomicrografia do animal do Grupo Tópico de Calêndula (G2), por 5 minutos e 21 dias de aplicação. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A seta indica área de reparação tecidual. 48

Figura 15- Fotomicrografia do animal do Grupo tratado com Ultrassom e Gel a base de água (G3), intensidade  $0,5W/cm^2$ , 21 dias consecutivos de terapia ultrassônica de 3 MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A seta indica área de reparação tecidual. 49

Figura 16- Fotomicrografia do animal do Grupo tratado com Ultrassom associado ao Gel de Calêndula a 10% (G4), intensidade  $0,5W/cm^2$ , 21 dias consecutivos de terapia ultrassônica de 3MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A seta indica área de reparação tecidual. 50

Figura 17- Fotomicrografia do animal do Grupo Controle (G1), tratado por 7 dias, coloração de Picrosirius, microscopia de polarização. 76

Figura 18- Fotomicrografia do animal do Grupo Controle (G1), tratado por 21 dias, coloração de Picrosirius, microscopia de polarização. 76

Figura 19- Fotomicrografia do animal do Grupo Tópico de Calêndula a 10% (G2), tratado por 7 dias, coloração de Picrosirius, microscopia de polarização. 77

Figura 20- Fotomicrografia do animal do Grupo Tópico de Calêndula a 10% (G2), tratado por 21 dias, coloração de Picrosirius, microscopia de polarização. 77

Figura 21- Fotomicrografia do animal do Grupo Ultrassom Terapêutico (G3), tratado por 7 dias, coloração de Picrosirius, microscopia de polarização. 78

Figura 22- Fotomicrografia do animal do Grupo Ultrassom Terapêutico (G3), tratado por 21 dias, coloração de Picrosirius, microscopia de 78

polarização.

Figura 23- Fotomicrografia do animal do Grupo Ultrassom Terapêutico e 79  
Gel de Calêndula a 10% (G4), tratado por 7 dias, coloração de  
Picrosirius, microscopia de polarização.

Figura 24- Fotomicrografia do animal do Grupo Ultrassom Terapêutico e 79  
Gel de Calêndula a 10% (G4), tratado por 21 dias, coloração de  
Picrosirius, microscopia de polarização.

Figura 25- Cicatrização externa de animal de cada grupo, referente ao 3º 80  
dia de tratamento.

Figura 26- Cicatrização externa de animal de cada grupo, referente ao 7º 81  
dia de tratamento.

Figura 27- Cicatrização externa de animal de cada grupo, referente ao 82  
21º dia de tratamento.

Gráfico 1- Intervalo de Tukey para média do 7º dia. 60

Gráfico 2- Intervalo de Tukey para média do 21º dia. 61

Gráfico 3- Intervalo de Tukey para média do Grupo G1. 61

Gráfico 4- Intervalo de Tukey para média do Grupo G3. 62

Gráfico 5- Intervalo de Tukey para média do Grupo G4. 62

Gráfico 6- Intervalo de Tukey para média do Grupo G2. 63

Gráfico 7- Diagrama de pontos para o 7º dia. 63

Gráfico 8- Diagrama de pontos para o 21º dia. 64

Gráfico 9- Diagrama de pontos para o Grupo G1. 64

Gráfico 10- Diagrama de pontos para o Grupo G2. 65

Gráfico 11- Diagrama de pontos para o Grupo G3. 65

Gráfico 12- Diagrama de pontos para o Grupo G4. 66

Gráfico 13- Box-plot para o 7º dia. 66

Gráfico 14- Box-plot para o 21º dia. 67

Gráfico 15- Box-plot para o Grupo G1. 67

Gráfico 16- Box-plot para o Grupo G2. 68

Gráfico 17- Box-plot para o Grupo G3.	68
Gráfico 18- Box-plot para o Grupo G4.	69
Gráfico 19- Médias para o Colágeno I por dia de eutanásia.	69
Gráfico 20- Médias para o Colágeno III por dia de eutanásia.	70
Gráfico 21- Médias para o Colágeno I por grupo.	70
Gráfico 22- Médias para o Colágeno III por grupo.	71
Gráfico 23- Box-plot para Colágeno I com outliers.	72
Gráfico 24- Box-plot para Colágeno I sem <i>outliers</i> , para grupo e dia de eutanásia.	74
Gráfico 25- Box-plot para Colágeno III sem outliers, para grupo e dia de eutanásia.	74
Quadro 1- Distribuição dos grupos, nos momentos de eutanásia.	34
Tabela 1- Profundidade média das freqüências 1MHz e 3MHz, para tecidos do corpo.	26
Tabela 2- Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada grupo no 3º dia.	51
Tabela 3- Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no 3º dia.	52
Tabela 4- Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada grupo no 7º dia.	52
Tabela 5- Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no 7º dia.	52
Tabela 6- Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada grupo no 21º dia.	53
Tabela 7- Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no 21º dia.	53
Tabela 8- Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada dia no Grupo 1.	54
Tabela 9- Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 1.	54

Tabela 10- Teste de Tukey para porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 1.	54
Tabela 11- Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada dia no Grupo 2.	55
Tabela 12- Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 2.	55
Tabela 13- Teste de Tukey para porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 2.	55
Tabela 14- Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada dia no Grupo 3.	56
Tabela 15- Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 3.	56
Tabela 16- Teste de Tukey para porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 3.	56
Tabela 17- Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada dia no Grupo 4.	57
Tabela 18- Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 4.	57
Tabela 19- Teste de Tukey para porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 4.	57
Tabela 20- Estatística descritiva para o colágeno I.	58
Tabela 21- Estatística descritiva para o colágeno III.	58
Tabela 22- P-Valor para o teste de Kruskal-Wallis comparando os grupos (G1 x G2 x G3 x G4).	59
Tabela 23- P-Valor para o teste de Kruskal-Wallis comparando os dias de eutanásia.	59
Tabela 24- P-Valor para o teste de Kruskal-Wallis da comparação entre os grupos dois-a-dois.	60
Tabela 25- Estatística descritiva para Colágenos I e III após a retirada de outliers.	73

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

UST	-	Ultrassom Terapêutico
CO	-	<i>Calendula Officinalis</i> L.
ZPT	-	Zirconato-Titanato de Chumbo
MEC	-	Matriz Extra Celular
MHz	-	Mega Hertz
kHz	-	Quilo Hertz
W/cm <sup>2</sup>	-	Watt por Centímetro Quadrado
h	-	Hora
cm	-	Centímetro
µm	-	micrometro
CEUA	-	Comitê de Ética no Uso de Animais
HE	-	Hematoxilina-Eosina
OS	-	Picrosirius
UTFPR	-	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1 OBJETIVOS</b> .....	20
1.1.1 Objetivo geral.....	20
1.1.2 Objetivos específicos.....	20
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
<b>2.1 A PELE NORMAL</b> .....	21
2.1.1 Reparo Tecidual.....	22
<b>2.2 ULTRASSOM TERAPÊUTICO</b> .....	24
2.2.1 Conceitos e Princípios.....	24
2.2.2 Efeitos Fisiológicos do Ultrassom Terapêutico.....	27
<b>2.2.2.1 Efeito Térmico</b> .....	27
<b>2.2.2.2 Efeito Mecânico</b> .....	27
<b>2.2.2.3 Efeito Químico</b> .....	27
2.2.3 Aplicação do Ultrassom Terapêutico.....	28
<b>2.3 FONOFORESE</b> .....	28
<b>2.4 CALENDULA OFFICINALIS L.</b> .....	30
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	33
<b>3.1 MATERIAIS</b> .....	33
<b>3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS</b> .....	34
<b>3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	34
3.3.1 Técnica Cirúrgica.....	34
3.3.2 Aplicação do Ultrassom.....	36
3.3.3 Eutanásia.....	37
3.3.4 Técnica Histológica.....	37
<b>3.4 CAPTURA DE IMAGENS</b> .....	37
<b>3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	38
<b>4 RESULTADOS</b> .....	39
<b>4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA POR HEMATOXILINA EOSINA (HE)</b> ....	39
<b>4.2 RESULTADOS PARA COLÁGENOS I e III</b> .....	51
4.2.1 Colágeno conforme o dia.....	51
4.2.2 Colágeno conforme o grupo.....	53

4.2.3 Resumos.....	58
4.2.4 Análise Gráfica.....	60
4.2.5 Análise Estatística após a retirada de <i>Outliers</i> .....	71
<b>4.2.5.1 Resultados sem <i>Outliers</i></b> .....	73
4.2.6 Conclusão Estatística.....	75
<b>4.3 IMAGENS DOS COLÁGENOS I E III</b> .....	75
4.3.1 Grupo Controle .....	76
4.3.2 Grupo Tópico com Calêndula a 10% .....	77
4.3.3 Grupo Ultrassom Terapêutico.....	78
4.3.4 Grupo Ultrassom Terapêutico com Gel de Calêndula a 10%.....	79
<b>4.4 RESULTADOS MACROSCÓPICOS</b> .....	80
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	83
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	88
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	89
<b>ANEXO</b> .....	96

## 1 INTRODUÇÃO

A cicatrização constitui um conjunto dinâmico de alterações teciduais, importantes na manutenção da integridade do organismo e surge como resposta às lesões, sejam elas por traumas ou por procedimentos cirúrgicos. (GARROS *et al.*, 2006).

O Ultrassom Terapêutico é amplamente usado na prática diária da Fisioterapia e Medicina Desportiva para o tratamento de uma variedade de condições adquiridas e traumáticas que afetam o aparelho locomotor. Seus efeitos benéficos incluem a cicatrização de úlceras e nervos periféricos, reparação de tendões e reparação de estiramento da musculatura esquelética (ROSUM *et al.*, 2004). O Ultrassom Terapêutico (UST) é um recurso comumente aplicado, tanto nos distúrbios do sistema músculo-esquelético, como na aceleração do reparo tecidual de lesões musculares, o aparelho promove a aceleração da cicatrização das lesões, a contração da ferida, a reepitelização tecidual, uma melhor organização da membrana extracelular e um menor processo inflamatório local (DYSON, 1987; ALTOMARE, 2009).

O Ultrassom pode funcionar em várias etapas da cicatrização tecidual. No estágio inicial pode diminuir o edema, desencadear a degranulação de mastócitos e aumentar o fluxo sangüíneo, aumentando o aporte de oxigênio e macrófagos para região. Na fase tardia o Ultrassom pode estimular a deposição de colágeno e sua remodelação (GRECA *et al.*, 1999).

Os principais efeitos fisiológicos observados na utilização do Ultrassom Terapêutico são a estimulação da circulação sanguínea, a promoção do relaxamento e as ações antiinflamatória, anti-edematosa, analgésica, tixotrópica ou coloidoquímica, fibrinolítica, regeneradora e antiacidótica. Estes são decorrentes dos efeitos biofísicos gerados pelas ondas ultrassônicas, sendo os principais o efeito mecânico, o térmico e o químico (CAMPOS, 1992; MENDONÇA *et al.*, 2006).

O mecânico é causado pelas vibrações sônicas que causam atrito nos complexos celulares, produzindo micro-massagem. Tem como consequência o aumento da permeabilidade celular das membranas tissulares devido à aceleração da difusão dos íons pela membrana, a melhora no metabolismo celular, a mudança no volume das células corporais e a desagregação de complexos celulares e

macromoléculas, liberando aderências provavelmente devido à separação das fibras colágenas (CAMPOS, 1992; BYL, 1995).

Os efeitos biológicos do Ultrassom relacionados à cavitação e à micro-massagem, tais como degranulação de células de sustentação, alterações na função da membrana celular, aumento nos níveis intracelulares de cálcio, estimulação da atividade fibroblástica, resulta no aumento da síntese protéica, da neogênese e da tensão elástica do colágeno, efeitos esses mais pronunciados com o Ultrassom pulsado. Lesões cutâneas crônicas, como as úlceras, são de difícil cicatrização, motivando a procura de meios e recursos que possam beneficiar seu processo de cicatrização. Desta forma, a terapia com Ultrassom Terapêutico pode agir como um estímulo para as células envolvidas no processo de reparo tecidual, particularmente na fase inflamatória e proliferativa deste, resultando na aceleração da cicatrização (MENDONÇA *et al*, 2006).

Byl (1995) estudou o efeito do Ultrassom na cicatrização em animais e concluiu que o mesmo não interfere na qualidade da ferida, macroscopicamente, mas aumenta a força de tensão da cicatriz e a taxa de oclusão da ferida. Já, Mendonça *et al* (2006), afirmam que com a irradiação ultrassônica, é possível melhorar tanto a velocidade da cicatrização, quanto à qualidade do tecido cicatricial, visto que seus efeitos benéficos se fazem sentir desde a fase inflamatória aguda até a fase de remodelagem da cicatriz cutânea.

Amâncio (2003) realizou um estudo sobre a influência do Ultrassom Terapêutico na integração de enxertos de pele total em coelhos e concluiu que o Ultrassom induz alterações morfológicas nos processos biológicos, como proliferação celular da camada germinativa da epiderme e neoangiogênese.

Além das funções já conhecidas, o Ultrassom também tem sido usado como promotor da permeação cutânea de fármacos, sendo o seu uso conhecido como fonoforese ou sonoforese. A fonoforese é a aplicação tópica, via Ultrassom de drogas pela camada externa da pele para tecidos subjacentes. Os efeitos da energia ultrassônica abrem caminhos que permitem que a medicação se difunda pela pele (SOUZA DE JESUS; FERREIRA; MENDONÇA *et al*, 2006).

No arsenal terapêutico, atualmente ocorre à predominância de substâncias sintéticas, porém, nos últimos anos, têm-se verificado uma retomada à valorização de práticas consideradas populares ou não científicas, inclusive a lenta

reincorporação das ervas medicinais como alternativa ou complemento terapêutico (GARROS *et al*, 2006).

Desde os tempos antigos as pessoas têm usado preparados de plantas para acelerar o processo de cicatrização. Muitas vezes a sua utilização é meramente baseada na tradição, sem qualquer evidência científica de sua eficácia e pouco conhecimento sobre seus compostos ativos ou do seu modo de ação (FRONZA *et al*, 2009).

Vários fitoterápicos foram testados e usados no processo de cicatrização de feridas cutâneas, e que se mostraram promissores. Dentre eles, pode-se citar a *Aloe vera*, a *Ixora L.*, a Papaína (*Carica papaya*) e a *Rosa spp*, porém com resultados variados (GARROS *et al*, 2006).

Tendo em vista a moderna investigação científica, a qual está trazendo importantes contribuições à área patológica, a flores de *Calendula officinalis L.* estão sendo empregadas em numerosas preparações de uso externo, como antiinflamatório e cicatrizante de feridas de pele. Notadamente, em cosmetologia, fazendo parte da composição de manipulações indicadas para o tratamento de eritemas solares, queimaduras, dermatoses secas, úlceras de pressão, entre outras (ALONSO, 2008; ESMALI *et al.*, 2008; SIMÕES *et al.*, 2004; FONSECA *et al.*, 2010). E, devido às atividades e princípios ativos que lhe são atribuídas, a *Calendula officinalis L.* tem sido empregada em estudos nos processos de cicatrização em diversos ramos, visto que o tratamento de uma ferida é um procedimento complexo e dinâmico, que requer uma avaliação detalhada e estruturada (MENENZES, 2006).

Em função da ausência de investigações científicas quanto a eficácia do efeito cicatricial do UST associado ao gel com tintura de *Calendula officinalis L.* em pele de animais, surge como questão problematizadora: **Qual o efeito da associação do Ultrassom Terapêutico ao princípio ativo da *Calendula officinalis L.* na cicatrização de feridas induzidas em pele de ratos?**

E para tanto, foram traçados os seguintes objetivos:

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos terapêuticos do Ultrassom com frequência 3MHz no modo pulsado e intensidade de  $0,5\text{W}/\text{cm}^2$  associado ao gel de *Calendula Officinalis L.* na cicatrização de feridas induzidas em ratos da linhagem Wistar.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar quantitativamente os colágenos tipos I e III, oriundo das feridas pós-aplicação do Ultrassom Terapêutico e aplicação Tópica do gel de *Calendula Officinalis L.*, associados e isolados;
- Analisar qualitativamente os aspectos da epiderme e da derme no processo de regeneração tecidual promovido pelo protocolo estabelecido, em todos os grupos do estudo;
- Analisar macroscopicamente a evolução cicatricial no 3º dia, no 7º dia e no 21º de tratamento, submetidos aos tratamentos propostos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A PELE NORMAL

A pele é o maior órgão do corpo humano, e também pode ser chamado de sistema tegumentar. A pele possui funções de proteção, barreira hídrica, regulação da temperatura corporal, defesa não-específica (contra microorganismos), excreção de sais, síntese de vitamina D e sinalização sexual. Ela consiste em três camadas firmemente aderidas umas às outras, que são denominadas de epiderme, derme e hipoderme (GUYTON, 1989; KIERSZENBAUN, 2004).

A epiderme é a camada mais externa, constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, de origem ectodérmica e espessura variada. Consiste de pelo menos quatro tipos celulares: ceratinócitos, melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans. Apresenta também quatro camadas bem definidas, da superfície para a profundidade: a camada córnea, camada de células granulosas, de células espinhosas e as camadas de células basais. A camada de células basais é a camada germinativa da epiderme, que faz junção com a derme ou tecido conjuntivo, e é responsável por sua constante renovação (GUIRRO e GUIRRO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; VIVIER, 2000).

A derme, chamada de tecido conjuntivo ou córion, é a camada de sustentação da epiderme, sendo o tipo de tecido mais abundante no corpo. Ela serve como um cimento que sustenta e conecta os outros tipos de tecidos, além de fornecer resistência, apoio, nutrição e defesa para os outros tecidos (GUIRRO e GUIRRO, 2002; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005; MANDELBAUM *et al*, 2003).

Ela consiste de um componente fibroso, formado por colágeno e elastina, juntamente com a chamada substância fundamental. Junto à derme estão os apêndices epidérmicos e a neurovasculatura, além de um componente celular incluindo fibroblastos e várias células inflamatórias. A derme se divide em duas camadas: a derme papilar, mais superficial e a derme reticular, mais profunda. A derme papilar é delimitada superiormente pela epiderme, lateralmente pelos cones epiteliais e inferiormente pelo plexo vascular superficial e pela derme reticular (GUIRRO e GUIRRO, 2002; STEVENS e LOWE, 2002).

Existem células do tecido conjuntivo que são produzidas no próprio tecido e permanecem nele. Outras, como os leucócitos vêm de outros tecidos e podem

permanecer temporariamente. As principais células do tecido conjuntivo são: macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células adiposas, linfócitos e leucócitos. Além destas, encontram-se na derme os fibroblastos e fibrócitos, que são sintetizadores de fibras de colágeno, substância fundamental na matriz extracelular do tecido conjuntivo. O colágeno é o principal tipo de proteína fibrilar insolúvel na matriz extracelular do tecido conjuntivo e dá a derme sua estabilidade estrutural (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; GUYTON, 2006; THOMAS *et al*,1995; VIVIER, 2000).

O colágeno é encontrado em alta densidade nas fâscias, tendões, ligamentos, cartilagens, músculos e ossos. Atualmente são descritos em torno de 18 tipos de colágeno e, com exceção da cartilagem do menisco, todos eles estão localizados em áreas muito vascularizadas. O colágeno tipo I e o tipo III são os principais, compreendendo cerca de 80% e 10% do colágeno dérmico, respectivamente. O colágeno tipo I é localizado na pele, fâscia, tendões, ligamentos, ossos e cartilagem. O colágeno tipo III é localizado nos músculos lisos, nervos, medula óssea e vasos sanguíneos (MANDELBAUM *et al.*, 2003; THOMAS *et al.*, 1995).

### 2.1.1 Reparo Tecidual

O tecido epitelial apresenta uma grande coesão entre suas células, mas é sensível a solução de continuidade, que se ocorrer, é precipitada por fatores agentes expondo o tecido conjuntivo subjacente. Quando isto ocorre, o organismo reage reparando o tecido lesado através de um processo de cicatrização, buscando restaurar sua integridade com a maior rapidez possível (BREM E TOMIC-CANIC, 2007; NITZ, 2006).

Após a lesão tecidual, um complexo processo é iniciado para restaurar a função e a integridade dos tecidos danificados (FRONZA *et al*, 2009)

É um processo dinâmico que envolve a ação integrada de vários tipos de células, da matriz extra-celular (MEC), e mediadores solúveis denominados citocinas. É um evento biológico complexo com a presença de inflamação, bem como a criação e remodelação de um novo tecido. Na pele, envolve a regeneração dos componentes do tecido epitelial e conjuntivo (FRONZA *et al*, 2009 ; THOMAS *et al*, 1995).

Este processo é influenciado por constituintes da MEC, que atuam como um substrato “adesivo” para os processos de regeneração e reparação. Um destes componentes é o colágeno, já que fibroblastos se proliferam e migram para a área da ferida (FRONZA *et al*, 2009; THOMAS *et al*, 1995).

O processo de cicatrização tecidual pode ser dividido em 3 fases: inflamação, proliferação e reparo ou remodelagem (WERNER E GROSE, 2003)

A inflamação é a resposta imediata a uma lesão, cujos sinais cardeais externos são rubor, tumor, calor, dor e perda de função. A fase aguda ou inicial da inflamação se prolonga por 24 a 48 horas, seguida por uma fase subaguda ou tardia, que se prolonga por mais 10 a 14 horas. A finalidade fundamental da fase inflamatória é livrar a área de tecido morto e secreções provocadas pela lesão tecidual, no qual diversos mediadores bioquímicos são liberados tão logo ocorre à destruição de células na ferida. A presença dos mediadores químicos no local da inflamação é transitória, sendo os mais importantes, a histamina, a serotonina, a bradicinina e as prostaglandinas (MANDELBAUM, *et al*, 2003).

A fase proliferativa começa por volta do terceiro dia, persistindo por duas a três semanas e se constitui no início da formação de tecido de granulação, o qual precede o desenvolvimento do tecido cicatricial maduro, constituído de uma neomatriz neovascularizada, macrófagos e fibroblastos. Assim que chegam à ferida, os fibroblastos passam a sintetizar ácido hialurônico, fibronectina e colágeno dos tipos I e III que formam a matriz extracelular inicial. Os tipos de colágeno no interior de uma ferida e suas quantidades são gradualmente modificados com o tempo; o colágeno do tipo III é gradualmente absorvido e substituído pelo colágeno do tipo I, que é o colágeno fibrilar maduro, acompanhado pela deposição de proteoglicanos (STEVENS e LOWE, 2002).

A fase de remodelagem apresenta seu início praticamente junto com a formação do novo tecido e persiste por até seis meses, mas pode durar anos. A matriz presente neste estágio é gradualmente substituída e remodelada enquanto ocorre a maturação do tecido cicatricial (Figura 3). A cicatriz é definida morfológicamente como ausência de organização tissular em comparação com arquitetura tissular adjacente normal (SCHUNCK *et al.*, 2005). Nessa fase há reorganização de colágeno e aumento da resistência da cicatriz. A remodelagem envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras colágenas (HATANAKA e CURI, 2007).

A reepitelização da superfície é o objetivo final do processo de reparo, iniciando-se já nas primeiras 24 a 36 horas. As células epiteliais migram a partir das bordas da ferida e dos folículos pilosos próximos, contribuindo para a contração e reduzindo a sua superfície. Após a cobertura da superfície cutânea, as células amadurecem e diferenciam-se em queratinócitos (REGER, 1999).

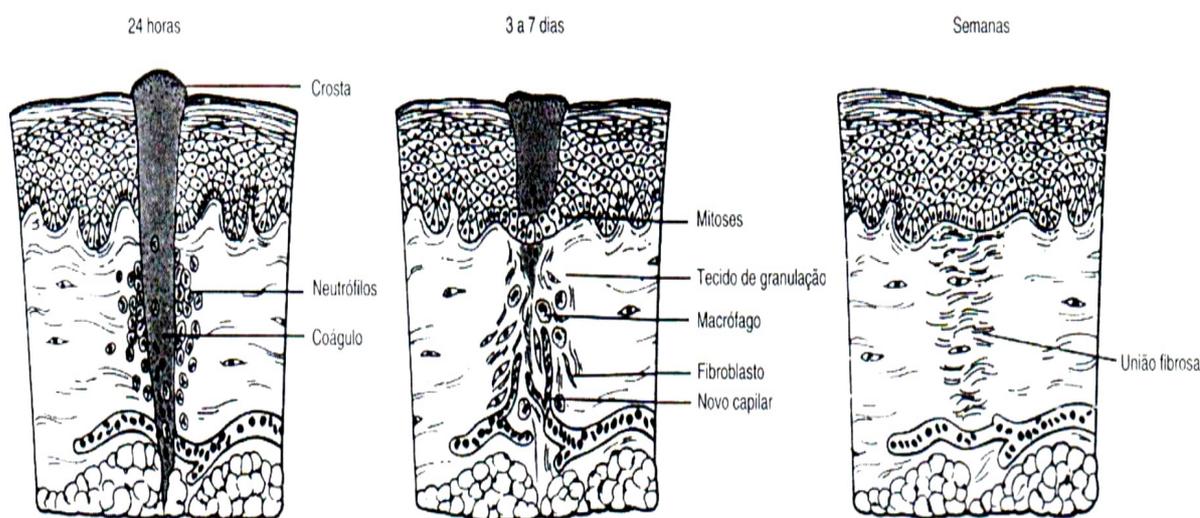


Figura 1 – Sequência fisiológica de cicatrização por primeira intenção.

Fonte: Anderson (1982).

## 2.2 ULTRASSOM TERAPÊUTICO

### 2.2.1 Conceitos e Princípios

Kitchen (2003) e Speed (2001) definem o Ultrassom como um conjunto de ondas sonoras longitudinais, não audíveis ao ouvido humano. Essas ondas ultrassônicas são produzidas a partir da transformação da corrente elétrica comercial em corrente de alta frequência, que ao incidir sobre um cristal de quartzo ou de zirconato-titanato de chumbo (ZTP) provoca compressão e expansão alternada do cristal. A onda de ultra-som é longitudinal na natureza ou seja, a direção de propagação é a mesma que a direção da oscilação (LAVON E KOST, 2004).

Esta ação mecânica (pressão), sobre o cristal, provoca a emissão de ondas ultrassônicas com frequência igual à corrente recebida ou corrente que incide sobre o cristal dentro do transdutor (efeito piezoelétrico). O cristal sintético (ZTP) é mais resistente a altas temperaturas e mais maleável, aumentando com isto a durabilidade e a emissão do feixe. O transdutor é um dispositivo capaz de

transformar uma forma de energia em outra, no caso, elétrica em mecânica. Esta vibração mecânica é transmitida a uma freqüências que variam de 20 KHz a 16MHz, limites superiores aos da audição humana. (KITCHEN, 2003; MITRAGOTRI e KOST, 2004; TER HAAR, 2007).

O modo de emissão de onda do Ultrassom pode ser contínuo ou pulsado (intermitente), dependendo do tipo de enfermidade em tratamento. A forma contínua produz 50% de efeito térmico e 50% de efeito mecânico, e o Ultrassom pulsado com sua ação mecânica, apresenta breves intervalos, facilitando a dispersão do calor (GUIRRO E GUIRRO, 2002; LOW E REED, 2001; MACHADO, 2002).

O conhecimento da fase da patologia e a profundidade da lesão são de vital importância, pois através desses parâmetros é que a dosimetria será feita diferenciada e individualizada. A freqüência do Ultrassom é um fator determinante na penetração da onda pelo tecido, como ocorre com o UST de 3MHz, em que a energia ultrassônica é praticamente absorvida no nível superficial, a uma profundidade de cerca de 1,6cm, mostrando melhores resultados em pesquisas de pele, enquanto que a absorção do Ultrassom de 1 MHz ocorre mais profundamente, atingindo profundidade superior a 2,5cm, sendo mais indicada em lesões profundas, como músculos e ossos. (HAYES, *et al*, 2004; KITCHEN, 2003; LOW E REED, 2001; SORIANO, PÉREZ E BAQUÉS, 2004; SPEED, 2001).

O Ultrassom Terapêutico é utilizado para promover o tratamento de uma variedade de situações, tais como na redução do edema, na aceleração da reparação tecidual, diminuição da dor (ALFREDO, 2009) e na melhora tecido cicatricial (MENDONÇA *et al*, 2006). Ele aumenta o fluxo sanguíneo, a permeabilidade de membranas, e a ativação de fibroblastos, com aumento na produção do colágeno (OLSSON, 2006).

Para que as ondas do UST sejam transmitidas aos tecidos biológicos, é necessário um meio acoplador, cuja função é eliminar o ar entre o transdutor e o tecido, assegurando que a energia ultrassônica atinja o tecido alvo. Os materiais mais utilizados para este acoplamento são: a água, géis e alguns óleos (KITCHEN, 2003).

As ondas ultrassônicas são absorvidas pelos tecidos e transformadas em calor, ocorrendo principalmente em nível molecular, sendo as proteínas os tecidos que mais absorvem. No tecido ósseo, aproximadamente 70% das ondas incidentes são absorvidas. A absorção depende da impedância do meio, da freqüência do

Ultrassom e da quantidade de proteína dos tecidos. A vibração, o atrito e a fricção molecular (energia cinética) são absorvidos pelos tecidos e transformados em calor (ROBINSON e SNYDER, 2001; MACHADO, 2002; KITCHEN, 2003).

A transmissão das ondas ultrassônicas ocorre em maior quantidade quando as impedâncias acústicas dos dois meios estiverem mais próximas (casamento de impedância) e quanto mais diferentes forem as impedâncias, maior será a reflexão. As ondas ultrassônicas, ao passarem de um meio para outro (meio diferente do que ele estiver passando), poderão ocasionar reflexão, refração, absorção, ocorrendo cada um desses atenuadores em diferentes graus, dependendo das impedâncias e índices de absorção de cada meio (LOW E REED, 2001; MACHADO, 2002).

A energia fornecida pelas ondas do UST ao atravessar o meio, é medida pela intensidade acústica ( $\text{Watts/cm}^2$ ), os valores de intensidade geralmente referem-se à intensidade transmitida pelo transdutor. A grande maioria das pesquisas mostrou que a intensidade de  $0,5\text{W/cm}^2$  acelera o processo de cicatrização dos tecidos como pele, tendões e ossos (BASSOLI, 2001; KITCHEN, 2003).

A seleção dos parâmetros é crucial para a utilização segura do UST. Dentre eles destaca-se freqüência, intensidade, ciclo, tempo de aplicação e modo. Porém, existem também parâmetros adicionais como tipo de tecido-alvo e condições ambientais que também podem influenciar nos resultados da aplicação (Tabela 1) (OGURA, 2008).

Tabela 1 – Profundidade média das freqüências 1MHz e 3MHz, para tecidos do corpo.

Fonte: Faganello, 2003.

<b>TECIDO-ALVO</b>	<b>1MHz</b>	<b>3MHz</b>
Tecido ósseo	2,1mm	--
Cartilagem	6mm	2mm
Pele	11,1mm	4mm
Tecido muscular (perpendicular)	9mm	3mm
Tecido muscular (paralelo)	24,6mm	8mm
Tecido adiposo	50mm	16,5mm
Tecido tendinoso	6,2mm	2mm

## 2.2.2 Efeitos Fisiológicos do Ultrassom Terapêutico

### 2.2.2.1 Efeito Térmico

Thomson, Skinner e Piercy (1994) alegam que este efeito é decorrente da absorção das ondas ultrassônicas pelo tecido e sua transformação em calor. Este fator decorre também da vibração celular e de suas partículas, provocando atrito entre si, produzindo o efeito térmico. O Ultrassom de feixe contínuo produz maior quantidade de calor. Este efeito melhora o metabolismo celular, o fluxo sanguíneo, o aumento da extensibilidade das estruturas de colágeno, reduzindo e/ou modulando a dor e os espasmos musculares, e reduzindo a rigidez articular. Pode elevar a temperatura local até 40°-45°C sem causar lesão (DYSON, 1980 apud GUIRRO e GUIRRO, 2002; KITCHEN e BAZIN, 1996; SPEED, 2001).

### 2.2.2.2. Efeito Mecânico

As ondas ultrassônicas, ao penetrarem nos tecidos, provocam uma vibração celular (micromassagem), produzindo o aumento da permeabilidade de sua membrana, acelerando assim, a velocidade de difusão iônica através dela (KITCHEN, 2003).

As correntes acústicas provocam o aumento da permeabilidade da membrana celular, aumentando a síntese de proteína e o aumento da secreção dos mastócitos. Altera os movimentos dos fibroblastos e aumenta absorção de cálcio. Os fatores de crescimento dos macrófagos são aumentados, contribuindo com a aceleração do processo de reparo. Acelera os processos osmóticos, regulando os desequilíbrios em nível celular, nos casos de lesões ou enfermidades (MACHADO, 2002).

Este efeito é priorizado quando se utiliza o modo de aplicação pulsado, já que o mesmo facilita a dispersão do calor (LOW e REED, 2001).

### 2.2.2.3 Efeito Químico

O efeito térmico e mecânico promovem reações químicas como liberação de histamina, substância vasodilatadora que promove a analgesia, estimula

regeneração tecidual, aumenta reabsorção de edema, aumenta atividade dos capilares, aumenta a reabsorção de metabólitos (SORIANO et al., 2003).

A associação pode também estimular a atividade fibroblástica, o aumento da síntese protéica, a regeneração dos tecidos e a cicatrização óssea (SPEED, 2001).

Para Thomson, Skinner, Piercy (1994), e Robinson e Snyder (2001) o Ultrassom atua como catalisador, acelerando as reações químicas, e aumentando a condutibilidade das reações.

### 2.2.3 Aplicação do Ultrassom Terapêutico

Segundo Low e Reed (2001), Robinson e Snyder (2001), Machado (2002) e Kitchen (2003) o tempo de tratamento, conforme regra geral, com Ultrassom é de 5 minutos por área, sendo que, em áreas corporais grandes, a região será dividida pela área de radiação efetiva do transdutor, que é informada na ficha técnica do transdutor do próprio equipamento.

Estes mesmos autores descrevem que o UST pode ser aplicado através do Método de Deslizamento, apropriado para áreas planas, sem acidentes ósseos e que suportem a pressão do transdutor.

## 2.3 FONOFORESE

Fonoforese ou Sonoforese é a migração de moléculas de drogas através da pele, para dentro de tecidos cutâneos, sob a influência do Ultrassom. Ela é possível, utilizando as forças de corrente acústicas, ou seja, vibração sonora de alta frequência, que existe no campo de Ultrassom para facilitar o processo (LOW E REED, 2001; KITCHEN, 2003). Descreve-se como uma alternativa útil e um meio interessante de administração de fármacos, por tratar-se de uma técnica não invasiva, evitando-se assim intervenções intravenosas e administrações orais (MUTOH *et al*, 2003; POLACOW, 2005), mostrando melhorar o transporte transdérmico sinergicamente com outros potenciadores de penetração (LAVON E KOST, 2004).

O primeiro relato para a utilização da fonoforese é do ano de 1950, onde foi testada a capacidade de ajuda da penetração de uma variedade de medicamentos, para condições localizadas (MITRAGOTRI E KOST, 2004). O objetivo principal deste

método consiste em obter uma concentração adequada e rápida de drogas nos tecidos, sem inativar as moléculas da droga e sem causar efeitos colaterais (EBRAHIMI *et al*, 2012)

Tanto o efeito térmico, como o mecânico, e as alterações químicas dos tecidos biológicos produzidas pelo UST podem facilitar a difusão dos princípios ativos presentes nos medicamentos de uso tópico, embora não haja consenso entre os autores (POLACOW, 2005).

Byl (1995) em sua revisão sobre fonoforese ressalta que 75% dos estudos comprovaram efeitos positivos da fonoforese e que os resultados considerados negativos se deram devido a erros metodológicos. Entretanto, os mais recentes estudos realizados em humanos e animais utilizando o Ultrassom vêm comprovando a eficácia dessa técnica.

Existem muitas razões para muitos dos relatos sobre a efetividade desta técnica ser contraditórios, porém é provável que a fonoforese dependa não apenas da frequência, intensidade e duração do tratamento do Ultrassom, mas também da natureza da molécula da droga propriamente dita (KITCHEN, 2003).

Outro item a ser considerado, é a profundidade na qual as drogas penetram sonoforeticamente. Esta é uma questão particularmente incerta, pois assim que a droga passa pela epiderme é provável que seja dispersa na circulação em uma extensão que depende da vascularidade dos tecidos subjacentes, e da facilidade com que as moléculas da droga podem entrar nos vasos sanguíneos. E após estudos, concluiu-se que frequências mais baixas levam a maior penetração, e se os efeitos terapêuticos precisam ocorrer na derme e na epiderme, é de se esperar que frequências mais altas obtenham um resultado mais efetivo. Outro estudo mostrou que o Ultrassom pulsado é mais efetivo que o contínuo (LOW e REED, 2001).

A utilização de diferentes frequências está relacionada à profundidade na qual o feixe ultrassônico pode atingir, além de ter-se uma indicação a favor da frequência de 3 MHz para a fonoforese (GUIRRO, 1999). Já Mutoh *et al* (2003), afirmam que a fonoforese tem aplicabilidade na faixa de 0,75 – 3MHz.

A cavitação é o principal mecanismo para a fonoforese. Esse efeito mecânico pode facilitar a difusão da droga pela oscilação de partículas no tecido, diminuindo o potencial de membrana, alterando a estrutura lipídica, aumentando a permeabilidade e a condutância iônica ou destruindo a membrana celular (MITRAGOTRI *et al*, 1995)

e por via de transporte, aumentando os dutos de glândulas sudoríparas e folículos pilosos na pele (EBRAHIMI *et al*, 2012).

#### **2.4 CALENDULA OFFICINALIS L.**

A *Calendula Officinalis* L. (CO), da família Asteraceae, é uma planta herbácea anual, caule ereto, anguloso e ramoso, de 30-60 centímetros de altura, nativa das Ilhas Canárias e região Mediterrânea, da qual são utilizadas as flores, possuidoras de aroma brando e pouco agradável, de coloração amarela ou alaranjada. Seu uso tem sido mais divulgado a partir do século XIII, quando foi inicialmente utilizada para curar feridas. Posteriormente, empregada como unguento e bálsamo, com finalidade anti-séptica e anti-inflamatória, durante a Guerra Civil Norte-americana e na Primeira Guerra Mundial. Na França, as indicações oficialmente aceitas, com base no uso tradicional, são em afecções dermatológicas como antipruriginoso, calmante e protetor da pele (LORENZI *et al*, 2002; PARENTE *et al*, 2011; SIMÕES *et al.*, 2004).

A planta adaptou-se bem ao clima, solo, pluviosidade e incidência de luminosidade do Brasil (EMBRAPA).

Trata-se de uma planta medicinal e cosmética, e seu extrato além de possuir uso popular consagrado, no Brasil, sua utilização está regulamentada na lista de registro simplificado de fitoterápicos, publicada pela ANVISA em 2004, sob registro RE nº 89/04, onde está estabelecido o uso da planta como agente antiinflamatório e cicatrizante quando em uso tópico (BRASIL, 2004).

Dentre várias farmacopéias, a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, através de especificações da monografia da planta, descreve suas características, bem como o processo para sua identificação e qualificação. Macroscopicamente apresenta flores dispostas em capítulos de 3cm a 7cm de diâmetro, as flores da periferia são linguladas, pistiladas, de 1,5cm a 3,0cm de comprimento e 0,5cm a 0,7cm de largura na porção mediana. As flores do centro são escassas, tubulosas, pequenas, curtas, de aproximadamente 0,5cm de comprimento, hermafroditas, amarelas ou alaranjadas, raro quase avermelhadas (Figura 4) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 2010).



Figura 2 - Flor de *Calendula officinalis* L.

Reproduzido de <http://www.topgiardinaggio.it/piante/calendula-officinalis.asp>. Site visitado em 22/01/2012.

De uma maneira geral, os extratos aquosos de Calêndula apresentam as seguintes propriedades farmacológicas: cicatrizante, antiinflamatória, antibacteriana, analgésica e tranqüilizante (VOLPATO, 2005). Também é considerada antiespasmódica, antiséptica, depurativa, estimulante de funções hepáticas e emoliente. Recomenda-se, além de seu uso interno, o uso externo para feridas, úlceras, acnes, lesões purulentas e pruridos (LORENZI *et al*, 2002), podendo ser usada sob as mais variadas formas, tais como, infusões, tinturas, ugüentos, géis tópicos e uso homeopático. (NITZ, 2006).

Para os extratos das flores da *Calendula Officinalis* L. foram relatadas ações bactericidas, fungistática, virucida, antitumoral, colerética e tricomonocida. Em modelos animais, foi relatada a ação cicatrizante, nas lacerações de pele e tecidos musculares, tanto em feridas recentes quanto crônicas, estimulando o desenvolvimento do tecido de granulação, com aumento da atividade fagocitária, atribuída por alguns autores aos carotenóides, às saponinas e aos flavonóides, seus principais componentes. Promovendo ainda, a hemostasia, prevenindo processos inflamatórios e favorecendo ainda mais sua ação cicatrizante (CAMPOS *et al*, 2000; NITZ, 2006; SIMÕES *et al*, 2004).

As flores liguladas da *Calendula officinalis* L. são utilizadas em fórmulas terapêuticas e em cosméticos na forma de tintura de Calendula. Essas flores apresentam principalmente saponinas, triterpenos álcoois e ésteres de ácidos

graxos, carotenóides, flavonóides, cumarinas, hidrocarbonetos e ácidos graxos (HAMBURGUER et al., 2003).

Em relação a formulações tópicas à base de extratos dessa planta, os estudos indicam resultados positivos com relação à melhora do processo cicatricial, com melhora significativa do tecido de granulação quando testadas em ratos (PARENTE, 2009), cães (MENEZES, 2006) e coelhos (PAGNANO, 2008). Esta melhora do tecido local é possivelmente devida ao aumento da atividade fagocitária local, com uma significativa redução do tecido necrótico (RICOLDY, 2010) e, a uma atividade angiogênica (PARENTE, 2011), ou seja, a formação de vasos sanguíneos novos, provenientes de vasos já existentes em situações patológicas ou fisiológicas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 MATERIAIS

A pesquisa do tipo experimental induzida, randomizada, foi desenvolvida nas dependências do Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Centro Oeste - Guarapuava – Paraná, com aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal da PUC-PR sob protocolo nº 582.

Os materiais utilizados para aplicação da terapia ultrassônica nas amostras foram: um Ultrassom, modelo Sonomaster, modo contínuo e pulsado, frequência de modulação até 100HZ, frequência de pulso de 1MHZ e 3MHZ, ERA de 3cm<sup>2</sup>, marca KW - Indústria Nacional de Tecnologia Eletrônica Ltda., de propriedade da pesquisadora. O equipamento utilizado foi aferido antes do início do experimento através de um dosímetro de precisão (Ultra Sonic Power Meter®, modelo UPM-DT-1) na UTFPR (Universidade Tecnológica Federal do Paraná). Gel à base de água e Carbopol, e Tintura de *Calendula Officinalis* L a 10% que foi incorporada ao gel à base de água e Carbopol, para acoplamento cabeçote-pele.

A Tintura de *Calendula officinalis* L. a 10% foi obtida após a extração da matéria prima da planta seca e a realização de testes de controle de qualidade dos lotes. Posteriormente, a formulação farmacêutica tópica, sob forma de gel, foi desenvolvida seguindo normatização da Farmacopéia Brasileira 5ª Edição, sendo que ambos os géis foram fornecidos pelo Departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Centro Oeste – Guarapuava – Paraná.

Para o presente estudo foram utilizados 90 ratos (*Rattus norvegicus*) albinos, Wistar, machos, adultos jovens, com idade de 100 dias e peso médio de 357,35g ( $\pm$  13,60g), provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, os quais foram mantidos nas mesmas condições ambientais, ciclo claro/escuro de 12hs, em caixas de plástico, contendo 03 ou 04 animais cada, recebendo ração (Nuvital® Nuvilab CR-1) e água *ad libitum*, seguindo orientações da Lei Federal nº 6638 e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Os animais foram transportados até o destino e local do experimento em automóvel próprio climatizado a 21º ( $\pm$ 1º), e em caixas próprias, mantendo-se os cuidados necessários para evitar desconforto aos mesmos.

## 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram separados randomicamente, ao acaso, em quatro grupos e alocados em caixas aleatoriamente (Quadro 1), sendo: um grupo controle (G1), com aplicação simulada por 3, 7 e 21 dias; grupo com aplicação tópica do Gel à base de água e Tintura de *Calendula Officinalis* L. a 10% (G2), por 3, 7 e 21 dias; ambos com 21 animais cada. Grupo com aplicação do Ultrassom e Gel à base de água (G3) por 3, 7 e 21 dias; e grupo com aplicação do Ultrassom e Gel à base de água e Tintura de *Calendula Officinalis* L. a 10% (G4) por 3, 7 e 21 dias, ambos com 24 animais cada.

Quadro 1 - Distribuição dos grupos, nos momentos de eutanásia.

<b>grupos</b> \ <b>eutanásia</b>	<b>3º dia</b>	<b>7º dia</b>	<b>21º dia</b>
<b>G1</b> (controle limpo)	<b>n=6</b>	<b>n=7</b>	<b>n=7</b>
<b>G2</b> (gel de calêndula tópico a 10%)	<b>n=7</b>	<b>n=7</b>	<b>n=7</b>
<b>G3</b> (UST pulsado)	<b>n=8</b>	<b>n=8</b>	<b>n=8</b>
<b>G4</b> (UST + gel de calêndula a 10%)	<b>n=8</b>	<b>n=8</b>	<b>n=8</b>

## 3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 3.3.1 Técnica Cirúrgica

No Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Centro Oeste - Guarapuava - Paraná, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Quetamina na dose de 60 -80 mg/Kg de peso vivo, associado a Cloridrato de Xilasina na dose de 08 -15 mg/Kg de peso vivo, em dose única, via intraperitoneal. Em seguida, o animal foi posicionado em decúbito ventral, sobre bancada do laboratório para realização de tricotomia dorsal. Realizada incisão de 4 cm, medida com Paquímetro Universal Mitutoyo®, obtendo exposição da pele e tela subcutânea, suturada com fio de nylon 2.0 simples, com um

número de três pontos em cada incisão. Utilizou-se PVPI como anti-séptico (WARREN et al., 2005). Após o término do ato cirúrgico os animais receberam Cefalexina (Rilexine® 150 Injetável) na concentração de 15mg/Kg, subcutâneo por 5 dias com efeito antibiótico profilático (Figura 3) (MARCHIONNI *et al*, 2006; MÜLLER-DECKER *et al*, 2002).



Figura 3 – Técnica Cirúrgica. A. Anestésicos utilizados; B. Procedimento de Anestesia; C. Paquimetria; D. Incisão com sutura de 3 pontos; E. Anti-séptico; F. Antibiótico.

### 3.3.2 Aplicação do Ultrassom

Seguidas 24 horas do procedimento cirúrgico, os animais foram colocados em uma superfície plana e após a assepsia com álcool 70° da área tratada, foi realizada a aplicação do Ultrassom nos grupos, uma vez ao dia, na intensidade e no período proposto.

O grupo controle (G1) realizou a terapia com o aparelho desligado. Os animais do grupo G2 foram submetidos à aplicação tópica do Gel à base de água e Tintura de *Calendula Officinalis* L. a 10%, por 5 minutos sobre a incisão. Nos animais dos grupos G3 e G4 foi aplicada a intensidade de 0,5 W/cm<sup>2</sup>, com freqüência de modulação de 16 Hz, 50%, ERA de 3 cm<sup>2</sup> e 3 MHz, com tempo de aplicação do equipamento ultrassônico de 5 minutos (Figura 4). A técnica de aplicação utilizada foi a de deslizamento, que consiste no deslocamento do transdutor com movimentos lentos, lineares, de vai e vem, nunca permanecendo imóvel (KITCHEN, 2003), em um ângulo de 90°, cabeçote-pele.

Após a aplicação, em todos os grupos, o gel remanescente foi removido com gaze estéril.



Figura 4 – Aplicação do Ultrassom. A. Gel de Calêndula; B. Aplicação ultrassônica; C. Dose aplicada; D. Aplicação tópica.

### 3.3.3 Eutanásia

No terceiro, sétimo e vigésimo primeiro dias de tratamento, os grupos sofreram eutanásia após o término da aplicação, por dose letal de Tiopental Sódico Intraperitoneal (250mg/Kg). Esse é o método de eutanásia recomendado para roedores e outros pequenos mamíferos, contido na Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 20 de junho de 2002.

### 3.3.4 Técnica Histológica

Após a eutanásia, foi retirado um segmento do dorso no qual a cicatriz estava contida. As peças retiradas foram conservadas em Formalina 10% por 48 horas e posteriormente inclusas em parafina, submetidas a cortes transversais de 4 $\mu$ , com micrótomo, e coradas com HematoxilinaEosina (HE), para análise qualitativa histomorfológica dos cortes do tecido, e pela coloração de PicroSirius Red (PS), que promove um aumento da birrefringência específica para a estrutura dos colágenos I e III para análise de suas fibras no microscópio com polarização (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2005; GARROS *et al.*, 2006), neste método as fibras colágenas mais delgadas e menos organizadas, que correspondem ao colágeno tipo III, apresentam coloração verde brilhante devido a menor birrefringência, já o colágeno tipo I, que é mais organizado e possui maior birrefringência, apresenta-se com coloração avermelhada (BORGES *et al.*, 2007).

Foram confeccionadas 90 lâminas sendo, 45 coradas com HE e outras 45, coradas com PS, onde em todas, estavam inseridos materiais de dois animais, com 3 fragmentos de pele de cada rato.

A confecção das lâminas foi realizada pelo laboratório Histocenter Centro de Anatomia Patológica e Citopatológica, localizado à Rua Professor Becker, 2565, Centro, Guarapuava, Paraná.

## 3.4 CAPTURA DE IMAGENS

A captura das imagens foi realizada nas dependências do Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, utilizando-se

de microscopia de polarização, programa de captura Dino Capture e o programa de análise de imagens Image Pro Plus, Cybernetics®, versão 4.5.

Foram utilizadas leituras em objetiva de 40x e 400x para a qualificação da derme, epiderme, tecido de granulação e reparação.

Para a quantificação dos colágenos tipos I e III corados em Picrosirius com luz polarizada foi realizada leitura em três campos seguindo o trajeto da cicatriz, e ampliação de 400x.

### **3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados do percentual de colágeno I e de colágeno III foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos grupos em cada dia de eutanásia e comparação dos dias de eutanásia dentro de cada grupo em relação ao percentual de colágeno foi considerado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística.

Para verificar as diferenças significativas entre os grupos e dias foi utilizado o teste de Tukey.

Para todos os teste foi utilizado um nível de confiabilidade de 95%, ou seja, um nível de significância de 0,05.

Os dados foram analisados com o programa computacional Statgraphics Plus 5.1.

Para as lâminas coradas por Hematoxilina-Eosina (HE) utilizou-se a análise qualitativa por descrição histológica da epiderme, derme e tela subcutânea.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA POR HEMATOXILINA EOSINA (HE)

As lâminas coradas com HE forma avaliadas qualitativamente com microscopia óptica utilizando aumento de 40 e 400x.

A descrição da lâmina verifica o espessamento da epiderme, ausência ou presença de proliferação celular envolvidas no reparo, preservação de anexos da derme e cicatrização propriamente dita.

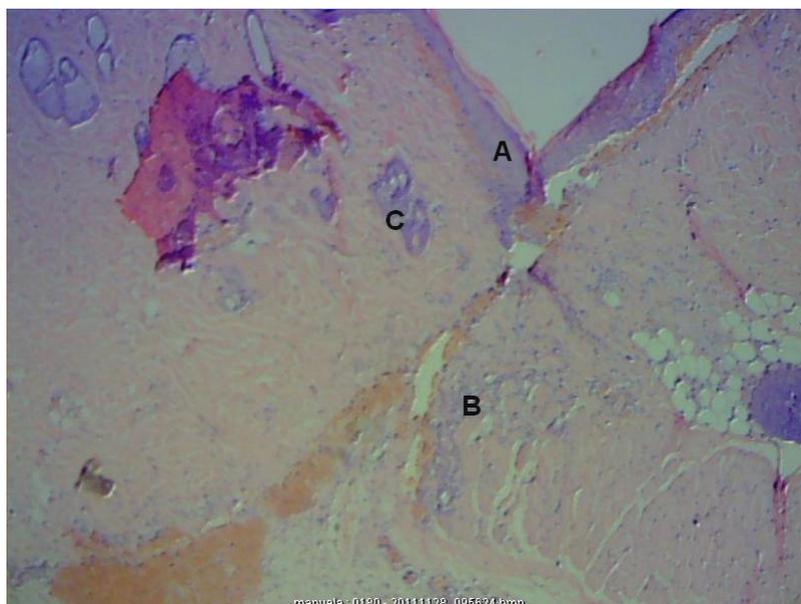


Figura 5 – Fotomicrografia do animal do Grupo Controle (G1), intensidade  $0,0W/cm^2$ , 3 dias de terapia ultrassônica de 3 MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. estrato córneo; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.

Animais do Grupo Controle (G1) demonstraram espessamento da epiderme, com maior número de células de necrose. Identificou-se presença de tecido de granulação em pequena quantidade nas bordas das incisões e observou-se pouca presença de anexos da derme na área incisional, conforme visualização na Figura 5.

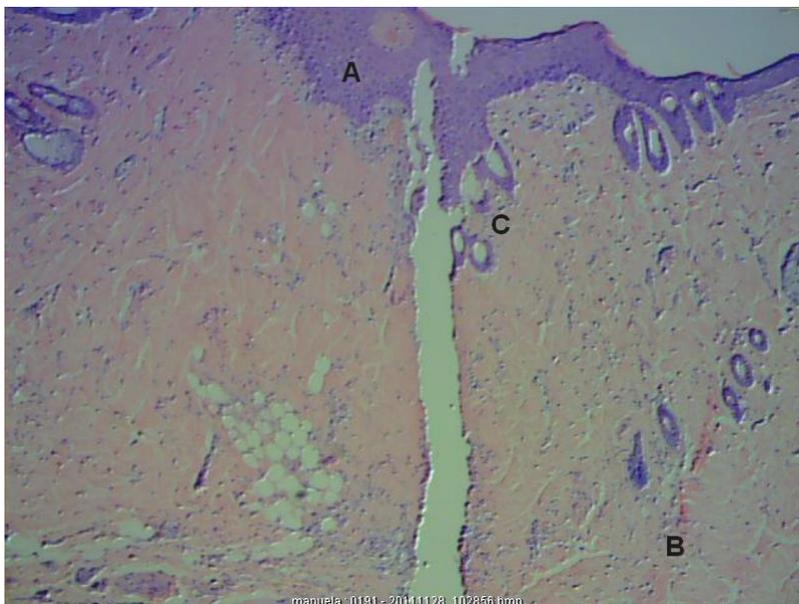


Figura 6 – Fotomicrografia do animal do Grupo Tópico de Calêndula (G2), por 5 minutos e 3 dias de aplicação. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina.

Nota: A. estrato córneo; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.

Nos animais do grupo que receberam apenas aplicação tópica do Gel de *Calendula officinallis* L. a 10% (G2), foi possível identificar espessamento da epiderme com grande quantidade de células necróticas, presença de tecido de granulação distal a área da incisão e pouca presença de anexos da derme na área cicatricial.(Figura 6)

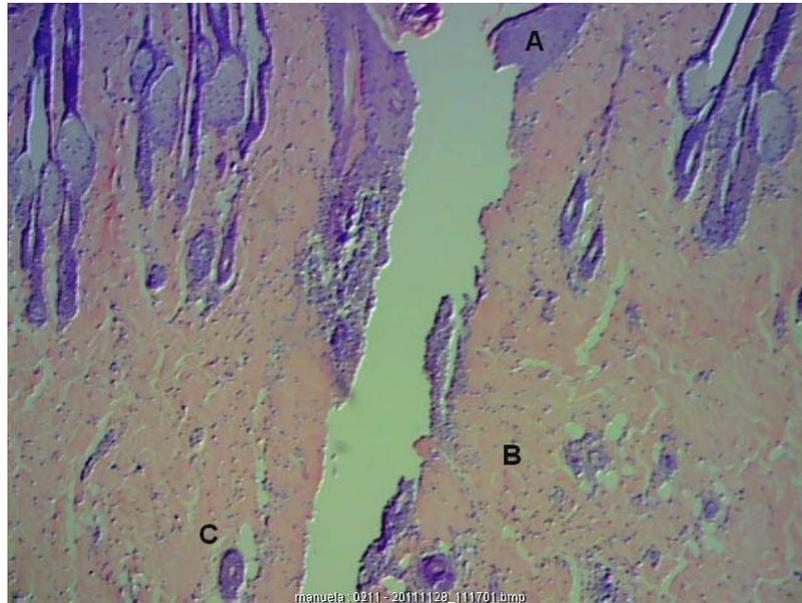


Figura 7 – Fotomicrografia do animal do Grupo tratado com Ultrassom e Gel à base de água (G3), intensidade  $0,5W/cm^2$ , 3 dias consecutivos de terapia ultrassônica de 3 MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. estrato córneo; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.

No 3º dia de tratamento para o grupo dos animais que receberam a aplicação de Ultrassom e Gel à base de água (G3), observou-se espessamento da epiderme, com formação de tecido de granulação na borda e áreas próximas a incisão, em maior quantidade que nos grupos descritos anteriormente; também pouca presença de anexos de derme.(Figura 7)

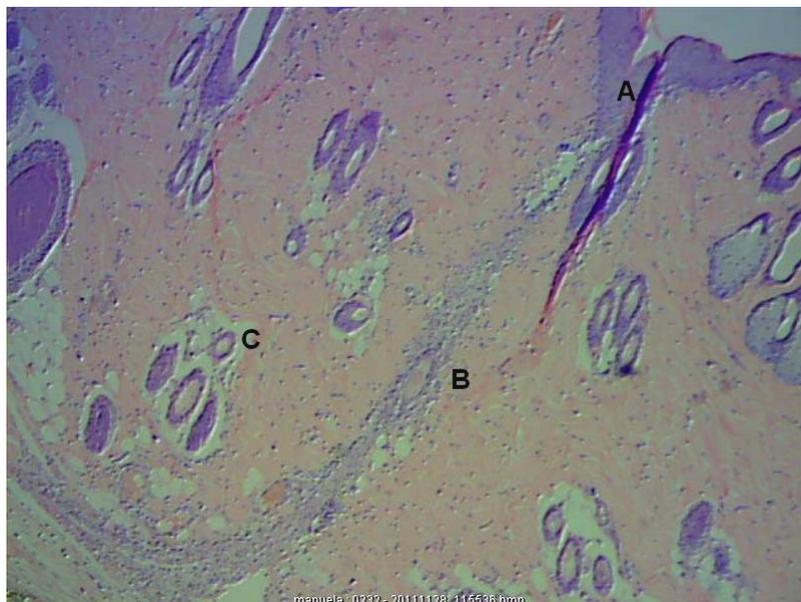


Figura 8 – Fotomicrografia do animal do Grupo tratado com Ultrassom associado ao Gel de Calêndula a 10% (G4), intensidade  $0,5W/cm^2$ , 3 dias consecutivos de terapia ultrassônica de 3MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. estrato córneo; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.

No grupo dos animais tratados com a associação do Ultrassom Terapêutico e o Gel de Calêndula a 10%, no 3º dia, identificou-se espessamento da epiderme na área incisional, com boa quantidade de tecido de granulação na borda e área próxima a incisão e maior presença de anexos da derme próximos a área de reparo.(Figura 8)

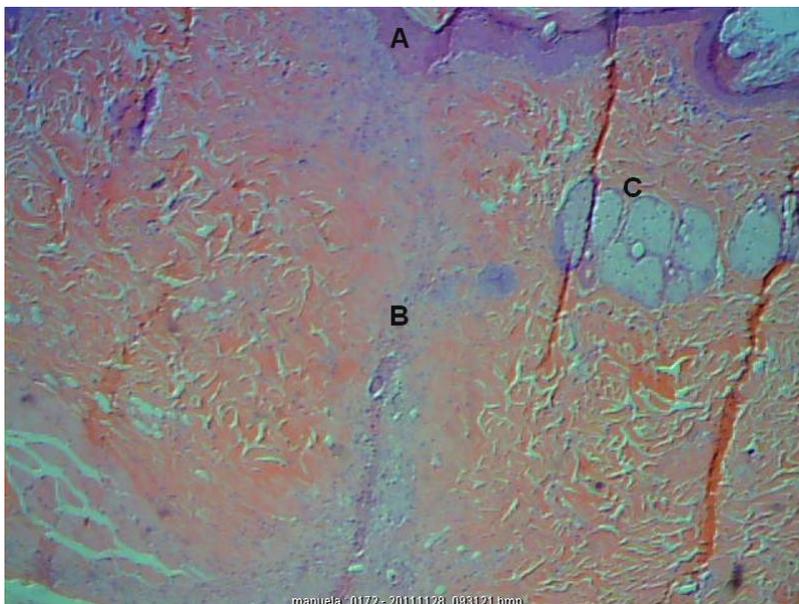


Figura 9 – Fotomicrografia do animal do Grupo Controle (G1), intensidade  $0,0W/cm^2$ , 7 dias de terapia ultrassônica de 3 MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. epiderme; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.

Nos animais pertencentes ao Grupo Controle (G1) com 7 dias de tratamento simulado, pode-se observar ainda o espessamento a epiderme com grande concentração de tecido de granulação na área da incisão. Identificou-se pouca presença de anexos da derme próximos a área citada. (Figura 9)

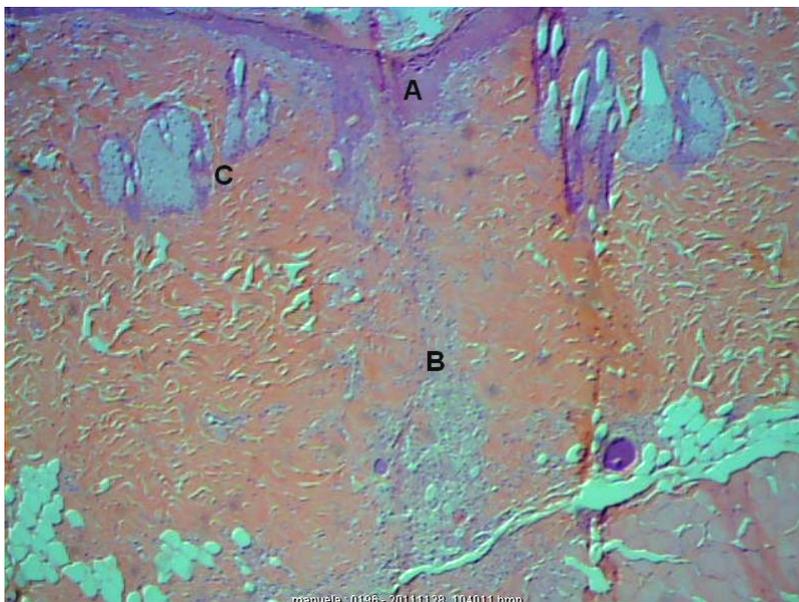


Figura 10 – Fotomicrografia do animal do Grupo Tópico de Calêndula (G2), por 5 minutos e 7 dias de aplicação. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina.

Nota: A. epiderme; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.

No grupo dos animais tratados topicamente com Gel de Calêndula a 10% (G2), por 7 dias consecutivos, identificou-se espessamento da epiderme, grande quantidade de tecido de granulação sobre a área da incisão e a presença de anexos da derme com alinhamento dos mesmos. (Figura 10)

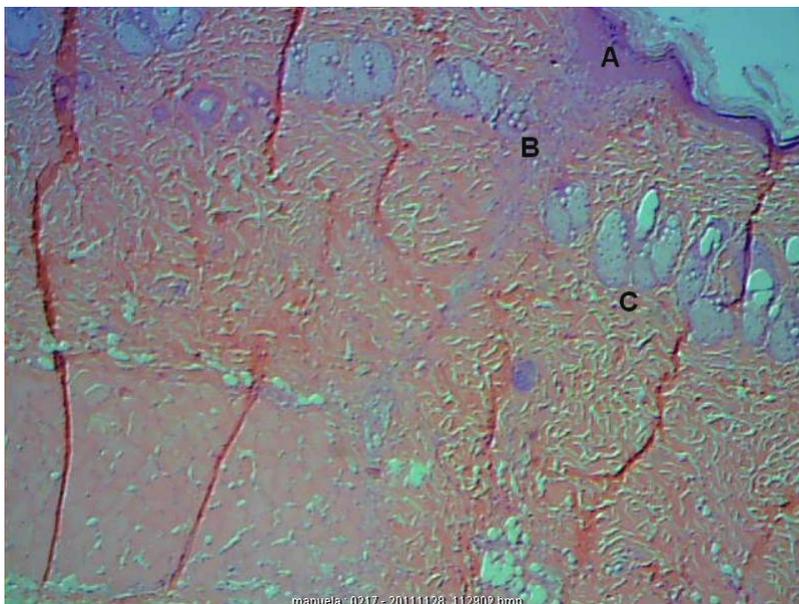


Figura 11 – Fotomicrografia do animal do Grupo tratado com Ultrassom e Gel à base de água (G3), intensidade  $0,5W/cm^2$ , 7 dias consecutivos de terapia ultrassônica de 3 MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. epiderme; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.

Observou-se menor espessamento da camada da epiderme, concentração de tecido de granulação na área da incisão com presença e maior organização dos anexos da derme, nos animais do Grupo tratado com Ultrassom e Gel à base de água (G3), que receberam o protocolo por 7 dias consecutivos. (Figura 11)

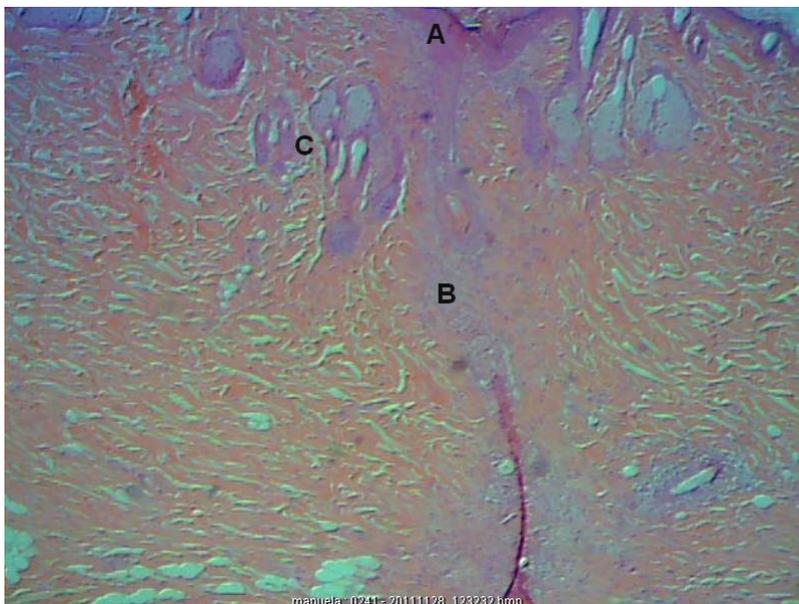


Figura 12 – Fotomicrografia do animal do Grupo tratado com Ultrassom associado ao Gel de Calêndula a 10% (G4), intensidade  $0,5W/cm^2$ , 7 dias consecutivos de terapia ultrassônica de 3MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A. epiderme; B. tecido de granulação; C. anexos dérmicos.

No Grupo dos animais tratados com Ultrassom associado ao Gel de Calêndula a 10% (G4) durante 7 dias, com ficou evidente menor espessamento da camada da epiderme, maior concentração de tecido de granulação na área da cicatriz, e já com presença dos anexos da derme, porém com menor organização dos mesmos. (Figura 12)

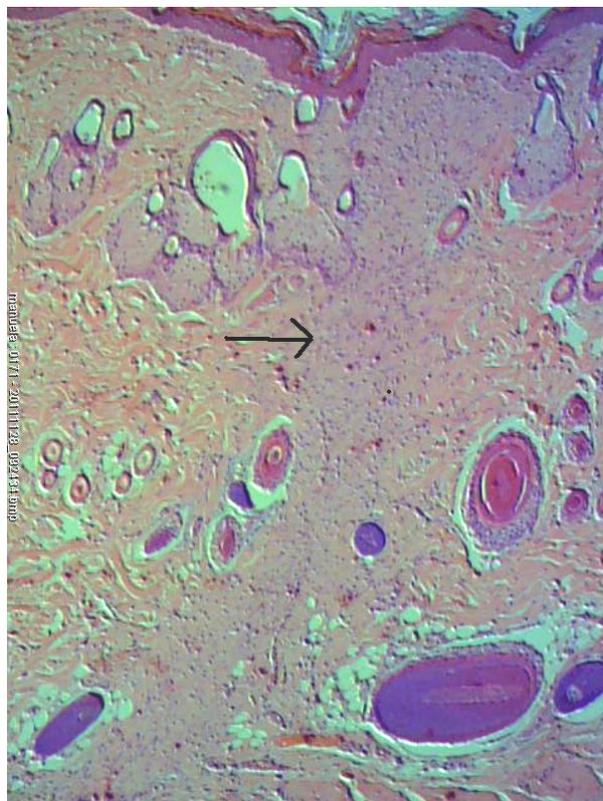


Figura 13 – Fotomicrografia do animal do Grupo Controle (G1), intensidade  $0,0W/cm^2$ , 21 dias de terapia ultrassônica de 3 MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A seta indica área de reparação tecidual.

Todos os animais do Grupo Controle (G1), no 21º dia de tratamento apresentaram o mesmo padrão de reparação tecidual. Foi possível observar a reorganização da epiderme e da derme, tecido de granulação disperso e grande quantidade de anexos próximos a área regenerada. (Figura 13)

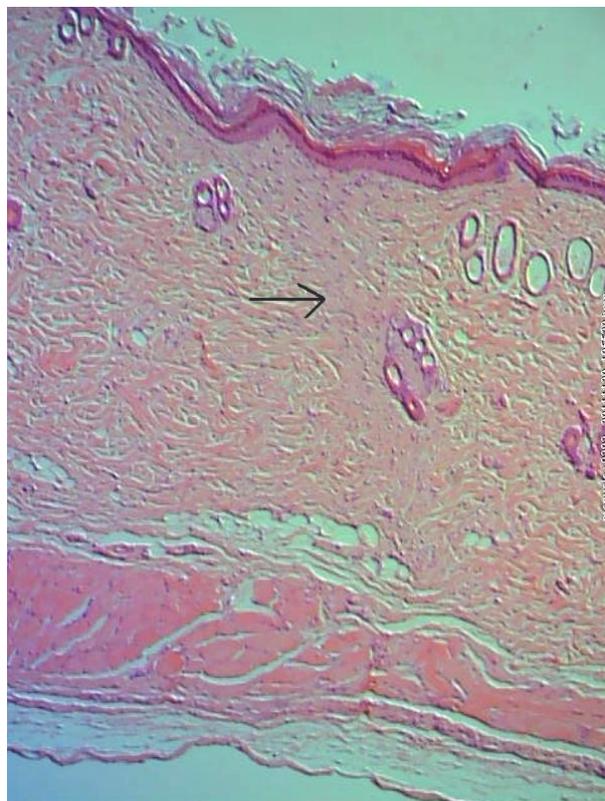


Figura 14 – Fotomicrografia do animal do Grupo Tópico de Calêndula (G2), por 5 minutos e 21 dias de aplicação. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina.

Nota: A seta indica área de reparação tecidual.

Nos animais do Grupo Tópico de *Calendula officinalis* L. (G2), todos apresentaram o mesmo padrão de reparação tecidual, após 21 dias. Foi possível observar a reorganização da epiderme e da derme, tecido de granulação disperso e menor quantidade de anexos próximos a área cicatrizada. (Figura 14)

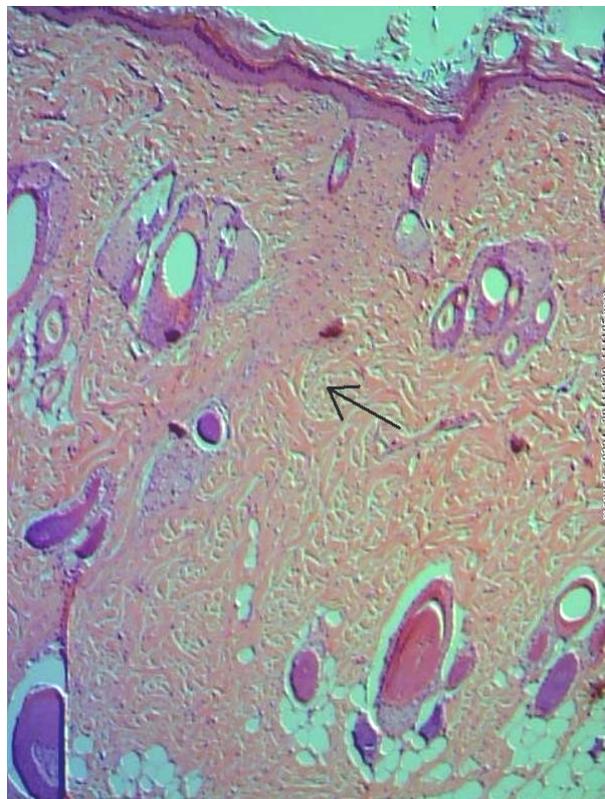


Figura 15 – Fotomicrografia do animal do Grupo tratado com Ultrassom e Gel a base de água (G3), intensidade  $0,5W/cm^2$ , 21 dias consecutivos de terapia ultrassônica de 3 MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A seta indica área de reparação tecidual.

Todos os animais do Grupo tratado com Ultrassom Terapêutico e Gel a base de água (G3) demonstraram o mesmo padrão de reparação tecidual, após 21 dias consecutivos de aplicação do protocolo. Identificou-se a reorganização da epiderme e da derme, tecido de granulação disperso e maior quantidade de anexos dérmicos próximos a área regenerada.(Figura 15)

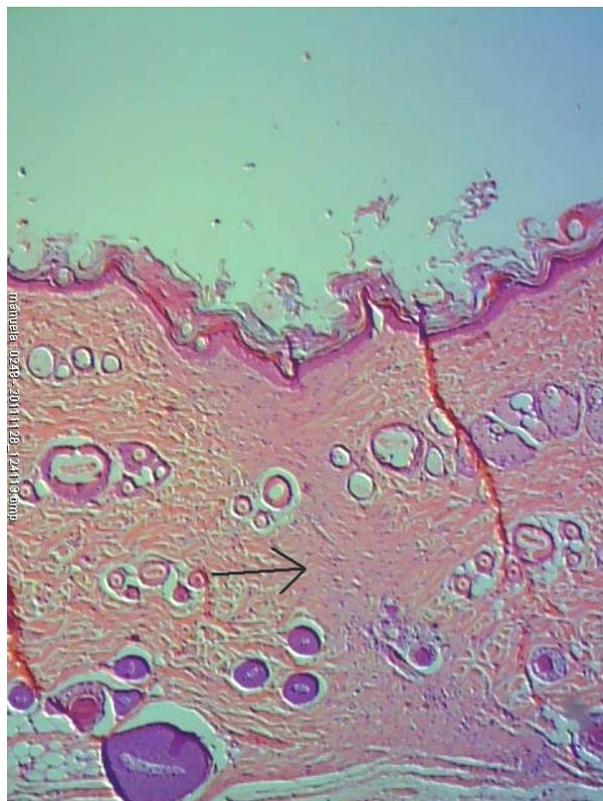


Figura 16 – Fotomicrografia do animal do Grupo tratado com Ultrassom associado ao Gel de Calêndula a 10% (G4), intensidade  $0,5W/cm^2$ , 21 dias consecutivos de terapia ultrassônica de 3MHz. Vista panorâmica, microscopia óptica, aumento de 40x. Coloração Hematoxilina Eosina. Nota: A seta indica área de reparação tecidual.

Observou-se em todos os animais do Grupo tratado com Ultrassom Terapêutico associado ao Gel de *Calendula officinalis* L. a 10% (G4), tratados por 21 dias consecutivos, o mesmo padrão de reparação tecidual. Foi possível observar e identificar maior reorganização da epiderme e da derme, tecido de granulação disperso e grande quantidade de anexos próximos a área cicatrizada.(Figura 16)

## 4.2 RESULTADOS PARA COLÁGENOS I E III

### 4.2.1 Colágeno Conforme o Dia

Sendo Med a mediana populacional da porcentagem de colágeno para cada GRUPO e os índices 1, 2, 3 e 4 identificando o grupo G1, G2, G3 e G4, respectivamente, a hipótese testada foi:

H0: Med1 = Med2 = Med3 = Med4

H1: Med1 ≠ Med2 ≠ Med3 ≠ Med4

Ou seja:

H0: As medianas são iguais para todos os grupos dentro de um determinado dia

H1: A mediana é diferente para pelo menos um dos grupos dentro de um determinado dia.

As tabelas apresentadas a seguir são para o Colágeno I. Para o Colágeno III os resultados de P-Valor serão os mesmos, visto que os valores de Colágeno I e Colágeno III são complementares, ou seja, somados dão o total de 100%. Neste caso o desvio-padrão será o mesmo para os dois grupos e a média será complementar, chegando a uma mesma conclusão nos testes aplicados.

Para o 3º dia não foi possível calcular a estatística de teste devido a não haver variação alguma na amostra, como demonstrado nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada grupo no 3º dia.

Grupo	Tamanho da amostra	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
G1	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2	7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G3	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G4	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 3 - Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no 3º dia.

<b>Grupo</b>	<b>Tamanho da amostra</b>	<b>Média dos postos</b>	<b>P-Valor</b>
<b>G1</b>	6	Não é possível calcular devido à todos os valores serem iguais	
<b>G2</b>	7		
<b>G3</b>	8		
<b>G4</b>	8		

Para o 7º dia, pelo teste de Kruskal-Wallis obtém-se um P-Valor de 0,71, maior que 0,05 e, portanto, não há evidências para rejeitar a hipótese nula. Conclui-se, com um nível de significância de 5%, que não há diferença entre os grupos no 7º dia (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada grupo no 7º dia.

<b>Grupo</b>	<b>Tamanho da amostra</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>G1</b>	7	13,83	14,27	9,20	2,18	26,03
<b>G2</b>	7	17,76	16,72	9,29	3,47	32,01
<b>G3</b>	8	13,89	13,83	5,64	6,78	21,82
<b>G4</b>	8	13,47	12,97	5,15	6,22	20,74
<b>Total</b>	30	14,67	14,82	7,25	2,18	32,01

Tabela 5 - Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no 7º dia.

<b>Grupo</b>	<b>Tamanho da amostra</b>	<b>Mediana</b>	<b>P-Valor</b>
<b>G1</b>	7	14,27	0,71
<b>G2</b>	7	16,72	
<b>G3</b>	8	13,83	
<b>G4</b>	8	12,97	

Para o 21º dia, pelo teste de Kruskal-Wallis obtém-se um P-Valor de 0,65, maior que 0,05 e, portanto, não há evidências para rejeitar a hipótese nula. Conclui-se, com um nível de significância de 5%, que não há diferença entre os grupos no 21º dia, conforme Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada grupo no 21º dia.

Grupo	Tamanho da amostra	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
G1	7	30,14	32,54	8,31	17,75	42,59
G2	7	25,75	27,68	10,43	4,12	36,38
G3	8	27,00	29,88	6,71	12,36	33,49
G4	8	31,42	30,20	5,51	25,05	44,20
<b>Total</b>	30	28,62	30,09	7,77	4,12	44,20

Tabela 7 - Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no 21º dia.

Grupo	Tamanho da amostra	Mediana	P-Valor
G1	7	17,43	0,65
G2	7	13,00	
G3	8	13,88	
G4	8	17,63	

#### 4.2.2 Colágeno Conforme o Grupo

Sendo Med a mediana populacional da porcentagem de colágeno para cada dia e os índices 3, 7 e 21 identificando o 3º dia de eutanásia, o 7º dia e o 21º dia de eutanásia, respectivamente, a hipótese testada foi:

$$H_0: Med_3 = Med_7 = Med_{21}$$

$$H_1: Med_3 \neq Med_7 \neq Med_{21}$$

Ou seja:

H<sub>0</sub>: As medianas são iguais para todos os dias dentro de um determinado grupo

H<sub>1</sub>: A mediana é diferente para pelo menos um dos dias dentro de um determinado grupo

Para o grupo G1, pelo teste de Kruskal-Wallis obtém-se um P-Valor menor que 0,001, ou seja, menor que 0,05 e, portanto, há evidências para rejeitar a hipótese nula. Conclui-se, com um nível de significância de 5%, que há diferença entre os dias no grupo G1, como pode-se visualizar nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada dia no Grupo 1.

<b>Eutanásia</b>	<b>Tamanho da amostra</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>3º dia</b>	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>7º dia</b>	7	13,83	14,27	9,20	2,18	26,03
<b>21º dia</b>	7	30,14	32,54	8,31	17,75	42,59
<b>Total</b>	20	15,39	15,08	14,30	0,00	42,59

Tabela 9 - Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 1.

<b>Grupo</b>	<b>Tamanho da amostra</b>	<b>Mediana</b>	<b>P-Valor</b>
<b>3º dia</b>	6	3,50	<0,001
<b>7º dia</b>	7	10,57	
<b>21º dia</b>	7	16,43	

O teste de Tukey identifica as diferenças significativas, com um nível de significância de 5%. Observa-se que há diferenças significativas entre todos os dias, sendo com maior valor o 21º dia, de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10 - Teste de Tukey para porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 1.

<b>Dia</b>	<b>Média</b>	<b>Grupo Homogêneos</b>
<b>3º dia</b>	0,00	A
<b>7º dia</b>	13,83	B
<b>21º dia</b>	30,14	C

\* Médias seguidas de uma mesma letra não diferem conforme teste de Tukey com 5% de significância

<b>Contraste</b>	<b>Diferença</b>	<b>Limite</b>
<b>3º dia - 7º dia*</b>	13,83	10,52
<b>3º dia - 21º dia*</b>	30,14	10,52
<b>7º dia - 21º dia*</b>	16,32	10,11

\* indica uma diferença significativa

Para o grupo G2, pelo teste de Kruskal-Wallis obtém-se um P-Valor menor que 0,001, ou seja, menor que 0,05 e, portanto, há evidências para rejeitar a hipótese nula. Pelas tabelas 11 e 12, conclui-se, com um nível de significância de 5%, que há diferença entre os dias no grupo G2.

Tabela 11 - Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada dia no Grupo 2.

<b>Eutanásia</b>	<b>Tamanho da amostra</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>3º dia</b>	7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>7º dia</b>	7	17,76	16,72	9,29	3,47	32,01
<b>21º dia</b>	7	25,75	27,68	10,43	4,12	36,38
<b>Total</b>	21	14,50	14,57	13,42	0,00	36,38

Tabela 12 - Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 2.

<b>Grupo</b>	<b>Tamanho da amostra</b>	<b>Mediana</b>	<b>P-Valor</b>
<b>3º dia</b>	7	0,00	<0,001
<b>7º dia</b>	7	16,72	
<b>21º dia</b>	7	27,68	

O teste de Tukey identifica as diferenças significativas, com um nível de significância de 5%. Observa-se, na Tabela 13, que há diferenças significativas entre o 3º dia e os demais, porém entre o 7º dia e o 21º dia não há diferenças significativas.

Tabela 13 - Teste de Tukey para porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 2.

<b>Dia</b>	<b>Média</b>	<b>Grupo Homogêneos</b>
<b>3º dia</b>	0,00	a
<b>7º dia</b>	17,76	b
<b>21º dia</b>	25,75	b

\* Médias seguidas de uma mesma letra não diferem conforme teste de Tukey com 5% de significância

<b>Contraste</b>	<b>Diferença</b>	<b>Limite</b>
<b>3º dia - 7º dia*</b>	17,76	11,01
<b>3º dia - 21º dia*</b>	25,75	11,01
<b>7º dia - 21º dia</b>	7,99	11,01

\* indica uma diferença significativa

Para o grupo G3, pelo teste de Kruskal-Wallis obtem-se um P-Valor menor que 0,001, ou seja, menor que 0,05 e, portanto, há evidências para rejeitar a hipótese nula. Conclui-se, com um nível de significância de 5%, que há diferença entre os dias no grupo G3 (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14 - Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada dia no Grupo 3.

<b>Eutanásia</b>	<b>Tamanho da amostra</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>3º dia</b>	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>7º dia</b>	8	13,89	13,83	5,64	6,78	21,82
<b>21º dia</b>	8	27,00	29,88	6,71	12,36	33,49
<b>Total</b>	24	13,63	11,60	12,26	0,00	33,49

Tabela 15 - Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 3.

<b>Grupo</b>	<b>Tamanho da amostra</b>	<b>Mediana</b>	<b>P-Valor</b>
<b>3º dia</b>	8	0,00	<0,001
<b>7º dia</b>	8	13,83	
<b>21º dia</b>	8	29,88	

O teste de Tukey identifica as diferenças significativas, com um nível de significância de 5%. Na Tabela 16, observa-se que existem diferenças significativas entre todos os dias, sendo com maior valor o 21º dia.

Tabela 16 - Teste de Tukey para porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 3.

<b>Dia</b>	<b>Média</b>	<b>Grupo Homogêneos</b>
<b>3º dia</b>	0,00	a
<b>7º dia</b>	13,89	b
<b>21º dia</b>	27,00	c

\* médias seguidas de uma mesma letra não diferem conforme teste de Tukey com 5% de significância

<b>Contraste</b>	<b>Diferença</b>	<b>Limite</b>
<b>3º dia - 7º dia*</b>	13,89	6,38
<b>3º dia - 21º dia*</b>	27,00	6,38
<b>7º dia - 21º dia*</b>	13,11	6,38

\* indica uma diferença significativa

Para o grupo G4, pelo teste de Kruskal-Wallis, obteve-se um P-Valor menor que 0,001, ou seja, menor que 0,05 e, portanto, há evidências para rejeitar a hipótese nula. Conclui-se, com um nível de significância de 5%, que há diferença entre os dias no grupo G4, de acordo com as Tabelas 17 e 18.

Tabela 17 - Estatísticas descritivas para a porcentagem de colágeno tipo I em cada dia no grupo 4.

<b>Eutanásia</b>	<b>Tamanho da amostra</b>	<b>Média</b>	<b>Mediana</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>3º dia</b>	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>7º dia</b>	8	13,47	12,97	5,15	6,22	20,74
<b>21º dia</b>	8	31,42	30,20	5,51	25,05	44,20
<b>Total</b>	24	14,96	12,97	13,79	0,00	44,20

Tabela 18 - Teste de Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 4.

<b>Grupo</b>	<b>Tamanho da amostra</b>	<b>Mediana</b>	<b>P-Valor</b>
<b>3º dia</b>	8	0,00	<0,001
<b>7º dia</b>	8	12,97	
<b>21º dia</b>	8	30,20	

O teste de Tukey identifica as diferenças significativas, com um nível de significância de 5%. Observa-se que há diferenças significativas entre todos os dias, sendo o com maior valor o 21º dia, conforme Tabela 19.

Tabela 19 - Teste de Tukey para porcentagem de colágeno tipo I no Grupo 4.

<b>Dia</b>	<b>Média</b>	<b>Grupo Homogêneos</b>
<b>3º dia</b>	0,00	a
<b>7º dia</b>	13,47	b
<b>21º dia</b>	31,42	c

**\* Médias seguidas de uma mesma letra não diferem conforme teste de Tukey com 5% de significância**

<b>Contraste</b>	<b>Diferença</b>	<b>Limite</b>
<b>3º dia - 7º dia*</b>	13,47	5,49
<b>3º dia - 21º dia*</b>	31,42	5,49
<b>7º dia - 21º dia*</b>	17,95	5,49

**\* indica uma diferença significativa**

#### 4.2.3 Resumos

Abaixo as tabelas-resumos para todos os testes de comparações, nestes casos, utilizando o teste de Kruskal-Wallis.

As estatísticas descritivas de cada um dos grupos, dias e tipo de colágeno, são apresentadas a seguir, conforme Tabelas 20 e 21.

Tabela 20 - Estatística descritiva para o colágeno I.

Grupo	Eutanásia	n	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
<b>G1</b>	3º dia	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	7º dia	7	13,83	14,27	9,20	2,18	26,03
	21º dia	7	30,14	32,54	8,31	17,75	42,59
<b>G2</b>	3º dia	7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	7º dia	7	17,76	16,72	9,29	3,47	32,01
	21º dia	7	25,75	27,68	10,43	4,12	36,38
<b>G3</b>	3º dia	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	7º dia	8	13,89	13,83	5,64	6,78	21,82
	21º dia	8	27,00	29,88	6,71	12,36	33,49
<b>G4</b>	3º dia	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	7º dia	8	13,47	12,97	5,15	6,22	20,74
	21º dia	8	31,42	30,20	5,51	25,05	44,20

Tabela 21 - Estatística descritiva para o colágeno III.

Grupo	Eutanásia	n	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
<b>G1</b>	3º dia	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	7º dia	7	86,17	85,73	9,20	73,97	97,82
	21º dia	7	69,86	67,46	8,31	57,41	82,25
<b>G2</b>	3º dia	7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	7º dia	7	82,24	83,28	9,29	67,99	96,53
	21º dia	7	74,25	72,32	10,43	63,62	95,88
<b>G3</b>	3º dia	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	7º dia	8	86,11	86,17	5,64	78,18	93,22
	21º dia	8	73,00	70,12	6,71	66,51	87,64
<b>G4</b>	3º dia	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	7º dia	8	86,53	87,03	5,15	79,26	93,78
	21º dia	8	68,58	69,80	5,51	55,80	74,95

Comparações entre os grupos para cada um dos dias. Todos os p-valores estão acima de 0,05, portanto não há evidências para rejeitar a hipótese de que todos possuem a mesma mediana. Atenção ao 3º dia, em que não há variação, portanto, não é possível o cálculo da estatística de teste. Todos os valores são

iguais, o que leva a concluir que todos os grupos possuem a mesma mediana, como se visualiza na Tabela 22.

Tabela 22 - P-Valor para o teste de Kruskal-Wallis comparando os grupos (G1 x G2 x G3 x G4).

<b>Dia de eutanásia</b>	<b>P-Valor</b>
<b>3º dia</b>	*
<b>7º dia</b>	0,710
<b>21º dia</b>	0,650

Na Tabela 23 estão demonstradas as comparações entre os dias dentro de cada grupo. Todos os valores estão abaixo de 0,05, portanto há evidências para rejeitar a hipótese de que todas as medianas são iguais, pois uma difere das demais.

Tabela 23 - P-Valor para o teste de Kruskal-Wallis comparando os dias de eutanásia.

<b>Grupo</b>	<b>P-Valor</b>
<b>G1</b>	<0,001
<b>G2</b>	<0,001
<b>G3</b>	<0,001
<b>G4</b>	<0,001

Calculando a estatística de teste para cada um dos pares também obteve-se p-valores abaixo de 0,05 (com exceção do par abaixo indicado), ou seja, rejeitou-se a hipótese de que as medianas seriam iguais para todos os pares de dias.

Existem diferenças significativas para cada um dos pares de dias de eutanásia dentro de cada um dos grupos.

A exceção é a diferença entre o 7º dia e o 21º dia para o grupo 2. Neste caso não houve diferença significativa, confirmando o resultado encontrado no teste de Tukey, conforme Tabela 24.

Tabela 24 - P-Valor para o teste de Kruskal-Wallis da comparação entre os grupos dois-a-dois.

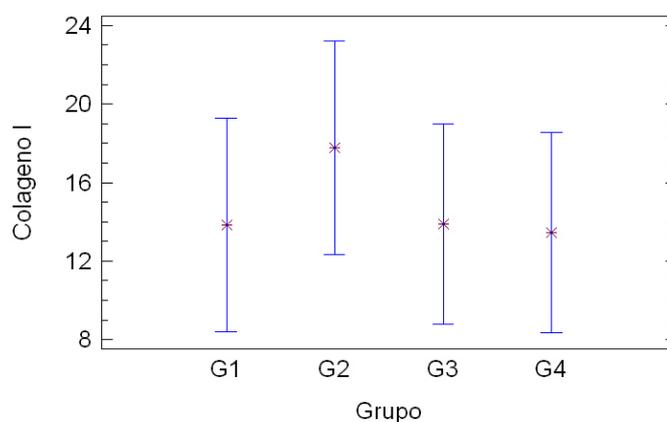
Grupo	Dias comparados	Valor de p
<b>G1</b>	3 <sup>o</sup> x 7 <sup>o</sup>	0,002
	3 <sup>o</sup> x 21 <sup>o</sup>	0,002
	7 <sup>o</sup> x 21 <sup>o</sup>	0,009
<b>G2</b>	3 <sup>o</sup> x 7 <sup>o</sup>	<0,001
	3 <sup>o</sup> x 21 <sup>o</sup>	<0,001
	7 <sup>o</sup> x 21 <sup>o</sup>	0,085
<b>G3</b>	3 <sup>o</sup> x 7 <sup>o</sup>	<0,001
	3 <sup>o</sup> x 21 <sup>o</sup>	<0,001
	7 <sup>o</sup> x 21 <sup>o</sup>	0,003
<b>G4</b>	3 <sup>o</sup> x 7 <sup>o</sup>	<0,001
	3 <sup>o</sup> x 21 <sup>o</sup>	<0,001
	7 <sup>o</sup> x 21 <sup>o</sup>	<0,001

#### 4.2.4 Análise Gráfica

A análise gráfica através do intervalo de Tukey com 95% de confiabilidade informa os mesmos resultados obtidos anteriormente.

Para o 3<sup>o</sup> dia todo o gráfico será de valores 0.

Para o 7<sup>o</sup> dia observou-se que os intervalos se sobrepõem, indicando que não há diferenças significativas (Gráfico 1).

Gráfico 1- Intervalo de Tukey para média do 7<sup>o</sup> dia.

Para o 21º dia também observou-se que os intervalos se sobrepõem, indicando que não há diferenças (Gráfico 2).

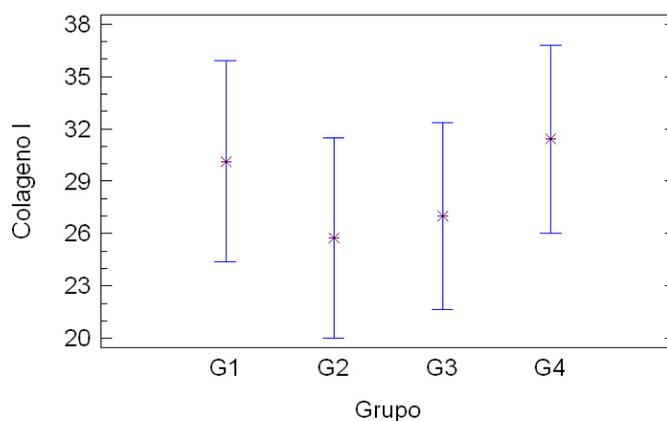


Gráfico 2 - Intervalo de Tukey para média do 21º dia.

Para o grupo G1 os intervalos não se sobrepõem, indicando diferenças entre os dias. O mesmo se repete para os grupos G3 e G4 (Gráficos 3, 4 e 5).

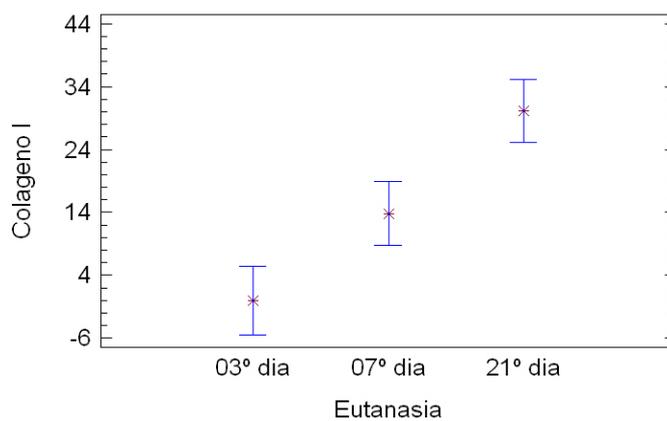


Gráfico 3 - Intervalo de Turkey para média do Grupo G1.

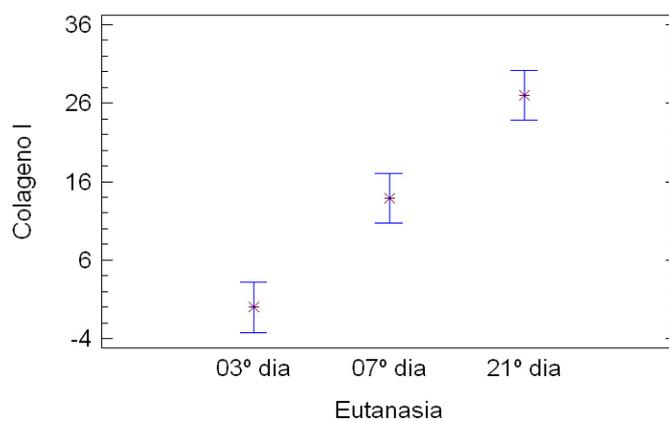


Gráfico 4 - Intervalo de Tukey para média do Grupo G3.

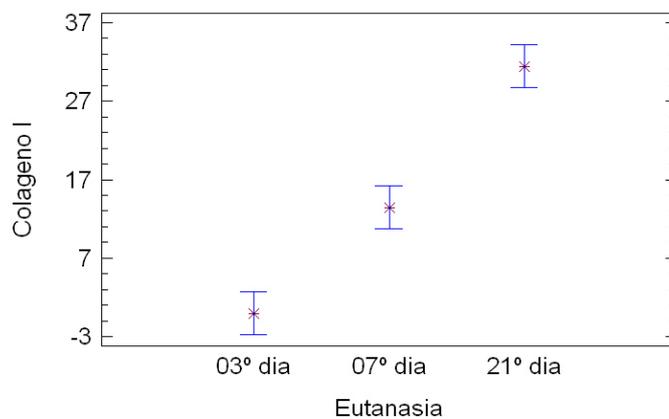


Gráfico 5 - Intervalo de Tukey para média do Grupo G4.

Para o grupo G2 os intervalos do 7º e 21º dia se sobrepõem, indicando que não existem diferenças significativas entre a quantidade de colágeno I entre estes dias (Gráfico 6).

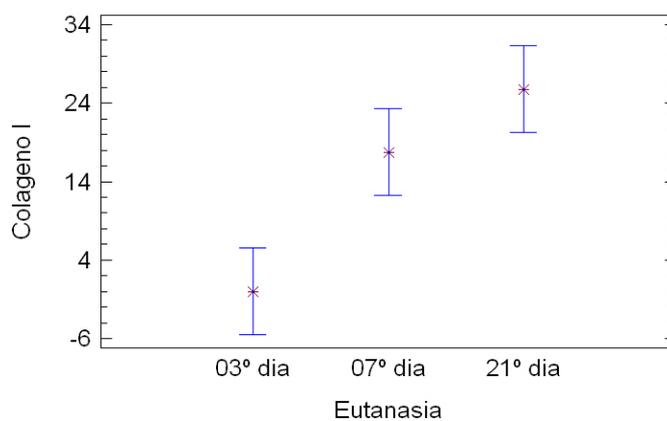


Gráfico 6 - Intervalo de Tukey para média do Grupo G2.

Pelo diagrama de pontos observou-se onde os valores se acumulam e os valores que saem do padrão (out-liers).

Para o 7º dia observou-se que os pontos se espalham e a distribuição é muito semelhante para todos os grupos (Gráfico 7).

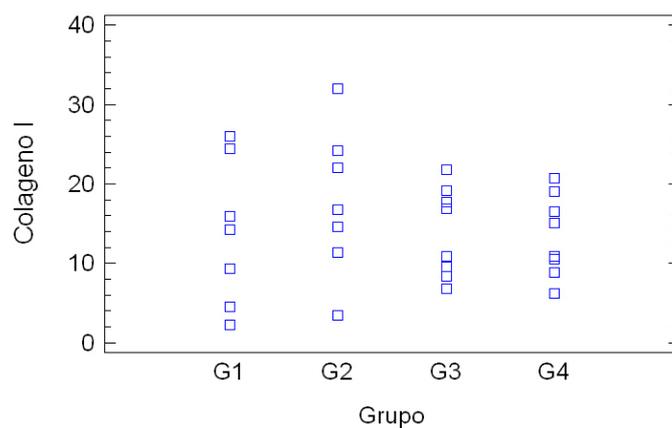


Gráfico 7 - Diagrama de pontos para o 7º dia.

Para o 21º dia as distribuições dos tempos em cada grupos também são parecidas e se agrupam entre os valores 20% e 30%, indicando também que não há diferenças (Gráfico 8).

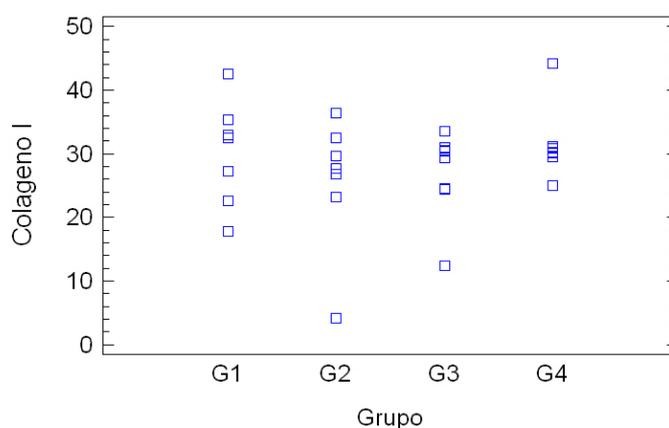


Gráfico 8 - Diagrama de pontos para o 21º dia.

Para o grupo G1, observa-se que no 3º dia somente há valores iguais a 0. Entre o 7º e o 21º dia há a diferença de agrupamento dos valores, sendo que o 7º dia tende a se agrupar em valores mais baixo e o 21º dia tende a se agrupar nos valores mais altos. Tal configuração também é observada nos demais grupos (Gráficos 9, 10, 11 e 12).

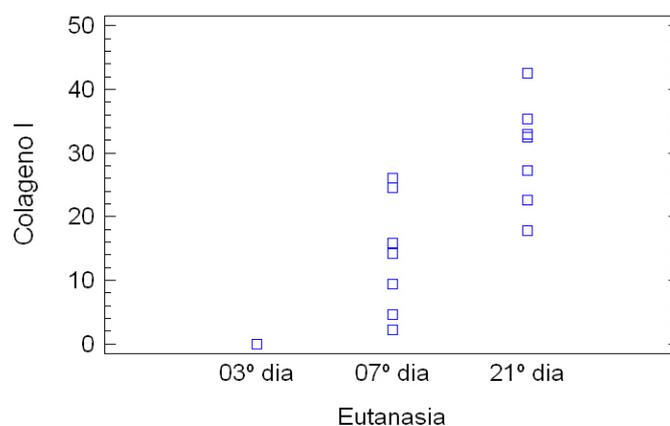


Gráfico 9 - Diagrama de pontos para o Grupo G1.

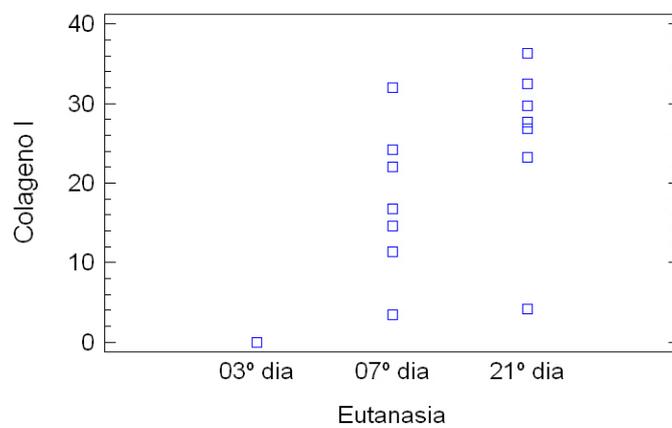


Gráfico 10 - Diagrama de pontos para o Grupo G2.

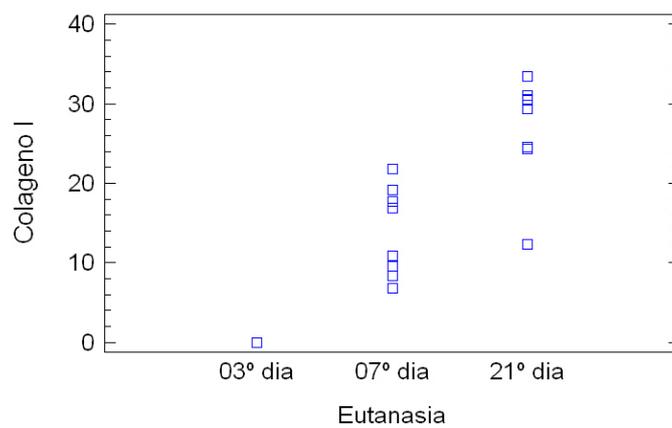


Gráfico 11 - Diagrama de pontos para o Grupo G3.

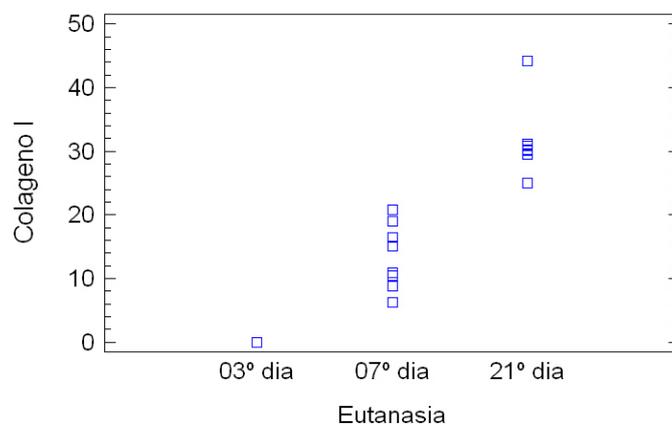


Gráfico 12 - Diagrama de pontos para o Grupo G4.

Os gráficos Box-plot abaixo (13,14,15,16,17e18) confirmam todas as informações anteriores. A caixa indica onde os valores estão acumulados (50% dos valores estão entre os limites da caixa). Os pontos extremos são chamados de outliers e sugere-se que sejam investigados, pois, caso sejam erros, tendem a influenciar negativamente no resultado final.

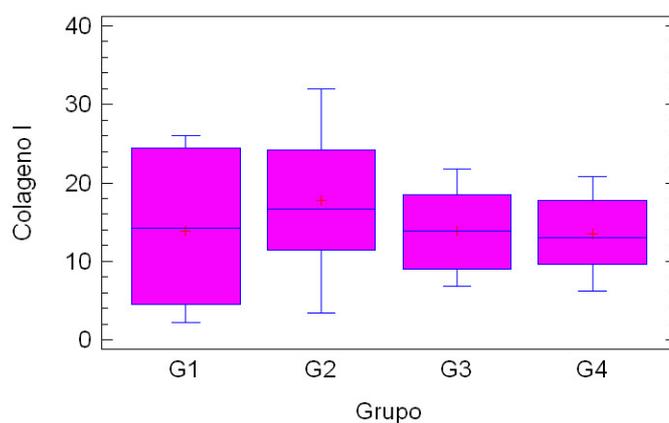


Gráfico 13 - Box-plot para o 7º dia.

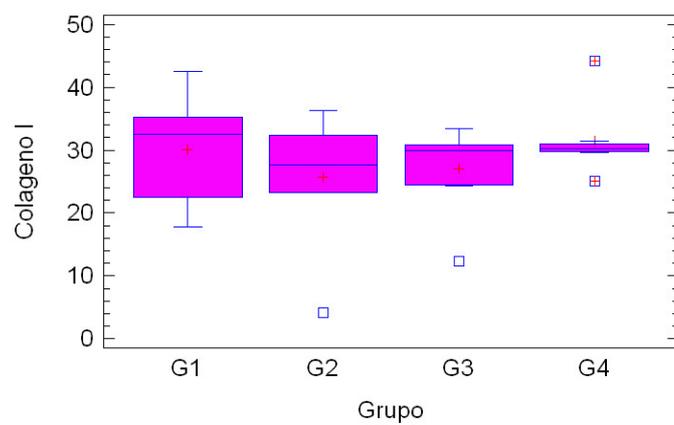


Gráfico 14 - Box-plot para o 21° dia.

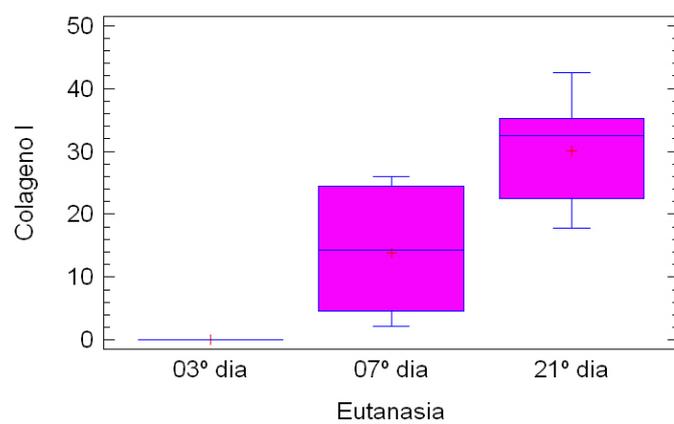


Gráfico 15 - Box-plot para o Grupo G1.

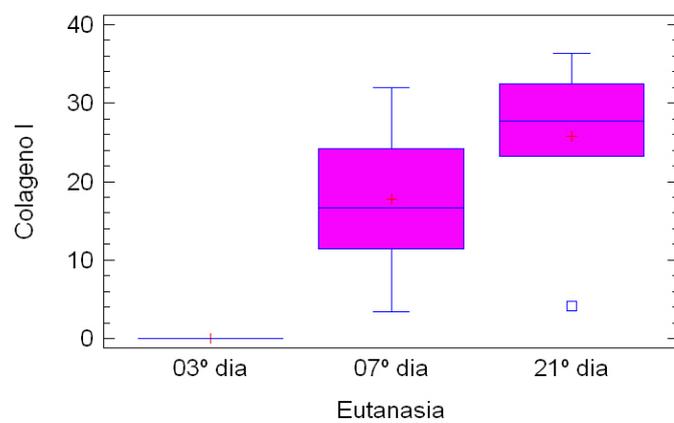


Gráfico 16 - Box-plot para o Grupo G2.

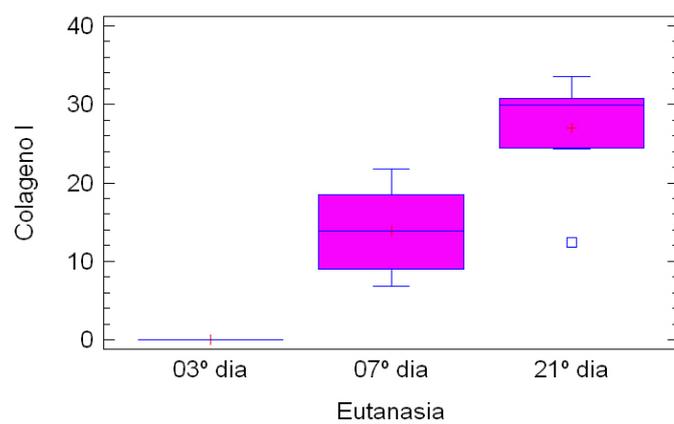


Gráfico 17 - Box-plot para o Grupo G3.

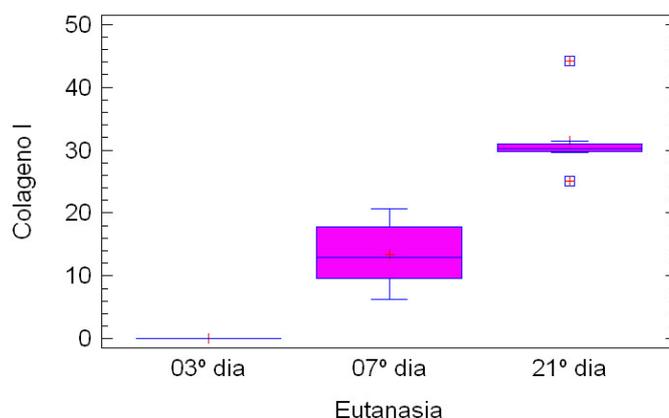


Gráfico 18 - Box-plot para o Grupo G4.

Nos gráficos a seguir cada linha representa um grupo e o eixo horizontal representa os dias. Nota-se que os valores não diferem tanto entre os grupos (as linhas estão coincidindo) e crescem ao passar dos dias (Gráfico 19).

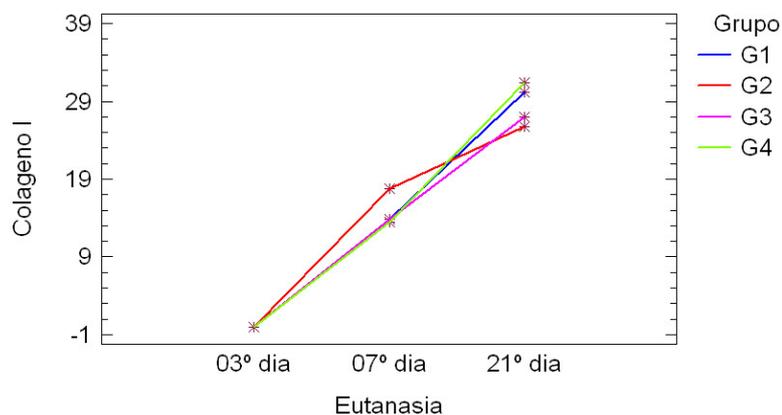


Gráfico 19 - Médias para o Colágeno I por dia de eutanásia.

No colágeno III observa-se a mesma coincidência de valores entre os grupos, porém no 7º dia o valor de colágeno é maior que o do 21º dia, conforme visualização no Gráfico 20.

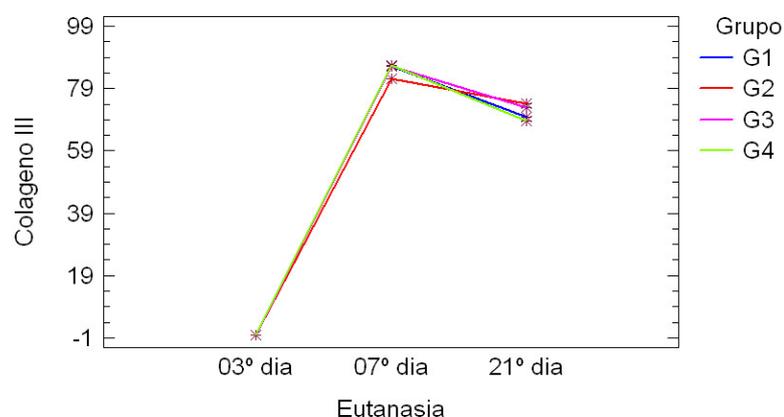


Gráfico 20 - Médias para o Colágeno III por dia de eutanásia.

No gráfico onde cada linha representa um dos dias e o eixo horizontal representa os grupos observa-se a diferença entre cada um dos dias (as linhas são afastadas uma das outras). As linhas de cada dia quase na horizontal indicam que não há grandes diferenças entre os grupos (as médias são parecidas). Nota-se também a aproximação dos pontos do grupo G2 para os dias 7 e 21.

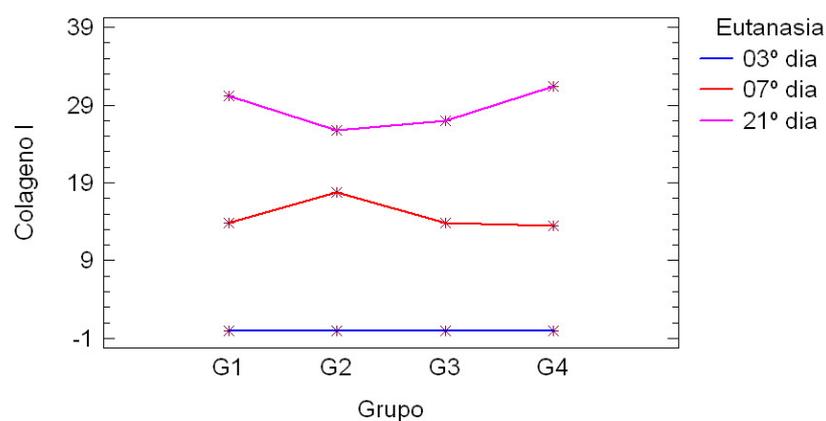


Gráfico 21- Médias para o Colágeno I por grupo.

Para o colágeno III observa-se também os mesmos comportamentos, com as linhas afastadas e quase horizontais, porém a linha superior (com maiores médias)

neste caso é a do 7º dia. Também há a aproximação os pontos do 7º dia e do 21º dia para o grupo 2.

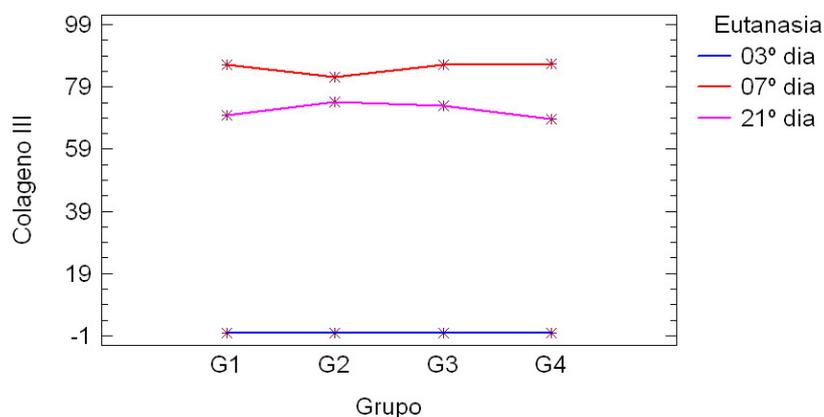


Gráfico 22 - Médias para o Colágeno III por grupo.

#### 4.2.5 Análise Estatística após a retirada de *Outliers*

Os resultados do percentual de colágeno I e de colágeno III foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Os dados foram submetidos previamente a uma análise de outliers e valores extremos. Foram considerados outliers os dados acima da mediana + 1,5 amplitude interquartílica ou abaixo da mediana - 1,5 amplitude interquartílica; foram considerados extremos os dados acima da mediana + 3 amplitude interquartílica ou abaixo da mediana - 3 amplitude interquartílica. Para a comparação dos grupos em cada dia de eutanásia e comparação dos dias de eutanásia dentro de cada grupo, em relação ao percentual de colágeno, foi considerado o modelo de Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

Para esta análise foram considerados os dados de 7º dia e 21º dia de eutanásia.

Após a análise de outliers e extremos de acordo com os critérios acima descritos, foram retirados os dados:

Grupo 2, eutanásia 21º dia: 4,1174

Grupo 3, eutanásia 21º dia: 12,3632

Grupo 4, eutanásia 21º dia: 25,0471

Grupo 4, eutanásia 21º dia: 44,2037

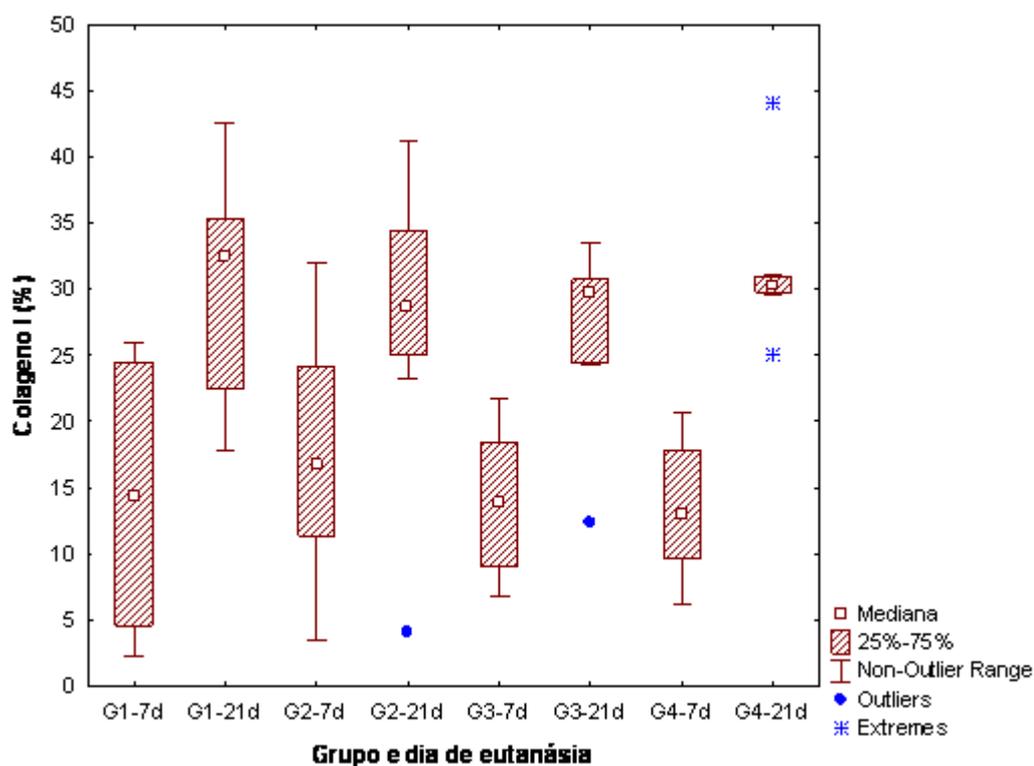


Gráfico 23- Box-plot para Colágeno I com outliers.

#### 4.2.5.1 Resultados

Para Colágeno I e Colágeno III, testou-se a hipótese nula de que as médias dos grupos são iguais (para eutanásia no 7º dia e no 21º dia), versus a hipótese alternativa de médias diferentes. Também foi testada a hipótese nula de que as médias são iguais nos dois dias de eutanásia (nos 4 grupos), versus a hipótese alternativa de que pelo menos um grupo tem média diferente dos demais. Na tabela 25 são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 25- Estatística descritiva para Colágenos I e III após retirada de *outliers*.

Variável	Eutanásia	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Colágeno I (%)	7º dia	G1	7	13,83	14,27	2,18	26,03	9,20
		G2	7	17,76	16,72	3,47	32,01	9,29
		G3	8	13,89	13,83	6,78	21,82	5,64
		G4	8	13,47	12,97	6,22	20,74	5,15
	21º dia	G1	7	30,14	32,54	17,75	42,59	8,31
		G2	7	31,07	29,67	23,20	41,31	6,17
		G3	7	29,09	30,42	24,34	33,49	3,43
		G4	6	30,35	30,20	29,56	31,18	0,59
Colágeno III (%)	7º dia	G1	7	86,17	85,73	73,97	97,82	9,20
		G2	7	82,24	83,28	67,99	96,53	9,29
		G3	8	86,11	86,17	78,18	93,22	5,64
		G4	8	86,53	87,03	79,26	93,78	5,15
	21º dia	G1	7	69,86	67,46	57,41	82,25	8,31
		G2	8	72,30	71,33	58,69	95,88	11,11
		G3	8	73,00	70,12	66,51	87,64	6,71
		G4	8	68,58	69,80	55,80	74,95	5,51

Tanto para Colágeno I como para Colágeno III, os resultados dos testes indicaram que, nos dois momentos de eutanásia, não existe diferença entre os quatro grupos ( $p=0,852$ ). Na comparação dos dias de eutanásia, para os 4 grupos, foi encontrada diferença significativa entre os dois momentos ( $p<0,001$ ).

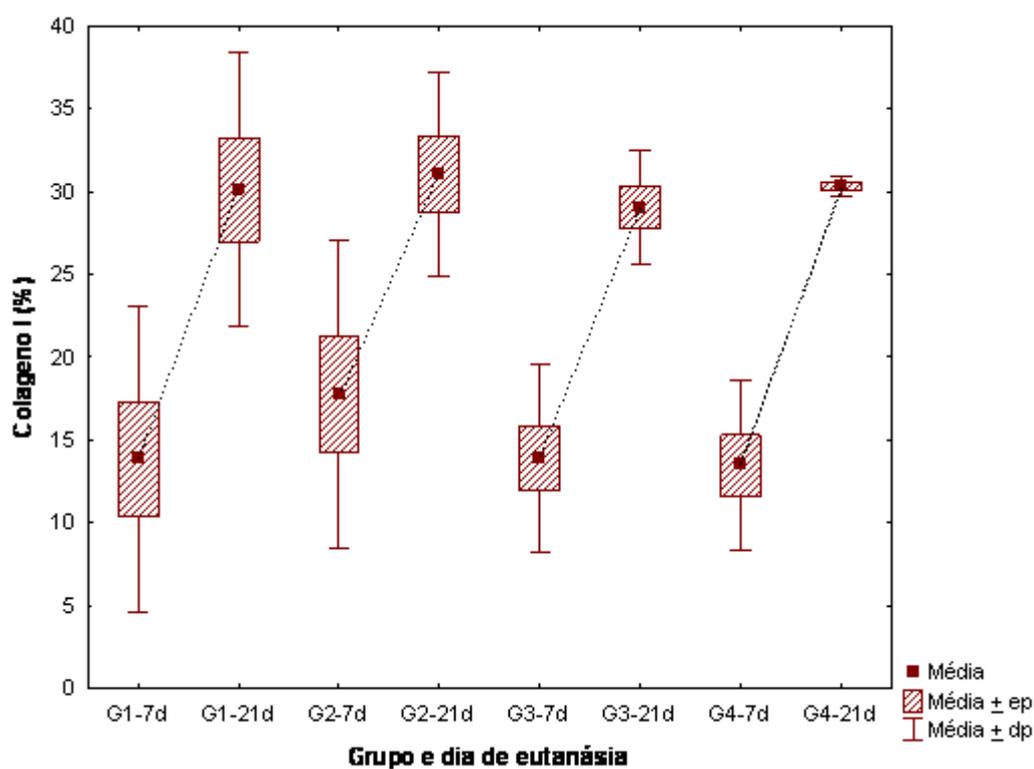


Gráfico 24- Box-plot para Colágeno I sem *outliers*, para grupo e dia de eutanásia.

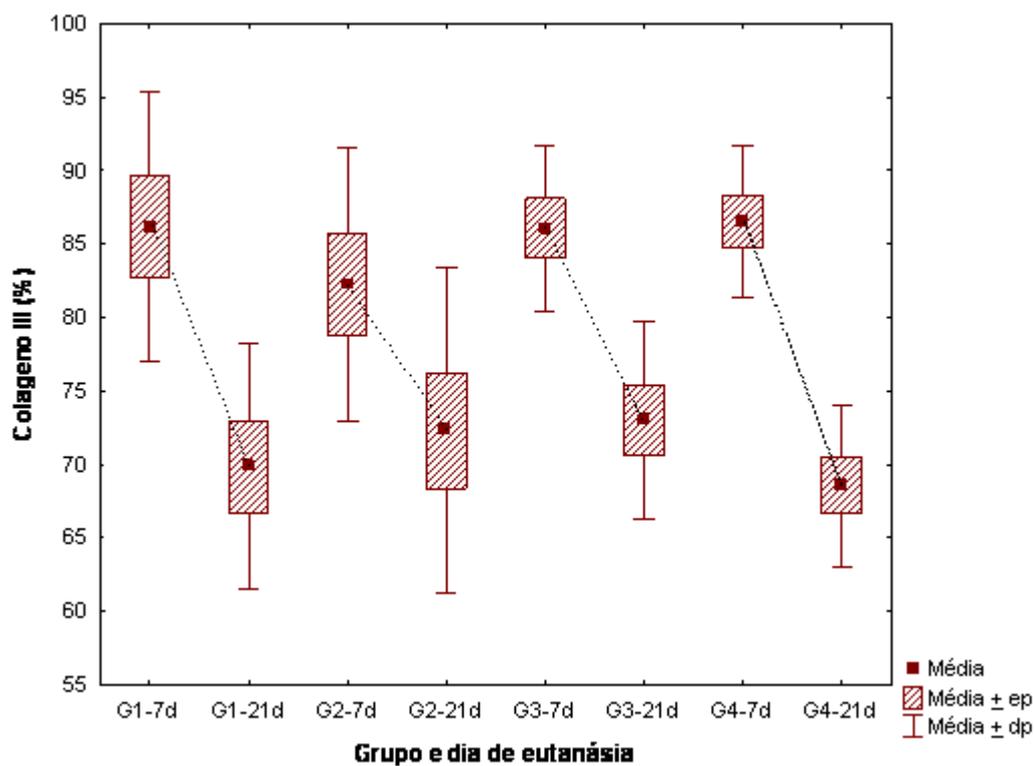


Gráfico 25- Box-plot para Colágeno III sem *outliers*, para grupo e dia de eutanásia.

#### 4.2.6 Conclusão Estatística

Não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos em nenhum dos dias.

Foram encontradas diferenças entre os dias dentro de cada um dos grupos. Há diferenças significativas entre os dias nos grupos G1, G3 e G4.

No grupo G2 há diferenças significativas entre o 7º dia e o 21º dia.

### **4.3 IMAGENS DOS COLÁGENOS I E III**

Nas imagens obtidas através do protocolo descrito, no 3º dia de tratamento não visualizou-se nenhuma representação do surgimento do Colágenos no local da incisão. Fato este modificado a partir do 7º dia de tratamento.

As figuras a seguir, representam Colágenos I e III, nas cores vermelho e verde, respectivamente, em seus determinados grupos, no 7º e 21º dias de aplicação do protocolo proposto.

#### 4.3.1 Grupo Controle (G1)

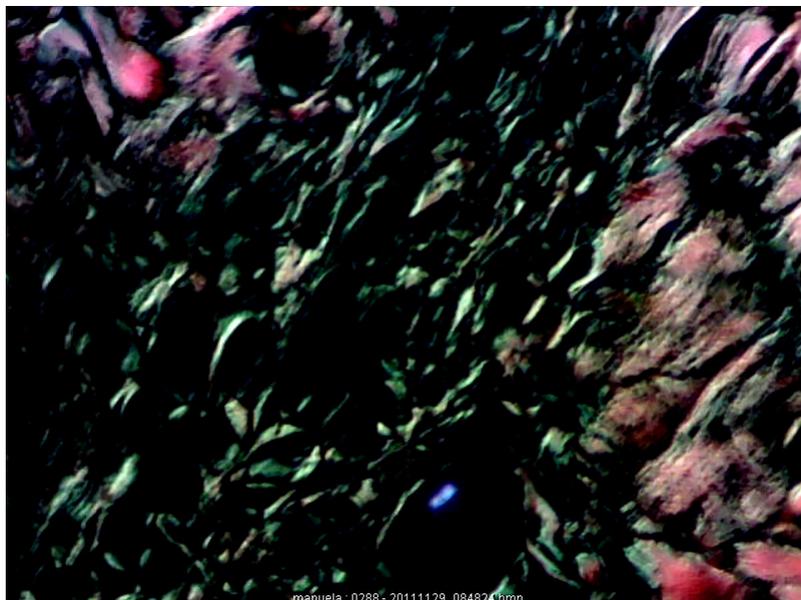


Figura 17- Fotomicrografia do animal do Grupo Controle (G1), tratado por 7 dias, coloração de Picosirius, microscopia de polarização.

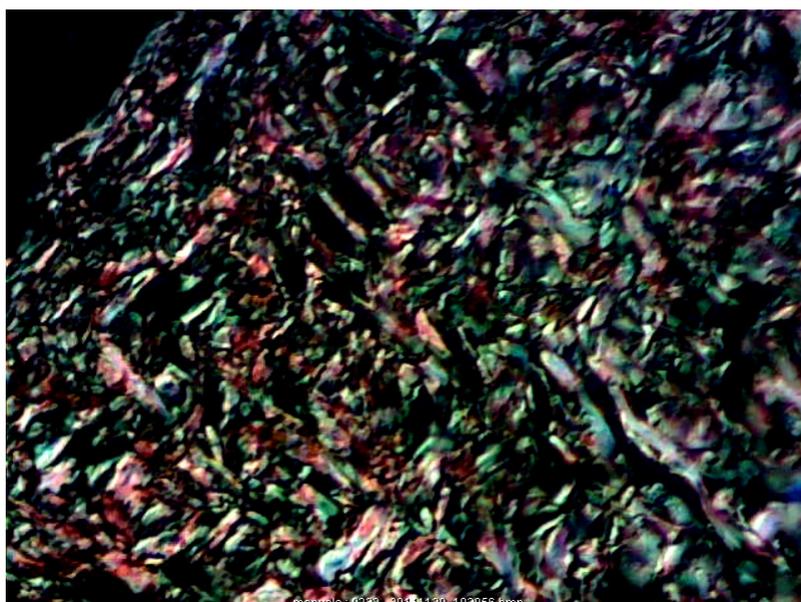


Figura 18- Fotomicrografia do animal do Grupo Controle (G1), tratado por 21 dias, coloração de Picosirius, microscopia de polarização.

#### 4.3.2 Grupo Tópico de Calêndula a 10% (G2)

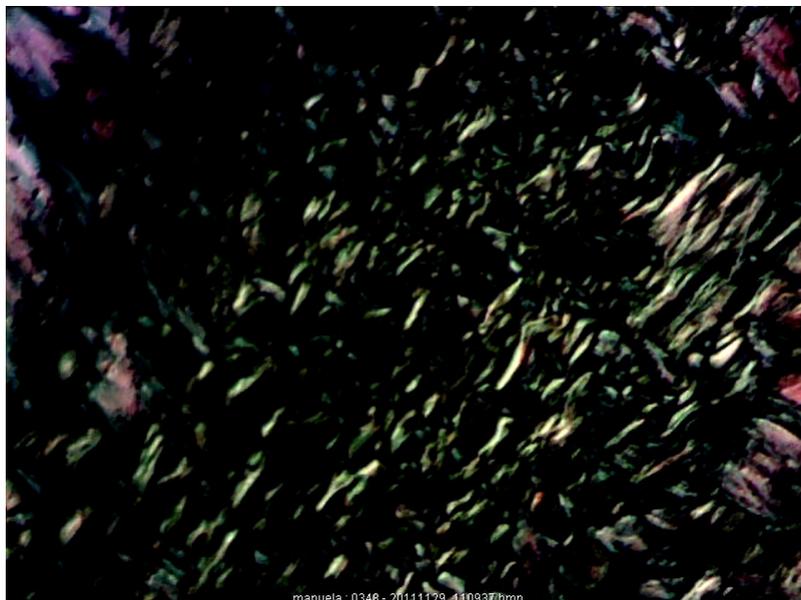


Figura 19- Fotomicrografia do animal do Grupo Tópico de Calêndula a 10% (G2), tratado por 7 dias, coloração de Picosirius, microscopia de polarização.

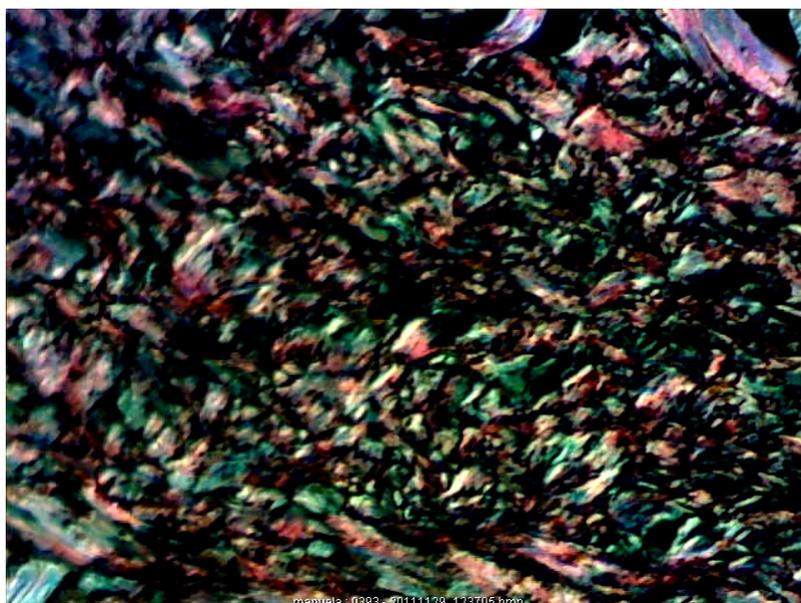


Figura 20- Fotomicrografia do animal do Grupo Tópico de Calêndula a 10% (G2), tratado por 21 dias, coloração de Picosirius, microscopia de polarização.

### 4.3.3 Grupo Ultrassom Terapêutico (G3)

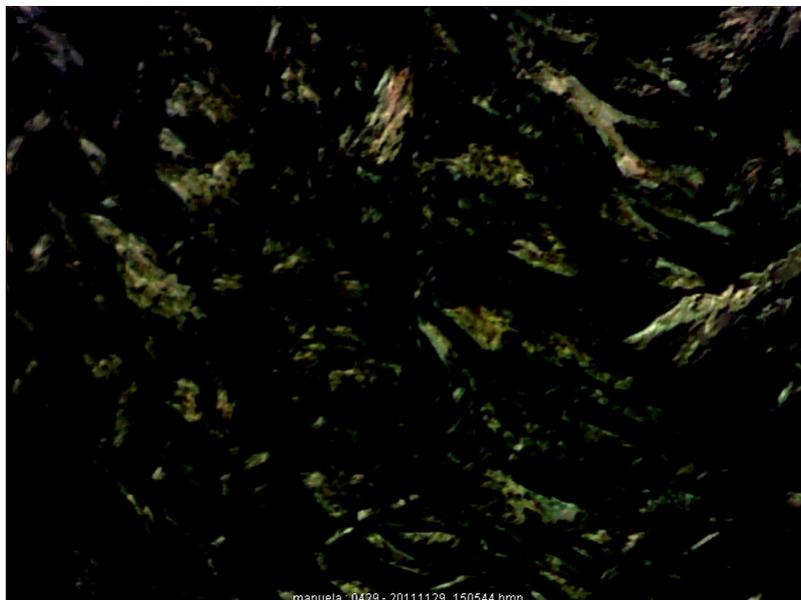


Figura 21- Fotomicrografia do animal do Grupo Ultrassom Terapêutico (G3), tratado por 7 dias, coloração de Picrosirius, microscopia de polarização.

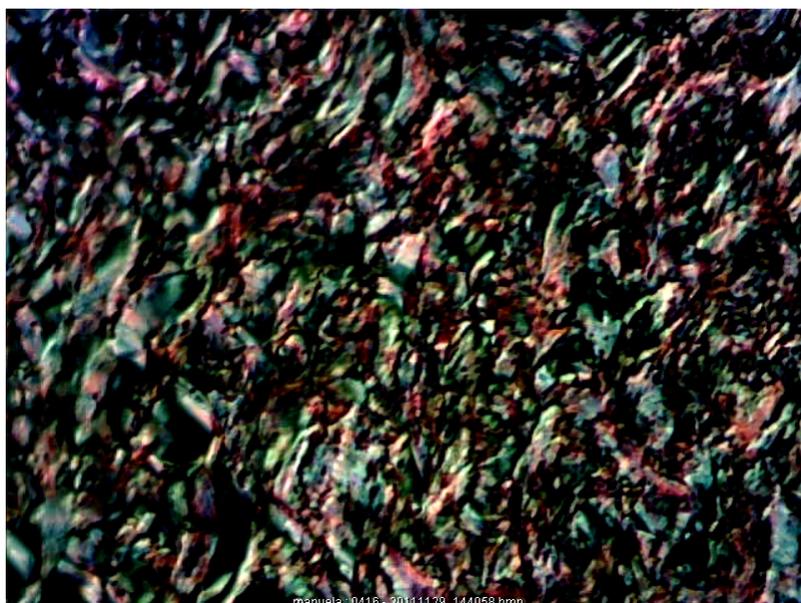


Figura 22- Fotomicrografia do animal do Grupo Ultrassom Terapêutico (G3), tratado por 21 dias, coloração de Picrosirius, microscopia de polarização.

#### 4.3.4 Grupo Ultrassom Terapêutico e Gel de Calêndula a 10%



Figura 23- Fotomicrografia do animal do Grupo Ultrassom Terapêutico e Gel de Calêndula a 10% (G4), tratado por 7 dias, coloração de Picrosirius, microscopia de polarização.

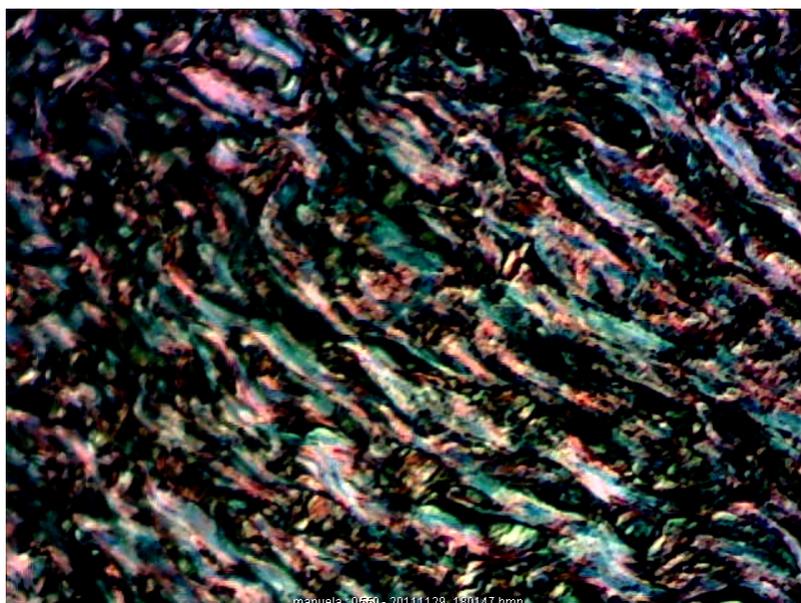


Figura 24- Fotomicrografia do animal do Grupo Ultrassom Terapêutico e Gel de Calêndula a 10% (G4), tratado por 21 dias, coloração de Picrosirius, microscopia de polarização.

#### 4.4 RESULTADOS MACROSCÓPICOS

Dentro do grupo total de animais fornecido pelo Biotério Central da PUC-PR (n=90), somente um animal morreu durante o procedimento anestésico pré-operatório.

O procedimento anestésico, o ato cirúrgico e o tratamento pós-operatório transcorreram sem complicações para os outros 89 animais. Todos se recuperam da anestesia de maneira satisfatória, momento em que eram pesados.

Demonstraram bom estado geral, tanto físico quanto comportamental, dentro dos padrões esperados para espécie.

Observou-se no 3º dia de tratamento, que as feridas apresentavam-se secas, sem presença de exsudação e com bordas regulares; nos animais referentes a G1 as crostas eram mais espessas e evidentes (Figura 25).



Figura 25- Cicatrização externa de animal de cada grupo, referente ao 3º dia de tratamento.

No 7º dia de tratamento, em todos os grupos foi realizada a retirada dos pontos, sendo que em G2, G3 e G4, as crostas se destacavam com mais facilidade, demonstrando sinais de epitelização da ferida (Figura 26).



Figura 26- Cicatrização externa de animal de cada grupo, referente ao 7º dia de tratamento.

No 21º dia de tratamento, as feridas dos animais de todos os grupos, sob avaliação macroscópica apresentavam-se completamente cicatrizadas. Animais de G4 com incisões cicatriciais mais claras, e menos profundas, onde nova tricotomia se fez necessária para melhor visualização da cicatriz (Figura 27).

A área das feridas na epiderme dos ratos diminuiu gradativamente com a evolução do processo de cicatrização, mais evidente em G4.

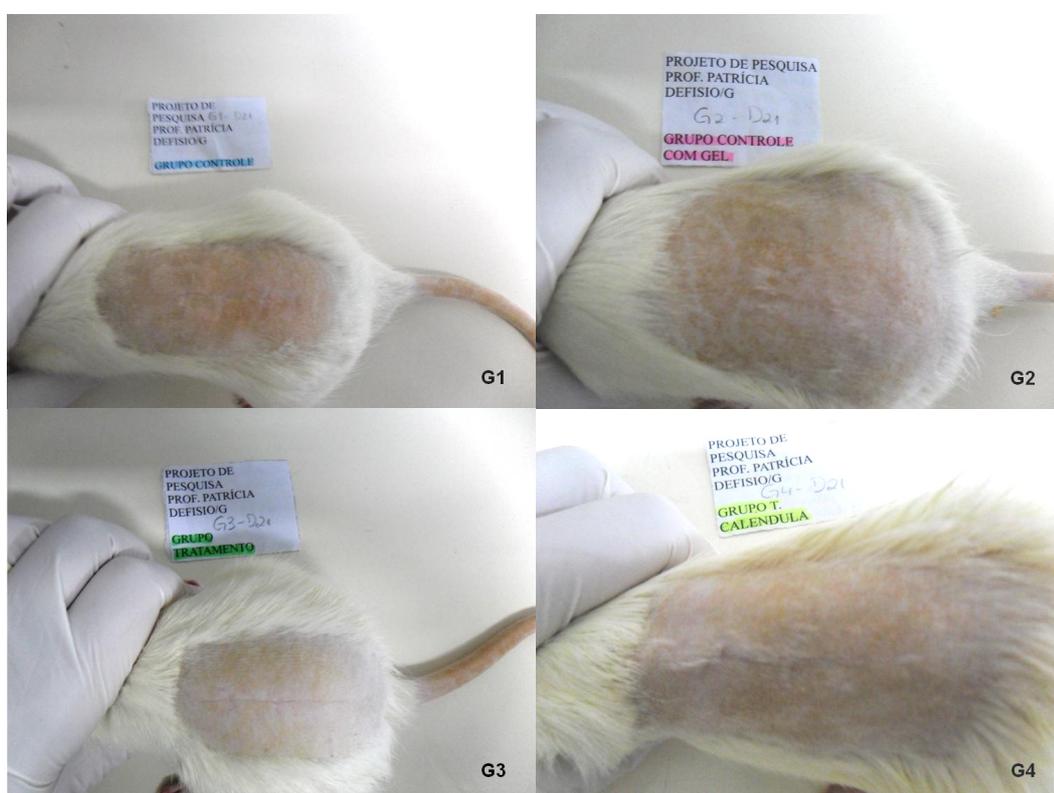


Figura 27- Cicatrização externa de animal de cada grupo, referente ao 21º dia de tratamento.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a utilização do Ultrassom Terapêutico aplicado no modo pulsado e associado ao Gel de *Calendula officinalis* L. a 10% não apresentou relevância do ponto de vista estatístico, quando comparado aos outros grupos estudados, ou seja, aplicação Tópica do Gel de *Calendula officinalis* L. a 10% e aplicação do Ultrassom Terapêutico pulsado com Gel a base de água e Carbopol, no que se refere a neocolagenase.

Com relação à literatura, não foram identificadas pesquisas com desenho de estudo e tamanho de amostra semelhantes a esta pesquisa, o que limitou o escopo da discussão.

Procurou-se então, identificar pesquisas que utilizaram o Ultrassom Terapêutico pulsado e o Gel de *Calendula officinalis* L. de maneira dissociada como forma de subsidiar a discussão.

Lavon e Kost (2004) descrevem que o efeito do ultrassom sobre a pele é derivado diretamente a partir dos parâmetros de aplicação, que incluem duração, frequência e intensidade, e comprovando este fato, foi verificado nos estudos encontrados uma grande diversidade de protocolos combinados ou isolados.

Em revisão sistemática, com 216 artigos, Ter Haar (2007), concluiu que o uso da fonoforese é um importante potencializador do processo de cicatrização quando utilizado em baixas frequências, como ocorreu com este estudo, pois no presente estudo obteve-se um aumento de 17,95% no colágeno tipo I, comparando o 7º com 21º dia de tratamento no Grupo 4. Este autor relata ainda, que a maioria das pesquisas encontradas que aplicaram o modo pulsado apresentaram melhores resultados na cicatrização de tecidos moles.

Baixas frequências também foram estudadas em pele de ratos por Boucaud et al (2001), que concluíram que o uso do Ultrassom no modo pulsado, apresentou melhores resultados no que se refere a penetração transdérmica de Fentanil, mas, que tanto o modo pulsado, quanto o contínuo são eficazes na fonoforese com Cafeína.

No que se refere a reparo tecidual de pele, vários estudos com uso do Ultrassom Terapêutico demonstraram maior efetividade no modo pulsado, principalmente pela ação mecânica de suas ondas. (WATSON, 2008, OLSSOM, 2006, SPEED, 2001).

Amâncio (2003) observou um aumento significativo no número de células em proliferação na epiderme, com aceleração e melhora na integração de enxertos totais de peles de coelhos, após aplicar a mesma dose de irradiação ultrassônica utilizada no presente estudo, porém, sem diferenças em relação à orientação das fibras colágenas, relatando que a mesma apresenta importante alteração nos enxertos de pele.

Apesar de a resposta cicatricial ser naturalmente diferente nas espécies estudadas, reitera-se o efeito antiinflamatório e regenerativo no que diz respeito às incisões nas espécies tratadas com o uso do Ultrassom Terapêutico.

No presente estudo, os resultados para Colágenos I e III obtidos no G3, quando comparados ao G1, se mostraram divergentes da literatura pesquisada, não havendo diferença significativa para os grupos. Alguns autores contradizem os resultados encontrados neste estudo, porém com delineamentos diferentes em relação a esta pesquisa, no que se refere a tamanho e características da amostra, dosimetria e período de tratamento.

Byl *et al* (1993) também compararam a aplicação do Ultrassom Terapêutico nos modos contínuo e pulsátil em peles de porcos, na mesma intensidade e tempo propostos por este estudo, e verificaram que a maior deposição de colágeno é com o uso pulsado, novamente dando subsídios ao modo escolhido por esta pesquisa.

O estudo de RICOLDY *et al* (2010), foi o que mais se assemelhou a esta pesquisa. Os autores utilizaram a mesma distribuição de grupos, dose de aplicação ultrassônica e concentração da tintura de *Calendula officinalis* L., com diferenças em tecido-alvo lesionado e período de tratamento máximo do protocolo proposto (5 dias). Concluíram que nos grupos tratados com ultrassom e principalmente associado à calêndula, houve maior número de macrófagos e mioblastos, e que os grupos que foram submetidos ao ultrassom apresentaram redução da área lesionada, porém não-significativa quando comparados ao Grupo Controle, fato este semelhante às conclusões obtidas neste estudo.

Os dados obtidos através da pesquisa supracitada podem sugerir que a partir do 5º dia de intervenção do protocolo, pode ser desencadeado o processo de reparação tecidual, o que só foi observado a partir do 7º dia do presente estudo. Deve-se ressaltar, que o reduzido tamanho da amostra do estudo acima, não permite generalizações quanto ao início do processo de reparação tecidual. Apesar das diferenças existentes entre os trabalhos, os resultados de RICOLDY *et al* (2010)

reforçam os achados do presente estudo, no que se refere a associação do Gel de *Calêndula officinalis* L. a 10% com o Ultrassom Terapêutico Pulsado.

Os resultados de Ricoldy et al (2010) também indicaram que os animais submetidos ao tratamento tópico de gel à base de *Calendula* se apresentaram com áreas de lesão relativamente menores quando comparados as do Grupo-controle, demonstrando a ação cicatrizante desta preparação, mas não similares ao desta pesquisa, onde o grupo que recebeu aplicação tópica de *Calêndula*, obteve o pior resultado para formação de colágeno. Não foram identificados estudos comparativos do efeito Tópico da *Calêndula officinalis* L. com o Ultrassom Terapêutico Pulsado em baixa intensidade nos tecidos muscular e epitelial, o que poderia contribuir com evidências para suporte desta discussão.

PARENTE (2009), fez punch e tratou por 21 dias ratos com Extrato Etanólico de *Calêndula* e verificou que na fase inflamatória as crostas apresentavam-se serosas e lisas, com bordos delgados no grupo tratado em relação ao controle, com resultados macroscópicos que se mostraram similares aos do presente estudo. No entanto, devem ser evitadas generalizações entre estes estudos, pois o processo cicatricial de lesões do tipo “punch” ocorrem de maneira diferenciada das incisões lineares, nesta, o tecido de granulação inicia sua formação pelos bordos laterais da incisão, já naquela, a formação do tecido de granulação acontece no leito incisional.

O estudo de NITZ (2006) avaliou o potencial cicatrizante dos extratos aquosos de *Calêndula* em ratos Wistar, machos, com lesão cutânea por 7 dias, e após análise de material corado por Hematoxilina Eosina, concluiu que o extrato além de proporcionar um maior número de fibras colágenas e fibroblastos que o grupo controle, não apresentou diferença estatisticamente significativa, convergindo com os resultados da presente pesquisa.

Na análise da coloração com Hematoxilina-Eosina, pode-se observar a formação do espessamento do estrato córneo bem evidente em G1, e com menor intensidade em G4, quando comparados no 3º dia de tratamento. Houve também início da formação de tecido de granulação nesta fase, confirmando o início do processo natural de cicatrização.

Percebe-se uma lacuna de evidências da formação de colágeno entre o 3º e o 7º dia, que não tem sido contemplada na maioria dos estudos. Não foram privilegiados estudos que investigassem a formação de colágeno, neste intervalo de tempo.

No caso deste estudo, não se identificou a presença de neocolagenase no 3º dia, porém a mesma não foi investigada nos dias subsequentes (4º; 5º e 6º dia de tratamento).

A maioria das pesquisas analisadas busca a comprovação cicatricial, descrevendo o processo no 7º dia pós-lesão. A literatura existente é bastante sólida ao descrever a formação de colágeno nesta fase do processo. Esta literatura em sua grande maioria é representada por livros didáticos, onde se podem citar títulos como Junqueira e Carneiro, 2008; Anderson, 1982 e Kitchen, 2003.

Visualizando os resultados para o 7º dia de tratamento, constatou-se pouca redução na espessura da epiderme para o grupo controle em comparação aos grupos que receberam a aplicação do Ultrassom Terapêutico. A regeneração epitelial ocorreu em todos os grupos tratados, mostrando preenchimento de toda extensão da ferida.

Mendonça *et al* (2006) concluíram que o UST, aplicado sobre cicatriz por segunda intenção em pele de ratos, estimulou a neoangiogênese em 3 dias, aumentou a concentração e a qualidade do colágeno e melhorando a reepitelização em 7 dias. Com 14 dias de tratamento, os tecidos analisados melhoraram a apresentação do colágeno e apresentaram maior presença de anexos cutâneos, quando comparados ao grupo não estimulado. Seus resultados, não mostraram significância estatística, porém houve indicativos de melhora qualitativa da pele dos animais, o que vem de encontro com os resultados deste estudo.

Este estudo apresentou algumas limitações, tais como, a insuficiência de artigos versando sobre a temática em questão e delineamento de pesquisa (tamanho de amostra, dosimetria, formulação de fitoterápico, entre outros).

A amostra precisou ser redimensionada, em virtude da necessidade apontada de formação de mais um grupo para avaliar isoladamente o efeito Tópico do Gel de *Calendula officinalis* L. a 10%, diminuindo desta forma o n em cada grupo. Os resultados do presente estudo não evidenciaram superioridade da formulação Tópica de *Calendula officinalis* L. a 10% associada ao Ultrassom Terapêutico, em aplicação nas feridas por primeira intenção em peles de ratos, quando comparada aos outros grupos tratados, porém não podendo ser tomado como argumento contra sua ação cicatrizante.

A formação de colágeno na derme e epiderme, não apresentou diferenças significantes entre os grupos tratados, mas as análises qualitativas indicaram uma

estimulação à regeneração tecidual mais acentuada no grupo que recebeu a associação do Ultrassom Terapêutico com o Gel de *Calendula officinalis* L. a 10%.

A análise macroscópica no G4 evidenciou uma cicatrização mais satisfatória que nos demais grupos. Isto sugere que o efeito da associação de UST e Calendula, pode potencializar a reparação tecidual em lesões de menor profundidade, sendo que este aspecto ainda não foi alvo de investigação.

Estudos futuros são necessários para esclarecimentos da ocorrência da neocolagenase em outros intervalos de tempo.

## 6 CONCLUSÃO

- Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos tratados em relação a formação dos Colágenos I e III na derme e epiderme, após análise microscópica polarizada e quantificação no programa ImageProPlus Cybernetics®, versão 4.5;
- A análise qualitativa dos aspectos da derme e da epiderme, através da coloração por HematoxilinaEosina indicou estimulação à regeneração tecidual mais acentuada no grupo que recebeu a associação do Ultrassom Terapêutico com o Gel de Calendula officinalis L. a 10% (G4).
- A análise macroscópica qualitativa evidenciou cicatrização mais satisfatória no G4 quando comparada aos demais grupos, em todas as fases estabelecidas pelo protocolo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFREDO, P.P.; ANARUMA, C.A.; PIÃO, A.C.S.; JOÃO, S.M.A; CASAROTTO, R.A. Effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: an experimental study. **Ultrasonics**, vol 49, p. 466-471, 2009.

ALONSO, J. **Fitomedicina. Curso para profissionais da área de saúde**. São Paulo: Pharmabooks, 2008.

ALTOMARE, M.; NASCIMENTO, A.P.; ROMANA-SOUZA, B.; AMADEU, T.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Ultrasound accelerates healing of normal wounds but not of ischemic ones. **Wound Repair and Regeneration**, p.01-07, 2009.

AMÂNCIO, A. C. G. **Efeitos do ultra-som terapêutico na integração de enxertos de pele total em coelhos**. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos. Ribeirão Preto, 2003.

ANDERSON, W.A.D. **Patologia**. 7ªed, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1982.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Calendula flos*. **Farmacopéia Brasileira 5ed.**, v.2, p.162-164, 2010.

BASSOLI, D. A. **Avaliação dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas à aplicabilidade em clínica fisioterapêutica**. Dissertação de Mestrado – Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Paulo – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BORGES, L.F. et al. Pricrossírius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. **Mícron**, vol. 38, p. 580-583, 2007.

BOUCAUD, A.; MACHET, L.; ARBEILLE, B.; MACHET, M.C.; SOURNAC, M.; MAVON, A.; PATAT, F.; VAILLANT, L. In vitro study of low-frequency ultrasound-enhanced transdermal transport of fentanyl and caffeine across human and hairless rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 228, p. 69–77, 2001.

BRASIL. Resolução-RE Nº 89, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 18 de março de 2004, p. 32.

BYL, N.N.; MACKENZIE, A.; WONG, T.; WEST, J.; HUNT, T.K. Incisional wound healing: A controlled study of low and high dose ultrasound. **Journal Orthop. Sports Phys. Ther**, vol. 18, n. 5, p. 619-628, 1993.

BYL, N. B. The use of ultrasound as an enhancer for transcutaneous drug delivery: phonophoresis. **Physio Therapy**, vol. 75, n. 6, p. 539-553, 1995.

CAMPOS, M.C.P.S.; COELHO, M.C.O.C.; SILVA, L.G.G; MONTEIRO, V.L.C.; LIMA, E.T.; ACETO, M.L. Tratamento de Feridas Infectadas Utilizando *Calendula officinalis*. **Revista Homeopatia Brasileira**, vol. 06, p. 22-28, 2000.

CAMPOS, M.S.M.P. Fibro-edema gelóide subcutâneo. **Ciência & Tecnologia, Piracicaba**, v. 1, n. 2, p. 77-82, 1992.

CHANDRAN, P.K.; KUTTAN, R. Effect of *Calendula Officinalis* Flower Extract on Acute Phase Proteins, Antioxidant Defense Mechanism and Granuloma Formation During Thermal Burns. **J. Clin. Biochem. Nutr.**: Índia, vol. 43, p. 58–64, 2008.

COLLINS, K. Efeitos térmicos. In: KITCHEN, S.; BAZIN, S. **Eletroterapia de Clayton**. 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 2001.

DELLA-LOGGIA, R. et al. The Role of Trietpenoids in the Topical Anti-inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Flowers. **Planta Médica**, vol. 60, p. 516-520, 1994.

DYSON, M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, vol. 73, n. 3, p.116-20, 1987.

DOCKER, M.F. A review of instrumentation available for therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**, vol 73, n.4, p.154-5, 1987.

EBRAHIMI, S.; ABBASNIA, K.; MOTEALLEH, A.; KOOROSHFARD, N.; KAMALI, F.; GHAFFARINEZHAD, F. Effect of lidocaine phonophoresis on sensory blockade: pulsed or continuous mode of therapeutic ultrasound? **Physiotherapy**, vol. 98, p. 57–63, 2012.

ESMAILI, R.; KHALILIAN, A.R.; NASIRI, E.; ALIPOUR, S. Study regarding the effect of *calendula officinalis* cream in healing of pressure sores. **Journal of Mazandaran University of Medical Sciences**: Persian, vol 18, n. 66, p. 19-25, 2008.

FAGANELLO, F.R. **Ação do Ultrassom Terapêutico no Processo de Regeneração do Músculo Esquelético**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência da Motricidade. UNESP. Rio Claro, São Paulo, 2003.

FONSECA, Y.M., CATINI, C.D., VICENTINI, F.T.M.C., NOMIZO, A., GERLACH, R.F., FONSECA, M.J.V., Protective effect of *Calendula Officinalis* extract against UVB – induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 127, p. 596-601, 2010.

FRONZA, M.; HEINZMANN, B.; HAMBURGER, M.; LAUFER, S.; MERFORT, I., Determination of the wound healing effect of *Calendula Officinalis* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 126, p. 463-467, 2009.

GARROS, I.C., CAMPOS, A.C.L., TÂMBARA, E.M., TENÓRIO, S.B., TORRES, O.J.M., AGULHAM, M.A., ARAÚJO, A.C.F., SAINS-ISOLAN, P.M.B., OLIVEIRA E.M., ARRUDA, E.C.M.. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, vol 21, Supl 3, p. 55-65, 2006.

GRECA, F. H. et al. Efeito do ultra-som terapêutico nas anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 14, n. 3, 1999.

GUIRRO, E.C.O. **Bioefeitos induzidos por ultra-som em staphylococcus aureus e escherichia coli: estudo in vitro**. Dissertação de doutorado. Instituto de Biociências de Rio Claro. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1999.

GUIRRO, R.; GUIRRO, E. **Fisioterapia Dermato-Funcional: Fundamentos-Recursos-Patologias**. 3ª ed. São Paulo: Manole, 2002.

GUYTON A, HALL J. **Tratado de Fisiologia Médica de Guyton & Hall**. 11ª ed. Elsevier, 2006.

HAMBUERGUER, M.; ADLER, S.; BAUMANN, D.; FORG, A; WEINREICH, B. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula Officinalis*). **Fitoterapia**. Amsterdam, vol. 74, n. 4, p.328-338, 2003.

HAYES, B.T.; MERRICK, M.A.; SANDREY, M.A.; CORDOVA, M.L., Three-MHz Ultrasound Heats Deeper Into the Tissues Than Originally Theorized. **Journal of Athletic Training**, vol. 39, n.3, p. 230-234, 2004.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos Graxos e cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, n. 2, p. 53- 58, 2007.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia e biologia celular**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, J. **Histologia básica texto/atlas**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KIERSZENBAUN, A. L. **Histologia e Biologia Celular. Uma Introdução à Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 654p.

KITCHEN S. **Eletroterapia Prática Baseada em Evidências**. 11ª ed. Barueri: Manole, 2003.

KLOUCHEK-POPOVA, E.; POPOV, A.; PAVLOVA, N.; KRÜSTEVA, S. Influence of the physiological regeneration and epithelialization using fractions isolated from *Calendula Officinalis*. **Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgarica**, vol 8, n. 4, p. 63-67, 1982.

LAVON, I.; KOST, J. Ultrasound and transdermal drug delivery. **DDT-Drug Discovery Today**, vol. 9, n 15, p.670-676, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas**. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LOW, J.; REED, A. **Eletroterapia Explicada. Princípios e Prática**. 3ª ed. São Paulo: Manole, 2001.

MACHADO, D.R., CLAYTON, M. **Eletrotermoterapia Prática**. São Paulo: Pancast, 2002.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. **Cicatrização: Conceitos atuais e recursos auxiliares**. Parte I – Anais Brasileiros de Dermatologia. Rio de Janeiro, 2003.

MARCHIONNI, A. et al. Influência do Meloxicam e da Dexametasona no processo inflamatório no reparo tecidual. **Revista Odonto Ciência-Faculdade de Odontologia/PUCRS**, v. 21, n. 51, jan./mar. 2006.

MENDONÇA, A.C.; FERREIRA, A.S.; BARBIERI, C.H.; THOMAZINE, J.A.; MAZZER, N. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, vol 14, n. 3, p. 152-7, 2006.

MENEZES, F.F. Avaliação da *Calendula officinalis* L. na Cicatrização Cutânea de Cães. Aspectos Clínicos, Histopatológicos e Histoquímicos. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2006.

MITRAGOTRI, S.; EDWARDS, D.A.; BLANKSCHETEIN, D.; LANGER, R. A mechanistic study of ultrasonically-enhanced transdermal drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol 84, n.6, p. 697-706, 1995.

MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHETEIN, D.; LANGER, R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. **Pharmaceutical Research**, vol 13, n.3, p. 411-420, 1996.

MITRAGOTRI, S.; KOST, J., Low-frequency sonophoresis. A review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 56, p. 589-601, 2004.

MÜLLER-DECKER, K. et al. The effects of cyclooxygenase isozyme inhibition on incisional wound healing in mouse skin. **Journal Invest Dermatol**, v. 119, n. 5, p. 1189-1195, 2002.

MUTOH, M.; UEDA, H.; NAKAMURA, Y.; HIRAYAMA, K.; ATOBE, M.; KOBAYASHI, D.; MORIMOTO, Y. Characterization of transdermal solute transport induced by low-frequency ultrasound in the hairless rat skin. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 137–146, 2003.

NITZ, A.C.; ELYS, J.B.; D'ACAMPORA, A.J.; TAMES, D.R.; CORRÊA, B.P. Estudo morfométrico na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*, **Arquivos Catarinenses de Medicina**, vol 35, nº 4, p. 74-79, 2006.

OGURA, M.; PALIWAL, S.; MITRAGOTRI, S. Low-frequency sonophoresis: Current status and future prospects. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 60, p. 1218-1223, 2008.

OLSSON. D.C.; MARTINS, V.M.V.; MARTINS, E.; MAZZANTI, A. Estimulação ultrassônica pulsada e contínua no processo cicatricial de ratos submetidos à celiotomia. **Ciência Rural, Santa Maria**, vol. 36, n. 03, p. 865-872, 2006.

PAGNANO, L.O.; BARALDI-ARTONI, S.M.; PACHECO, M.R.; SANTOS, E.; OLIVEIRA, D.; LUI, J.F. Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com calêndula. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 38, n. 6, p. 1664, 2008.

PARENTE, L.M.L.; ANDRADE, M.A.; BRITO, L.A.B.; MOURA, V.M.B.D.; MIGUEL, M.P.; LINO-JÚNIOR, R.S.; TRESVENZOL, L.F.M.; JOSÉ REALINO PAULA, J.R.; PAULO, N.M. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, vol. 26, p. 19-24, 2011.

PARENTE, L.M.L.; SILVA, M.S.B.; BRITO, L.A.B.; LINO-JÚNIOR, R.S.; PAULA, J.R.; TRESVENZOL, L.M.F.; ZATTA, D.T.; PAULO, N.M. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol 11, nº 04, p. 383-3911, 2009.

POLACOW, M.L.O. et al. Efeito do ultra-som e do D-Pantenol na regeneração tegumentar. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, vol. 9, n. 3, p. 365-371, 2005.

RAO, S. Caledula and hypericum: two homeopathic drugs promoting wound healing in rats. **Fitoterapia**, vol 11, n.2/3. p.191-199, 1997.

REGER, S. I.; HYODO, A; NEGAMI, S; KAMBIC, H. E.; SAHGAL, V; REGER, S. I. Experimental Wound Healing with Electrical Stimulation. **Artificial Organs**, vol. 23, p. 460-462, 1999.

ROBINSON, A.J. & SNYDER, L. **Eletrofisiologia Clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

ROSUM, A. et al. Efeitos do ultra-som pulsado e baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 152-157, 2004,

SCHUNCK, M; NEUMANN, C; PROKSCH, E. Artificial Barrier Repair in Wounds by Semi-Occlusive Foils Reduced Wound Contraction and Enhanced Cell Migration and Reepithelization in Mouse Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, vol. 125, p.1063, 2005.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: UFRGS Editora, 2004.

SORIANO, M.; PÉREZ, S.; BAQUES, M.. **Teoria e prática para a utilização de correntes em estética**. Sant Quirze Del Vallès: SOR International, 2003.

SOUZA DE JESUS, G.; FERREIRA, A.S.; MENDONÇA, A.C.,. Fonoforese X Permeação cutânea. **Fisioterapia em Movimento**, v.19, n.4, p. 83-88, out./dez., 2006.

SPEED, C.A. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. **Rheumatology**, vol. 40, p. 1331-1336, 2001.

STEVENS, A.; LOWE, J. S. **Histologia**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996.

STEVENS, A.; LOWE, J. Patologia. In: Henkes, M.C. **Respostas teciduais**. Harcourt: Londres, Ed Marks, p. 35-58, 2002.

TER HAAR, G.;Therapeutic ultrasound. **European Journal of Ultrasound**, p. 3-9, 1999.

TER HAAR, G. Therapeutic applications of ultrasound. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, vol. 93, p. 111-129, 2007.

THOMAS, D.V.; O'NEILL, I.D.; HARDING, K.G.; SHEPHERD, J.P. Cutaneous Wound Healing: A Current Prespective. **J. Oral Maxillofac Surg**, vol 53, p. 442-447, 1995.

THONSOM, A.N.N., SKINNER, A., PIERCY, J. **Fisioterapia de Tydi**. São Paulo: Santos, 1994

WARREN, L.; ERNEST, J.; SENNA, J. **Microbiologia médica e imunologia**. 7ªed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.**, vol 83, p. 835-870, 2003.

VIVIER, A. D.; **Atlas de Dermatologia Clínica**. 2ªed, São Paulo: Manole, 2000.

VOLPATO, A.M.M. Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Paraná, p.35, 2005.

## ANEXO



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética  
Comitê de Ética no Uso de Animais

PUCPR

Curitiba, 24 de fevereiro de 2011.

### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

**REGISTRO DO PROJETO:** 582 – 2ª versão

**TÍTULO DO PROJETO:** Análise do efeito cicatricial do extrato de Calendula Officinalis L. associado à aplicação do ultrassom terapêutico em feridas induzidas em pele de ratos

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** João Antônio Palma Setti

**EQUIPE DE PESQUISA:**

João Antônio Palma Setti, Patrícia Pacheco Tyski Suckow

**INSTITUIÇÃO:**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**CENTRO / CURSO:**

Mestrado – Ciências da Saúde

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Ratos ( <i>Rattus Norvergicus</i> )	Machos	100 dias 220 – 270 g	C	90

O colegiado do CEUA em reunião no dia 24/02/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.



Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

  
Prof<sup>a</sup> Gracinda Maria D Almeida e Oliveira  
Coordenadora Adjunta  
Comitê de Ética no Uso de Animais

