



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DE CURATIVO À BASE DE COLÁGENO COM FÁRMACO FOTOATIVO
PARA TERAPIA FOTODINÂMICA PÓS-CIRÚRGICA *IN VIVO***

Versão final

FERNANDO COUTO PEREIRA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Tecnologia das Radiações
em Ciência da Saúde na Área de
Concentração Processos de Radiação
na Saúde**

**Orientadora:
Prof. Dra. Martha Simões Ribeiro**

**São Paulo
2022**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DE CURATIVO À BASE DE COLÁGENO COM FÁRMACO FOTOATIVO
PARA TERAPIA FOTODINÂMICA PÓS-CIRÚRGICA *IN VIVO***

Versão final

FERNANDO COUTO PEREIRA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia das Radiações em Ciência da Saúde na Área de Concentração Processos de Radiação na Saúde.

**Orientadora:
Prof. Dra. Martha Simões Ribeiro**

**São Paulo
2022**

FICHA CATOLOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

COUTO PEREIRA, F. Avaliação de curativo à base de colágeno com fármaco fotoativo para terapia fotodinâmica pós-cirúrgica in vivo. 2022. 67 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN, São Paulo. Disponível em: <<http://repositorio.ipen.br/>> (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Couto Pereira, Fernando

Avaliação de curativo à base de colágeno com fármaco fotoativo para terapia fotodinâmica pós-cirúrgica in vivo / Fernando Couto Pereira; orientadora Martha Simões Ribeiro. -- São Paulo, 2022.
67 f.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde (Processos de Radiação na Saúde) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2022.

1. Azul de metileno. 2. LED de emissão vermelho. 3. Infecção bacteriana. I. Ribeiro, Martha Simões, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Fernando Couto Pereira

Título: Avaliação de curativo à base de colágeno com fármaco fotoativo para terapia fotodinâmica pós-cirúrgica in vivo.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia das Radiações em Ciência da Saúde na Área de Concentração Processos de Radiação na Saúde.

Data: 21/12/2022

Banca examinadora

Profa. Dra.: Martha Simões Ribeiro

Instituição: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN-CNEM/SP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr: Aguinaldo Silva Garcez Segundo

Instituição: Faculdade São Leopoldo Mandic

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra.: Silvia Cristina Nuñez

Instituição: Universidade Brasil

Julgamento: Aprovado

*"Se minha mente consegue
imaginar, então eu consigo
realizar"*

Napoleon Hill

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN) por toda infraestrutura fornecida para minha formação.

A minha família, em especial ao meu marido, Vinicius Marchiori da Silva, por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial. A minha mãe, pelo amor e compreensão incondicional em todos os momentos dessa jornada.

A Profa. Dra. Martha Simões Ribeiro. Tê-la como minha orientadora no meu projeto de pesquisa foi uma honra. Sou grato pelos ensinamentos compartilhados, pela compreensão, dedicação e amizade.

A Dra. Tânia Mateus Yoshimura, por ter sido tão acessível em todos os momentos em que precisei, por toda a atenção, cuidado, experiência e valiosas sugestões de melhorias que me sugeriu para a defesa. Gratidão pelo acolhimento.

A Dra. Denise Maria Zezell pela coordenação e composição do grupo de ensino do curso stricto sensu.

Ao Prof. Dr. Orlando Rodrigues Júnior, pelas valiosas recomendações e sugestões que me sugeriu para a defesa.

A Andréa Malavazi e Sabrina Lopes Soares, por todo o acolhimento. Agradeço por terem me fornecido toda a ajuda necessária, sempre de maneira tão rápida e resolutiva.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte dessa jornada. Todos vocês fizeram mais que o possível e deram sempre tudo pela nobre arte de ensinar.

Agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

PEREIRA, Fernando C. **Avaliação de curativo a base de colágeno com fármaco fotoativo para terapia fotodinâmica pós-cirúrgica *in vivo***. 2022. 67 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN, São Paulo.

O tratamento de feridas é um problema significativo e crescente em todo o mundo. Algumas bactérias patogênicas podem se instalar nas feridas e promover dificuldade de cicatrização, especialmente em casos onde é difícil manter curativo protetor sobre a lesão ou em pacientes com algum fator que dificulte a cicatrização em tempo regular. Curativos bioativos de colágeno mantêm a umidade em ambientes feridos, são absorventes, conformam-se bem com a superfície da ferida, são não aderentes e fáceis de usar. O objetivo deste estudo *in vivo* é mensurar a efetividade do curativo à base de colágeno contendo o fotossensibilizador azul de metileno ativado por LED de emissão vermelha, da empresa Revolugenix Biotecnologia, na cicatrização de feridas em um tecido que esteja contaminado por bactérias. O estudo comparou o processo de cicatrização de 32 feridas cutâneas em 8 ratos Wistar. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, escuro (Col, Col+AM) e luz (Col+luz, Col+AM+luz). Cada animal passou pelo procedimento de 4 incisões cirúrgicas cutâneas dorsal no plano coronal de 1cm e curativos com 6 mm de diâmetro (2 de Col e 2 de Col+AM) contaminados com alíquotas de 10 μ L de *Staphylococcus aureus* contendo 1×10^9 ufc/ml foram implantados e a ferida suturada. Para a aplicação da terapia fotodinâmica mediada pelo fotossensibilizador azul de metileno nos animais do grupo luz, a fonte de luz utilizada foi o LED no comprimento de onda na região do vermelho ($\lambda = 660$ nm), seguindo os seguintes parâmetros de irradiação: sessão única no pós-cirúrgico (D0) com duração de 300s, aplicação de modo contínuo, ângulo de 90° em contato com a ferida, área irradiada de 1cm^2 por ferida, densidade de potência de $100\text{mW}/\text{cm}^2$, densidade de energia de $30\text{J}/\text{cm}^2$ por ferida. Nos dias 1, 3, 7 e 10, um animal de cada grupo (escuro e luz) foi eutanasiado com sobredose de anestésico (cetamina:xilazina 500:50 mg/kg) seguido de ruptura do diafragma para confirmação do óbito. Os tecidos circunvizinhos das regiões das feridas foram coletados para as análises microbiológicas e histopatológicas. Os resultados mostram que, clinicamente os animais do grupo luz apresentaram melhor escore de cicatrização, porém, em relação à análise microbiológica, não foram observadas reduções significativas de microrganismos em favor do grupo irradiado.

Palavras-chave: azul de metileno, LED de emissão vermelha, infecção bacteriana

ABSTRACT

PEREIRA, Fernando C. **Evaluation of collagen-based dressing with photoactive drug for post-surgical photodynamic therapy *in vivo***. 2022. 67 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia das Radiações em Ciências da Saúde) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN, São Paulo.

Wound care is a significant and growing problem worldwide. Some pathogenic bacteria can settle in the wounds and promote healing difficulties, especially in cases where it is difficult to keep a protective dressing on the wound or in patients with a factor that hinders healing regularly. Bioactive collagen dressings maintain moisture in wound environments, are absorbent, conform well to the wound surface, are non-adherent and easy to use. The objective of this *in vivo* study is to measure the effectiveness of the collagen-based a dressing containing the methylene blue photosensitizer activated by red emission LED, from the company Revolugenix Biotecnologia, in the healing of wounds where bacteria contaminated the tissue. The study compared the healing process of 32 skin wounds in 8 Wistar rats. The animals were randomly divided into two groups, dark (Col, Col+AM) and light (Col, Col+AM, light). Each animal underwent the procedure of 4 dorsal cutaneous surgical incisions in the coronal plane measuring 1cm and dressings with 6mm in diameter (2 Col and 2 Col+AM) contaminated with 10 μ L Staphylococcus aureus aliquots containing 1×10^9 CFU/ml were implanted, and the sutured was. For the application of photodynamic therapy mediated by the methylene blue the photosensitizer in the animals in the light group, the light source used was the LED at a wavelength in the red region ($\lambda = 660$ nm), following the following irradiation parameters: single session in the postoperative period (D0) lasting 300s, continuous application, angle of 90 degrees in contact with the wound, irradiated area of 1 cm^2 per wound, power density of 100 mW/cm^2 , energy density of 30 J/cm^2 by wound. On days 1, 3, 7 and 10, one animal from each group (dark and light) was euthanized with an overdose of anesthetic (ketamine: xylazine 500:50 mg/kg) followed by diaphragm rupture to confirm death. The surrounding tissues of the wound regions were collected for microbiological and histopathological analyses. The results show that, clinically, the animals in the light group had a better healing score, however, about to with concerning the microbiological analysis, no significant reductions of microorganisms were observed in favor of the irradiated group.

Keywords: methylene blue, red LED, bacterial infection

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tipos de cicatrização de feridas por intenção	17
Figura 2 - Etapas da cicatrização de feridas	18
Figura 3 - Inflamação e reparo do tecido.....	19
Figura 4 - Processo de cicatrização e reparação tecidual nas primeiras 72 horas após a lesão.....	20
Figura 5 - Testes pré-clínicos realizados pela ALS Laboratórios	24
Figura 6 - Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana.....	26
Figura 7 - Posição dos implantes de colágeno e colágeno com azul de metileno	30
Figura 8 - Colágeno com azul de metileno 0,02% m/v	31
Figura 9 - Alíquota de 10 µL do inóculo bacteriano sobre o disco de colágeno	32
Figura 10 - Procedimentos cirúrgicos. A – Anestesia intraperitoneal. B – Molde para marcação dos implantes. C - Colocação de um implante. D – Feridas suturadas. ...	33
Figura 11 - Guia utilizado para irradiar somente as feridas.....	35
Figura 12 - Coleta do tecido para análise microbiológica e histológica	38
Figura 13 - Coleta do tecido em torno da incisão e amostra coletada de tecido para análise microbiológica e histológica	38
Figura 14 - Protocolo de análise microbiológica para contagem de UFC/g.....	40
Figura 15 – Score ASEPSIS grupo luz.....	43
Figura 16 – Escore ASEPSIS do grupo escuro	43
Figura 17 – Imagens das avaliações clínicas das feridas dos animais 1 do grupo escuro e luz no período de 10 dias.	43
Figura 18 - Desfechos distintos de feridas no dia 10.....	44
Figura 19 – Média ± D.P do n.º de microrganismos totais para os animais do grupo escuro	45
Figura 20 - Média ± D.P do n.º de microrganismos totais para os animais do grupo luz	46
Figura 21 - Média ± D.P de <i>S. aureus</i> para os animais do grupo escuro	46
Figura 22 - Média ± D.P do n.º de <i>S. aureus</i> para os animais do grupo luz.....	47
Figura 23 - Escore histopatológico – Σ polimorfos+macofragos+linfócitos do grupo escuro. Cada símbolo representa uma ferida.....	49
Figura 24 - Escore histopatológico – Σ polimorfos+macrófagos+linfócitos do grupo luz. Cada símbolo representa uma ferida.	49
Figura 25 - Escore histopatológico - necrose grupo escuro. Cada símbolo representa uma ferida.	50
Figura 26 - Escore histopatológico – necrose grupo luz. Cada símbolo representa uma ferida.	50
Figura 27 - Escore histopatológico – neovascularização grupo escuro. Cada símbolo representa uma ferida.	51

Figura 28 - Escore histopatológico – neovascularização grupo escuro. Cada símbolo representa uma ferida.	51
Figura 29 - Escore histopatológico – <i>S. aureus</i> grupo escuro. Cada símbolo representa uma ferida.	52
Figura 30 - Escore histopatológico – <i>S. aureus</i> grupo luz. Cada símbolo representa uma ferida.	52
Figura 31- Fotomicrografias de cortes histológicos dos dias 1, 3, 7 e 10 (HE, 200 µm) – grupo escuro	53
Figura 32 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos dias 1, 3, 7 e 10 (HE, 200 µm) – grupo luz.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos subgrupos de estudo	29
Tabela 2 – Parâmetros de irradiação grupo luz.....	34
Tabela 3 - Escore Método ASEPSIS até 14 dias	36
Tabela 4 – Escala de pontuação ASEPSIS para feridas até 14 dias	37
Tabela 5 - Escores da avaliação microscópica baseada em coloração de HE	41
Tabela 6 – Escore ASEPSIS grupo escuro	42
Tabela 7 – Escore ASEPSIS grupo luz	42
Tabela 8 - Massas individuais do grupo escuro e grupo luz.....	44
Tabela 9 – Resultado de análise de lâminas de microscopia para avaliação de resposta inflamatória	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Feridas.....	15
2.2 Classificação das feridas.....	16
2.3 Etapas da cicatrização de feridas	18
2.4 Reparação tecidual de feridas.....	18
2.5 Curativos.....	21
2.6 Classificação dos curativos	22
2.7 Curativo de colágeno da Revolugenix.....	23
2.8 Terapia Fotodinâmica	25
3 OBJETIVOS.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Preparo dos implantes de colágeno	31
4.2 Preparo dos inóculos bacterianos.....	32
4.3 Procedimento cirúrgico	33
4.4 Terapia fotodinâmica	34
4.6 Eutanásia	37
4.7 Análises microbiológicas	39
4.8 Análises histopatológicas	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Avaliações clínicas	42
5.2 Massa corpórea	44
5.3 Contagem microbiológica	45
5.4 Análise histopatológica	47
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	59
8 REFERÊNCIAS.....	60
Anexo I	66

1 INTRODUÇÃO

Milhões de pessoas vivem com feridas crônicas no mundo, e os números estão crescendo. Somente nos Estados Unidos, as feridas crônicas são mais prevalentes entre os 30,3 milhões de americanos diagnosticados com diabetes, que têm 25% de risco de desenvolver uma úlcera no pé. Idade avançada, obesidade, doenças cardíacas e vasculares, tratamento de câncer e lesões traumáticas também podem contribuir para feridas que não cicatrizam (1). Alguns tipos de bactérias podem se instalar em feridas e promover dificuldades de cicatrização, principalmente nos casos em que é difícil manter um curativo protetor sobre a ferida em pacientes com má cicatrização, como em pacientes diabéticos, fumantes ou hospitalizados. As lesões do pé diabético são a causa mais frequente de hospitalização de pacientes com diabetes e amputações de membros inferiores (2). Feridas de difícil cicatrização também ocorrem na osteonecrose asséptica, em pacientes em tratamento com antirreabsortivos, antiangiogênicos usados contra osteoporose, câncer, entre outras patologias (3).

Existe uma gama de curativos antimicrobianos no mercado e escolher entre eles é uma tarefa difícil mesmo para profissionais experientes. Eles estão disponíveis em diferentes formatos e materiais e com diferentes agentes antimicrobianos. São espumas, alginatos, gazes entre outros e idealmente deve-se escolher forma, material e agente antimicrobiano com base em características que colaborem com a cicatrização além de manter a ferida livre de microrganismos (4).

O curativo ideal deve ser biocompatível e servir de estrutura para proliferação das células ligadas ao reparo tecidual, deve se manter em posição durante o processo de cicatrização, mas ser absorvido pelo corpo com o tempo e ser substituído por tecido novo, deve ainda evitar a indução de resistência de microrganismos (5).

Ao manter a atenção contínua nos curativos e bandagens, o risco de infecção e outras complicações é bastante reduzido. Um profissional de saúde pode tomar decisões importantes trocando os curativos, observando o progresso da ferida, bem como fazendo observações de sangramento, temperatura, secreção e cheiro. Em geral, as feridas devem ser limpas uma vez ao dia com desinfetante específico para feridas, água limpa ou soro fisiológico, além da aplicação de curativos limpos (6).

Um mito potencialmente perigoso é que as feridas cicatrizam mais rápido se deixadas descobertas, o que simplesmente não é verdade (7). Cobrir a ferida durante o processo de cicatrização acelera o processo de cicatrização. Além disso, o curativo mantido adequadamente fornece proteção adicional contra infecções. Manter a ferida úmida durante o processo de cicatrização ajuda a minimizar as cicatrizes, evitando a formação de crostas duras. Pomadas antibióticas – e outras opções de tratamento recomendadas pelo médico – aplicadas durante os estágios iniciais da cicatrização manterão a pele ao redor da ferida úmida e flexível (8).

Colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular e está naturalmente presente em tecidos humanos, como pele, ossos, cartilagem, tendão e ligamentos. Este biopolímero interage com as células e regula a ancoragem, migração, proliferação e sobrevivência celulares (9). O colágeno é um biomaterial amplamente utilizado em curativos devido à sua biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, estrutura polimérica adequada e por ser reabsorvível (10),(11).

O colágeno desempenha um papel crucial em todas as fases de cicatrização de feridas. A molécula exógena de proteína tripla hélice ajuda a compor um meio para crescimento celular, simulando em parte a matriz extracelular (ECM). Em um ambiente de ferida perfeito, essas fases de cicatrização ocorrem de forma organizada (hemostasia, inflamatória, proliferativa, remodelação). Após o desbridamento e limpeza da ferida aplica-se o colágeno, que durante a cicatrização no local, servirá de condutor e suporte para células como fibroblastos e queratinócitos, criando angiogênese e reepitelização (12) e portanto, fornecendo uma estrutura natural para fibras de colágeno recém-formadas e tecido de granulação dentro do leito da ferida. Isoladamente, o colágeno não tem propriedades antimicrobianas e, portanto, é preciso associá-lo a algum agente deste tipo para que haja um bom controle do biofilme e biocarga (13).

O azul de metileno (AM), também conhecido como cloreto de metiltionínio, é um fotosensibilizador (FS) com banda de absorção na região vermelha do espectro com pico em 660 nm (14),(15). O AM vem sendo utilizado na odontologia como um fármaco potente para o tratamento fotodinâmico local de doenças periodontais (16). Sua ampla utilização é devida à sua eficiência contra um amplo espectro de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus (17),(18). Diferentes concentrações de AM são reportadas na literatura, no entanto, o AM na concentração

de até 1% pode ser usado topicamente seguindo notificação simplificada de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) , da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) - RDC 199/2006 (19), o que facilita seu uso clínico.

A terapia fotodinâmica (TFD ou *Photo Dynamic Therapy* - PDT) é uma modalidade de fototerapia na qual três fatores atuam concomitantemente: o fotossensibilizador (fármaco fotoativo), a fonte de luz e o oxigênio (20),(21). A aplicação clínica mais explorada pela TFD na literatura concentra-se em infecções dentárias e dermatológicas, cicatrização de feridas e desinfecção de dispositivos médicos, por serem infecções tóxicas e contaminações tóxicas ou superficiais (22).

A TFD oferece vantagens como um amplo espectro de ação, sendo eficiente inclusive sobre microrganismos resistentes a antimicrobianos e promove menos efeitos adversos quando comparada a outros tratamentos (23). A TFD como tratamento adjuvante apresenta na literatura muitas vantagens: repetição sem resistência bacteriana ao fármaco e sem efeitos tóxicos cumulativos; pode ser utilizada em conjunto com outras terapias; tem dupla seletividade: não apenas o fotossensibilizador pode ser direcionado para as células ou tecido doente, mas também a luz é precisamente focalizada no local da lesão (24). Além disso, terapias não térmicas baseadas em luz que usam luz visível podem induzir respostas biológicas sem efeitos significativos de aquecimento.

O mercado carece de um produto terapêutico que ajude a acelerar a cicatrização dessas feridas. Este trabalho propõe a adição do fotossensibilizador (fármaco fotoativo) azul de metileno, em concentrações não tóxicas, no colágeno bovino tipo I da Revolugenix para que seja possível a redução da carga microbiana por terapia fotodinâmica, e conseqüentemente diminuir a morbidade causada por essa patologia. Não foram encontrados no mercado brasileiro ou mundial, produtos comercialmente disponíveis e aprovados por agência sanitária à base de colágeno conjugado com azul de metileno para ser utilizado em terapia fotodinâmica; portanto, o produto em desenvolvimento pela Revolugenix é inovador e possui características únicas, e pretende reduzir o uso de antibióticos e evitar o surgimento de novas cepas de bactérias resistentes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Feridas

O tratamento de feridas é um problema significativo e crescente em todo o mundo. Feridas crônicas impactam na qualidade de vida e os impactos econômicos são significativos (25). De acordo com o relatório sobre mercado global de tratamentos de feridas, o mercado deve atingir US\$ 27,8 bilhões até 2026, contra US\$ 19,3 bilhões previstos em 2021. Nos Estados Unidos cerca de 7 milhões de pessoas convivem com uma ferida crônica. Feridas e/ou úlceras de pressão correspondem a 43% dos casos, seguido de úlceras de pé diabético com 31%, úlceras venosas com 12%, feridas cirúrgicas ou trauma com 8% e finalmente úlceras arteriais com 6% dos casos. Um estudo avaliou os custos individuais com feridas nos Estados Unidos, o maior mercado global, e estimou que o gasto médio por paciente foi de US\$ 3.859 (26).

O crescimento do mercado é em grande parte impulsionado por fatores como a crescente prevalência de doenças crônicas que resultam em feridas crônicas, cirúrgicas, agudas e traumáticas; aumento dos gastos com feridas crônicas; aumento do uso de medicina regenerativa no manejo de feridas e avanços tecnológicos (27).

A pele desempenha um papel essencial como barreira protetora contra patógenos, perda de água, bem como agressões químicas e físicas (28). Uma ferida na pele resulta da quebra da integridade da camada epidérmica e que qualquer lesão tecidual com ruptura da integridade anatômica com perda funcional pode ser descrita como ferida (29). Outros autores definem que uma descontinuidade do tecido epitelial, das mucosas e órgãos resultam numa ferida e as causas dessa descontinuidade pode ser causada por fatores extrínsecos, como incisão cirúrgica, com feridas provocadas intencionalmente por incisão, excisão ou punção; traumática, com feridas provocadas acidentalmente por agente mecânico, químico ou físico; e por fatores intrínsecos; as ulcerativas, relacionadas a doenças facilitadoras ou causadoras da ferida, como exemplo, diabete mellitus (30).

2.2 Classificação das feridas

O tempo é um fator importante no reparo de feridas e de acordo com o tempo de cura, uma ferida pode ser categorizada clinicamente como aguda ou crônica (31). Uma ferida aguda se repara e prossegue normalmente um caminho de cicatrização oportuno e ordenado, com resultado final tanto funcional quanto anatômico. No entanto, uma ferida crônica não progride através das etapas normais de cura e demandam um tempo de cicatrização maior do que esperado devido a sua etiologia (fator causal), e não apresentam a fase de regeneração no tempo esperado, retardando a cicatrização (32).

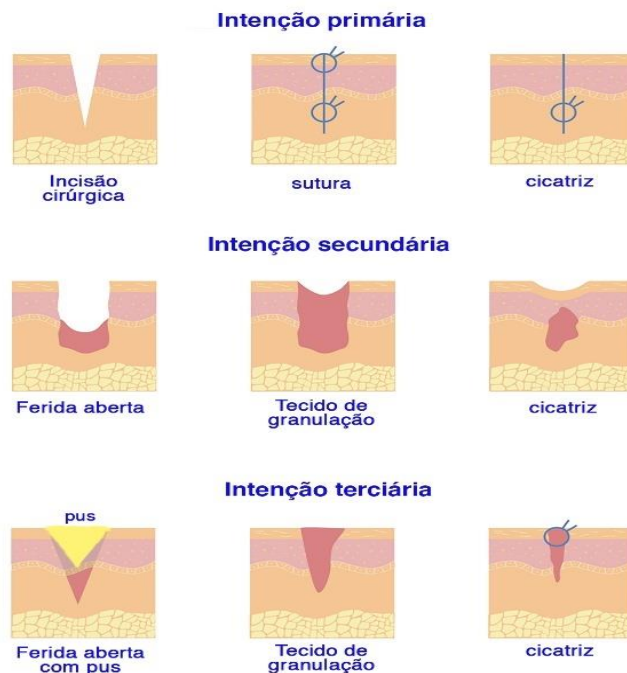
Alguns autores incluem uma outra categoria de feridas, as complexas, geralmente associada a combinação de um defeito tecidual com uma infecção. O desenvolvimento ou não de uma infecção manifesta depende da virulência, número e tipo de microrganismos, bem como do suprimento sanguíneo local e da resistência inerente do paciente. Nesta categoria são necessárias intervenções nos fatores causais e o uso de tecnologias adjuvantes podem auxiliar no tratamento. O papel de diferentes terapias adjuvantes para melhorar o processo de cicatrização são investigados. Essas terapias incluem eletroterapia, oxigênio hiperbárico, infravermelho, ultravioleta, irradiação com laser de baixa potência, irradiação com LED, terapia fotodinâmica, ultrassom, agentes tópicos variados e outras drogas sistêmicas diferentes dos antibióticos, como vasodilatadores, inibidores de serotonina e agentes fibrinolíticos (33).

As feridas também são classificadas como de tipos abertas e tipos fechadas. A aberta é uma lesão onde a borda da pele estão afastadas e podem ser incisas ou cortantes, perfurante, escoriação, laceração, contusa e queimadura. As fechadas são aquelas que as bordas da pele estão justapostas e seus exemplos incluem contusões, e esmagamento do ferimento.

Existem três tipos de cicatrização ou formas pelas quais uma ferida pode cicatrizar (figura 1) que dependem da quantidade de tecido lesado ou danificado e da presença ou não de infecção. São as cicatrizações de primeira intenção, segunda intenção e terceira intenção. Na cicatrização de primeira intenção, as bordas da ferida são aproximadas com suturas, grampos ou adesivos dentro de horas após sua criação sem nenhum defeito. Isso permite que o fechamento ocorra rapidamente com tecido

mínimo necessário para reparar o defeito e cicatrizes mínimas. Na cicatrização de segunda intenção, a ferida é deixada aberta e nenhum fechamento formal é feito. A cicatrização ocorre por epitelização e contração, geralmente associadas a uma ferida grande e/ou profunda onde as bordas do tecido não podem ser aproximadas. Diferentemente da cicatrização por segunda intenção, a cicatrização de terceira intenção é quando a ferida é fechada depois de um tempo aberta e isso geralmente é empregado para feridas infectadas. O fechamento da ferida é retardado por vários dias até que haja diminuição do edema ou infecção ou para permitir a retirada de exsudato. Outra classificação das feridas é sobre o grau de contaminação, podendo ser classificadas como limpas, contaminadas e feridas infectadas.

Figura 1 - Tipos de cicatrização de feridas por intenção

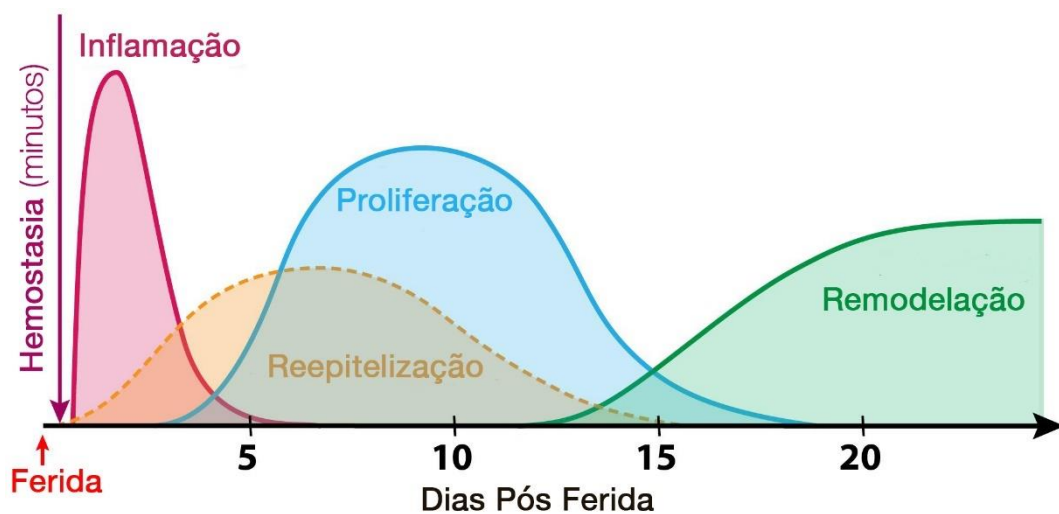


Independente da causa, as feridas cicatrizam de maneira muito semelhante e estudar como esse processo pode ser otimizado continua sendo o foco do sistema de saúde. Na próxima seção são descritas as principais etapas do processo de cicatrização de uma ferida.

2.3 Etapas da cicatrização de feridas

A divisão clássica das etapas da cicatrização de feridas (figura 2) é dividida nas seguintes fases: coagulação ou hemostasia, onde se forma um coágulo de fibrina. A fase inflamatória, onde células imunes, como neutrófilos e monócitos, se infiltram no local da lesão para atacar patógenos e limpar detritos. Na fase seguinte, a de proliferação, envolve a multiplicação de células residentes, como queratinócitos e fibroblastos, que contribuem para a formação do tecido de granulação. Através de uma matriz de células imunes e a eventual formação de uma rede de colágeno por fibroblastos e miofibroblastos, a nova matriz extracelular se forma. Finalmente, a fase de remodelagem consiste em apoptose, pois as células não são mais necessárias e as estruturas em excesso são quebradas nos esforços de restaurar a arquitetura original (34),(35).

Figura 2 - Etapas da cicatrização de feridas



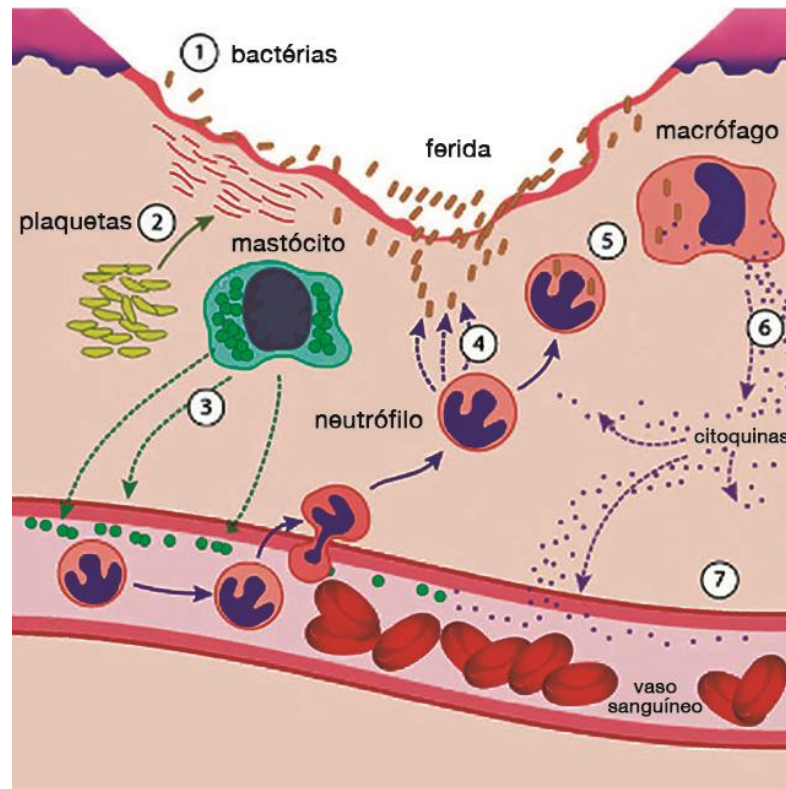
Fonte: Elaboração própria

2.4 Reparação tecidual de feridas

Após a lesão da pele, ocorre uma sequência de eventos moleculares e celulares a fim de restaurar o tecido danificado (36). A lesão tecidual desencadeia

uma cascata de atividades celulares e bioquímicas que leva à cicatrização da ferida, conforme figura 3.

Figura 3 - Inflamação e reparo do tecido



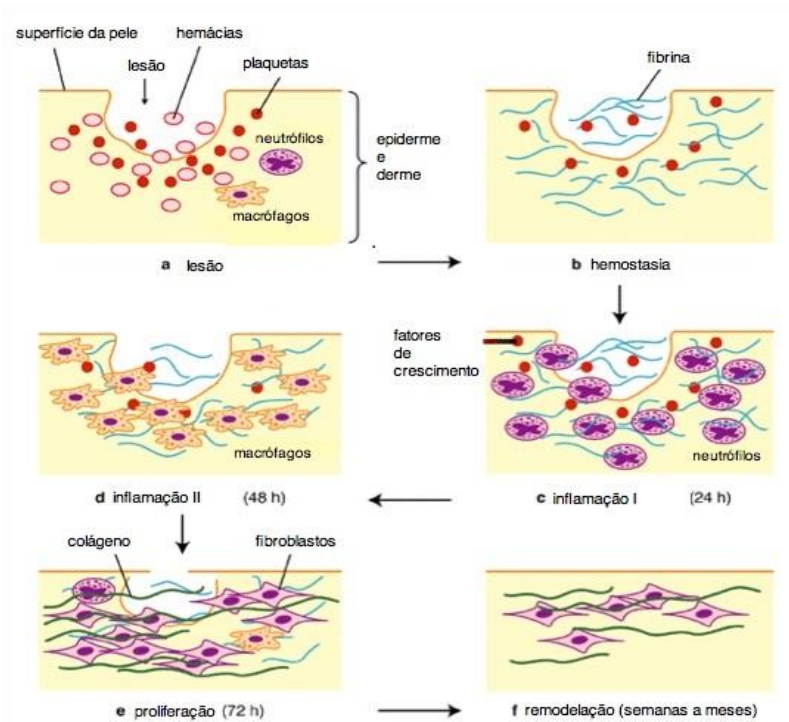
Fonte: 123rf.com – licença de uso adquirida

A inflamação e o reparo do tecido seguem as seguintes etapas: 1 - Após ocorrência da ferida, as bactérias e outros patógenos entram na ferida. 2 - Na próxima etapa as plaquetas sanguíneas liberam proteínas de coagulação sanguínea no local da ferida. 3 - Os mastócitos secretam fatores que medeiam a vasodilatação e a constrição vascular. Aumenta o suprimento de sangue, plasma e células para a área lesada. 4 - Os neutrófilos secretam fatores que matam e degradam patógenos. 5 - Neutrófilos e macrófagos matam patógenos por fagocitose. 6 - Os macrófagos secretam hormônios chamados citocinas que atraem células do sistema imunológico para o local e ativam as células envolvidas no reparo tecidual. 7 - Finalmente, os macrófagos secretam metaloproteases de matriz que removem o excesso de colágeno, e o colágeno imaturo remanescente amadurece para finalizar a matriz extracelular (MEC).

O impacto da lesão tecidual resulta numa mudança na permeabilidade vascular concentrando células polimorfonucleares (PMN), também conhecidos como neutrófilos, e monócitos na área da lesão. Os neutrófilos são células produzidas na medula óssea e tem fluxo livre dentro da corrente sanguínea, elas fagocitam detritos e bactérias e sua infiltração no local da lesão tende a cessar após alguns dias, eles sofrem apoptose e são englobados e degradados por macrófagos (37).

Os macrófagos são recrutados pelo sangue e apresentam capacidade fagocítica e atuam como células apresentadoras de antígenos e fontes de fatores de crescimento e mediadores bioquímicos, que ditam e sustentam o processo de cicatrização. São responsáveis por fagocitar bactérias, debridar corpos estranhos e ativar o desenvolvimento de tecido de granulação (38). A figura 4 ilustra o processo de cicatrização e reparação tecidual nas primeiras 72 horas.

Figura 4 - Processo de cicatrização e reparação tecidual nas primeiras 72 horas após a lesão



Fonte: (Adaptado de BEANES et al., 2003)(39)

O reparo da ferida pode ser simples e muitas vezes realizado pelo próprio paciente ou pode ser complexo o suficiente para justificar cirurgia e hospitalização. Um tratamento eficaz requer uma compreensão completa dos tipos de feridas e

mecanismos de cicatrização e conhecimento das intervenções disponíveis e que, idealmente, ajudariam no processo de reparação.

2.5 Curativos

O curativo é considerado uma parte essencial para qualquer tratamento de feridas e para que esse curativo seja considerado ideal, ele deve englobar as seguintes características: manter alta a umidade entre a ferida e o curativo, remover o excesso de exsudação. evitar a maceração dos tecidos próximos, permitir troca gasosa, fornecer isolamento térmico, ser impermeável as bactérias, estar isento de substâncias tóxicas e permitir a sua retirada ou troca sem ocasionar lesão por aderência (40).

Diferentes estudos convergem que não existe um curativo universal que funcione para todos os tipos de feridas e que a escolha do curativo mais adequado para o tratamento de uma ferida deve ser decidida caso a caso e considerar fatores como: localização da lesão, tamanho, profundidade da ferida, quantidade de exsudatos, infecção, frequência e dificuldade de troca do curativo, custo e conforto.(41),(42).

A experiência do profissional na escolha de um curativo é uma etapa fundamental no tratamento de feridas. Como são muitas as opções de curativo no mercado, o profissional deve escolher o curativo levando em consideração a composição, o mecanismo de ação, indicação de uso, contraindicação, periodicidade de troca, vantagens e desvantagens de cada curativo e principalmente o custo do produto pois em caso de necessidade de continuidade do tratamento fora de um ambiente clínico e/ou hospitalar, o paciente depende do seu poder aquisitivo para continuidade do tratamento, cobertura do plano de saúde, atendimento domiciliar, ou da disponibilidade gratuita desse curativo no sistema de saúde público (42). As opções de tratamento são descritas sem que nenhum tratamento único seja universalmente eficaz devido aos múltiplos eventos moleculares e celulares envolvidos, de modo que é necessária uma combinação de diferentes terapias (43).

Na medida que se observa um crescimento promissor de tratamento de feridas e sua cura, surgem no mercado produtos inovadores e novas abordagens terapêuticas no tratamento de feridas. A compreensão das diferentes fases de reparação tecidual

de feridas e como esses curativos são classificados é uma etapa necessária para o estudo e desenvolvimento de novos curativos.

2.6 Classificação dos curativos

A principal função do curativo é criar uma barreira física entre a ferida e o ambiente da lesão. De modo geral os curativos são classificados em cinco categorias: tradicionais / passivos, interativos, bioativos, substitutos de pele e enxertos dérmicos (44).

Os curativos tradicionais/passivos protegem as lesões de substâncias estranhas ou contaminação, estancam o sangramento, amortecem a lesão e absorvem o exsudato da ferida. Os principais curativos desse grupo são: gaze, algodão e esparadrapo e bandagens (44),(45),(46). Alguns desses curativos apresentam deficiências, como vazamento de exsudato da ferida, resultando em infecções bacterianas e danos à pele durante a remoção (47).

Os curativos interativos como filmes, géis, espumas, sprays, membranas e adesivos transdérmicos, agem como uma barreira contra a invasão bacteriana, fornecem um ambiente úmido e melhoram a permeação gasosa na ferida. Esses curativos também podem ser carregados de agentes bioativos (48),(49).

Os bioativos como hidrocoloides, esponjas, espumas, nanofibras, hidrogéis, colágeno e filmes, que são carregados com agentes bioativos, são biodegradáveis, e biocompatíveis e podem atuar como sistema de administração de drogas para agentes terapêuticos como nanopartículas, antibióticos, vitaminas, e fotossensibilizadores, para um melhor processo de reparo do tecido da ferida (50),(51).

Os substitutos de pele têm a função de substituir a pele danificada. São compostos por engenharia de tecidos geralmente decorrentes de um processo de cultura de células ou de materiais com estrutura de células semeadas e são considerados muito eficazes no reparo tecidual. No entanto, na literatura, eles podem causar infecções de feridas, transmitir doenças, podem ser rejeitados pelo organismo, são caros e têm prazo de validade muito limitado (49).

Curativos considerados enxertos dérmicos são utilizados em uma variedade de problemas clínicos com as feridas traumáticas, reconstruções de pele em

queimaduras, defeitos após ressecção oncológica, vitiligo, liberação da contratatura cicatricial e restauração capilar (44). São exemplos dessa categoria, autoenxerto, onde a pele é retirada de uma região saudável do paciente para a área lesionada do mesmo paciente; aloenxerto, onde o paciente recebe um enxerto de outro paciente doador e xenoenxerto, a pele recebe um enxerto de indivíduo de outra espécie, geralmente de origem porcina.

Os curativos podem ainda ser classificados como: oclusivo – onde não permite trocas entre a ferida e o ambiente, impede a entrada de ar e absorve completamente os fluidos. Os do tipo semioclusivo, que permite que a ferida respire e faça a captação do exsudato, mantendo os líquidos eliminados fora do contato com a ferida. Os do tipo compressivo, que restringem o fluxo sanguíneo na região da ferida e facilita a aproximação das bordas da lesão do tecido e a do tipo aberto, onde as feridas são limpas, recebem a medicação e o local da lesão não é coberta (40).

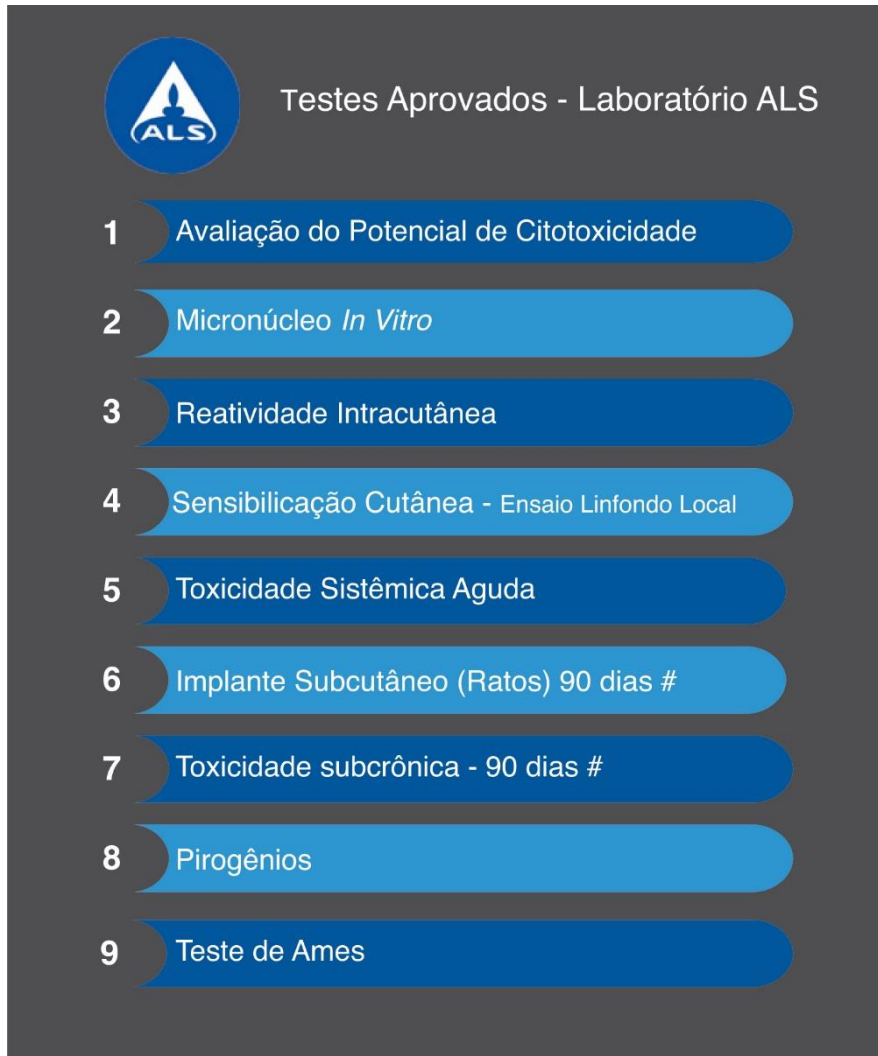
2.7 Curativo de colágeno da Revolugenix

O colágeno utilizado na produção do curativo é de origem alimentar e certificado pelo Ministério da Agricultura do Brasil e, portanto, atende a todas as normas sanitárias. O colágeno foi irradiado no Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN antes de entrar na cadeia produtiva. A transformação do colágeno alimentar em um hidrogel passa por um protocolo de purificação desenvolvido pela empresa que confere ao hidrogel aplicabilidades distintas. O produto em gel fabricado com colágeno bovino tipo I serve de base para culturas de células humanas e animais para pesquisa e desenvolvimento, bem como base para curativos, aceitando a adição de medicamentos tradicionais e nanoestruturados, sendo reabsorvido pelo organismo. A composição do curativo reticulado é de 10% de colágeno e 90% água.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária recomenda que os testes pré clínicos de produtos médicos sejam realizados em laboratórios credenciados a Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS). O laboratório credenciado a REBLAS que realizou 9 testes pré clínicos com o colágeno da Revolugenix foi o ALS Laboratórios Ltda (Brasil- São Paulo). Além da ANVISA, os testes realizados pela ALS são reconhecidos pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) e pela Agência Europeia

de Medicamentos (EMA). Os 9 testes pré-clínicos (Figura 5) com o colágeno em gel foram aprovados e seus relatórios emitidos em português e inglês.

Figura 5 - Testes pré-clínicos realizados pela ALS Laboratórios



Os testes realizados foram:

Avaliação do potencial de citotoxicidade avaliou o potencial citotóxico do colágeno em um sistema in vitro usando a linha celular V79-4.

Micronúcleo in vitro avaliou o potencial genotóxico do colágeno em um sistema in vitro usando a linha celular V79-4.

Reatividade intracutânea avaliou a resposta local do colágeno na pele de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), após injeção intracutânea.

Ensaio de linfonodos locais (LLNA) em coelhos. As informações sobre os efeitos sensibilizantes são baseadas na informação de que o teste de sensibilização

do colágeno induz a proliferação de linfócitos nos gânglios linfáticos próximos ao campo de aplicação. A proliferação de linfócitos foi avaliada pela determinação da incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina, no DNA das células do linfonodo.

Teste de Toxicidade Sistêmica Aguda para ratos (*Rattus norvegicus*) avaliou a resposta sistêmica após administração única, por via intraperitoneal, do colágeno.

Teste de implante subcutâneo (90 dias) em ratos (*Rattus norvegicus*) avaliou os locais decorrentes da exposição por 90 dias ao implante subcutâneo do colágeno em ratos, por meio de análises anatomopatológicas quando comparados ao item controle ou referência.

Teste de Toxicidade Sistêmica Subcrônica (90 dias) em (*Rattus norvegicus*) presente estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos tóxicos e sistêmicos decorrentes da exposição ao item teste implante subcutâneo por 90 dias em ratos, por meio de observações clínicas diárias, peso corporal semanal, consumo alimentar, exame oftalmológico, avaliações hematológicas, avaliações bioquímicas e análise anatomopatológica quando comparado ao item de controle ou referência.

Teste de Pirogênios teve como objetivo obter informações sobre o aumento da temperatura corporal de coelhos após injeção intravenosa do item testado para detectar a presença ou ausência de pirogênios.

Teste de Ames (Mutaç o Bacteriana Reversa) ou atividade mutagênica, no teste de muta o bacteriana reversa, utilizando cinco cepas testadoras mutantes deficientes em histidina (his-) de *Salmonella Typhimurium*: TA98, TA100, TA102, TA1535 e TA1537.

A partir do colágeno aprovado em testes pré clínicos, a empresa fez a adi o do azul de metileno (Synth – C.I.52.015 - P.A) na concentra o de 0,02% (massa/volume) no colágeno e o produto em desenvolvimento foi irradiado no Centro de Tecnologia das Radia es do IPEN para garantir a esterilidade do produto.

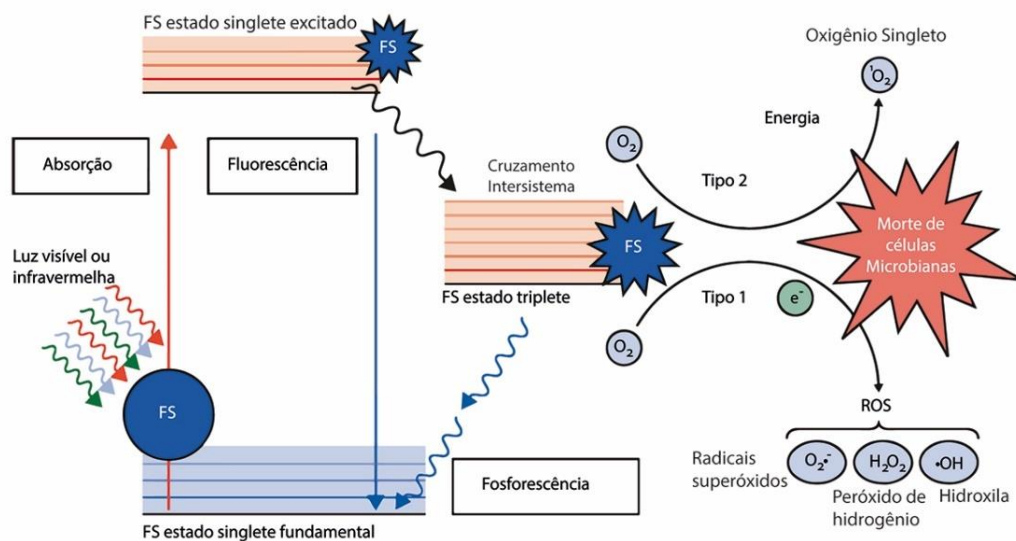
2.8 Terapia Fotodinâmica

A Organiza o Mundial da Sa de estima que aproximadamente 700.000 pessoas morram todos os anos de infec es n o trat veis, causadas por superbact rias. Em 2050, essas mortes podem atingir a assustadora marca de 10

milhões (52). Uma das maiores barreiras às infecções resistentes a antibióticos é que elas adicionam custos significativos ao sistema de saúde já sobrecarregado de qualquer nação. Assim, abriram-se caminhos para outras formas de combater as infecções e a terapia fotodinâmica tem se destacado com o objetivo de inativar não apenas bactérias, mas também fungos, protozoários e vírus. É uma técnica promissora, inclusive no tratamento de doenças que já apresentam resistência antimicrobiana(52).

A TFD consiste em um processo que combina a aplicação localizada de um fotossensibilizador (FS), em um tecido ou célula doente, e iluminação subsequente com luz com um comprimento de onda específico que seja absorvida pelo FS para produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), que são capazes de matar células-alvo (Figura 6) (20)(53) via estresse oxidativo na membrana e outros componentes celulares de fungos, bactérias, vírus e protozoários (54), (55).

Figura 6 - Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana



Fonte: Adaptado de: <https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099%2816%2930268-7/fulltext> (53)

Nesse processo, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode seguir duas vias alternativas após a ativação da luz por um determinado fotossensibilizador. O FS pode absorver um fóton no estado fundamental, indo para um estado singleto excitado. Este estado pode sofrer cruzamento intersistema para um estado tripleto de vida mais longa, que pode interagir com o oxigênio por dois

mecanismos: no tipo 1, por transferência de elétron do FS excitado; ou tipo 2, o por transferência de energia com o oxigênio no estado fundamental tripleto, levando a formação de oxigênio singleto. As EROs geradas reagem rapidamente com seu ambiente, dependendo da localização do FS excitado, por exemplo, paredes celulares de microrganismos, membranas lipídicas, peptídeos e ácidos nucléicos.

Pesquisadores que investigaram o uso da TFD para cicatrização de feridas cutâneas em humanos relatam que TFD contribuiu de diversas formas para a cicatrização de feridas: redução na carga microbiana, redução ou aumento da inflamação, proliferação de fibroblastos e conseqüentemente de colágeno e elastina e por fim, aumento do fator transformador beta e metaloproteínas (56),(57). Outros autores destacam que a TFD proporcionou resultados satisfatórios no processo de cicatrização das feridas atuando em diversas etapas e acelerando o reparo tecidual (58).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo deste estudo *in vivo* é avaliar a efetividade do curativo à base de colágeno contendo o fotossensibilizador azul de metileno ativado por *LED* de emissão vermelha, da empresa Revolugenix Biotecnologia, na cicatrização de feridas infectadas por bactérias.

Objetivos específicos

- Desenvolver um modelo de feridas infectadas em ratos;
- Avaliar o processo de cicatrização tecidual macroscopicamente;
- Avaliar a carga bacteriana das feridas;
- Avaliar o processo de cicatrização por análise histológica;
- Identificar possíveis mudanças metodológicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório da Revolugenix Biotecnologia e no Laboratório de Terapia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações, que dispõem de toda infraestrutura necessária para o desenvolvimento e realização dos procedimentos experimentais.

Após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CEUA-IPEN), registrada com o número 13/21, foram fornecidos pelo Biotério do IPEN/CNEN-SP, 8 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com 8 semanas de vida, que foram aclimatados em isoladores acomodados em estantes ventiladas durante uma semana antes do início dos experimentos, sendo mantidos em ciclo de claro/escuro de 12/12 h, temperatura ambiente entre 20 e 26°C e recebendo ração e água ad libitum. Todos os procedimentos realizados nos animais obedeceram aos princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Posteriormente ao período de aclimação, os animais foram divididos aleatoriamente através de sorteio em 2 grupos, escuro e luz, divididos em 4 subgrupos, conforme a tabela 1.

Tabela 1 - Descrição dos subgrupos de estudo

Subgrupos	Incisão Cirúrgica	Infecção	Colágeno	Colágeno + AM	Luz
COL	+	+	+	-	-
COL + AM	+	+	-	+	-
COL + LUZ	+	+	+	-	+
COL + AM + LUZ	+	+	-	+	+

Fonte: Elaboração própria

Para o grupo escuro, os dois subgrupos ficaram divididos da seguinte forma:

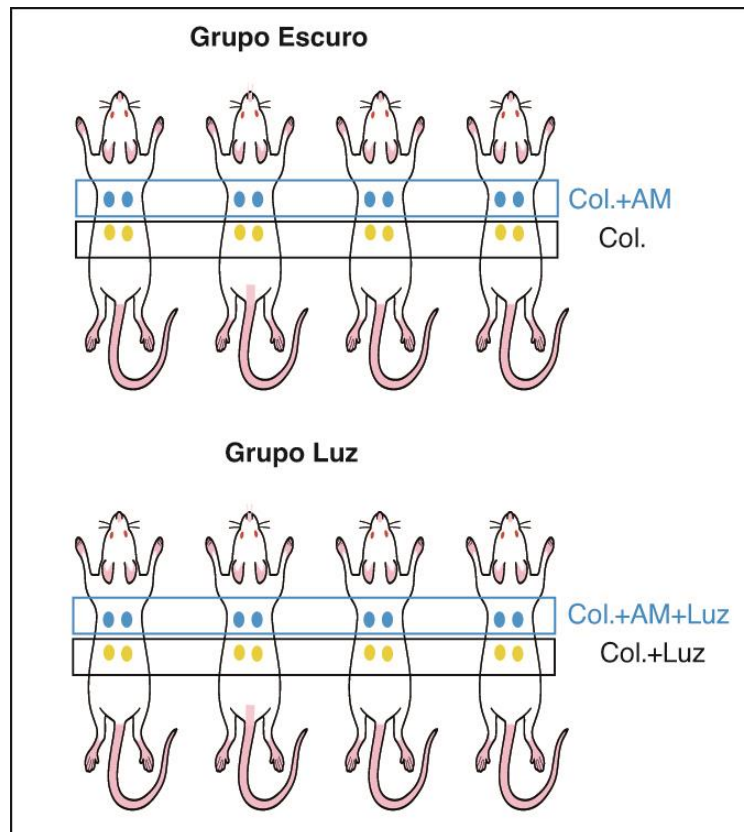
- COL: incisão cirúrgica, infecção e implante de colágeno.
- COL+AM: incisão cirúrgica, infecção e implante de colágeno com azul de metileno.

Para o grupo Luz, os dois subgrupos ficaram divididos da seguinte forma:

- COL+LUZ: incisão cirúrgica, infecção e implante de colágeno+ irradiação com LED.
- COL+AM+LUZ: incisão cirúrgica, infecção e implante de colágeno com azul de metileno e irradiação com LED.

Os animais foram identificados e enumerados com marcas na cauda, utilizando canetas permanentes atóxicas e sem cheiro na cor preta para o grupo escuro e azul para o grupo luz. Os animais passaram por procedimento cirúrgico e cada animal submetido a 4 incisões cirúrgicas cutânea dorsal (1 cm), totalizando n de feridas =8 por cada subgrupo. Antes da cirurgia, cada implante foi infectado com um inóculo bacteriano de *Staphylococcus aureus* e os implantes de colágeno e colágeno + azul de metileno foram implantados de acordo com a ilustração da figura 7.

Figura 7 - Posição dos implantes de colágeno e colágeno com azul de metileno



Fonte: Elaboração própria

4.1 Preparo dos implantes de colágeno

Discos de colágeno e de colágeno com azul de metileno (concentração de 0,02% de AM m/v) foram fornecidos pela empresa Revolugenix (Figura 8). Os espécimes foram entregues embalados a vácuo individualmente em placa de Petri de 3 cm de diâmetro contendo 2 ml de colágeno reticulado. Os colágenos foram irradiados no Centro de Tecnologia das Radiações por radiação gama com 16 KGy para garantir a esterilidade do material antes da implantação. Em condições assépticas e em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de um punch de 6 mm de diâmetro foram cortados discos do colágeno com e sem o AM.

Figura 8 - Colágeno com azul de metileno 0,02% m/v



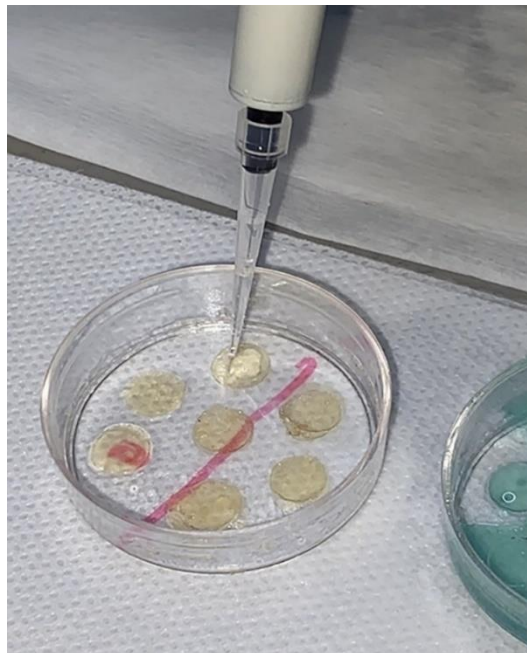
Fonte: Elaboração própria

4.2 Preparo dos inóculos bacterianos

No preparo do inóculo foi utilizada uma cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 29523, incubada em estufa de cultura bacteriológica a 37°C durante 20 horas de crescimento, em um tubo Falcon de 15 ml com 9 ml de meio de cultura em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI). Previamente à cirurgia, foi preparado o inóculo de uma suspensão bacteriana em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Para isso, foram realizadas duas lavagens em PBS. O meio de cultura contendo as bactérias foi centrifugado a 1.500 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de bactérias foi ressuscitado em PBS, homogeneizado no vórtex e centrifugado por 10 min. Depois da segunda lavagem, foi realizada a resssuspensão em 200 µl. A concentração do inóculo bacteriano foi padronizada, através do ajuste de 21,5% de transmitância em espectrofotômetro em $\lambda=600$ nm para se determinar a concentração de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de 10^9 UFC/ml.

Para contaminação dos implantes de colágeno, foram depositadas alíquotas de 10 µL da suspensão de *S. aureus* em PBS contendo 1×10^9 UFC/ml sobre cada disco de implante do grupo controle e grupo luz, conforme figura 9.

Figura 9 - Alíquota de 10 µL do inóculo bacteriano sobre o disco de colágeno

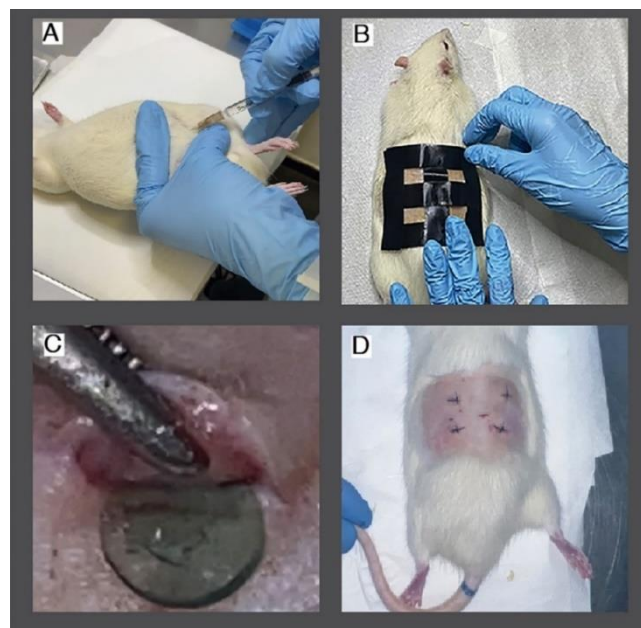


Fonte: Elaboração própria

4.3 Procedimento cirúrgico

Para a realização das cirurgias, os animais foram submetidos à sedação por via inalatória com isoflurano 3-5% volume (Isoforune – Critéria – Brasil) e mantidos a 1-2%. A região da incisão foi tricotomizada com equipamento apropriado e para antisepsia da pele foi utilizado uma solução de clorexidina 0,12% (Periogard solução – Colgate – Brasil). Para aprofundamento anestésico e analgesia dos animais, o protocolo seguido de anestesia foi a administração intraperitoneal (ip) de cloridato de cetamina 10% (Cetamin – Syntec – Brasil) na dose de (100mg/kg) + cloridato de xilazina 2% (Xilazin – Syntec – Brasil) na dose de (10mg/kg) e também a administração subcutânea do anestésico local de Mepvacaína 3% (Mepsiv 3% - DFL – Brasil). Após a perda de sensação dolorosa e constatação da sedação, observada pela perda do reflexo após pinçamento do espaço interdigital das patas traseiras e/ou da cauda do animal, foi realizada a incisão cirúrgica cutânea dorsal no plano coronal (1 cm) e divulsionamento do tecido subcutâneo para introdução dos implantes de colágeno (Figura 10). Foram realizadas 4 incisões em cada animal, correspondente a cada subgrupo.

Figura 10 - Procedimentos cirúrgicos. A – Anestesia intraperitoneal. B – Molde para marcação dos implantes. C - Colocação de um implante. D – Feridas suturadas.



Fonte: Elaboração própria

Após a implantação dos discos de colágeno contaminado com *Staphylococcus aureus*, as incisões foram suturadas com fio agulhado Nylon 4.0 (MT Circ. TRG ½ – Shalon - Brasil). Os animais foram monitorados durante 10 dias quanto ao processo de cicatrização da incisão cirúrgica. Para analgesia foi administrada dipirona sódica (50–150 mg/Kg) na água das gaiolas por até 3 dias dependendo do quadro de evolução de cada animal. Os procedimentos cirúrgicos nos animais dos grupos experimentais e controles foram realizados nas mesmas condições, dimensões e nas mesmas regiões escolhidas.

4.4 Terapia fotodinâmica

Para irradiação do grupo Luz, foi utilizada uma fonte baseada em LEDs (LedBox, Biolambda Científica, Brasil) no comprimento de onda na região do vermelho ($\lambda=660$ nm), nos parâmetros apresentados na tabela 2 abaixo:

Tabela 2 – Parâmetros de irradiação grupo luz

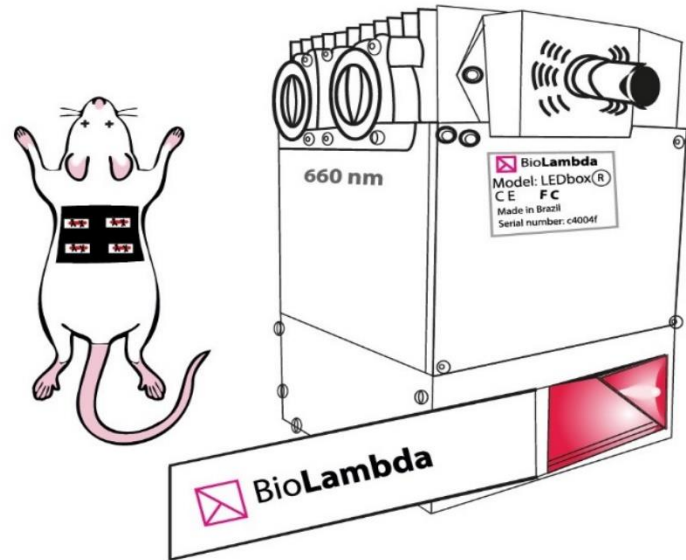
Comprimento de onda	660 nm
Modo	Contínuo
Área de irradiação	1 cm ² por ferida
Densidade de potência	100 mW/cm ²
Densidade de energia	30 J/cm ² por ferida
Tempo de irradiação	300 s por ferida
Energia total	30 J por ferida
Ângulo de aplicação	90°
Distância do alvo	Em contato direto
Sessões de irradiação	Dia 0

Fonte: Elaboração própria

Para a irradiação, os animais foram colocados sob sedação ventilatória (isoflurano a 2,5%). A seguir, foi posicionado uma guia (Figura 11) para deixar somente as feridas descobertas para serem irradiadas e cada animal, um de cada vez, posicionado no LedBox, com a ferida em contato com a fonte de luz para ser irradiado

em única sessão de 300 s. Os animais dos grupos controle, que não foram irradiados, passaram pelos mesmos procedimentos de sedação e posicionamento sob a fonte de luz, sendo o equipamento mantido desligado durante o tempo da sessão (300 s).

Figura 11 - Guia utilizado para irradiar somente as feridas



Fonte: Elaboração própria

O tempo de pré irradiação, ou seja, entre a colocação do implante e a sessão de irradiação, foi de aproximadamente 3 horas para os primeiros animais suturados.

4.5 Monitoramento clínico dos animais

Os animais foram acompanhados diariamente para monitoramento dos sinais clínicos, incluindo aferição da massa corporal, tamanho e características das lesões (sinais de inflamação e infecção) utilizando o método de pontuação ASEPSIS (59) para monitoramento das feridas no pós-operatório, sendo realizadas intervenções para aumentar o conforto dos animais durante todo o período experimental quando necessário. O método ASEPSIS avalia a cicatrização da ferida através de atribuição de pontuação levando em consideração características da ferida e a proporção da ferida afetada, conforme Tabela 3. A escala ASEPSIS utiliza critérios padronizados e ajuda a superar o problema da avaliação subjetiva de complicações secundárias. Para calcular o escore é necessário observar a presença de exsudato seroso, eritema,

exsudato purulento ou separação de tecidos profundos e é necessário avaliar para cada um desses sinais a proporção de ferida acometida.

Tabela 3 - Escore Método ASEPSIS até 14 dias

CARACTERÍSTICAS DA FERIDA	PROPORÇÃO DA FERIDA AFETADA					
	0	<20	20-39	40-59	60-79	>80
Exudado seroso	0	1	2	3	4	5
Eritema	0	1	2	3	4	5
Exudato purulento	0	2	4	6	8	10
Separação de tecidos profundos	0	2	4	6	8	10

Fonte: Elaboração própria

O sistema de pontuação ASEPSIS foi desenvolvido por Wilson *et al.*(59) com base nos sinais e sintomas de feridas cirúrgicas esternais infectadas. ASEPSIS é um acrônimo para os termos em inglês: *Additional treatment* (tratamento adicional), *Serous discharge* (descarga serosa), *Erythema* (eritema), *Purulent exudate*, (exudato purulento), *Separation of deep tissues* (separação de tecidos profundos), *Isolation of bactéria* (isolamento de bactérias) *Stay as impatient* (internação prolongada por mais de 14 dias). O desfecho infecção para feridas com até 14 dias é determinada de acordo com a escala de pontuação e desfecho da cicatrização, conforme tabela 4.

Tabela 4 – Escala de pontuação ASEPSIS para feridas até 14 dias

0 a 10: cicatrização satisfatória
11 a 20: distúrbio de cicatrização
21 a 30: pequena infecção da ferida
31 a 40: infecção moderada da ferida
superior a 40: infecção grave da ferida

Fonte: Elaboração própria

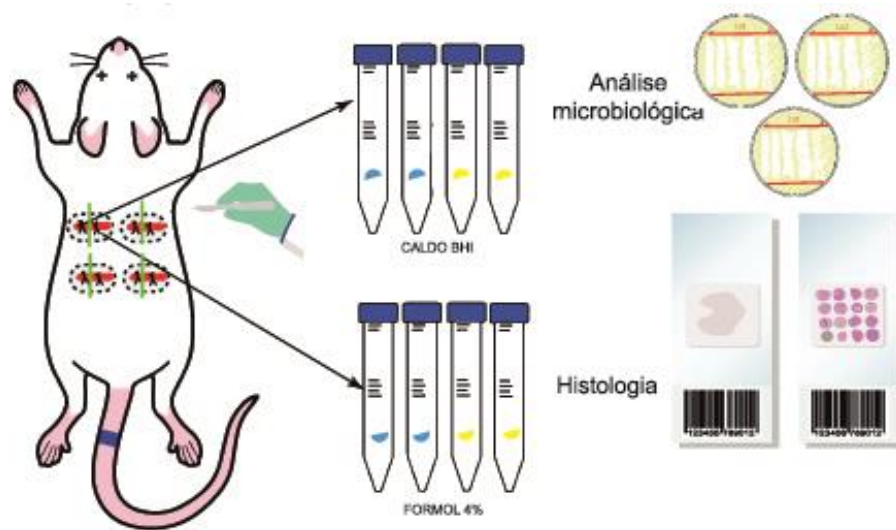
No score ASEPSIS, tratamentos adicionais para cicatrização da ferida recebem pontuações adicionais. O uso de antibióticos, por exemplo, 10 pontos; drenagem de pus com anestesia local, 5 pontos e desbridamento da ferida com anestesia local, 10 pontos. Neste estudo o período máximo de análise foram de 10 dias e os animais não foram submetidos a tratamentos adicionais e, portanto, não receberam pontuações adicionais.

4.6 Eutanásia

Após as cirurgias, que ocorreram no dia D0, os animais foram submetidos a eutanásia em pares, um de cada grupo, nos dias 1, 3, 7 e 10. Os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico (cetamina:xilazina 500:50 mg/kg) seguida de ruptura do diafragma para confirmação de óbito.

Prontamente foram realizadas antissepsia na região das 4 feridas com álcool 70% e os animais acomodados dentro do fluxo laminar (ISO 5) para o procedimento de coleta do tecido na região de cada ferida (Figura 12), sendo que metade deste tecido coletado de uma mesma ferida foi utilizado para as análises microbiológicas para contagem de UFC/g (em caldo BHI) e a outra metade utilizado para análises histopatológicas (em formol 4%).

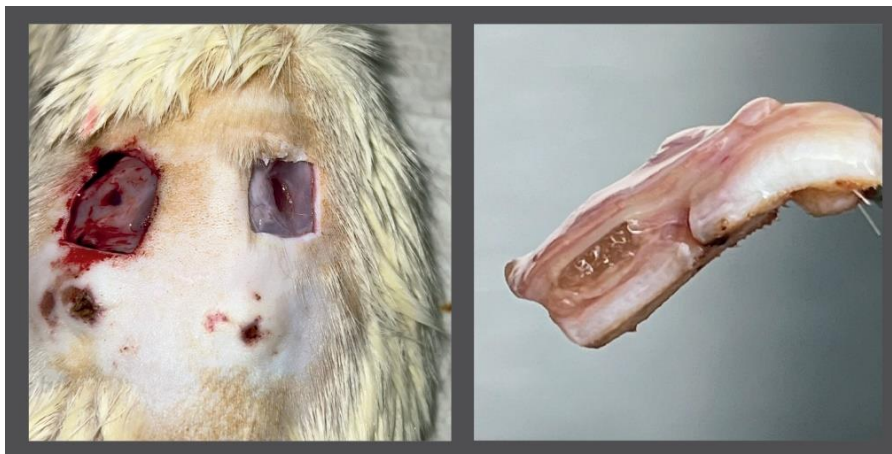
Figura 12 - Coleta do tecido para análise microbiológica e histológica



Fonte: elaboração própria

Os biomateriais remanescentes e tecidos circunvizinhos foram coletados para análises microbiológicas e histopatológicas (Figura 13).

Figura 13 - Coleta do tecido em torno da incisão e amostra coletada de tecido para análise microbiológica e histológica



Fonte: Elaboração própria

4.7 Análises microbiológicas

No dia anterior de cada eutanásia programada, 8 tubos Falcon de 15 ml (4 para grupo escuro e 4 para grupo luz) contendo 4 ml de caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) foram incubadas a 37°C durante 20 h para verificar se no dia da coleta do tecido o líquido estava livre de microrganismos indesejados e se o líquido não apresentava turbidez ou partículas suspensas no caldo.

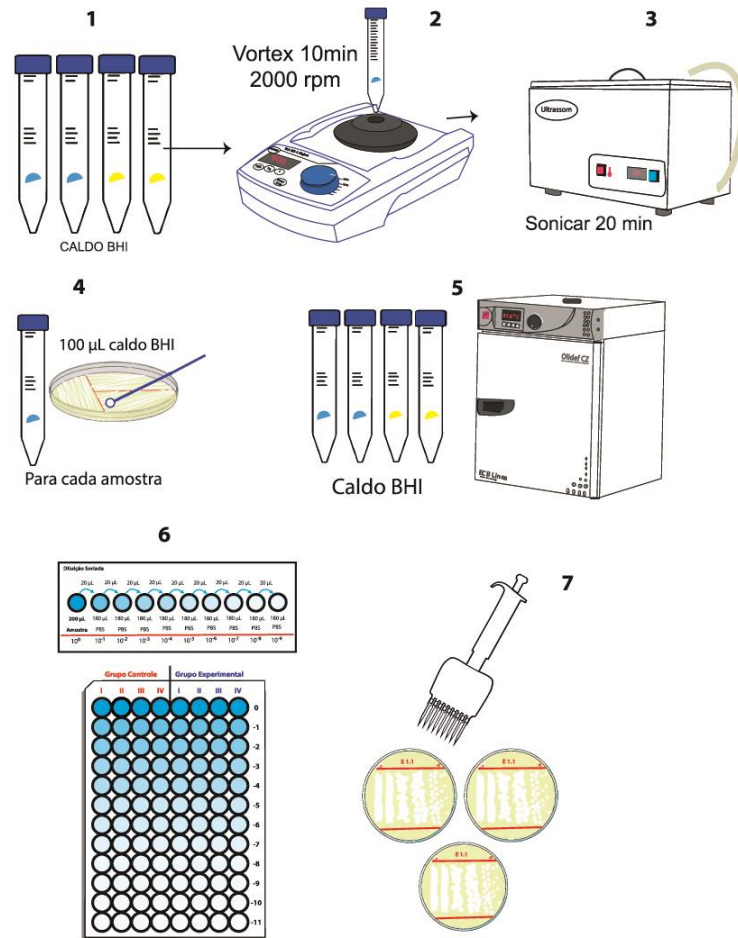
No dia da coleta do tecido em torno da ferida os 8 tubos com caldo BHI foram identificados de acordo com o tecido coletado de cada grupo e aferidos em balança de precisão antes de receberem a amostra de tecido coletado. Após a pesagem, os 8 tubos foram abertos dentro do fluxo laminar (ISO 5) e cada tubo recebeu metade da amostra de tecido coletado da ferida de cada animal de acordo com seus grupos. Em seguida tiveram suas massas aferidas novamente em balança de precisão. O cálculo da massa coletada de cada ferida nessa etapa serviu posteriormente para o cálculo do ufc/ml/g do tecido coletado.

As amostras coletadas (Figura 14) foram homogeneizadas em 4 ml de caldo BHI com auxílio de vórtex durante 10 minutos com 2000 rpm e sonicadas no ultrassom por 20 min em temperatura ambiente. Na sequência, dentro do fluxo foram abertas 8 placas de Petri contendo 15ml de ágar BHI. Utilizando uma micropipeta com ponteira estéril, cada placa recebeu uma alíquota de 100 µl do respectivo tubo do caldo homogeneizado e sonificado. Alças microbiológicas estéreis foram utilizadas para espalhar esse líquido na placa através da técnica do esgotamento do inóculo por estrias. Os tubos contendo amostras de tecidos em caldo BHI e as placas de Petri foram levadas para a estufa a 37°C por 20 horas. Após o período de 20 horas incubadas, as 8 placas (passo 4 da Figura 14) foram analisadas e identificadas visualmente os microrganismos que cresceram nesse meio durante o período de incubação.

Após incubados por 20 horas, os caldos contendo as culturas de tecidos coletados em torno das feridas foram diluídos em 10 vezes por transferência sequencial de 20 µl para 180 µl de solução salina tamponada com fosfato (PBS) em placa de 96 poços. As diluições foram semeadas em triplicata em placas de ágar BHI segundo o método de Jett *et al* (60). As placas foram incubadas a 37°C durante 20 h

para contagem das colônias. Os números de ufc/ml foram contados visualmente e os resultados são apresentados em ufc/g da amostra do tecido coletado.

Figura 14 - Protocolo de análise microbiológica para contagem de UFC/g



Fonte: Elaboração própria

4.8 Análises histopatológicas

Para as análises histopatológicas, parte dos tecidos coletados ao redor das feridas dos animais na eutanásia (aproximadamente 0,5 cm²) foram fixados em formalina tamponada a 4% para evitar a proliferação de microrganismos decompositores e manter intacta a estrutura tecidual e celular.

Para avaliação histopatológica foi utilizada a coloração pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação do processo inflamatório e infeccioso. O tecido subcutâneo do local do implante e tecidos adjacentes foram avaliados às cegas por um patologista, de acordo com os escores da Tabela 5.

Tabela 5 - Escores da avaliação microscópica baseada em coloração de HE

Tipos de resposta	0	1	2	3	4
Polimorfos (PMNs)	0	Raro, 1-5 pc*	5-10 pc	Forte infiltração	Densa infiltração
Macrófagos	0	Raro, 1-5 pc	5-10 pc	Forte infiltração	Densa infiltração
Linfócitos	0	Raro, 1-5 pc	5-10 pc	Forte infiltração	Densa infiltração
Necrose	0	Mínima	Leve	Moderada	Intensa
Neovascularização	0	Mínima	4-7 capilares	Múltiplos vasos com tecido de sustentação	Extensa formação vascular
S. aureus	0	Raro, 1-10 pc	10-50 pc	Forte presença	Densa presença

* por campo

Fonte: Elaboração própria

5 RESULTADOS

5.1 Avaliações clínicas

Não foram observadas mortalidades nem manifestações clínicas evidentes de efeito tóxico ou sistêmico relacionadas à exposição dos colágenos utilizados nos experimentos nos animais do grupo escuro e luz.

As avaliações da escala de pontos para inspeção diária da ferida foram realizadas no período de 10 dias após as cirurgias de implantes em 4 ratos do grupo escuro (16 feridas infectadas) e 4 ratos do grupo luz (16 feridas infectadas). Os resultados da pontuação são apresentados na tabela 6 do grupo escuro e tabela 7 do grupo luz. Escores de 0-10 indicam cicatrização satisfatória; 11-20 distúrbio na cicatrização; 21-30 pequena infecção na ferida; 31-40 infecção moderada da ferida e superior a 40 infecção grave da ferida.

Tabela 6 – Escore ASEPSIS grupo escuro

Grupo escuro - não irradiado								
Dia / Grupo	Col+AM	Col	Col+AM	Col	Col+AM	Col	Col+AM	Col
1	1 0	2 2	1 0	3 0	0 0	1 3	0 1	0 1
2			1 0	2 0	0 0	2 3	1 3	3 5
3			2 2	5 4	0 0	1 3	3 3	4 5
4					3 0	4 3	3 5	8 8
5					4 0	8 7	6 10	15 15
6					6 1	15 15	6 10	20 20
7					6 2	15 15	6 10	20 25
8							8 15	25 25
9							8 15	25 25
10							8 15	25 25

Fonte: Elaboração própria

Tabela 7 – Escore ASEPSIS grupo luz

Dia / Grupo	Col+AM	Col	Col+AM	Col	Col+AM	Col	Col+AM	Col
1	0 1	3 2	0 0	1 0	0 0	0 1	0 0	0 1
2			0 1	1 0	0 0	0 3	0 0	2 3
3			0 2	4 0	0 1	0 3	0 0	6 3
4					0 4	3 4	2 0	6 4
5					0 5	3 2	2 0	10 8
6					0 5	3 2	4 0	15 8
7					0 15	8 4	4 0	20 8
8							6 0	25 10
9							6 0	25 8
10							6 0	25 8

Fonte: Elaboração própria

Figura 16 – Escore ASEPSIS do grupo escuro

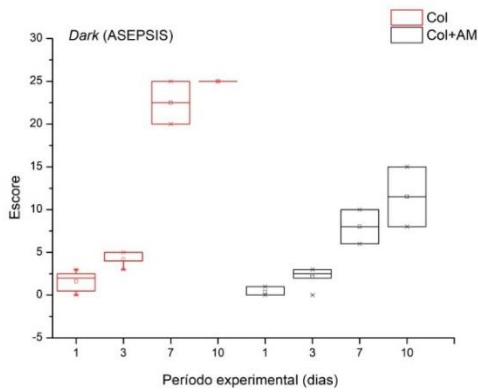
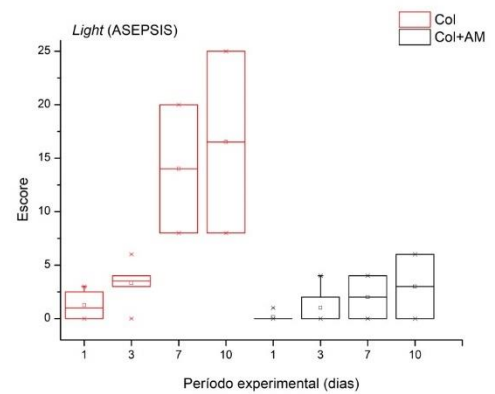


Figura 15 – Score ASEPSIS grupo luz



Fonte: Elaboração própria

Nota-se que ao verificar a distribuição dos escores (Figura 15 e Figura 16) nos dois grupos (luz e escuro), que o grupo de animais tratados com luz apresentaram melhor cicatrização (Figura 17) das feridas em relação ao grupo escuro no dia 10.

Figura 17 – Imagens das avaliações clínicas das feridas dos animais 1 do grupo escuro e luz no período de 10 dias.



Fonte: Elaboração própria

A figura 18 apresenta dois desfechos distintos de feridas com implantes de colágeno + AM no décimo dia do experimento. Enquanto a amostra coletada do tecido ao redor da ferida do animal 1 do grupo escuro apresentou distúrbios de cicatrização com a presença de pus e necrose, a amostra do tecido coletado da ferida do animal 1 do grupo luz, tratado com a TFD, apresentou cicatrização satisfatória.

Figura 18 - Desfechos distintos de feridas no dia 10.



Fonte: elaboração própria

5.2 Massa corpórea

As massas corporais individuais e médias do grupo escuro e luz são representadas na tabela 8. Durante o período do experimento, os animais tiveram seus pesos aferidos diariamente e suas dietas não tiveram restrições de ração e água.

Tabela 8 - Massas individuais do grupo escuro e grupo luz

Massa corporal individual (g)												
Massa (dia)	Escuro (não irradiado)						Luz (irradiado)					
					n	Média				n	Média	
P0 (0)	325	345	364	366	4	350	419	405	359	393	4	394
P1 (1)	313	334	361	361	4	342	418	397	358	389	4	391
P2 (2)		330	355	352	3	346		382	347	378	3	369
P3 (3)		332	347	350	3	343		387	342	374	3	368
P4 (4)			352	342	2	347			348	375	2	362
P5 (5)			348	345	2	347			348	374	2	361
P6 (6)			352	347	2	350			347	373	2	360
P7 (7)			352	348	2	350			347	375	2	361
P8 (8)				351	1	351				376	1	376
P9 (9)				350	1	350				378	1	378
P10 (10)				350	1	350				381	1	381

Fonte: elaboração própria

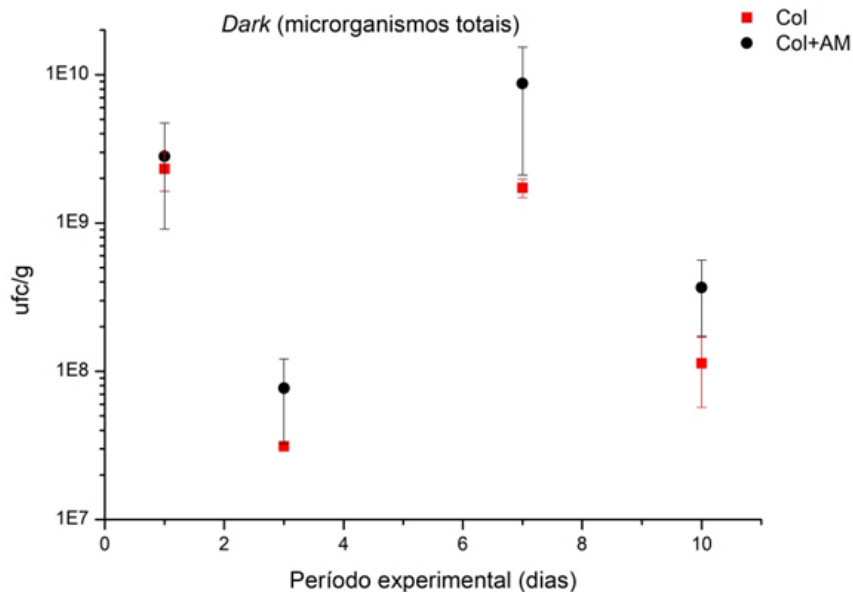
Nota-se que os animais apresentaram ganho de peso e/ou perda de peso corpóreo dentro da variabilidade fisiológica da espécie testada.

5.3 Contagem microbiológica

Para as contagens microbiológicas, o monitoramento das taxas de crescimento bacteriano através da contagem de ufc/g de *S. aureus* ocorreu em momentos específicos. Foram realizadas eutanásias para coleta da pele na região das feridas contaminadas de 2 animais (1 grupo escuro e 1 grupo luz) na seguinte ordem: dia 1, dia 3, dia 7 e dia 10. Para a contagem de ufc/g, as amostras de metade do tecido coletado de cada ferida foram plaqueadas em triplicata, utilizando a metodologia de corrida de pista com 6 a 7 diluições seriadas (geralmente de -2 a -8) na proporção de 1/10. No cálculo para determinar o número de UFC/ml foi utilizado a fórmula: número de colônias x inverso da diluição x fator de correção de volume para ml.

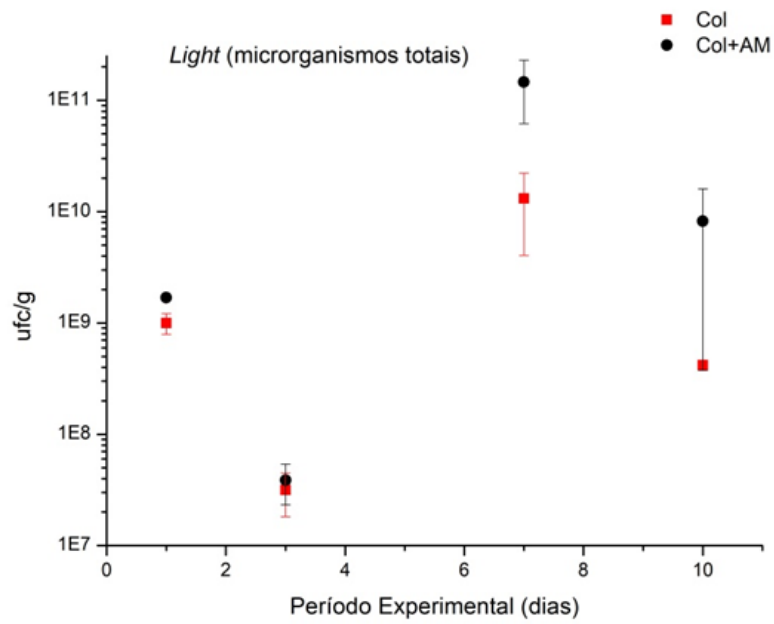
Nota-se que o número de microrganismos totais (Figuras 19 e 20) e de *S. aureus* (Figuras 21 e 22) foi bastante similar entre os grupos.

Figura 19 – Média \pm D.P do n.º de microrganismos totais para os animais do grupo escuro



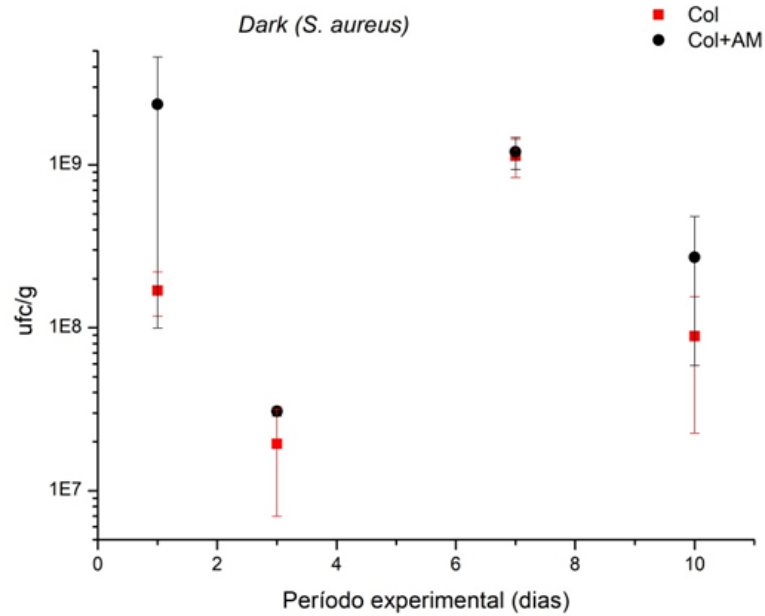
Fonte: Elaboração própria

Figura 20 - Média \pm D.P do n.º de microrganismos totais para os animais do grupo luz



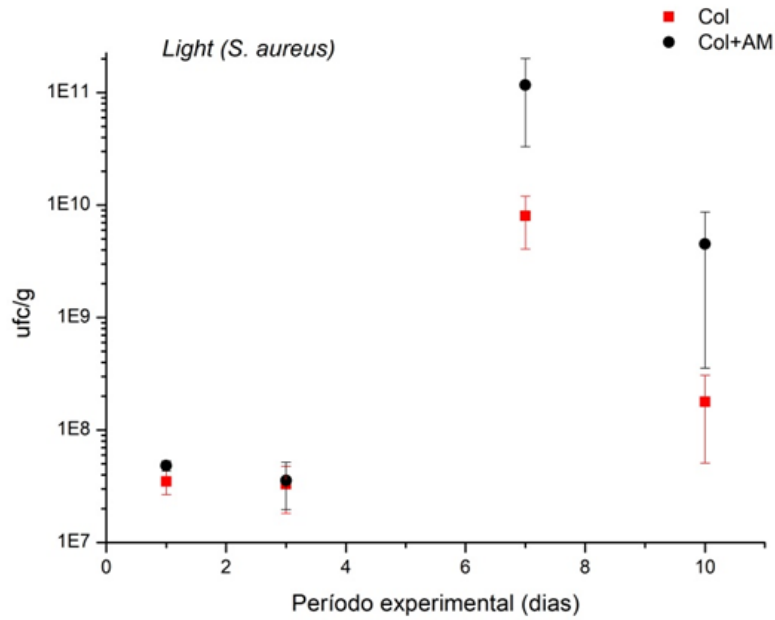
Fonte: Elaboração própria

Figura 21 - Média \pm D.P de *S. aureus* para os animais do grupo escuro



Fonte: Elaboração própria

Figura 22 - Média \pm D.P do n.º de *S. aureus* para os animais do grupo luz



Fonte: Elaboração própria

5.4 Análise histopatológica

As análises histopatológicas foram realizadas às cegas por um médico patologista. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise da resposta inflamatória de acordo com escore estabelecido no estudo. Os resultados são apresentados na tabela 9.

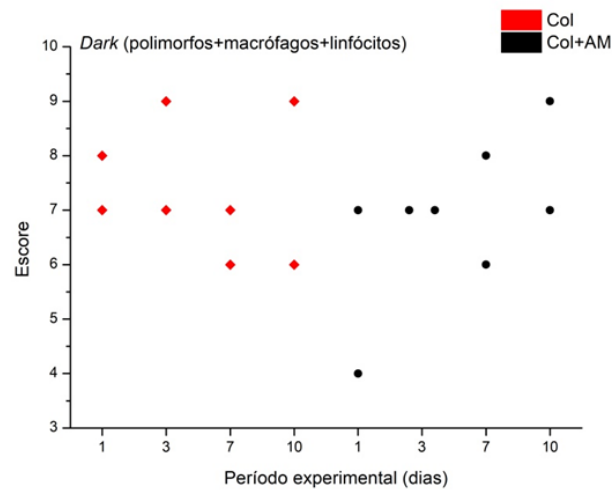
Tabela 9 – Resultado de análise de lâminas de microscopia para avaliação de resposta inflamatória

Resultado grupo escuro - não irradiado								Resultado grupo luz - irradiado							
	Subgrupo	Polimorto	Macrófago	Linfócito	Necrose	Neovascularização	S aureus		Subgrupo	Polimorto	Macrófago	Linfócito	Necrose	Neovascularização	S aureus
Dia 1	Col+AM	3	3	1	2	2	1	Col+AM	0	0	0	0	0	0	0
	Col+AM	1	2	1	0	1	1	Col+AM	2	2	1	0	1	1	
	Col	3	3	1	2	2	1	Col	2	2	1	0	1	1	
	Col	4	3	1	2	3	3	Col	3	3	1	1	3	1	
Dia 3	Col+AM	3	3	1	2	2	1	Col+AM	3	3	1	1	2	3	
	Col+AM	3	3	1	1	2	1	Col+AM	4	3	1	1	2	2	
	Col	4	4	1	3	3	3	Col	1	2	1	0	2	1	
	Col	3	3	1	2	2	2	Col	3	3	1	1	2	1	
Dia 7	Col+AM	4	3	1	2	2	3	Col+AM	3	3	1	2	2	3	
	Col+AM	1	3	2	0	2	1	Col+AM	4	3	1	3	2	3	
	Col	3	3	1	2	2	3	Col	3	3	1	3	2	3	
	Col	1	3	2	0	2	1	Col	1	2	1	0	2	1	
Dia 10	Col+AM	3	3	1	2	2	2	Col+AM	2	3	1	1	3	1	
	Col+AM	4	4	1	4	3	3	Col+AM	1	2	1	0	3	0	
	Col	4	4	1	4	4	4	Col	4	3	1	4	4	4	
	Col	2	2	2	0	3	1	Col	2	2	1	0	3	0	

Fonte: Elaboração própria

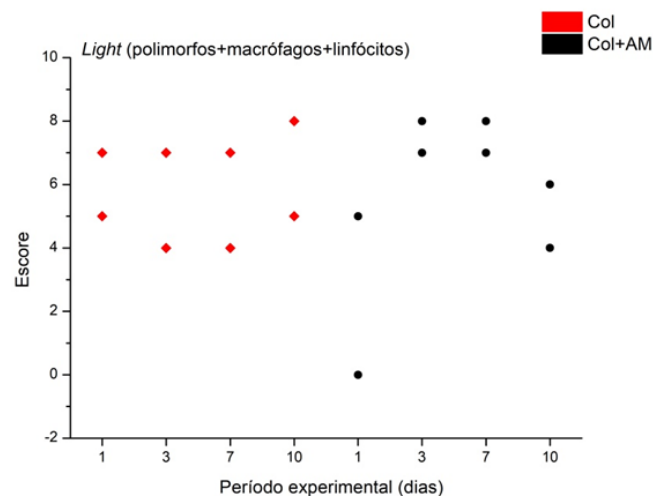
As figuras 23 e 24 apresentam o escore das feridas com relação à presença de células inflamatórias (Σ de células polimorfonucleares + macrófagos + linfócitos) para os grupos irradiado e não irradiado, durante o período experimental. Nota-se que no dia 10 ainda há presença de infiltrado inflamatório, embora as feridas irradiadas mostrem um escore médio menor no dia 10 quando comparadas às não irradiadas, sem AM (7,5 x 6,5) e com AM (8 x 5).

Figura 23 - Escore histopatológico – Σ polimorfos+macrófagos+linfócitos do grupo escuro. Cada símbolo representa uma ferida.



Fonte: Elaboração própria

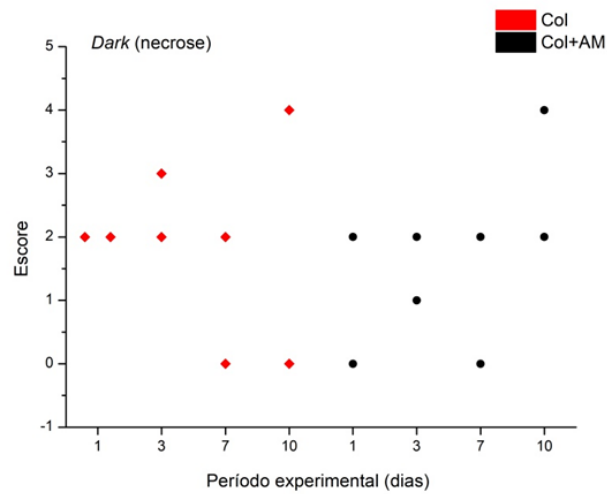
Figura 24 - Escore histopatológico – Σ polimorfos+macrófagos+linfócitos do grupo luz. Cada símbolo representa uma ferida.



Fonte: Elaboração própria

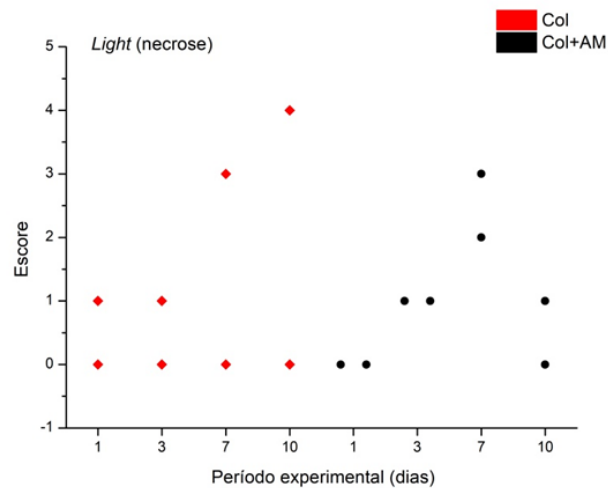
Nas figuras 25 e 26 podemos notar que pelo menos uma ferida do grupo não irradiado apresentava severa necrose no dia 10, com escore médio de 2 e 3 para as feridas sem AM e com AM, respectivamente. Para o grupo irradiado, observa-se que as feridas que não receberam AM têm um escore médio de 2. No entanto, feridas que receberam AM mostraram um escore médio de 0,5, sugerindo que a TFD acelerou o processo cicatricial.

Figura 25 - Escore histopatológico - necrose grupo escuro. Cada símbolo representa uma ferida.



Fonte: Elaboração própria

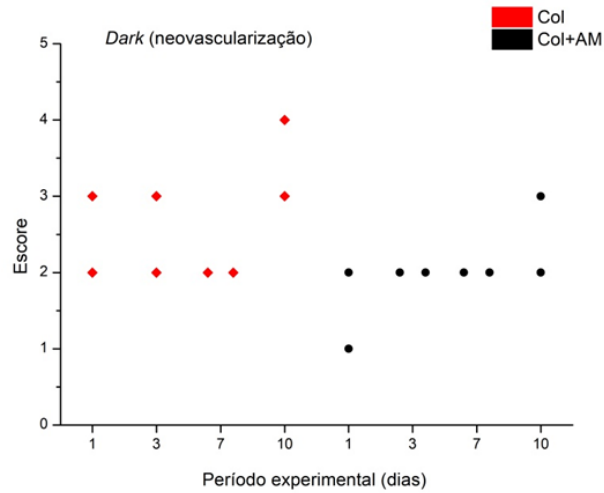
Figura 26 - Escore histopatológico – necrose grupo luz. Cada símbolo representa uma ferida.



Fonte: Elaboração própria

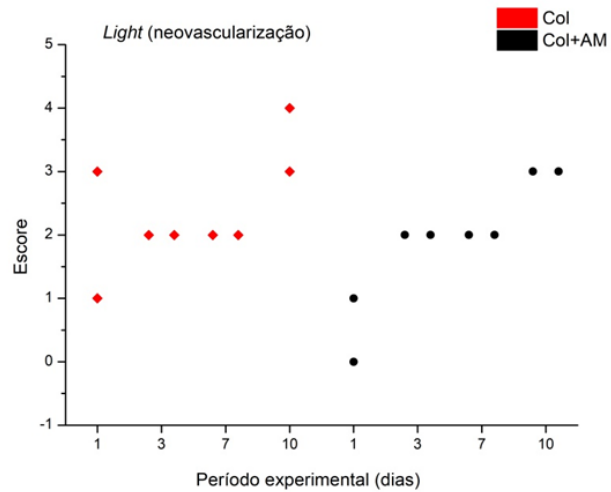
Os escores referentes à neovascularização são apresentados nas figuras 26 e 27. As feridas que tinham só colágeno mostram um escore médio de 3,5 no dia 10. Quando o AM foi utilizado, o grupo não irradiado mostrou um escore médio mais baixo (2,5) que o grupo irradiado (3). Interessantemente, as duas feridas que receberam AM mostraram o mesmo escore no grupo irradiado. Estes dados sugerem que o colágeno, provavelmente, é o principal agente para promover angiogênese.

Figura 27 - Escore histopatológico – neovascularização grupo escuro. Cada símbolo representa uma ferida.



Fonte: Elaboração própria

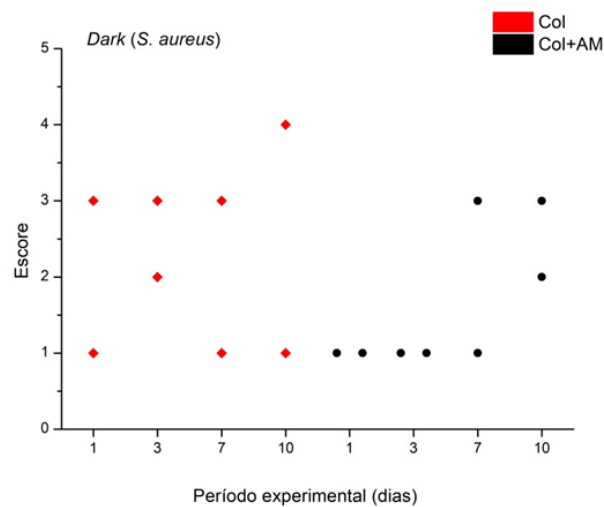
Figura 28 - Escore histopatológico – neovascularização grupo escuro. Cada símbolo representa uma ferida.



Fonte: Elaboração própria

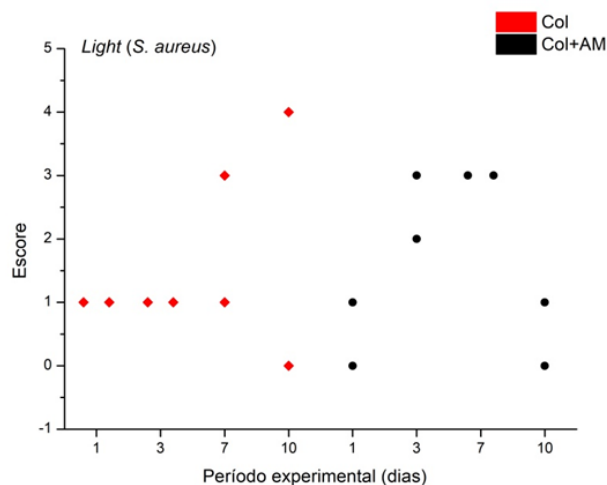
As figuras 29 e 30 mostram os escores obtidos para a presença de *S. aureus* nas feridas. Nesse caso, podemos observar que o escore variou bastante no dia 10 para as feridas que receberam o colágeno sem o AM. Os escores médios foram 2,5 (sem luz) x 2 (luz). Por outro lado, feridas que receberam AM foram mais homogêneas com escore médio de 2,5 (sem luz) x 0,5 (com luz). Este resultado indica que a TFD pode ter diminuído a carga bacteriana na ferida, embora os dados de ufc/g (figuras 21 e 22) não corroborem tal dado.

Figura 29 - Escore histopatológico – *S. aureus* grupo escuro.
Cada símbolo representa uma ferida.



Fonte: Elaboração própria

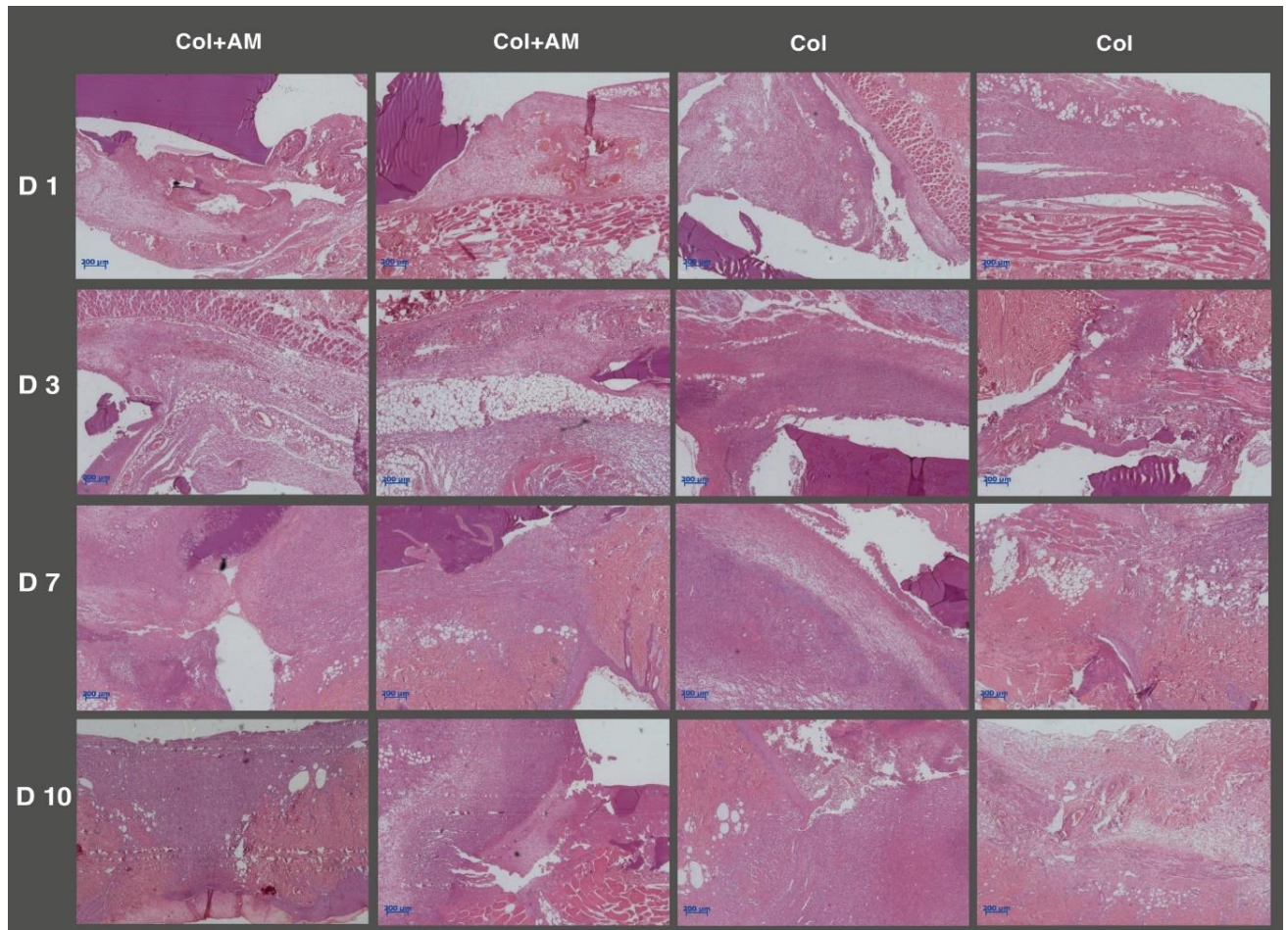
Figura 30 - Escore histopatológico – *S. aureus* grupo luz.
Cada símbolo representa uma ferida.



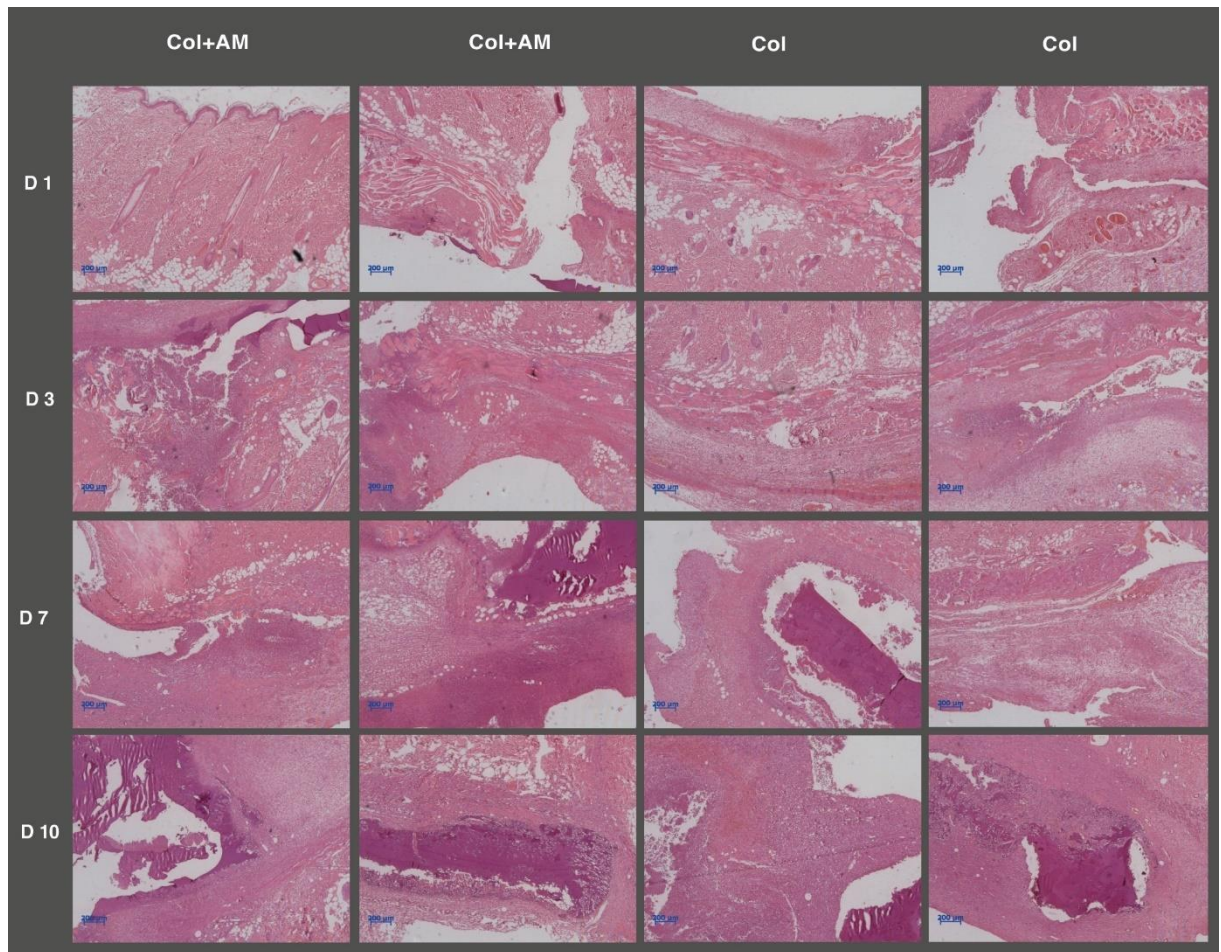
Fonte: Elaboração própria

As figuras 31 e 32 mostram as fotomicrografias dos cortes histológicos das feridas, durante o período experimental de 10 dias. Grupo escuro e grupo luz, tratado com TFD. A técnica de coloração utilizada foi a hematoxilina e eosina (HE) que distinguem os diversos componentes das células e da matriz extracelular (MEC).

Figura 31- Fotomicrografias de cortes histológicos dos dias 1, 3, 7 e 10 (HE, 200 µm) – grupo escuro



Fonte: Elaboração própria

Figura 32 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos dias 1, 3, 7 e 10 (HE, 200 μ m) – grupo luz

Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

O projeto realizado neste estudo para avaliar a ação fotodinâmica com o produto em gel de colágeno da Revolugenix conjugado (colágeno + AM) associado ao LED de emissão vermelha, buscou responder algumas demandas em relação a esta fase de desenvolvimento do produto: 1- Se a concentração de AM de 0,02% m/v do curativo colágeno implantável seria ideal para TFD; 2- Se o curativo implantado em uma ferida de cicatrização de primeira intenção, onde a ferida é fechada por aproximação de suas bordas e com baixa concentração de oxigênio, permitiria o resultado fotodinâmico desejado na redução de microrganismos; e 3 - Se uma única sessão de irradiação com LED no pós-cirúrgico reduziria a carga microbiana.

Ao realizar um experimento com TFD (61), alguns aspectos podem interferir na eficácia da terapia sobre o processo cicatricial e controle microbiano: o comprimento de onda, a densidade de potência e energia, a potência, a energia, o tempo de irradiação, a periodicidade do uso da TFD, a técnica de aplicação, as características do FS e o tempo de pré-irradiação.

A ausência de efeito de redução bacteriana significativa no grupo luz tratado com TFD, identificando pelo protocolo de contagens totais de microrganismos e de *S. aureus*, poderia ser decorrente à baixa concentração do agente fotossensibilizador AM utilizado no colágeno (0,02% m/v), porém, na literatura encontra-se estudos onde utilizaram concentrações de 0,01% m/v de AM associado com a TFD, onde os autores obtiveram resultados satisfatórios na cicatrização de feridas (62),(63),(64). Um dos estudos avaliou a evolução clínica de pacientes com feridas tratadas e não tratadas com TFD, amostra de 16 pacientes, $\lambda = 660$ nm, densidade de energia de 90 J/cm^2 , com uma única sessão, irradiado por 5 minutos, o desfecho foi de redução da ferida e redução da dor, sem menção a quantificação da carga microbiana. (63). Outro estudo, com amostras de 12 pacientes com feridas de pé diabéticos, $\lambda = 660$ nm, densidade de energia de 6 J/cm^2 , com total de 10 sessões, 3 vezes por semana, irradiado por 5 minutos, o desfecho foi de redução de carga microbiana e redução da ferida (64).

Ainda sobre a concentração do AM, outro estudo com ferida de Fournier na região genitália de 1 único paciente, a concentração utilizada de AM para TFD foi de 1% massa/volume do FS, utilizou-se laser de baixa potência, $\lambda = 632$ nm, densidade de energia de 120 J/cm^2 , com total de 16 sessões, 2 vezes na semana, não foi

especificado o tempo de irradiação e o desfecho clínico é que em 8 semanas a ferida estava com redução de 80% de cicatrização (65),(66). Em todos os estudos citados sobre a concentração de AM, as feridas são do tipo abertas e não utilizaram material implantável.

Outro fator que pode ter impactado a eficiência da TFD neste experimento é que os discos de colágeno com AM são implantados nos ratos e a ferida fechada com fio de sutura, o que pode ter comprometido a ação da TFD. O *International Wound Infection Institute* recomenda o uso tópico de antimicrobianos e destaca ainda que a aplicação de terapia padrão ouro em cada etiologia e a aplicação de uma cobertura contendo um antimicrobiano junto à TFD pode potencializar a sua ação e diminuir o uso desnecessário de antibióticos (67).

Uma revisão sistemática selecionou 13 artigos que estudaram a TFD na cicatrização de feridas *in vivo* entre 2008 e 2018 e apenas em um dos artigos a ferida recebia um implante de colágeno e a ferida suturada por um ponto reabsorvível. As demais feridas descritas na revisão são provocadas nos animais por queimaduras, escoriações, abrasões e feridas excisionais (58).

A justificativa para adoção do protocolo para curativos para feridas fechadas é que para um material ser testado e aprovado pela ANVISA, é exigido que o produto seja testado em condições adversas. Um curativo de colágeno com indicação de uso tópico não poderia ser usado como um produto implantável, porém um produto implantável poderia ser utilizado com indicação de uso tópico. Caso o produto médico possua funções pretendidas que possam ser enquadradas em classes de risco diferentes, deve-se adotar a classe de risco mais crítica. O produto em desenvolvimento pertence a classe IV, a mais crítica, e estão inseridas nessa classe todo os produtos derivados de animais, implantáveis e absorvíveis. Isso tudo é dado pelo Relatório Técnico do Produto (RTP) (68), que é uma avaliação crítica de todos os aspectos relevantes para a avaliação da ANVISA (elementos técnicos, legislações e guias vigentes), e contém todos os aspectos que podem estar na farmacopeia brasileira ou americana ou ser desenvolvido *in house* desde que a empresa apresente um racional aceitável pela ANVISA. As indicações de uso do produto deverão estar baseadas nos estudos realizados pelo produto não podendo ultrapassar ou ser indicado para função diversa daquela de comprovada efetividade em pesquisa. No caso de indicação baseada no desempenho do produto deverá ser observada a

demanda mais crítica de esforços para que se processa a indicação, conforme determina a RDC n.º 185/2001 para registro de implantes ortopédicos (69). Mediante isso, buscou-se um racional para a validação do protocolo de uso e mudanças no protocolo para obter resultados significativos e reprodutíveis fazem parte desta fase de desenvolvimento do produto.

No trabalho de revisão de literatura (65), os autores apontam a discrepância na literatura sobre a variação de densidade de energia em trabalhos com AM e TFD onde densidades de energia aplicadas nos tratamentos variam entre 6 e 120 J/cm² por sessão com total de 1 a 30 sessões de TFD. Neste trabalho a densidade utilizada foi de 30 J/cm² em aplicação de dose única, de modo contínuo com a fonte de luz em contato com a ferida, o que estaria dentro do recomendado na literatura. A TFD consome oxigênio e a densidade de energia muito alta pode consumir as moléculas de oxigênio de forma acelerada, impactando nas EROs e na eficácia da TFD. Estudos indicam que densidade de energia superiores a 40 J/cm² pode esgotar todas as fontes de oxigênio disponíveis durante a reação de oxidação (61),(70). Outros autores realizaram uma revisão sistemática sobre TFD mediada por AM no tratamento da microbiota bucal e os resultados apresentados dos 15 artigos escolhidos para a revisão mostrou que a densidade de energia variou de 3 J/cm² a 640 J/cm² nos estudos analisados (71).

Um outro fator que pode ter impactado no resultado da TFD é o tempo de pré-irradiação, onde o AM do colágeno entra em contato com os microrganismos (*S. aureus*) para que esse possa penetrar ou, ao menos, se ligar à membrana plasmática e, conseqüentemente, aumentar os danos causados aos microrganismos presentes na ferida infectada. De acordo com a literatura, em estudos *in vitro* o tempo médio comumente usados de pré-irradiação é de 5 minutos (65),(72). O tempo de pré-irradiação do estudo foi de até 3 horas e esse é uma variável para ser revista no protocolo de irradiação para a TFD.

Este estudo foi um primeiro passo para desenvolvimento de um curativo conjugado de colágeno com AM para TFD a ser usado para aceleração cicatricial de feridas. Novos estudos pré-clínicos são necessários para esta fase de desenvolvimento do produto. Os pontos de melhoria que precisam ser ajustados para futuras avaliações são:

- Testar diferentes concentrações do AM no colágeno (*in vitro* e *in vivo*);

- Verificar se a carga microbiana utilizada para infecção das feridas não foi muito alta, dificultando a cicatrização;
- Testar o material em feridas abertas;
- Ajustar o tempo de pré-irradiação;
- Testar o curativo com diferentes tempos de irradiação e densidades de energia;
- Aleatorizar os curativos nas feridas e verificar se diferentes posições de feridas nos ratos interferem na cicatrização;
- Não esterilizar o curativo de colágeno com AM em radiação gama. Como o curativo sem o AM já está estéril, a sugestão é filtrar a solução de AM com filtro 0,22 μm , mantendo a cadeia asséptica do produto.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que, clinicamente, os animais do grupo luz apresentaram melhor escore de cicatrização, porém, em relação à análise microbiológica, não foram observadas reduções significativas de microrganismos em favor do grupo luz e essa redução é o fator chave da TFD. As análises histopatológicas sugerem que a TFD acelerou o processo cicatricial no grupo irradiado.

8 REFERÊNCIAS

1. Sen CK. Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. *Adv Wound Care*. 2019;8(2):39–48.
2. Yazdanpanah L, Shahbazian H, Nazari I, Arti HR, Ahmadi F, Mohammadianinejad SE, et al. Incidence and risk factors of diabetic foot ulcer: A population-based diabetic foot cohort (ADFC study)-two-year follow-up study. *Int J Endocrinol*. 2018;2018.
3. Ruggiero SL, Dodson TB, Fantasia J, Goodday R, Aghaloo T, Mehrotra B, et al. American association of oral and maxillofacial surgeons position paper on medication-related osteonecrosis of the jaw - 2014 update. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2014;72(10):1938–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2014.04.031>
4. Ather S. HKG. and TSJ. “1 - Wound management and dressings,” in *Advanced Textiles for Wound Care*. 2nd ed. S. Rajendran, editor. United Kingdom: Woodhead Publishing; 2019. 1–22 p.
5. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials (Basel)*. 2010;3(3):1863–87.
6. Laredo Specialty Hospital. Why Wound Care is a Critical Part of Recovery [Internet]. 2022 [cited 2022 Nov 3]. Available from: <https://lsh.ernesthealth.com/why-wound-care-is-a-critical-part-of-recovery/>
7. Madhuri Reddy RC. Healing Your Wound: The Top Ten Myths Dispelled. In: *Healing Wounds, Healthy Skin: A Practical Guide for Patients with Chronic Wounds* [Internet]. New Haven: Yale University Press; 2011. Available from: <https://doi.org/10.12987/9780300171723-002>
8. Field CK, Kerstein MD. Overview of wound healing in a moist environment. *Am J Surg*. 1994;167(1 SUPPL.):2–6.
9. Moura LIF, Dias AMA, Suesca E, Casadiegos S, Leal EC, Fontanilla MR, et al. Neurotensin-loaded collagen dressings reduce inflammation and improve wound healing in diabetic mice. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2014 Jan;1842(1):32–43.
10. Kim CL, Kim DE. Self-healing Characteristics of Collagen Coatings with Respect to Surface Abrasion. *Sci Rep*. 2016 Mar 24;6.
11. Noh YK, Dos Santos Da Costa A, Park YS, Du P, Kim IH, Park K. Fabrication of bacterial cellulose-collagen composite scaffolds and their osteogenic effect on human mesenchymal stem cells. *Carbohydr Polym*. 2019 Sep 1;219:210–8.
12. Human BioScience. Non-Hydrolyzed vs Hydrolyzed Collagen in Wound Healing [Internet]. HBS Blog. 2021 [cited 2022 Oct 5]. Available from: <https://humanbiosciences.com/non-hydrolyzed-vs-hydrolyzed-collagen-wound->

healing/

13. Michalska-Sionkowska M, Walczak M, Sionkowska A. Antimicrobial activity of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing. *Polym Test*. 2017 Oct 1;63:360–6.
14. Chen CW, Chan YC, Hsiao M, Liu RS. Plasmon-Enhanced Photodynamic Cancer Therapy by Upconversion Nanoparticles Conjugated with Au Nanorods. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;8(47):32108–19.
15. Tardivo JP, Del Giglio A, De Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005;2(3):175–91.
16. Sharman WM, Allen CM, Van Lier JE. Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today*. 1999;4(11):507–17.
17. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med*. 2001;29(2):165–73.
18. de Souza SC, Junqueira JC, Balducci I, Koga-Ito CY, Munin E, Jorge AOC. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2006;83(1):34–8.
19. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 199, de 26 de outubro de 2006. Dispõe sobre a notificação simplificada de medicamentos mediante peticionamento eletrônico. 2006; Available from: <http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/27796>
20. Silvia Cristina Nunez MSR e ASG. PDT - Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia. 2|2019. São Paulo: GEN Guanabara Koogan; 2019.
21. Ribeiro MS, Silva D de FT da, Núñez SC, Zezell DM. Laser em Baixa Intensidade. *Técnicas e Procedimentos Ter*. 2011;945–53.
22. El-Khordagui L, El-Sayed N, Galal S, El-Gowell H, Omar H, Mohamed M. Photosensitizer-eluting nanofibers for enhanced photodynamic therapy of wounds: A preclinical study in immunocompromized rats. *Int J Pharm*. 2017 Mar 30;520(1–2):139–48.
23. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004 Apr 30;3(5):436–50.
24. Carneiro VSM, Catão MHCV. Aplicações da Terapia Fotodinâmica na Odontologia. *Rev Faculdade Odontol Lins*. 2012;22(1):25–32.
25. Weller CD, Team V, Sussman G. First-Line Interactive Wound Dressing Update: A Comprehensive Review of the Evidence. Vol. 11, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
26. Nussbaum SR, Carter MJ, Fife CE, DaVanzo J, Haught R, Nusgart M, et al. An

- Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. *Value Heal* [Internet]. 2018;21(1):27–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jval.2017.07.007>
27. MarketsandMarkets. Wound Care Market by Product (Dressings (Foam, Film, Hydrocolloid, Collagen, Alginate), Devices (NPWT, Debridement), Grafts, Matrices, Topical Agents, Sutures, Stapler), Wound (Traumatic, Diabetic Ulcers, Surgical, Burn), End User - Global Forecast to 2026. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/wound-care-market-371.html>. 2021.
 28. Chen K, Sivaraj D, Davitt MF, Leeolou MC, Henn D, Steele SR, et al. Pullulan-Collagen hydrogel wound dressing promotes dermal remodelling and wound healing compared to commercially available collagen dressings. *Wound Repair Regen*. 2022 May 1;30(3):397–408.
 29. Ozgok Kangal MK RJ. Wound Healing. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
 30. Brandão dos Santos J, Ganzer Porto S, Midori Suzuki L, da Rosa Zinn Sostizzo L, Luiz Antoniazzi J, Cristina Echer I. Avaliação e tratamento de feridas orientações aos profissionais de saúde.
 31. Robson MC, Cooper DM, Aslam R, Gould LJ, Harding KG, Margolis DJ, et al. Guidelines for the treatment of venous ulcers. *Wound Repair Regen*. 2006;14(6):649–62.
 32. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res*. 2009;37(5):1528–42.
 33. Robson MC. A Failure of Wound Healing Caused by an Imbalance of Bacteria.
 34. Janis JE, Kwon RK, Lalonde DH. A practical guide to wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125(6):230–44.
 35. Nguyen A V., Soulika AM. The dynamics of the skin's immune system. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8):1–53.
 36. Gonzalez ACDO, Andrade ZDA, Costa TF, Medrado ARAP. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol*. 2016;91(5):614–20.
 37. Ather S, Harding KG. Wound management and dressings. In: *Advanced Textiles for Wound Care: A Volume in Woodhead Publishing Series in Textiles*. 2009. p. 3–19.
 38. Mandelbaum SH, Di Santis ÉP, Sant'Ana Mandelbaum MH. Cicatrization: Current concepts and auxiliary resources - Part I. *An Bras Dermatol*. 2003;78(4):393–412.
 39. Beanes SR, Dang C, Soo C, Ting K. Skin repair and scar formation: The central role of TGF- β . *Expert Rev Mol Med*. 2003;5(8):1–11.

40. Weller C. Interactive dressings and their role in moist wound management [Internet]. *Advanced Textiles for Wound Care: A Volume in Woodhead Publishing Series in Textiles*. Woodhead Publishing Limited; 2009. 97–113 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1533/9781845696306.1.97>
41. Gupta BS, Vincent Edwards J. Textile materials and structures for wound care products. *Adv Text Wound Care A Vol Woodhead Publ Ser Text*. 2009;48–96.
42. Franco D, Gonçalves LF. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Rev Col Bras Cir*. 2008;35(3):203–6.
43. Ovington LG. Advances in wound dressings. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):33–8.
44. Alven S, Peter S, Mbese Z, Aderibigbe BA. Polymer-Based Wound Dressing Materials Loaded with Bioactive Agents: Potential Materials for the Treatment of Diabetic Wounds. *Polymers (Basel)*. 2022;14(4).
45. Zhang M, Zhao X. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;162:1414–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.311>
46. S. Sharma, A. Dua AM. Third Generation Materials for Wound Dressings. *Int J Pharm Sci Res* [Internet]. 2014;5(6):2113–24. Available from: [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(6\).2113-24](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(6).2113-24)
47. Felgueiras HP, Amorim MTP. Functionalization of electrospun polymeric wound dressings with antimicrobial peptides. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2017;156:133–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.001>
48. Mir M, Ali MN, Barakullah A, Gulzar A, Arshad M, Fatima S, et al. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Prog Biomater* [Internet]. 2018;7(1). Available from: <https://doi.org/10.1007/s40204-018-0083-4>
49. Ambekar RS, Kandasubramanian B. Advancements in nanofibers for wound dressing: A review. *Eur Polym J*. 2019;117(March):304–36.
50. Naseri-Nosar M, Ziora ZM. Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites [Internet]. Vol. 189, *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd.; 2018. 379–398 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.003>
51. Fahimirad S, Ajalloueiian F. Naturally-derived electrospun wound dressings for target delivery of bio-active agents. *Int J Pharm* [Internet]. 2019;566(January):307–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.053>
52. Singer AC, Shaw H, Rhodes V, Hart A. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Front Microbiol*. 2016;7(NOV):1–22.
53. Wainwright M, Maisch T, Nonell S, Plaetzer K, Almeida A, Tegos GP, et al.

- Photoantimicrobials—are we afraid of the light? *Lancet Infect Dis*. 2017;17(2):e49–55.
54. Jain A, Moshfeghi DM, Blumenkranz MS. Photodynamic therapy. *Age-Related Macular Degener Second Ed*. 2007;90(12):223–32.
 55. Lee CN, Hsu R, Chen H, Wong TW. Daylight Photodynamic Therapy: An Update. *Molecules*. 2020;25(21).
 56. Nesi-Reis V, Lera-Nonose DSSL, Oyama J, Silva-Lalucci MPP, Demarchi IG, Aristides SMA, et al. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2018;21:294–305. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.12.015>
 57. Domingues EAR, Urizzi F, Souza FR de. Efeito Da Terapia Fotodinâmica Em Feridas Agudas E Crônicas: Revisão De Escopo. *Rev Enferm Atual Derme*. 2022;96(38).
 58. Oyama J, Fernandes Herculano Ramos-Milaré AC, Lopes Lera-Nonose DSS, Nesi-Reis V, Galhardo Demarchi I, Alessi Aristides SM, et al. Photodynamic therapy in wound healing in vivo: a systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020 Jun 1;30.
 59. Wilson APR, Sturridge MF, Treasure T, Grüneberg RN. a Scoring Method (Asepsis) for Postoperative Wound Infections for Use in Clinical Trials of Antibiotic Prophylaxis. *Lancet*. 1986;327(8476):311–2.
 60. Jett BD, Hatter KL, Huycke MM, Gilmore MS. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *Biotechniques*. 1997;23(4):648–50.
 61. Boltes Cecatto R, Siqueira de Magalhães L, Fernanda Setúbal Destro Rodrigues M, Pavani C, Lino-dos-Santos-Franco A, Teixeira Gomes M, et al. Methylene blue mediated antimicrobial photodynamic therapy in clinical human studies: The state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2020;31(November 2019):101828. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101828>
 62. Chan Y, Lai CH. Bactericidal effects of different laser wavelengths on periodontopathic germs in photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2003;18(1):51–5.
 63. Moura JPG, Brandão LB, Barcessat ARP. Estudo da Terapia Fotodinâmica (PDT) no reparo de lesões teciduais: estudo de casos clínicos. *Estação Científica (UNIFAP)*. 2018;8(1):103.
 64. Patrícia Michelassi Carrinho Aureliano. EFEITOS BIOLÓGICOS PRODUZIDOS PELA TERAPIA FOTODINÂMICA NA REPARAÇÃO DE FERIDAS DIABÉTICAS EM HUMANOS. 2017;127.
 65. Ferreira RP, Policarpo N de S, Ribeiro Z dos S de F, Tonazio CHS, Pinto AM de O, Pinto GHP. Aplicação da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

- no tratamento de feridas: revisão de literatura. *Rev Eletrônica Acervo Saúde*. 2022;15(4):e10133.
66. Souza RM, Pinto MVM, Celulare I. Análise Da Terapia Fotodinâmica Associada Ao Uso De Membrana Celular Em Feridas Diabéticas – Um Estudo De Caso. 2014;675–7.
 67. Swanson T, Angel D. International Wound Infection Institute Wound Infection in Clinical Practice Update Principles of Best Practice. *Wounds Int*. 2022;24(8):1–59.
 68. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Manual para regularização de implantes ortopédicos na Anvisa. Brasília: ABDI; 2010. p. 114.
 69. ANVISA. Resolução De Diretoria Colegiada – Rdc Nº 185, De 22 De Outubro De 2001. Regulam Técnico que trata do Regist Alteração, Revalidação e Cancel do Regist Prod Médicos na Agência Nac Vigilância Sanitária-ANVISA Diário Of da União, Brasília, DF, Pod Exec [Internet]. 2001;6:1–9. Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/rdc0185_22_10_2001.pdf
 70. Warriar A, Mazumder N, Prabhu S, Satyamoorthy K, Murali TS. Photodynamic therapy to control microbial biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2021;33:102090. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102090>
 71. Cristina L, Moreti T, Gonzalez K, Fernandes C, Antonio J, Souza S. Methylene blue-mediated photodynamic therapy in the treatment of oral microbiota . A Systematic Review A terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno no tratamento da microbiota bucal . *Uma. Res Soc Dev*. 2022;11(6):1–24.
 72. Furtado GS, Paschoal MAB, Santos Grenho L do C, Lago ADN. Does pre-irradiation time influence the efficacy of antimicrobial photodynamic therapy? *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;31.

Anexo I



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação de curativo à base de colágeno e fármaco fotoativo para terapia fotodinâmica pós-cirúrgica *in vivo*”, registrada com o nº 13/21, sob a responsabilidade de Martha Simões Ribeiro, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica ou ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela CEUA-IPEN - Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) em **09/12/2021**.

We certify that the proposal titled “Evaluation of collagen-based dressing and photoactive drug for pos-surgical photodynamic therapy *in vivo*”, registration number 13/21, under the responsibility of Martha Simões Ribeiro, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the CEUA-IPEN - Ethic Committee on Animal Use of the Nuclear and Energy Research Institute (IPEN/CNEN-SP) in **12/09/2021**.

Finalidade:	Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Março/2022 a Abril/2023
Espécie/linhagem/raça:	Ratos Wistar
Nº de animais:	36
Peso/Idade:	250-300 g
Sexo:	Machos
Origem:	Biotério do IPEN/CNEN-SP

São Paulo, 09 de dezembro de 2021.

Cibele Nunes Peroni
Coordenadora da CEUA/IPEN

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000
Fone (11) 2810-1570 ou (11) 2810-1572
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil
<http://mprofissional.ipen.br>

O Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento Econômico do Governo do Estado de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) do Governo Federal.