



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



JOSÉ ROBERTO PIMENTEL CABRAL DE SEIXAS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS À BASE DE
POLISSACARÍDEOS CONTENDO BIOMOLÉCULAS IMOBILIZADAS PARA
APLICAÇÃO NO REPARO TECIDUAL DE QUEIMADURAS TÉRMICAS DE
SEGUNDO GRAU**

Recife

2021

JOSÉ ROBERTO PIMENTEL CABRAL DE SEIXAS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS À BASE DE
POLISSACARÍDEOS CONTENDO BIOMOLÉCULAS IMOBILIZADAS PARA
APLICAÇÃO NO REPARO TECIDUAL DE QUEIMADURAS TÉRMICAS DE
SEGUNDO GRAU**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha

Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Antônio Galindo Soares

Recife

2021

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Seixas, José Roberto Pimentel Cabral de

Produção e caracterização de hidrogéis à base de polissacarídeos contendo biomoléculas imobilizadas para aplicação no reparo tecidual de queimaduras térmicas de segundo grau / José Roberto Pimentel Cabral de Seixas – 2021.

192 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria das Graças Carneiro da Cunha

Coorientadores: Maria Tereza dos Santos Correia e Paulo Antônio Galindo Soares

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Polímeros 2. Lactoferrina 3. Queimaduras I. Cunha, Maria das Graças Carneiro da (orient.) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorient.) III. Soares, Paulo Antônio (coorient.) IV. Título

620.192

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-214

JOSÉ ROBERTO PIMENTEL CABRAL DE SEIXAS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS À BASE DE
POLISSACARÍDEOS CONTENDO BIOMOLÉCULAS IMOBILIZADAS PARA
APLICAÇÃO NO REPARO TECIDUAL DE QUEIMADURAS TÉRMICAS DE
SEGUNDO GRAU**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 09/04/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha (Orientador)
Departamento de Bioquímica-UFPE/LIKA

Profa^a. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Examinador Interno)
Departamento de Bioquímica-UFPE/LIKA

Prof. Dr. Wilson de Barros Júnior (Examinador Externo)
Departamento de Física/UFPE

Dra. Katia Alves Ribeiro (Examinador Externo)
Departamento de Bioquímica-UFPE

Prof^a. Dra. Fernanda Miguel de Andrade (Examinador Externo)
Departamento de Farmácia/Faculdade de Integração do Sertão-FIS

Aos meus pais, José Roberto e Thaís, que nunca
pouparam energias para que eu pudesse alcançar
meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por toda luz necessária para que este propósito fosse alcançado.

Aos meus pais José Roberto de Seixas e Thaís Pimentel, pelo amor, dedicação e companheirismo. Esta é uma conquista nossa.

Aos meus irmãos Raphael e Arthur, por não levar apenas o nome irmão, mas carregar consigo o verdadeiro espírito de irmandade. A minha cunhada Isabella e minha sobrinha Júlia que tornam os dias mais felizes.

A minha filha Sophie, minha luz e força diária, dedico este trabalho aos dias que precisei não estar presente, esta conquista também é nossa, filha.

A minha namorada Julyanne Maria, a qual tenho tamanho respeito e admiração, estando ao meu lado em momentos bons e ruins, e jamais me deixando desanimar diante dos desafios da vida, você foi peça fundamental para que esse momento existisse.

Aos meus Avós José Jorge de Seixas e Carmen de Seixas, pelo apoio e carinho nesta jornada. Carrego comigo a frase sempre utilizada por meu avô, fundador dos cursos de Geologia e Engenharia Cartográfica da UFPE, tomo sempre como exemplo: “the best teacher is repetition and observation”.

Aos meus Avós Ronaldo Cabral e Telma Pimentel, por toda energia e amor, sei que sempre estiveram rezando e me apoiando neste caminho. A minha bisavó Maria de Lurdes, nossa base familiar.

Aos meus tios, tias e primos, vocês sempre serão meu alicerce. A minha tia Andréa de Seixas, pelo apoio, preocupação e carinho, pode ter certeza de que essa conquista também só foi possível por você estar ao meu lado.

Aos meus amigos de infância do colégio Vera Cruz, por tornar a vida mais suave e engraçada, sei que sempre posso contar com vocês.

À minha orientadora, professora Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha, por todo ensinamento, dedicação, carinho e amizade. Obrigado pelo incentivo, companheirismo, e confiança nesses 9 anos.

Ao meu coorientador, Paulo Antônio Galindo Soares. Obrigado pela paciência, confiança e amizade. Sem você nada nisso seria possível.

À minha coorientadora, Tereza dos Santos Correia, por aceitar fazer parte deste trabalho, juntamente com a professora Graça. Muito obrigado pela confiança, carinho, e por todo ensino durante a graduação e pós-graduação.

À professora Dra. Márcia Vanusa da Silva, que estive ao meu lado quando precisei, e me incentivou nesse longo caminho da pós-graduação.

À professora Dra. Priscilla Albuquerque, pela amizade e carinho, sempre foi um exemplo de como trabalhar em laboratório.

Ao professor Dr. Jacinto da Costa Silva Neto, pelo suporte aos ensaios realizados no laboratório de histologia, assim como aos ensinamentos passados desde a graduação à pós-graduação.

Ao professor Dr. Wilson de Barros Júnior, pela atenção, confiança e todo conhecimento passado durante os ensaios reológicos, foi de suma importância.

À professora Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, por todo carinho e incentivo, jamais esquecerei das palavras em minha qualificação para que eu continuasse, e não desistisse.

Aos meus amigos do laboratório de Biotecnologia, que ganhei nesta jornada: George, Fernanda Pacífico, Rita, Fernanda Andrade, Jan, Kátia, Andréa, Beatriz, Junior, Joyce, Mirla, Viviane, Marcela, Isabell, Elton, Adelmo e Marthynna, cada um de vocês foram peça chave para o bom desenvolvimento desta tese.

Aos amigos dos laboratórios parceiros, em especial Wêdeo Costa, Isabelly Bianca, Wesley Felix e Luíz Maia, a junção de amizade e trabalho torna tudo mais leve.

Aos técnicos, Vivaldo e Maria Helena. Tenho um carinho por vocês, nunca se negando a ajudar, em prol deste trabalho.

À Adenilda pelo auxílio e dedicação em inúmeras situações ao qual necessitei.

A Alex pela paciência e sempre estando de prontidão, auxiliando nos laboratórios da Bioquímica.

Aos ratos utilizados em experimentação. Em homenagem à sua importância para minha formação e para o conhecimento humano. Farei o máximo para aproveitar cada dado extraído, cada experiência profissional, e pessoal, de meu contato com eles.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, através do seu corpo docente e funcionários. E aos demais que, direta ou indiretamente, me incentivaram, apoiaram e contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

À FACEPE pelo suporte financeiro.

Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.

Chico Xavier

RESUMO

Hidrogéis são definidos como uma rede tridimensional de polímeros hidrofílicos, capazes de absorver grande quantidade de água e exercer múltiplas funções, como: entrega de medicamentos, selagem cirúrgica, manutenção de nutrientes, drogas e proteínas, assim como matriz de suporte para o crescimento celular e regeneração de tecidos. Os Hidrogéis em estudo foram preparados com 1,7% (p/v) de galactomanana (extraída de sementes de *Cassia grandis*) e 0,5% (p/v) de k-carragenana e o sal CaCl_2 0,2 M em pH 5,0; acrescidos ou não das biomoléculas lactoferrina (extraída de leite bovino) e Cramoll-1,4 (extraída do feijão camaratu – *Cratylia mollis*). Esta pesquisa visou avaliar a eficácia da formulação de hidrogéis contendo ou não as biomoléculas lactoferrina e lectina Cramoll-1,4 nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ no tratamento de queimaduras térmicas de segundo grau *in vivo*, utilizando *Rattus norvegicus*, albinos, da linhagem Wistar. Foram realizadas análises da estabilidade no período de 90 dias de estocagem a 4 °C, avaliando-se pH, cor e contaminação microbiana; medidas reológicas também foram feitas para análise das interações entre as biomoléculas e o hidrogel, através da rampa de amplitude, com mudulos G'/G'' . Os resultados obtidos revelaram que durante os 90 dias de estocagem não ocorreram modificações significativas para o pH ideal (5,0); houve um aumento na luminosidade (L^*) e diminuição da opacidade ($Y\%$) com valores significativos para o hidrogel sem a presença das biomoléculas, e nenhum crescimento microbiológico, por contagem de mesófilos aeróbios, bactérias lácticas, psicrotróficas, bolores e leveduras. As análises reológicas confirmaram as características sólidas e viscoelásticas dos hidrogéis, onde módulo $G' > G''$ não se alteram na presença das proteínas lactoferrina e/ou Cramoll 1,4, do mesmo modo, podemos identificar que a adição de tais proteínas diminuiu o ponto de transição $G' > G''$ para $G'' > G'$ quando comparado com o hidrogel sem a presença dessas biomoléculas; o CaCl_2 foi utilizado com função reticulante, e os resultados apontam que ocorre uma interação significativa apenas com a k-carragenana e não com a galactomanana. O tratamento da cicatrização dos animais com queimaduras térmicas de segundo grau foi feito topicamente com quatro diferentes formulações de hidrogéis: hidrogel (H); hidrogel contendo lactoferrina (HL); hidrogel contendo Cramoll 1,4 (HC) e hidrogel contendo lactoferrina e Cramoll 1,4 (HLC). Tais formulações demonstraram uma melhor resposta quando comparadas com o grupo controle de solução salina 0,9% NaCl (S). Estes resultados foram confirmados pelas análises macroscópicas, em lesões cicatrizando de maneira centrípeta, com percentagem de contração das queimaduras: H-32,85 %; HL-45,49 %; HC-36,05; %; HLC-66,10 % e S-20,76 %, tendo como destaque o hidrogel acrescido com as biomoléculas (HLC). Além disso, resultados histológicos comprovaram a diminuição no processo inflamatório, necrose tecidual e fibrose, com aumento da reepitelização e presença de acantose focal. Podemos concluir que a formulação de hidrogéis com a imobilização da lactoferrina e Cramoll 1,4, ganham destaque como novo sistema de tratamento para queimaduras de segundo grau. Somado a estes resultados, também foi realizada uma revisão sistemática detalhada da literatura, sobre a comparação das condições de modelos de queimaduras em ratos, a fim de otimizar a aplicabilidade dessas condições para modelos futuros na área da biomedicina.

Palavras-chave: lactoferrina. Cramoll 1,4. lesão térmica. hidrogéis polissacarídicos.

ABSTRACT

Hydrogels are defined as a three-dimensional network of hydrophilic polymers, capable of absorbing large amounts of water and exercising multiple functions, such as: delivery of medicines, surgical sealing, maintenance of nutrients, drugs and proteins, as well as a support matrix for cell growth and tissue regeneration. The hydrogels under study were prepared with 1.7% (w/v) of galactomannan (extracted from *Cassia grandis* seeds) and 0.5% (w/v) of k-carrageenan and 0.2 M CaCl_2 salt at pH 5.0; whether or not added lactoferrin biomolecules (extracted from bovine milk) and Cramoll-1,4 (extracted from camaratu beans - *Cratylia mollis*). This research aimed to evaluate the effectiveness of the formulation of hydrogels containing or not the biomolecules lactoferrin and lectin Cramoll-1,4 in concentrations of 100 $\mu\text{g/mL}$ in the treatment of thermal burns of second degree in vivo, using *Rattus norvegicus*, albinos, of the Wistar strain. Stability analyzes were performed during the 90 day storage period at 4 °C, evaluating pH, color and microbial contamination; rheological measurements were also made to analyze the interactions between the biomolecules and the hydrogel, through the amplitude ramp, with muds G'/G'' . The results obtained revealed that during the 90 days of storage there were no significant changes to the ideal pH (5.0); there was an increase in luminosity (L^*) and a decrease in opacity ($Y\%$) with significant values for the hydrogel without the presence of biomolecules, and no microbiological growth, by counting aerobic mesophiles, lactic, psychrotrophic bacteria, molds and yeasts. The rheological analyzes confirmed the solid and viscoelastic characteristics of the hydrogels, where $G' > G''$ modulus do not change in the presence of lactoferrin and/or Cramoll 1,4 proteins, in the same way, we can identify that the addition of such proteins decreased the transition point $G' > G''$ to $G'' > G'$ when compared to the hydrogel without the presence of these biomolecules; CaCl_2 was used with a crosslinking function, and the results indicate that a significant interaction occurs only with k-carrageenan and not with galactomannan. The healing treatment of animals with second-degree thermal burns was done topically with four different hydrogel formulations: hydrogel (H); hydrogel containing lactoferrin (HL); hydrogel containing Cramoll 1.4 (HC) and hydrogel containing lactoferrin and Cramoll 1.4 (HLC). Such formulations showed a better response when compared to the control group of 0.9% NaCl (S) saline solution. These results were confirmed by macroscopic analyzes, in lesions healing in a centripetal manner, with a percentage of burns contraction: H-32.85%; HL-45.49%; HC-36.05%; HLC-66.10% and S-20.76%, highlighting the hydrogel added with biomolecules (HLC). In addition, histological results confirmed the decrease in the inflammatory process, tissue necrosis and fibrosis, with increased reepithelialization and the presence of focal acanthosis. We can conclude that the formulation of hydrogels with the immobilization of lactoferrin and Cramoll 1.4, gain prominence as a new treatment system for second degree burns. In addition to these results, a detailed systematic review of the literature was also carried out, on the comparison of the conditions of burn models in rats, in order to optimize the applicability of these conditions for future models in the field of biomedicine.

Keywords: lactoferrin. Cramoll 1.4. thermal injury. polysaccharide hydrogels.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da Literatura

Figura 1 - Conformação reticulada do hidrogel.	20
Figura 2 - (a) Árvore <i>Cassia grandis</i> , (b) Vagem, fruto da árvore, (c) Vagem com sementes, (d) Sementes, (e) Galactomanana após extração e (f) Galactomanana obtida após extração.	26
Figura 3 - Representação das camadas da pele.	32
Figura 4 - Representação das cinco camadas da epiderme.	33
Figura 5 - Representação morfológica da membrana basal dermoepidérmica, evidenciando sua compactação com colágeno e outras proteínas do tecido conjuntivo.	34
Figura 6 - Esquema do mecanismo da hemostasia.	35
Figura 7 - Representação do processo inflamatório de feridas na pele. A ferida é caracterizada por um ambiente hipóxico (isquêmico) no qual um coágulo de fibrina se formou. Bactérias, neutrófilos e plaquetas são abundantes nesta etapa.	36
Figura 8 - Estágio proliferativo da cicatrização de feridas na pele.	38
Figura 9 - Estágio de remodelação da cicatrização de feridas na pele.	39
Figura 10 - Estágios do reparo tecidual: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento, desde o estabelecimento da lesão até total cicatrização, no decorrer do tempo.	39
Figura 11 - (a) descrição das zonas circundantes a uma lesão por queimadura, (b) camadas do tecido cutâneo, demonstrando as possíveis áreas que a zona de necrose pode atingir.	40
Figura 12 - Classificação das queimaduras com base na profundidade da lesão e descrição do tempo estimado para a sua cicatrização.	41

Artigo 1

Figura 1 - Medidas reológicas dos hidrogéis. Módulo elástico (G') e viscoso (G'') em função da tensão de cisalhamento (Pa), fluxo oscilatório dinâmico. a- hidrogel a base de galactomanana 1,7% (p/v) e k-carragenana 0,5% (p/v) acrescido de CaCl_2 . b-	64
--	----

galactomanana 1,7 % (p/v) acrescida ou não de CaCl₂. c- k-carragenana 0,5% (p/v) acrescido ou não de CaCl₂. d- hidrogel a base de galactomanana 1,7% (p/v) e k-carragenana 0,5% (p/v) acrescido ou não de CaCl₂. e- hidrogel + lactoferrina e hidrogel + Cramoll. f- hidrogel; hidrogel + lactoferrina e hidrogel + Cramoll.

Figura 2 - Evolução clínica observada nas queimaduras térmicas de segundo grau em ratos Wistar macho. a - Queimadura obtida com barra de 10 mm de diâmetro, com presença de edema leve; b - Tratamento de queimadura térmica usando 100 µl de hidrogel; c- Tecido lesionado 3 dias após a indução da queimadura, presença de crosta fina e seca com coloração homogênea e desprendimento discreto nas bordas; d - Tecido lesionado 7 dias após a indução da queimadura, presença de crosta seca em toda região da lesão, com coloração mais escura no centro. 67

Figura 3 - Avaliação clínica da cicatrização de queimaduras de segundo grau em ratos Wistar machos. Tratamento nos intervalos de: 3, 7 e 14 dias. Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Cramoll (HC); Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC) e controle negativo de Salina (S). 68

Figura 4 - Percentagem de contração das queimaduras nos intervalos de tempo 3,7 e 14 dias, tratados com hidrogéis e controle negativo (salina). Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Cramoll (HC); Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC) e controle negativo de Salina (S). A ILC (%) foi expressa como média ± erro padrão. (*) representação da diferença significativa (p<0,05) entre os grupos de tratamento e o grupo S (controle negativo). 69

Figura 5 - Tecido epitelial de ratos dos grupos de 3, 7 e 14 dias, submetidos a tratamento térmico de queimaduras de segundo grau. Coloração H&E. Barras de escala = 20 µm. Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ- 75

carragenana/galactomanana + Cramoll (HC); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC) e controle negativo de Salina (S). (a) formação de tampão; (b) presença de infiltrado inflamatório; (c) área de reepitelização; (d) queratinização e (e) redução de tampão e infiltrado inflamatório.

Figura 6 - Tecido epitelial de ratos dos grupos de 3, 7 e 14 dias, submetidos a tratamento térmico em queimaduras de segundo grau. Coloração tricrômico de Masson. Barras de escala = 20 μ m. Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Cramoll (HC); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC) e controle negativo de Salina (S). (a) formação de tampão; (b) presença de infiltrado inflamatório; (c) fibras colágenas; (d) reepitelização; (e) queratinização; (f) redução de tampão e infiltrado inflamatório e (g) acantose focal.

Artigo 2

Figura 1 - Diagrama de fluxo para estratégia de busca e seleção dos artigos incluídos. 105

Figura 2 - Demografia dos estudos. (A) especificação animal, (B) tipos de estudos, (C) raça dos ratos e (D) sexo dos ratos. Se os valores forem fornecidos como um intervalo, a média para esse intervalo é apresentada. 110

Figura 3 - Detalhes de criação da queimadura, incluindo: (A) mecanismo de lesão por queimadura, (B) local das queimaduras, (C) tipo de material e (D) método de material de aquecimento usado para aquecer os dispositivos de contato. 114

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 – Variação do pH entre os 4 tipos de hidrogéis formulados.	57
Tabela 2 – Parâmetros de cor L* e Y para os hidrogéis durante 90 dias.	60
Tabela 3 – Parâmetros de cor a* e b* para os hidrogéis durante 90 dias.	61
Tabela 4 – Análise histopatológica do grau de infiltrado inflamatório na derme, material proteico amorfo e necrose na pele após queimadura térmica profunda de segundo grau. As amostras foram obtidas nos dias 3, 7 e 14 após a indução da queimadura.	71
Tabela 5 – Análise histopatológica do grau de fibrose, epiderme lesada e área de reepitelização da pele após queimadura térmica profunda de segundo grau. As amostras foram obtidas nos dias 3, 7 e 14 após a indução da queimadura	73

Artigo 2

Tabela 1: Critérios de inclusão e exclusão para estudos elegíveis.	101
Tabela 2: Lista de itens para avaliação da qualidade dos artigos incluídos. As diretrizes ARRIVE [22] foram modificadas com os itens 11 e 14 não avaliado.	102- 103
Tabela 3: Dados coletados para análise dos artigos incluídos.	104
Tabela 4: Resumo da qualidade dos artigos incluídos nesta revisão. Avaliado usando as diretrizes ARRIVE modificadas (itens 11 e 14 excluídos), onde cada item é pontuado de 0–2. Para o item 17 (eventos adversos), 92% dos estudos foram avaliados como não aplicáveis.	106
Tabela 5: Os dados demográficos dos animais para os estudos incluídos (n = 25).	108-

Tabela 6: Metodologias de criação de queimadura. Se nenhum tamanho de gravação foi relatado, o tamanho médio de gravação foi calculado a partir das dimensões do dispositivo. 112-113

Tabela 7: Medidas de resultado para cada estudo incluído na revisão. 117-119

Tabela 8: As temperaturas e durações de exposição relatadas para criar queimaduras de gravidades diferentes. 120

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS.....	20
1.1.1 Objetivo Geral:.....	20
1.1.2 Objetivos Específicos:	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 HIDROGÉIS	21
2.2 GALACTOMANANAS	25
2.3 CARRAGENANAS	27
2.4 LACTOFERRINA	29
2.5 LECTINAS	30
2.6 QUEIMADURAS	32
2.6.1 Queimaduras e a Pele	33
2.6.2 Fisiopatologia da Queimadura	41
2.6.3 Curativos para Queimaduras	44
3 RESULTADOS	47
3.1 ARTIGO 1 - HIDROGÉIS À BASE DE GALACTOMANANA E K-CARRAGENANA CONTENDO BIOMOLÉCULAS IMOBILIZADAS PARA APLICAÇÃO EM QUEIMADURAS TÉRMICAS <i>IN VIVO</i>	47
3.2 ARTIGO 2 - COMPARAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MODELOS DE QUEIMADURAS EM RATOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA	97
4 CONCLUSÕES	131
REFERÊNCIAS	133
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	161
ANEXO B - NORMAS DA REVISTA CARBOHYDRATE POLYMERS	162
ANEXO C - ANEXO B NORMAS DA REVISTA BURNS.....	180

1 INTRODUÇÃO

Hidrogel é o nome usado para classificar um gel que é formado por uma rede tridimensional de polímeros hidrofílicos naturais ou sintéticos. Os hidrogéis devido à sua capacidade de absorver e reter elevadas quantidades de água ou fluidos biológicos sem a dissolução da rede polimérica apresentam boa biocompatibilidade, os tornando muito semelhante ao tecido humano. Dentre as suas múltiplas aplicações, têm sido utilizados como produtos de uso médico e farmacêutico como substituição de cartilagens e como cápsulas de liberação controlada de medicamentos e compostos bioativos devido à sua capacidade de proteger o medicamento contra condições ambientais hostis, tendo como princípio controlar a liberação do medicamento por alterações causadas em sua estrutura devido às flutuações no pH, temperatura, pressão, teor de oxigênio, entre outros.

Devido à sua composição, os hidrogéis podem ser divididos em hidrogéis de polímeros naturais, hidrogéis de polímeros sintéticos e combinação das duas classes poliméricas. A utilização de hidrogéis naturais é de grande importância principalmente nas aplicações médicas, por serem, em sua maioria, biocompatíveis e atóxicos podem ser aplicados nos mais variados produtos tanto de usos tópicos quanto de uso interno. Os hidrogéis à base de polissacarídeos têm recebido interesses consideráveis referentes às suas excelentes propriedades, incluindo absorção de excesso de exsudato, proteção contra infecções e fatores externos, fornecimento de pH ideal, que promovem a cicatrização rápida de feridas e queimaduras, além de serem facilmente removidos sem trauma. Devido à sua estrutura, os hidrogéis a base de polissacarídeos tais como os extraídos de sementes como a galactomanana e xiloglucana, de exudatos de plantas como arabinogalactanas e de algas, como agarose, alginato e k-carragenana têm sido amplamente utilizados como matrizes para imobilização de diferentes moléculas ativas.

A lactoferrina é uma importante glicoproteína da família da transferrina, multifuncional, presente no leite de mamíferos, encontrada nas lágrimas, saliva e outras secreções. É a principal proteína do soro do leite, com maior concentração no colostro, que apresenta inúmeras funções biológica tais como anticancerígena, antiinflamatória, antibacteriana, antiviral, antifúngica, efeito imunomodulador, e inibidora da formação de radicais livres.

A lectina obtida de sementes de *Cratylia mollis* (feijão camaratu) conhecida como Cramoll, é uma glicoproteína que tem sido empregada em várias aplicações biotecnológicas

em forma livre ou imobilizada por apresentar diferentes atividades biológicas tais como antitumoral, anti parasitária, anti-inflamatória e cicatrizante de feridas, isso é, lesões decorrentes de acidentes, traumas, cortes, incisões cirúrgicas e queimaduras.

As queimaduras são lesões nos tecidos resultantes da exposição térmica, radiação, contato químico ou elétrico que pode resultar em morbidade e mortalidade. Isso é, uma lesão por queimadura pode ter um impacto severo na vida dos sobreviventes, resultando em sequelas físicas e psicossociais em longo prazo. Segundo a Organização Mundial da Saúde a queimadura é uma das principais causas de morte no mundo. Uma vez que o paciente queimado é mais suscetível a infecções, em decorrência de imunossupressão e perda de cobertura cutânea, assim experimentos *in vitro* não podem capturar essa complexidade nem abordar a fisiopatologia, por essas razões, modelos animais para queimaduras são necessários para se descobrir o mecanismo patológico pós-queimadura e testar novas abordagens terapêuticas.

Durante muitos anos, o curativo convencional usado para as feridas foi a gaze de algodão e agentes antibacterianos tópicos, para protegê-las de trauma, infecção ambiental e proporcionar sua estabilidade. No entanto, esses materiais de curativo têm várias limitações, incluindo adesão à ferida, resultando em isquemia, necrose, irritação, ou reações alérgicas. Visando superar essas desvantagens do curativo convencional, atualmente, novos métodos de curativo úmidos, como hidrogéis ou hidrocoloides têm sido introduzidos. Isso porque a umidade suprime a formação de cicatrizes, permitindo uma migração eficiente de queratinócitos e reepitelialização. Além disso, a umidade diminui a quantidade de epiderme perdida assim como suas estruturas anexas, melhorando assim o resultado da cicatriz. Contudo a má estabilidade física de alguns desses materiais de curativos molhados tem levado pesquisadores à busca por novos materiais naturais biodegradáveis, que sejam mais eficazes no processo de cicatrização.

Diante do exposto, o presente trabalho visa desenvolver e caracterizar hidrogéis constituídos pelos polissacarídeos naturais galactomanana/ κ -carragenana contendo ou não Cramoll e/ou lactoferrina e, avaliar a capacidade de potencializar a ação cicatrizante em queimaduras de segundo grau.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral:

Obter e caracterizar hidrogéis à base de galactomanana e κ -carragenana contendo ou não Cramoll 1,4 e/ou Lactoferrina e avaliar a eficácia dos mesmos no processo de reparo de queimaduras cutâneas de segundo grau em ratos Wistar. Realizar uma revisão sistemática detalhada da literatura, sobre a comparação das condições de modelos de queimaduras em ratos.

1.1.2 Objetivos Específicos:

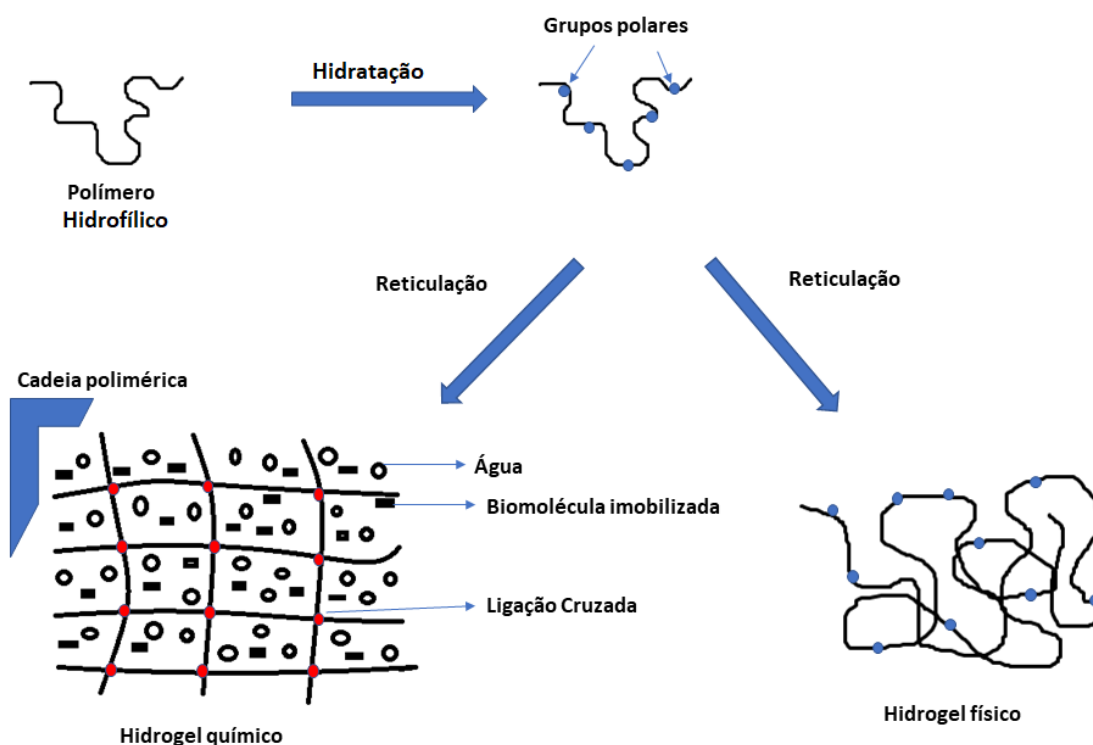
- Extrair e purificar a galactomanana presente nas sementes de *Cassia grandis*;
- Purificar a Cramoll 1,4;
- Desenvolver hidrogéis à base de galactomanana e κ -carragenana;
- Imobilizar Cramoll 1,4 e Lactoferrina no hidrogel de galactomanana e κ -carragenana;
- Avaliar a estabilidade dos hidrogéis ao longo do tempo (1, 5, 10, 15, 30, 60 e 90 dias) em relação ao: pH, colorimetria e contaminação microbiológica;
- Avaliar a reologia dos hidrogéis;
- Induzir feridas experimentais;
- Realizar o tratamento tópico diário das lesões cutâneas experimentais utilizando: hidrogel (H); hidrogel + lactoferrina (HL); hidrogel + Cramoll 1,4 (HC); hidrogel + lactoferrina + cramol 1,4 (HLC); Solução salina 0,9% NaCl (S), durante 14 dias;
- Acompanhar a evolução do processo de reparo do ponto de vista clínico (avaliação clínica das feridas e mensuração de sua área) durante 14 dias;
- Acompanhar a cicatrização do ponto de vista histopatológico, através de biópsias no 3º, 7º e 14º dia após indução de queimaduras;
- Realizar uma revisão sistemática detalhada da literatura, sobre a comparação das condições de modelos de queimaduras em ratos, para determinar se uma análise conjunta de fatores como: temperatura, pressão, tempo, material, entre outros, podem fornecer informações sobre as condições necessárias para criar queimaduras de uma gravidade específica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HIDROGÉIS

Os hidrogéis são redes macromoleculares formados estruturalmente por polímeros hidrofílicos naturais ou sintéticos. A fração principal de hidrogel é a água (cerca de 99%), que é mantida unida por uma pequena fração de cadeias poliméricas hidrofílicas e reticuladas (0,1% a 2%) formando uma rede (Figura 1) (RAGHUWANSHI e GARNIER, 2019).

Figura 1 – Conformação reticulada do hidrogel.



As propriedades primordiais dos hidrógeis são: o elevado potencial de absorção e retenção de fluídos biológicos ou água (AHMED, 2015), devido à presença das moléculas hidrofílicas (por exemplo, -OH, -CONH, -CONH₂ e -SO₃H) (LEFNAOUI et al., 2014) e resistência a trações físicas, devido as ligações cruzadas entre as cadeias das redes poliméricas.

As cadeias poliméricas no hidrogel podem ser reticuladas por interações físicas ou químicas para formar uma malha. Os hidrogéis fisicamente reticulados são formados por interações iônicas, interações hidrofóbicas, automontagem, termocondensação e reconhecimento molecular específico (RAGHUWANSHI e GARNIER, 2019). Os hidrogéis

reticulados quimicamente são formados a partir de ligações covalentes fortes por polimerização radical, grupos funcionais reativos e radiação de alta energia (EBARA et al., 2014; LU, 2018).

Os hidrogéis são caracterizados pela natureza de seus polímeros constituintes, tornando-os sintéticos, naturais ou híbridos. Tendo como estudos principais a estrutura física, química e possíveis atividades biológicas. A escolha de seus polímeros deve levar em consideração a eficácia, biodisponibilidade, estabilidade, toxicidade, facilidade de fabricação entre outros mecanismos que aperfeiçoam a formulação final do hidrogel.

Os polímeros naturais são produzidos por organismos vivos. Utilizados na síntese de hidrogéis, são polissacarídicos e polipeptídicos, como: alginato, pectina, celulose, gelatina, ácido hialurônico, dextrano, fibrina, quitosana e carragenana, entre outras, que apresentam como características principais a biocompatibilidade e efeitos biológicos (KIM et al., 2014).

Os hidrogéis também são sintetizados a partir de polímeros sintéticos, como: N-isopropilacrilamida (NIPAAm), poli (propileno glicol) (PPG), poli (etileno glicol) (PEG), poliimida, poli (álcool vinílico) (PVA) e poliacrilamida (PAM) (KANDOW et al., 2007; MILAŠINOVIĆ, et al., 2010 e ANGHELACHE, et al., 2014). Hidrogéis sintéticos ou híbridos derivados de poliamidas e polietileno glicol foram lentamente sendo introduzidas em formulações de hidrogéis nas últimas duas décadas, resultando em uma vida útil mais alta, resistência do gel e capacidade de absorção de água (GARNICA-PALAFOX e SÁNCHEZ-ARÉVALO, 2016).

A vantagem da utilização de polímeros naturais frente aos sintéticos na síntese de hidrogéis em aplicações biomédicas está na sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade (PREETHI et al., 2019), já os polímeros sintéticos se destacam por serem hidrofóbicos, possuindo fortes ligações covalentes dentro de sua matriz, o que permite maior durabilidade e resistência mecânica. Sendo assim, tanto os hidrogéis naturais quanto os sintéticos apresentam vantagens e desvantagens dependendo da sua utilização, mas o fato de a utilização em organismos vivos necessitar de uma biocompatibilidade faz com que os polímeros naturais ganhem maior atenção (GYLES et al., 2017).

Além das propriedades singulares, tanto mecânicas quanto reológicas, que possibilitam uma maior resistência a tensões mecânicas e mantem a integridade dos hidrogéis ao longo da sua vida útil (UTECH e BOCCACCINI, 2016), a alta biodisponibilidade vem atraindo à atenção em estudos biomédicos, que tenham como intuito a expansão das aplicações em sistemas regenerativos medicinais, engenharia de tecidos e técnicas de cultura de células.

Uma das vantagens de entender as propriedades dos hidrogéis para as formulações biomédicas, se encontra na aplicação química que pode ser criada e personalizada, controlando: a composição e as densidades de reticulação, estrutura da rede e tamanho dos poros do hidrogel; já as propriedades mecânicas da maioria dos hidrogéis podem ser influenciadas pela alteração do grau de reticulação ou incorporação de locais de ligação adicionais via reticulação física (ANNABI et al., 2014). Quase todas as células do corpo estão situadas em uma arquitetura tridimensional, fato que explica a tentativa de mimetizar tais estruturas, como o desenvolvimento de plataforma e células 3D (TERRELL et al., 2020). Os requisitos como atoxicidade, micro ambiente similar aos tecidos naturais e seletividade de entrada e saída de moléculas, tornam as estruturas tridimensionais com aplicação na área da saúde tão diversas quanto as suas próprias aplicações (KENAWY et al., 2014).

A descoberta dos hidrogéis completam 61 anos no ano de 2021, onde Wichterle e Lim fizeram seu desvendamento em 1960. Desde então aplicações biomédicas foram testadas sempre tendo como preocupação inicial sua toxicidade, no entanto, o aumento da pesquisa em química de polímeros e os avanços na fisiologia permitiram aos cientistas projetarem formas mais inovadoras e biocompatíveis (WANG et al., 2016). As pesquisas no ramo dos biossensores, lentes de contato, mecanismos de administração de medicamentos e implantes, vem ganhando força ao passar dos anos (BUWALDA et al., 2014).

Deste modo nas últimas décadas, uma gama de materiais foram investigados, a fim de atender aos requisitos mínimos de uma plataforma para hidrogéis (UTECH e BOCCACCINI, 2016). HUANG et al. (2013), desenvolveram um modelo vascular 3-D com sistemas de polímero de plataforma e célula, constituídos por hidrogel de gelatina e alginato contendo fibrinogênio, que formou um material interno para plataforma de acomodação de células tronco.

A utilização de hidrogéis como dispositivo de administração de medicamentos e compostos bioativos é explicada por sua capacidade de proteger o medicamento contra condições ambientais hostil, tendo como princípio controlar a liberação do medicamento por alterações causadas em sua estrutura devido a flutuações no pH, temperatura, pressão, teor de oxigênio, entre outros (MANKOTIA et al., 2020). Estudo recente com hidrogéis multicamadas constituídas de quatro camadas (1ª PVA carboxilado, 2ª gelatina, 3ª ácido hialurônico, adicionando ampicilina e 4ª gelatina) preparado por meio da técnica de automontagem foi desenvolvido como um novo curativo antibacteriano. A liberação de antibiótico ocorreu por 7 dias com liberação moderada de 34,5% em 6 horas. O hidrogel apresentou atividade

antibacteriana contra *S. aureus* sensível à oxacilina e não apresentou efeito tóxico em fibroblastos cultivados, indicando que o novo curativo representa uma opção eficaz para o tratamento seletivo de infecções bacterianas (TAMAHKAR et al., 2020).

Qiao et al. (2019), projetaram um hidrogel de rede dupla imprimível, utilizando tecnologia de impressão 3D, à base de ácido hialurônico modificado por acrilamida, misturado com ácido fólico e Fe^{3+} , com administração da droga ácido acetilsalicílico; o hidrogel apresentou resposta a modificações no pH, e confirmou a liberação do fármaco, com potencial aplicação na medicina regenerativa.

O acúmulo de drogas dentro da matriz do hidrogel pode ser controlado devido a concentração e composição de parâmetros manipulados para controlar as propriedades de penetração e difusão (LI e MOONEY, 2016). Com objetivo de analisar a sensibilidade ao pH, micro géis de goma de guar, que apresentavam propriedades auto curativas foram analisados, e constatou-se que a força dos géis pode ser regulada pelo valor do pH da solução, onde a viscosidade aumenta com o aumento do valor do pH, além disso os géis conseguiram se reconstruir dinamicamente após serem destruídos por força externa (ZHENG e HUANG, 2015).

Kamoun et al. (2017), descrevem uma revisão no que se diz respeito ao uso de membranas de hidrogéis poliméricos como curativos para feridas, e concluíram que os curativos de hidrogel são atualmente convenientes para qualquer tipo de ferida e queimadura, independentemente do formato da lesão; também observaram que os polímeros naturais, como: quitosana, glucano, alginatos e hialuronano são mais eficientes como um acelerador na cicatrização de feridas do que os polímeros sintéticos, já os curativos de algodão, com gaze tradicionais podem lesionar novamente a ferida no momento da remoção.

A fim de aproveitar as propriedades mecânicas e biológicas dos hidrogéis, muitos estudos estão sendo realizados no ramo da biotecnologia, principalmente para o tratamento de queimaduras.

Visando tratar as complicações em queimaduras de terceiro grau, o hidrogel de celulose bacteriana enriquecido com timol (BCT) foi desenvolvido. Os estudos revelaram que o BCT possui excelente atividade biocida contra patógenos específicos de queimaduras; é biocompatível uma vez que facilitou o crescimento de células de fibroblastos de camundongo 3T3, exibindo baixa toxicidade e maior viabilidade celular e, promoveu o fechamento mais rápido da ferida comparado ao grupo controle em modelo por queimadura de terceiro grau,

demonstrando grande potencial para ser usado como sistema de curativo natural para feridas (JJI et al., 2019).

Oryan et al. (2018), estudaram o desenvolvimento do impacto do curativo de hidrogel de colágeno com ou sem uso tópico do microrganismo probiótico, *Saccharomyces cerevisiae*, na cicatrização de queimadura dérmica de espessura total, em ratos, que confirmou o benefício da formulação contendo o microrganismo, com aumento da cicatrização, reepitelização e melhora no desempenho biomecânico da queimadura, reduzindo o tamanho da cicatriz.

Um curativo promissor para queimaduras a base de quitosana em combinação com peptídeos marinhos extraídos de pele de tilápia, mostrou atividade antibacteriana, proliferação e migração celular, com boa cicatrização da queimadura, observou-se reepitelização e deposição de fibras de colágeno no dia 7, o epitélio foi completamente regenerado no dia 14 e as feridas foram completamente curadas no dia 21, demonstrando potencial aplicação do hidrogel associado ao peptídeo para o tratamento de queimaduras (OUYANG et al., 2018).

No que tange o tratamento de feridas, os hidrogéis apresentam propriedades de absorção de excesso de exsudato, proteção contra infecções e fatores externos, fornecimento de pH ideal, que promovem a cicatrização rápida de feridas, além de poderem ser facilmente removidos sem trauma (EL HOSARY et al., 2019), portanto, são candidatos adequados para aplicações biomédicas, como administração de medicamentos, engenharia de tecidos, e pele artificial (CHAN et al., 2016). A associação de hidrogéis naturais imobilizados ou não com fármacos ganha expressão no ramo biomédico, principalmente em lesões de queimaduras que não apresentam proteção externa e contaminam com maior facilidade.

2.2 GALACTOMANANAS

As galactomananas são polissacarídeos extraídos geralmente do endosperma das sementes de diferentes espécies de leguminosas, da família Leguminosae, e que têm grande aplicação industrial, especialmente nos ramos petroquímico, farmacêutico, cosméticos, papel, tecidos, minério e explosivos (SRIVASTAVA e KAPOOR, 2005; CHOUAIBI et al., 2019), assim como estabilizador de emulsão e na preparação de filmes, membranas e sistemas misto como hidrogéis (ALBUQUERQUE et al., 2014; SOARES et al., 2015; RODRIGUEZ-CANTO et al., 2020).

Estruturalmente, as galactomananas apresentam uma cadeia principal formada por unidades β (1 $\rightarrow$ 4) D-manopiranosil com ramificações de α -(1 $\rightarrow$ 6) D-galactopiranosil (Dea & Morrison, 1975). Dependendo da fonte e do método de extração, as galactomananas possuem

diferentes relações de manose: galactose (M/G), que pode variar de 1,0 a 5,0 (SRIVASTAVA e KAPOOR, 2005; PRAJAPATI et al., 2013). Esta razão tem um importante papel na avaliação da solubilidade em água e na dependência da viscosidade da solução com a concentração do polímero (RINAUDO, 2001). A solubilidade em água depende do conteúdo de galactose substituinte, assim, mananas que não apresentam substituição, são insolúveis em água (MCCLEARY et al., 1981) ao contrário das galactomananas que são solúveis em água e formam dispersões viscosas e estáveis (MEER, MEER, e TINKER, 1975).

Especificamente na área alimentar, são comumente utilizados como espessantes, estabilizantes e substitutos de gorduras em sorvetes, molhos, filmes ou revestimentos para prolongar a vida útil de vários alimentos (GERMANO et al., 2019), além de proporcionarem melhoramento nas características organolépticas dos produtos (SHIRANI e GANESHARANEE, 2009). Andrade et al. 2018, substituíram gordura vegetal / margarina de uma amostra controle (receita padrão de bolo) por galactomanana extraída das sementes de *Cassia grandis*, alcançando uma substituição de 75% de gordura pela galactomanana na concentração de apenas 1,0%, mantendo com sucesso a microestrutura da superfície, a aceitação sensorial e o comportamento reológico semelhante à formulação original contendo apenas gordura.

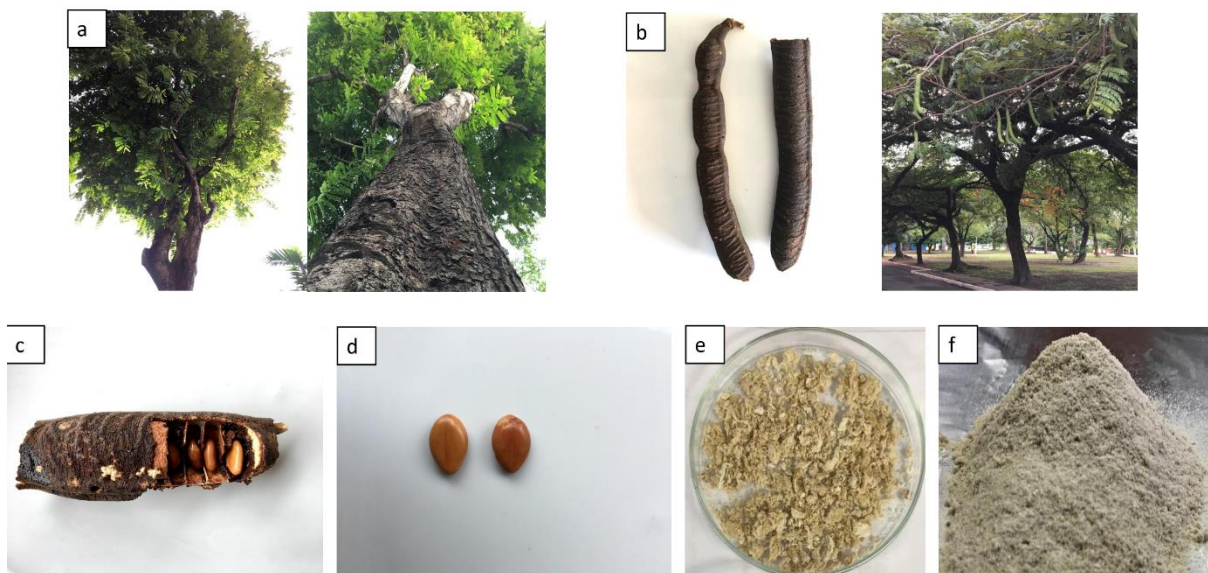
Filmes preparados a base de galactomanana são também usados em conjunto com ceras, lipídios, antimicrobianos ou antioxidantes, a fim de modificar suas propriedades físicas e estender sua funcionalidade, tais como: melhora reológica e durabilidade (CERQUEIRA et al., 2011).

Além das propriedades funcionais industrialmente relevantes, as galactomananas também podem exercer bioatividade, como foram relatadas as atividades imunomoduladoras e eliminadoras de radicais livres (LIU et al., 2015a). BERA et al. (2020), produziram nanocompósitos biocompatíveis a base de galactomanana como dispositivos de entrega de erlotinibe para células de câncer de pulmão, a fim de suprimir sua proliferação celular excessiva. Almeida et al. (2015), confirmaram o potencial de matrizes poliméricas a base de galactomanana contendo mangiferina para a liberação controlada do bioativo. Filmes de galactomanana a partir de sementes de *Cassia grandis*, associados ou não a Cramoll 1,4, foram utilizados em feridas tópicas de ratos para avaliação do processo de cicatrização por 14 dias. Os filmes não apresentaram citotoxicidade e atuam acelerando a cicatrização cutânea, diminuindo o tempo do processo para 10 dias. (ALBUQUERQUE et al., 2017).

As galactomananas influenciam a reologia dos sistemas aquosos por meio de associações de cadeias sinérgicas intermoleculares com outros polissacarídeos, mostrando um aumento notável na viscosidade ou mesmo na formação de redes tridimensionais. Assim, o maior teor de galactose evidencia pouca tendência a formar géis devido ao impedimento estérico representado pelos resíduos de galactose, ocasionando deste modo, diminuição da velocidade das reações químicas devido ao volume dos grupos ligados ao centro da reação (KONTOGIORGOS et al., 2019).

A produção ecológica de galactomanana é uma atividade lucrativa em muitas regiões do mundo, desde o plantio e colheita inicial de sementes, até a produção industrial de polissacarídeos (GRENHA e DIONÍSIO, 2012; PRAJAPATI et al., 2013). Pertencente à subfamília Caesalpinaceae, a *Cassia grandis* (Figura 2) é uma leguminosa de médio a grande porte, oriunda de florestas tropicais e da América Central, bem como das Antilhas, sendo posteriormente levada para a Índia. As sementes dessa leguminosa por obterem um bom rendimento final $36 \pm 8\%$, na extração da galactomanana, são amplamente exploradas (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Figura 2 – (a) Árvore *Cassia grandis*, (b) Vagem, fruto da árvore, (c) Vagem com sementes, (d) Semente, (e) Galactomanana após extração e (f) Galactomanana obtida após trituração.



2.3 CARRAGENANAS

As carragenanas são polissacarídeos lineares sulfatados extraídos de algas vermelhas da classe *Rhodophyceae* (PAINTER, 1983). Compostas por polímeros hidrofílicos naturais (OSORIO et al., 2011), com uma cadeia linear de galactanas parcialmente sulfatados (LIU et

al., 2019b). As carragenanas são classificadas em vários subtipos como λ , κ , ι , ϵ e μ (MCKIM, 2014; WEINER, 2014; LIU et al., 2015b), principalmente pelo número e a localização dos grupos sulfato e o conteúdo de 3,6-endo-D-galactopiranosídeo (THOMSON e FOWLER, 1981). A gelificação de carragenanas envolve a formação de uma hélice após o resfriamento de soluções aquosas diluídas na presença de cátions metálicos, que promovem conjuntos físicos de hidrogel agregando cadeias poliméricas (LIU e LI, 2016).

São amplamente utilizadas como gelificante e estabilizante em formulações alimentícias (SKRYPLONEK et al., 2019).

As κ -carragenanas são constituídas de unidades alternadas de β -(1-3) -D-galactose-4-sulfato e α -(1-4) -3,6-anidro-D-galactose (HASHEMI et al., 2018). A κ -carragenana comercial desempenha um papel essencial na preparação de hidrogéis duráveis (BERTON et al., 2020), têm sido amplamente utilizadas para produzir hidrogéis físicos (DAFE et al., 2017) e embalagens de alimentos (KASSAB et al., 2019), na engenharia de tecidos (GONZÁLEZ OCAMPO et al., 2019) e na administração de medicamentos, por exemplo, imobilização de tri-hidrato de amoxicilina (SELVAKUMARAN et al., 2016).

As carragenanas são polissacarídeos seguros como aditivos alimentares (FDA, 2019), por esta razão são bem estudadas no ramo alimentício. Meindrawan et al. (2018), estudaram um método de revestimento aplicado para reduzir a perda das qualidades organolépticas das mangas, onde foram revestidas com carragenana [0, 0,5 e 1% (p/v)] convencional em combinação com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO). A incorporação das nanopartículas adicionou ao revestimento propriedades antimicrobianas contra *Escherichia coli*, aumentando assim a vida útil das mangas.

Falcó et al. (2019), analisaram diferentes dispersões formadoras de filmes baseadas em κ , ι e λ -carragenanas. Constataram que todos os revestimentos foram eficazes em prolongar a vida útil dos frutos de mirtilos e framboesas, sob refrigeração, promovendo a segurança alimentar.

Além de aperfeiçoarem as características físicas dos alimentos, as carragenanas também contribuem na modulação do sistema imunológico, além de serem antivirais, anticancerígenas (FALCÓ et al., 2019; MUTHULAKSHMI et al., 2021) e apresentarem biocompatibilidade (KELDER et al., 2018). Foi verificado que a κ -carragenana de *Kappaphycus alvarezii* pode ser utilizada como alimento funcional para prevenir a carcinogênese do cólon (RAMAN & DOBLE, 2015).

Um estudo que analisou os efeitos de um suplemento de carragenana sobre a atividade imune e o perfil lipídico em pacientes com cardiopatia isquêmica mostrou que as carragenanas modularam moderadamente todos os marcadores do sistema imunológico e causaram reduções estatisticamente significativas nos seguintes biomarcadores de inflamação crônica: leucócitos (15,9%), fibrinogênio (8,62%) e proteína C reativa (13,03%) (SOKOLOVA et al., 2014).

2.4 LACTOFERRINA

A Lactoferrina é uma glicoproteína de 80 KDa de ligação ao ferro da família da transferrina (GARCIA-MONTOYA et al., 2012), que consiste em uma cadeia polipeptídica simples dobrada em dois lobos, cada um dos quais se liga de forma reversível ao ferro (Fe^{2+} ou Fe^{3+}) para formar apo-LF, ou não, sendo caracterizada como holo-LF (GONZALEZ-CHAVEZ et al., 2009). Esta proteína pode ser encontrada no leite especialmente no colostro e secreções mucosas, incluindo lágrimas, salivas, fluidos vaginais, sêmen, secreções nasais e brônquicas, bile, fluidos gastrointestinais e urina (ÖZTAŞYEŞİM e OZGUNES, 2005; KHAN et al., 2020).

Esta proteína ganha destaque no cenário de pesquisas devido às inúmeras funções biológicas como anticancerígenas, anti-inflamatório, antibacteriano, antiviral, antifúngico, efeito imunomodulador, e inibidor da formação de radicais livres (HABIB et al., 2013; BOKKHIM et al., 2013; EMBLETON et al., 2013).

A lactoferrina também é liberada por neutrófilos polimorfonucleares em resposta a estímulos inflamatórios, participando da defesa contra agentes infecciosos (DRAGO-SERRANO et al., 2017). A atividade antibacteriana da lactoferrina foi uma das primeiras funções a serem elucidadas e baseia-se em sua capacidade de sequestrar o ferro e interagir com agentes infecciosos para exercer funções imunomoduladoras, atuando assim, diretamente no sistema imunológico, modulando-o de forma a fortalecer suas defesas e seu funcionamento (LEGRAND et al., 2006).

Outra característica peculiar é que a lactoferrina cruza prontamente a barreira hematoencefálica demonstrando melhorar a disfunção mitocondrial e reduzir os danos celulares ao eliminar as espécies reativas de oxigênio em modelos animais com doença de Alzheimer (PARK et al., 2013; GUO et al., 2017). Estudos demonstraram que a lactoferrina é eficaz na atenuação do declínio cognitivo relacionado ao envelhecimento (ZHENG et al., 2020).

Gao et al. (2018) estudaram a eficácia da aplicação local de géis de colágeno impregnados com lactoferrina, na regeneração óssea, em ratos Sprague-Dawley. Verificaram que a aplicação local de lactoferrina aumenta significativamente a regeneração óssea.

Choi et al. (2020), prepararam nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) imobilizados com lactoferrina e avaliaram seus efeitos anti-inflamatórios e de cicatrização no tendão de Aquiles em ratos. Concluíram que houve uma redução na inflamação e otimização na cicatrização, com restauração dos tendões, na tendinite de Aquiles.

A lactoferrina humana recombinante e lactoferrina bovina foram usadas como componente da dieta infantil humana há anos sem relatos de intolerância ou efeitos adversos. Extensivamente pesquisada em humanos, principalmente em bebês e crianças (MANZONI et al., 2012; OCHOA et al., 2013; PAMMI e ABRAMS, 2015). Liu et al. (2019a), analisaram o efeito da lactoferrina como suplemento no leite para prevenir a progressão da doença enterocolite necrosante, e sugeriram que a administração de lactoferrina pode modular a lesão das células epiteliais intestinais. Testes realizados com neonatos demonstram que a lactoferrina tem um impacto clinicamente significativo na alimentação, no microbioma e nos resultados clínicos, prevenindo deste modo, infecções e morbidades relacionadas à sepse nos primeiros estágios da vida (MANZONI et al., 2016).

A lactoferrina é significativamente reduzida nas lágrimas de pacientes afetados por ceratocone em comparação com indivíduos saudáveis, e isso sugere a causa do aumento do ferro lacrimal e consequente deposição de ferro e acúmulo de radicais livres de oxigênio na córnea, a aplicação de lactoferrina em lentes de contatos neutralizou a citotoxicidade das lágrimas em pacientes com ceratocone, restaurando sua viabilidade, podendo assim representar um dispositivo eficiente para interromper a progressão do ceratocone (PASTORI et al., 2019).

Considerando-se as potenciais atividades da lactoferrina, sua incorporação em hidrogéis facilitaria o uso tópico destas biomoléculas para aplicações como cicatrizantes de queimaduras.

2.5 LECTINAS

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, compostas de 2 ou 4 monômeros cujo peso molecular varia de 8,5 a 265 kDa, que expressam a capacidade de se ligar reversivelmente em sítios específicos de carboidratos, sem alterar a sua estrutura covalente (CHRISPEELS e RAIKHEL 1991; MATUCCI et al., 2004; SUN et al., 2007), possibilitando assim um importante papel em eventos celulares como aglutinação,

reconhecimento, simbiose, estimulação da proliferação, opsonização, metástase e apoptose celular (SHARON, 2008). Para realizar a atividade hemaglutinante, algumas lectinas necessitam de cátions Ca^{2+} e Mn^{2+} , que estão associados aos aminoácidos que participam da ligação ao carboidrato (MOREIRA, et al., 1991).

São encontradas em quase todos os seres vivos incluindo vegetais, animais, bactérias e vírus. Nas plantas foram encontradas no citoplasma da célula vegetal, embora já tenham sido encontrados também em raiz, caule, folhas, sementes, tubérculos, bulbos, rizomas e entrecascas (SILVA e SILVA, 2000; PEREIRA, 2005; CAMACHO, 2007; MARTINS, 2009). As lectinas estão integradas no grupo dos compostos de metabólitos secundários, e por isso são utilizadas pelas plantas como sistema de proteção contra-ataques de bactérias, fungos e insetos (BELMONTE, et. al., 2013).

A *Cratylia mollis* é uma planta forrageira da região Semiárido do Estado de Pernambuco. Essa planta é conhecida popularmente como “camaratu” e “camaratuba”, e as folhas e caules dessa espécie são utilizados como substitutos da alimentação do gado durante a estação seca (REZENDE et al., 2015). De suas sementes têm sido purificadas e caracterizadas diferentes isoformas de lectinas: Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4. Uma preparação contendo as isoformas 1 e 4 associadas, denominada Cramoll 1,4, apresenta especificidade glicose/manose (CORREIA e COELHO, 1995), a mesma observada para Cramoll 1, Cramoll 2 e Cramoll 4, enquanto Cramoll 3 é uma glicoproteína específica para galactose. A Cramoll tem sido empregada em várias aplicações biotecnológicas (PAIVA e COELHO, 1992; COELHO et al., 2017) apresentando atividades antitumoral (DA CUNHA et al., 2016), antiparasitária (FERNANDES et al., 2010; MELO et al., 2011a), antimicrobiana (JANDÚ et al., 2017), anti-inflamatória (MELO et al., 2010), mitogênica (OLIVEIRA et al., 2018), imunomodulatória (DE OLIVEIRA et al., 2013) e cicatrizante de feridas (MELO et al., 2011b; ALBUQUERQUE et al., 2017).

Um estudo a base de fluorescência de pontos quânticos (QDs) combinados com a especificidade da lectina Cramoll, foi combinado para produzir um nanotool, para avaliar os perfis de glicose/manose em três espécies de *Candida*. Os conjugados QDs-Cramoll demonstraram ser nanopróbios fluorescentes eficazes para avaliação da constituição de glicose/manose nas paredes celulares de espécies de fungos frequentemente envolvidas em candidíase (OLIVEIRA et al., 2020).

Estudos avaliando os efeitos antitumorais de lectinas nativas (pCramoll) e recombinantes (rCramoll) de *Cratylia mollis* contra células de adenocarcinoma da próstata

humana (PC-3), constataram que ambas: pCramoll e rCramoll reduziram a viabilidade das células PC-3 de maneira dose-dependente (FIGUEIRÔA et al., 2017).

Albuquerque et al. (2016), realizaram a formulação de um gel de galactomanana de sementes de *Cassia grandis* contendo Cramoll 1,4 imobilizado, obtendo resultados nas suas propriedades reológicas, confirmando sua estabilidade até 30 dias e não contaminação microbiológica ao longo do estudo.

Os efeitos da Cramoll no tratamento de feridas cutâneas foram investigados em camundongos imunocomprometidos. A administração tópica diária de Cramoll (100 µL a 100 µg/mL) resultou no reparo das lesões experimentais, mostrando, maior intensidade de tecido de granulação e deposição de fibras de colágeno (MELO et al., 2011b).

Pereira et al. (2012), estudaram um hidrogel contendo Cramoll a base de Carbopol®, para o tratamento de queimaduras de segundo grau, em ratos. Esta formulação biofarmacêutica mostrou após 21 dias de tratamento que os animais apresentaram intensa proliferação fibroblástica, presença de tecido conjuntivo denso modelado e fibrose moderada. Os autores também relataram que o tratamento não provocou alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos.

O desenvolvimento tecnológico de novas formas de imobilização de lectinas tem sido estratégias promissoras para aumentar suas ponteciais atividades biológicas (SILVA et al., 2015).

2.6 QUEIMADURAS

Queimaduras na pele estão entre as mais angustiantes de todas as lesões, apresentando complicações físicas e psicológicas graves se não forem tratadas adequadamente no momento certo (KAUSHIK et al., 2013; GUO et al., 2019). Tais lesões requerem tratamentos especiais intensivos e de longo prazo que podem causar danos oxidativos a pele do paciente (DEMLING e LALONDE, 1989).

Do ponto de vista da saúde pública, a morbidade e mortalidade por queimaduras, são crises globais solucionáveis, que são amplamente ignorados (GRIGGS et al., 2013). Em todo o mundo, 11 milhões de pessoas requerem atenção médica e estima-se que 150.000 morram de queimaduras ou suas complicações anualmente, principalmente em países subdesenvolvidos (WHO, 2014; ARGENTA e DEMOS, 2017), mais de 90% das queimaduras com fatalidades com fogo ocorrem em países de baixa renda, onde os programas de prevenção são inadequados ou ausentes (SADEGHI-BAZARGANI e MOHAMMADI, 2012; JAGNOOR et al., 2018). Segundo o Ministério da saúde, um milhão de pessoas sofrem

queimadoras por ano no Brasil (BRASIL, 2017), destes, 100.000 buscaram atendimento hospitalar e, cerca de 2.500 pacientes irão a óbito direta ou indiretamente em função de suas lesões, sendo, portanto, consideradas um problema de saúde pública.

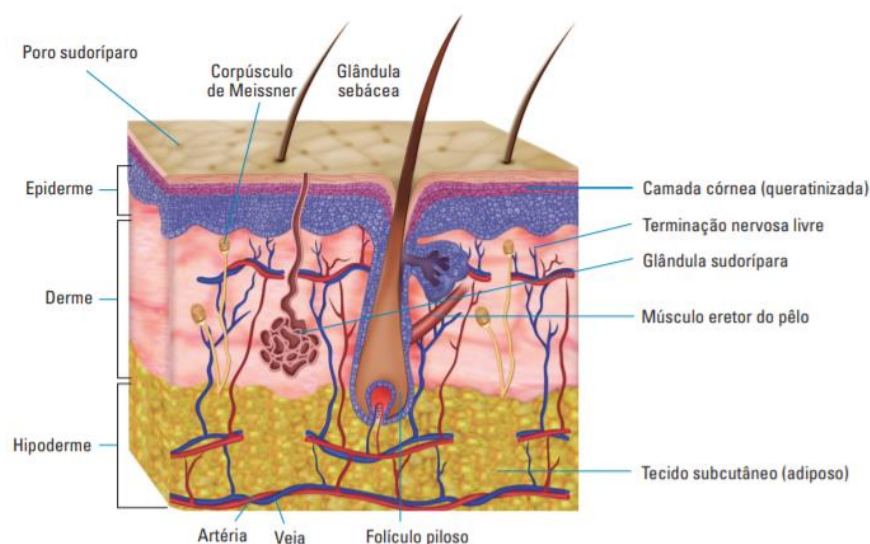
Acidentes com queimaduras ocorrem em diferentes faixas etárias e podem ser causadas por agentes físicos, como chamas, líquidos quentes, radiação, eletricidade, frio, ou agentes químicos (por exemplo, substâncias cáusticas) (RODRIGUEZ-FERREYRA et al., 2019). As queimaduras térmicas na pele são os tipos mais comuns de queimadura, seguido por queimaduras elétricas e químicas. O dano térmico é observado na maioria dos tipos de células quando é atingida uma temperatura crítica ($>43^{\circ}\text{C}$). A severidade das queimaduras na pele varia de acordo com a profundidade, largura e localização da ferida (DEMLING e LALONDE, 1989; MARTINA e FALDER, 2017). No que tange a faixa etária, a incidência de queimaduras é quatro vezes maior em crianças do que em adultos, representando cerca de 25% de todas as hospitalizações pediátricas, sendo a causa mais comum, os líquidos quentes (LEGRAND et al., 2020).

2.6.1 Queimaduras e a Pele

A pele é um órgão com mais de uma camada, disposta como a interface entre os órgãos internos e o ambiente externo, representando um sexto do peso corporal total. Ela funciona como uma barreira física para proteger o corpo da desidratação, bem como de agressões ambientais, como patógenos, produtos químicos, agentes físicos e radiação ultravioleta do sol, ao longo da vida (PEREIRA et al, 2013; BERTHON et al., 2017). Além disso, a pele cumpre uma ampla variedade de funções, incluindo termorregulação, sensibilidade, excreção, geração de vitamina D, entre outros (QIU et al., 2016).

As camadas da pele consistem em derme e epiderme (Figura 3). A epiderme é um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, cujo principal tipo de célula é o queratinócito, o qual forma a queratina – proteína com fibras tridimensionais (VENUS, WATERMAN e MCNAB, 2010; CAPALLERE et al., 2018). A epiderme pode ser distinguida em cinco camadas no epitélio estratificado pavimentoso queratinizado: o estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido (nas palmas das mãos e planta dos pés) e o estrato córneo (KEDE e SABATOVICH, 2015) (Figura 4).

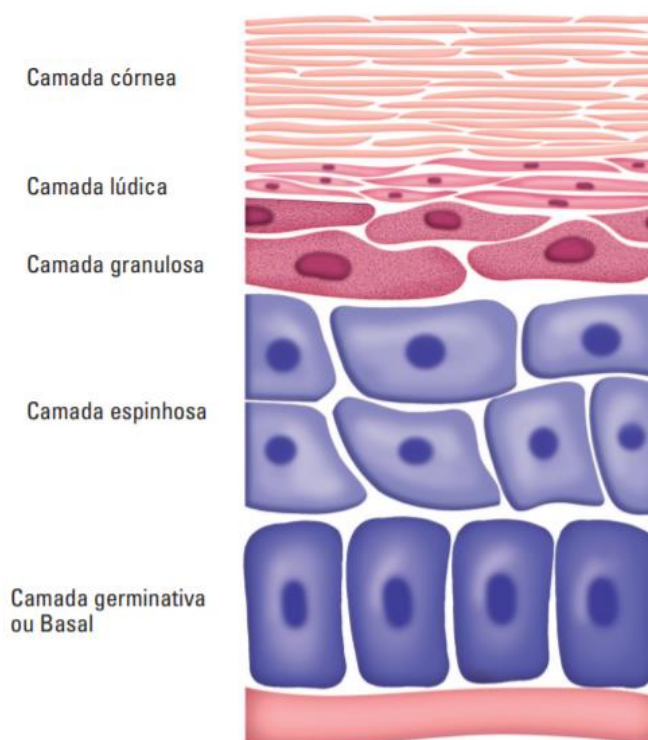
Figura 3 – Representação das camadas da pele.



Fonte: CESTARI, S.C. P. Dermatologia pediátrica: Diagnóstico e tratamento. 1ª Edição Editora dos Editores, 2018.

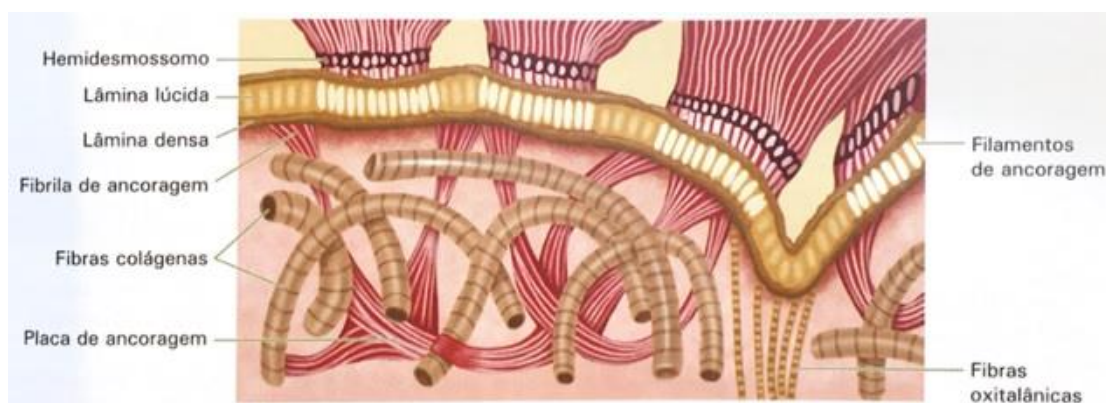
A derme é uma camada resistente que protege o corpo contra lesões mecânicas. Por ser tecido conjuntivo, a derme contém células, substância fundamental e fibras. O principal tipo de célula na derme é o fibroblasto, que sintetiza fibras de colágeno e elastina; o colágeno representa 75% do peso seco e até 30% do volume da derme; 75% são colágeno tipo I e 15% são de colágeno tipo III. A substância fundamental consiste em polissacarídeos e proteínas que interagem para produzir macromoléculas proteoglicanas higroscópicas. As fibras de elastina também fornecem um grau de elasticidade à pele (VENUS, WATERMAN e MCNAB, 2010). Morfologicamente a derme pode ser dividida em derme papilar ou superior, com alta densidade celular e tecido conjuntivo frouxo e em derme reticular, nas camadas mais profundas a qual possui uma baixa densidade celular, mas é densamente compactada com colágenos e outras proteínas do tecido conjuntivo (Figura 5) (WATT e FUJIWARA, 2011).

Figura 4 – Representação das cinco camadas da epiderme.



Fonte: CESTARI, S.C. P. Dermatologia pediátrica: Diagnóstico e tratamento. 1ª Edição Editora dos Editores, 2018.

Figura 5 – Representação morfológica da membrana basal dermoepidérmica, evidenciando sua compactação com colágeno e outras proteínas do tecido conjuntivo.



Fonte: PERYASSU, M. A. Dermatologia para o clínico: diagnóstico e tratamento. 1ª Edição Rubio, 2016.

Como a pele é permanentemente exposta à atmosfera externa, é extremamente vulnerável ao aparecimento de diferentes tipos de lesões, como queimaduras, úlceras e feridas (MIR et al., 2018).

A cicatrização de feridas é um curso precisamente programado de processos celulares e moleculares, incluindo inflamação, proliferação e diferenciação celular, coagulação do sangue, angiogênese, formação de matriz extracelular (MEC), deposição de colágeno,

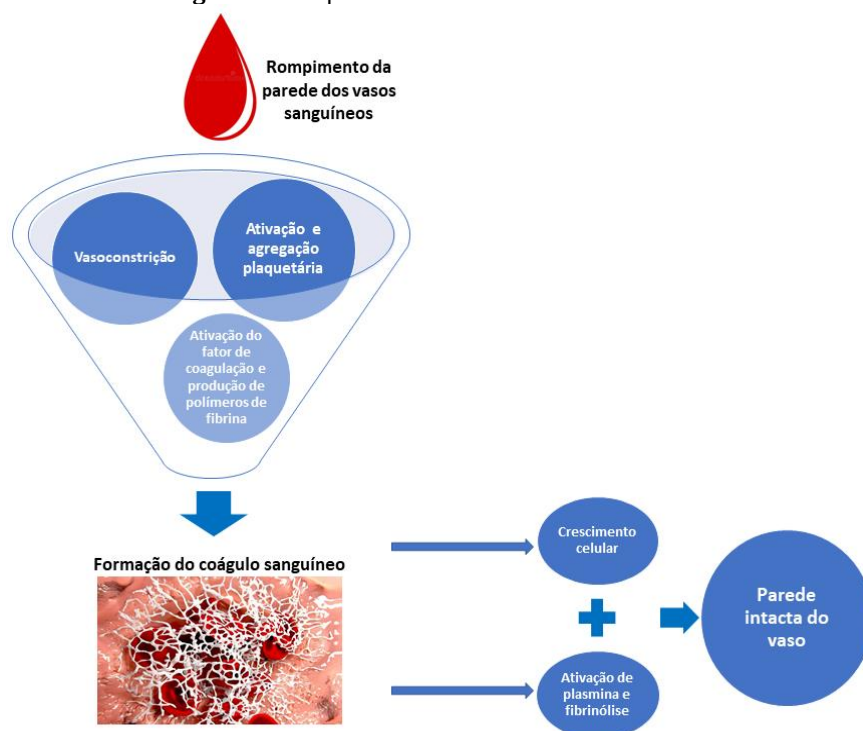
reepitelização, fibrose e remodelação de tecidos (CLARK, GHOSH e TONNESEN, 2007; JERE et al., 2017).

Uma ferida pode ser descrita como a deterioração da integridade anatômica e funcional do tecido epitelial da pele (FRONCZEK et al, 2015). O processo normal de cicatrização de feridas inclui várias vias intra e intercelulares que são ativadas e coordenadas para restaurar a integridade e a homeostase do tecido. Estão envolvidas mudanças significativas na expressão gênica e fenótipos de vários tipos de células, incluindo queratinócitos, fibroblastos, células nervosas periféricas, células vasculares e células imunes, levando à proliferação, migração e diferenciação celular (PIPERIGKOU et al., 2018). Todas as fases se sobrepõem até certo ponto, e não ocorrem em um período definido (BAUM e ARPEY, 2005; SOLIMAN et al., 2018).

2.6.1.1 Hemostasia

A hemostasia é um processo complexo (Figura 6) pelo qual o sangramento de um vaso sanguíneo é interrompido. É um mecanismo biológico multifatorial que se inicia após um trauma tecidual para prevenir a perda de sangue. Envolve um sistema complexo de processos de feedback positivo e negativo para promover a rápida formação de coágulos em áreas onde a integridade de um vaso sanguíneo é comprometida, limitando o tamanho do coágulo e permitindo a dissolução do coágulo como vaso (LEONARDI, 2019; SCHUCK, et al., 2020). É um mecanismo essencial para manter a reologia ideal do sangue e pode ser usado para detectar e controlar muitos distúrbios que afetam o tempo de coagulação do paciente, evitando sérias complicações patológicas no sistema vascular, como hemorragia, trombose venosa e embolia (SCHUCK, et al., 2020).

Figura 6 – Esquema do mecanismo da hemostasia.



Os mecanismos de hemostasia incluem vasoconstrição, reduzindo a perda de sangue; ativação e agregação plaquetária formando um tampão e ativando a cascata de coagulação, a qual resultam em um coágulo estável.

Na primeira etapa do processo hemostático ocorre a ativação plaquetária. As plaquetas, células anucleadas formadas na medula óssea são liberadas no sangue periférico e circulam por aproximadamente 10 dias. Quando o endotélio de um vaso sanguíneo é danificado, são expostas moléculas de colágeno nas camadas subjacentes do tecido conjuntivo (APONTE SANTAMARÍA et al., 2015).

Os receptores de plaquetas se ligam diretamente ao colágeno, mas podem ligar-se ao fator de von Willebrand (vWF), aumentando a via de ligação. São então desencadeadas alterações complexas na matriz da plaqueta, ocorrendo uma mudança, que passa de mais arredondada para achatada com vários pseudópodes. Também há liberação extracelular de moléculas granulares, como serotonina, difosfato de adenosina (ADP), vWF e fibrinogênio, que ajudam a promover a agregação e a ligação de plaquetas entre si no local do dano. As plaquetas ativadas regulam positivamente as moléculas em suas membranas celulares que promovem a ativação da cascata de coagulação, para formar polímeros de fibrina que são reticulados, formando um coágulo estável (KONKLE, 2012; RAND E ISRAELS, 2018; LEONARDI, 2019). Os fatores associados à via extrínseca iniciam a formação de trombina,

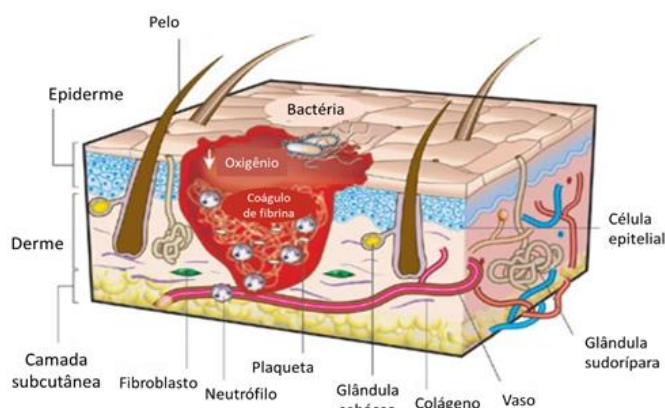
enquanto os fatores associados a via intrínseca e as plaquetas ativadas ajudam a propagar e amplificar o processo.

Também é ativado o processo de fibrinólise, que dissolve o coágulo à medida que o crescimento celular é estimulado por ele, levando a uma parede intacta dos vasos sanguíneos (ZILIOTTO et al., 2018).

2.6.1.2 Inflamação

A fase inflamatória (Figura 7) é fundamental para a ativação do sistema imunológico inato, que protege os seres humanos contra patógenos invasores e ajuda a remover o tecido necrótico. Após 2 a 3 dias, os monócitos aparecem na ferida e se diferenciam em macrófagos. Pensa-se que os macrófagos são cruciais para coordenar eventos posteriores na resposta à lesão, mas a importância dos neutrófilos e macrófagos no reparo de feridas é incompletamente entendida. Dados recentes sugerem, no entanto, que uma deficiência em qualquer tipo de célula pode ser compensada pela redundância na resposta inflamatória (SILVA e MACEDO, 2011; MACLEOD et al., 2016).

Figura 7 – Representação do processo inflamatório de feridas na pele. A ferida é caracterizada por um ambiente hipóxico (isquêmico) no qual um coágulo de fibrina se formou. Bactérias, neutrófilos e plaquetas são abundantes nesta etapa.



Fonte: Adaptado de Gurtner et al. (2008)

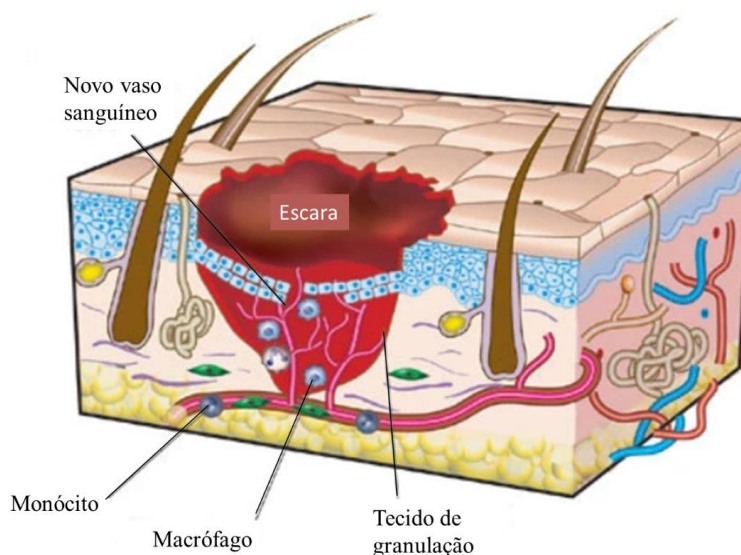
2.6.1.3 Proliferação

A proliferação é caracterizada por reepitelização, formação de tecido de granulação e neovascularização (Figura 8). A matriz extracelular, incluindo proteoglicanos, ácido hialurônico, colágeno e elastina, forma um tecido de granulação para substituir a formação original do coágulo (SU et al., 2010; VERMOLEN e GEFEN et al., 2016). Nos estágios iniciais dessa fase, os queratinócitos migram da borda da ferida e dos apêndices da pele, como

os folículos capilares (KIYA e KUBO, 2019). Os queratinócitos contribuem para a degradação do colágeno e da Matriz extracelular ao produzir collagenase e o fator ativador do plasminogênio (BUGGE et al., 1996; PILCHER et al., 2017), reconstruindo a função de barreira do epitélio através da maturação e proliferação. Os fibroblastos são recrutados para a área da ferida, estimulados por fatores de crescimento, que foram secretados pelos macrófagos: fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP), levando à produção da Matriz extracelular, e realizando a angiogênese – geração de novos vasos a partir das células endoteliais (PROFYRIS, TZIOTZIOS e DO VALE, 2012; SIRIMAHACHAIYAKUL et al., 2015).

Os reguladores positivos mais importantes da angiogênese são o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) e o fator de crescimento 2 de fibroblastos (FGF2); também conhecido como fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF). Na parte posterior desse estágio, os fibroblastos, que são atraídos da borda da ferida ou da medula óssea, são estimulados por macrófagos, e alguns se diferenciam em miofibroblastos. Os miofibroblastos são células contráteis que, com o tempo, unem as bordas de uma ferida. Os fibroblastos e os miofibroblastos interagem e produzem matriz extracelular, principalmente na forma de colágeno, que finalmente forma a maior parte da cicatriz madura. (WERNER e GROSE, 2003; OPALENIK e DAVIDSON, 2005; WERNER e SMOLA, 2007).

Figura 8 – Estágio proliferativo da cicatrização de feridas na pele.



Fonte: Adaptado de Gurtner et al. (2008)

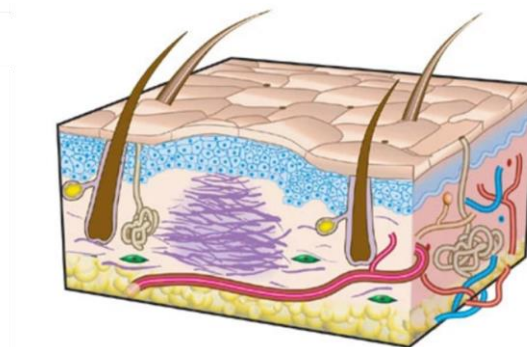
2.6.1.4 Remodelação

A remodelação começa 2 a 3 semanas após a lesão e dura um ano ou mais. Durante esse estágio, todos os processos que haviam sido ativados após a lesão, são interrompidos. A maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos sofre apoptose, ou sai da ferida, deixando uma massa que contém poucas células e consiste principalmente de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular (Figura 9) (FEKRAZAD et al., 2018).

A remodelação é uma fase que precisa de um equilíbrio preciso entre a apoptose das células existentes e a produção de novas células. As interações epitélio-mesenquimais regulam continuamente a homeostase e a integridade cutânea (SZABOWSKI, 2000; BANDO et al., 2018).

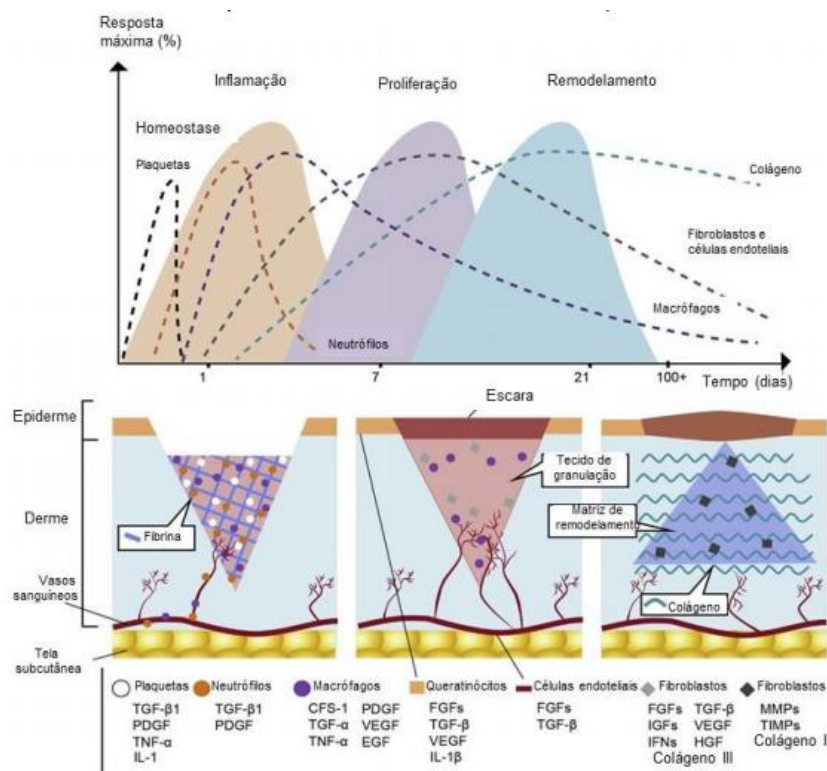
Ao longo de 6 a 12 meses, a matriz acelular é remodelada ativamente com colágeno, principalmente do tipo III, que posteriormente é substituído por colágeno do tipo I. Esse processo é realizado por metaloproteinases (MT-MMP) da matriz extracelular, uma família de endopeptidases dependentes de cálcio, contendo zinco, envolvidas na remodelação da matriz (GYENGE et al., 2013; DE MEDEIROS et al., 2017). As MT-MMP são numeradas de 1 a 6: MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP e MT6-MMP, correspondendo respectivamente às MMP14, -15, -16, -17, -24 e -25. Além de apresentarem papel importante na ativação das outras MMP, os subtipos das MT-MMP são responsáveis pela degradação de diferentes componentes da MEC (KERKELA e SAARIALHO-KERE et al., 2003; GUAN et al., 2017). Qualquer aberração nesta fase pode levar à cicatrização excessiva de feridas ou a feridas crônicas (PLIKUS et al., 2017). A Figura 10 mostra os estágios do reparo tecidual: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento, desde o estabelecimento da lesão até total cicatrização, no decorrer do tempo.

Figura 9 – Estágio de remodelação da cicatrização de feridas na pele.



Fonte: Adaptado de Gurtner et al. (2008)

Figura 10 – Estágios do reparo tecidual: homeostasia, inflamação, proliferação e remodelamento, desde o estabelecimento da lesão até total cicatrização, no decorrer do tempo.



Adaptado a partir de Zomer e Trentin, (2018).

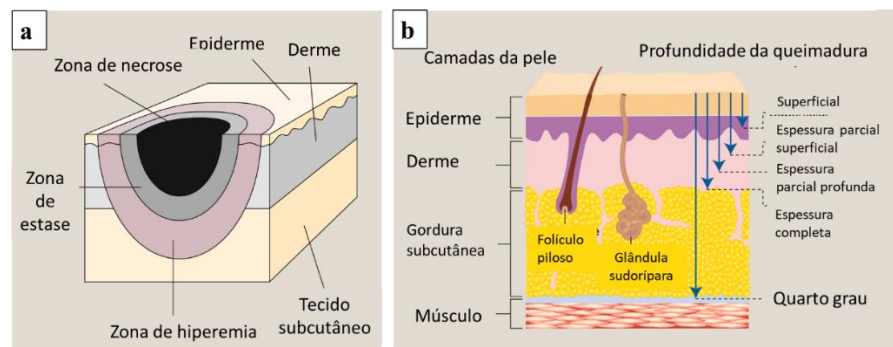
Siglas e abreviações: TGF: fator de crescimento transformador; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas, TNF- α : fator de necrose tumoral α , IL-1: interleucina 1, CSF-1: Fator estimulador de colônias de macrófagos 1; VEGF: fator de crescimento vascular endotelial, EGF: fator de crescimento epidermal, IGFs: fator de crescimento semelhante à insulina, IFNs: interferons, HGFs: fator de crescimento de hepatócitos, FGFs: fator de crescimento de fibroblastos, MMPs: metaloproteinases, TIMPs: inibidoras de metaloproteinases.

2.6.2 Fisiopatologia da Queimadura

O grau de dano ao tecido em uma queimadura (Figura 11a e 11b) pode ser descrito através da descrição das zonas circundantes à lesão (EYUBOGLU et al., 2018; URALOĞLU et al., 2019). A zona de necrose é uma área de maior dano térmico. Nessa região, as proteínas são desnaturadas, devido à temperatura, levando à trombose vascular e morte celular, representando, assim, uma área do tecido que não pode ser salva. A zona de estase representa

a área em que o fluxo sanguíneo é comprometido e envolve a zona de coagulação. Nessa área ocorre um significativo edema, devido à vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, se a ressuscitação e o tratamento forem iniciados, essa hipoperfusão pode ser revertida, e essa área do tecido pode ser potencialmente recuperável. A zona de hiperemia envolve a zona de estase e é caracterizada por um período prolongado de aumento do fluxo sanguíneo e inflamação. Se não houver um período prolongado de hipotensão arterial sistêmica ou sepse localizada, que impeça sua cura, esse tecido certamente se recuperará (JHONSON, 2018).

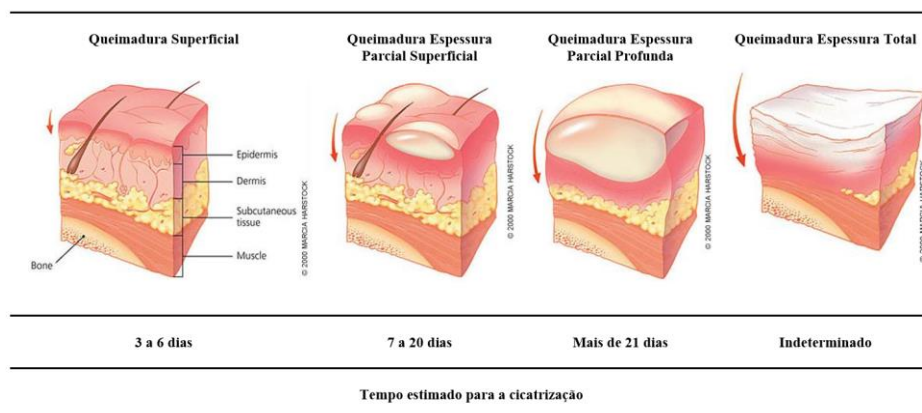
Figura 11 – (a) descrição das zonas circundantes a uma lesão por queimadura. (b) camadas do tecido cutâneo, demonstrando as possíveis áreas que a zona de necrose pode atingir.



Fonte: Adaptado de Johnson (2018).

As queimaduras são classificadas dependendo da gravidade do dano causado (Figura 12): primeiro grau (superficial); segundo grau: parcial ou profunda (comprometimento parcial da pele); terceiro grau (comprometimento total da pele); quarto grau (regiões mais profundas como músculo) (JESCHKE et al., 2020).

Figura 12 – Classificação das queimaduras com base na profundidade da lesão e descrição do tempo estimado para a sua cicatrização.



Fonte: Adaptado de MORGAN, BLEDSOE & BARKER, 2000.

Nas queimaduras de primeiro grau há danos estruturais mínimos, sem formação de bolhas, com vermelhidão um pouco maior que a de um eritema, e com dor associada. Normalmente se resolve completamente em poucos dias. A lesão térmica apenas na epiderme geralmente não é considerada uma queimadura verdadeira, mas ainda é referida como queimadura epidérmica. Exemplos deste tipo são as queimaduras solares (MARTIN e FALDER, 2017).

A lesão térmica que se estende através da junção dermoepidérmica até a derme é referida como queimadura dérmica (espessura parcial ou de segundo grau), que pode ser classificada como superficial ou profunda. O rompimento da junção dermoepidérmica causa formação de bolhas e a cicatrização só pode ocorrer após a restauração da camada basal dos queratinócitos (CHEN et al., 2019).

Nas queimaduras de terceiro e quartos graus há uma lesão térmica que se estende por toda a derme e é denominada de queimadura subdérmica (ou de espessura total). A cicatrização é lenta e complicada, devido a extensas cicatrizes, sendo necessárias excisão e reconstrução cirúrgica (OCON et al., 2019).

No estágio inicial do trauma, a destruição do tecido cutâneo leva a um aumento na permeabilidade capilar, o que faz com que haja vazamento de fluidos e moléculas grandes como a albumina para fora da circulação, principalmente se uma grande área sofrer a lesão. Se essa perda não for tratada, será levada à desidratação e colapso cardiovascular (KAO et al., 2018).

Em queimaduras maiores, também existem efeitos sistêmicos provocados pela liberação generalizada de histamina e outros mediadores inflamatórios. Isso é ocasionado por um aumento sistêmico da permeabilidade capilar e pode levar a edema pulmonar e disfunção miocárdica. A liberação maciça de esteróides endógenos e catecolaminas levam ao aumento do estresse no sistema cardiovascular e ao catabolismo, que é prejudicial para a cicatrização contínua da queimadura (RAE, FIDLER, e GIBRAN, 2016; JHONSON, 2018). Além disso, pode ocorrer uma hipotermia significativa no paciente, devido à perda da capacidade de regular a temperatura corporal através da pele, contribuindo para a resposta imune prejudicada propagada pelos altos níveis de esteróides endógenos e a perda da barreira contra patógenos, aumentando significativamente o risco de sepse em pacientes queimados.

A principal diferença entre a cicatrização de feridas e cicatrização de feridas por queimadura, é que pacientes com lesão térmica têm uma alta incidência de hipercoagulabilidade e trombose, pois a queimadura interrompe a homeostase ao induzir

coagulação intravascular disseminada subclínica e uma deficiência adquirida do anticoagulante antitrombina III (BAGLIN, et al., 1996; WIEGELE et al., 2019). A ativação da coagulação sanguínea resulta na polimerização da fibrina, que induz a formação de microtrombos intravasculares no tecido queimado (KOWAL-VERN et al., 2000; MIDURA et al., 2016).

Devido as reações fisiopatológicas do ferimento de queimadura, apresentarem uma certa complexidade. No qual o processo de cicatrização envolve quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (HEMMATI et al., 2018), somado ao fato das queimaduras apresentarem propriedades individuais, tais como: hipercoagulação, estase e necrose. Novos tratamentos são constantemente estudados, a fim de minimizar os danos físicos e psíquicos, que esta lesão vem a acarretar.

2.6.3 Curativos para Queimaduras

Historicamente baseada em processos endógenos, a cicatrização de feridas na pele vem sendo modificada por materiais de diversos compostos, que estão sendo cada vez mais utilizados no reparo de tecidos. Sem tratamento adequado, a pele lesionada é difícil de ser curada, e pode afetar órgãos vitais, o que causaria mais fatalidades (KWON, 2007; WEN, MITHIEUX e WEISS, 2020). Os principais objetivos do tratamento de queimaduras são o fechamento rápido, com complicações mínimas e menor chance de formação de cicatriz hipertrófica. As queimaduras estão associadas a uma série de riscos, como infecção microbiana, nível elevado de resposta inflamatória e formação de tecido cicatricial patológico, o que adia significativamente a cicatrização da lesão e leva a um reparo prejudicado (NOOSHABADI et al., 2020).

Um dos acontecimentos mais significativos no campo do tratamento de lesões foi o conceito de cicatrização úmido proposto por volta da década de 1950 (BULL, SQUIRE e TOPLEY 1948; SCHILLING, ROBERTS e GOODMAN, 1950), e estabelecido por Winter et al. (1962). Estes pesquisadores demonstraram que feridas de cunho agudo, que cicatrizam rapidamente, apresentam um aumento significativo na taxa de reepitelização quando o tecido danificado é mantido em um ambiente úmido, enquanto para as feridas crônicas, como diabetes mellitus, insuficiência venosa e insuficiência arterial, o tratamento recomendado é geralmente por via ativa, como a entrega de medicamentos específicos (HULL et al., 2017; NAHM et al., 2018; MASUDA, RANDALL e ORTIZ, 2020). Desde então, uma grande variedade de produtos cicatrizantes foi desenvolvida, com base no princípio de cicatrização

em ambiente úmido, utilizado para todos os tipos de lesões, incluindo queimaduras (UBBINK et al., 2008). Atualmente os mecanismos de tratamento úmido relatados são: filme, gaze, hidrogel, hidrocoloide e espuma (LEE et al., 2016; BANERJEE et al., 2019; FEBRIYENTI et al., 2019; WANG et al., 2021).

A utilização de filmes à base de colágeno incorporado de extratos hidroalcoólicos de própolis brasileira mostrou melhora nos eventos associados à cicatrização por queimaduras (DE ALMEIDA et al., 2013). LEI et al. (2020), tiveram como objetivo produzir um curativo promissor para queimaduras. Com a adição de ácido hialurônico, quitosana, colágeno e glutamina transaminase, utilizada como um reticulador, simulando deste modo, a matriz extracelular. O hidrogel demonstrou que pode prevenir eficazmente as infecções por bactérias, e confirmou que o curativo foi mais benéfico para promover a cicatrização de queimaduras, do que um filme comercial (DUO DERM).

Os curativos de espuma também têm sido estudados, pois evitam o acúmulo de exsudatos, maceração, e mantém a hidratação, de modo que o ambiente de umidade apropriado promova a epitelização e a cura através do incentivo à migração das células (NAMVIRIYACHOTE et al., 2019).

Pacientes com queimaduras nas mãos foram divididos em quatro grupos: tratados com curativos de hidrocoloide; desbridamento mecânico com fibras monofilamentares de poliéster e aplicação de sulfadiazina de prata; curativos de gaze contendo preparação enzimática de colagenase, e o quarto e último grupo de pacientes foram tratados com sulfadiazina de prata e curativos de gaze. O estado de cicatrização da ferida foi avaliado após 3, 7, 14 e 21 dias. As cicatrizes de queimaduras e a função das extremidades lesadas foram avaliadas após seis meses. A epitelização mais rápida de queimaduras nas mãos foi observada no grupo de pacientes tratados com curativos de hidrocoloide. Os pacientes desse grupo também apresentaram menos cicatrizes e melhor função manual (ZACHAREVSKIJ et al., 2018).

Ben Slima et al. (2019), estudaram a atividade hemolítica e antioxidante do hidrogel a base de polissacarídeo extraído da *Sorghum bicolor*, assim como, analisaram seus efeitos hemostáticos e curativos em queimaduras de segundo grau, a laser, em modelos de ratos Wistar. Concluíram que a formulação do hidrogel: não apresentou atividade hemolítica, mostrou potencial atividade antioxidante *in vivo* e *in vitro* e confirmou que a aplicação do hidrogel para queimaduras de segundo grau, acelera a reepitelização, o fechamento da ferida e a remodelação da matriz extracelular do tecido queimado.

Os tratamentos modernos de queimaduras incluem novos curativos, substitutos da pele com engenharia biológica, tecidos, células-tronco, fatores promotores de cura e terapia genética (AUGUSTINE et al., 2014; ORYAN et al., 2017). Esses métodos são frequentemente caros e de difícil acesso, principalmente nos países em desenvolvimento (GARCIA et al., 2016). Portanto, mais pesquisas são necessárias para identificar medicamentos mais adequados em termos de eficácia no processo de cicatrização, preço e disponibilidade para o tratamento de queimaduras.

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO 1 - HIDROGÉIS À BASE DE GALACTOMANANA E K-CARRAGENANA CONTENDO BIOMOLÉCULAS IMOBILIZADAS PARA APLICAÇÃO EM QUEIMADURAS TÉRMICAS *IN VIVO*

Hidrogéis à base de galactomanana e k-carragenana contendo biomoléculas imobilizadas para aplicação em queimaduras térmicas *in vivo*

José R. P. C. de Seixas^a, Kátia A. Ribeiro^a, Andrea A. de Souza^a, Geovanna H. F. Guedes^c, Maxwellinne G. P. Santiago^c, Maria H. M. Lima-Ribeiro^b, Jacinto da C. Silva Neto^c, Wilson B. Junior^d, René D. Martins^e, Luana C. B. B. Coelho^a, Maria T.S. Correia^a, Paulo A.G. Soares^a, Maria G. Carneiro-da-Cunha^{a,b,*}

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420 Recife, PE, Brazil;

^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901;

^c Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife, PE, Brazil;

^d Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Luiz Freire s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-901 Recife, PE, Brazil;

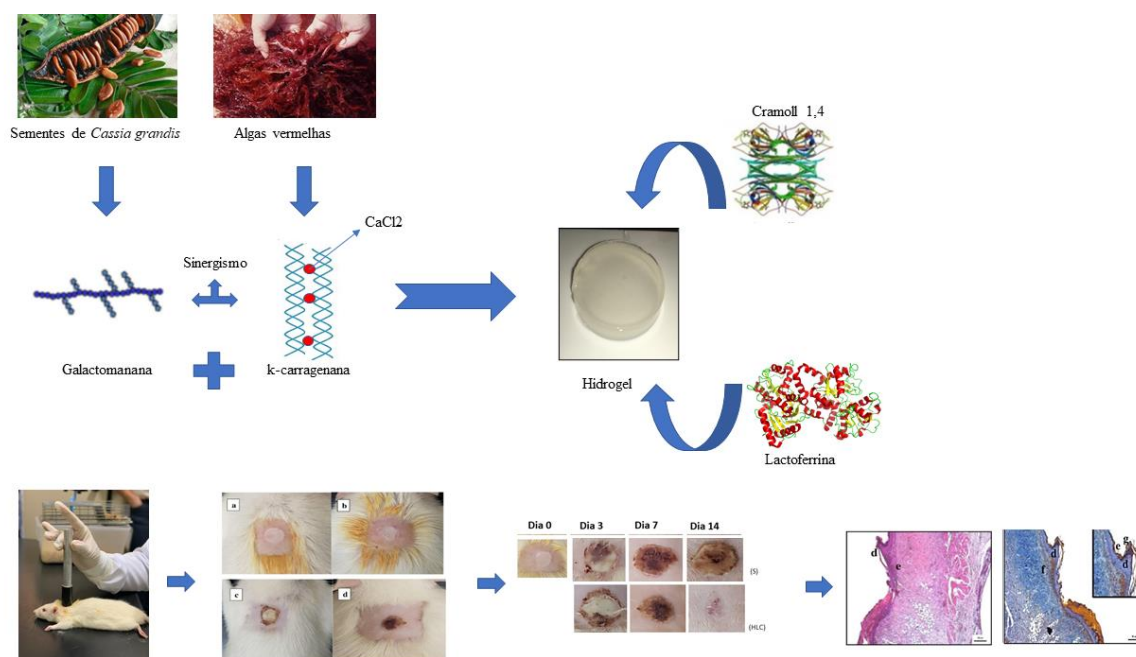
^e Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória. Rua do Alto do Reservatório, S/N Bela Vista 55600000 - Vitória de Santo Antão, PE – Brasil.

* Autor correspondente. E-mail address: mgcc@ufpe.br; mgcc1954@gmail.com Tel.: +55 81 21268547; Fax: +55 81 21268576.

Resumo

Hidrogéis foram preparados com 1,7% (p/v) de galactomanana (extraída de sementes de *Cassia grandis*) e 0,5% (p/v) de k-carragenana, CaCl_2 0,2 M em pH 5,0, acrescido ou não das biomoléculas lactoferrina e/ou Cramoll-1,4. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que durante os 90 dias de estocagem, não ocorreram modificações significativas para o pH, não houve crescimento microbiológico, contudo, houve um aumento na luminosidade (L^*) de 11,78% e diminuição da opacidade (Y%) 49,40% para o hidrogel sem as biomoléculas. As análises reológicas confirmaram as características sólidas e viscoelásticas dos hidrogéis, onde tais características, módulo $G' > G''$ não se alteram na presença das proteínas lactoferrina ou Cramoll 1,4. Além disso, foi possível identificar que a adição de tais proteínas diminuiu o ponto de transição $G' > G''$ para $G'' > G'$ e que não ocorre interação significativa do CaCl_2 com a galactomanana e sim com a κ -carragenana. O processo de cicatrização de animais com queimaduras térmicas, tratadas topicamente com as quatro diferentes formulações de hidrogéis: hidrogel (H); hidrogel contendo lactoferrina (HL); hidrogel contendo Cramoll 1,4 (HC) e hidrogel contendo lactoferrina e Cramoll 1,4 (HLC), obtiveram uma melhor resposta quando comparado com o grupo controle de solução salina 0,9% NaCl (S). Resultados esses confirmados pelas análises macroscópicas, com as lesões cicatrizando de maneira centrípeta com percentagem de contração das queimaduras: H-32,85 %; HL-45,49 %; HC-36,05; %; HLC-66,10 % e S-20,76 %, tendo como destaque o hidrogel acrescido com as biomoléculas (HLC), que juntamente com a microscopia comprovou a diminuição no processo inflamatório, diminuição na necrose tecidual, redução da fibrose e aumento da reepitelização com acantose focal. Podemos concluir que a formulação de hidrogéis com a imobilização dessas biomoléculas ganha destaque como novo sistema de tratamento para queimaduras de segundo grau.

Resumo gráfico



Palavras-chave: caracterização de hidrogel; polissacarídeos; lactoferrina; Cramoll 1,4; cicatrização de queimaduras.

Introdução

Os hidrogéis são redes tridimensionais formadas a partir de polímeros hidrofílicos naturais ou sintéticos, com boa biocompatibilidade que podem absorver e reter uma quantidade significativa de água, os tornando muito semelhante ao tecido humano (Jingyi et al., 2019). Os hidrogéis têm sido utilizados como dispositivo de administração de medicamentos devido à sua capacidade de protegê-lo contra condições ambientais hostis, tendo como princípio controlar a liberação do medicamento por alterações causadas em sua estrutura, devido a flutuações no pH, temperatura, pressão, teor de oxigênio, entre outros (Mankotia et al., 2020).

Além das vantagens econômicas (baixo custo e fácil disponibilidade), os polissacarídeos demonstram um benefício importante na formulação de hidrogéis, pois podem ser solidificados por gelificação ionotrópica, processo este, que tem por base a capacidade que os polieletrólitos apresentam de entrecruzarem na presença de contra-íons e formarem estruturas gelatinosas (Joye e McClements, 2014). Os hidrogéis à base de polissacarídeos têm recebido interesses consideráveis referentes às suas excelentes propriedades, incluindo absorção de excesso de exsudato, proteção contra infecções e fatores externos, fornecimento de pH ideal, que promovem a cicatrização rápida de feridas, além de serem facilmente removidos sem trauma (Hui e Ying, 2020).

As Galactomananas são polissacarídeos amplamente utilizados rotineiramente, extraído do endosperma das sementes de leguminosas, que tem como característica proporcionar a reserva energética do vegetal e função de hidratação (Tyagi et al., 2018). As galactomananas possuem uma cadeia principal formada por unidades β -(1 $\rightarrow$ 4) -D-manopiranosil com ramificações de α -(1 $\rightarrow$ 6) -D-galactopiranosil (Takemasa e Nishinari et al., 2016). Devido a suas características peculiares tais como: alta absorção de água e biocompatibilidade, este polissacarídeo pode ser utilizado como espessante e estabilizantes em alimentos, indústrias farmacêutica, biomédica, cosmética, têxtil e de papel. Podemos destacar sua utilização na produção de filmes associado à Cramoll 1,4, para cicatrização de feridas tópicas de ratos, testes estes, que confirmaram a diminuição do tempo de cicatrização com uma maior contração das feridas, apresentando reepitelização em torno de 11 dias (Albuquerque et al., 2017).

Extraídas de algas vermelhas (Rhodophyceae), a κ -carragenana (Prajapati et al., 2013), apresenta como peculiaridade a formação de uma rede polimérica tridimensional, que ganha força na presença de contra-íons (K^+ e Ca^{+2}). Constituídas de unidades alternadas de β -(1-3) -D-galactose-4-sulfato e α -(1-4) -3,6-anidro-D-galactose (Kravchenko et al., 2016), que lhe confere alta hidrofília, força mecânica, biocompatibilidade e biodegradabilidade, este polímero tem sido amplamente utilizado, tanto para otimização física como para reduzir ou eliminar a toxicidade de transportadores de entrega de drogas, na área biomédica (Selvakumaran et al., 2016).

Devido às propriedades que as galactomananas e κ -carragenanas apresentam para desenvolvimento de hidrogéis biocompatíveis. Biomoléculas que otimizem a cicatrização de queimaduras podem ser incorporadas, a fim de otimizar suas propriedades inerentes para tal feito (Dang et al., 2019). A lactoferrina é uma importante glicoproteína de 80 Kda de ligação ao ferro, da família da transferrina, multifuncional, presente no leite de mamíferos, nas lágrimas, saliva, líquido cefalorraquidiano e outras secreções (García-Montoya et al., 2012a; Fakhri, 2020). É a principal proteína do soro do leite, com maior concentração no colostro, apresentando inúmeras funções biológicas como anticancerígeno, anti-inflamatório, antibacteriano, antiviral, antifúngico, efeito imunomodulador, e inibidor da formação de radicais livres (Bokkhim et al., 2013; Habib et al., 2013; Embleton et al., 2013; Dominique, 2016a; Frontera et al., 2018; Liu et al., 2019).

Cratylia mollis é uma planta forrageira da região Semi-Árida do estado de Pernambuco, e de suas sementes (feijão camaratu) têm sido purificadas e caracterizadas

diferentes isoformas de lectinas: Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4. Uma preparação contendo as formas 1 e 4 associadas, denominada Cramoll 1,4, apresenta especificidade glicose/manose (Correia e Coelho, 1995), a mesma observada para Cramoll 1, Cramoll 2 e Cramoll 4, enquanto Cramoll 3 é uma glicoproteína específica para galactose. A Cramoll tem sido empregada em várias aplicações biotecnológicas (Paiva e Coelho, 1992; Coelho et al., 2017), apresentando atividades antitumoral (Da Cunha et al., 2016), antiparasitária (Fernandes et al., 2010; Melo et al., 2011a), antimicrobiana (Jandú et al., 2017), anti-inflamatória (Melo et al., 2010), mitogênica (Oliveira et al., 2018), antioxidante (Rezende et al., 2015) e cicatrizante de feridas (Melo et al., 2011b; Albuquerque et al., 2017). O desenvolvimento tecnológico de novas formas de imobilização de lectinas tem sido estratégias promissoras para aumentar seus potenciais atividades biológicas, principalmente no que diz respeito a otimização e aceleração do processo cicatricial (Jamal et al., 2012; Silva et al., 2016).

As queimaduras são lesões nos tecidos resultantes da exposição térmica, radiação, contato químico ou elétrico que pode resultar em morbidade e mortalidade (Atwell et al., 2019). Uma lesão por queimadura pode ter um impacto severo na vida dos sobreviventes, resultando em sequelas físicas e psicossociais em longo prazo (Kornhaber et al., 2019). O paciente queimado é mais suscetível a infecções, em decorrência de imunossupressão e perda de cobertura cutânea. No Brasil acontecem em torno de 1.000.000 de incidentes por queimaduras ao ano, sendo que 100.000 pacientes buscam atendimento hospitalar e, destes, cerca de 2.500 pacientes irão a óbito direta ou indiretamente em função de suas lesões (Brasil, 2017). No âmbito global, as lesões térmicas agudas causam aproximadamente 150.000 mortes anualmente, segundo relatório da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2018).

A reação fisiopatológica a um ferimento de queimadura é complexa envolvendo três fases para cicatrização: inflamatória, proliferativa e remodelação (Hemmati et al., 2018). O trauma de queimadura não é um evento fisiopatológico único, mas uma lesão devastadora que causa déficits estruturais e funcionais em vários sistemas orgânicos. Devido à sua complexidade e envolvimento de múltiplos órgãos, experimentos *in vitro* não podem capturar essa complexidade nem abordar a fisiopatologia (Abdullahi et al., 2014), por essas razões, modelos animais para queimaduras são necessários para se descobrir o mecanismo patológico pós-queimadura e testar novas abordagens terapêuticas.

Durante muitos anos, o curativo convencional da queimadura (gaze de algodão) e agentes antibacterianos tópicos, foram usados para proteger as feridas de trauma, infecção ambiental e proporcionar sua estabilidade (Kim et al., 2011; Laleh et al., 2021). No entanto, esses materiais de curativo apresentam várias limitações, incluindo adesão à ferida, resultando em isquemia e/ou necrose, ocorrência da reação a um corpo estranho, provocando deste modo, irritação ou reações alérgicas (Moon et al., 2013).

Novos tratamentos envolvendo curativos úmidos, como os hidrogéis, foram introduzidos para superar as desvantagens dos curativos convencionais (Bouhadir et al., 2001a; Tao et al., 2020). A umidade suprime a formação de cicatrizes, permitindo um desenvolvimento mais rápido de colágeno e reepitelização (Zhai et al., 2018). Além disso, a umidade diminui a quantidade de epiderme perdida assim como suas estruturas anexas, melhorando assim a qualidade da cicatriz (Bouhadir et al., 2001b; Parwani et al., 2016). A má estabilidade física desses materiais de curativo molhados cria um desafio para os pesquisadores usá-los sozinhos em feridas, por esta razão, nos últimos anos, novos materiais naturais biodegradáveis foram fabricados para proteger feridas queimadas e tentar minimizar as possíveis instabilidades físicas, que possam surgir.

Devido à crescente busca por mecanismos curativos naturais e eficazes, e levando em consideração que a Cramoll 1,4 e a lactoferrina já são conhecidas como componentes que otimizam a cicatrização, a pesquisa pela imobilização dessas biomoléculas em um suporte como o hidrogel à base de polímeros naturais, em que apresentam capacidade de potencializar a ação cicatrizante, pode ser destacada como uma nova alternativa de tratamento para queimaduras de segundo grau.

Diante do exposto, o presente trabalho visa caracterizar os hidrogéis constituídos de galactomanana/ κ -carragenana acrescidos ou não das biomoléculas Cramoll 1,4 e/ou lactoferrina ao longo do tempo, e avaliar a atividade cicatrizante em queimaduras de segundo grau *in vivo*.

Materiais e métodos

A κ -carragenana e Lactoferrina foram adquiridas da Sigma Aldrich (U.S.A.). As sementes (feijão de camaratu) foram coletadas na cidade de Ibimirim, estado de Pernambuco. As vagens de *Cassia grandis* foram coletadas no campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), na cidade de Recife (Brasil). Todos os outros reagentes químicos foram de grau analítico.

Extração da galactomanana presente nas sementes de *cassia grandis*

A galactomanana das sementes de *Cassia grandis* foi extraída e purificada de acordo com Albuquerque et al. (2014). Resumidamente, o processo de extração incluiu, primeiramente, remoção das sementes das vagens, seguido pela fervura em água destilada 1:5 (p/v) a 100 °C por 1h e mantidas por 18 h a 25 °C para facilitar a remoção do seu tegumento. O endosperma mais o germe foram triturados com NaCl 0,1 M 5% (p/v) a 25 °C, filtrados e precipitados com etanol 46% 1:3 (v/v) por 24 h. O precipitado foi filtrado novamente, seguido por uma lavagem com etanol 100% 1:3 (v/v) e duas vezes com acetona P.A. 1:3 (v/v), com filtrações entre cada lavagem. O precipitado obtido da galactomanana foi seco em estufa a 100 °C e por fim pulverizado e mantido em local seco até posterior utilização.

Extração e purificação de *Cratylia mollis* (Cramoll)

A lectina extraída das sementes de *C. mollis*, conhecida como Cramoll, contendo suas isoformas 1 e 4 (Cramoll 1,4), foi obtida segundo Correia e Coelho (1995). Resumidamente, as sementes foram secas a 25 °C e trituradas para se obter uma farinha, a qual foi dissolvida em NaCl 0,15 M a 10% (p/v), sob agitação magnética (500 rpm), por 18 h, a 4 °C. Assim, o extrato salino obtido foi fracionado com sulfato de amônio (0–40% e 40–60%). O precipitado obtido da fração de 40–60% foi dialisado e purificado por cromatografia de afinidade em coluna Sephadex G-75.

Preparação dos hidrogéis

Os hidrogéis de κ -carragenana e galactomanana foram obtidos segundo metodologia descrita por Soares et al. (2015). Resumidamente, em um béquer foi adicionado um volume conhecido da solução de κ -carragenana e CaCl_2 . A solução foi mantida sob agitação magnética (850 rpm), a 50 °C durante 20 min. A adição de CaCl_2 [1,0% (v/v) do volume final da mistura desejada] foi necessária para iniciar um processo de reticulação. Com o auxílio de uma agulha de seringa (calibre 27G) a um fluxo de 1mL/min, foi adicionado um volume conhecido da solução de galactomanana ao béquer contendo a solução de κ -carragenana, enquanto a mesma ainda se mantinha sob agitação. Ao final da adição da galactomanana, a mistura foi deixada sob agitação nas mesmas condições (850 rpm a 50 °C) por mais 30 min. Em seguida o pH da solução foi ajustado para 5,0, com solução de HCl 1M. Essas amostras

finais, agora denominadas hidrogéis, foram distribuídas em uma placa de cultura celular (placa de 6 poços) e armazenadas a 4 °C.

Incorporação da lactoferrina e Cramoll 1,4 ao hidrogel

As biomoléculas lactoferrina e/ou Cramoll (100 µg/mL de hidrogel) foram incorporadas à solução do hidrogel de κ-carragenana/galactomanana (H) antes da gelificação e a mesma foi mantida sob agitação magnética (500 rpm) durante 1h, em temperatura ambiente (25 °C). Em seguida as 3 formulações dos hidrogéis obtidos: **A-** Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); **B-** Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Cramoll (HC); **C-** Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC), foram armazenados a 4 °C.

Caracterização do hidrogel

Avaliação da estabilidade dos hidrogéis ao longo do tempo

A estabilidade dos hidrogéis quanto ao pH, cor e contaminação microbiológica foram avaliados ao longo do tempo (1, 5, 10, 15, 30, 60 e 90 dias), a 4 °C. A determinação do pH foi conduzida em potenciômetro digital. A mudança na coloração dos hidrogéis foi obtida com base nas coordenadas tridimensionais de espaço de cores L*, a* e b* de Hunter, obtidos com base no método CIE (1976), utilizando um colorímetro digital (CR 400; Minolta, Japão), onde foi possível identificar as características de coloração de uma determinada estrutura através de um diagrama de cores. A opacidade, a razão leitura da amostra em padrão preto (Yb) pela da amostra em padrão branco (Yw), cujo resultado foi expresso em porcentagem segundo a fórmula: $Y (\%) = (Yb/Yw) \times 100$. A avaliação microbiológica foi realizada por contagem de mesófilos aeróbios, bactérias lácticas, psicrotróficas, bolores e leveduras de acordo com a metodologia de Vanderzant & Splittstoesser (1992).

Medidas reológicas

As medidas reológicas dos hidrogéis foram realizadas de acordo com Pinheiro et al. (2011), utilizando um reômetro MCR301 (Anton Paar, Áustria), com células de placas paralelas de (25 mm de diâmetro) com espessamento de 1mm entre as placas. A rampa de amplitude, com mudulos G'/G'' foram realizados na faixa de 0,1-1000% de tensão de cisalhamento a 25°C.

Indução de queimaduras em ratos

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Animais da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo nº 23076.046544/2017-96).

Foram utilizados 75 ratos machos Wistar albinos (*Rattus norvegicus*) obtidos do Biotério Setorial do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pesando entre 250 ± 50 g, 8-10 semanas de idade, mantidos sob temperatura (22 ± 2 °C), luminosidade controlada (12 h de claro e 12 h de escuro) e com água e ração *ad libitum*. O experimento foi realizado no Biotério do LIKA - Universidade Federal de Pernambuco, onde os animais foram mantidos nos mesmos padrões de temperatura, luminosidade, alimentação e hidratação, e passando por um período de uma semana de adaptação antes de serem submetidos aos procedimentos.

O modelo experimental de escolha para realização das queimaduras de segundo grau foi estabelecido por Pereira et al. (2012), obtendo lesões com o mesmo tamanho e grau de profundidade.

Primeiramente, os animais foram divididos, ao acaso, em cinco grupos experimentais, cada um constituído por 15 animais: H – tratado com hidrogel; HL – tratado com hidrogel contendo lactoferrina; HC – tratado com hidrogel e Cramoll; HLC – tratados com hidrogel contendo lactoferrina e Cramoll; S – tratado com solução salina 0,9% NaCl. Cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos, cada um contendo 5 animais, que correspondem aos tempos de biópsias, a serem realizadas no 3º, 7º e 14º dias após a indução da queimadura.

Os animais foram anestesiados com xilazina 10 mg Kg^{-1} e cetamina 90 mg kg^{-1} por via intramuscular, com subsequente tricotomia do dorso pela tensão de pelo direta (área medindo cerca de 3 cm^2) e anti-sepsia com 1% de polivinilpirrolidona-iodo. Queimaduras foram simetricamente induzidas em áreas depiladas através do contato com barra de alumínio (diâmetro= 10 mm), previamente aquecida em água fervente, até que a barra atingisse $97 \pm 3^\circ \text{C}$. A pressão exercida sobre a pele do animal corresponde à massa de 51 g de barra de alumínio usadas na indução da queimadura. Após o termino da anestesia foi aplicada analgesia com dipirona intramuscular ($0,01 \text{ mg/ kg}^{-1}$) para evitar a dor. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e foram diariamente tratados topicamente com 100 uL das diferentes formulações de hidrogéis de acordo com o grupo experimental. As biópsias foram efetuadas ao 3º, 7º e 14º dias após a indução da queimadura (T_3 , T_7 e T_{14}).

Avaliação clínica das lesões experimentais

As características clínicas das feridas experimentais foram observadas diariamente, considerando os seguintes aspectos: edema, hiperemia, secreção, sarna, granulação, epitelização e cicatrização dos tecidos segundo Melo et al. (2011b). O peso corporal foi determinado utilizando balança eletrônica (precisão g) no dia da indução da queimadura, bem como no 3º, 7º, e 14º dias da eutanásia.

Para determinar a retração das lesões, as áreas foram fotografadas e calculadas pelo software image J 2.0. O índice de cicatrização das lesões (ICL), para análise da reepitelização foi calculado de acordo com a equação $[ICL = (A_i - A_f) / A_i]$, que representa o quociente entre a diferença da área inicial (A_i) e final (A_f), dividido pela área inicial, multiplicado por 100 para expressar o valor em porcentagem (Kumar et al., 2006). A área inicial corresponde ao dia da indução da queimadura (T_0) e a área final corresponde ao dia da eutanásia (Biópsia T_3 , T_7 e T_{14}).

2.9. Biópsia da lesão e avaliação histopatológica

As biópsias cutâneas foram realizadas objetivando a retirada do fragmento de pele total e área da ferida, abrangendo um centímetro além de cada margem dorsal e ventral no sentido caudal, aprofundando-se até o plano muscular.

O tecido da região queimada dos ratos submetidos aos diferentes tratamentos foi seccionado e fixado em formalina tamponada a 10% durante 24 horas. Após a fixação, as amostras foram lavadas com água, imersas em álcool etílico a 70% por um período de 3 a 4 dias, seguido pelo processo de inclusão em parafina.

Através da microtomia, os blocos de parafina com representação da lesão, foram cortados na espessura de 5 μ m e corados pelo método “Hematoxilina e Eosina” (H&E) e “Tricrômico de Masson”. A análise histopatológica das secções da pele foi realizada utilizando um sistema de microscopia com software de captura de imagens ZEN blue edition Axio zeiss®, USA.

Processamento dos dados e análise estatística

Para detectar diferenças entre os grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney e a análise de variância ANOVA. Todos os resultados foram expressos como valores médios dos grupos $\pm$ desvio padrão e analisado considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Todas

as análises estatísticas e gráficos foram realizadas com os programas Statistica 8.0 program (SatSoft Inc., 2008, Tulsa, OK, USA) e Origin Pro 8.5 (2018, USA).

Resultados e discussão

Extração da galactomanana das sementes de *cassia grandis*

O polissacarídeo, galactomanana, obtido no final do processo de extração, apresentou um rendimento de $36\% \pm 8\%$. Este resultado foi o mesmo reportado por Albuquerque et al. (2014), os quais utilizaram sementes de *Cassia grandis* originária do Brasil e similar aos 32-34% encontrado para sementes de *Cassia grandis* da Índia, relatado por Andrade et al. (1999).

Preparação dos hidrogéis

De acordo com os resultados, foi possível obter hidrogéis estáveis compostos por 1,7 % (p/v) de galactomanana e 0,5% (p/v) de κ -carragenana, com 0,2 M de CaCl_2 a pH 5,0, acrescidos ou não de lactoferrina e/ou Cramoll (100 $\mu\text{g/mL}$ de hidrogel), conforme metodologia descrita por Soares et al. (2015). Os hidrogéis com incorporação de Cramoll e/ou lactoferina apresentaram aspectos macroscópicos similares aos hidrogéis que não tiveram a incorporação das respectivas biomoléculas, tais como homogeneidade, brilho, cor e opacidade, aspectos esses confirmados no teste de colorimetria.

Avaliação da estabilidade dos hidrogéis ao longo do tempo

Avaliação do pH ao longo do tempo de armazenamento

O pH é uma propriedade importante tanto para a estabilidade de bioprodutos quanto para sua compatibilidade em futuras aplicações biotecnológicas e para liberação de compostos imobilizados em hidrogéis. Os valores médios de pHs após 90 dias de armazenamento em temperatura a 4°C estão representados na tabela 1 (H, HL, HC e HLC), as leituras não apresentaram variações significativas ($p \geq 0,05$) entre os grupos testados, os valores de pHs variaram entre 5,22 até 5,31 (Tabela 1). Esta faixa de pH é considerada adequada para uma gama de aplicações, especialmente cosméticas, alimentícias e farmacêuticas (Segura et al., 2010). Os resultados foram semelhantes aos reportados por Soares e colaboradores (2015), que produziram hidrogéis de galactomanana e κ -carragenana com pHs que variaram de 5,0 até 5,7 em 90 dias de armazenamento.

Tabela 1 – Variação do pH entre os 4 tipos de hidrogéis formulados.

Formulação	Faixa de pH
H	5,30 ± 0,09
HL	5,22 ± 0,14
HC	5,31 ± 0,19
HLC	5,25 ± 0,10

Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Cramoll (HC) e Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC).

Os valores dos pHs do presente estudo indicam que os hidrogéis inicialmente formulados a pH 5,0 não obtiveram variações que pudessem indicar possíveis contaminações microbiológicas, fato observado por Gram et al. (2002), onde afirmam que a variação de pH está intimamente associada com crescimento microbológico. Paim et al. (2017), avaliaram que a alteração de pH para o neutro, pode representar uma contaminação por aeróbios mesófilos, como a *Escherichia coli*. Garavito et al. (2020), relatam que bactérias psicrotróficas como as *Pseudomonas* spp. são ativas em condições de refrigeração e pH entre 6,5 e 8,0. Nessas condições, elas geram proteinases que hidrolisam as proteínas.

Do ponto de vista clínico, a superfície da pele possui um pH ácido, variando de 4,5 a 6,0 (Lambers et al., 2006), valores estes que estão envolvidos nas funções protetoras da pele, proporcionando um ambiente favorável à microbiota normal e inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos, incluindo bactérias do gênero *Staphylococcus* (Giannuzzi et al., 2016), e mantendo a homeostase de barreira do estrato córneo (Elias, 2004). Agnieszka (2016), afirma que um aumento do pH da pele de 6,5 a 8 atua como irritante na barreira protetora, devido às alterações na flora microbiana da pele e à atividade de enzimas nas camadas superiores da epiderme. Desta forma os hidrogéis produzidos no presente estudo ganham destaque por se enquadrarem em valores de pHs observados em peles saudáveis mimetizando assim a camada córnea do tecido epitelial.

3.3.2. Avaliação microbiológica

De acordo com as análises microbiológicas, a relação da contagem entre o número de unidades formadoras de colônias (UFC), que são agrupamentos característicos de certos microrganismos, por mililitro ou gramas de amostra, não apresentaram crescimento para as avaliações por contagem de mesófilos aeróbios, bactérias lácticas, psicrotróficas, bolores e leveduras em nenhum dos dias de experimentação (1, 5, 10, 15, 30, 60 e 90 dias). Isso sugere

que os hidrogéis analisados podem ser estocados por longos períodos em temperatura a 4 °C sem apresentar possíveis contaminações.

As análises realizadas englobaram diversas linhagens de microorganismos contaminantes de substâncias orgânicas, indicando se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante os processos de tratamento laboratorial foram realizados de forma adequada, segundo a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMS, 1994). O número de microrganismos aeróbios mesófilos (lactobacilos, estreptococos, lactococos e coliformes), que crescem em temperatura ambiente, encontrados em material orgânico, é um dos indicadores microbiológicos da qualidade dos mesmos (Putnik et al., 2016; Mritunjay e Kumar, 2017). A identificação de bactérias lácticas ganha destaque por apresentarem atividades proteolíticas (Hahne et al., 2018), o que que poderia ocasionar degradação das proteínas lactoferrina e Cramoll incorporadas nos hidrogéis.

Embora o resfriamento possa exercer um importante papel na melhoria da qualidade de substâncias de origem orgânica, deve-se enfatizar que se a obtenção do mesmo não for feita higienicamente, pode haver comprometimento da qualidade do produto devido a proliferação de microrganismos psicotróficos, conhecidos pela sua habilidade em se desenvolver a temperaturas menores do que 7 °C, capazes de produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes (Lampugnani et al., 2019).

A contaminação por fungos e leveduras continua sendo uma das principais preocupações da higiene e segurança internacional (Hernández et al., 2018), podendo estes produzirem micotoxinas extremamente perigosas, com características mutagênicas e cancerígenas (Li et al., 2019). Segundo Garayoa et al. (2016), parâmetros como condições de higiene em que o material em questão foi processado, a vida útil pretendida e os riscos que o material pode oferecer, são condições fundamentais que foram confirmadas com as análises microbiológicas, tornando-as indispensáveis para verificar se os padrões nacionais ou internacionais foram atendidos adequadamente.

Avaliação da cor

A cor é um parâmetro importante na escolha dos produtos para os consumidores (Van Hal, 2000; Wrolstad et al., 2005), e por se tratar de um produto com possível comercialização, a padronização da cor dos hidrogéis é de extrema importância. Os resultados colorimétricos para os parâmetros L*, Y, a* e b* são mostrados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Parâmetros de cor L* e Y para os hidrogéis durante 90 dias.

Dias	H		HL		HC		HLC	
	L*	Y (%)	L*	Y (%)	L*	Y (%)	L*	Y (%)
1	69,99 ± 0,44 ^a	17,67 ± 0,80 ^a	70,8 ± 1,29 ^a	19,09 ± 2,52 ^a	72,48 ± 3,56 ^a	15,77 ± 4,25 ^a	74,26 ± 1,01 ^a	16,87 ± 2,41 ^a
5	74,0 ± 0,54 ^b	14,68 ± 0,65 ^b	74,52 ± 2,71 ^a	15,06 ± 0,48 ^b	74,8 ± 1,37 ^a	11,53 ± 0,42 ^a	73,52 ± 0,86 ^a	11,70 ± 0,70 ^b
10	73,98 ± 4,39 ^a	16,27 ± 3,24 ^a	71,93 ± 2,25 ^a	15,60 ± 1,71 ^a	67,31 ± 1,39 ^a	16,2 ± 3,87 ^a	71,2 ± 4,45 ^{a7}	18,85 ± 1,0 ^a
15	77,74 ± 3,46 ^a	10,25 ± 0,75 ^b	73,28 ± 0,44 ^a	9,69 ± 2,53 ^b	76,57 ± 2,39 ^a	8,67 ± 1,44 ^a	75,45 ± 2,33 ^a	10,76 ± 1,8 ^b
30	74,72 ± 1,81 ^b	10,25 ± 2,06 ^b	71,0 ± 3,31 ^a	11,77 ± 1,28 ^a	74,07 ± 2,95 ^a	10,01 ± 1,38 ^a	74,87 ± 1,88 ^a	13,83 ± 4,85 ^a
60	71,94 ± 1,83 ^a	10,40 ± 0,71 ^b	78,07 ± 1,29 ^b	10,13 ± 0,66 ^b	79,50 ± 1,40 ^b	10,29 ± 0,44 ^a	73,27 ± 0,41 ^a	13,35 ± 1,03 ^a
90	78,24 ± 1,11 ^b	8,94 ± 1,90 ^b	76,55 ± 3,52 ^a	13,94 ± 6,96 ^a	74,44 ± 1,80 ^a	12,82 ± 5,50 ^a	76,66 ± 3,14 ^a	12,27 ± 5,75 ^a

L* (luminosidade); Y (%) (opacidade); Valores expressos como média ± desvio padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma coluna indicam uma diferença estatisticamente significativa (p <0,05.). Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Cramoll (HC) e Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC).

Tabela 3: Parâmetros de cor a* e b* para os hidrogéis durante 90 dias.

Dias	H		HL		HC		HLC	
	a*	b*	a*	b*	a*	b*	a*	b*
1	-0,12 ± 0,05 ^a	6,2 ± 0,20 ^a	-0,14 ± 0,01 ^a	6,15 ± 0,10 ^a	-0,2 ± 0,09 ^a	5,99 ± 0,23 ^a	-0,06 ± 0,14 ^a	6,94 ± 0,65 ^a
5	-0,05 ± 0,10 ^a	5,71 ± 0,60 ^a	-0,03 ± 0,10 ^a	6,21 ± 0,36 ^a	-0,003 ± 0,15 ^a	6,12 ± 1,01 ^a	0,003 ± 0,04 ^a	6,41 ± 0,12 ^a
10	0,02 ± 0,01 ^b	6,66 ± 0,13 ^a	0,11 ± 0,09 ^b	6,04 ± 0,04 ^a	0,13 ± 0,01 ^b	634 ± 0,15 ^a	0,40 ± 0,05 ^b	8,06 ± 0,17 ^b
15	-0,47 ± 0,04 ^b	4,48 ± 1,05 ^a	-0,5 ± 0,04 ^b	4,32 ± 0,12 ^b	-0,66 ± 0,02 ^b	4,01 ± 0,12 ^b	-0,6 ± 0,04 ^b	4,63 ± 0,55 ^b
30	-0,44 ± 0,01 ^b	4,11 ± 0,21 ^b	-0,36 ± 0,07 ^b	4,33 ± 0,28 ^b	-0,5 ± 0,04 ^b	4,21 ± 0,16 ^b	-0,37 ± 0,06 ^a	5,01 ± 0,78 ^a
60	-0,22 ± 0,03 ^a	5,54 ± 0,18 ^a	-0,35 ± 0,01 ^b	3,84 ± 0,69 ^b	-0,33 ± 0,07 ^b	5 ± 0,75 ^a	-0,16 ± 0,17 ^a	6,74 ± 1,09 ^a
90	-0,37 ± 0,02 ^b	6,53 ± 0,18 ^a	0,03 ± 0,28 ^a	6,55 ± 1,31 ^a	0 ± 0,11 ^a	7,17 ± 0,93 ^a	-0,31 ± 0,03 ^a	6,13 ± 0,21 ^a

a* (verde-vermelho); b* (azul-amarelo); Valores expressos como média ± desvio padrão. Diferentes letras sobrescritas na mesma coluna indicam uma diferença estatisticamente significativa (p < 0,05.). Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Cramoll (HC) e Hidrogel de κ-carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC).

Os resultados experimentais mostraram um aumento na luminosidade (Tabela 2) dos hidrogéis de aproximadamente 11,78% (H); 8,12% (HL); 2,70% (HC) e 3,23% (HLC), respectivamente, mas apenas os valores do (H) foram significativos ($p < 0,05$), ao longo dos 90 dias de armazenamento; e uma redução de 49,40% (H); 26,97% (HL); 18,70% (HC) e 27,26% (HLC), na opacidade, onde do mesmo modo apenas os valores do (H) foram significativos (Tabela 2). Esses dados podem ser comparados aos reportados por Selig et al. (2018), os quais observaram que géis formulados com κ -carragenana contendo proteínas do soro do leite, quanto maior a concentração de proteína maior era a opacidade dos géis, do mesmo modo ao adicionar as proteínas lactoferrina e Cramoll, estas biomoléculas podem ter diminuído a capacidade de aumentar a luminosidade e diminuir a opacidade.

A opacidade Y (%) é uma característica importante que indica a capacidade de biomateriais de agirem como uma barreira contra a luz. No caso de hidrogéis preparados com mais de um tipo de polímero, esse parâmetro pode representar um grau maior ou menor de miscibilidade dos polímeros (Rad et al., 2018). Como os hidrogéis em questão são formulações que têm como princípio a cicatrização de queimaduras cutâneas, uma menor opacidade é preferível possibilitando assim o acompanhamento visual do tecido lesado.

Os dados do presente estudo também estão de acordo com os de Soares et al. (2015), que mostraram que os hidrogéis à base de galactomanana e κ -carragenana armazenados ao longo de 90 dias sofreram uma variação no aumento da luminosidade (L^*) e diminuição na opacidade Y (%). Nos primeiros dias de estocagem, o estágio globular de dupla hélice inicial da formulação dos hidrogéis dispersa a luz com mais eficiência, diferentemente do que é observado com o envelhecimento do hidrogel. À medida que as cadeias poliméricas reagem com os íons livres de cálcio, essas hélices começam a se agregar e se organizar nas zonas de junção reduzindo a dispersão de luz, tornando o hidrogel mais transparente.

Os parâmetros a^* e b^* (Tabela 3) para as diferentes formulações de hidrogéis não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), com exceção do hidrogel (H), que apresentou uma variação para o parâmetro a^* de $-0,12 \pm 0,05$ para $-0,37 \pm 0,02$, fato este não notado macroscopicamente. Para as formulações contendo ou não as proteínas lactoferrina e Cramoll incorporadas. Foi verificado uma tendência do parâmetro a^* à coloração verde e do b^* ao amarelo. Estes resultados possibilitam uma padronização para possíveis réplicas dos hidrogéis analisados.

Medidas reológicas

As medições reológicas são úteis para descrever o comportamento de dispersões, pastas, géis e hidrogéis (Agoub et al., 2017; Quah et al., 2018), quando submetido a uma deformação ou força de cisalhamento, por exemplo, para aplicações nas indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêutica e médica.

Conforme já reportado por Soares et al. (2015) que analisaram hidrogéis de galactomanana e κ -carragenana com adição de CaCl_2 nas mesmas condições do presente trabalho, verificando que o hidrogel apresentava um comportamento sólido viscoelástico e, às vezes, um comportamento puramente elástico. Também foi confirmado que a adição de κ -carragenana adiciona a formulação uma característica de gel mais forte comparado ao gel contendo apenas galactomanana (Albuquerque et al., 2014). O presente estudo conseguiu mimetizar os hidrogéis previamente estudados (Figura 1a), confirmando a característica sólida e viscoelástica do hidrogel.

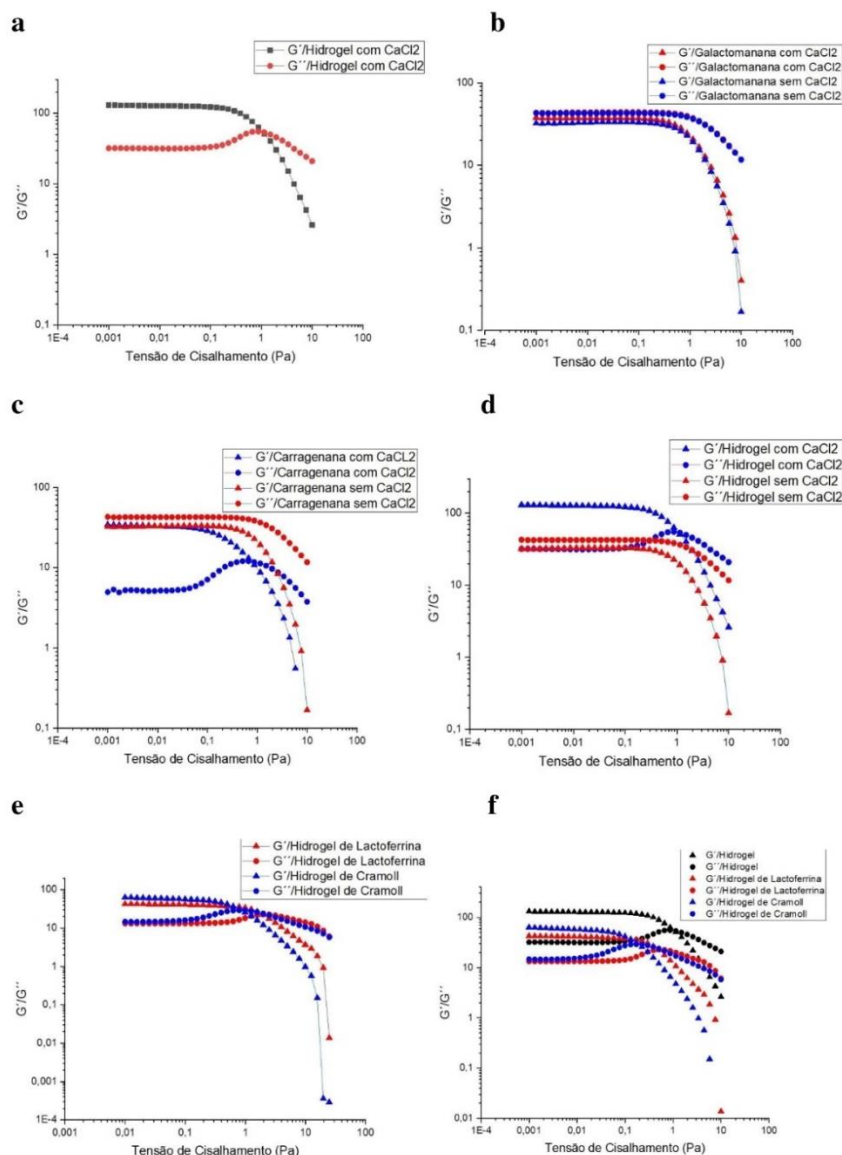


Figura 1. Medidas reológicas dos hidrogéis. Módulo elástico (G') e viscoso (G'') em função da tensão de cisalhamento (Pa), fluxo oscilatório dinâmico. a- hidrogel a base de galactomanana 1,7% (p/v) e k-carragenana 0,5% (p/v) acrescido de CaCl_2 . b- galactomanana 1,7 % (p/v) acrescida ou não de CaCl_2 . c- k-carragenana 0,5% (p/v) acrescido ou não de CaCl_2 . d- hidrogel a base de galactomanana 1,7% (p/v) e k-carragenana 0,5% (p/v) acrescido ou não de CaCl_2 . e- hidrogel + lactoferrina e hidrogel + Cramoll. f- hidrogel; hidrogel + lactoferrina e hidrogel + Cramoll.

A fim de elucidar a influência do CaCl_2 com os valores de rampa de amplitude dos hidrogéis, foi realizado testes oscilatórios em que os módulos elásticos G' (armazenamento de energia) e viscoso G'' (perda de energia), são monitorados em função da frequência oscilatória. Géis a base de galactomanana 1,7 % (p/v) (mesma concentração da formulação dos hidrogéis) com e sem CaCl_2 são mostrados na figura 1b. Os resultados apontam que não ocorre uma interação significativa da galactomanana com o CaCl_2 , fato este oposto à solução

de κ -carragenana 0,5% (p/v) (mesma concentração da formulação dos hidrogéis) (Figura 1c). A solução de κ -carragenana interagiu fortemente com o CaCl_2 , evento este que foi confirmado pela transição dos módulos $G'' > G'$, para $G' > G''$ no caso da solução de κ -carragenana (gel verdadeiro). Esses resultados corroboram com os reportados por Bui et al. (2019), Du et al. (2016) e Lundin et al. (2000), que observaram a gelificação de carragenanas na presença de sais KCl, NaCl ou CaCl_2 , devido a interação de cátions livres em solução com os grupos sulfatos carregados negativamente da κ -carragenana (Derkach et al., 2015). Uma vez solubilizadas, as carragenas do tipo Kappa formam, durante o resfriamento, uma estrutura molecular tipo dupla hélice e uma rede tridimensional reforçada pela presença de certos íons como cálcio e potássio (Nguyen et al., 2015).

Também é importante destacar que as carragenas apresentam sinergismo com alguns galactomananos e glucomananos (Kaya et al., 2015). A combinação com estes hidrocoloides potencializa a força de gel, reduz a sinérese e permite a obtenção de texturas mais elásticas. Pensa-se que a associação entre κ -carragenana e galactomananas ocorre através de regiões não substituídas do esqueleto do manano, que se presume que se ligam à hélice da carragenana (Dea et al., 1972; Miles et al., 1984). A adição de galactomanana extraída da *Gleditsia triacanthos* e *Sophora japonica* levou à formação de géis mais fortes, em comparação com κ -carragenana sozinha (Pinheiro et al., 2011).

Essa forte interação também foi observada no trabalho de Soares et al. (2015), que confirmam que a mistura de galactomanana 1,7% (p/v) e κ -carragenana 0,5 % (p/v) na presença de CaCl_2 , produzem um composto com características físicas desejadas, para obtenção de hidrogéis. Corroborando deste modo com os dados apresentados neste trabalho.

Após a confirmação da interação do CaCl_2 com o polissacarídeo κ -carragenana, foi observado a interação do sal em questão com a formulação do hidrogel [1,7% (p/v) e κ -carragenana 0,5 % (p/v)]. Um ensaio de rampa de amplitude, confirmou a necessidade do CaCl_2 para que a formulação do hidrogel obtivesse características físicas desejadas ($G' > G''$) (Figura 1d).

A adição de proteínas (lactoferrina ou Cramoll) aos hidrogéis do presente estudo não alteraram a sua natureza sólida viscoelástica com $G' > G''$ (Figura 1e). Além disso, foi verificado que a adição de tais proteínas diminuiu o ponto de transição dos módulos $G' > G''$ para $G'' > G'$. Provavelmente as microfissuras individuais de cada hidrogel no decorrer do cisalhamento formam macro fendas contínuas que percorrem toda a amostra ou toda a lacuna

de cisalhamento do sistema de medição, e assim o material começa a fluir após exceder este ponto, onde G'' é maior que G' porque o ponto de cruzamento $G' = G''$ foi excedido.

A adição de lactoferrina ou Cramoll proporcionou uma menor resistência a tensão de cisalhamento, quando comparado ao hidrogel sem as biomoléculas (Figura 1f). No qual, a tensão necessária para que os grupos H, HL e HC, chegassem ao ponto de $G'' > G'$, foram de: $1,01 \times 10^{-4}$ Pa, $0,517 \times 10^{-4}$ Pa e $0,213 \times 10^{-4}$ Pa, respectivamente. Na verdade, a Cramoll diminuiu mais do que a lactoferrina o coeficiente de viscosidade, que está diretamente associado à viscosidade da solução. Esses resultados corroboram com os achados por Sousa et al. (2019), que também observaram uma diminuição no coeficiente de viscosidade de géis de galactomanana a 1,5% (p/v), quando adicionado a lectina frutalin.

3.5. Avaliação clínica e histológica do tratamento das queimaduras

No geral, todos os animais estavam clinicamente bem (mostrando comportamento normal e ingestão de comida e água) durante os experimentos. Não houve sangramento durante a cirurgia, assim como não houve lesões secundárias a pele dos animais, visto que o método utilizado (tração manual), é o mais recomendado, segundo Orgaes et al. (2007), o uso de dispositivos com lâminas geralmente causa essas lesões.

Tanto o grupo em tratamento como o grupo controle não apresentaram alterações estatisticamente significativas no peso corporal ao longo dos experimentos, mostrando que a analgesia foi adequada para a lesão causada. Conforme relatado por Steintraesser et al. (2005), os principais sinais de dor em animais de laboratório submetidos a procedimentos experimentais estão diretamente relacionados a mudanças de comportamento, sendo a anorexia um dos sinais mais significativos.

Os resultados deste estudo revelaram queimaduras térmicas de cor branca, sem bolhas, edema leve até o terceiro dia após a lesão (Figura 2a), com uma margem indistinta de eritema. Definição semelhante é relatada por Cai et al. (2014), que relataram queimaduras profundas de segundo grau e lesões apresentando cor pálida com margens indistintas de eritema, ao utilizar haste cilíndrica de 100 g com (1 cm de diâmetro) aquecida a 100 °C, por 5 segundos, com o próprio peso da haste. Os hidrogéis a base de galactomanana e κ -carragenana imobilizados ou não com Cramoll e lactoferrina, funcionaram como tampões hemostáticos, protegendo a ferida da perda de fluidos e da contaminação microbiana.

A água transferida para a área queimada mostrou-se benéfica para a cicatrização, pois o resfriamento de feridas causado por queimadura é uma medida de urgência nas práticas clínicas e experimentais. Os hidrogéis conseguem transferir a umidade para a ferida (Figura

2b), através da sua rede tridimensional com alta porcentagem de água, o que promove uma hidratação, facilitando assim a sua contração (parâmetro para avaliar a cicatrização).

A formação de uma crosta espessa e seca foi observada nas bordas da lesão a partir do 3 dia após a indução da queimadura (Figura 2c), confirmando que as contrações das lesões cutâneas ocorreram de forma centrípeta a partir das bordas da lesão, causada pela ação dos miofibroblastos presentes no local (Zhou et al., 2020). Com passar do tempo a crosta amplia-se até atingir toda superfície da queimadura, por volta de 7 dias (Figura 2d).

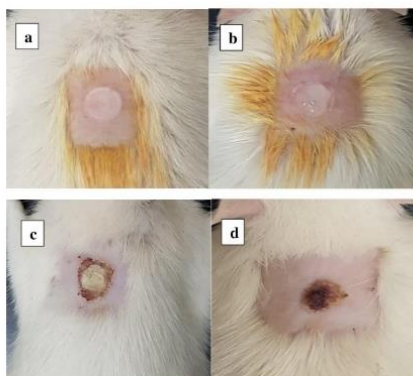


Figura 2 – Evolução clínica observada nas queimaduras térmicas de segundo grau em ratos Wistar macho. a - Queimadura obtida com barra de 10 mm de diâmetro, com presença de edema leve; b - Tratamento de queimadura térmica usando 100 µl de hidrogel; c- Tecido lesionado 3 dias após a indução da queimadura, presença de crosta fina e seca com coloração homogênea e desprendimento discreto nas bordas; d - Tecido lesionado 7 dias após a indução da queimadura, presença de crosta seca em toda região da lesão, com coloração mais escura no centro.

O processo de cicatrização das queimaduras tratadas topicamente com as diferentes formulações de hidrogéis apresentaram clinicamente, uma melhor resposta quando comparado com o grupo controle (Figura 3). As imagens macroscópicas evidenciaram uma melhor cicatrização dos grupos HL e HLC, mostrando que o fechamento da ferida nestes grupos ocorreu mais rapidamente. O fechamento mais rápido da ferida facilita o evento biológico de cicatrização ao unir as bordas da ferida (Ranjbar-Mohammadi et al., 2016).

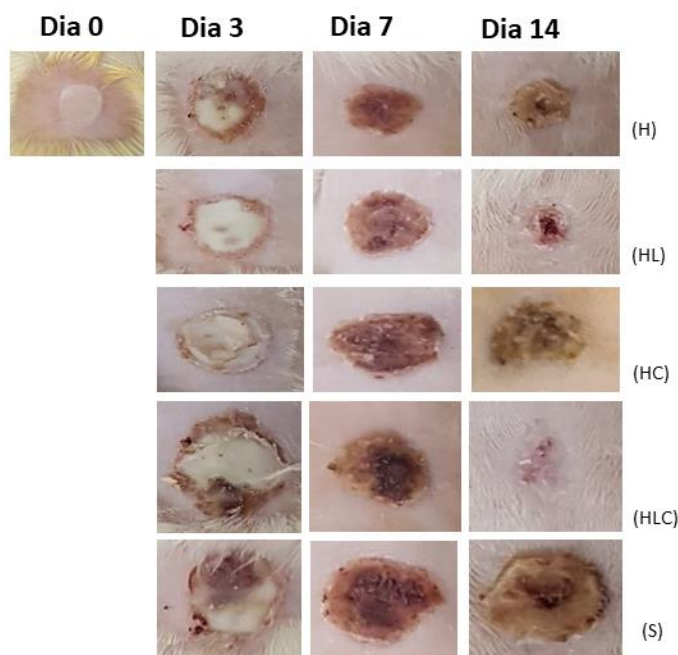


Figura 3 – Avaliação clínica da cicatrização de queimaduras de segundo grau em ratos Wistar machos. Tratamento nos intervalos de: 3, 7 e 14 dias. Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Cramoll (HC); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC) e controle negativo de Salina (S).

A área da lesão diminuiu gradualmente com o progresso do tempo de cicatrização nos cinco grupos, onde o grupo S (controle negativo) obteve a menor contração comparado aos outros quatro grupos de tratamentos com hidrogéis (Figura 4): H-32,85 %; HL-45,49 %; HC-36,05 %; HLC-66,10 % e S-20,76 %. Merecem destaque os grupos HL e HLC que obtiveram uma maior taxa de contração, confirmando assim a análise macroscópica das lesões para os respectivos grupos e indicando que a Lactoferrina e a Cramoll têm efeito indutor na contração da lesão.

Esses resultados são consistentes com estudos por Thanusha et al. (2018), que demonstrou a eficácia dos hidrogéis no tratamento de queimaduras dérmicas em modelo de ratos Wistar. Revelando que a aplicação do hidrogel composto por biopolímero de gelatina e glicosaminoglicanos (ácido hialurônico e sulfato de condroitina), incorporados com ácido asiático (um triterpenóide) e nanopartículas (óxido de zinco e óxido de cobre) promove a contração da queimadura e induz a cicatrização. Esses dados confirmam que além do veículo hidrogel apresentar características que otimizam a cicatrização das queimaduras, outro fator relevante é sua composição, que no presente estudo pode-se destacar os efeitos inerentes dos polissacarídeos, que parecem contribuir na cura promovendo uma cicatrização mais rápida das queimaduras em comparação ao grupo S. Esses resultados corroboram com os achados de

Sousa et al. (2019) que confirmam a otimização da cicatrização de feridas cutâneas com a aplicação de um gel a base de galactomanana 1,5% (p/v). A galactomanana têm ganhado destaque como um polissacarídeo natural útil no tratamento de feridas cutâneas, tanto para proteger dos danos externos quanto acelerar a cicatrização das lesões (Siqueira et al., 2015; Bedian et al., 2017).

Como observado na figura 4 as biomoléculas Cramoll e lactoferrina otimizam a contração das lesões, especialmente quando utilizadas em conjunto. Estudos utilizando lactoferrina como tratamento em queimaduras de segundo grau em suínos revelaram um aumento significativo na taxa de reepitelização da ferida, aumento da viabilidade celular, inibição da apoptose e aumento da proliferação de queratinócitos (Tang et al., 2010). Istiati et al. (2019), apontaram que a utilização local de lactoferrina em concentrações de 40 µg/ml em gengivas lesionadas, aceleraram o processo de cicatrização, aumentando a expressão de fibroblastos e fator de crescimento endotelial vascular.

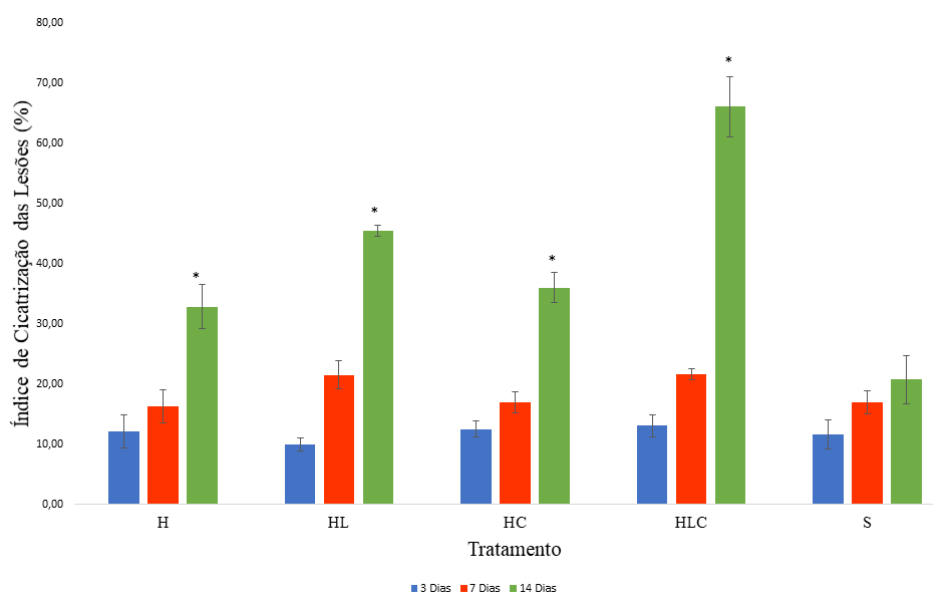


Figura 4 – Percentagem de contração das queimaduras nos intervalos de tempo 3,7 e 14 dias, tratados com hidrogéis e controle negativo (salina). Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Cramoll (HC); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC) e controle negativo de Salina (S). O ILC (%) foi expressa como média $\pm$ erro padrão. (*) representação da diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de tratamento e o grupo S (controle negativo).

Foi reportado que filmes de galactomanana contendo a lectina Cramoll 1,4 reduzem o tempo de cicatrização com maior contração das feridas, apresentando reepitelização em torno de 11 dias (Albuquerque et al., 2017). Um outro estudo com o objetivo de avaliar o tratamento

de queimaduras de segundo grau em ratos wistar, demonstrou que a aplicação tópica regular de um hidrogel a base de carbopol contendo Cramoll 1,4 acelerou as etapas de granulação, reepitelização e retração do processo de cicatrização (Pereira et al., 2012).

Deste modo podemos concluir que com as características peculiares da lactoferrina e da Cramoll 1,4, frente a uma gama de patologias e uma possível otimização do processo de cicatrização de feridas e queimaduras, somadas as características que o veículo hidrogel proporciona ao microambiente da lesão, fica evidente uma associação entre as biomoléculas e o hidrogel, criando assim um ambiente favorável para cicatrização de queimaduras térmicas de segundo grau.

Os resultados histopatológicos indicaram que o procedimento de realização das queimaduras térmicas atingiu as terminações nervosas, folículos capilares e glândulas sudoríparas causando destruição parcial ou total, consistentes com relatos de vários autores (Meng et al., 2016; Mataro et al., 2017; Vasconcellos et al., 2018), confirmando assim a aquisição de queimaduras profundas de segundo grau com base na observação de autólise total da derme e da epiderme, sem atingir a hipoderme.

Segundo Buchstein et al. (2009) e Moor et al. (2009), a reação inflamatória aguda é caracterizada pelo exsudato com presença de células polimorfonucleares, assim como possíveis sinais de sangramento na derme, presença de fibrina e infiltrado inflamatório discreto (albumina /leucócito/macrófago). Foi observada na lesão térmica no 3º dia após indução a presença de exsudato inflamatório com intensa reação inflamatória. A reação inflamatória classificada como moderada perdurou até o 7º dia, com melhora significativa no 14º dia (classificada como reação inflamatória discreta) para os grupos tratados com hidrogéis, ganhando destaque o grupo tratado com hidrogel com adição de lactoferrina e Cramoll (HLC). Resultados semelhantes foram observados por Orgaes et al. (2007), que também descrevem a ocorrência no grupo controle, tratado com solução salina, um processo inflamatório agudo no sexto dia de avaliação. Em relação ao grupo controle, a resposta inflamatória moderada continuou no 14º dia.

O material proteico amorfo foi encontrado do 3º até o 7º dia, com declínio no 14º dia para todos os grupos tratados com os hidrogéis com exceção do grupo S (Tabela 4). A diminuição do número de neutrófilos que se infiltram nos tecidos ao redor da lesão é essencial para prevenção de necrose secundária, embora os neutrófilos desempenhem um papel essencial no controle da infecção imediatamente após o ferimento, é relatado que a infiltração persistente de neutrófilos contribui para a ferida crônica (Vakoc et al., 2009; Inoue et al., 2016), fato este encontrado no grupo S. Além disso, a diminuição da infiltração de neutrófilos

na derme foi correlacionada com cicatrização mais rápida e redução de cicatrizes em queimaduras de suínos (wang, 2010), enquanto a depleção de neutrófilos em camundongos após a injeção com soro de neutrófilo de coelho anti-camundongo acelerou significativamente a reepitelização de feridas cutâneas (Dovi et al., 2003).

Tabela 4. Análise histopatológica do grau de infiltrado inflamatório na derme, material proteico amorfo e necrose na pele após queimadura térmica profunda de segundo grau. As amostras foram obtidas nos dias 3, 7 e 14 após a indução da queimadura.

Tempo	Animal	Infiltrado inflamatório na derme					Material proteico amorfo					Necrose				
		S	HL	H	HC	HLC	S	HL	H	HC	HLC	S	HL	H	HC	HLC
3º dia	1	+++	+	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++
	2	++	+	++	++	++	+++	++	+++	-	+++	+++	++	+++	+++	+++
	3	-	++	-	-	-	-	++	-	-	+++	-	++	-	-	+++
7º dia	1	++	+	+	++	-	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	++	-
	2	+	++	++	++	++	++	++	+++	+	+	+++	+++	+++	++	++
	3	-	+	+	+	++	-	+++	+	+	+	-	+++	+++	-	++
14º dia	1	+++	+	+	+	-	++	+	+	+	-	++	-	-	++	-
	2	+++	+	+	+	-	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	++	-	-	-	-

A intensidade dos sinais clínicos foi pontuada como: - = ausente; + = leve, ++ = moderado, +++ = forte. Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Cramoll (HC); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC) e controle negativo de Salina (S).

Vários dias após a queimadura, a necrose secundária ao redor da lesão, é um processo que aumenta não apenas o tamanho, mas também sua profundidade nos tecidos. Uma pequena queimadura de espessura parcial vista logo após a lesão pode progredir para uma queimadura de espessura total durante 24 a 48 horas. Limitar a extensão da necrose secundária pode melhorar os resultados de cicatrização. Assim, a preservação da zona de estase é importante para limitar a necrose tecidual secundária observada nas conversões de queimaduras (Inoue et al., 2018), no entanto, nenhum tratamento atual é confiável para limitar esse processo (Dugan et al., 2010).

Fatores como perda de fluxo sanguíneo para a derme ao redor da área queimada e a ativação de neutrófilos proporcionada pelo processo inflamatório, induzem ao desenvolvimento de necrose tecidual (Ehrlich et al., 1987; Bohr et al., 2013). Características semelhantes também foram observadas em nosso trabalho. Como observado na tabela 4, a necrose foi verificada no 3º dia e ainda se encontrava presente no 7º dia, mas assim como para

o infiltrado inflamatório e o material proteico amorfo que diminuiu no 14º dia para todos os grupos tratados com os hidrogéis, principalmente o grupo HLC, com exceção do grupo S. Estes resultados indicam que os hidrogéis, principalmente aquele contendo lactoferrina e Cramoll minimizam o processo inflamatório e consequentemente a necrose tecidual. Resultados semelhantes foram reportados por Pereira et al. (2012), que verificaram a utilização de hidrogel à base de carbopol contendo Cramoll 1,4 no tratamento de queimaduras de segundo grau, assim como Tang et al. (2010), que identificaram que a lactoferrina estimula a função dos queratinócitos, a reepitelização da pele e inibe a apoptose celular, podendo assim impedir o desenvolvimento de necrose durante o tratamento de queimaduras.

A cicatrização de queimaduras é um processo doloroso que está associado ao desenvolvimento de eritemas e tecido fibroso, sendo modulado pelo fator de crescimento transformador (TGF) (Engrav et al., 2007). A queimadura a princípio é estéril, mas o tecido necrótico em pouco tempo se torna colonizado por bactérias endógenas e exógenas, produtoras de proteases, que levam à liquefação e separação da escara, dando lugar ao tecido de granulação responsável pela cicatrização da ferida, com alta capacidade de retração e desenvolvimento de tecido fibroso (Sheridan, 2003). A superprodução de tecido fibroso diminui sua flexibilidade, promove o aparecimento de doenças associadas, como queloides e esclerodermia e menor resistência à luz ultravioleta, podendo ainda causar a ausência do crescimento dos folículos capilares (Trojanowska, 2012; Birbrair et al., 2013). Koganti et al. (2016), estudando camundongos murinos, observaram uma perturbação na configuração de proteínas da matriz extracelular, pelo aumento da fibrose induzida por queimaduras. Assim, o controle da fibrose é indispensável para uma homeostase do tecido lesionado. Na tabela 5 foi observado o desenvolvimento de tecido fibroso acentuado do terceiro ao sétimo dia, em todos os grupos tratados com os hidrogéis, com uma redução significativa no 14º dia, principalmente para o grupo HLC, com exceção do grupo controle.

Foi observado também que a lesão da epiderme diminuiu enquanto a área de reepitelização aumentou para todos os grupos tratados com os hidrogéis.

Tabela 5. Análise histopatológica do grau de fibrose, epiderme lesada e área de reepitelização da pele após queimadura térmica profunda de segundo grau. As amostras foram obtidas nos dias 3, 7 e 14 após a indução da queimadura

Tempo	Animal	Fibrose					Epiderme lesada					Área de reepitelização				
		S	HL	H	HC	HLC	S	HL	H	HC	HLC	S	HL	H	HC	HLC
3º dia	1	+++	-	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
	2	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	-	+++	-	-	-	-	-
	3	-	++	+	-	+++	-	++	-	-	+++	-	-	-	-	-
7º dia	1	+++	+++	+++	++	-	+++	++	+++	++	-	-	-	-	-	-
	2	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	++	++	-	-	-	-	-
	3	-	+++	+++	-	++	-	++	+++	-	++	-	-	-	-	-
14º dia	1	++	+	+	+	+	++	-	+	+	-	-	+	+	+	++
	2	-	+	+	+	+	++	+	++	++	-	-	++	+	+	+
	3	++	+	+	+	-	++	+	++	++	-	-	+	+	+	++

A intensidade dos sinais clínicos foi pontuada como: - = ausente; + = leve, ++ = moderado, +++ = forte.

Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Cramoll (HC); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC) e controle negativo de Salina (S).

A formação de epitélio, tecido conjuntivo, resposta inflamatória, proliferação de fibroblastos e queratinização podem ser vistas nas figuras 5 e 6.

A análise histopatológica permitiu acompanhar a progressão do processo de cicatrização das queimaduras que foram tratadas com os hidrogéis. Parâmetros como a maturação da epiderme, formação de tecido conjuntivo, resposta inflamatória, proliferação de fibroblastos e queratinização foram avaliados (Figuras 5 e 6). Pode-se identificar que havia menos folículos pilosos residuais, desnaturação de colágeno mais grave, necrose de tecido mais profunda e infiltrados inflamatórios mais óbvios nas queimaduras do grupo de controle em comparação com os grupos tratados com os hidrogéis. A coloração das lâminas histológicas com o corante tricrômico de Masson foi considerada um bom indicador da profundidade do ferimento por queimadura, confirmando que a mesma se tratava de uma lesão térmica de segundo grau.

O estágio de inflamação no processo de cicatrização da queimadura ocorre logo após a lesão, de modo que os componentes do sistema imunológico atuam removendo tecidos danificados e bactérias (Caliari-Oliveira et al., 2016; Eitas et al., 2017). No 3º dia após a realização da queimadura, foi observado o processo inflamatório com prevalência de neutrófilos, poucos fibroblastos, presença do tampão hemostático, substância fundamental amorfa e material de secreção, não havendo evidência de colágeno e cicatrização do epitélio para ambos os grupos (Figura 5). As reações imunológicas com prevalência de neutrófilos ocorreram até o 7º dia, contudo, os grupos que foram tratados com os hidrogéis apresentaram uma redução significativa do infiltrado inflamatório, com destaque para o grupo HLC.

O aumento na área da queimadura é um processo de reação comum do tecido à lesão formada. Com o passar do tempo, essa gravidade diminui e a cura, juntamente ao processo de cicatrização, ocorre exponencialmente após 7 dias (Jeschke et al., 2020). Essa tendência foi seguida para todos os grupos de tratamento com hidrogéis com exceção do grupo controle.

A evolução positiva do processo cicatricial das queimaduras, pode ser atribuída a natureza elástica dos hidrogéis, que estando totalmente hidratados após a aplicação, minimizam a irritação nos tecidos circundantes. Foi demonstrado que o alto teor de água dos hidrogéis pode ajudar no alívio da dor (Shulman, 1960), na diminuição da lesão celular (Ofeigsson, 1959), na estabilização do sistema sanguíneo (Wiedeman e Brigham, 1971), na redução do edema (Jakobsson e Arturson, 1985), na otimização da cicatriz (Cuttle et al., 2008) e na alteração favorável da resposta imunológica (Ju et al., 2014).

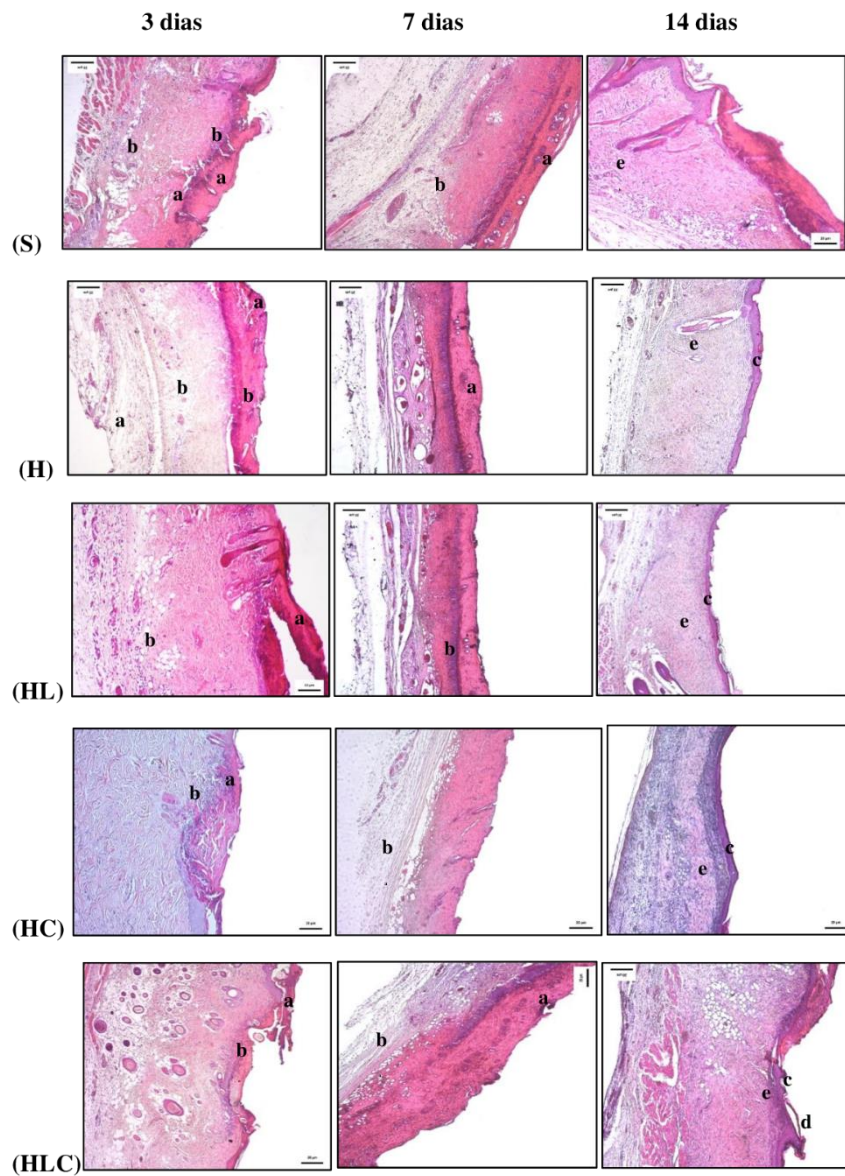


Figura 5. Tecido epitelial de ratos dos grupos de 3, 7 e 14 dias, submetidos a tratamento térmico de queimaduras de segundo grau. Coloração H&E. Barras de escala = 20 µm. Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Cramoll (HC); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC) e controle negativo de Salina (S). (a) formação de tampão; (b) presença de infiltrado inflamatório; (c) área de reepitelização; (d) queratinização e (e) redução de tampão e infiltrado inflamatório.

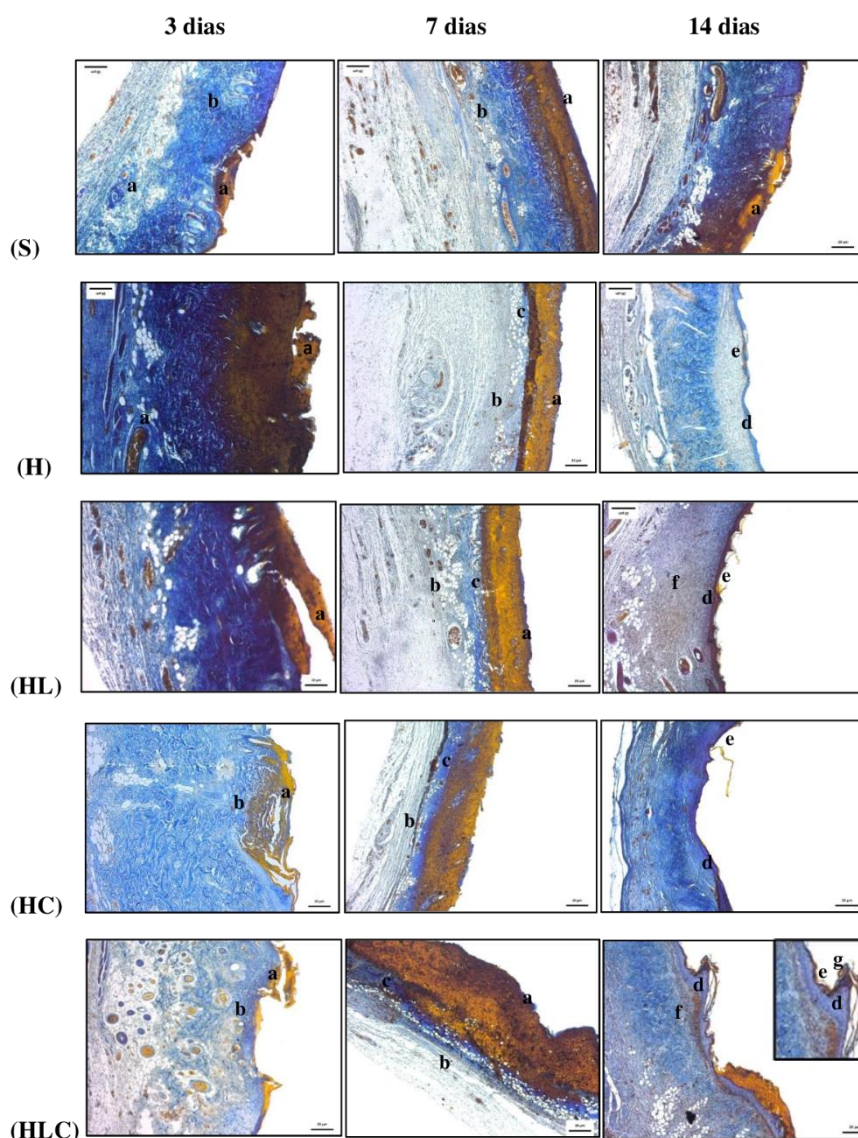


Figura 6. Tecido epitelial de ratos dos grupos de 3, 7 e 14 dias, submetidos a tratamento térmico em queimaduras de segundo grau. Coloração tricrômico de Masson. Barras de escala = 20 μ m. Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana (H); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina (HL); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Cramoll (HC); Hidrogel de κ -carragenana/galactomanana + Lactoferrina + Cramoll (HLC) e controle negativo de Salina (S). (a) formação de tampão; (b) presença de infiltrado inflamatório; (c) fibras colágenas; (d) reepitelização; (e) queratinização; (f) redução de tampão e infiltrado inflamatório e (g) acantose focal.

No 7º dia, as áreas de lesão estavam menores, com algumas diferenças particulares para os grupos que foram tratados com os hidrogéis, tais como uma maior uniformidade epitelial, apresentando material mais compacto e fibras colágenas mais organizadas (Figuras 5 e 6). Além disso, o infiltrado inflamatório ainda se apresentava moderado com tecido conjuntivo mais fibroso, porém com um aumento do número de fibroblastos. Essas características podem ser traduzidas como uma melhor qualidade da cicatriz em

desenvolvimento que está dando espaço para o crescimento de fibras colágenas no local (Maligieri et al., 2017). No 14º dia após a lesão, os grupos testados apresentaram maior grau de cicatrização em relação ao controle, com destaque para o grupo HLC, confirmados pela avaliação macroscópica (Figura 3) e retração da lesão (Figura 4). As análises histológicas comprovaram que, com exceção do grupo controle, os grupos tratados com os hidrogéis, especialmente o HLC, apresentou reepitelização com acantose focal, discreto material inflamatório, destacando a presença de células linfocíticas, que indicam claramente que o HLC otimizou uma cicatrização mais rápida, prevenindo uma fase inflamatória prolongada.

Em um estudo envolvendo queimaduras de córnea provocada por álcali, Ke et al. (2015) avaliaram a eficácia de um hidrogel preparado à base de polissacarídeo, D-manose e D-glicose com razão molar de 6:1, derivado de *Hardy orchid* contendo células-tronco mesenquimais, e concluíram que este biomaterial recuperou o epitélio da córnea, suprimiu a inflamação, e aliviou sua opacidade.

Morsi et al. (2014), relataram que hidrogéis à base de quitosana e carbopol foram capazes de acelerar o processo de cicatrização de queimaduras dérmicas de segundo grau profundas, frente a um curativo comercial bastante utilizado pela clínica médica (Dermazin®).

Aragão-Neto et al. (2017), reportaram o efeito curativo de um hidrogel à base de quitosana e o polissacarídeo extraído da goma do Cajueiro (policaju), associada ou não à laser de baixa intensidade, cuja terapia contribuiu para uma cicatrização e modulação mais eficaz do processo inflamatório de lesões cutâneas.

Ghissi et al. (2020), analisaram à aplicação tópica de um gel de polissacarídeo extraído das sementes de *Pimpinella anisum* nas lesões de queimadura a laser, e constataram que sua utilização acelera a contração da ferida, a neovascularização, aumento da eliminação de radicais livres, redução da inflamação, controle da infecção, reepitelização e remodelação após o 7º dia de tratamento.

Todos esses resultados corroboram com os dados deste trabalho, no que diz respeito à cura de lesões que empregam polissacarídeos em associação com diferentes terapias, biomoléculas ou células. De maneira geral, os hidrogéis aqui testados otimizaram a transição das etapas de inflamação e granulação tecidual do processo de cicatrização e melhoraram a formação madura da cicatriz e a remodelação da matriz extracelular, levando a uma contratura e fechamento mais rápido das queimaduras.

Também é importante ressaltar que o reparo da queimadura observado na avaliação microscópica, confirmada pela contração observada na análise macroscópica, foi importante para a validação destes hidrogéis, principalmente a formulação HLC, como agentes curativos.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, foi possível obter hidrogéis estáveis compostos por 1,7% (p/v) de galactomanana e 0,5% (p/v) de κ -carragenana, com 0,2 M de CaCl_2 a pH 5,0, acrescidos ou não de lactoferrina e/ou Cramoll. No estudo de estabilidade, não houve mudanças significativas no pH e nenhuma contaminação microbiana ao longo do tempo de estocagem de 90 dias a 4 °C. No entanto, houve um aumento na luminosidade (L^*) e diminuição da opacidade ($Y\%$), para o hidrogel sem a incorporação das biomoléculas. Os estudos reológicos confirmaram a natureza de gel viscoelástico dos hidrogéis, mantendo esta característica mesmo após adição das proteínas estudadas. Também foi possível confirmar que o CaCl_2 reage com a κ -carragenana e não com a galactomanana na formulação dos hidrogéis. Nos ensaios *in vivo*, as análises macroscópicas revelaram queimaduras térmicas de cor branca, sem bolhas com leve edema, cicatrização centrípeta com recobrimento de crosta no 7º dia, conjuntamente com a retração da lesão, cujos resultados foram mais expressivos para o grupo que foi tratado com o hidrogel contendo lactoferrina e Cramoll. Corroborando com as análises macroscópicas e de retração das queimaduras, as análises histopatológicas confirmaram que a aplicação tópica regular dos hidrogéis, especialmente a formulação HLC, para o tratamento de queimaduras cutâneas de segundo grau, acelerou os processos de granulação, reepitelização e retração da lesão. Deste modo, podemos concluir que os hidrogéis que foram testados neste trabalho, possuem propriedades físicas estáveis e curativas adequadas que podem ser uma alternativa eficaz para substituir curativos sintéticos na cicatrização de queimaduras, com potencial de aplicação na clínica médica e cosmética.

Referências

ABDULLAHI, A.; AMINI - NIK, S.; JESCHKE, M. G. Animal models in burn research. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, Sept 2014, Vol.71(17), p.3241(15)

AGNIESZKA CISZEK. Variability of skin pH after the use of different collagen gels. **Journal of Cosmetic Dermatology**. Volume16, Issue 4 December 2016, Pages 531-536

AGOUB A. AGOUB; XUEHAI XIE; EDWIN R. MORRIS. Enhanced self-association and “weak gel” rheology of microdispersed oxidised cellulose (MDOC) by low concentrations of guar gum. **Hydrocolloids Food**, 73, 229-234. (2017).

ALBUQUERQUE, P.B.S; BARROS, W.; SANTOS, G.R.C; CORREIA, M.T.S.; MOURÃO, P.A.S; TEIXEIRA, J.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. **Carbohydrate polymers**, 15 April 2014, Vol.104, pp.127-134

ALBUQUERQUE, P.B.S; SOARES, P.A.G; ARAGÃO-NETO, A.C.; ALBUQUERQUE, G.S; SILVA, L.C.N; LIMA-RIBEIRO, M.H.M; SILVA NETO, J.C.; COELHO, L.C.B.B; CORREIA, M.T.S; TEIXEIRA, J.A.C; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **International journal of biological macromolecules**, September 2017, Vol.102, pp.749-757

ANDRADE, C.T; AZERO, E.G; LUCIANO, L; GONÇALVES, M.P. Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. **International journal of biological macromolecules**, 1999, Vol.26(2), pp.181-185

ARAGÃO-NETO, A.C; SOARES, P.A.G; LIMA-RIBEIRO, M.H.M; CARVALHO, E.J.A; CORREIA, M.T.S; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Combined therapy using low level laser

and chitosan-polycaprolactone hydrogel for wound healing. **International journal of biological macromolecules**, February 2017, Vol.95, pp.268-272

ATWELL, K.; BARTLEY, C.; CAIRNS, B.; CHARLES, A. The epidemiologic characteristics and outcomes following intentional burn injury at a regional burn center. **Burns**, In press, 24 August 2019.

BEDIAN, L.; RODRÍGUEZ, A.M.V.; VARGAS, G.H.; PARRA-SALDIVAR, R.; IQBAL H.M.N. Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – A review, **Int. J. Biol. Macromol.** 98 (2017) 837–846. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.048.

BIRBRAIR, A.; ZHANG, T.; WANG, Z.M.; MESSI, M.L.; MINTZ, A.; DELBONO, O. Type-1 pericytes participate in fibrous tissue deposition in aged skeletal muscle, **Am. J. Physiol.: Cell Physiol** 305 (2013) 1098–1113

BOHR, S.; PATEL, S.J.; SARIN, D.; IRIMIA, D.; YARMUSH, M.L.; BERTHIAUME, F. Resolvin D2 prevents secondary thrombosis and necrosis in a mouse burn wound model. **Wound Repair Regen** 2013; 21:35–43.

BOKKHIM, H., BANSAL, N., GRØNDAHL, L., BHANDARI, B., (2013). Physico- 711 chemical properties of different forms of bovine lactoferrin. **Food Chemistry** 712 141(3), 3007-3013.

BOUHADIR, KH.; ALSBERG, E. DJ MOONEY. Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents, **Biomaterials**, 22, 2625 (2001a).

BOUHADIR, KH.; LEE, KY.; ALSBERG, E. Degradation of Partially Oxidized Alginate and Its Potential Application for Tissue Engineering, **Biotechnol. Prog**, 17, 945 (2001b).

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portal do Governo Brasileiro**. Terça, 04 de Julho de 2017.

BUCHSTEIN N, HOFFMANN N, SMOLA H, ET AL. Alternative proteolytic processing of hepatocyte growth factor during wound repair. **Am J Pathol**. 2009; 174:2116– 28.

BUI, VIET TNT; NGUYEN, BACH T.; RENOU, FREDERIC; NICOLAI, TACO. Reologia e microestrutura de misturas de iota e kappa-carragenina. **Hidrocoloides alimentares**. Volume 89, abril de 2019, páginas 180-187

CAI, E. Z.; ANG, C. H.; RAJU, A.; TAN, K. B.; HING, E. C. H.; LOO, Y.; WONG, Y. C.; LEE, H.; LIM, J.; MOOCHHALA, S. M.; HAUSER, C. AE.; LIM, T. C. Creation of Consistent Burn Wounds: A Rat Model. **Archives of plastic surgery**, 01 July 2014, Vol.41(4), pp.317-324

CALIARI-OLIVEIRA, C.; YAOCHITE, J.N.U.; RAMALHO, L.N. Z.; PALMA, P.V.B.; CARLOS, D.; QUEIRÓZ CUNHA, F.; DE SOUZA, D.A.; FRADE, M.A.C.; COVAS, D. T.; MALMEGRIM, K.C.R.; OLIVEIRA, M.C.; VOLTARELLI, J.C. Xenogeneic Mesenchymal Stromal Cells Improve Wound Healing and Modulate the Immune Response in an Extensive Burn Model. **Cell transplantation**, 01 February 2016, Vol.25

COELHO, L. C. B. B; SILVA, P. M. S.; LIMA, V. L. DE M.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEAO, T. H.; CORREIA, M. T. S. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017, Vol.2017.

CUTTLE, L.; KEMPF, M. KRAVCHUK, O. The optimal temperature of first aid treatment for partial thickness burn injuries, **WOUND REPAIR REGEN**, 16, 626 (2008).

DA CUNHA, C.R.A.; DA SILVA, L.C.N.; ALMEIDA, F.J. F; FERRAZ, M.S.; VAREJÃO, N.; CARTAXO, M.F.S.; DE MIRANDA, R.C.M.; DE AGUIAR, F.C.A.; SANTOS, N.P. S.; COELHO, L.C. B. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; CORREIA, M.T.S. Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant Cratylia mollis Lectin Expressed in Escherichia coli. **Frontiers in Microbiology**, 2016, Vol.7

DANG, L.; HUYNH, N.; PHAM, N.; NGUYEN, C.; VU, M.; DINH, V.; LE, V.; TRAN, N. Injectable nanocurcumin-dispersed gelatin-pluronic nanocomposite hydrogel platform for burn wound treatment. **Bulletin of Materials Science**, 2019, Vol.42(2), pp.1-10

DEA, I.C.M.; MCKINNON, A.A.; REES, D.A. Tertiary and quaternary structure in aqueous polysaccharide systems which model cell wall cohesion: Reversible changes in conformation

and association of agarose, carrageenan and galactomannan. **Journal of Molecular Biology**, 68 (1972), pp. 153-172

DERKACH, S.R.; ILYIN, S.O.; MAKLAKOVA, A.A.; KULICHIKHIN, V.G.; MALKIN, A.Y. The rheology of gelatin hydrogels modified by [kappa]-carrageenan. **LWT - Food Science and Technology**, 2015, Vol.63(1), p.612(8)

DOMINIQUE, L. Overview of lactoferrin as a natural immune modulator. **J. Pediatr.** 173:10–15. 2016. (a)

DOVI, J.V.; HE, L.K.; DIPIETRO, L.A. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. **J Leukoc Biol** 2003; 73:448–55.

DU, L.; BRENNER, T.; XIE, J.; MATSUKAWA, S.O. A study on phase separation behavior in kappa/iota carrageenan mixtures by micro-DSC, rheological measurements and simulating water and cations migration between phases. **Food Hydrocolloids**. Volume 55, April 2016, Pages 81-88

DUGAN, A. L.; GREGERSON, K. A.; NEELY, A.; GARDNER, J.; NOEL, G. J.; BABCOCK, G. F.; HORSEMAN, N. D. (2010). Mice Treated with a Benzodiazepine Had an Improved Survival Rate Following *Pseudomonas aeruginosa* Infection. **Journal of Burn Care & Research**, 31(1), 1–12. doi:10.1097/bcr.0b013e3181cb8e82

EHRlich, H.P.; MACGARVEY, U.; MCGRANE, W.L.; WHITE, M.E. Ibuprofen as an antagonist of inhibitors of fibrinolysis in wound fluid. **Thromb Res** 1987; 45:17–28.

EITAS, T.; STEPP, W.; LONG, C.; RILEY, C.; CALLAHAN, J. S.Y.; GOUGH, P.; KNOWLIN, L.D.; ORTIZ-PUJOLS, S.; JONES, S.; MAILE, R.; HONG, Z.; BERGER, S. CAIRNS, B. Correction: Differential regulation of innate immune cytokine production through pharmacological activation of Nuclear Factor-Erythroid-2-Related Factor 2 (NRF2) in burn patient immune cells and monocytes. **PLoS One**, Nov 2017, Vol.12(11), p.e0187785

ELIAS, P.M. The epidermal permeability barrier: from the early days at Harvard to emerging concepts. **Soc. Invest. Dermatol.** 122, xxxvi–xxxix (2004).

EMBLETON, N.D., BERRINGTON, J.E., MCGUIRE, W., STEWART, C.J., CUMMINGS, S.P., (2013). Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine** 18(3), 143-149.

ENGRAV LH, GARNER WL, TREDGET EE. Hypertrophic scar, wound contraction and hyper-hypopigmentation. **J Burn Care Res** 2007; 28:593–7.

FAKHRI, SHAHIDI. Evaluation of antimicrobial properties of bovine lactoferrin against foodborne pathogenic microorganisms in planktonic and biofilm forms (in vitro). **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, 2020, Vol.15(3), pp.277-283

FERNANDES, M.P., N.M. INADA, M.R. CHIARATTI, F.F.B. ARAÚJO, F.V. MEIRELLES, M.T.S. CORREIA, L.C.B.B. COELHO, M.J.M. ALVES, F.R. GADELHA, A.E. VERCESI. Mechanism of Trypanosoma cruzi death induced by Cratylia mollis seed lectin. **J. Bioenerg. Biomembr.** 42 (2010) 69–78.

FRONTERA, L.S.; MOYANO, S.; QUASSOLLO, G.; LANFREDI-RANGEL, A.; RÓPOLO, A.S.; TOUZ, M.C. Lactoferrin and lactoferricin endocytosis halt Giardia cell growth and prevent infective cyst production. **Scientific reports**, 01 December 2018, Vol.8(1), pp.1-15

GARAVITO, J., MONCAYO-MARTÍNEZ, D., & CASTELLANOS, D. A. (2020). Evaluation of Antimicrobial Coatings on Preservation and Shelf Life of Fresh Chicken Breast Fillets Under Cold Storage. **Foods**, 9(9), 1203. doi:10.3390/foods9091203

GARAYOA, R.; YÁNEZ, N.; DÍEZ-LETURIA, M.; BES-RASTROLLO, M.; VITAS, A. I. (2016). Evaluation of Prerequisite Programs Implementation and Hygiene Practices at Social Food Services through Audits and Microbiological Surveillance. *Journal of Food Science*, 81(4), M921–M927. doi:10.1111/1750-3841.13258

GARCÍA-MONTOYA, I.A.; CENDÓN, T.S.; ARÉVALO-GALLEGOS, S.; RASCÓN-CRUZ, Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. **Biochimica et biophysica acta**. General subjects, March 2012, Vol.1820(3), pp.226-236

GHLISSI, Z.; KALLEL, R.; KRICHEN, F.; HAKIM, A.; ZEGHAL, K.; BOUDAWARA, T.; BOUGATEF, A.; SAHNOUN, Z. Polysaccharide from *Pimpinella anisum* seeds: Structural characterization, anti-inflammatory and laser burn wound healing in mice. **International journal of biological macromolecules**, 01 August 2020, Vol.156, pp.1530-1538

GIANNUZZI, L.; CONTRERAS, E.; ZARITZKY, N. Modeling the aerobic growth and decline of *Staphylococcus aureus* as affected by pH and potassium sorbate concentration. **J Food Prot.** 2016;62(4):356-362.

GRAM, L., RAVN, L., RASCH, M., BRUHN, J.B., CHRISTENSEN, A.B., GIVSKOV, M. Food Spoilage – Interactions between food spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2002; 78:79- 97.

HABIB, H.M., IBRAHIM, W.H., SCHNEIDER-STOCK, R., HASSAN, H.M. Camel milk lactoferrin reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts antioxidant and DNA damage inhibitory activities. **Food Chem.** 141 (1), 148–152, 2013.

HAHNE, J., ISELE, D., BERNING, J., & LIPSKI, A. (2018). The contribution of fast growing, psychrotrophic microorganisms on biodiversity of refrigerated raw cow's milk with high bacterial counts and their food spoilage potential. **Food Microbiology**. doi:10.1016/j.fm.2018.10.019

HEMMATI, A.; NAMJUYAN, F.; YOUSEFI, S.; HOUSMAND, G.; KHADEM HAGHIGHIAN, H.; REZAEI, A. The Healing Effect of N-Hexan- Dichloromethane Extract Root *Onosma Bulbotrichum* in Second Degree Burns. **World Journal of Plastic Surgery**, 2018, Vol.7(1), p.25-33

HEMMATI, A.A.; FOROOZAN, M.; HOUSHMAND, G.; MOOSAVI, Z.B.; BAHADORAN, M.; SHAKIBA, N. The topical effect of grape seed extract 2% cream on surgery wound healing. **Glob. J. Health Sci.** 7, 52–58. 2015.

HERNÁNDEZ, A.; PÉREZ-NEVADO, F.; RUIZ-MOYANO, S.; SERRADILLA, M.J.; VILLALOBOS, M.C.; MARTÍN, A. Spoilage yeasts: What are the sources of contamination

of foods and beverages. **International Journal of Food Microbiology**, 286 (2018), pp. 98-110

HUI, Z.; YING LI. A novel pH/temperature-responsive hydrogel based on tremella polysaccharide and poly(N-isopropylacrylamide). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Volume 586, 5 February 2020, Article 124270
ICMSF (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS). Microorganismos de los alimentos. 1. Técnicas de análisis microbiológico. Zaragoza: Acribia. 1994. 804p.

INOUE, V.Y.; YU, J.Y.; KURIHARA, G.T.; VASILYEV, G.A.; IBRAHIM, G.A.; OKLU, G.R.; ZHAO, G. G.; NAIR, G.A.; BROWN, G.D.; FISCHMAN, G.A.; TOMPKINS, G.R.; IRIMIA, G.D. Kidney and Liver Injuries After Major Burns in Rats Are Prevented by Resolvin D2. **Critical Care Medicine**, 2016, Vol.44(5), pp. e241-e252

INOUE, Y.; LIU, Y. M.; OTAWARA, M. A.; CHICO CALERO, I.; STEPHANIE NAM, A. Y. – M.; CHANG, P.; BUTLER, K. L.; NAZARIAN, R. M.; GOVERMAN, JEREMY; VAKOC, BENJAMIN J; IRIMIA, DANIEL. Resolvin D2 Limits Secondary Tissue Necrosis After Burn Wounds in Rats. **Journal of Burn Care & Research**, 2018, Vol. 39(3), pp.423-432

ISTIATI, I.; NIRWANA, I.; SURJONO, M.D.C.; SURBOYO, M.D.C. Role of lactoferrin fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor in gingival wounds. **Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University**, 2019, Vol.8(3), pp.38-45

JAKOBSSON, G ARTURSON O.P.; The effect of prompt local cooling on oedema formation in scalded rat paws, **Burns Incl Therm Inj**, 12, 8 (1985)

JAMAL, F.; QIDWAI, T.; SINGH, D.; PANDEY, P.K. Biocatalytic activity of immobilized pointed gourd (*Trichosanthes dioica*) peroxidase–concanavalin A complex on calcium alginate pectin gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Volume 74, Issues 1–2, January 2012, Pages 125-131

JANDÚ, J. J. B.; MORAES NETO, R. N.; ZAGMIGNAN, A.; DE SOUSA, E. M.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A.; DOS SANTOS CORREIA, M. T.; DA SILVA, L. C. N.

(2017). Targeting the Immune System with Plant Lectins to Combat Microbial Infections. **Frontiers in Pharmacology**, 8. doi:10.3389/fphar.2017.00671

JESCHKE, M.G.; VAN BAAR, M.E.; CHOUDHRY, M.A.; CHUNG, K.K.; GIBRAN, N.; LOGSETTY, S. Burn injury. **Nature Reviews**. Disease Primers, 2020, Vol.6(1)

JINGYI, N.; BOYING, P.; ZHENGKE, W.; QIAOLING, Hu. Construction of ordered structure in polysaccharide hydrogel: A review. **Carbohydrate Polymers**, Volume 205, 1 February 2019, Pages 225-235

JOYE I.J., MCCLEMENTS D.J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.** 2014; 19:417–427. doi: 10.1016/j.cocis.2014.07.002.

JU, H.; LEE, O.; MOON, B.; SHEIKH, F.; LEE, J.; KIM, J.; PARK, H.; KIM, D.; LEE, M.; KIM, S.; PARK, C.; LEE, H. Silk fibroin based hydrogel for regeneration of burn induced wounds. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 2014, Vol.11(3), pp.203-210

KAYA, A. O. W.; SURYANI, A.; SANTOSO J.; RUSLI, M. S. The Effect of Gelling Agent Concentration on the Characteristic of Gel Produced From the Mixture of Semirefined Carrageenan and Glukomannan. **International Journal of Sciences: Basic and Applied Research** (IJSBAR) ISSN 2307-4531, (2015).

KE, Y.; WU, Y.; CUI, X.; LIU, X.; YU, M.; YANG, C.O.; LI, X.K.E.Y. Polysaccharide Hydrogel Combined with Mesenchymal Stem Cells Promotes the Healing of Corneal Alkali Burn in Rats: e0119725. **PLoS ONE**, Mar 2015, Vol.10(3)

KIM, HL.; HONG, M.; KIM, SJ. Preparation and Characterization of Silk Fibroin/Gelatin Hybrid Scaffolds. **Polym. -Korea**, 35, 378 (2011).

KOGANTI, D; TANNOURI, S; LOTTO, C; MACARAK, E; UITTO, J; ROSENBLOOM, J. Characterization of fibrosis in burn wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, May 2016, Vol.136(5), pp. S129-S129

KORNHABER, R.L.; VISENTIN, D.; THAPA, D.K.; WEST, S.; HAIK, J.; CLEARY, M. Burn camps for burns survivors-Realising the benefits for early adjustment: A systematic review. **Burns**, In press, corrected proof, Available online 9 January 2019

KRAVCHENKO, A. O.; ANASTYUK, S. D.; SOKOLOVA, E. V.; ISAKOV, V.V.; GLAZUNOV, V. P.; HELBERT, W.; YERMAK, I. M. (2016). Structural analysis and cytokine-induced activity of gelling sulfated polysaccharide from the cystocarpic plants of *Ahnfeltiopsis flabelliformis*. **Carbohydrate Polymers**, 151, 523–534. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.05.086

KUMAR, M. S.; SRIPRIYA, R.; RAGHAVAN, H. V.; SEHGAL, P. K. Wound healing potential of *Cassia fistula* on infected albino rat model. **Journal of Surgical Research**, vol. 131, pp. 283-289, 2006.

LALEH, ASADI. An alginate–PHMB–AgNPs based wound dressing polyamide nanocomposite with improved antibacterial and hemostatic properties. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Jan 2021, Vol.32(1)

LAMBERS H, PIESENS S, BLOEM A, PRONK H, FINKEL P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. **Int J Cosmet Sci**. 2006;28(5):359-370.

LAMPUGNANI, C.; WAS, M.; MONTANHINI, M.; NERO, L.; BERSOT, L. Quantification of psychrotrophic bacteria and molecular identification of *Pseudomonas fluorescens* in refrigerated raw milk. **Arquivos do Instituto Biológico**, 2019, Vol.86, p.1

LEFNAOUI, S.; MOULAI - MOSTEFA, N. Investigation and optimization of formulation factors of a hydrogel network based on kappa carrageenan-pregelatinized starch blend using an experimental design. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Sept 20, 2014, Vol.458, p.117(9)

LI, X.H.; TANG, H.; YANG, C.; MENG, X.H.; LIU, B.J. Detoxification of mycotoxin patulin by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. **Food Control**, 96 (2019), pp. 47-52

LIU, J., LI, B., LEE, C., ZHU, H., ZHENG, S., & PIERRO, A. (2019). Protective effects of lactoferrin on injured intestinal epithelial cells. **Journal of Pediatric Surgery**. doi: 10.1016/j.jpedsurg. 2019.08.046

LUNDIN, L.; ODIC, K.; FOSTER, T. J.; NORTON I. T. Phase separation in mixed carrageenan systems. **Supramolecular and Colloidal Structures in Biomaterials and Biosubstrates**, pp. 436-449 (2000)

MALIGIERI, L.A.O.; NEVES, L.M.G.; DE MORAIS, D.T.; DOMINGUES, R.F.; DE ARO, A.A.; PIMENTEL, E.R.; DO AMARAL, M.E.C.; ESQUISATTO, M.A.M.; DOS SANTOS, G.M.T.; MENDONÇA, F.A.S. Differing energy densities with laser 670 nm InGaP controls inflammation and collagen reorganization in burns. **Burns**, 2017, Vol.43(7), p.1524

MANKOTIA, P.; CHOUDHARY, S.; SHARMA, K.; KUMAR, V.; KAUR BHATIA, J.; PARMAR, A.; SHARMA, S.; SHARMA, V. Neem gum-based pH responsive hydrogel matrix: A new pharmaceutical excipient for the sustained release of anticancer drug. **International journal of biological macromolecules**, 01 January 2020, Vol.142, pp.742-755

MARIA T. S. CORREIA & LUANA C. B. B. COELHO. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, volume 55, pages261–273(1995)

MATARO, I; DELLI SANTI, G; PALOMBO, P; D'ALESSIO, R; VESTITA, M. Spontaneous healing and scar control following enzymatic debridement of deep second-degree burns. **Annals of burns and fire disasters**, 31 December 2017, Vol.30(4), pp.313-316

MELO, C. M. et al. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 342, p. 163-169, 2010.

MELO, C. M. L.; DE LIMA, A. L. R.; BELTRÃO, E. I. C.; CAVALCANTI, C. C. B.; DE MELO-JÚNIOR, M. R.; MONTENEGRO, S. M. L.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*. **Acta tropica**, May 2011a, Vol.118(2), pp.152-158

MELO, C. M. L.; PORTO, C. S.; MELO-JÚNIOR, M. R.; MENDES, C. M.; CAVALCANTI, C. C. B.; COELHO, L. C. B. B.; PORTO, A. L. F.; DOS ANJOS CARNEIRO LEÃO, A. M.; DOS SANTOS CORREIA, M. T. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International journal of pharmaceutics**, 15 April 2011b, Vol.408(1-2), pp.113-119

MENG, PING; MA, SHOUGUO; HUANG, SHUWEN. Healing effect of Terminalia chebula Retz extract on second-degree burns in rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 2016, Vol.15(4)

MILES, M. J.; MORRIS, V. J.; CARROLL, V. Carob gum- κ -carrageenan mixed gels: Mechanical properties and X-ray fiber diffraction studies *Macromolecules*, 17 (11) (1984), pp. 2443-2445

MINOLTA, K. Precise color communication: color control from perception to Instrumentation. Konica Minolta Sensing, Incorporated, 2007, 61 p. Disponível em: <https://www.konicaminolta.com/instruments/knowledge/color/pdf/color_communication.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2019.

MOON, BM.; JU, HW.; PARK, HJ. The Pilot Study for the Development of the Hemostatic Agent using Silk Fibroin for Epistaxis, **Tissue Eng. Regen. Med**, 10, 41 (2013)

MOOR, A.N.; VACHON, D.J.; GOULD, L.J. Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers. **Wound Repair Regen**. 2009; 17:832– 9

MORSI, NADIA M; ABDELBARY, GHADA A; AHMED, MOHAMMED A. Silver sulfadiazine based cubosome hydrogels for topical treatment of burns: Development and in vitro/in vivo characterization. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, February 2014, Vol.86(2), pp.178-189

MRITUNJAY, S. K.; KUMAR, V. (2017). A study on prevalence of microbial contamination on the surface of raw salad vegetables. **3 Biotech**, 7(1). doi:10.1007/s13205-016-0585-5

NGUYEN, B. T.; NICOLAI, T.; BENYAHIA, L.; CHASSENIEUX, C. (2015). The effect of the competition for calcium ions between κ -carrageenan and β -lactoglobulin on the rheology

and the structure in mixed gels. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 475, 9–18. doi:10.1016/j.colsurfa.2014.09.008

OFEIGSSON, O.J. Observations and experiments on the immediate cold-water treatment for burns and scalds, **Br J Plast Surg**, 12, 104 (1959)

OLIVEIRA, W. F.; SILVA, G.M.M; CABRAL FILHO, P.E.; FONTES, A.; OLIVEIRA, M. D.L; ANDRADE, C.A.S; SILVA, M. V.; COELHO, L.C.B.B; MACHADO, G.; CORREIA, M.T.S. Titanium dioxide nanotubes functionalized with Cratylia mollis seed lectin, Cramoll, enhanced osteoblast-like cells adhesion and proliferation. **Materials Science & Engineering C**, 01 September 2018, Vol.90, pp.664-672

ORGAES, F. A. F. S. M.; LYRA, C.; RODRIGUES JR, O. F.; GONELLA, H. A. “Estudo histopatológico do uso de heparina tópica em queimaduras por escaldamento em ratos”, **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, vol. 22, no. 1, pp. 39-44, 2007.

PAIM, M. P., MACIEL, M. J., WESCHENFELDER, S., BERGMANN, G. P., & AVANCINI, C. A. M. (2017). Anti-Escherichia coli effect of Hibiscus sabdariffa L. in a meat model. **Food Science and Technology**, 37(4), 647–650. doi:10.1590/1678-457x.29516

PAIVA, P. M. G., COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from Cratylia mollis Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.

PANNERSELVAM, B.; DHARMALINGAM JOTHINATHAN, M.; RAJENDERAN, M.; PERUMAL, P.; PUDUPALAYAM THANGAVELU, K.; KIM, H.J.; SINGH, V.; RANGARAJULU, S.K. An in vitro study on the burn wound healing activity of cotton fabrics incorporated with phytosynthesized silver nanoparticles in male Wistar albino rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 30 March 2017, Vol.100, pp.187-196

PARWANI, L.; BHATNAGAR, M.; BHATNAGAR, A.; SHARMA, V.; SHARMA, V. Evaluation of Moringa oleifera seed biopolymer-PVA composite hydrogel in wound healing dressing. **Iranian Polymer Journal**, 2016, Vol.25(11), pp.919-931

PEREIRA, D. S. T.; LIMA-RIBEIRO, M. H. M.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; CAVALCANTI, C. L. B.; PONTES-FILHO, N. T.; COELHO, L. C. B. B.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.;

CORREIA, M. T. S. Topical Application Effect of the Isolectin Hydrogel (Cramoll 1,4) on Second-Degree Burns: Experimental Model. **Journal of biomedicine & biotechnology**, 01 January 2012, Vol.2012

PINHEIRO, A.C.; BOURBON, A.I.; ROCHA, C.; RIBEIRO, C.; MAIA, J.M.; ONÇALVES, M.P. Rheological characterization of κ -carrageenan/galactomannan and xanthan/galactomannan gels: Comparison of galactomannans from non-traditional sources with conventional galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, 83, 392–399, 2011.

PRAJAPATI, V.D.; JANI, G.K.; MORADIYA, N.G.; RANDERIA, N.P.; NAGAR, B.J.; NAIKWADI, N.N.; VARIYA, B.C. Galactomannan: a versatile biodegradable seed polysaccharide. **Int. J. Biol. Macromol.** 60 (2013) 83– 92. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.017.

PUTNIK, P.; BURSAC KOVAČEVIĆ, D.; HERCEG, K.; LEVAJ, B. (2016). Influence of Respiration on Predictive Microbial Growth of Aerobic Mesophilic Bacteria and Enterobacteriaceae in Fresh-Cut Apples Packaged Under Modified Atmosphere. **Journal of Food Safety**, 37(1), e12284. doi:10.1111/jfs.12284

QUAH, S.P.; SMITH, A.J.; PRESTON, A.N.; LAUGHLIN, S.T.; BHATIA, S.R. Large-area alginate/PEO-PPO-PEO hydrogels with thermoreversible rheology at physiological temperatures. **Polymer**, 17 January 2018, Vol.135, pp.171-177

RAD, F.; SHARIFAN, A.; ASADI, G. Miscibility and morphology of kefiran/waterborne polyurethane blend films. **International journal of food properties**, 10 January 2018, Vol.20(sup3), pp. S2764-S2775

RANJBAR-MOHAMMADI, M.; RABBANI, S.; BAHRAMI, S.H.; JOGHATAEI, M.T.; MOAYER, F. Antibacterial performance and in vivo diabetic wound healing of curcumin loaded gum tragacanth/poly(ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers. **Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.**, 69 (2016), pp. 1183-1191

.

REZENDE, L.C.; JUCK, D.B. F.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; ALVES, C.Q. New flavans isolated from the leaves and stems of *Cratylia mollis* (Leguminosae). **Phytochemistry Letters**, Volume 14, December 2015, Pages 165-169

SEGURA, J. H.; DE CAMARGO, J. F. B.; BAGATIN, E.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Influência da água termal e de seus oligoelementos na estabilidade e eficácia de formulações dermocosméticas. **Surgical & cosmetic dermatology**, 01 March 2010, Vol.2(1), pp.11-17

SELIG, MICHAEL J.; DAR, B. N.; KIERULF, ARKAYE; RAVANFAR, RAHELEH; RIZVI, SYED S. H.; ABBASPOURRAD, ALIREZA. Modulation of whey protein-kappa carrageenan hydrogel properties via enzymatic protein modification. **Food & Function**, 2018, Vol.9(4), pp.2313-2319

SELVAKUMARAN, S.; MUHAMAD, I.I.; ABD RAZAK, S.I. Evaluation of kappa carrageenan as potential carrier for floating drug delivery system: Effect of pore forming agents. **Carbohydrate polymers**, 01 January 2016, Vol.135, pp.207-214

SHERIDAN R. Evaluation and management of the thermally injured patient. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 6th ed. New York: McGraw-Hill;2003. p.1220-9.

SHULMAN, AG. Ice water as primary treatment of burns. Simple method of emergency treatment of burns to alleviate pain, reduce sequelae, and hasten healing, **JAMA**, 27, 1916 (1960).

SILVA, P.M. S.; LIMA, A.L. R.; SILVA, B.V.M.; COELHO, L.C. B. B.; CORREIA, M.T. S. Cratylia mollis lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensors and Bioelectronics**, Volume 85, 15 November 2016, Pages 171-177

SIQUEIRA, N. M.; PAIVA, B.; CAMASSOLA, M.; ROSENTHAL-KIM, E. Q.; GARCIA, K. C.; DOS SANTOS, F.P.; SOARES, R.M.D. (2015). Gelatin and galactomannan-based scaffolds: Characterization and potential for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, 133, 8–18. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.039

SOARES, P.A.G.; SEIXAS, J.R.P.C.; ALBUQUERQUE, P.B.S.; SANTOS, G.R.C.; MOURÃO, P.A.S.; BARROS JÚNIOR, W.; CORREIA, M.T.S.; CARNEIRO-DA-CUNHA,

M.G. Development and characterization of a new hydrogel based on galactomannan and - carrageenan, **Carbohydr. Polym.** 134 (2015) 673–679.

SOUSA, F. D.; VASCONSELOS, P. D.; DA SILVA, A. F. B.; MOTA, E. F.; DA ROCHA TOMÉ, A.; MENDES, F. R. S.; GOMES, A. M. M.; ABRAHAM, D. J.; SHIWEN, XU; OWEN, J. S.; LOURENZONI, M. R.; CAMPOS, A. R.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. Hydrogel and membrane scaffold formulations of Frutalin (breadfruit lectin) within a polysaccharide galactomannan matrix have potential for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, January 2019, Vol.121, pp.429-442

STEINSTRAESSER, L.; BURKHARD, O.; FAN, M.H; JACOBSEN, F.; LEHNHARDT, M.; SU, G.; DAIGELER, A.; STEINAU, H.U.; REMICK, D.; WANG, S.C. Burn wounds infected with *Pseudomonas aeruginosa* triggers weight loss in rats. **BMC Surgery**, 2005, Vol.5, p.19-19.

TAKEMASA, M., & NISHINARI, K. (2016). Solution Structure of Molecular Associations Investigated Using NMR for Polysaccharides: Xanthan/Galactomannan Mixtures. **The Journal of Physical Chemistry B**, 120(12), 3027–3037. doi:10.1021/acs.jpcc.5b11665

TANG, L.; WU, J.J.; MA, Q.; CUI, T.; ANDREOPOULOS, F.M.; GIL, J.; VALDES, J.; DAVIS, S.C.; LI J. Human lactoferrin stimulates skin keratinocyte function and wound re-epithelialization. **British Journal of Dermatology**, no–no. doi:10.1111/j.1365-2133. (2010). 09748.x

TAO, B.; LIN, C.; YUAN, Z.; HE, Y.; CHEN, M.; LI, K.; HU, J.; YANG, Y.; XIA, Z.; CAI, K. Near infrared light-triggered on-demand Cur release from Gel-PDA@Cur composite hydrogel for antibacterial wound healing. **Chemical engineering journal** (Lausanne, Switzerland: 1996), 01 January 2021, Vol.403

THANUSHA, A.V.; DINDA, AMIT KUMAR; KOUL, VEENA. Evaluation of nano hydrogel composite based on gelatin/HA/CS suffused with Asiatic acid/ZnO and CuO nanoparticles for second degree burns. **Materials Science & Engineering**. 01 August 2018, Vol.89, pp.378-386

TROJANOWSKA, M. Mediators of fibrosis, **Open Rheumatol. J.** 6 (2012) 70–71.

TYAGI, A.; NIGAM, D.; SOLANKE, A.U.; SINGH, N.K.; SHARMA, T.R.; GAIKWAD, K. Genome-wide discovery of tissue-specific miRNAs in clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba*) indicates their association with galactomannan biosynthesis. **Plant Biotechnology Journal**, June 2018, Vol.16(6), pp.1241-1257

VAN HAL, M. (2000). Quality of sweet potato flour during processing and storage. **Food Reviews International**, 16, 1–37. <https://doi.org/10.1081/FRI-100100280>

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3. Ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.

VASCONCELLOS, P. K. F. M.; NÓIA, M. P.; DE CASTRO, I. C. VIEIRA; DOS SANTOS, J. N.; PINHEIRO, A. L. B.; MARQUES, A. M. C.; RAMOS, E. G.; ROCHA, C. G. Influence of laser therapy on the dynamic formation of extracellular matrix in standard second degree burns treated with bacterial cellulose membrane. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, May 2018, Vol.182, pp.1-8

WANG RM, XI. A review on porcine burn and scar models and their relevance to humans. **Wound Pract Res** 2010; 18:41–49.

WHO - World Health Organization Fact sheet N°365 (Updated 2018): **Burns** – Fact sheet N°365. Available online at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/>, checked on April 2018.

WIEDEMAN, M. P.; BRIGHAM M. P. The effects of cooling on the microvasculature after thermal injury, **Microvasc. Res**, 3, 154 (1971)

WROLSTAD, RONALD E.; DURST, ROBERT W.; LEE, JUNGMIN. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in food science & technology**, 2005, Vol.16(9), pp.423-428

ZHAI, M.; XU, Y.; ZHOU, B.; JING, W. Keratin-chitosan/n-ZnO nanocomposite hydrogel for antimicrobial treatment of burn wound healing: Characterization and biomedical application. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, March 2018, Vol.180, pp.253-258

ZHOU, J.; ZHAO, Y.; YANG, W.; DU, Q.; YIN, J.; GU, Y.; HAO, C. Use of Mechanical Stretching to Treat Skin Graft Contracture. **Journal of Burn Care & Research**, 2020, Vol. 41(4), pp.892-899

3.2 ARTIGO 2 - COMPARAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MODELOS DE QUEIMADURAS EM RATOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

COMPARAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE MODELOS DE QUEIMADURAS EM RATOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

José R. P. C. de Seixas^a, Julyanne M. L. Barbosa^b, Maria T. S. C.^{a,b}, Paulo A.G. Soares^a, Maria G. Carneiro-da-Cunha^{a,b,c*}

^a Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420 Recife, PE, Brazil;

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brasil;

^c Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-901.

* Autor correspondente. E-mail address: mgcc@ufpe.br; mgcc1954@gmail.com Tel.: +55 81 21268547; Fax: +55 81 21268576.

Resumo

Existem muitos modelos de queimaduras em ratos utilizando diferentes materiais como os metais e a água, aliado a este fator estão os diferentes parâmetros que influenciam significativamente na lesão, como temperatura e duração da exposição. Esta revisão visa determinar se uma análise conjunta desses estudos pode fornecer informações sobre os materiais e condições necessárias para criar queimaduras de uma gravidade específica. Uma revisão sistemática de 25 estudos de queimadura em ratos que descrevem a profundidade da queimadura com avaliação histológica é apresentada. Os critérios de inclusão incluíram queimaduras térmicas, queimaduras criadas com um novo método ou material, avaliação histológica dentro de 7 dias após a queimadura e método para avaliação da profundidade da lesão especificadas. Condições causando queimaduras dérmicas profundas com queimaduras de contato de gravidade equivalente foram díspares, com temperaturas mais baixas e durações mais longas quando comparada com métodos similares (60 °C por 15 seg e 150 °C por 9 segundos), já queimaduras por escaldadura obtiveram grau de lesões divergentes quando aplicado a mesma temperatura (100 °C) com tempos diferentes. Um arquivo valioso dos diferentes mecanismos e materiais usados para modelos de queimaduras de ratos é apresentado para auxiliar em projetos e otimização de modelos futuros. Significativamente, esta revisão demonstra o efeito do mecanismo de lesão na gravidade da queimadura e que se recomenda cautela quando as condições de queimadura estabelecidas pelos modelos são utilizadas.

Palavras-chave: Profundidade de queimadura; Modelo de queimadura; Ratos; Ferimento Térmico

Introdução

As queimaduras configuram uma lesão devastadora que causa déficits estruturais e funcionais em vários sistemas orgânicos; elas estão entre os traumas mais debilitantes para os humanos. Nos Estados Unidos estima-se que ocorram mais de 2 milhões de casos anualmente, apresentando a terceira principal causa de morte por ferimentos entre crianças de 5 a 9 anos de idade e a quinta causa de morte por ferimentos entre crianças de 1 a 4 anos [1], com 3.275 mortes por ano atribuídas a lesões relacionadas a queimaduras [2]. A cada ano cerca de 150.000 mortes são devido a queimaduras, segundo a Organização Mundial da Saúde [3].

Avanços importantes têm minimizado a mortalidade por queimaduras na última década, mas o tratamento ainda se encontra longe do ideal. Muitas doenças humanas podem ser melhor desvendadas e compreendidas por causa dos modelos animais, que provam ser uma ferramenta singular para novas descobertas de drogas terapêuticas.

Os modelos *in vitro* são limitados em sua capacidade de capturar todos os detalhes da fisiopatologia da queimadura, por esta razão, os modelos *in vivo* são necessários para uma melhor abordagem frente aos mecanismos patológicos pós-queimadura e aprofundamento nas novas abordagens de tratamento. Os modelos animais estão associados a diversas descobertas, como as moleculares [4 e 5] e celulares, patogênese dos danos à pele e para desenvolver novos métodos para intervenções terapêuticas [6, 7, 8 e 9]. No entanto, para pacientes queimados a falta de um modelo animal adequado se configura como limitante na busca de tratamentos.

Os ratos podem ser classificados como "animais de pele solta", principalmente por causa da elasticidade de sua pele e fraca aderência às estruturas subjacentes em comparação com os humanos [10, 11], e não apresentam cicatrização idêntica. Apesar disso, esses roedores ganham destaque por sua semelhança filogenética, apresentando grande similaridade aos humanos, como as camadas da epiderme e derme, compartilhando assim, características fisiológicas e patológicas em muitos sistemas de órgãos que já foram bem estabelecidos na literatura [12]. Outro aspecto importante à pesquisa é a questão de manejo e economia, que tornam o modelo *in vivo* com ratos, mais adequados para realização de simulações de lesões em geral, quando comparado com outros mamíferos.

Uma grande preocupação com relação ao uso de modelos de queimadura em ratos é o desafio de criar queimaduras reproduzíveis, com mesma profundidade e severidade. Numerosos investigadores relatam modelos de queimadura em ratos, descrevendo as

condições de queimadura necessárias para criar a profundidade ou gravidade desejada da lesão [13, 14]. Diferentes técnicas com reprodutibilidade de criação de queimadura foram descritas anteriormente [12, 15, 16]. No entanto, há uma discussão limitada sobre a discrepância entre os estudos das condições de queimadura de profundidades equivalentes.

Embora a indução de queimaduras uniformes sob condições padronizadas sejam o principal objetivo de toda queimadura experimental, os métodos que simulam uma lesão real ainda são bastante controversos [17, 18]. As lesões de queimaduras podem ser acarretadas por vários mecanismos que influenciam diretamente na gravidade da lesão. Os métodos de escaldadura, queimadura de contato, fogo, química, elétrica e radiação são os métodos mais utilizados, com destaque para os de contato e escaldadura, com diferentes eventos fisiopatológicos, celulares e moleculares [19, 20].

Fatores limitantes em vários métodos experimentais de queimadura ganham destaque, porque os pesquisadores geralmente não descrevem completamente os detalhes do protocolo de queimadura em muitos estudos realizados [12]. Aspectos como: temperatura, pressão da mão do operador ou peso do utensílio, tempo e tipo do material são muitas vezes ausente nos dados de pesquisa, influenciando assim o entendimento do tempo de cura e os resultados em geral.

Nestes estudos, as condições de queimadura relatadas para espessura parcial dérmica profunda (EPDP) equivalentes, variam amplamente, de 70°C / 10 seg [21] a 100 °C/15 seg [7] por exemplo. Portanto, a análise conjunta de estudos pode permitir um melhor entendimento e sustentar as condições mínimas para uma queimadura de EPDP.

Estudos experimentais comparando diferentes mecanismos de lesões térmicas são escassos. Derakhshanfar et al. (2019) [21], compararam o dano ao tecido causado por queimaduras de contato e escaldantes em um modelo de ratos, e forneceram evidências histológicas sugerindo que sua fisiopatologia difere.

O objetivo principal desta revisão foi fornecer uma avaliação qualitativa e quantitativa abrangente da literatura sobre queimaduras em ratos, criadas através de diferentes mecanismos e materiais. O objetivo secundário foi comparar as condições de queimadura relatadas para criar feridas com profundidades de queimaduras especificadas [superficial (S), espessura parcial superficial (EPS), espessura parcial dérmica profunda (EPDP) e espessura total (ET)] determinados histologicamente, com particular destaque para as queimaduras de EPDP.

Esta é a primeira vez que uma revisão sistemática de modelos de queimaduras em ratos foi realizada, com avaliação de um pool de trabalhos com profundidade histológica

presente. Além disso, esta revisão é uma de apenas algumas revisões sistêmicas de estudos experimentais em animais onde a qualidade metodológica dos estudos incluídos é avaliada quantitativamente usando uma modificação da diretriz ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) [22].

Materiais e métodos

Uma revisão sistemática da literatura publicada sobre modelos de queimaduras em ratos foi conduzida. Os critérios de inclusão experimentais foram: modelos de queimaduras *in vivo*, ratos, cutâneos e publicados em inglês. Os critérios de inclusão e exclusão completos estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 Critérios de inclusão e exclusão para estudos elegíveis.

Critério de inclusão	Critério de exclusão
• Apenas ratos • <i>In vivo</i> • Modelo de queimadura cutânea • Avaliação da profundidade da lesão do tecido especificada • Avaliação histológica da profundidade da queimadura por pelo menos 1 vez, ponto (dentro de 7 dias) pós-queimadura • Queimaduras térmicas expressas como temperatura • Método ou material novo para inflicção de queimadura e/ou se o método for com base em um modelo anterior (citado), mas o material é significativamente modificado • Inglês	• <i>Ex vivo</i> • Modelos de queimadura pulmonar, gastrointestinal ou sistêmica • Queimaduras químicas, queimaduras a laser, queimaduras por radiação, queimaduras de frio • Estudos citando o uso de um método de inflicção de queimaduras descrito anteriormente • Texto completo indisponível em inglês

Fontes de dados e seleção de artigos

Os bancos de dados pesquisados incluíram EMBASE, PUBMED e Web of Science de todos os artigos publicados até janeiro de 2021. A estratégia de pesquisa detalhada para cada banco de dados é fornecida na Tabela 1. Os termos de pesquisa incluíram 'ratos OU rato 'E'

animal OU modelo OU estudo experimental OU *in vivo* 'E' queimaduras OU queimaduras OU lesão térmica OU estudos térmicos '.

A pesquisa foi complementada por estudos identificados por referência cruzada e pesquisas de autor-chave. Os estudos para inclusão/exclusão foram avaliados por dois revisores (JS e JB) independentes. Após a remoção das duplicatas, os artigos foram selecionados para inclusão com base no título e no resumo. Os Textos completo foram obtidos a partir dos artigos restantes e avaliado para elegibilidade por ambos os revisores. Apenas artigos onde o texto completo estava disponível em inglês foi incluído na revisão. Além das avaliações, todos os tipos de estudo, incluindo teses de doutorado e resumos de congressos, foram incluídos se o texto completo estivesse disponível.

Avaliação da qualidade dos estudos

A qualidade foi avaliada usando uma lista de verificação modificada desenvolvida a partir das diretrizes da ARRIVE, para relatar pesquisas com animais [22], com os itens 11 e 14 não avaliados (pois são mais relevantes para ensaios terapêuticos randomizados e não foram considerados aplicáveis aqui). Os itens para avaliação da qualidade estão listados na Tabela 2. Cada item da lista de verificação recebeu uma pontuação de qualidade onde 0 = TODOS os critérios inadequados ou não mencionados, 1 = ALGUNS critérios ausentes ou pouco claros e 2 = TODOS os critérios adequados e claros. Para o item 17, eventos adversos, não aplicável (n/a) foi registrado se não houver indicação de que um evento adverso ocorreu.

Tabela 2 Lista de itens para avaliação da qualidade dos artigos incluídos. As diretrizes ARRIVE [22] foram modificadas com os itens 11 e 14 não avaliado.

	Item	Descrição
Título	1	Permite uma descrição do conteúdo do artigo que seja precisa e concisa
Resumo	2	Fornece um resumo preciso do histórico, objetivos de pesquisa, métodos-chave, principais descobertas e conclusões do estudo
Introdução	3	Inclui formação científica suficiente para compreender a motivação e o contexto para o estudo, explica a abordagem experimental e a relevância para a biologia humana
Objetivos	4	Descreve claramente os objetivos primários e secundários do estudo
Declaração ética	5	Descrição da conformidade com os princípios regulatórios nacionais e/ou licenças relevantes, que cobrem a pesquisa

Design de estudo	6	Métodos para reduzir o enviesamento, por exemplo, randomização, cegamento, ordem em que queimaduras foram criadas. Número de animais usados explicado. Tempo entre queimadura e amostragem claramente delineadas.
------------------	---	---

Tabela 2 Continuação

	Item	Descrição
Procedimentos experimentais	7	Fornece detalhes precisos de todos os procedimentos realizados e descrição do equipamento: Como, por exemplo, tipo de dispositivo de queima, fonte de calor, temperatura, duração, local das queimaduras e número e tamanho das queimaduras
Animais experimentais	8	Fornece detalhes dos animais usados, incluindo espécie, sexo, idade, peso
Habitação e criação	9	Tipo de instalação, como os animais são alojados e alimentados, descreve quaisquer avaliações de bem-estar e medicamentos de alívio da dor usados (para ratos pós cirurgias)
Tamanho da amostra	10	Especifica o número de repetições de cada condição de queimadura, fornece detalhes de qualquer tamanho de amostra e cálculo usado
Alocando animais para grupos experimentais	11	Alocação de animais a grupos experimentais - randomização ou combinação, ordem em quais animais foram tratados e avaliados
Resultados experimentais	12	Define claramente os resultados experimentais primários e secundários avaliados, como: profundidade ou gravidade da queimadura
Métodos estatísticos	13	Fornece detalhes dos métodos estatísticos usados para cada análise
Dados básicos	14	Características e estado de saúde dos animais - estado microbiológico, drogas ou teste ingênuo antes do tratamento
Números analisados	15	Números absolutos em cada grupo incluído em cada análise, explicação se houver animais, queimaduras ou dados que foram excluídos
Resultados e estimativa	16	Resultados para cada análise com uma medida de precisão
Eventos adversos	17	Detalhes de quaisquer eventos adversos (se relevante)
Interpretação / implicações científicas	18	Interpretar resultados, referir-se a hipóteses, comentar sobre limitações ou fontes de viés
Generalidade / tradução	19	Relevância para a biologia humana discutida
Financiamento	20	Divulga as fontes de financiamento e quaisquer conflitos de interesse

Extração e análise de dados

A extração de dados foi concluída para todos os estudos incluídos por um revisor (JS). Os dados para extração seguiram o formato PICOTS (participantes, intervenção, comparação, resultado, tempo e desenho do estudo), conforme descrito na Tabela 3.

Para permitir comparações entre os estudos de gravidade das queimaduras, as lesões foram classificadas pela nomenclatura atualmente aceita: queimaduras superficiais, EPS, EPDP e ET [23,24]. Onde foram dadas classificações, como primeiro grau, segundo grau parcial ou profunda e terceiro grau com espessura total. Para estudos onde a gravidade da queimadura foi relatada quantitativamente em tabelas ou gráficos, um valor de $\geq 60\%$ relativo à lesão na derme significava queimadura EPDP [25].

Estatísticas descritivas, como média $\pm$ desvio padrão foram usadas para relatar as características dos animais e feridas. Meta-regressão foi considerado quando apropriado. A análise foi realizada usando Graphpad Prism V6.

Tabela 3 Dados coletados para análise dos artigos incluídos.

Dados coletados	Detalhes
Participantes	Animais: -Raça, idade, sexo, peso -Número de ratos em estudo
Intervenção	Criação da queimadura: - Mecanismo de lesão térmica - Localização, tamanho e número queimaduras por rato - Aparelho usado, por exemplo, tipo de material, fonte de calor, controle de pressão - Condições de queimadura, por exemplo, temperatura (°C) e duração da exposição (segundos)
Comparação	Pele normal de animal não queimado como controle
Resultado	Profundidade ou gravidade da queimadura medida histologicamente:

-Método de coloração usado

Tempo	Todas as biópsias de pele coletadas em até 7 dias após a queimadura
Design de estudo	Tudo incluído

Medidas de resultado

O desfecho primário avaliado foram as condições de queimadura relatado para criar queimaduras superficiais, EPS, EPDP e ET, determinado histologicamente. Os cálculos para a temperatura média e a duração da exposição necessária para causar queimaduras de gravidades diferentes para os mecanismos heterogêneos de lesão foram feitos a partir dos dados disponíveis.

Resultados

Seleção de estudos

O fluxo de trabalho dos estudos incluídos na revisão é delineado na Figura 1. Razões para exclusão após avaliação de texto completo (n = 94) método incluído não novo (n=26), incapaz de obter artigo de texto completo em inglês (n = 5), não *in vivo* (n=2), avaliação histológica não relatada até o dia 7 (n=22), avaliação da profundidade da lesão não foi especificada adequadamente (n=11), não é uma queimadura térmica expressa como temperatura (n=11), revisão (n=6) e não são ratos (n=11). Um número final total de 25 estudos foi incluído (Tabela 4).

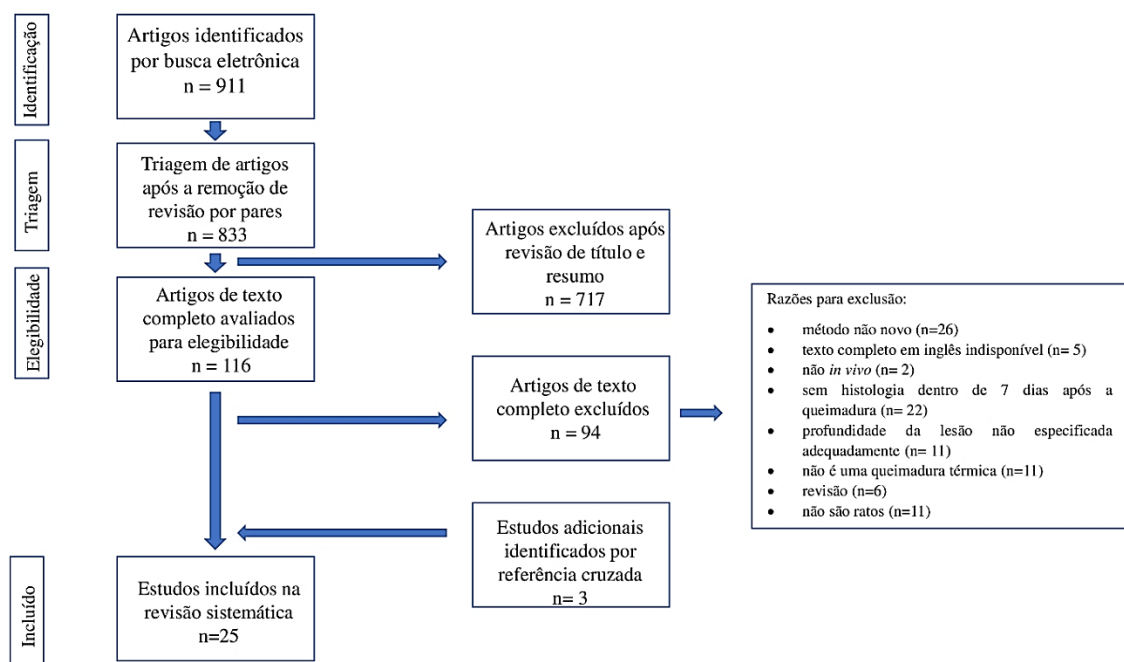


Figura 1 Diagrama de fluxo para estratégia de busca e seleção dos artigos incluídos.

Avaliação da qualidade das publicações selecionadas

As pontuações de qualidade individuais para cada estudo são fornecidas na Tabela 2 e resumidas na Tabela 4. Uma nota de 2 (todos os critérios adequados) foi alcançado por $\geq 90\%$ dos estudos para a lista de verificação descrição de itens; o título, resumo e introdução (1–4); declaração ética (5); resultados experimentais (12); métodos estatísticos (13); números analisados (15); resultados e estimativa (16) e generalidade/tradução (19). Notavelmente, 76% dos estudos não forneceram detalhes completos dos animais usados, incluindo espécie, sexo, idade e peso (8); 40% não mencionaram adequadamente os detalhes precisos de todos os procedimentos realizados e descrição do equipamento: tipo de dispositivo de queimadura, fonte de calor, temperatura, duração, local, número e tamanho das queimaduras (7); e 56% não divulgou quaisquer fontes de financiamento e conflitos de interesse (20).

Tabela 4 Resumo da qualidade dos artigos incluídos nesta revisão. Avaliado usando as diretrizes ARRIVE modificadas (itens 11 e 14 excluídos), onde cada item é pontuado de 0–2. Para o item 17 (eventos adversos), 92% dos estudos foram avaliados como não aplicáveis.

Item	Pontuação		
	0 (%)	1 (%)	2 (%)

1	0	0	100
2	0	8	92
3	0	0	100
4	0	0	100
5	4	4	92
6	12	16	72
7	0	40	60
8	0	76	24
9	4	32	64
10	4	8	88
12	0	0	100
13	0	0	100
15	8	0	92
16	0	4	96
17	0	0	8
18	0	20	80
19	0	0	100
20	56	16	28

Demografia

Os dados demográficos são apresentados na Tabela 5 com comparações entre os estudos mostrados na Figura 2. Estudos cujo objetivo principal foi relatado como o desenvolvimento de um novo modelo de queimadura foi responsável por 20% de todos os estudos incluídos (n=5). Uma alta proporção de estudos teve o objetivo principal de investigar novos tratamentos de queimaduras 72 % (n=18), e alguns estudos relataram avaliação de uma modalidade de análise fisiopatológica 8 % (n = 2). Em relação ao sexo dos ratos, 86,4% (n=19) eram machos e 13,6% (n=3) eram fêmeas.

Tabela 5 Os dados demográficos dos animais para os estudos incluídos (n = 25).

Autor (ref)	Ano	Tipo de estudo	Mecanismo de queimadura	Número de ratos	Raça dos ratos	Idade média dos ratos (semanas)	Peso médio dos ratos (g)	Sexo dos ratos
Ahn et al. [26]	2016	Tratamento/terapia nova	Contato	24	Wistar	12	350-400	Macho
Andritoiu et al. [27]	2020	Tratamento/terapia nova	Contato	42	Wistar	-	220-250	Macho
Banerjee et al. [28]	2019	Tratamento/terapia nova	Contato	16	-	-	-	-
Bayat et al. [29]	2006	Tratamento/terapia nova	Escaldadura	78	Wistar	16	250 ± 30	Macho
Bhowmick et al. [30]	2018	Tratamento/terapia nova	Contato	24	Wistar	-	180 ± 20	Fêmea
Campelo et al. [6]	2011	Desenvolvimento de modelo	Contato	24	Wistar	-	-	Macho
Derakhshanfar et al. [21]	2019	Desenvolvimento de modelo	Contato/Escaldadura	6	Sprague Dawley	-	200-220	Macho
Eryani et al. [31]	2018	Tratamento/terapia nova	Contato	24	Sprague Dawley	10	250-400	Macho
Fowler et al. [32]	2013	Fisiopatologia / histologia	Contato	117	Sprague Dawley	-	250-400	Macho
Guo et al. [17]	2017	Desenvolvimento de modelo	Contato	36	Sprague Dawley	-	250 ± 50	Macho
Hu et al. [33]	2020	Desenvolvimento de modelo	Contato	60	Sprague Dawley	4-6	180-220	-
Ju et al. [34]	2014	Tratamento/terapia nova	Contato	-	Sprague Dawley	8	300	Macho

–Dados não extraíveis, pouco claros ou não disponíveis.

Tabela 5 Continuação.

Autor (ref)	Ano	Tipo de estudo	Mecanismo de queimadura	Número de ratos	Raça dos ratos	Idade média dos ratos (semanas)	Peso médio dos ratos (g)	Sexo dos ratos
Lee et al. [35]	2015	Tratamento/terapia nova	Escaldadura	40	Sprague Dawley	6	180-220	Macho
Liu et al. [36]	2014	Tratamento/terapia nova	Escaldadura	126	Wistar	6	180-220	Macho
Lytvynyuk et al. [37]	2016	Fisiopatologia / histologia	Contato	24	Wistar	-	-	Macho
Ma et al. [38]	2015	Tratamento/terapia nova	Escaldadura	105	Wistar	-	220-240	Macho
Mohtasham Amiri et al. [39]	2017	Tratamento/terapia nova	Contato	95	Sprague Dawley	-	180-220	Fêmea
Nunes et al. [40]	2011	Tratamento/terapia nova	Contato	45	Wistar	-	250-300	Macho
Oliveira et al. [41]	2010	Tratamento/terapia nova	Contato	45	Wistar	-	200-230	Macho
Ozcelik et al. [42]	2016	Tratamento/terapia nova	Escaldadura	30	Wistar	-	250-300	Macho
Pereira et al. [7]	2012	Desenvolvimento de modelo	Contato	12	Wistar	-	250 ± 50	Macho
Sawada et al. [43]	1997	Tratamento/terapia nova	Escaldadura	10	Wistar	-	250-350	Macho
Wang et al. [44]	2015	Tratamento/terapia nova	Contato	-	Sprague Dawley	-	420	-
Yang et al. [45]	2020	Tratamento/terapia nova	Escaldadura	24	Goto-Kakizaki	12	-	-
Yüksel et al. [46]	2014	Tratamento/terapia nova	Contato	28	Sprague Dawley	-	-	Fêmea

–Dados não extraíveis, pouco claros ou não disponíveis.

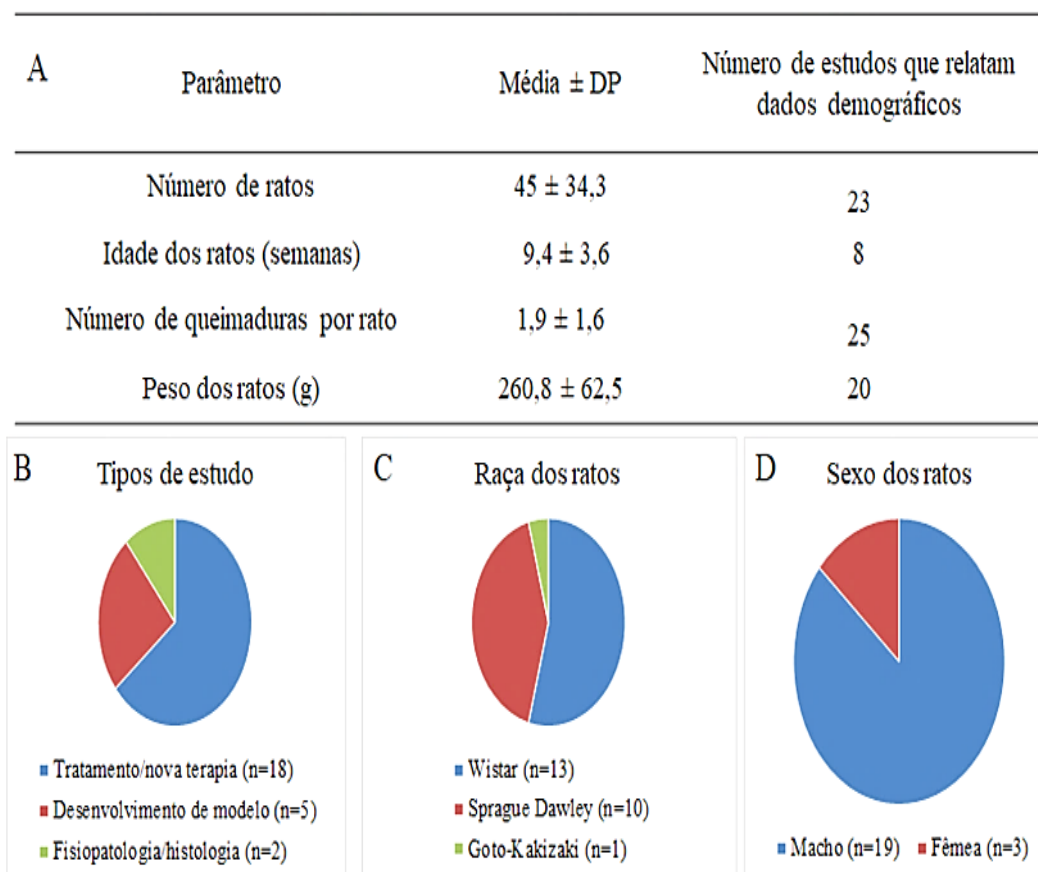


Figura 2 Demografia dos estudos. (A) especificação animal, (B) tipos de estudos, (C) raça dos ratos e (D) sexo dos ratos. Se os valores forem fornecidos como um intervalo, a média para esse intervalo é apresentada.

Criação da queimadura

Os diferentes métodos e materiais para criação de queimaduras usada por cada estudo são relatados na Tabela 6 e resumidos na Figura 3. Os tamanhos de queimaduras individuais variaram de 0,78 cm² a aproximadamente 19 cm², com uma média de 4,3 $\pm$ 4,5 cm², obtendo desta maneira uma média de 1,65 % da área da superfície corporal total dos ratos, considerando a fórmula [TBSA (cm²) = 9.1BW^{2/3}] onde: TBSA (área da superfície corporal total), 9.1 é um atributo fixo e “BW” representa o peso do animal em gramas [47]. Portanto, o tamanho da queimadura apresentou uma área grande o suficiente para exames histopatológicos, e pequeno o suficiente para evitar amplas respostas sistêmicas [17-18-20-48-49]. Para a pressão em gramas, onde o material aplicado na área queimada foi identificado, apenas 24% dos estudos expuseram este dado, no qual para as queimaduras de contato se obteve uma média de 227,2g e para a escaldadura um valor único de 500g.

Para os mecanismos de queimaduras, havia n=25 [17 (estudos somente de contato), 7 (escaldadura) e 1 (contato e escaldadura)]. Havia seis especificações distintas para criar queimaduras de contato (Figura 3C); Latão foi o metal mais comumente utilizado (27,8%),

seguido por cobre (22,2%), material não informado (22,2%), alumínio (11,1%), metal não especificado (11,1%) e solda (5,6%). Os métodos para aquecer os materiais usados para as queimaduras de contato obtiveram iguais porcentagens (Figura 3D), água quente (33,3%), eletricidade (33,3%) e não informado (desconhecido 33,3%).

Medidas dos resultados

As condições de queimadura relatadas para criar queimaduras de profundidade equivalente ou a gravidade conforme avaliada histologicamente são fornecidos na Tabela 7. Houve uma variação extremamente grande entre os relatórios de estudo, de quando e como o dano ao tecido foi avaliado. O Tempo de biópsia variou desde imediatamente após a criação da queimadura até 7 dias pós-queimadura. Muitos métodos de coloração diferentes foram usados; no entanto, hematoxilina e eosina foram os mais comuns, relatados em 96% dos estudos. Vários marcadores histológicos diferentes foram usados para determinar a profundidade da lesão, sendo a necrose celular, lesão do colágeno e resposta inflamatória as mais comuns. A maioria dos estudos relatou apenas dados qualitativos para profundidade da lesão. Essa ampla variação no tipo e na qualidade da avaliação da profundidade da lesão do tecido, afetou a capacidade de comparar os resultados do estudo. Devido à heterogeneidade dos estudos, uma análise de meta-regressão não foi capaz de ser executado. Onde os dados estavam disponíveis, a temperatura média e duração da exposição relatada como causa superficial, EPS, EPDP e ET foram analisadas e são mostradas na Tabela 8. Temperaturas mais baixas e durações mais curtas de exposição foram relatadas para queimadura por escaldadura em EPDP e ET (75–100°C, 10–15 segundos) em comparação com as queimaduras de contato EPDP (95–200°C, 2–30 segundos), do mesmo modo (94–100°C, 7–12 segundos) em comparação com as queimaduras de contato de ET (60–150°C, 8–20 segundos).

Tabela 6 Metodologias de criação de queimadura. Se nenhum tamanho de gravação foi relatado, o tamanho médio de gravação foi calculado a partir das dimensões do dispositivo.

Autor (ref)	Local das queimaduras	Número de queimaduras por rato	Tamanho médio da queimadura (cm2)	Mecanismo de queimadura	Tipo de material (queimaduras de contato)	Fonte de calor para dispositivo de queimadura	Temperatura (°C)	Duração da exposição (segundos)	Peso (g)
Ahn et al. [26]	Dorso	2	4	Contato	-	-	170	2	-
Andritoiu et al. [27]	Dorso	1	7,2	Contato	Cobre	Eletricidade	100	9	-
Banerjee et al. [28]	Dorso	1	2,32	Contato	Latão	Eletricidade	87	10	500
Bayat et al. [29]	Dorso	2	3,81	Escaldadura	Banho d'água	n/a	100	7	-
Bhowmick et al. [30]	Dorso	2	0,95	Contato	Latão	Banho d'água	-	20	-
Campelo et al. [6]	Dorso	4	1	Contato	Cobre	Eletricidade	100-200	9	85
Derakhshanfar et al. [21]	Dorso	1	3,14	Contato, escaldadura	Latão	Banho d'água	95	15	-
Eryani et al. [31]	Dorso	2	0,78	Contato	-	-	-	20	-
Fowler et al. [32]	Pata	1	-	Contato	Solda	Eletricidade	100	30	-
Guo et al. [17]	Dorso	1	3,14	Contato	Alumínio	Eletricidade	60-70	10	300
Hu et al. [33]	Dorso	8	2	Contato	Latão	Eletricidade	100	8	200
Ju et al. [34]	Dorso	1	1,5	Escaldadura	-	-	60	15	-
Lee et al. [35]	Dorso	1	6,15	Escaldadura	Banho d'água	n/a	100	10	-
Liu et al. [36]	Dorso	1	-	Contato	Banho d'água	n/a	94	12	-

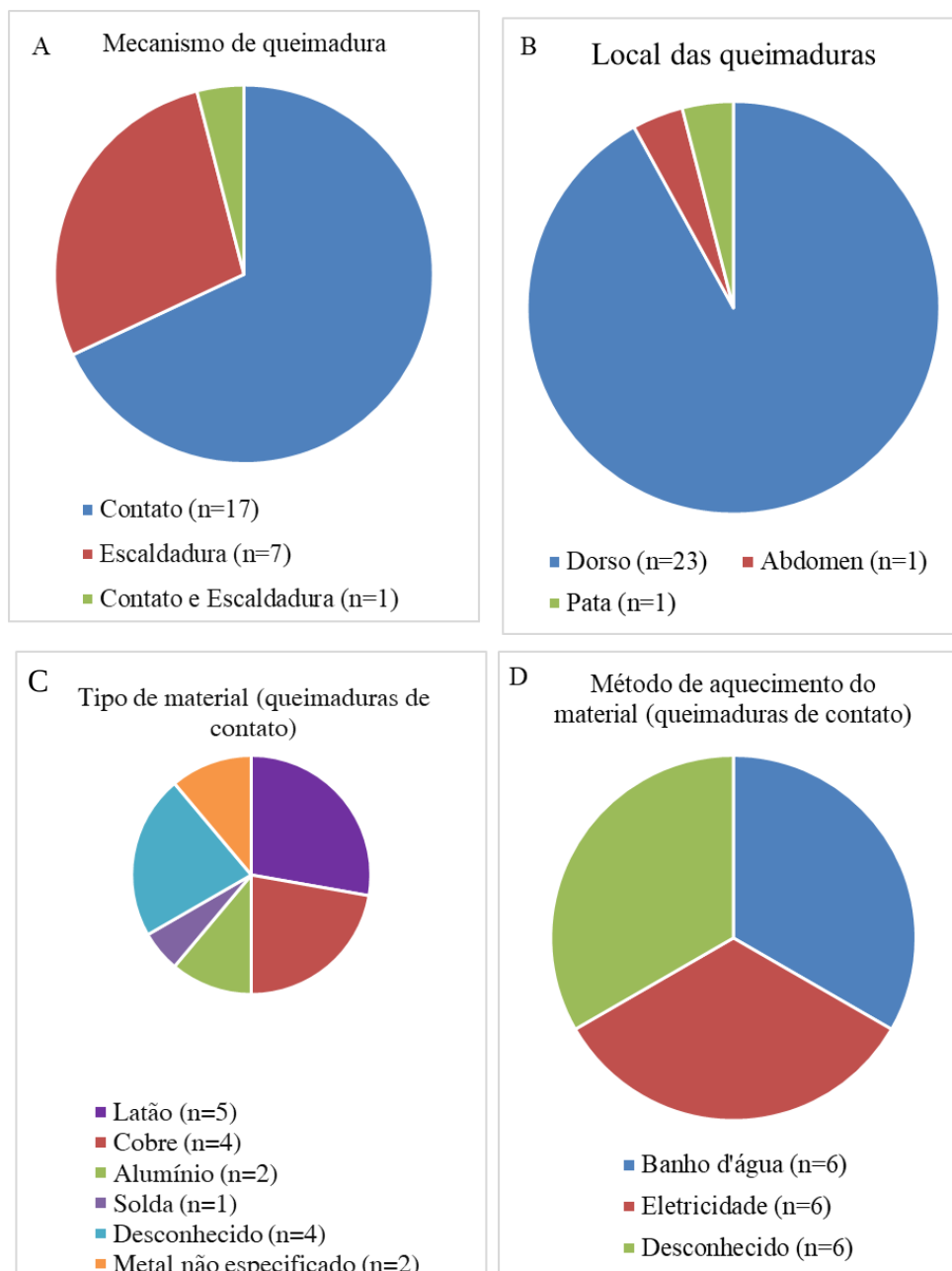
–Dados não extraíveis, pouco claros ou não disponíveis.

Tabela 6 Continuação.

Autor (ref)	Local das queimaduras	Número de queimaduras por rato	Tamanho médio da queimadura (cm2)	Mecanismo de queimadura	Tipo de material (queimaduras de contato)	Fonte de calor para dispositivo de queimadura	Temperatura (°C)	Duração da exposição (segundos)	Peso (g)
Lytvynyuk et al. [37]	Dorso	1	14,5	Escaldadura	Cobre	Banho d'água	97-99	15	-
Ma et al. [38]	Dorso	1	-	Contato	Banho d'água	n/a	75	15	-
Mohtasham Amiri et al. [39]	Dorso	1	-	Contato	-	-	-	-	-
Nunes et al. [40]	Dorso	1	1	Contato	Cobre	-	-	20	-
Oliveira et al. [41]	Dorso	1	2,25	Escaldadura	Metal	-	-	20	-
Ozcelik et al. [42]	Dorso	1	9		Esponja, banho d'água	Banho d'água	100	35	-
Pereira et al. [7]	Dorso	1	0,78	Contato	Alumínio	Banho d'água	100	15	51
Sawada et al. [43]	Abdomen	4	4	Escaldadura	Algodão, banho d'água	Banho d'água	99	10	-
Wang et al. [44]	Dorso	3	19	Contato	Latão	Banho d'água	-	10	500
Yang et al. [45]	Dorso	1	0,78	Escaldadura	Banho d'água	n/a	85	10	-
Yüksel et al. [46]	Dorso	4	2	Contato	Metal	Banho d'água	-		

—Dados não extraíveis, pouco claros ou não disponíveis.

Figura 3 Detalhes de criação da queimadura, incluindo: (A) mecanismo de lesão por queimadura, (B) local das queimaduras, (C) tipo de material e (D) método de material de aquecimento usado para aquecer os dispositivos de contato.



Discussão

Qualidade dos estudos

A maioria dos estudos incluídos para revisão obteve qualidade adequada. A maior parte teve pontuações de alta qualidade para os itens de: título, resumo e introdução; métodos; objetivos da pesquisa com clareza; interpretação dos resultados e sua relevância para a

biologia humana, abordados de forma conveniente; e declaração ética. É preocupante que 76% dos estudos não forneceram detalhes completos dos animais usados, incluindo: espécie, sexo, idade e peso, dificultando deste modo as possíveis mimetizações destes trabalhos por outros autores; similarmente, 40% não mencionaram adequadamente os detalhes precisos de todos os procedimentos realizados e descrição do equipamento: tipo de dispositivo de queimadura, fonte de calor, temperatura, duração, local das queimaduras, número e tamanho das queimaduras, diminuindo deste modo uma comparação mais eficaz entre os métodos e suas relativas profundidades na lesão térmica; e 56% não divulgaram quaisquer fontes de financiamento e conflitos de interesse, dados que auxiliam em planejamentos futuros de pesquisas. Notavelmente, uma pequena porcentagem de estudos não teve nenhum dos itens abordados (pontuação 0) de método básico, descrevendo procedimentos para reduzir o viés, avaliações de bem-estar animal e métodos estatísticos usados para análise. Embora as pontuações de baixa qualidade nesses itens não impedirem inclusão de estudos nesta revisão, inconsistências nos relatórios podem ter um efeito sobre a capacidade de avaliar a força de suas conclusões. Atualmente existe um consenso entre os pesquisadores em biociências que trabalham com animais, para aplicação das diretrizes ARRIVE [22]. Assim sendo, além de defender os princípios dos 3 Rs, redução, substituição e refinamento (reduction, replacement and refinement) e proporcionando detalhes dos cálculos do tamanho das amostras, ocorre um aumento na qualidade e abrangência de relatórios para modelos de queimadura em ratos experimentais.

Tipos de estudo e dados demográficos

Como reportado anteriormente, os tipos de estudos mais comumente realizados incluem: tratamento/nova terapia, modelo de queimadura e fisiopatologia/histologia. Curiosamente, houve uma alta proporção de estudos cujo principal objetivo era a investigação de novos tratamentos de queimaduras ou modalidades diagnósticas. Dado o grande número de modelos de queimaduras em ratos na literatura, é surpreendente que novos modelos sejam continuamente desenvolvidos para esses tipos de estudos, ao invés de aperfeiçoar métodos existentes. Analisando de forma abrangente modelos de queimadura de ratos, já existentes, e avaliando como as condições de queimadura se relacionam com a gravidade da lesão, esta revisão deve servir como um recurso para pesquisadores e minimizar o uso futuro de animais.

A demografia dos ratos nos estudos foi semelhante. Embora o uso de ratos Wistar na pesquisa de queimaduras tenha uma elevada popularidade, nos últimos anos, muitos estudos vêm relatando o uso de ratos da raça Sprague Dawley, animais albinos, que similar a raça

Wistar apresentam vantagens como: tranquilidade e facilidade de manipulação. Esses ratos normalmente têm uma cauda mais longa em proporção ao comprimento do corpo do que os ratos Wistar [50, 51]. Os ratos israelenses da raça Goto-Kakizaki, apresentam aplicações mais restritas devido aos animais apresentarem hiperglicemia e hiperinsulinemia, principalmente na idade adulta [52]. A maioria dos estudos relatou a criação de queimaduras individuais (n=16), queimaduras duplas em segundo lugar (n=4), seguido por ratos com 4 queimaduras (n=3), ratos com 3 lesões (n=1) e 8 lesões (n=1), com uma média de 21 queimaduras de tamanho moderado ($4,3 \pm 4,6 \text{ cm}^2$) por rato. É importante salientar a falta geral de consistência em relatar todas as especificações dos animais (por exemplo, espécie, sexo, idade, peso); no entanto, a semelhança da demografia animal entre a maioria dos estudos, permitiu as comparações.

Os modelos de lesão por queimaduras que aplicam escaldadura, são comumente reconhecidos como mais desafiadores pelos pesquisadores, devido ao aumento significativo no risco de queimaduras não intencionais, em comparação com modelos de queimaduras de contato [12-53]. Portanto, não é de se surpreender que a maioria dos modelos de queimadura de ratos analisados no presente estudo é de modelos de queimadura de contato. Não apenas houve mais estudos, mas a gama de temperaturas e tempos de contato aplicados para gerar queimaduras de contato era maior do que para queimaduras por escaldadura. Em um dos estudos, reportado por Derakhshanfar et al. 2019 [21], para modelo de queimaduras com padronização de temperatura (95°C) e tempo (15 segundos), com comparações de escaldadura e contato, constatou-se que apesar dos mesmos tempos e temperatura, a histologia confirmou que a escaldadura produziu um dano menos severo EPDP, contra a queimadura de contato que produziu uma lesão de ET, resultado este, que pode ser explicado pelo contato direto da barra de latão aquecida com a pele e somado a este fator a pressão manual do controlador, resultando em espessuras diferentes, mesmo que aplicado a mesma técnica [54-55].

Tabela 7 Medidas de resultado para cada estudo incluído na revisão.

Autor (ref)	Mecanismo de queimadura	Condições de queimadura: temperatura (°C) /duração (s)				Tempo de biópsia pós-queimadura (dia)	Método de Coloração	Marcadores histológicos para profundidade lesão
		Superficial	EPS	EPDP	ET			
Ahn et al. [26]	Contato				170/2	1, 5, 14	H&E, PR	Colágeno, necrose tecidual
Andritoiu et al. [27]	Contato			100/9		1, 3, 6, 12, 21	H&E	Inflamação tecidual, ulceração, fibrose, granulação
Banerjee et al. [28]	Contato			85/10		1, 4, 7, 14, 21, 28	H&E, TM, Pentacromo, PR, Herovici	Colágeno
Bayat et al. [29]	Escaldadura				100/7	7, 16, 30	H&E	Angiogênese, granulação
Bhowmick et al. [30]	Contato			N/20		7, 14, 21	H&E, Van Gieson	Colágeno
Campelo et al. [6]	Contato		100/9	150/9	200/9	7	H&E	Reepitelização, lesão muscular
Derakhshanfar et al. [21]	Contato				95/15	7	H&E	Resposta inflamatória, reepitelização e granulação

H&E, Hematoxilina e Eosina; TM, tricrômico de Masson; PR, Picrosirius red. –Dados não extraíveis, pouco claros ou não disponíveis.

Tabela 7 Continuação

Autor (ref)	Mecanismo de queimadura	Condições de queimadura: temperatura (°C)/duração (s)				Tempo de biópsia pós-queimadura (dia)	Método de Coloração	Marcadores histológicos para profundidade lesão
		Superficial	EPS	EPDP	ET			
Derakhshanfaret al. [21]	Escaldadura			95/15		7	H&E	Resposta inflamatória, reepitelização e granulação
Eryani et al. [31]	Contato			N/20		3, 7, 14, 21	H&E, TM	Colágeno
Fowler et al. [32]	Contato				100/30	0, 1, 3, 7, 28	H&E	Colágeno, necrose tecidual, resposta inflamatória
Lee et al. [35]	Escaldadura			100/10		2, 14, 21	H&E, TM	Reepitelização, maturação da epiderme e derme, granulação, colagenização, células inflamatórias
Liu et al. [36]	Escaldadura				94/12	0, 1, 2, 3, 6, 8, 11	H&E	Células inflamatórias, capilares e colágeno tipos I/III
Lytvynyuk et al. [37]	Contato				97-99/15	1, 7, 14, 21	H&E, azul de toluidina	Modificações morfofuncionais de neurócitos
Ma et al. [38]	Escaldadura			75/15		7, 14, 21	H&E	Colágeno, células inflamatórias, fibroblastos, granulação

H&E, Hematoxilina e Eosina; TM, tricrômico de Masson; PR, Picrosirius red. –Dados não extraíveis, pouco claros ou não disponíveis.

Tabela 7 Continuação

Autor (ref)	Mecanismo de queimadura	Condições de queimadura: temperatura (°C)/duração (s)				Tempo de biópsia pós-queimadura (dia)	Método de Coloração	Marcadores histológicos para profundidade lesão
		Superficial	EPS	EPDP	ET			
Mohtasham Amiri et al. [39]	Contato				N	7, 14, 21	H&E	Reepitelização, angiogênese, granulação, inflamação
Nunes et al. [40]	Contato			N/20		7, 14, 21	H&E, Picro-Sirius	Perfil inflamatório, epitelização
Oliveira et al. [41]	Contato				N/20	7, 14, 21	H&E, Picro-Sirius red	Reação inflamatória, reepitelização, fibroblastos, colágeno, neoangiogênese
Ozcelik et al. [42]	Escaldadura		100/35			7	H&E, MT	Colágeno, estase, células inflamatórias
Hu et al. [33]	Contato			100/8		2	H&E	Necrose e zonas de estase
Ju et al. [34]	Contato			60/15		3, 7, 14, 21	H&E, TM	Deposição de colágeno e formação dérmica
Sawada et al. [43]	Escaldadura		99/10			5	H&E	Resposta inflamatória, necrose tecidual
Wang et al. [44]	Contato				N/30	3	H&E, MT	Colágeno, necrose, zonas de estase
Yang et al. [45]	Escaldadura			85/10		7, 14, 25, 31	H&E	Necrose epidermal
Yüksel et al. [46]	Contato		N/10			0, 7, 14, 21	H&E, MT	Fibroblastos, colágeno, vascularização

– A letra N representa os dados não disponíveis.

Tabela 8 As temperaturas e durações de exposição relatadas para criar queimaduras de gravidades diferentes.

Gravidade da queimadura	Mecanismo de lesão	Tempo médio (segundos)	Intervalo de tempo (segundos)	Temperatura média (°C)	Intervalo de temperatura (°C)	n
Superficial	Contato	10	10	60	60	1
EPS	Contato	9,7	09-10	82,5	65-100	3
EPS	Escaldadura	22,5	10-35	99,5	99-100	2
EPDP	Contato	13,6	8-20	95,3	60 -150	10
EPDP	Escaldadura	12,5	10-15	88,75	75 -100	4
ET	Contato	17,3	2-30	132,6	95 – 200	7
ET	Escaldadura	9,5	07-12	97	94 – 100	2

EPS, espessura parcial superficial; EPDP, espessura parcial dérmica profunda; ET, espessura total.

Comparação das condições de queimadura para queimaduras de gravidade equivalente

Queimaduras de contato

Embora muitos estudos de queimaduras de contato tenham sido incluídos, o agrupamento dos dados foi difícil devido à heterogeneidade de materiais usados nos dispositivos de queimadura, como: latão, alumínio, cobre, solda, metal não informado e material desconhecido. As propriedades térmicas de cada material são únicas, com capacidade e habilidade de transferir calor para o tecido, diferindo amplamente. Além disso, o método de aquecimento dos dispositivos e a pressão com a qual foram aplicados a pele, também diferia, o que tornou as comparações entre modelos desafiadoras. Portanto, uma análise quantitativa com meta-regressão não pôde ser realizada. Independentemente, houve uma associação aparente entre a gravidade da queimadura e a duração média da exposição, com a gravidade da queimadura aumentando à medida que a duração média de exposição ao dispositivo aumentava. Tempo médio de contato de 10, 13,6 e 17,3 segundos foram relatados para queimaduras de contato superficial, EPDP e ET, respectivamente.

A média das condições de queimadura de contato relatadas para causar lesões de EPDP foi 95,3 °C por 13,6 segundos. Este dado é de suma importância, servindo como guia para estudos de desenvolvimento de modelos futuros, embora exista a problemática da grande variedade de materiais utilizados para confeccionar as queimaduras de contato. Guo et al. (2017) [17] propuseram uma queimadura de EPDP com padrões de 70 °C por 10 segundos e Andritoiu et al. (2020) [27] 100 °C por 9 segundos, esta grande diferença (30 °C) poderia ser explicado pela divergência de calor específico entre os metais utilizados, enquanto o primeiro utilizou alumínio, com calor específico de 0,22 cal/(g.°C) o segundo utilizou cobre 0,094 cal/(g.°C) que apresenta 2,3 vezes menos calor específico que o alumínio, necessitando deste

modo de mais calor que o primeiro modelo; somado a estes fatores o trabalho de Guo et al. (2017) [17] aplicou uma força de 300 gramas, considerada elevada se compararmos com outros autores, Pereira et al. (2012) [7] 51 gramas e Campelo [6] et al 85 gramas, fator este de considerável importância na profundidade da lesão. Singh et al. (2016) [56] sugerem que exista uma correlação entre a quantidade real de calor transferido e a gravidade da lesão, aumentando desta maneira a eficácia de padronização dos estudos futuros. Apesar de não se enquadrar no escopo deste artigo, os dados coletados aqui fornecem um recurso valioso para estudos de modelagem matemática, que podem considerar variáveis como calor específico, densidade e condutividade térmica do material usado frente a área de contato. A Comparação da quantidade real de calor entregue por diferentes materiais, em comparação com a severidade da lesão, teria um enorme benefício para os pesquisadores.

Queimaduras por escaldamento

Todos os modelos de queimadura de escaldadura incluídos usaram água quente para criar as queimaduras, com exceção dos trabalhos de Ozcelik et al. (2016) [42] e Sawada et al. (1997) [43] que utilizaram esponja e tecido de algodão, respectivamente, embebidos com água fervente. Incluindo todos os estudos de escaldadura, as condições médias de queimadura necessárias para causar uma queima de EPDP foram de $88,8 \pm 9,6^{\circ}\text{C}$ por $12,5 \pm 2,5$ segundos. Este resultado é comparável a um estudo recente que investigou derramamentos de bebidas quentes usando dados experimentais de substitutos de tecido da pele e simulações numéricas [57], os autores estimaram que uma lesão mediana da derme resultaria de um derramamento com água acima de 82°C onde a roupa saturada foi deixada em contato com a pele por 30 segundos. Este resultado é muito semelhante às conclusões de Abraham et al. (2015) [58] que identificaram por modelo computacional que é necessária uma temperatura de no mínimo aproximadamente 77°C por 10 segundos para produzir uma lesão EPDP.

Queimaduras de contato versus escaldadura

As Comparações entre as condições relatadas para causar queimadura por escaldadura e contato de gravidade equivalente só foi possível para queimaduras EPDP e ET. Uma disparidade era aparente para EPDP, com temperaturas substancialmente mais baixas e tempos de exposição mais curtos relatados para queimaduras por escaldadura ($88,8^{\circ}\text{C}$ por 12,5 segundos) em comparação com queimaduras de contato ($95,3^{\circ}\text{C}$ por 13,6 segundos), do mesmo modo para a queimadura de ET, escaldadura (97°C por 9,5 segundos) e contato ($132,6^{\circ}\text{C}$ por 17,3 segundos). Estes resultados podem ser surpreendentes se evidenciarmos a

condutividade térmica relativamente inferior da água em comparação com os metais. Contudo, a capacidade de calor específico da água é muito mais elevada quando comparada a dos metais descritos, podemos destacar o latão que é 10 vezes inferior. Portanto, a quantidade de energia térmica armazenado em água aquecida a 88 °C é maior do que uma haste de latão aquecida à mesma temperatura. Esta revisão demonstra a importância do efeito do mecanismo de lesão na gravidade da queimadura. Recomendamos que as condições de queimadura estabelecidas por modelos de contato em ratos para criar certa profundidade de lesão, forneçam dados mais precisos a fim de estabelecer uma padronização exata da lesão em estudo.

Entre as limitações que foram identificadas para as comparações entre os estudos, destacam-se, as diferentes classificações utilizadas para demonstrar a gravidade da lesão no tecido, como a avaliação da profundidade realizada em diferentes momentos pós-queimadura, somado a este fator, divergentes colorações usadas para coloração nos tecidos e heterogeneidade nos marcadores de lesão celular. Uma gama de estudos apresentava informações insuficientes para métodos e materiais na criação da queimadura. Além disso, alguns estudos não continham informações sobre as condições de queimadura, como profundidade ou gravidade, e se presente, não relatava claramente ou em gráficos, forçando uma interpretação subjetiva dos dados analisados. Também reconhecemos a possibilidade de viés de seleção devido à exclusão de artigos em que o texto completo não estava disponível em inglês. Esta revisão foi limitada a estudos onde a profundidade do dano foi determinada histologicamente dentro de 7 dias de criação da queimadura. Revisões futuras de modelos de queimadura em ratos, onde se investiga a medida do tempo de cicatrização, seria uma boa alternativa para adição de mais detalhes nesta área.

Conclusões

Esta nova revisão sistemática com 25 estudos incluídos fornece uma visão abrangente dos modelos de queimadura em ratos usados na pesquisa de lesões por queimadura. Em suma:

- No geral, a qualidade dos documentos incluídos foi de qualidade quando avaliados de acordo com as diretrizes ARRIVE.
- Apesar da disponibilidade de vários modelos bem validados, pesquisadores continuam a desenvolver novos modelos para uso em estudos que investigam tratamentos ou diagnósticos de queimaduras.
- As condições médias de queimadura relatadas para causar uma lesão de EPDP de escaldadura (88,8 °C por 12,5 segundos) são diferentes das de contato (95,3 °C por 13,6

segundos). A implicação clínica disto é que lesões de gravidade equivalente podem ser sustentadas a temperaturas mais baixas e/ou durações mais curtas com queimaduras por escaldadura.

- Continua difícil estimar a gravidade da lesão para a derme da exposição à água, como visto com escaldaduras de imersão em água quente a 100 °C e tempos variados 35, 10 e 7 segundos para queimaduras de EPS, EPDP e ET, respectivamente.

- A grande distinção entre os materiais que são utilizados para gerar modelos de queimadura de contato limita a detecção de condições necessárias para criar queimaduras de profundidade pré-definida. Fórmulas matemáticas, cálculos ou modelagem que estimem a quantidade de energia térmica gerada por cada aparelho são necessários.

- O principal objetivo desta revisão foi a realização de um estudo sistemático, permitindo deste modo uma nova análise com agrupamento dos resultados de diferentes estudos, avaliando de maneira prudente a relação entre: temperatura, duração e gravidade das queimaduras.

- Portanto, pode-se inferir que o resultado de qualquer método de tratamento, não pode ou não deve ser generalizado para todos os modelos de queimadura.

Referências

1. Centers for Disease Control and Prevention. 10 leading causes of injury deaths by age group highlighting unintentional injury deaths, United States. 2017; Available at: https://www.cdc.gov/injury/images/lccharts/leading_causes_of_death_by_age_group_unintentional_2017_1100w850h.jpg. Accessed January 27, 2020.
2. American Burn Association. Burn incidence and treatment in the United States: 2016. 2016. <http://www.ameriburn.org/resources%5ffactsheet.php>. Accessed 10 Jan 2021.
3. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2016: Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2016 [Internet]. Geneva: WHO; 2018. [cited 2018 Mai 10]. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/
4. Williams FN, Herndon DN, Jeschke MG (2009) The hypermetabolic response to burn injury and interventions to modify this response. *Clin Plast Surg* 36(4):583–596. doi:10.1016/j.cps.2009.05.001
5. Dae-Won, Kim; You-Young, Jo; Garagiola, Umberto; Choi, Je-Yong; Seong-Gon, Kim (2020) Increased Level of Vascular Endothelial Growth Factors by 4-hexylresorcinol is Mediated by Transforming Growth Factor- β 1 and Accelerates Capillary Regeneration in the Burns in Diabetic Animals. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.21(10), p.3473
6. Campelo APBS, Campelo MWS, Britto GA d C, Ayala AP, Guimarães SB, Vasconcelos PRL d (2011) An optimized animal model for partial and total skin thickness burns studies. *Acta Cir Bras* 26(1): 38–42
7. Pereira T, Dos Santos D, Lima-Ribeiro MHM, de Pontes-Filho NT, Carneiro-Leão AM d A, Correia MT d S (2012) Development of animal model for studying deep second-degree thermal burns. *Biomed Res Int* 2012(1):1–7
8. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke M (2014) Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci* 71(17):3241–3255
9. Abdeldjelil M, Messai A, Boudebza A, Beghoul S (2017) Practical aspects to generate cutaneous experimental burns in a rat model. *Pharm Lett* 9(1):70–84
10. Dahiya P (2009) Burns as a model of SIRS. *Front Biosci* 14:4962–4967 pii:3580

11. Arda, Mehmet Surhan; Kuas, Nilsun; Soztutar, Erdem; Kocman, Atacan Emre; Ilhan, Huseyin (2018) Comparison of Burn Depth at Different Temperatures on Ex Vivo Human Skin with Standardized Model and Comparison of the Results with Rat Contact Burn Model. *The Journal of Pediatric Research*, Vol.5(2), p.88(4)
12. Abdullahi, A.; Amini-Nik, S.; Jeschke, M. G. (2014). Animal models in burn research. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(17), 3241–3255. doi:10.1007/s00018-014-1612-5
13. Kumar P, Chirayil PT, Chittoria R (2000) Ten years epidemiological study of paediatric burns in Manipal, India. *Burns* 26(3):261–264
14. Akansel N, Yilmaz S, Aydin N, Kahveci R (2013) Etiology of burn injuries among 0–6 aged children in one University Hospital Burn Unit, Bursa, Turkey. *Int J Caring Sci* 6(2):208–215
15. Sheu SY, Wang WL, Fu YT, Lin SC, Lei YC, Liao JH, Tang NY, Kuo TF, Yao CH. The pig as an experimental model for mid-dermal burns research. *Burns* 2014; 40:1679–88
16. Wang X, Kimble RM (2010) A review on porcine burn and scar models and their relevance to humans. *Wound Pract Res*; 18:41–9.
17. Guo HF, Ali RM, Hamid RA, Zaini AA, Khaza'ai H. A new model for studying deep partial-thickness burn in rats. *Int J Burns Trauma*. 2017;7(6):107-14.
18. Qu M, Nourbakhsh M (2017) Current experimental models of burns. *Discov Med* 23(125):95–103
19. Meyer TN, Silva AL d (1999) A standard burn model using rats. *Acta Cir Bras* 14(4):1–7
20. Porumb V, Trandabăţ AF, Terinte C, Căruntu ID, Porumb-Andrese E, Dimofte MG, Pieptu D (2017) Design and testing of an experimental steam-induced burn model in rats. *Biomed Res Int* 2017(1):1–10

21. Derakhshanfar, Amin; Moayedi, Javad; Hashemi, Seyedeh-Sara; Vahedi, Mahjoob; Valizadeh, Abouzar. Comparative study on the effects of heated brass bar and scald methods in experimental skin burn in rat. *Comparative Clinical Pathology*, 2019, Vol.28(5), pp.1381-1385

22. Kilkenney C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Animals* 2014; 4:35–44

23. Jeschke, Marc G.; Van Baar, Margriet E.; Choudhry, Mashkoor A.; Chung, Kevin K.; Gibran, Nicole S.; Logsetty, Sarvesh (2020) Burn injury. *Nature Reviews. Disease Primers*, Vol.6(1)

24. Shupp JW, Nasabzadeh TJ, Rosenthal DS, Jordan MH, Fidler P, Jeng JC. A review of the local pathophysiologic bases of burn wound progression. *J Burn Care Res* 2010; 31:849–73.

25. Renkielska A, Nowakowski A, Kaczmarek M, Ruminski J. Burn depths evaluation based on active dynamic IR thermal imaging – a preliminary study. *Burns* 2006; 32:867–75.

26. Ahn, Janghoon; Kim, Seong-Gon; Kim, Min-Keun; Kim, Dae-Won; Lee, Jang-Ha; Seok, Hyun; Choi, Je-Yong (2016). Topical delivery of 4-hexylresorcinol promotes wound healing via tumor necrosis factor- α suppression. *Burns*, Nov;42(7):1534-1541. doi: 10.1016/j.burns.2016.04.016

27. Andritoiu, CV; Andriescu, CE; Ibanescu, C; Lungu, C; Ivanescu, B; Vlase, L; Havarneanu, C; Popa, M (2020) Effects and Characterization of Some Topical Ointments Based on Vegetal Extracts on Incision, Excision, and Thermal Wound Models. *Molecules* (Basel, Switzerland), 01 November, Vol.25(5356), p.5356

28. Banerjee, J; Seetharaman, S; Wrice, NL; Christy, RJ; Natesan, S; Song, J (2019) Delivery of silver sulfadiazine and adipose derived stem cells using fibrin hydrogel improves infected burn wound regeneration. *PLOS ONE*, 14(6), e0217965–. doi:10.1371/journal.pone.0217965

29. Bayat, M; Vasheghani, MM; Razavi N (2006) Effect of low-level helium–neon laser therapy on the healing of third-degree burns in rats. 83(2), 87–93. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2005.12.009

30. Bhowmick, S; Thanusha, AV; Kumar, A; Scharnweber, D; Rother, S; Koul, V (2018) Nanofibrous artificial skin substitute composed of mPEGPCL grafted gelatin/hyaluronan/chondroitin sulfate/sericin for 2 nd degree burn care: *in vitro* and *in vivo* study. RSC Advances, Vol.8(30), pp.16420-16432

31. Eryani, A; Sukmawati, D; Damayanti, L; Angmalisang, EC; Pawitan, JÁ (2018) The Healing Effect of Adipose-derived Stem Cell Conditioned Medium on Burn Wound Model. Trends in Biomaterials and Artificial Organs, Vol.32(1), p.18

32. Fowler, M; Clifford, JL; Garza, TH; Slater, TM; Arizpe, HM; Novak, J; Petz, LN; Loyd, DR (2014) A rat model of full thickness thermal injury characterized by thermal hyperalgesia, mechanical allodynia, pronociceptive peptide release and tramadol analgesia. Burns, 40(4), 759–771. doi: 10.1016/j.burns.2013.10.011

33. Hu, X; Wang, X; Hong, X; Fan, H; Zhang, X; Chen, A; Wang, G; Jin, J; Xia, Z (2020) Modification and utility of a rat burn wound model. Wound Repair and Regeneration, November, Vol.28(6), pp.797-811, wrr.12855–. doi:10.1111/wrr.12855

34. Ju, H; Lee, Ok; Moon, Bo; Sheikh, F; Lee, J; Kim, Jung-Ho; Park, H; Kim, D; Lee, M; Kim, S; Park, C; Lee, H (2014) Silk fibroin based hydrogel for regeneration of burn induced wounds. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Vol.11(3), pp.203-210

35. Lee, K; Lee, B; Lee, Mi-Hwa; Kim, B; Chinannai, KS; Ham, I; Choi, Ho-Young (2015) Effect of Ampelopsis Radix on wound healing in scalded rats. BMC Complementary and Alternative Medicine, 15(1), 213–. doi:10.1186/s12906-015-0751-z

36. Liu, L; Yu, Y; Hou, Y; Chai, J; Duan, H; Chu, W; Zhang, H; Hu, Q; Du, J; Covas, D T (2014) Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Transplantation Promotes Cutaneous Wound Healing of Severe Burned Rats. PLoS ONE, 9(2), e88348–. doi:10.1371/journal.pone.0088348

37. Lytvyniuk, SO; Volkov, KS; Nebesna, Z M (2016) Morphofunctional Modifications of Neurocytes of the Rat Hippocampal CA3 Area after Experimental Thermal Trauma. *Neurophysiology*, 48(6), 399–406. doi:10.1007/s11062-017-9616-z
38. Ma, K; Du, M; Liao, M; Chen, S; Yin, G; Liu, Q; Wei, Q; Qin, G (2015) Evaluation of Wound Healing Effect of Punica granatum L Peel Extract on Deep Second-Degree Burns in Rats. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, Vol.14
39. Mohtasham Amiri, Z; Tanideh, N; Seddighi, A; Mokhtari, M; Amini, M; Shakouri Partovi, A; Manafi, A; Hashemi, SS; Mehrabani, D (2017) The Effect of Lithospermum officinale, Silver Sulfadiazine and Alpha Ointments in Healing of Burn Wound Injuries in Rat. *World Journal of Plastic Surgery*, Vol.6(3), p.313-318
40. Nunes, PS; Albuquerque-Júnior, RLC; Cavalcante, DRR.; Dantas, MDM; Cardoso, JC; Bezerra, MS; Souza, JCC; Serafini, MR; Quitans-Jr, LJ; Bonjardim, LR; Araújo, A A S (2011) Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 9 pages, 1–9. doi:10.1155/2011/761593
41. Oliveira, PC; Pinheiro, Alb; Reis, Ja; De Castro, Icv; Gurgel, C; Noia, MP; Meireles, Gcs; Cangussu, MC; Ramalho, Lmp (2010) Polarized Light (λ 400-2000 nm) on Third-Degree Burns in Diabetic Rats: Immunohistochemical Study. *Photomedicine And Laser Surgery*, Oct, Vol.28(5), pp.613-619
42. Ozcelik, U; Ekici, Y; Bircan, HY; Aydogan, C; Turkoglu, S; Ozen, O; Moray, G; Haberal, M (2016) Effect of Topical Platelet-Rich Plasma on Burn Healing After Partial-Thickness Burn Injury. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, Vol.22, p.1903-1909
43. Sawada Y; Urushidate S; Yotsuyanagi T; Ishita K (1997) Is prolonged and excessive cooling of a scalded wound effective? 23(1), 0–58. doi:10.1016/s0305-4179(96)00080-0
44. Wang, CZ; Ayadi, AEI; Goswamy, J; Finnerty, CC.; Mifflin, R; Sousse, L; Enkhbaatar, P; Papaconstantinou, J; Herndon, DN.; Ansari, NH (2015) Topically applied metal chelator

reduces thermal injury progression in a rat model of brass comb burn. *Burns*, 41(8), 1775–1787. doi: 10.1016/j.burns.2015.08.012

45. Yang, X; Yang, R; Chen, M; Zhou, Q; Zheng, Y; Lu, C; Bi, J; Sun, W; Huang, T; Li, L; Gong, J; Li, X; Hui, Qi; Wang, X (2020) KGF-2 and FGF-21 poloxamer 407 hydrogel coordinates inflammation and proliferation homeostasis to enhance wound repair of scalded skin in diabetic rats. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 2020, Vol.8

46. Yüksel, EB; Yıldırım, AM; Bal, A; Kuloglu, T (2014) The Effect of Different Topical Agents (Silver Sulfadiazine, Povidone-Iodine, and Sodium Chloride 0.9%) on Burn Injuries in Rats. *Plastic Surgery International*, 1–6. doi:10.1155/2014/907082

47. Meyer TN, Silva AL. A standard burn model using rats. *Acta Cir Bras* [serial online] 1999;14(October–December (4)). Available from: URL: <http://www.scielo.br/acb>. Google Scholar

48. Singer AJ, Berruti L, Thode HC Jr, McClain SA (2000) Standardized burn model using a multiparametric histologic analysis of burn depth. *Acad Emerg Med* 7(1):1–6

49. Gurfinkel R, Singer AJ, Cagnano E, Rosenberg L (2010) Development of a novel animal burn model using radiant heat in rats and swine. *Acad Emerg Med* 17(5):514–520

50. Horiuchi N, Suda T, Sasaki S, Takahashi H, Shimazawa E, Ogata E (December 1976). "Absence of regulatory effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ on 25-hydroxyvitamin D metabolism in rats constantly infused with parathyroid hormone". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 73 (4): 869–75. doi:10.1016/0006-291X (76)90202-3. PMID 15625855

51. Seyhan, Nevra Valenta, Patricia (2020) Evaluation of the Healing Effects of and Curcumin on Burn Wounds in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol.2020, 5 pages

52. Sone H, Takahashi A, Iida K, Yamada N. Disease model: Hyperinsulinemia and insulin resistance. Part B – polygenic and other animal models. *Trends Mol Med* 2001; 7:373-6.

53. Singer A, McClain S. A porcine burn model. In: DiPietro L, Burns A, editors. Wound healing. Humana Press, NJ, USA. 2003:107–19.
54. Papp A, Kiraly K, Härmä M, Lahtinen T, Uusaro A, Alhava E (2004) The progression of burn depth in experimental burns: a histological and methodological study. *Burns* 30(7):684–690
55. Kempf M, Cuttle L, Liu P-Y, Wang X-Q, Kimble RM (2009) Important improvements to porcine skin burn models, in search of the perfect burn. *Burns* 35(3):454–455
56. Singh M, Nuutila K, Minasian R, Kruse C, Eriksson E (2016) Development of a precise experimental burn model. *Burns*; 42:1507–12.
57. Abraham JP, Nelson-Cheeseman BB, Sparrow E, Wentz JE, Gorman JM, Wolf SE. Comprehensive method to predict and quantify scald burns from beverage spills. *Int J Hyperthermia* 2016; 32:1–22.
58. Abraham, John P.; Plourde, Brian; Vallez, Lauren; Stark, John; Diller, Kenneth R. (2015). Estimating the time and temperature relationship for causation of deep-partial thickness skin burns. *Burns* 41:1741–7.

4 CONCLUSÕES

- De acordo com os resultados obtidos, foi possível obter hidrogéis estáveis compostos por 1,7% (p/v) de galactomanana (de Sementes de *Cassia grandis*) e 0,5% (p/v) de k-carragenana, com 0,2 M de CaCl_2 a pH 5,0 acrescidos ou não de lactoferrina e/ou Cramoll 1,4, não havendo mudanças significativas no pH e nenhuma contaminação microbiana ao longo do tempo de estocagem.
- Foi observada diminuição da opacidade e aumento da transparência ao longo dos 90 dias de armazenamento a 4 °C, com tendência de a^* à coloração verde e b^* ao amarelo, resultados estes favoráveis para aplicações diárias, com possíveis observações macroscópicas da evolução da lesão.
- Os estudos reológicos confirmaram a característica sólida e viscoelástica dos hidrogéis, mantendo esta característica mesmo após adição das proteínas estudadas, resultados favoráveis considerando a não alteração da reologia padrão do hidrogel de polissacarídeos.
- A reologia também confirmou a importância da adição do CaCl_2 e k-carragenana ao hidrogel, que preserva o módulo G' superior ao módulo G'' .
- As análises macroscópicas revelaram queimaduras térmicas de cor branca, sem bolhas com leve edema; cicatrização centrípeta com recobrimento de crosta no sétimo dia e conjuntamente com a retração da lesão foi confirmado um melhor reparo para o grupo HLC.
- Corroborando com as análises macroscópicas e de retração das queimaduras, as análises histopatológicas confirmaram que a aplicação tópica regular do hidrogel contendo lactoferrina e Cramoll-1,4 na concentração de 100 μg para o tratamento de queimaduras cutâneas de segundo grau, acelerou os processos de granulação, reepitelização e retração da ferida em ratos Wistar.
- Deste modo, podemos concluir que os hidrogéis, com destaque para o grupo HLC possui propriedades físicas adequadas e estáveis, mostrado ser uma alternativa eficaz para substituir curativos sintéticos na cicatrização de queimaduras, com potencial de aplicação na indústria médica e cosmética.

- Apesar da disponibilidade de vários modelos bem validados, pesquisadores continuam a desenvolver novos modelos para uso em estudos que investigam tratamentos ou diagnósticos de queimaduras.

- As condições médias de queimadura relatadas para causar uma lesão de EPDP de escaldadura (88,8 °C por 12,5 segundos) são diferentes das de contato (95,3 °C por 13,6 segundos). A implicação clínica disto é que lesões de gravidade equivalente podem ser sustentadas a temperaturas mais baixas e/ou durações mais curtas com queimaduras por escaldadura.

- Continua difícil estimar a gravidade da lesão para a derme da exposição à água, como visto com escaldaduras de imersão em água quente a 100 °C e tempos variados 35, 10 e 7 segundos para queimaduras de EPS, EPDP e ET, respectivamente.

- Portanto, pode-se inferir que o resultado de qualquer método de tratamento, não pode ou não deve ser generalizado para todos os modelos de queimadura.

REFERÊNCIAS

AHMED, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, 6(2), 105–121. doi:10.1016/j.jare.2013.07.006

ALBUQUERQUE, G.S.; SILVA, L. C.N.; LIMA-RIBEIRO, M.H.M.; NETO, J.C.S.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; TEIXEIRA, J.A.C.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **International Journal of Biological Macromolecules** Volume 102, September 2017, Pages 749-757

ALBUQUERQUE, P.B.S; BARROS, W.; SANTOS, G.R.C; CORREIA, M.A.T.S; MOURÃO, P.A.S.; TEIXEIRA, J.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. **Carbohydrate polymers**, 15 April 2014, Vol.104, pp.127-134

ALBUQUERQUE, P.B.S; SOARES, P.A.G; ARAGÃO-NETO, A.C.; ALBUQUERQUE, G.S.; SILVA, L.C.N.; LIMA-RIBEIRO, M.H.M; SILVA NETO, JACINTO C; COELHO, L.C.B.B; CORREIA, M.T.S; TEIXEIRA, J.A.C; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, September 2017, Vol.102, pp.749-757

ALMEIDA, RAIMUNDO R.; MAGALHÃES, HEBERT S.; SOUZA, JOSÉ R.R.; TREVISAN, MARIA T.S.; VIEIRA, ÍCARO G.P.; FEITOSA, JUDITH P.A.; ARAÚJO, TAMARA G; RICARDO, NÁGILA M.P.S. Exploring the potential of *Dimorphandra gardneriana* galactomannans as drug delivery systems. **Industrial Crops and Products**, Volume 69, July 2015, Pages 284-289

ANDRADE, F.J.E.T.; ALBUQUERQUE, P.B.S.; SEIXAS, J.R.P.C.; FEITOZA, G.S.; JÚNIOR BARROS, W.; VICENTE, A.A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.. Influence of *Cassia grandis* galactomannan on the properties of sponge cakes: a substitute for fat. **Food & Function**, 2018, Vol.9(4), pp.2456-2468.

ANGHELACHE, M. TEODORESCU, P.O. STANESCU, C. DRAGHICI, D.M. VULUGA. Novel crosslinked thermoresponsive hydrogels with controlled poly (ethylene glycol)-poly (propylene glycol) multiblock copolymer structure. **Colloid Polym Sci**, 292 (2014), pp. 829-838

ANNABI, N.; TAMAYOL, A.; UQUILLAS, J.A.; AKBARI, M.; BERTASSONI, L. E.; CHA, C.; CAMCI-UNAL, G.; DOKMECI, M. R.; PEPPAS, N. A.; KHADEMHOSEINI, A. 25th anniversary article: rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. **Adv Mater** 26:85–124, 2014.

APONTE SANTAMARÍA, C.A.; HUCK, V.; POSCH, S.; BRONOWSKA, A.K.; GRÄSSLE, S.; BREHM, M. A.; OBSER, T.; SCHNEPPENHEIM, R.; HINTERDORFER, P.; SCHNEIDER, S.W.; BALDAUF, C.; GRÄTER, F. Mechanosensitive Von Willebrand Factor Protein-Protein Interactions Regulate Hemostasis. **Biophysical Journal**, 27 January 2015, Vol.108(2), pp.505a-505^a.

ARGENTA, A., & DEMOS, J. (2017). Burn Management in the Developing World. **Clinics in Plastic Surgery**, 44(4), 875–883. doi: 10.1016/j.cps.2017.05.019

AUGUSTINE, ROBIN; KALARIKKAL, NANDAKUMAR; THOMAS, SABU. Advancement of wound care from grafts to bioengineered smart skin substitutes. **Progress in Biomaterials**, 2014, Vol.3, p.103-113

BAGLIN, TREVOR. Disseminated intravascular coagulation: Diagnosis and treatment. **British Medical Journal**, Mar 16, 1996, Vol.312(7032), p.683

BANDO, T., YOKOYAMA, H., & NAKAMURA, H. (2018). Wound repair, remodeling, and regeneration. **Development, Growth & Differentiation**, 60(6), 303–305. doi:10.1111/dgd.12566

BANERJEE, JAIDEEP; SEETHARAMAN, SHANMUGANATHAN; WRICE, NICOLE L.; CHRISTY, ROBERT J.; NATESAN, SHANMUGASUNDARAM. Delivery of silver sulfadiazine and adipose derived stem cells using fibrin hydrogel improves infected burn wound regeneration. **PLoS ONE**, June 13, 2019, Vol.14(6), p.e0217965

BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. (2006). Normal Cutaneous Wound Healing: Clinical Correlation with Cellular and Molecular Events. **Dermatologic Surgery**, 31(6), 674–686.

doi:10.1111/j.1524-4725.2005.31612

BELMONTE, B.R; NAPOLEÃO, T.H; PONTUAL, E.; ALBUQUERQUE, L.; SÁ, R.A; PAIVA, L.M; COELHO, L.C.B.; PAIVA, P.M.G – Atividade Inseticida de Lectina de *Myracrodruon Urundeuva* contra *Sitophilus Zeamais*. - I Conicbio / II Conabio / VI Simcbio (V. 2). –Ucpe – Recife – PE, Nov. 2013

BERA, HRIDAY; ABBASI, YASIR FARAZ; GAJBHIYE, VIRENDRA; LIEW, KOK FUI; YANG, MINGSHI. Carboxymethyl fenugreek galactomannan-g-poly(N-sopropylacrylamide-co-N, N'-methylene-bis-acrylamide)-clay based pH/temperature-responsive nanocomposites as drug-carriers. **Materials Science and Engineering: C**, Volume 110, May 2020

BERTHON, J.-Y., NACHAT-KAPPES, R., BEY, M., CADORET, J.-P., RENIMEL, I., & FILAIRE, E. (2017). Marine algae as attractive source to skin care. *Free Radical Research*, 51(6), 555–567. doi:10.1080/10715762.2017.1355550

BERTON, SHARISE B.R.; JESUS, GUILHERME A.M.; SABINO, ROBERTA M.; MONTEIRO, JOHNY P.; VENTER, SANDRO A.S.; BRUSCH, MARCOS L.; POPAT, KETUL C.; MATSUSHITA, MAKOTO; MARTINS, ALESSANDRO F.; BONAFÉ, ELTON G. Properties of a commercial κ -carrageenan food ingredient and its durable superabsorbent hydrogels **Carbohydrate Research**. Volume 487, January 2020, 107883

BOKKHIM, H., BANSAL, N., GRØNDAHL, L., BHANDARI, B. Physico- 711 chemical properties of different forms of bovine lactoferrin. **Food Chemistry** 712 141(3), 3007-3013, 2013.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portal do Governo Brasileiro**. Terça, 04 de Julho de 2017.

BUGGE T.H., K.W. KOMBRINCK, M.J. FLICK, C.C. DAUGHERTY, M.J.S. DANTON, J.L. DEGEN. Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency *Cell*, 87 (1996), pp. 709-719

BULL JP, SQUIRE JR, TOPLEY E. Experiments with occlusive dressings of new plastic. **Lancet** 1948;252(6519):213–5.

BUWALDA, SYTZE; BOERE, J.K.; DIJKSRA, P.; FIEJEN, J.; VERMODEN, T.; HENNINK, W. Hydrogels in an Historical Perspective: From Simple Networks to Smart Materials. **Journal of Controlled Release**, pages 254-273, 2014.

CAMACHO, N.N. – Expressão heteróloga da lectina de *Bauhinia forficata* em *Escherichia coli* e efeito sobre linhagens clulares tumorais. **Tese de Mestrado** – UFPELOTAS - Pelotas – 2007

CAPALLERE, C.; PLAZA, C.; MEYRIGNAC, C.; ARCIONI, M.; BRULAS, MARIE; BUSUTTIL, VALÈRE; GARCIA, IMANE; BAUZA, ÉRIC; BOTTO, JEAN-MARIE. Property characterization of reconstructed human epidermis equivalents, and performance as a skin irritation model. **Toxicology in vitro**, December 2018, Vol.53, pp.45-56

CERQUEIRA, M.A., BOURBON, A.I., PINHEIRO, A.C. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends Food Sci. Technol.** 22,662–671, 2011.

CESTARI, SILMARA DA COSTA PEREIRA. Dermatologia pediátrica: Diagnóstico e tratamento. 1ª Edição. Editora dos Editores, 2018.

CHAN, B.Q.Y.; LOW, Z.W.K.; HENG, S.J.W.; CHAN, S.Y.; OWH, C.; LOH, X.J. Recent Advances in Shape Memory Soft Materials for Biomedical Applications. **ACS Applied Materials and Interfaces**, 27 April 2016, Vol.8(16), pp.10070-10087

CHEN, QIANRU; GAO, XIANG; ZHANG, HONGWEI; LI, BAFANG; YU, GUANGLI; LI, BO. Collagen peptides administration in early enteral nutrition intervention attenuates burn-induced intestinal barrier disruption: Effects on tight junction structure. **Journal of functional foods**, April 2019, Vol.55, pp.167-174

CHOI, HONG JOON; CHOI, SOMANG; KIM, JAE GYOON; SONG, MI HYUN; SHIM, KYU-SIK; LIM, YOUN-MOOK; KIM, HAK-JUN; PARK, KYEONGSOON; KIM, SUNG

EUN. Enhanced tendon restoration effects of anti-inflammatory, lactoferrin-immobilized, heparin-polymeric nanoparticles in an Achilles tendinitis rat model. **Carbohydrate polymers**, 01 August 2020, Vol.241

CHOUAIBI, MONCEF; REZIG, LEILA; LAKOUD, ATEF; BOUSSAID, AMEL; HASSOUNA, MNASSER; FERRARI, GIOVANNA; HAMDI, SALEM. Exploring potential new galactomannan source of *Retama reatam* seeds for food, cosmetic and pharmaceuticals: Characterization and physical, emulsifying and antidiabetic properties. **International Journal of Biological Macromolecules**. Volume 124, 1 March 2019, Pages 1167-1176

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N.V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**, 1991 Jan, Vol.3(1), pp.1-9

CLARK, R.A.F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M.G. Tissue engineering for cutaneous wounds. J. Investig. **Dermatol.**, 127 (2007), pp. 1018-1029

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, P. M. S.; LIMA, V. L. DE M.; PONTUAL, E. V.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEAO, T. H.; CORREIA, M. T. S. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017, Vol.2017.

COELHO, L.C.B.B.; SILVA, P.M.S.; LIMA, V.L.M.; PONTUAL, E.V.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEAO, T.H.; CORREIA, M.T.S.
Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017, Vol.2017.

DA CUNHA, C.R.A.; DA SILVA, L.C.N.; ALMEIDA, F.J. F; FERRAZ, M.S.; VAREJÃO, N.; CARTAXO, M.F.S.; DE MIRANDA, R.C.M.; DE AGUIAR, F.C.A.; SANTOS, N.P. S.; COELHO, L.C. B. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; CORREIA, M.T.S. Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant Cratylia mollis Lectin Expressed in Escherichia coli. **Frontiers in Microbiology**, 2016, Vol.7

DAFE, ALIREZA; ETEMADI, HOSSEIN; ZARREDAR, HABIB; MAHDAVINIA, GHOLAM REZA. Development of novel carboxymethyl cellulose/k-carrageenan blends as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. **International journal of biological macromolecules**, April 2017, Vol.97, pp.299-307

DE ALMEIDA, E. B., CORDEIRO CARDOSO, J., KARLA DE LIMA, A., DE OLIVEIRA, N. L., DE PONTES-FILHO, N. T., OLIVEIRA LIMA, S., ... DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. (2013). The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(2), 419–425. doi: 10.1016/j.jep.2013.03.031

DE MEDEIROS, M. L.; ARAÚJO-FILHO, I.; DA SILVA, E. M. N.; DE SOUSA QUEIROZ, W. S.; SOARES, C. D.; DE CARVALHO, M. G. F.; MACIEL, M. A. M. (2016). Effect of low-level laser therapy on angiogenesis and matrix metalloproteinase-2 immunoexpression in wound repair. **Lasers in Medical Science**, 32(1), 35–43. doi:10.1007/s10103-016-2080-y

DE OLIVEIRA, P.S.; RÊGO, M.J.; DA SILVA, R.R.; CAVALCANTI, M.B.; GALDINO, S.L.; CORREIA, M.T.; COELHO, L.C.B.B.; PITTA, M.G.R. Cratylia mollis 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. **BioMed Res. Int.**, 2013, 263968-263968.

DEMLING R.H., C. LALONDE, Burn trauma, vol. 4, **Thieme Medical Pub**, New York (1989)

DRAGO-SERRANO, M. E.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R.; CARRERO, J. C.; DE, L. G. M. Lactoferrin: Balancing Ups and Downs of Inflammation Due to Microbial Infections. **International Journal of Molecular Sciences**. 18, 501. 2017.

EBARA M., Y. KOTSUCHIBASHI, R. NARAIN, N. IDOTA, Y.-J. Kim, J.M. Hoffman, et al. *Smart Hydrogels* (2014), p. 9

EL HOSARY, R., EL-MANCY, S. M. S., EL DEEB, K. S., EID, H. H., EL TANTAWY, M. E., SHAMS, M. M., ... SLEEM, A. A. (2019). Efficient wound healing composite hydrogel using Egyptian Avena sativa L. polysaccharide containing β -glucan. **International Journal**

of Biological Macromolecules. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.11.046 Elastomeric nanocomposite scaffolds made from poly(glycerol sebacate) chemically crosslinked with carbon nanotubes. **Biomaterials Science**, 2015, Vol.3(1), pp.46-58

EMBLETON, N.D., BERRINGTON, J.E., MCGUIRE, W., STEWART, C.J., CUMMINGS, S.P. Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine** 18(3), 143-149, 2013.

EYUBOGLU, A. A., UYSAL, C. A., OZGUN, G., COSKUN, E., MARKAL ERTAS, N., & HABERAL, M. (2018). The effect of adipose derived stromal vascular fraction on stasis zone in an experimental burn model. **Burns**, 44(2), 386–396. doi: 10.1016/j.burns.2017.08.016

FALCÓ, Irene; RANDAZZO, Walter; SÁNCHEZ, Gloria; LÓPEZ-RUBIO, Amparo; FABRA, María José. On the use of carrageenan matrices for the development of antiviral edible coatings of interest in berries. **Food Hydrocolloids**. Volume 92, July 2019, Pages 74-85

FDA, **CP Kelco** (n.d.). <https://www.cpkelco.com/press-releases/united-states-fda-confirms-safety-of-carrageenan-as-food-ingredient/>(accessed February 11, 2019)

FEBRIYENTI, FEBRIYENTI; LUCIDA, HENNY; ALMAHDY, ALMAHDY; ALFIKRIYAH, ISTIANAH; HANIF, MUHAMMAD. Wound-healing effect of honey gel and film. **Journal of Pharmacy and Bio Allied Sciences**, 2019, Vol.11(2), p.176

FEKRAZAD, R., SARRAFZADEH, A., KALHORI, K. A. M., KHAN, I., ARANY, P. R., & GIUBELLINO, A. (2018). Improved Wound Remodeling Correlates with Modulated TGF-beta Expression in Skin Diabetic Wounds Following Combined Red and Infrared Photobiomodulation Treatments. **Photochemistry and Photobiology**, 94(4), 775–779. doi:10.1111/php.12914

FERNANDES, M.P., N.M. INADA, M.R. CHIARATTI, F.F.B. ARAÚJO, F.V. MEIRELLES, M.T.S. CORREIA, L.C.B.B. COELHO, M.J.M. ALVES, F.R. GADELHA, A.E. VERCESI. Mechanism of Trypanosoma cruzi death induced by Cratylia mollis seed lectin, **J. Bioenerg. Biomembr.** 42 (2010) 69–78.

FIGUEIRÔA, E.O.; SOUZA, M. Â.A.; VAREJÃO, N.; ROSSATO, F. A.; COSTA, R. Alves P.; FIGUEIRA, T. R.; SILVA, L. C. N.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E.; CORREIA, M. T. S. pCramoll and rCramoll lectins induce cell death in human prostate adenocarcinoma (PC-3) cells by impairment of mitochondrial homeostasis. **Toxicology in Vitro**. Volume 43, September 2017, Pages 40-46

FRONCZEK, J.; LULF, R.; KORKMAZ, H. I.; WITTE, B.I.; VAN DE GOOT, F.R.W.; BEGIENEMAN, M.P.V; KRIJNEN, P.A.J; ROZENDAAL, L.; NIESSEN, H.W.M.; REIJNDERS, UDO J.L. Analysis of morphological characteristics and expression levels of extracellular matrix proteins in skin wounds to determine wound age in living subjects in forensic medicine. *Forensic Science International*, January 2015, Vol.246, pp.86-91.

GAO, R.; WATSON, M.; CALLON, K.E.; TUARI, D.; DRAY, M.; NAOT, D.; AMIRAPU, S.; MUNRO, J.T.; CORNISH, J.; MUSSON, D.S. Local application of lactoferrin promotes bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model as demonstrated by micro-CT and histological analysis. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, January 2018, Vol.12(1), pp. e620-e626

GARCIA, P.L.; HUANG, S.A.; CORLEW, M.D.; AERON, L.K.; AERON, L.Y.; RAI, L. S.; JOVIC, L.G.; AGAG, L.R. Factors Affecting Burn Contracture Outcome in Developing Countries: A Review of 2506 Patients. **Annals of Plastic Surgery**, 2016, Vol.77(3), pp.290-296

GARCÍA-MONTOYA, ISUI ABRIL; CENDÓN, TANIA SIQUEIROS; ARÉVALO-GALLEGOS, SIGIFREDO; RASCÓN-CRUZ, QUINTÍN. Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. **Biochimica et biophysica acta**. General subjects, March 2012, Vol.1820(3), pp.226-236

GARNICA-PALAFOX, I. M., SÁNCHEZ-ARÉVALO, F. M. Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, 151:1073-81. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.06.036, 2016.

GERMANO, T. A.; AGUIAR, R. P.; BASTOS, M. S. R.; MOREIRA, R. A.; MIRANDA, M. R.A. Galactomannan-carnauba wax coating improves the antioxidant status and reduces

chilling injury of 'Paluma' guava. **Postharvest Biology and Technology**, Volume 149, March 2019, Pages 9-17

GONZÁLEZ OCAMPO, J.I.; DE PAULA, MACHADO M.M.; BASSOUS, N.J.; LOBO, A.O.; OROZCO, OSSA C.P.; WEBSTER, T.J. Osteoblast responses to injectable bone substitutes of kappa-carrageenan and nano hydroxyapatite. **Acta Biomater**, 83 (2019), pp. 425-434,

GONZALEZ, A. C. O.; COSTA, T. F.; ANDRADE, Z. A.; MEDRADO, A. R. A. P. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 01 October 2016, Vol.91(5), pp.614-620

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, SUSANA A; ARÉVALO-GALLEGOS, SIGIFREDO; RASCÓN-CRUZ, QUINTÍN. Lactoferrin: structure, function and applications. **International journal of antimicrobial agents**, 2009, Vol.33(4), pp.301.e1-301.e8

GRENHA A.; DIONÍSIO, M.; Locust bean gum: Exploring its potential for biopharmaceutical applications. **J. Pharm. Bioallied Sci.** 4 (2012) 175. doi:10.4103/0975-7406.99013.

GRIGGS, D.; STAFFORD-SMITH, M.; GAFFNEY, O.; ROCKSTRÖM, J.; ÖHMAN, M. C.; SHYAMSUNDAR, P.; STEFFEN, W.; GLASER, G.; KANIE, N.; NOBLE, I. Policy: Sustainable development goals for people and planet. **Nature**, 2013, Vol.495(7441), p.305

GUAN, T., ZHAO, G., DUAN, H., LIU, Y., & ZHAO, F. (2017). Activation of type 2 cannabinoid receptor (CB2R) by selective agonists regulates the deposition and remodelling of the extracellular matrix. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 95, 1704–1709. doi: 10.1016/j.biopha.2017.09.085

GUO, C.; YANG, Z.H.; ZHANG, S.; CHAI, R.; XUE, H.; ZHANG, Y.H; WANG, Z.Y. Intranasal lactoferrin enhances alpha-secretase-dependent amyloid precursor protein processing via the ERK1/2-CREB and HIF-1alpha Pathways in an Alzheimer's disease mouse model. **Neuropsychopharmacology**, 42 (2017), pp. 2504-2515

GUO, F.; ZHOU, H.; WU, J.; HUANG, Y.; LV, G.; WU, Y.; ZHAO, H.; JIN, J.; ZHAO, F.; LIU, L.; LIU, W.; YANG, Y.; XU, Y.; QIU, H. A prospective observation on nutrition support in adult patients with severe burns. **British Journal of Nutrition**, 2019, Vol.121(9), pp.974-981

GURTNER G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M.T. Wound repair and regeneration. **Nature**, 453 (2008), pp. 314-321

GYENGE, MELINDA; AMAGASE, KIKUKO; KUNIMI, SHINO; MATSUOKA, RIE; TAKEUCHI, KOJI. Roles of pro-angiogenic and anti-angiogenic factors as well as matrix metalloproteinases in healing of NSAID-induced small intestinal ulcers in rats. **Life Sciences**, 06 October 2013, Vol.93(12-14), pp.441-447.

GYLES, DESIRÉE ALESA; CASTRO, LORENA DINIZ; JÚNIOR, JOSÉ OTÁVIO CARRÉRA SILVA; RIBEIRO-COSTA, ROSEANE MARIA. The Designs and Prominent Biomedical Advances of Natural and Synthetic Hydrogel Formulations. **European Polymer Journal**. S0014-3057(16)31250-2, (2017).

HABIB, H.M., IBRAHIM, W.H., SCHNEIDER-STOCK, R., HASSAN, H.M. Camel milk lactoferrin reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts antioxidant and DNA damage inhibitory activities. **Food Chem.** 141 (1), 148–152, 2013.

HASHEMI TABATABAEI, RAMIN; JAFARI, SEID MAHDI; MIRZAEI, HABIBOLLAH; MOHAMMADI NAFCHI, ABDORREZA; DEHNAD, DANIAL. Preparation and characterization of nano-SiO₂ reinforced gelatin-k-carrageenan biocomposites. **International journal of biological macromolecules**, May 2018, Vol.111, pp.1091-1099

HEMMATI, A.A.; FOROOZAN, M.; HOUSHMAND, G.; MOOSAVI, Z.B.; BAHADORAN, M.; SHAKIBA, N. The topical effect of grape seed extract 2% cream on surgery wound healing. **Glob. J. Health Sci.** 7, 52–58. 2015.

HEMMATI, ALIASGHAR; NAMJUYAN, FOROUGH; YOUSEFI, SADEGH; HOUSHMAND, GHOLAMREZA; KHADEM HAGHIGHIAN, HOSSEIN; REZAEI, ANAHITA. The Healing Effect of N-Hexan- Dichloromethane Extract Root *Onosma*

Bulbotrichum in Second Degree Burns. **World Journal of Plastic Surgery**, 2018, Vol.7(1), p.25-33

HUANG, YUANWEN; HE, KAI; WANG, XIAOHONG. Rapid prototyping of a hybrid hierarchical polyurethane-cell/hydrogel construct for regenerative medicine. **Materials Science & Engineering C**, 01 August 2013, Vol.33(6), pp.3220-3229.

HULL, M; PRUETT, J; KOEP, E; TSANG, Y; DRAKE, W. Treatment patterns and medication adherence and persistence among patients with pulmonary arterial hypertension in realworld database representing a large us health plan. **Value in Health : The Journal of the International Society for Pharmacoeconomics and Outcomes Research**, May 2017, Vol.20(5), p.A272

JAGNOOR, J., LUKASZYK, C., FRASER, S., CHAMANIA, S., HARVEY, L. A., POTOKAR, T., & IVERS, R. Q. (2018). Rehabilitation practices for burn survivors in low- and middle-income countries: A literature review. **Burns**, 44(5), 1052–1064. doi: 10.1016/j.burns.2017.10.007

JANDÚ, J. J. B.; MORAES NETO, R. N.; ZAGMIGNAN, A.; DE SOUSA, E. M.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A.; DOS SANTOS CORREIA, M. T.; DA SILVA, L. C. N. (2017). Targeting the Immune System with Plant Lectins to Combat Microbial Infections. **Frontiers in Pharmacology**, 8. doi:10.3389/fphar.2017.00671

JERE, S. W., ABRAHAMSE, H., & HOURELD, N. N. (2017). The JAK/STAT signaling pathway and photobiomodulation in chronic wound healing. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 38, 73–79. doi:10.1016/j.cytogfr.2017.10.001

JIJI, S.; UDHAYAKUMAR, S.; ROSE, C.; MURALIDHARAN, C.; KADIRVELU, K. Thymol enriched bacterial cellulose hydrogel as effective material for third degree burn wound repair. **International journal of biological macromolecules**, 01 February 2019, Vol.122, pp.452-460

JOHNSON, C. (2018). Management of burns. Surgery for major incidents. **Surgery** (Oxford), Volume 36, Issue 8, August 2018, Pages 435-440.

Journal of Biomedical Materials Research, Nov 2020, Vol.108(11), pp.2138-2149
 KAMOUN, ELBADAWY A; KENAWY, EL-REFAIE S; CHEN, XIN. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced Research**, May 2017, Vol.8(3), pp.217-233

KANDOW C.E., P.C. GEORGES, P.A. JANMEY, K.A. BENINGO, Polyacrylamide hydrogels for cell mechanics: steps toward optimization and alternative uses. *Methods Cell Biol*, 83 (2007), pp. 29-46. Academic Press

KAO, YUAN; LOH, EL-WUI; HSU, CHIEN-CHIN; LIN, HUNG-JUNG; HUANG, CHIEN-CHENG; CHOU, YUN-YUN; LIEN, CHIEH-CHUN; TAM, KA-WAI; GERHARDT, ROBERT T. Fluid Resuscitation in Patients With Severe Burns: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials.(Report). **Academic Emergency Medicine**, 2018, Vol.25(3), p.320(10)

KASSAB, Z.; AZIZ, F.; HANNACHE, H.; YUCEF, H. Ben; EL ACHABY, M. Improved mechanical properties of k-carrageenan-based nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals. **Int. J. Biol. Macromol**, 123 (2019), pp. 1248-1256,

KAUSHIK, P.; SHARMA, S.; RANA, A.; KAUSHIK, D.; & KAMBOJ, S.; (2013). Burn wound: Pathophysiology and its management by herbal plants. **Chronicles of Young Scientists**, 4(2), 86. doi:10.4103/2229-5186.115537

KEDE, MARIA PAULINA VILLAREJO; SABATOVICH, OLEG. *Dermatologia Estética*. Atheneu, 3^o Edição atualizada e ampliada. Capítulo 1. Pág 4, 2015.

KELDER, C.; BAKKER, A. D.; KLEIN-NULEND, J.; WISMEIJER, D. The 3D Printing of Calcium Phosphate with K-Carrageenan under Conditions Permitting the Incorporation of Biological Components—A Method. **Journal of functional biomaterials**, 01 October 2018, Vol.9(4), p.57

KENAWY, EL-REFAIE; KAMOUN, ELBADAWY A; MOHY ELDIN, MOHAMED S; EL-MELIGY, MAHMOUD A. Physically crosslinked poly (vinyl alcohol)-hydroxyethyl starch blend hydrogel membranes: Synthesis and characterization for biomedical applications. **Arabian Journal of Chemistry**, July 2014, Vol.7(3), pp.372-380

KERKELA E, SAARIALHO-KERE U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Exp Dermatol**. 2003 Apr;12(2):109-25.

KHAN, Aminul Islam; LIU, jin; DUTTA, Prashanta. Bayesian inference for parameter estimation in lactoferrin-mediated iron transport across blood-brain barrier. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Volume 1864, Issue 3, March 2020, 129459

KIM JK, KIM HJ, CHUNG JY, LEE JH, YOUNG SB, KIM YH. Natural and synthetic biomaterials for controlled drug delivery. **Arch Pharm Res** 37:60–68, 2014.

KIM, H. L.; HONG, M.; KIM, S.J. Preparation and Characterization of Silk Fibroin/Gelatin Hybrid Scaffolds. **Polym.-Korea**, 35, 378 (2011).

KIYA, K., & KUBO, T. (2019). Neurovascular interactions in skin wound healing. *Neurochemistry International*. doi: 10.1016/j.neuint.2019.02.014

KONKLE B. Bleeding and thrombosis. In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, et al, editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 18th edition. New York: McGraw-Hill; 2012. p. 457–64.

KONTOGIORGOS, VASSILIS. Galactomannans (Guar, Locust Bean, Fenugreek, Tara). **Encyclopedia of Food Chemistry**, Pages 109-113, 2019.

KOWAL-VERN, V. MCGILL, J.M. WALENG, R.L. GAMELLI. Antithrombin (H) concentrate infusions are safe and effective in patients with thermal injuries. **The Journal Burn Care and Rehabilitation**, 21 (2000), pp. 115-127

KWON, O.-J., OH, S.-T., LEE, S.-D., LEE, N.-R., SHIN, C.-H., & PARK, J.-S. (2007). Hydrophilic and flexible polyurethane foams using sodium alginate as polyol: Effects of PEG molecular weight and cross-linking agent content on water absorbency. *Fibers and Polymers*, 8(4), 347–355. doi:10.1007/bf02875822

LEE, OK; KIM, JUNG-HO; MOON, BO; CHAO, JANET; YOON, JAEHO; JU, HYUNG; LEE, JUNG; PARK, HYUN; KIM, DONG; KIM, SEUNG; PARK, HAE; PARK, CHAN.

Fabrication and characterization of hydrocolloid dressing with silk fibroin nanoparticles for wound healing. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 2016, Vol.13(3), pp.218-226

LEFNAOUI, SONIA; MOULAI - MOSTEFA, NADJI. Investigation and optimization of formulation factors of a hydrogel network based on kappa carrageenan-pregelatinized starch blend using an experimental design. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Sept 20, 2014, Vol.458, p.117(9)

LEGRAND, D.; ELASS, E.; CARPENTIER, M.; MAZURIER, J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 7th International Conference on Lactoferrin: Structure, Function, and Applications, and has undergone the Journal's usual peer review process. **Biochemistry and Cell Biology (Biochimie et biologie cellulaire)**, 2006, Vol.84(3), pp.282-290

LEGRAND M.; BARRAUD, D.; CONSTANT, I.; DEVAUCHELLE, P.; DONAT, N.; FONTAINE, M.; GOFFINET, L.; HOFFMANN, C.; JEANNE, M.; JONQUERES, J.; LECLERC, T.; LEFORT, H.; LOUVET, N.; LOSSER, M.; LUCAS, C.; PANTET, O.; ROQUILLY, A.; ROUSSEAU, A.; SOUSSI, S.; WIRAMUS, S.; GAYAT, E.; BLET, A. Management of severe thermal burns in the acute phase in adults and children, **Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine**. Volume 39, Issue 2, April 2020, Pages 253-267

LEI, H., ZHU, C., & FAN, D. (2020). Optimization of human-like collagen composite polysaccharide hydrogel dressing preparation using response surface for burn repair. **Carbohydrate Polymers**, 116249. doi:10.1016/j.carbpol.2020.116249

LEONARDI, M. J. (2019). Laboratory Evaluation of Hemostasis Disorders. **Physician Assistant Clinics**, 4(3), 609–623. doi: 10.1016/j.cpha.2019.02.014

LI, J.; MOONEY, D.J. Designing hydrogels for controlled drug delivery, **Nat. Rev. Mater.** 1 (2016) 16071.

LIU, J., WILLFÖR, S., XU, C. A review of bioactive plant polysaccharides: biological activities, functionalization, and biomedical applications. **Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre** 5, 31–61, 2015a.

LIU, J., Zhan, X., WAN, J., WANG, Y., & Wang, C. (2015b). Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects. **Carbohydrate Polymers**, 121, 27–36.

LIU, JIA; LI, BO; LEE, CAROL; ZHU, HAITAO; ZHENG, SHAN; PIERRO, AGOSTINO. Protective effects of lactoferrin on injured intestinal epithelial cells. **Journal of Pediatric Surgery**. Volume 54, Issue 12, December 2019a, Pages 2509-2513

LIU, S.; LI, L. Thermoreversible gelation and scaling behavior of Ca²⁺-induced κ -carrageenan hydrogels. **Food Hydrocolloids**, 61 (2016), pp. 793-800

LIU, YUNPENG; ZHANG, XUEMEI; LI, CHENCHEN; QIN, YAN; XIAO, LIXIA; LIU, JUN. Comparison of the structural, physical and functional properties of κ -carrageenan films incorporated with pomegranate flesh and peel extracts. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2019b.

MACLEOD, A. S., & MANSBRIDGE, J. N. (2016). The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. **Advances in Wound Care**, 5(2), 65–8. doi:10.1089/wound.2014.0608

MANKOTIA, PRIYANKA; CHOUDHARY, SONAL; SHARMA, KASHMA; KUMAR, VIJAY; KAUR BHATIA, JASPREET; PARMAR, ANKUSH; SHARMA, SHWETA; SHARMA, VISHAL. Neem gum-based pH responsive hydrogel matrix: A new pharmaceutical excipient for the sustained release of anticancer drug. **International journal of biological macromolecules**, 01 January 2020, Vol.142, pp.742-755

MANZONI, P., I. STOLFI, H. MESSNER, S. CATTANI, N. LAFORGIA, M. G. ROMEO, L. BOLLANI, M. RINALDI, E. GALLO, M. QUERCIA, M. MAULE, M. MOSTERT, L. DECEMBRINO, R. MAGALDI, F. MOSCA, F. VAGNARELLI, L. MEMO, P. M. BETTA, M. Stronati, and D. Farina. Bovine lactoferrin prevents invasive fungal infections in very low birth weight infants: A randomized controlled trial. **Pediatrics**, 129:116–123. 2012.

MANZONI, PAOLO. Clinical Benefits of Lactoferrin for Infants and Children. **The Journal of Pediatrics**. Volume 173, Supplement, June 2016, Pages S43-S52

MARTINA, N.A; FALDER S. b. A review of the evidence for threshold of burn injury.

Burns. Volume 43, Issue 8, December 2017, Pages 1624-1639

MARTINS G.V.F. - Avaliação do potencial citotóxico das lectinas de *canavalia ensiformis*, *canavalia brasiliensis* e *cratylia floribunda* – Tese de mestrado – UFPB – João Pessoa, 2009.

MASUDA, C., RANDALL, R., & ORTIZ, M. (2020). Pilot Study: Evaluating the Impact of Pharmacist Patient-Specific Medication Recommendations for Diabetes Mellitus Therapy to Family Medicine Residents. **Pharmacy**, 8(3), 158. doi:10.3390/pharmacy8030158

MATUCCI, A., VENERI, G., DALLA PELLEGRINA, C., ZOCCATELLI, G., VINCENZI, S., CHIGNOLA, R., PERUFFO, A.D.B., RIZZI, C., 2004. Temperature-dependent decay of wheat germ agglutinin activity and its implications for food processing and analysis. **Food Control**, 15, 391-395.

MCCLEARY, BARRY V; AMADO, RENATO; WAIBEL, ROBERT; NEUKOM, HANS. Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans. **Carbohydrate research**, 1981, Vol.92(2), pp.269-285

MCKIM, J. M. Food additive carrageenan: Part I: A critical review of carrageenan in vitro studies, potential pitfalls, and implications for human health and safety. **Critical Reviews in Toxicology**, 44(3), 211–243. 2014.

MEER, G.; MEER, W. A. & TINKER, J. Water-Soluble Gums: Their past, present, and future. **Food Technology**, p. 22-28, nov. 1975.

MEINDRAWAN, BAYU; SUYATMA, NUGRAHA EDHI; WARDANA, ATA ADITYA; PAMELA VEGA YOESEPA. Nanocomposite coating based on carrageenan and ZnO nanoparticles to maintain the storage quality of mango. **Food Packaging and Shelf Life**, Volume 18, December 2018, Pages 140-146

MELO, C. M. L.; DE LIMA, A. L. R.; BELTRÃO, E. I. C.; CAVALCANTI, C. C. B.; DE MELO-JÚNIOR, M. R.; MONTENEGRO, S. M. L.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M.

T. S.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine Schistosomiasis mansoni. **Acta tropica**, May 2011a, Vol.118(2), pp.152-158

MELO, C. M. L.; PORTO, C. S.; MELO-JÚNIOR, M. R.; MENDES, C. M.; CAVALCANTI, C. C. B.; COELHO, L. C. B. B.; PORTO, A. L. F.; DOS ANJOS CARNEIRO LEÃO, A. M.; DOS SANTOS CORREIA, M. T. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International journal of pharmaceutics**, 15 April 2011b, Vol.408(1-2), pp.113-119

MELO, CRISTIANE; PAIM, BRUNO; ZECCHIN, KARINA; MORARI, JOSEANI; CHIARATTI, MARCOS; CORREIA, MARIA; BARROSO COELHO, LUANA; PAIVA, PATRÍCIA. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2010, Vol.342(1), pp.163-169

MIDURA, F., EMILY; KUETHE, W., JOSHUA; RICE, C., TERESA; VEILE, G., ROSALIE; ENGLAND, ANN, LISA; FRIEND, C., LOU; CALDWELL, D., CHARLES; GOODMAN, D., MICHAEL. Impact of Platelets and Platelet-Derived Microparticles on Hypercoagulability Following Burn Injury. **SHOCK**, 2016, Vol.45(1), pp.82-87

MILAŠINOVIĆ N., M. KALAGASIDIS KRUŠIĆ, Z. KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, J. FILIPOVIĆ. Hydrogels of N-isopropylacrylamide copolymers with controlled release of a model protein. **Int J Pharm**, 383 (2010), pp. 53-61

MIR, MARIAM; BARAKULLAH, AFIFA; GULZAR, AYESHA. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. **Progress in Biomaterials**, Mar 2018, Vol.7(1), pp.1-21

MOREIRA, R.A. – Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, Rio de Janeiro, OCT. 1991

MORGAN, E. D.; BLEDSOE, S. C.; BARKER, J. Ambulatory Management of Burns. **American Family Physician**, vol. 62, no. 9, pp. 2015-2026, 2000.

MUTHULAKSHMI, L; ANAND KUMAR, B; RAJASEKAR, ARULIAH; ANNARAJ, J; PRUNCU, CATALIN I. The benefits of k-Carrageenan-gelatin hybrid composite coating on the medical grade stainless steel (SS304) used as anticorrosive barrier. **Materials chemistry and physics**, 15 January 2021, Vol.258

NAHM, W. J., MOTA, J. A., ROJAS, S., HIZON, B. J., & GORDON, C. (2018). Improvement of Ulcerations in Treatment-Resistant Chronic Scarring in a Patient with Pyoderma Gangrenosum After Improving Vascular Insufficiency, Gently Removing Necrotic Debris, and Decreasing Wound Fluid. **American Journal of Case Reports**, 19, 844–848. doi:10.12659/ajcr.908995

NAMVIRIYACHOTE, N., LIPIPUN, V., AKKHAWATTANANGKUL, Y., CHAROONRUT, P., & RITTHIDEJ, G. C. (2018). Development of polyurethane foam dressing containing silver and asiaticoside for healing of dermal wound. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. doi: 10.1016/j.ajps. 2018.09.001

NOOSHABADI, VAJIHE; KHANMOHAMADI, MEHDI; VALIPOUR, ELAHE; MAHDIPOUR, SHADI; SALATI, AMIR; MALEKSHAHI, ZIBA; SHAFEI, SHILAN; AMINI, ELAHE; FARZAMFAR, SAEED; AI, JAFAR. Impact of exosome-loaded chitosan hydrogel in wound repair and layered dermal reconstitution in mice animal model

OCHOA, T. J., E. CHEA-WOO, N. BAIOCCHI, I. PECHO, M. CAMPOS, A. PRADA, G. VALDIVIEZO, A. LLUQUE, D. LAI, AND T. G. CLEARY. Randomized double-blind controlled trial of bovine lactoferrin for prevention of diarrhea in children. **J. Pediatr.** 162:349–356. 2013.

OCÓN, CARLOS; SANTOS, SOLANGE; CAIRES, JHENIPHE; OLIVEIRA, MARCELO; SERRA, ANDREY; LEAL-JUNIOR, ERNESTO; DE CARVALHO, PAULO. Effects and parameters of the photobiomodulation in experimental models of third-degree burn: systematic review. **Lasers in Medical Science**, 2019, Vol.34(3), pp.637-648

OLIVEIRA, W. F.; SILVA, G.M.M; CABRAL FILHO, P.E.; FONTES, A.; OLIVEIRA, M. D.L; ANDRADE, C.A.S; SILVA, M. V.; COELHO, L.C.B.B; MACHADO, G.; CORREIA, M.T.S. Titanium dioxide nanotubes functionalized with Cratylia mollis seed lectin, Cramoll,

enhanced osteoblast-like cells adhesion and proliferation. **Materials Science & Engineering C**, 01 September 2018, Vol.90, pp.664-672

OLIVEIRA, W.F.; CABRERA, M.P.; SANTOS, N.R.M.; NAPOLEÃO, T.; PAIVA, P.M.G.; NEVES, R.P.; SILVA, M.V.; SANTOS, B.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; FILHO, P.E.C.; FONTES, A.; CORREIA, M.T.S. Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe. **Microbiological Research**. Volume 230, January 2020, 126330

OPALENIK, S. R. & DAVIDSON, J. M. Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. *FASEB J.* **19**, 1561–1563 (2005).

ORYAN, A., ALEMZADEH, E., MOSHIRI, A. Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. **J Wound Care** 26(1), 5-19, 2017.

ORYAN, A., JALILI, M., KAMALI, A., & NIKAHVAL, B. (2018). The concurrent use of probiotic microorganism and collagen hydrogel/scaffold enhances burn wound healing: An in vivo evaluation. **Burns**. doi: 10.1016/j.burns.2018.05.016

OSORIO, F. A., MOLINA, P., MATIACEVICH, S., ENRIONE, J., & SKURTYS. Characteristics of hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) based edible film developed for blueberry coatings. **Procedia Food Science**, 1, 287-293, 2011.

OUYANG, QIAN-QIAN; HU, ZHANG; LIN, ZHEN-PENG; QUAN, WEI-YAN; DENG, YI-FENG; LI, SI-DONG; LI, PU-WANG; CHEN, YU. Chitosan hydrogel in combination with marine peptides from tilapia for burns healing. **International Journal of Biological Macromolecules**. Volume 112, June 2018, Pages 1191-1198

ÖZTAŞYEŞİM, E.R.; ÖZGÜNEŞ, N. Lactoferrin: a multifunctional protein. **Adv. Mol. Med.** 1 (4), 149–154.2005.

PAINTER, T.J. Algal Polysaccharides. **The polysaccharides**, v. 2, p. 195-285, (1983).
PAIVA, P. M. G., COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.

PAIVA, P. M. G., COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.

PAMMI, M.; ABRAMS, S. A. Oral lactoferrin for the prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. **Cochrane Database Syst. Rev.** 2:CD007137. 2015.

PANNERSELVAM, B.; DHARMALINGAM JOTHINATHAN, M.; RAJENDERAN, M.; PERUMAL, P.; PUDUPALAYAM, K.; KIM, H.J.; SINGH, V.; RANGARAJULU, S. K. An in vitro study on the burn wound healing activity of cotton fabrics incorporated with phytosynthesized silver nanoparticles in male Wistar albino rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 30 March 2017, Vol.100, pp.187-196

PARK, Y.G.; JEONG, J.K.; LEE, J.H.; LEE, Y.J.; SEOL, J.W.; KIM, S.J.; PARK, S.Y. Lactoferrin protects against prion protein-induced cell death in neuronal cells by preventing mitochondrial dysfunction. **International Journal of Molecular Medicine**, 31 (2013), pp. 325-330

PASTORI, VALENTINA; TAVAZZI, SILVIA; LECCHI, MARZIA. Lactoferrin-loaded contact lenses counteract cytotoxicity caused in vitro by keratoconic tears. **Contact Lens and Anterior Eye**. Volume 42, Issue 3, June 2019, Pages 253-257

PEREIRA R.F.; BÁRTOLO, P. J. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. **Advances in Wound Care**, 2016; Vol. 5, No. 5

PEREIRA, D. S. T.; LIMA-RIBEIRO, M. H. M.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; CAVALCANTI, C. L. B.; PONTES-FILHO, N. T.; COELHO, L. C. B. B.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; CORREIA, M. T. S. Topical Application Effect of the Isolectin Hydrogel (Cramoll 1,4) on Second-Degree Burns: Experimental Model. **Journal of biomedicine & biotechnology**, 01 January 2012, Vol.2012

PEREIRA, R.F.; BARRIAS, C.C.; GRANJA, P.L.; BARTOLO, P. J. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. **Nanomedicine**, 2013; 8: 603.

PEREIRA, S. F. - Caracterização dos efeitos biológicos das lectinas de *canavalia brasiliensis* e de *canavalia ensiformes* em preparações do sistema nervoso central e em células tumorais – Tese de mestrado - UFSC – 2005

PÉRICO, L.L.; RODRIGUES, V.P.; OHARA, R.; NUNES, V.V.A.; DA ROCHA, L. R.M.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, C.; HIRUMA-LIMA, C.A. Can the gastric healing effect of *Eugenia punicifolia* be the same in male and female rats? **Journal of Ethnopharmacology**, 10 May 2019, Vol.235, pp.268-278

PERYASSU, M. A. Dermatologia para o clínico: diagnóstico e tratamento. 1ª Edição Rubio, 2016.

PILCHER B.K., J.A. DUMIN, B.D. SUDBECK, S.M. KRANE, H.G. WELGUS, W.C. PARKS. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. **J. Cell Biol.**, 137 (2017), pp. 1445-57.

PIPERIGKOU, Z., GÖTTE, M., THEOCHARIS, A. D., & KARAMANOS, N. K. (2018). Insights into the key roles of epigenetics in matrix macromolecules-associated wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 129, 16–36. doi:10.1016/j.addr.2017.10.008

PLIKUS M.V., C.F. GUERRERO-JUAREZ, M. ITO, Y.R. LI, P.H. DEDHIA, Y. ZHENG, et al. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. **Science**, 355 (2017), pp. 748-752

PRAJAPATI, V.D.; JANI, G.K.; MORADIYA, N.G.; RANDEIRA, N.P.; NAGAR, B.J.; NAIKWADI, N.N.; VARIYA, B.C. Galactomannan: a versatile biodegradable seed polysaccharide. **Int. J. Biol. Macromol.** 60 (2013) 83– 92. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.017.

PREETHI, G. U.; UNNIKRISHNAN, B. S.; SREEKUTTY, J.; ARCHANA, M. G. SREELEKHA, T. T. Semi-interpenetrating nanosilver doped polysaccharide hydrogel scaffolds for cutaneous wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, *In press, corrected proof*, Available online 14 October 2019

PROFYRIS, C., TZIOTZIOS, C., & DO VALE, I. (2012). Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 66(1), 1–10. doi: 10.1016/j.jaad.2011.05.055

QIAO, YANG; XU, SHICHAO; ZHU, TIANZHE; TANG, NAN; BAI, XUEJIAN; ZHENG, CHUNMING. Preparation of printable double-network hydrogels with rapid self-healing and high elasticity based on hyaluronic acid for controlled drug release. **Polymer**. 2019

QIU, J.; ZHONG, L.; ZHOU, M.; CHEN, D.; HUANG, X.; CHEN, J.; CHEN, M.; NI, H.; CAI, Z. Establishment and characterization of a reconstructed Chinese human epidermis model. **International Journal of Cosmetic Science**, February 2016, Vol.38(1), pp.60-67

RAE L., P. FIDLER, N. GIBRAN. The physiologic basis of burn shock and the need for aggressive fluid resuscitation. **Crit Care Clin**, 32 (4) (2016), pp. 491-505

RAGHUWANSHI, V. S.; GARNIE, G. Characterisation of hydrogels: Linking the nano to the microscale, **Advances in Colloid and Interface Science**. Volume 274, December 2019, 102044

RAMAN, MAYA; DOBLE, MUKESH. κ -Carrageenan from marine red algae, *Kappaphycus alvarezii* – A functional food to prevent colon carcinogenesis. **Journal of functional foods**, May 2015, Vol.15, pp.354-364

RAND, M. L.; ISRAELS, S. J. Molecular basis of platelet function. In: Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, et al, editors. *Hematology: basic principles and practice*. 7th edition. Elsevier; 2018. p. 1870–84

REZENDE, Larissa C.; JUCK Débora B. F.; DAVID Jorge M.; DAVID, Juceni P.; ALVES, Clayton Q. New flavans isolated from the leaves and stems of *Cratylia mollis* (Leguminosae). **Phytochemistry Letters**, Volume 14, December 2015, Pages 165-169

RINAUDO, MARGUERITE. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. **Food hydrocolloids**, 2001, Vol.15(4), pp.433-440

RODRIGUEZ-CANTO, W.; CERQUEIRA, M.A.; CHEL-GUERRERO, L.; PASTRANA, L.M.; AGUILAR-VEGA, M. Delonix regia galactomanana-based edible films: Effect of molecular weight and k-carrageenan on physicochemical properties. **Food Hydrocolloids**, Volume 103, June 2020, Article 105632

RODRIGUEZ-FERREYRA, P., GAYOSSO-CERÓN, O., ALONSO-CAMPERO, R., TELLEZ-TELLEZ, A., BALDERAS-SÁNCHEZ, R., FUNK M., REYES-IBARRA, A.P. Experiência com o aloenxerto epidérmico epiférmico criopreservado no tratamento de queimaduras superficiais e profundas de segundo grau: estudo retrospectivo de 297 casos, 2010–2015. **Burns Open**, Volume 3, Edição 3, julho de 2019, Páginas 116-120

SADEGHI-BAZARGANI, H.; ARSHI, S.; MASHOUFI, M.; DELJAVAN-ANVARI, R.; MESHKINI, M.; MOHAMMADI, R. (2012). Household related predictors of burn injuries in an Iranian population: a case–control study. **BMC Public Health**, 12(1). doi:10.1186/1471-2458-12-340

SCHILLING RS, ROBERTS M, GOODMAN N. Clinical trial of occlusive plastic dressings. **Lancet** 1950;1(6599):293–6.

SCHUCK, A., KIM, H. E., JUNG, K.-M., HASENKAMP, W., & KIM, Y.-S. (2020). Monitoring the hemostasis process through the electrical characteristics of a graphene-based field-effect transistor. *Biosensors and Bioelectronics*, 112167. doi: 10.1016/j.bios.2020.112167

SELVAKUMARAN, S.; MUHAMAD, I.I.; ABD RAZAK, S.I. Evaluation of kappa carrageenan as potential carrier for floating drug delivery system: Effect of pore forming agents. **Carbohydrate polymers**, 01 January 2016, Vol.135, pp.207-214

SHARON, N. Lectins: Past, present and future. **Biochemical Society Transactions**, 2008, Vol.36(6), pp.1457-1460

SHIRANI, G.; GANESHARANEE, R. Extruded products with Fenugreek (*Trigonella foenum-graecium*) chickpea and rice: Physical properties, sensory acceptability and glycaemic index. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 44–52. (2009).

SILVA, F. O. C.; MACEDO, D. V. Physical exercise, inflammatory process and adaptive condition: an overview. **Revista brasileira de cineantropometria & desempenho humano**, 01 June 2011, Vol.13(4), pp.320-328

SILVA, L. C. N.; ALVES, N. M. P.; DE CASTRO, M. C. A. B.; HIGINO, T. M. M.; DA CUNHA, C. R. A.; PEREIRA, V. R. A.; PAZ, N. V. N.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S.; DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q. pCramoll and rCramoll as new preventive agents against the oxidative dysfunction induced by hydrogen peroxide. (Research Article). **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015, Vol.2015

SILVA, M. R; SILVA, M. A. A. P. - Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista Nutrição**, 13(1): 3-9, jan./ 2000

SILVA, Priscila M. S.; LIMA, Amanda L. R.; SILVA, Bárbara V. M.; COELHO Luana C. B. B.; CORREIA, Maria T. S. *Cratylia mollis* lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensors and Bioelectronics**, Volume 85, 15 November 2016, Pages 171-177

SIRIMAHACHAIYAKUL, P.; SOOD, R.F.; MUFFLEY, L.A.; SEATON, M.; LIN, C.; QIAO, L.; ARMALY, J.S.; HOCKING, A.M.; GIBRAN, N.S.C. Race Does Not Predict Melanocyte Heterogeneous Responses to Dermal Fibroblast-Derived Mediators. **PLoS ONE**, 2015, Vol.10(9)

SKRYPLONEK, Katarzyna; HENRIQUES, Marta; GOMES, David; VIEGAS, Jorge; FONSECA, Catarina; PEREIRA, Carlos; DMYTRÓW1, Izabela; MITUNIEWICZ-MAŁEK, Anna. Characteristics of lactose-free frozen yogurt with κ -carrageenan and corn starch as stabilizers. **Journal of Dairy Science**. Volume 102, Issue 9, September 2019, Pages 7838-7848

SOARES, P.A.G.; SEIXAS, J.R.P.C.; ALBUQUERQUE, P.B.S.; SANTOS, G.R.C.; MOURÃO, P.A.S.; BARROS JÚNIOR, W.; CORREIA, M.T.S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. Development and characterization of a new hydrogel based on galactomannan and - carrageenan, **Carbohydr. Polym.** 134 (2015) 673–679.

SOKOLOVA, E.V.; BOGDANOVICH, L.N.; IVANOVA, T.B.; BYANKINA, A.O.; KRYZHANOVSKIY, S.P.; YERMAK, I.M. Effect of carrageenan food supplement on patients with cardiovascular disease results in normalization of lipid profile and moderate modulation of immunity system markers. **PharmaNutrition**. Volume 2, Issue 2, April 2014, Pages 33-37

SOLIMAN, A. M., DAS, S., ABD GHAFAR, N., & TEOH, S. L. (2018). Role of MicroRNA in Proliferation Phase of Wound Healing. **Frontiers in Genetics**, 9. doi:10.3389/fgene.2018.00038

SRIVASTAVA, M., KAPOOR, V.P. Seed galactomannans: an overview. **Chem. Biodivers.** 2, 295–317, 2005.

SU W.H., M.H. CHENG, W.L. LEE, T.S. TSOU, W.H. CHANG, C.S. CHEN, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for wounds: pain relief or excessive scar formation? **Mediat Inflamm**, 2010 (2010), p. 413238

SUN, JIE; WANG, LEI; WANG, BAOJIE; GUO, ZHENYU; LIU, MEI; JIANG, KEYONG; LUO, ZUOYONG. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, 2007, Vol.23(2), pp.292-299
SZABOWSKI, A. et al. c-Jun e JunB controlam antagonisticamente a interação mesenquimal-epidérmica regulada por citocinas na pele. *Cell* 103, 745-755 (2000).

TAMAHKAR, E.; ÖZKAHRAMAN, B.; KILIÇSÜLOĞLU, A. A novel multilayer hydrogel wound dressing for antibiotic release. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. 2020

TERRELL, JOHN A.; JONES, CURTIS G.; KABANDANA, GIRASO KEZA MONIA; CHEN, CHENGPENG. From cells-on-a-chip to organs-on-a-chip: scaffolding materials for

3D cell culture in microfluidics. **Journal of Materials Chemistry B**, 2020, Vol.8(31), pp.6667-6685

THANUSHA, A.V.; DINDA, AMIT KUMAR; KOUL, VEENA. Evaluation of nano hydrogel composite based on gelatin/HA/CS suffused with Asiatic acid/ZnO and CuO nanoparticles for second degree burns. **Materials Science & Engineering**. 01 August 2018, Vol.89, pp.378-386

THOMSON, A. W., & FOWLER, E. F. Carrageenan: a review of its effects on the immune system. **Agents and Actions**, 11(3), 265–273. 1981.

UBBINK DT, VERMEULEN H, GOOSSENS A, KELNER RB, SCHREUDER SM, LUBBERS MJ. Occlusive vs. gauze dressings for local wound care in surgical patients: a randomized clinical trial. **Arch Surg** 2008;143(October (10)):950–5.

URALOĞLU, M., URAL, A., EFE, G., YULUĞ, E., LIVAOĞLU, M., & KARAÇAL, N. (2018). The Effect of Platelet-Rich Plasma on the Zone of Stasis and Apoptosis in an Experimental Burn Model. **Plastic Surgery**, 229255031880049. doi:10.1177/2292550318800498

UTECH, Stefanie; BOCCACCINI, Aldo R. A review of hydrogel-based composites for biomedical applications: enhancement of hydrogel properties by addition of rigid inorganic fillers. **J Mater Sci** (2016) 51:271–310.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. **Basic science**, Volume 29, Issue 10, October 2011, Pages 471-474

VERMOLEN, F. J.; GEFEN, A. (2015). Semi-stochastic cell-level computational modelling of cellular forces: application to contractures in burns and cyclic loading. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, 14(6), 1181–1195. doi:10.1007/s10237-015-0664-2

WANG, L.-P., WANG, H.-J., HOU, X., RAZA, A., KOYAMA, Y., ITO, T., & WANG, J.-Y. (2021). Preparation of stretchable composite film and its application in skin burn repair.

Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 113, 104114. doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.104114

WANG, T., CHEN, L., SHEN, T., WU, D. Preparation and properties of a novel thermosensitive hydrogel based on chitosan/hydroxypropylmethylcellulose/ glycerol. **International Journal of Biological Macromolecules**, 93(Pt A), 775-782. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.038. 2016.

WATT F.M.; FUJIWARA, H. Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin Cold Spring Harb Perspect. **Biol**, 3 (4) (2011), p. a005124

WEINER, M. L. Food additive carrageenan: Part II: A critical review of carrageenan in vivo safety studies. **Critical Reviews in Toxicology**, 44(3), 244–269. 2014.

WEN, Q.; SUZANNE, M. M.; ANTHONY, S.W. elastin biomaterials in dermal repair. **Trends in Biotechnology**, Volume 38, Issue 3, March 2020, Pages 280-291.

WERNER, S. & GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* **83**, 835–870 (2003).

WERNER, S., KRIEG, T. & SMOLA, H. Keratinocyte–fibroblast interactions in wound healing. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 998–1008 (2007).

WHO - World Health Organization Fact sheet N°365 (Updated 2014): **Burns** – Fact sheet N°365. Available online at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/>, checked on April 2014.

WHO/FAO expert committee on food additives. (2008). Addendum 10. FAO Food and Nutrition Pipe, **Compendium of food additives specifications**, 59, 65–85.

WIEGELE, MARION; SCHADEN, EVA; KOCH, STEFAN; BAUER, DANIEL; KRALL, CHRISTOPH; ADELMANN, DIETER. Thrombin generation in patients with severe thermal injury. **Burns**, February 2019, Vol.45(1), pp.54-62

WINTER, G. D. Formation of the scab and the rate of epithelisation of superficial wounds in the skin of the domestic pig. **Nature**, London, v.193, p. 293 – 294, jan. 1962.

ZACHAREVSKIJ, E., BARANAUSKAS, G., VARKALYS, K., RIMDEIKA, R., & KUBILIUS, D. (2018). Comparison of non-surgical methods for the treatment of deep partial thickness skin burns of the hand. **Burns**, 44(2), 445–452. doi: 10.1016/j.burns.2017.08.002

ZHENG, C.; HUANG, Z. Microgel reinforced composite hydrogels with pH-responsive, self-healing properties. **Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects**, 05 March 2015, Vol.468, pp.327-332

ZHENG, J.; XIE, Y.; LI, F. ZHOU, YU; QI, L.; LIU, L.; CHEN, Z. Lactoferrin improves cognitive function and attenuates brain senescence in aged mice. **Journal of Functional Foods**. Volume 65, February 2020, 103736

ZILIOOTTO, N.; BERNARDI, F.; JAKIMOVSKI, D.; BARONI, M.; MARCHETTI, G.; BERGSLAND, N.; RAMASAMY, D. P.; WEINSTOCK-GUTTMAN, B.; SCHWESER, F.; ZAMBONI, P.; RAMANATHAN, M.; ZIVADINOV, R. Hemostasis biomarkers in multiple sclerosis. **European Journal of Neurology**, September 2018, Vol.25(9), pp.1169-1176

ZOMER, H. D.; TRENTIN, A. G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. **Journal of Dermatological Science**, v. 90, n. 1, p. 3–12, 2018.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones 2126 8840 / 2126 8351
www.ccb.ufpe.br

Recife, 10 de maio de 2018.

Ofício nº 30/18

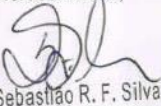
Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Maria das Graças Carneiro da Cunha**
Departamento de Bioquímica
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **23076.046544/2017-96**

"Certificamos que a proposta intitulada **"Produção e caracterização de hidrogéis à base de polissacarídeos contendo biomoléculas imobilizadas para aplicação do reparo tecidual de queimaduras térmicas de segundo grau"**, registrada com o nº **23076.046544/2017-96** sob a responsabilidade de **Prof.ª Maria das Graças Carneiro da Cunha** que envolve a produção, manutenção 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 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 02/05/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	07/03/2018 até 01/03/2019
Espécie/ linhagem/raça	Rato isogênico
Nº de animais	240
Peso/Idade	250-300/ 120 dias
Sexo	Macho
Origem	Bioterio de Fisiologia e Farmacologia da UFPE.

Atenciosamente,


Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691



ANEXO B - NORMAS DA REVISTA CARBOHYDRATE POLYMERS

CARBOHYDRATE POLYMERS

A Journal Devoted to Scientific and Technological Aspects of
Industrially Relevant Polysaccharides

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Aims and scope The Aims and Scope of Carbohydrate Polymers must be complied with in order for submissions to be considered for review and possible publication.

Carbohydrate Polymers is a major journal within the field of glycoscience, and covers the study and exploitation of polysaccharides which have current or potential application in areas such as bioenergy, bioplastics, biomaterials, biorefining, chemistry, drug delivery, food, health, nanotechnology, packaging, paper, pharmaceuticals, medicine, oil recovery, textiles, tissue engineering and wood, and other aspects of glycoscience.

The role of the well-characterized carbohydrate polymer must be the major proportion of the work reported, not a peripheral . At least one named carbohydrate polymer must be cited and be the main focus of the paper and its title. Research must be innovative and advance scientific knowledge.

Characterization For all polysaccharides, including those obtained from a supplier, essential structural information which will affect their behavior in the subsequent work should be given, along with a description of how that information was ascertained. Examples of such essential information include molecular weight, mannuronate/guluronate ratio for alginates, degree of esterification for pectin, degree of deacetylation for chitosan. Editors are unlikely to send papers for formal review with a statement such as "sodium alginate was purchased from XXX Inc." unless additional information is supplied. For papers involving synthesis, polysaccharide derivatives must also be well- characterized. For papers describing identity or application of newly-discovered polysaccharides, purity and monosaccharide composition are essential; some molecular size and linkage information is highly desirable.

Hypothesis Nearly all scientific papers benefit from inclusion of a statement of hypothesis. Such statements should be clear, concise, and declarative. The statement should describe the one or more key hypotheses that the work described in the manuscript was intended to confirm or refute. Inclusion of a hypothesis statement makes it simple to contrast the hypothesis with the most relevant previous literature and point out what the authors feel is distinct about the current hypothesis (novelty). It also permits the authors to describe why they feel it would be important to prove the hypothesis correct (significance).

Topics of interest to the journal: structure-property relationships analytical methods chemical, enzymatic and physical modifications biosynthesis natural functions interactions with other materials Glycogen

Topics not of interest to the journal: biological, physiological and pharmacological aspects of non-carbohydrate; molecules attached to, or mixed with, carbohydrate polymers, unless the polysaccharide has a relevant and specific role; materials science of

biocomposites where there is no mention of any specific carbohydrate polymer, or the role of the carbohydrate polymer is not the major proportion of the study; polyalkanoates, polylactic acid, or lignin; routine studies of extraction yields without characterisation of the extracted polysaccharide under the different conditions; routine studies of complexation of a drug with a single cyclodextrin; studies of newly discovered natural polysaccharides or new polysaccharide derivatives where the structure of the polysaccharide (derivative) is unknown; production and isolation of enzymes which act on polysaccharides (studies on the mode of action of an enzyme on a polysaccharide are within the journal scope); carbohydrate oligomers where the degree of polymerization is less than four; treatments of cotton fabrics and cellulose-based paper where the research is largely not about the component cellulose itself; use of carbohydrate polymers as a support material (e.g. in enzyme immobilization, chromatography, etc.) where there is no specific involvement of the chemistry of the carbohydrate polymer.

Types of paper

Original full-length research papers should contain material that has not been previously published elsewhere, except in a preliminary form. These papers should not exceed 6000 words of text (including references) and generally not more than 10 figures/tables. The same information should not be repeated in a figure and a table.

Review papers will be accepted in areas of topical interest and will normally emphasise literature published over the previous five years. They should not exceed 12,000 words (not including references) and should contain no more than 8 figures and 6 Tables. The same information should not be repeated in a figure and a table.

This journal (as do all high impact journals) places a very high bar on acceptance of reviews. This must be the case since a review is not the authors own work but is a representation from the author(s) of recent "high quality" work in an important field and is intended to provide an all-encompassing and in-depth presentation from the author(s) of the recent impactful developments, the opportunities, the failures, the challenges, the interfaces with other disciplines (and how these interfaces affect the science) in the field. Also, review manuscripts should be of the highest quality on initial submission and should not need considerable reworking or language improvements.

Contact details for submission

Contributors must submit their articles electronically via the Elsevier Editorial System <https://www.editorialmanager.com/carbpol/default.aspx>. This is the only method of submission, and facilitates processing of your article.

Review process

A peer review system is used to ensure high quality of papers accepted for publication. The Editors will reject papers without formal review when it is deemed that the paper is on a topic outside the scope of the Journal, lacking technical merit or lacking appropriate characterization, missing a hypothesis, containing data which are non-reproducible (another scientist from a third-party laboratory must be able to reproduce your work), of narrow regional scope and significance, lacking novelty, does not advance scientific knowledge or is poorly written.

Previous publication of a paper on a particular topic does not guarantee publication of subsequent papers in that area, as the Aims and Scope of the journal are regularly updated. Please see the Current Aims and Scope before you submit.

Revisions

Any revised papers returned later than three months after being sent to authors with the reviewers' comments will be treated as a new submission. When submitting a revised paper authors must list all of the reviewer's comments and indicate how they have responded to the comment, and where in the paper they have made appropriate revisions. All modifications in the paper must be shown in red. Authors must submit two versions of the revised manuscript, one with changes marked and one clean version with no changes marked which will be used by production should your manuscript be accepted.

Resubmitted Manuscripts

It is the author's choice whether or not to resubmit a rejected manuscript to the journal. The expectation of the journal and its editors is that any resubmission will be the result of significant rewriting and perhaps additional experimentation as required to address all prior reviewer and editor concerns. Authors resubmitting previously rejected manuscripts are required to; 1) identify the manuscript as a resubmitted manuscript in the cover letter to the editor, including identification of the prior title and manuscript number, 2) address all reviewer concerns from the final reviews of the previous, rejected manuscript, and 3) include a "Response to Reviewers" document that includes those reviews from the previous version and your responses to those reviews; clearly identify what are reviewer comments and what are your responses, often the use of color is a convenient way to do so.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have

been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

- **Plagiarism and Ethical Concerns**

By submitting this manuscript, the authors agree that text, equations, or figures from previously published articles or books have been clearly identified in full and their origin clearly explained in the adjacent text, with appropriate references given at the end of the paper. Duplication of text is rarely justified, even with diligent referencing. Exceptions may be made for descriptions of standard experimental techniques, or other standard methods used by the author in the investigation; but an appropriate citation is mandatory. Authors who duplicate material from their own published work in a new article, without clearly identifying the repeated material and its source as outlined above, are self-plagiarising.

If an author is found to have plagiarized content from another author or submits a duplicate publication the paper will be rejected without review. These actions may result in sanctions such as retraction of the article (along with the publication of a corrective notice with a direct link to the original article explaining the reason for the retraction) and a possible ban on future publications from the author. In addition, the scientific community at large, including the author's work place, may be notified about the case and the decision reached. Committing plagiarism or submitting a duplicate publication can have a negative impact on an author's scientific career.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or

"he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

No additions, deletions or changes to authorship of a paper will be permitted **after** the article is accepted.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the

author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.
[More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, source files containing the accepted revisions are needed for further processing after

acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Reviewers

Authors are required to submit with their articles, the names, complete affiliations (spelled out), country and contact details (including current and valid (preferably business) e-mail address) of three potential reviewers. Email addresses and reviewer names will be checked for validity. Your potential reviewers must not be from your institute, and at least two should be from a different country. Authors must not suggest reviewers with whom they have collaborated within the past two years. Your submission will be rejected if these are not supplied. Names provided may be used for other submissions on the same topic. Reviewers must have specific expertise on the subject of your article and/or the techniques employed in your study. Briefly state the appropriate expertise of each reviewer. Do not select a referee only because they have expertise on polysaccharides, this is not specific enough. For each reviewer you suggest you must include details of two recent relevant research or review papers authored by the potential reviewer which have appeared in good quality scientific journals. Authors cited in your paper can be useful suggested reviewers, provided that they have published in the field over the last few years.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Carbohydrate Polymers requires authors to include tables and figures in the body of the article at the appropriate position, not at the end of the article. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Pages must be numbered, and lines must be numbered consecutively throughout the manuscript.

Article structure

(The abstract is not included in section numbering; see specific instructions below.) *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Focus on a number of key references; do not overlook the earlier, seminal work.

Hypotheses

Nearly all scientific papers benefit from inclusion of a statement of hypothesis. Such statements should be clear, concise, and declarative. The statement should describe the one or more key hypotheses that the work described in the manuscript was intended to confirm or refute. Inclusion of a hypothesis statement makes it simple to contrast the hypothesis with the most relevant previous literature and point out what the authors feel is distinct about the current hypothesis (novelty). It also permits the authors to describe why they feel it would be important to prove the hypothesis correct (significance). **Submissions must include a statement of hypothesis and authors will be asked to copy and paste this into the editorial system as part of the submission process.** The hypothesis shall be stated in the introductory section, and the conclusion section shall include your conclusion about whether the hypothesis was confirmed or refuted, as well as describing any new hypotheses generated by the work described. Here is an example of a famous, excellent hypothesis statement; declarative, concise, clear, and testable:

"Equal volumes of gases, at the same temperature and pressure, contain equal numbers of molecules."

Lorenzo Romano Amedeo Carlo Avogadro di Quareqa e di Carreto (Avogadro), 1811. **Review articles do not require a hypothesis statement**

Material and methods (or experimental)

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and description of published literature.

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. The Conclusion should not be a summary, but should illustrate the advances and claims of innovative aspects of the research work done.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

-

- **Title.** Concise, attractive and informative. The title should not exceed 120 characters excluding spaces and should make clear the focus of the paper and the fact that the focus is within the scope of the journal. Specifically name the carbohydrate polymer or group of carbohydrate polymers that is the main focus of the research. Because titles are used in information-retrieval systems, avoid abbreviations and formulae, avoid general terms when specific ones are available, avoid strings of names. Check for syntax and spelling. If your paper is a review paper, please include the word "review" somewhere in the title.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address

of each affiliation, including the country name and **the e-mail address of each author**. Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in Editorial Manager, or a department. Institutional email addresses, rather than personal email addresses such as gmail, are strongly preferred for all authors who are affiliated to an institution; this is particularly important for the corresponding author.

- **Corresponding author.** *Carbohydrate Polymers* allows only one corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of reviewing and publication, also post- publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

-

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required, and should be a maximum of 150 words in length. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Numerical values for the most important findings should be reported. An abstract is often presented separately from the article in databases, so it must be able to stand alone. For this reason, vague terms and references should be avoided. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h $\times$ w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a minimum of 3 and maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field or approved by learned societies in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure

consistency of abbreviations throughout the article. Abbreviations, except for very common terms (e.g. DNA, NMR), should not be used in the title of the paper.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork *Electronic artwork General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork](#).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables and Figures

Data used in tables and figures must be legible and relevant to the stated aims of your paper and related to a specific point. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them

with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Please ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Do not exceed a total of 10 tables/figures; any additional figures or tables can be included in the supplementary data. **Please note that over half the papers submitted to Carbohydrate Polymers in 2017 were sent back to authors because of poor figure resolution or exceeding the number of figures permitted.**

Carbohydrate Polymers requires authors to include tables and figures in the body of the article at the appropriate position, not at the end of the article

References

Citation in text

All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication (Smith, 2003);
2. Two authors: both authors' names and the year of publication (Smith & Jones, 2004);
3. Three, four or five authors: all authors names and year of publication (Smith, Jones, & Brown, 2005). For all subsequent citations of this work use et al. (Smith et al., 2005).
4. Six or more authors: first author's name followed by et al. and the year of publication (Black et al., 2007).

Citations may be made directly or parenthetically. Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, b, 1999; Allan & Jones, 1995; Allen et al., 1994). Kramer et al. (2000) have recently shown..."

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products,

authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use

reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/carbohydrate-polymers>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article.

Journal of Scientific Communications,
163, 51–59. Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted,

it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright- holder. Your article will be checked for plagiarism by the originality detection service Crossref Similarity Check. If the editors find an unacceptable level of similarity between your article and an existing paper in any journal, your article will be rejected, In cases of significant similarity, the Editors will consider further action, including contacting your institution and/or ethics committee.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you

to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of

publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail addresses for all authors
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All tables and figures (with captions) included in the body of the article

•

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <https://service.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#). Do not contact the editors - they do not have access to this information and will not be able to help you.

ANEXO C - ANEXO B NORMAS DA REVISTA BURNS

BURNS

Journal of the International Society for Burn Injuries

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Burns aims to foster the exchange of information among all engaged in preventing and treating the effects of burns. The journal focuses on clinical, scientific and social aspects of these injuries and covers the prevention of the injury, the epidemiology of such injuries and all aspects of treatment including development of new techniques and technologies and verification of existing ones. Regular features include clinical and scientific papers, state of the art reviews and descriptions of burn-care in practice.

Submission of papers

Authors are requested to submit their original manuscript and figures online via <https://www.editorialmanager.com/jbur>, which is the Elsevier web-based submission and peer-review system. Please follow these guidelines to prepare and upload your article. Once the uploading is done, our system automatically generates an electronic pdf proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revisions, will be managed via this system. If any illustrations, diagram or part of the text have been published elsewhere the source must be given in full, permission having been granted by the author and by the publisher.

Submitted manuscripts will be reviewed by selected referees and the author will be informed of editorial decisions based on the referee comments as soon as possible. For information about the status of your paper, please log on to <https://www.editorialmanager.com/jbur> On receipt of the first decision letter authors should submit their revised manuscript within three months in order to ensure that the scientific content of their manuscript is timely and up to date.

***Burns* no longer accepts Case Reports for publication.** Authors may submit Case Reports as well as Full Length Articles to the new Open Access journal, *Burns Open*. See <https://www.journals.elsevier.com/burns-open> for information, including Article Publication Fees. Manuscripts can be submitted via the Editorial Manager site: <https://www.editorialmanager.com/burns>.

Types of paper

Original Paper Burn-care in practice Letter to the Editor Review Paper Editorial Personal Report Addendum Book Review Supplement

Online only publications

Due to the large volume of submissions to the journal, Case Reports will be published online-only and will be listed on the contents page of a print issue. Authors will be informed if their submission is selected to appear online only.

Contact details for submission

If you have any problems submitting your paper through this system, please contact the Editorial Office on e-mail: burns@elsevier.com; tel: +44 (0)20 7424 4267; or fax: +44 (0)20 7424 4911

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It

is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright- holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original

submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Reporting clinical trials

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The [CONSORT checklist and template flow diagram](#) are available online.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.
[More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author but copies should not be provided to the journal. Only if specifically requested by the journal in exceptional circumstances (for example if a legal issue arises) the author must provide copies of the consents or evidence that such consents have been obtained. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to

typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/jbur>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word

processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class [elsarticle.cls](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography.

Our [LaTeX site](#) has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did

the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at

their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork *Electronic artwork General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired colorvision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not: Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Illustration services

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables must be placed on separate files and not embedded within the article text. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*,

<https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/burns>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. J Sci

Commun 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000. Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304. Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are

received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Additional information

Please submit your original manuscript and figures online, together with a covering letter which should be signed by the corresponding author on behalf of all authors, including: A statement that all authors have made substantial contributions. All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance. A statement that the manuscript, including related data, figures and tables has not been previously published and that the manuscript is not under consideration elsewhere. The names and contact addresses (including e-mail) of 3 potential reviewers that have not been involved in the design, performance and discussion of the data and are not a co-worker. You may also mention persons who you would prefer not to review your paper.

Each of the following sections should begin on a new page: title page; abstract; text; acknowledgements; references; tables; legends for illustrations. The title page should give the following information: title of the article; names, initials and appointment held by each author; name of the department or institution to which the work should be attributed and name and address of the author responsible for correspondence. The second page should carry an abstract of not more than 200 words. It should embody the purpose of the study or investigation, basic procedures (study material, observational and analytical methods), main findings (with specific data and their statistical significance) and the principal conclusions.

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to [download the free Adobe Reader](#), version 9 (or higher). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the [Adobe site](#).

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and scan the pages and return via e-mail. Please use this proof only for checking the typesetting, editing,

completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive 25 free paper offprints, or alternatively a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may

order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOIlink.

Additional information

Please Note: The Editor reserves the right to make editorial and literary corrections to the paper. No major alterations or corrections will be made without the knowledge and consent of the author.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).