

ANÁLISE DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO COMPLEXO HOMEOPÁTICO M8 EM FERIDAS INDUZIDAS EM RATOS

ANALYSIS OF HEALING ACTIVITY OF THE M8 HOMEOPATHIC COMPLEX ON INDUCED WOUNDS IN MOUSE

JOÃO ALBERTO GARCIA ALVES FILHO^{1*}, RENAN ROCHA CABRERA², VALÉRIA DO AMARAL³

1. Discente do curso de graduação em Medicina do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR; 2. Acadêmico do curso de graduação em Medicina do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR; 3. Graduada em Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), Especialista em Farmacologia pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), docente do curso de graduação em Medicina do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR.

* Rua José Moreno Junior, 674, apto. 602 bl. B. Edifício Twin Towers, Jardim Aclimação, Maringá, Paraná, Brasil. CEP: 87.050-710.
joao.albertoo@hotmail.com

Recebido em 02/12/2015. Aceito para publicação em 17/02/2016

RESUMO

O homem sempre buscou na natureza plantas medicinais para satisfazer suas necessidades primárias à saúde. Entre os agentes cicatrizantes estão os extratos vegetais e a utilização da homeopatia, práticas amplamente utilizadas no Brasil. O presente estudo avaliou a ação cicatrizante do creme do complexo homeopático M8 em feridas induzidas em ratos. Para o estudo da cicatrização, foram utilizados 90 ratos da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 300g, distribuídos aleatoriamente em três grupos de 30 animais de acordo com o período de observação (3°,7°, 14°,21° e 28° dias) e tratamento. Tais grupos ainda, subdivididos em grupos de 6 animais de acordo com o tratamento recebido (controle e tratado) e período de tratamento em dias (3°,7°, 14°,21° e 28° dias); são eles: grupo controle (soro fisiológico 0.9%, grupos tratado com creme base e grupo tratado com o creme do complexo M8). No final de cada período de tratamento, foram coletadas amostras para realização da análise macroscópica e histopatológica. Verificou-se ao final do estudo que a utilização do complexo homeopático M8 por via tópica não alterou significamente a atividade cicatrizante quando comparados com os grupos tratado base e grupo controle negativo (SF 0,9%).

PALAVRAS-CHAVE: Cicatrização, fitoterapia, homeopatia.

ABSTRACT

Man has always sought in the wild medicinal plants to meet their primary health needs. Among the healing agents are extracted plants and the use of homeopathy, practices widely used in Brazil. This study evaluated the healing action of the homeopathic complex M8 cream on wounds induced in rats. For the study of healing, 90 rats were used Wistar, weighing between

250 and 300 g were randomly divided into three groups of 30 animals according to the observation period (3, 7, 14, 21 and 28 days) and treatment. These groups will were divided into groups of 6 animals in the treatment received (control and treated) and treatment period in days (3, 7, 14, 21 and 28 days), they are: control group (saline 0.9 %, based cream treated groups and the group treated with the cream M8 complex). It has been found, the end of the study, the use of homeopathic complex M8 topically did not significantly alter healing activity when compared to base treated groups and the negative control group (0.9 % saline).

KEYWORDS: Homeopathy, phytotherapy, wound healing.

1. INTRODUÇÃO

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano, podendo atingir até 16% do peso corporal. Ela possui duas origens embriológicas, sendo uma ectodérmica que dá origem a uma porção epitelial denominada epiderme e outra de tecido conjuntivo de origem mesodérmica denominada derme. Este órgão possui uma camada queratinizada que previne a desidratação e protege contra o atrito, possui também, terminações nervosas sensitivas que enviam para o sistema nervoso central, estímulos ambientais. Através de suas glândulas sudoríparas, seu tecido adiposo e vasos sanguíneos, contribui para a termorregulação. A pele possui células do sistema imunitário que atuam contra a invasão de microrganismos, possui também um pigmento denominado melanina que protege contra radiação ultravioleta, e por ultimo, é na pele que ocorre a transformação de precursores em vitamina D, sendo de extrema importância a sua integridade. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011)

A suspensão na continuidade de um tecido corpóreo é denominada ferida, podendo ela ser aguda, ou crônica, quando ultrapassa 6 semanas de cicatrização. Atualmente as feridas vêm acarretando crescentes e elevados gastos para o sistema de saúde pública, além disso, gera um grande impacto psicológico, econômico e social para o paciente (LEITE *et al.*, 2012). As feridas podem ser classificadas como de primeira e segunda intenção, sendo a primeira uma cicatrização onde há perda mínima de tecido, as bordas da ferida estão apostas ou aproximadas e não há infecção. Já a segunda, é uma cicatrização que não há a possibilidade de aproximação, pois há perda extensa de tecido e pode ou não estar presente infecção (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

As feridas crônicas representam uma morbidade prevalente na população. Estudos indicam que cerca de 14% da população mundial possui algum tipo de ferida crônica. Portadores de feridas crônicas possuem uma redução na qualidade de vida devido a dor, alterações de mobilidade, abandono, interferência em relações pessoais, no ambiente de trabalho e familiar, inabilidade para o trabalho, depressão, perda de autoestima e isolamento social, sendo de extrema importância um tratamento eficaz e acessível a toda população (MAGELA, 2010; EVANGELISTA *et al.*, 2012).

Entre as feridas crônicas damos destaque as úlceras do pé diabético e as úlceras de pressão. A Diabetes Mellitus é uma doença com alta prevalência e cerca de 10% dos portadores da doença apresentam em alguma época da vida, úlcera nos pés. O pé diabético é um conjunto de alterações decorrentes de neuropatias, micro e macrovasculopatias que acomete o pé de portadores de DM. Estas alterações levam ao aparecimento de úlceras que são de difícil cicatrização e apresentam uma alta suscetibilidade a infecção, tornando-se a causa mais comum de amputações não traumáticas (HIROTA; HADDAD; GUARIENTE, 2008).

As úlceras de pressão são causadas por uma isquemia tecidual local em pessoas que apresentam o reflexo de dor alterado, sendo os principais grupos acometidos pacientes com lesão medular, idosos e portadores de doenças crônico-degenerativas. Ela é caracterizada por qualquer lesão causada por pressão não aliviada, fricção e cisalhamento, acarretando em morte tecidual e podendo provocar complicações e agravar o estado clínico de pacientes com mobilização restrita. Estudos comprovam que a incidência e a prevalência mundial de úlceras de pressão permanecem elevadas, sendo necessárias novas pesquisas para aperfeiçoar ou desenvolver novas formas terapêuticas (COSTA *et al.*, 2005; MEDEIROS; LOPES; JORGE, 2009).

A utilização de compostos derivados de plantas e minerais como terapêutica em diversas patologias é registrada desde os tempos remotos, como pelos indianos no século I a.C, pelos chineses durante a dinastia Ma-

wangdui Han que reinou durante os séculos 206 a.C. até o século 220 d.C., e por muitos outros povos em todo mundo (ALVES, 2013). O Brasil é o maior detentor de biodiversidade do mundo e possui também uma grande diversidade cultural, o que resultou em um vasto acervo de conhecimentos e tecnologias naturais, podendo essas serem utilizadas para as mais diversas patologias, incluindo o auxílio na cicatrização de feridas (BRASIL, 2006).

Cicatrização

A cicatrização de feridas compreende uma série de eventos que envolvem a interação entre células e sistema mensageiro. É constituída por três fases que se sobrepõem: inflamação, proliferação e maturação (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

A fase inflamatória é caracterizada pelo dano vascular com hemorragia local, causando a rápida ativação das vias de coagulação e uma vasoconstrição como resposta primária. Com a exposição da matriz extracelular, principalmente colágeno fibrilar, presente na parede do vaso, ocorre ativação de plaquetas, sua adesão, agregação e a secreção de fatores vasoativos (tromboxano A2), fatores de coagulação (fator de von Willebrand e fator de Hageman) e diversas quimiocinas e citocinas. Esses fatores ativam a cascata de coagulação e ocorre a formação de um coágulo constituído por plaquetas, hemácias, componentes do complemento e fibrina. O coágulo detém o sangramento e, através da fibrina, funciona como um arcabouço para migração celular (KUMMAR *et al.*, 2012)

Através das quimiocinas liberadas pelas células presentes na ferida e o arcabouço formado pelo coágulo, neutrófilos e monócitos migram para a ferida. Os neutrófilos aparecem dentro de 24 horas e liberam enzimas proteolíticas que possuem função de lise, eliminando os restos bacterianos e necróticos. Os macrófagos são considerados as principais células reguladoras da fase inflamatória, pois eles apresentam função de lise e fagocitose e secretam diversos fatores que induzem a proliferação celular, a angiogênese e a formação de tecido de granulação (KUMMAR *et al.*, 2012).

A fase proliferativa inicia a partir da formação de tecido de granulação, o qual, é constituído pela proliferação de fibroblastos e de células endoteliais vasculares juntamente com a presença de angiogênese. A angiogênese ocorre através da proliferação das células endoteliais vasculares adjacentes à ferida e é estimulada principalmente pelo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) secretado pelos macrófagos e neutrófilos em condições de baixa pressão parcial de oxigênio presente na ferida (KUMMAR *et al.*, 2012; LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

A proliferação fibroblástica ocorre também através da secreção de fatores de crescimento pelos macrófagos e neutrófilos, sendo os principais fatores o fator de cres-

cimento transformante- β (TGF- β), o de crescimento epidérmico (EGF), o de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). A baixa pressão parcial de oxigênio estimula a proliferação dos fibroblastos, porém com menos intensidade que os fatores de crescimento. Posteriormente à proliferação dos fibroblastos, estes começam a sintetizar colágeno tipo III e outras proteínas da matriz extracelular, ficando o tecido de granulação rico em colágeno (KUMMAR *et al.*, 2012).

Na fase de maturação ocorre a substituição do colágeno tipo III por colágeno tipo I, o qual é estável e semelhante ao colágeno pré-lesional, com conseqüente formação de cicatriz. Os vasos neoformados regridem e a cicatriz se torna empalidecida. Esse processo ocorre através de metaloproteinases (MMP's), secretadas por macrófagos, fibroblastos, neutrófilos e algumas células epiteliais, e inibidores tecidulares de metaloproteinases (TIMP's) secretados pelas células mesenquimais impedindo que essas enzimas atuem descontroladamente. As metaloproteinases clivam o colágeno tipo I, II e III e outras proteínas da matriz extracelular (KUMMAR *et al.*, 2012; LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

A reepitelização é a fase final do processo de cicatrização. As células epiteliais presentes na borda da ferida migram por debaixo da crosta e se fundem na linha média, formando uma fina camada de tecido epitelial, que posteriormente se torna mais espessa (KUMMAR *et al.*, 2012; LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

A homeopatia surgiu no século XVIII por Samuel Hahnemann e foi reconhecida em 1980 como especialidade médica. É um sistema terapêutico fundamentado no princípio vitalista e na lei dos semelhantes, proposto por Hipócrates no século IV a.C. que consiste em substâncias preparadas e diluídas infinitesimalmente que geram sintomas parecidos com o da doença em pessoas aparentemente sadias. A portaria 971, editada em 2006, assegura o acesso da homeopatia para todos os usuários do SUS, ficando acessível para toda população independentemente do nível social (LOCH-NECKEL; CARMIGNAN; CREPALDI, 2010).

O complexo M8 é um complexo homeopático derivado de Calcáricarbônica com associações (ANDRADE, 2009). Complexos homeopáticos vem sendo utilizados em todo o mundo com a perspectiva de aumentar a efetividade do sistema imunológico, resultando na redução da frequência de certas patologias, e apresentando, muitas vezes, nenhum efeito colateral, devido a sua baixa toxicidade. Estudos mostraram que o complexo M8 foi capaz de promover a diminuição do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), Interferon Gama (IFN- γ), das espécies reativas do oxigênio, além de aumentar a produção de Oxido Nítrico (NO) e reforçar a imunidade inata (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Portanto, há evidências cientí-

ficas que o complexo M8 possa ter um efeito aditivo no controle das respostas inflamatória e cicatricial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Aquisição da amostra

O complexo M8 utilizado neste trabalho foi gentilmente fornecido por Simone Martins de Oliveira. Posteriormente, parte do complexo foi encaminhado ao laboratório de farmacotécnica do Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR) para ser incorporado a uma base-creme Lanette contendo 10% do complexo mencionado para início da fase experimental. A técnica utilizada para incorporação do complexo M8 ao creme Lanette seguiu a recomendação da Anvisa, a qual, deve-se incorporar o insumo ativo, em temperatura não superior a 50 °C, na proporção de 10% (v/p), ao insumo inerte e homogeneizar (FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA, 2011).

O complexo M8 possui uma matriz obtida da Calcáricarbônica CH5 e associações, e segue a farmacotécnica homeopática de Hahnemann, sendo altamente diluído (ANDRADE, 2009).

Animais experimentais

Foram utilizados 90 ratos da linhagem Wistar, com peso variando entre 250g a 300g, procedentes e adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os animais permaneceram, durante todo o procedimento experimental, dispostos individualmente em gaiolas de polietileno, com a temperatura variando de 22°C a 23°C, com ciclo de luz/escuro de 12/12 horas. Os animais foram alimentados diariamente com ração industrializada padronizada e água ad libitum. A limpeza e observação dos animais foram realizadas diariamente com o intuito de evitar que agentes do meio externo interferissem no processo cicatricial.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de 30 animais, sendo eles: grupo tratado (creme M8 10%), grupo controle negativo (soro fisiológico 0,9%) e grupo controle creme (base do creme Lanette). Posteriormente, cada grupo sofreu subdivisão de acordo com os períodos de observação: 3^o, 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dias de experimentação (n=6 por grupo subdividido). No final de cada período de tratamento, foram coletadas amostras para realização da análise macroscópica e histopatológica.

Os animais foram manipulados e mantidos no Biotério do Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR), o qual possui controle de temperatura e umidade, timer para ciclo luz/escuro e não fica exposto a condições estressantes para o animal. Foram utilizadas as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Centro Universitário de Maringá. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da institui-

ção, onde está cadastrado sob o protocolo de número 009/2015.

Procedimento anestésico

Na etapa experimental os animais foram pesados e colocados sobre uma prancha cirúrgica em decúbito ventral e imobilizados através de tensores elásticos para indução anestésica, que foi realizada com a injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico 50mg/kg.

Depilação e procedimento cirúrgicos

Sob anestesia geral, realizou-se o procedimento cirúrgico em todos os animais, que consistiu inicialmente no processo de depilação manual dos pelos da parte do dorso superior dos animais, com a utilização de aparelho de barbear, em uma extensão de 6cm de comprimento e 4cm de largura totalizando uma área de 24cm².

A seguir, no centro da região depilada, foi realizada a demarcação da área a ser excisionada e com um punsh metálico cortante realizou-se a excisão cutânea de 6 mm de diâmetro, até a exposição da fáscia muscular. Quando necessário, foi realizado imediato procedimento de hemostasia com gaze estéril.

Após a operação, todos os animais receberam tratamento conforme o grupo que pertencem e foram acondicionados em suas respectivas caixas, em temperatura ambiente, com ciclo claro-escuro e com livre acesso à água potável e ração padrão comercial (Nuvilab®). Todas as gaiolas foram limpas e a ração e água trocadas diariamente. Os animais permaneceram sob este regime até a data prevista para as aferições do experimento.

Eutanásia e obtenção das amostras

Ao final de cada período de observação (3^o, 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dias), os animais sofreram eutanásia com dose letal de Pentobarbital sódico 100mg/kg e Lidocaína sem vasoconstritor 10mg/Kg, via intraperitoneal como demonstrado no trabalho de Seabra, Pompeu e Valente (2015). Em seguida, foram colocados sobre a prancha cirúrgica para a coleta das amostras morfológicas. Cada ferida cirúrgica foi dissecada com margem de 1 centímetro de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do animal, sendo a peça cirúrgica colocada em recipiente plástico com álcool a 70%. As amostras foram enviadas para o Laboratório Maringá para análise histopatológica.

Avaliação macro e microscópica

Nos dias de coleta do material, eram tomadas, com paquímetro digital, as medidas das feridas (milímetros) em seu maior e menor diâmetro. As medidas eram tomadas no sentido vertical e horizontal, com o intuito de analisar a contração do ferimento macroscopicamente, e, os valores eram anotados em uma planilha em Excel para posterior avaliação.

A análise microscópica foi realizada através da avaliação dos fragmentos histológicos, os quais foram fixados em formalina (formol a 10%), com amostragem de todo material recebido, para que as áreas cicatriciais pudessem ser conferidas inteiramente. Os materiais foram incluídos em blocos de parafina, geralmente seccionados em 3 fragmentos. O material foi submetido a processamento histológico, e emblocado em parafina, e recortado na espessura de 2 micrometros (duas micras). Foram analisados mediante microscopia óptica, com o uso do Microscópio Nikon 50i, com aumentos de 40 a 400x, porém a maioria dos detalhes histológicos foram avaliados e mensurados nos aumentos de 40 a 100x. Foram feitos recortes e as lâminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina. Foram analisados cerca de 9 espécimes por caso, sendo avaliados numerosos campos. Após a avaliação criteriosa destes 9 espécimes, foi realizada uma média dos achados, e preenchida uma tabela de avaliação.

Os parâmetros de avaliação utilizados pelo patologista para preenchimento dessa tabela foram:

Inflamação aguda = IA. Presença de neutrófilos. 0 = ausentes, 1 = leve presença por 10 Campo de Grande Aumento (CGA), 2 = moderada presença por 10CGA, 3 = frequentes por 10 CGA.

Inflamação crônica = IC. Presença de monomorfonucleares. 0 = ausentes, 1 = leve presença por 10CGA, 2 = moderada presença por 10CGA, 3 = frequentes por 10 CGA.

Necrose isquêmica = NI. Necrose. 0 = ausente, 1 = focal, 2 = moderadamente intensa, 3 = severa.

Tamanho máximo da cicatriz em milímetros (mm) = TC.

Fibroblastos = FB. Células fusiformes. 0 = ausentes, 1 = escassas por 10 CGA, 2 = moderadas por 10 CGA, 3 = frequentes por 10 CGA.

Fibrose = FI. Colágeno. 0 = derme frouxa, não cicatricial; 1 = derme cicatricial com baixa fibrose; 2 = derme cicatricial com moderada fibrose; 3 = derme cicatricial com características de queleide.

Ulceração = UL. Presença da integridade da epiderme. 0 = Ausência de úlcera, se presente, tamanho da área de ulceração em milímetros (mm).

CGA = Campo de grande aumento (400x).

Tabela 1. Escores de cicatrização utilizados para a avaliação quantitativa, segundo Cavalcanti *et al.*, (2011).

Escore 0	Epitélio normal e tecido conjuntivo sem vasodilatação; ausência ou discreta infiltração celular, ausência de áreas hemorrágicas, ulcerações ou abscessos.
Escore 1	Discreta ingurgitação vascular, áreas de re-epitelização; discreto infiltrado inflamatório com predomínio mononuclear, ausência de áreas de hemorragia, edema, ulcerações ou abscessos.
Escore 2	Moderada ingurgitação vascular, áreas de degeneração hidrópica do epitélio, infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos, presença de áreas hemorrágicas, edema e eventuais ulcerações, ausência de abscessos.

Escore 3	Grave ingurgitação e dilatação vascular, infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos, presença de áreas hemorrágicas, edema e extensa ulceração e abscessos.
----------	--

A partir dos achados histológicos da análise microscópica, fez-se a sobreposição dos resultados com o escore de cicatrização adotado por Cavalcanti *et al.*, 2011. (Tabela 1).

Análise estatística

Os dados obtidos foram digitados em planilha do programa Microsoft Excel 2010 e em seguida analisados por meio de tabelas. O software utilizado para fazer as análises estatísticas foi o Statistica 8.0. Foi realizado inicialmente o teste de Shapiro Wilk para verificação de normalidade dos dados. Com a constatação de não normalidade optou-se pela utilização de testes não paramétricos. Para a descrição dos dados foram usados média e desvio padrão. Para comparar as variáveis em todos os tempos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Foram consideradas significativas as comparações considerando nível de significância de 5%, ou seja, significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Avaliação macroscópica da contração das feridas e análise histológica quantitativa

Durante a experimentação animal não foi observado o desenvolvimento de abscessos em nenhum dos animais utilizados para o estudo. Sendo assim, esse parâmetro não foi avaliado estatisticamente.

No primeiro dia de experimentação animal, todos as feridas e os cortes histológicos foram observados. Foi possível verificar que não houve diferenças relevantes entre os grupos. Em todos os cortes, pôde ser observada extensa área de ulceração e presença de coágulo sanguíneo correspondendo à região da realização da ferida, em cuja superfície havia um infiltrado inflamatório de moderado a intenso, predominantemente agudo. Analisando o tecido conjuntivo denso, pode-se ver região bastante celularizada, a presença de um edema intercelular permeado por um discreto infiltrado inflamatório mononuclear evidente.

Quando avaliada a contração da ferida no terceiro dia do experimento, pode-se observar que as medidas, horizontal ($p=0,00828$) e vertical ($p=0,03701$), da área excisionada, apresentaram diferença estatisticamente signifi-

ficativa entre os grupos. No terceiro dia, a medida horizontal do grupo tratado com o ativo apresentou valores de contração inferiores quando comparado com o controle negativo, bem como quando comparado ao grupo controle tratado com a base do creme. Da mesma forma, as medidas de contração vertical do grupo tratado com o ativo também apresentaram valores inferiores aos do grupo controle negativo (Tabela 2), demonstrando menor capacidade de retração da área excisada.

O grupo controle tratado com a base do creme mostrou, quando avaliado no 21º dia, contração horizontal significativamente maior dos demais grupos ($p=0,00311$). No 28º dia de experimentação o grupo controle negativo apresentou diferença significativa, em relação ao grupo tratado com a base do creme, quando comparado a contração de ferida na medida vertical ($p=0,01615$) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição da média e desvio padrão para os grupos avaliados segundo o dia de avaliação.

Variável	Controle tratado						p	
	Controle negativo		base		Grupo tratado ativo			
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão		
3º	Horizontal	7,84	1,44	8,26	0,82	10,10	1,06	0,0449*
	Vertical	6,02	1,13	7,07	1,24	8,16	1,48	0,0106*
7º	Horizontal	3,96	0,62	4,41	0,65	4,84	0,66	0,0958
	Vertical	3,48	0,50	3,43	0,53	3,28	0,53	0,5873
14º	Horizontal	4,51	1,11	3,80	1,09	4,33	1,24	0,4436
	Vertical	3,33	1,24	3,33	0,80	2,91	0,85	0,5873
21º	Horizontal	4,18	1,06	2,59	0,26	4,25	0,80	0,0039*
	Vertical	2,92	0,65	4,14	1,44	3,32	0,95	0,2636
28º	Horizontal	4,52	1,17	2,53	1,22	3,57	0,63	0,5225
	Vertical	3,58	0,92	4,31	1,29	4,00	1,28	0,0254*

* ANOVA significativa considerando nível de significância de 5%; A: Tratado ativo difere dos demais grupos; B: Controle negativo difere de Tratado ativo; C: Controle tratado base difere dos demais grupos; D: Controle negativo difere do tratado base.

O grupo controle negativo (GCN), quando analisado pelo escore da Tabela 1, mostrou diferença significativa na variável "IA" (inflamação aguda) no terceiro dia. Apresentou valores estatisticamente inferiores ($p=0,0025$) quando comparado ao grupo tratado base (Tabela 3), sendo classificado como escore 1 e 2, respectivamente. Os achados histológicos demonstraram que a resposta inflamatória aguda dos animais do GCN estava diminuída, se caracterizando por menor presença de neutrófilos no local da injúria.

Não ficaram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas quando comparados os grupos para as variáveis no 7º, 14º, 21º e 28º dias (Tabelas 4,5,6 e 7).

O estudo experimental mostrou que não houve diferenças relevantes entre os grupos controle e tratado a partir do 7º dia em diante. As áreas das feridas estavam completamente cicatrizadas, ao final do experimento, com presença de epitélio pavimentoso estratificado or-

toceratinizado na superfície e inúmeros anexos cutâneos na derme em todos os animais.

Tabela 3. Distribuição da média e desvio padrão para as variáveis avaliadas segundo o grupo de avaliação no terceiro dia.

Variável	Controle negativo			Controle tratado base			Grupo tratado ativo			P
	Média	±	Desvio Padrão	Média	±	Desvio Padrão	Média	±	Desvio Padrão	
IA - 3º dia	1,67	±	0,82	3,00	±	0,00	2,67	±	0,52	0,0025*
IC - 3ª dia	0,83	±	0,41	1,00	±	0,00	1,00	±	0,00	0,3679
NI - 3ª dia	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,00	±	0,00	0,9999
TC - 3ª dia	5,50	±	1,64	7,50	±	1,38	7,83	±	0,75	0,0559
FB - 3ª dia	2,67	±	0,82	3,00	±	0,00	3,00	±	0,00	0,3679
FI - 3ª dia	1,00	±	0,00	1,00	±	0,00	1,00	±	0,00	0,9999
UL - 3ª dia	4,50	±	0,84	5,00	±	0,89	6,33	±	1,75	0,0766

* ANOVA significativa considerando nível de significância de 5%; A: Grupo controle negativo difere de tratado base.

Tabela 4. Distribuição da média e desvio padrão para as variáveis avaliadas segundo o grupo de avaliação no sétimo dia.

Variável	Controle negativo		Controle tratado base		Grupo tratado ativo		p*
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
IA - 7º dia	1,17	0,41	0,67	0,52	1,17	0,41	0,1194
IC - 7ª dia	2,00	0,00	1,67	0,52	1,83	0,41	0,3220
NI - 7ª dia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,9999
TC - 7ª dia	3,08	1,02	3,17	0,41	3,83	0,75	0,2265
FB - 7ª dia	3,00	0,00	3,00	0,00	2,67	0,52	0,1194
FI - 7ª dia	2,00	0,00	2,00	0,00	2,00	0,00	0,9999
UL - 7ª dia	1,17	0,75	0,33	0,82	0,58	0,49	0,1062

* ANOVA não significativa considerando nível de significância de 5%.

Tabela 5. Distribuição da média e desvio padrão para as variáveis avaliadas segundo o grupo de avaliação no décimo quarto dia.

Variável	Controle negativo			Controle tratado base		Grupo tratado ativo		p*
	Média	±	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
IA - 14º dia	0,33	±	0,82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,3679
IC - 14ª Dia	1,17	±	0,41	1,00	0,00	1,00	0,00	0,9999
NI - 14ª Dia	0,00	±	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,4217
TC - 14ª Dia	2,58	±	0,58	2,25	0,61	2,08	0,80	0,1194
FB - 14ª Dia	3,00	±	0,00	3,00	0,00	2,67	0,52	0,0866
FI - 14ª Dia	2,33	±	0,52	2,17	0,41	1,67	0,52	0,3679
UL - 14ª Dia	0,08	±	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,9999

* ANOVA não significativa considerando nível de significância de 5%.

Tabela 6. Distribuição da média e desvio padrão para as variáveis avaliadas segundo o grupo de avaliação no vigésimo primeiro dia.

Variável	Controle negativo			Controle tratado base		Grupo tratado ativo		p*
	Média	±	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
IA - 21º dia	0,00	±	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,9999
IC - 21ª dia	0,83	±	0,41	0,67	0,52	0,50	0,55	0,4925
NI - 21ª dia	0,00	±	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,9999
TC - 21ª dia	3,67	±	0,82	3,00	1,10	2,50	0,63	0,0978
FB - 21ª dia	2,83	±	0,41	2,33	0,52	3,00	0,00	0,1547
FI - 21ª dia	1,83	±	0,41	1,33	0,52	2,17	0,41	0,0856
UL - 21ª dia	0,08	±	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,3679

* ANOVA não significativa considerando nível de significância de 5%;

Tabela 7. Distribuição da média e desvio padrão para as variáveis avaliadas segundo o grupo de avaliação no vigésimo oitavo dia.

Variável	Controle negativo		Controle tratado base		Grupo tratado ativo			P
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	±	Desvio Padrão	
IA - 28º dia	0,17	0,41	0,17	0,41	0,00	±	0,00	0,5879
IC - 28ª dia	1,00	0,00	0,67	0,52	0,33	±	0,52	0,1547
NI - 28ª dia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	±	0,00	0,9999
TC - 28ª dia	2,33	0,82	1,67	1,37	2,83	±	1,72	0,3405
FB - 28ª dia	1,00	0,00	1,17	0,41	1,67	±	0,82	0,1454
FI - 28ª dia	1,00	0,00	0,67	0,52	0,83	±	0,41	0,3220
UL - 28ª dia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	±	0,00	0,9990

* ANOVA não significativa considerando nível de significância de 5%;

4. DISCUSSÃO

Segundo Andrade (2009), a homeopatia é reconhecida no Brasil desde 1980 como especialidade médica e uma forma terapêutica de tratamento oficial desde 1979 pela Associação Médica Brasileira (ABM). É uma terapia de grande aceitação popular devido a seus resultados, baixo custo capital, e não se ter registro de toxicidades ou efeitos colaterais. Entretanto, a eficácia terapêutica do tratamento homeopático é pouco comprovada cientificamente, com uma quantidade ainda insuficiente de estudos controlados e que utilizam metodologias com qualidades.

Como relata Neto *et al* (2006) em seus estudos a OMS estima que 80% da população de países em desenvolvimento é tratada com técnicas da medicina popular e desse total, 85% usam produtos de origem vege-

tal. A investigação da atividade do complexo homeopático M8 faz-se justificável

Estudos realizados, por Abud (2010); Oliveira (2011); Andrade (2009), *in vitro* e *in vivo* comprovaram que o ativo utilizado em nossos experimentos foi capaz de promover aumento do metabolismo de macrófagos em camundongos, reduzir a produção de TNF- α *in vitro*, aumentar o índice endocítico, bem como o sistema endossomal/lisossomal dos macrófagos, quando desafiados com leveduras. Foi capaz também, de promover redução do volume tumoral e aumento significativo da infiltração leucocitária e da fibrose peritumoral no modelo de Sarcoma 180 e mostrou remissão total do tumor em 30% dos animais tratados por via oral com o complexo M8. Os achados de Oliveira (2011) demonstram que o tratamento homeopático com o ativo, via oral, atua no sistema imunológico e pode ser benéfico ao organismo

Conforme demonstrado em nossos experimentos, a avaliação macroscópica que constou da verificação da

contração da ferida, tendo como referência as medidas demarcadas no dia do procedimento cirúrgico, mostrou medidas horizontal e vertical das feridas do grupo tratado topicamente com o M8, com valores superiores aos demais, evidenciando uma diminuição na capacidade de retração da ferida no terceiro dia de experimentação (Tabela 2), Tal achado sugere que pode ter ocorrido alteração na proliferação celular no local da injúria, sendo essa responsável pelo “fechamento” da lesão propriamente. A proliferação é dividida em três subfases, que são a reepitelização, a fibroplasia e a angiogênese, portanto podem ter ocorrido mudanças em alguma dessas subfases. Contudo, os resultados subsequentes do estudo, atestaram não haver diferenças macroscópicas e microscópicas do processo cicatricial entre os grupos analisados (KUMMAR *et al.*, 2012).

Nossos resultados podem ser justificados pela via de escolha de tratamento, no caso, uso tópico e pela falta de dinamização do complexo M8 antes do tratamento das feridas. O estudo desenvolvido por Andrade (2009) corrobora com esta hipótese pois o mesmo afirma que na manipulação de medicamentos homeopáticos, antes de qualquer tratamento, o medicamento necessita ser suscitado vigorosamente. Sendo esse procedimento fundamental para a manutenção das propriedades farmacológicas de qualquer medicamento homeopático.

O resultado encontrado no grupo controle negativo, que mostra redução da atividade inflamatória aguda, pode ser explicado, pelo menos em parte, pela dependência da ação inflamatória das condições locais, ligadas à ferida, e das condições gerais, ligadas ao paciente como um todo. Sabe-se que para se obter uma boa cicatrização, necessariamente as condições gerais do portador de feridas devem estar em seu melhor estado. Os principais fatores sistêmicos que interferem na cicatrização são nutrição, vascularização, uso de medicações sistêmicas, doenças sistêmicas, idade e tabagismo. Entre os fatores não sistêmicos interferentes na resposta inflamatória, está o estresse (GUYTON; HALL, 2011).

5. CONCLUSÃO

Não houve diferença estatisticamente significativa com relação à contração da ferida e atividade inflamatória final entre os grupos não tratados e tratado com o complexo M8, obtendo ambos resultados compatíveis com a atividade normal do processo cicatricial. Entretanto, faz-se necessário, posteriores investigações do complexo M8 utilizando outras vias de administração que permitam a técnica de dinamização para que se identifique seu real valor terapêutico.

REFERÊNCIAS

- [1] ABUD, Ana Paula Ressetti. Atividade imunomodulatória de complexos altamente diluídos sobre células de medula óssea murina e linhagem leucêmica humana. 2010. 129 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular, Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010. Disponível em: <http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/24874/Ana_Paula.pdf?sequence=1>. Acesso em: 18 ago. 2015.
- [2] ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas Rev. Virtual Quim., 2013, 5 (3), 450-513. Data de publicação na Web: 3 de julho de 2013.
- [3] ANDRADE, L. F. Ação de complexo homeopático em macrófagos peritoneais e no sangue periférico de camundongos. 2009. 25 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura e Bacharelado, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- [4] BRASIL. Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde. 2006. 60 p.
- [5] COSTA, M. P. et al. Epidemiologia e tratamento das úlceras de pressão: experiência de 77 casos. Acta ortop. bras. São Paulo, v. 13, n. 3, p. 124-133, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-78522005000300005&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 26 abr. 2015.
- [6] EVANGELISTA, D. G. et al. Impacto das feridas crônicas na qualidade de vida de usuários da estratégia de saúde da família. R. Enferm. Cent. O. Min. v. 2, n. 2, p. 254-263, 2012.
- [7] FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. 3ª ed. S. Paulo, 2011. Versão em formato digital e de livre acesso: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/contedo/3a_edicao.pdf
- [8] GUYTON, A.C., HALL, J.E Tratado De Fisiologia Médica 12. Ed. Rj . Guanabara Koogan, 2011.
- [9] HIROTA, C. M. O.; HADDAD, M. C. L.; GUARIENTE, M. H. D. M. Pé diabético: o papel do enfermeiro no contexto das inovações terapêuticas. Ciênc. Cuid. Saúde. v. 7, n. 1, p. 114-120, jan./mar. 2008.
- [10] JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda., 2011. 524 p.
- [11] KUMAR; A.; FAUSTO; A. Robbins e Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 1480 p.
- [12] LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de feridas. Revista da SPDV, v. 69, n. 3, p. 355-367, 2011.
- [13] LEITE, A. P. et al. Uso e efetividade da papaina no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. Rev. Gaúcha Enferm. Porto Alegre, v. 33, n. 3, p. 198-207, set. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-14472012000300026&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 26 abr. 2015.

- [14] LOCH-NECKEL, G.; CARMIGNAN, F.; CREPALDI, M. A. A homeopatia no SUS na perspectiva de estudantes da área da saúde. Rio de Janeiro, Rev. bras. educ. med. v. 34, n. 1, p. 82-90, mar. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-55022010000100010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 26 abr. 2015.
- [15] MAGELA, S. G. Processo de viver do portador com ferida crônica: atividades recreativas, sexuais, vida social e familiar. Saúde Coletiva, vol. 7, n. 46, 2010, p. 300-304, 2010.
- [16] MEDEIROS, A. B. F.; LOPES, C. H. A. F.; JORGE, M. S. B. Análise da prevenção e tratamento das úlceras por pressão propostos por enfermeiros. Rev. Esc. Enferm. USP. São Paulo, v. 43, n. 1, p. 223-228, 2009.
- [17] CASTELO BRANCO NETO, Manoel Lages et al. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. Acta Cir. Bras. [online]. 2006, vol.21, suppl.2 [cited 2016-04-06], pp.17-22. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502006000800004&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1678-2674. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502006000800004>
- [18] OLIVEIRA, C. C. et al.: Developments on drug discovery and on new therapeutics: highly diluted tinctures act as biological response modifiers. BMC Complement. Altern. Med. v. 11, n. 1, p. 101, out. 2011.
- [19] SEABRA, D. I.; POMPEU, E.; VALENTI, M. L. G. Anestesia e analgesia de animais utilizados em protocolos experimentais. Biotério da Faculdade de Medicina da USP. p. 1-8. 2015. Disponível em: <http://www.bioterio.fm.usp.br/pdf/Anestesia_e_Analgesia.pdf>. Acesso em: 10 out. 2015.
- [20] TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Wound biology and healing. Medicina (Ribeirão Preto), v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.