

PERSPECTIVAS DA APLICAÇÃO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS

(Perspectives of cold atmospheric plasma application in cutaneous wound healing)

Joelma Gomes da SILVA¹; Moacir Franco de OLIVEIRA²; Carlos Augusto Galvão BARBOSA³; Clodomiro ALVES JÚNIOR⁴; Carlos Eduardo Bezerra de MOURA^{2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (UFERSA). BR 110 - Km 47, Bairro Presidente Costa e Silva, Mossoró/RN. CEP: 59.625-900; ²UFERSA; ³Universidade Federal do Rio Grande do Norte; ⁴Universidade Federal de São Carlos. *E-mail: carlos.moura@ufersa.edu.br

RESUMO

A medicina do plasma evoluiu no tratamento da cicatrização de feridas, se destacando como uma excelente possibilidade terapêutica. Por se tratar de algo relativamente novo, ainda há a necessidade de conhecimento de alguns dos seus mecanismos de ação e aplicação. Portanto, este artigo teve como objetivo fazer um levantamento da literatura acerca da aplicação do plasma atmosférico a frio no tratamento da cicatrização de feridas cutâneas como forma de nortear o médico veterinário para utilização desse recurso terapêutico. O plasma é gerado por campos eletromagnéticos e é considerado o quarto estado da matéria, tendo sua ação impulsionada por substâncias gasosas. Sua ação se dá a partir da interação das espécies reativas presentes no seu jato, que produz efeitos estimuladores sobre a angiogênese, a produção de colágeno, os fatores de adesão de uma célula a outra e migração celular, além de fatores de crescimento e sinalizações importantes nesse processo. Há vários relatos da sua eficácia tanto de maneira direta como indireta, o que aumenta sua possibilidade de uso. De maneira geral, é preciso uma melhor definição de parâmetros e modos de aplicação seguros, baseados principalmente no fluxo, intensidade, posicionamento e tempo de jateamento na área lesionada. É importante ainda o médico veterinário pensar sobre as particularidades da espécie tratada no momento, o que aponta a versatilidade do uso dessa terapêutica na clínica de feridas. Mesmo diante dessas lacunas, os parâmetros descritos na literatura parecem ser seguros e podem ser utilizados como referência para a consolidação de novos estudos em diferentes espécies e práticas clínicas.

Palavras-Chave: Medicina do plasma, CAP, regeneração, ferimento, tratamento.

ABSTRACT

Plasma medicine has evolved in wound healing treatment, being highlighted as an excellent therapeutic possibility. As it is something relatively new, there is still a need to know some of its mechanisms of action and application. Therefore, this article aimed to make a survey of the literature on the application of cold atmospheric plasma in the treatment of skin wound healing as a way to guide the veterinarian to use this therapeutic resource. Plasma is generated by electromagnetic fields and is considered the fourth state of matter, having its action driven by gaseous substances. Its action occurs from the interaction of reactive species present in its jet, which produces stimulating effects on angiogenesis, collagen production, adhesion factors from one cell to another, and cell migration, in addition to growth factors and important signals in this process. There are numerous reports of its effectiveness, both directly and indirectly, which increases its possibility of use. In general, a better definition of safe parameters and mode of application is needed, based mainly on the flow, intensity, positioning, and blasting time in the injured area. It is also important for the veterinarian to think about the particularities of the species treated at the moment, which points to the versatility of using this therapy in the wound clinic. Even in the face of these gaps, the parameters described in the literature appear to be safe and can be used as a reference for consolidating new studies in different species and clinical practices.

Keywords: Plasma medicine, CAP, regeneration, wounds, treatment.

INTRODUÇÃO

A ferida é caracterizada como uma descontinuidade na pele, independente da etiologia. E uma vez que se instaura, existem dois mecanismos principais de reparação: a

Recebido: abr./2022.

Publicado: dez./2022.

regeneração, com substituição do tecido lesionado por um novo; e a cicatrização, caracterizada pela deposição do colágeno, tendo sua ocorrência marcada por uma cascata de eventos que envolve componentes da matriz extracelular, mediadores de natureza lipídica e proteica, células residentes e de defesa (HUSSNI *et al.*, 2010; CHAVES *et al.* 2014).

No entanto, esses eventos estão passíveis de interferências tanto internas, como externas e isso faz com que o tratamento de feridas se apresente como um desafio, representando um dos principais fatores de morbimortalidade na prática clínica veterinária, além de impactar para o aumento dos custos de internação e tratamento (REIS FILHO *et al.*, 2014). Assim, muitos mecanismos têm sido utilizados desde os medicamentos de uso tópico, até terapias com tecnologias não invasivas, a exemplo do plasma atmosférico a frio gerado em barreira dielétrica - DBD (LU *et al.*, 2012).

Esse tratamento é caracterizado por descargas entre dois eletrodos divididos por uma barreira dielétrica isolante que energiza o ar para gerar o plasma. Dentre suas vantagens, têm-se o baixo custo, além da possibilidade de utilização de diversos gases que o tornam mais versátil. É de fácil aplicação e apresenta boa aceitação por ser indolor. Seus benefícios já são pronunciados na fase aguda pelo estímulo do processo de cicatrização de tecidos, com efeitos na proliferação de células endoteliais que apontam para a possibilidade de impactos positivos na angiogênese mediada posteriormente por essas células (KALGHATGI *et al.*, 2008; ALCÂNTARA *et al.*, 2013; BREHMER, 2015; ULRICH *et al.*, 2015).

Nessa perspectiva, o uso do plasma DBD desperta o interesse das ciências médicas, por ter sido considerado tolerável pelos tecidos biológicos e pela sua capacidade de inativar microrganismos como bactérias, e promover uma mudança no tecido sem causar inflamação (WOEDTKE *et al.*, 2014). Essas propriedades o tornam uma alternativa interessante para o tratamento de cicatrização de feridas, apresentando-se como promissora para uso em aplicações na clínica médica veterinária.

Diante disso, esta pesquisa teve como objetivo fazer um levantamento da literatura acerca da aplicação do plasma atmosférico a frio para tratamento de feridas cutâneas como forma de nortear o médico veterinário para utilização desse recurso terapêutico na clínica.

DESENVOLVIMENTO

Cicatrização da pele e fatores envolvidos

Quando submetido à uma situação de descontinuidade extensa mais profunda, o corpo responde com a deposição de colágeno local, o que confere uma estruturação diferente do tecido primário (CAMPOS *et al.*, 2007). Para isso, ocorre uma cascata de eventos coordenados e sobrepostos entre si com o objetivo principal de reconstituir o tecido perdido. Toda essa cascata se inicia com a hemostasia, caracterizada pela vasoconstrição da musculatura da parede dos vasos, formação do coágulo, deposição de fibrina e, portanto, estabilização da perda de sangue. Depois, ocorre a fase inflamatória,; seguida das fases de proliferação ou de granulação, e de remodelamento ou de maturação (ISAAC *et al.*, 2010; BRASSOLATTI *et al.*, 2016).

Na fase inflamatória, há a presença marcante dos sinais cardinais (dor, calor, rubor, edema e perda de função) e seu tempo pode variar em 96 horas ou mais, a depender dos

fatores intervenientes. A hemostasia e a coagulação são os mecanismos principais. Nessa fase, há uma migração de leucócitos e a cascata de eventos se inicia para que ocorra a reparação tecidual. O componente vascular é essencial para a formação de um ambiente propício, além do importante papel das plaquetas que liberam mediadores químicos, como o derivado de plaquetas (PDGF), o crescimento transformante- α e β (TGF- α , TGF - β), o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e o crescimento epidérmico (EGF); além de fatores que contribuem para a formação da matriz extracelular e o aumento da permeabilidade dos vasos para penetração de grupos celulares necessários (UZÊDA-E-SILVA *et al.*, 2016; SORG *et al.*, 2017).

Portanto, nas primeiras 24 horas após a lesão, há um predomínio de neutrófilos, que realizam fagocitose, além de liberar proteases e espécies reativas de oxigênio na intenção de eliminar os microrganismos presentes e degradar macromoléculas. E, após as primeiras 24 horas, começa a ocorrer uma alteração do tipo celular, com predomínio dos monócitos que se diferenciam em macrófagos e, juntamente com os residentes teciduais, irão coordenar todo o processo de reparo tecidual (UZÊDA-E-SILVA *et al.*, 2016).

Quando há uma redução da atividade inflamatória, inicia-se a proliferação tecidual, essencial para a formação cicatricial, e pode durar até três semanas. Essa fase, é marcada por três eventos, a saber: angiogênese, reepitelização e a fibroplasia. A angiogênese se caracteriza pela migração de células endoteliais de vasos íntegros para a região da borda da ferida, dando origem a novos capilares. Nessa fase, têm-se a ação primordial do VEGF (RAKOCEVIC *et al.*, 2017).

Na reepitelização há um restabelecimento das características estruturais e funcionais da epiderme que foram perdidas devido à lesão de descontinuidade. Para isso, há a participação expressiva de queratinócitos, que migram e se diferenciam na região (TAZIMA *et al.*, 2018). A fibroplasia, por sua vez, caracteriza-se pela proliferação e migração de fibroblastos, através dos quimioatraentes EGF e PDGF, principalmente. Após atraídos, irão se diferenciar em miofibroblastos por meio do PDGF e TGF- β ; e, após diferenciados, possuem capacidade de se contrair, o que faz com que essas células se movimentem por toda a área da ferida e depositem fibronectina sobre a fibrina. Dessa forma, começa-se a deposição de colágeno (ISAAC *et al.*, 2010).

Sobre o colágeno, o tipo que mais predomina no tecido reparado é o colágeno tipo III, onde há ligação com os miofibroblastos que alinham essas fibras e promovem a contração da ferida, mediados por TGF- β e PDGF (GORDON, 2016). Quando há uma grande deposição de colágeno, diminuição do número de capilares e fibroblastos, inicia-se a fase de remodelação (TAZIMA *et al.*, 2018).

A fase de remodelação pode durar semanas ou anos e se caracteriza pela diminuição da atividade celular, degradação do colágeno tipo III e aumento da produção de colágeno tipo I pelos fibroblastos de maneira equilibrada. À medida que ocorre essa transição, dá-se o remodelamento tecidual, fator necessário para a contração da ferida e aumento da resistência mecânica do tecido. Esse evento é mediado pela comunicação das células da matriz extracelular, além da influência de substâncias, como serotonina, epinefrina, angiotensina e bradicinina (PARK *et al.*, 2017).

Com relação ao comportamento de aproximação da borda da ferida, a cicatrização pode ser classificada como por primeira intenção e por segunda intenção. Sendo assim,

Recebido: abr./2022.

Publicado: dez./2022.

quando a extensão da lesão permite que as bordas da ferida se aproximem mecanicamente, diz-se que a cicatrização foi por primeira intenção. Nesses casos, a perda tecidual é mínima. Já quando a lesão é extensa a ponto de não permitir que esse processo ocorra, sendo necessário que haja o mecanismo de contração, têm-se a cicatrização por segunda intenção, que é caracterizada por grande perda tecidual. Atualmente, fala-se numa outra classificação que é a de terceira intenção, quando a ferida é mantida aberta e por meio de enxertos é feita essa aproximação das bordas (TAZIMA *et al.*, 2018).

Plasma DBD: características, mecanismos de ação e evolução

O plasma é gerado por campos eletromagnéticos e pode ser considerado o quarto estado da matéria, além de ser o mais abundante na natureza, presente em vários fenômenos naturais, bem como nas tecnologias usadas no dia a dia (ARPAGAUS *et al.*, 2018). Sua característica predominante é ser um meio condutor, composto por um conjunto de partículas, que, apesar de estarem individualizadas no meio, a interação entre elas é essencial para que se tenha a geração da energia (BARDOS e BARANKOVA, 2010).

Nesse campo de estudo, há o envolvimento de conhecimentos da física, das ciências da saúde e da medicina com o objetivo de estabelecer parâmetros aceitáveis tanto dentro do tratamento de superfícies e materiais biomédicos como diretamente de tecidos biológicos. Desse modo, a medicina do plasma tem evoluído para o tratamento de afecções como câncer, na ação antibacteriana, e nas alterações dermatológicas de maneira geral, com destaque para cicatrização de feridas (IZADJOO *et al.*, 2018).

A ação do plasma é impulsionada a partir de substâncias gasosas que podem ser gás hélio, argônio, oxigênio, nitrogênio, ar ambiente, entre outros gases. Além disso, o plasma pode ser composto por partículas carregadas, como os elétrons e íons; partículas neutras; espécies reativas de oxigênio (ROS - Reactive Oxygen Species) e nitrogênio (RNS - Reactive Nitrogen Species), que são formadas a partir da interação dos elétrons presentes e disponíveis no plasma e as partículas de oxigênio e nitrogênio desse meio (JO *et al.*, 2015).

Desse modo, as espécies reativas têm sua ação direta na membrana celular, provocando desde o rompimento por estresse oxidativo ou pelo aumento da tensão eletrostática até a morte celular pelo seu efeito neutralizador ou por fótons ultravioletas (UV), que causam a necrose (PINTO, 2018). Além disso, há os efeitos de cicatrização pelo estímulo e aceleração de componentes e mecanismos envolvidos nesse processo, como angiogênese, produção de colágeno, fatores de adesão de uma célula a outra e migração celular. Esses mecanismos podem ocorrer pela interação do óxido nítrico e peróxido de hidrogênio que atuam estimulando ou inibindo a proliferação celular, ao passo que estimulam fatores de crescimento importantes no processo inflamatório, e atuam na coagulação sanguínea junto com as ROS (ALVES *et al.*, 2019).

Com relação a obtenção do plasma, têm-se basicamente o corona, que é aquele que emite o plasma por meio de superfícies assimétricas; o jato de plasma, que por sua conformidade pode emitir o plasma para superfícies irregulares; e o plasma DBD, que é a descarga por barreira dielétrica que ocorre entre o espaço de dois eletrodos (NISHIME *et al.*, 2016).

Nessa modalidade, é necessário que pelo menos uma ou as duas superfícies estejam recobertas por barreira dielétrica, que pode ter suas superfícies formadas por quartzo, vidro,

Recebido: abr./2022.

Publicado: dez./2022.

cerâmica, entre outros materiais; além da distância entre elas que deve ser mínima. As descargas operam em altos intervalos de tensões, tendo como vantagens a limitação da corrente, a prevenção na formação de arco, o impedimento do trabalho de forma contínua, a capacidade de produzir moléculas excitadas, além da flexibilidade no que diz respeito à forma geométrica (podendo ser plana, cilíndrica, coplanar ou de superfície), e ao modo de operação, gases utilizados e parâmetros gerais (potência de entrada, fluxo do gás, frequência e pressão). Já como desvantagens, têm-se a limitação dimensional da amostra, já que as superfícies ficam muito próximas (LU *et al.*, 2012).

Como forma de suprir as desvantagens desse sistema, surge a possibilidade do uso do jato tipo DBD, que atua dentro da mesma lógica explicada anteriormente, ao passo que possui uma baixa potência e, conseqüentemente, sua temperatura é próxima à ambiental, o que torna seu uso seguro independente da distância estabelecida com a superfície a ser tratada. Tais características o tornam aplicável na área biomédica (NISHIME *et al.*, 2016).

Plasma DBD e cicatrização de feridas

A partir do século XIX, começou-se a aplicação do plasma para fins biomédicos, e desde então o campo de estudo para melhor aplicabilidade das propriedades físicas dessa terapia vem passando por evolução e aprofundamentos (WOEDTKE *et al.*, 2014).

Nesse sentido, o CAP (do inglês *Cold Atmospheric Plasma*) tem sido amplamente difundido para o tratamento de cicatrização de feridas e isso se deve à interação das moléculas reativas (óxido nítrico - NO, Peróxido de Hidrogênio - H₂O₂, Ozônio - O₃, Dióxido de nitrogênio - NO₂, entre outras) presentes ao redor do jato do plasma que, quando administradas de maneira segura, promovem benefícios e recuperação para a saúde em geral, desde seus efeitos contra bactérias, regulação de metabolismo, comunicação entre os meios celulares, sinalização para fatores de crescimento, estímulo para coagulação sanguínea, angiogênese, respostas imunes e inflamatórias, produção de colágeno, adesão celular, diminuição do pH, levando à acidificação da pele e, assim, até o processo da coagulação, com a conversão de fibrinogênio em fibrina (DAESCHLEIN *et al.*, 2012; DEZEST *et al.*, 2017).

Essas espécies reativas acabam se associando e diminuindo ainda mais seus efeitos tóxicos, o que potencializa os efeitos terapêuticos. No caso do NO, quando em baixas concentrações, estimula os fatores de crescimento que são essenciais na fase inflamatória da cicatrização, enquanto o H₂O₂ atua diretamente no processo de proliferação celular e indução da apoptose (KIM *et al.*, 2010).

Outro componente que surge com a aplicação do plasma é o ozônio, em uma concentração de 100µg/m³, levando em consideração uma distância de 5mm do eletrodo em relação à superfície da pele (TUMMEL *et al.*, 2007). Esse componente já tem seu efeito discutido com relação à desinfecção e imunomodulação. Além disso, já se tem investigações sobre o efeito do ozônio na cicatrização de feridas em pacientes diabéticos, através da sua ação antioxidante e demais mecanismos envolvidos numa concentração 60g/m³ (SÁNCHEZ *et al.*, 2005).

Outra vantagem para o uso do plasma está relacionada com a abrangência da superfície disponível em sua totalidade, a falta de contato direto com a ferida que evita o risco de contaminação, sua aplicação segura e a associação com alívio da dor. Dessa maneira, a literatura tem relatado a eficiência da sua ação no processo de cicatrização. Isso pode estar

Recebido: abr./2022.

Publicado: dez./2022.

relacionado ainda à capacidade de ativação da expressão de interleucinas como a IL-8; fatores de crescimento como TGF- β 1 e TGF β 2, envolvidos no processo de cura local. Além da ativação de integrinas, que promovem a adesão celular e a estimulação da angiogênese (LENDECKEL *et al.*, 2015; IZADJOO *et al.*, 2018).

Aplicabilidade clínica do plasma: parâmetros para obtenção do plasma e efeitos

Para obtenção do jato de plasma é necessário estabelecer parâmetros importantes, a exemplo da tensão, voltagem, taxa de fluxo e frequência. Isso pode variar entre os aparelhos utilizados, no entanto, de maneira geral, deve ser definido com vista nos objetivos clínicos e, portanto, ressalta a necessidade da discussão.

Já se sabe que o CAP surgiu como uma possibilidade terapêutica para o uso na clínica veterinária por ser um tratamento resolutivo de uma afecção que causa transtorno no bem-estar animal e oferece riscos para sua sanidade e vida, tanto pela presença da dor e demais processos envolvidos, como pelo risco de contaminação. Sobre seu uso, os estudos apontam parâmetros diversificados aplicados principalmente em animais de experimentação, a exemplo da pesquisa de Tipa e Kroesen (2011), em que utilizaram o jato de plasma por meio de uma fina agulha a uma tensão de 13,56 MHz, com gás hélio, numa taxa de fluxo de 1L/min e voltagem aplicada à ferida de 200-400 V de pico, com um consumo de 100mW de energia; e concluíram que o CAP possui efeitos tanto na desinfecção das feridas, como no processo de cicatrização.

Concordando com esse pensamento, Kubinova *et al.* (2017) utilizaram o plasma com o ar atmosférico, com um volume de $5 \times 10^{17} \text{m}^{-3}$, temperatura do gás de 30–35 °C, com variação e duração do tratamento de 60 e até 120 segundos. Esses autores encontraram um efeito apenas na fase proliferativa da cicatrização, além da morte bacteriana, tanto de gram negativas como de gram positivas. Não foi encontrada diferença significativa com relação ao fechamento da ferida relacionada ao tempo, porém houve o relato que tanto com tratamento de um minuto como com o de dois minutos, no dia sete, a ferida estava melhor fechada esteticamente, apontando para a eficiência de ambos os tempos. Concordando com estudos anteriores, não houve registro de efeitos adversos.

Ainda com relação ao tempo e ao modo de aplicação, Daeschlein *et al.* (2012), investigaram o efeito de três fontes diferentes de plasma (jato de plasma pulsado e não pulsado e o DBD), na ponta dos dedos de humanos utilizando o gás argônio com fluxo de 8L/min, com uma tensão de 1-5 kV, frequência de 1,5 MHz e tempo que variou de três a 240 segundos, e a 12mm de distância. Com relação a temperatura da pele, se manteve em 37 °C, a umidade da pele também se manteve e, com relação a transpiração transepidermica, houve redução nas aplicações do plasma pulsado e DBD em 20%, que se normalizou após 30 minutos. De maneira geral e a partir de avaliações subjetivas de dor e parestesia, os autores concluíram que o plasma foi bem tolerado pelos indivíduos.

Na medicina veterinária, isso foi relatado por Lademanna *et al.* (2013) através da pele intacta de orelhas de suínos. Esses autores conseguiram definir uma velocidade ideal do fluxo para manter uma temperatura aceitável pelo tecido (35 a 45 °C), de 8mm/s e 10mm/s, a uma distância de 5 a 8mm da área tratada. Foi testado ainda na mesma pele, após uma lesão, e os resultados encontrados foram semelhantes, ou seja, tanto na pele intacta como na pele

lesionada, o uso do plasma se mostrou seguro com relação à temperatura do tecido. Portanto, apesar das diferenças morfológicas entre os animais, isso aponta para a possibilidade terapêutica na área.

Metelmann *et al.* (2012), em um estudo experimental, prospectivo, randomizado e controlado, avaliaram o efeito de diferentes parâmetros do plasma na pele de cinco indivíduos submetidos à uma lesão por laser de CO₂, através de fotografias obtidas no dia dez. O gás utilizado foi o argônio, num fluxo de 4 a 6slm, que foi aplicado imediatamente após a ferida. Os autores concluíram que tratamentos a curto prazo (dez segundos) aplicados repetidamente por três dias foram mais eficazes, com resultados estéticos mais precoces; seguido pela aplicação única e a longo prazo (30 segundos). Quando aplicado o tratamento a curto prazo (dez segundos) e com aplicação única, os resultados não foram satisfatórios, tendo comportamento igual ao do grupo controle.

Nessa mesma perspectiva, Metelmann *et al.* (2013), concluíram que o plasma possui efeitos satisfatórios no momento inicial da cicatrização, ou seja, na fase inflamatória; bem como de maneira tardia. Os autores avaliaram as lesões após 12 meses e relataram que o tratamento com plasma demonstrou uma estética superior e prevenção de doenças pós-traumáticas a longo prazo, comprovando a boa recuperação da pele por essa terapêutica. Algo de extrema importância na clínica veterinária já que os animais são bastante suscetíveis a lesões devido seus hábitos de vida. Assim, esses resultados apontam para uma possibilidade não somente do tratamento imediato, mas da diminuição tanto de recidivas, como do risco da cronicidade.

Sob outra perspectiva, Nastuta *et al.* (2011), em seu experimento com ratos e utilizando o gás hélio por meio do jato de plasma com um fluxo de 3slm (velocidade do gás 2,5ms⁻¹), potência de 2kHz e tensões de 4-5kV, no tempo de 40 segundos diários e acompanhamento de 21 dias, compararam o efeito da aplicação do plasma na ferida ao seu controle e do plasma aplicado a um curativo de poliuretano e seu controle, concluindo que tanto o tratamento direto como a aplicação dos curativos tratados com plasma apresentaram efeitos benéficos nas feridas, com aceleração da reepitelização da epiderme. Sem dúvida, isso vem a sanar possíveis dificuldades no atendimento daqueles animais com temperamento mais difícil, onde o uso do plasma de maneira direta poderia ser inviável.

O mesmo fato foi encontrado no estudo de Martines *et al.* (2020) com ovelhas, utilizando o plasma com gás hélio, a um fluxo de 1,75L/min, de forma indireta, durante dois minutos em cada ferida, com uma potência de 0,5 W. Houve um fechamento mais rápido para aquelas feridas tratadas com plasma, além da diminuição da carga bacteriana. Concomitantemente, houve um aumento de ROS e, após seis semanas, redução significativa da inflamação. Ainda, observou-se uma indução para angiogênese de maneira antecipada, com forte proliferação celular. Um outro achado relevante foi a promoção do crescimento de pelos ocasionada pelo plasma, algo promissor no tratamento de feridas cutâneas de animais, associado à saúde, proteção e estética.

Esses dados subsidiam o uso do plasma em diferentes situações, gerando possibilidades terapêuticas. Porém, percebe-se que ainda há uma grande variação na forma de uso, na definição dos parâmetros e na escolha do gás. De maneira geral, mesmo com gases diferentes, impactos positivos têm sido relatados no processo de cicatrização. Porém, alguns

autores buscam entender a ação de cada um para melhor elucidar seu mecanismo de ação e escolha.

Decisão terapêutica: escolha do gás utilizado no CAP e seus efeitos no processo de cicatrização

O plasma atmosférico a frio é uma ferramenta bastante versátil. Para sua obtenção podem ser utilizados diferentes gases de trabalho. Esses gases certamente possuem efeitos clínicos diferentes, porém isso ainda está em discussão na literatura. O que se tem consolidado é que os dois mais utilizados são o argônio e o hélio, por serem gases inertes e mais estáveis, além de já terem seus efeitos comprovadamente embasados cientificamente.

Nesse sentido, Alcântara *et al.* (2013) realizaram um estudo comparativo entre o gás hélio e o argônio. O argônio foi aplicado com uma dose de exposição de 1,2J/cm² e um fluxo de 0,5slm, a uma distância de 23 a 5mm, durante um minuto, sendo o processo repetido mais duas vezes com intervalo de 20 minutos. Já o Hélio foi aplicado na segunda fase do experimento, com uma dose de 60J/cm² e fluxo na agulha de 1,5slm, por cinco minutos. Esse procedimento foi repetido por três vezes, com intervalo de 60 minutos entre as aplicações. A presença das espécies reativas (ROS e RNS) foi observada após a aplicação de ambos os gases. Porém, um fato que chamou a atenção foi que o óxido nítrico, que desempenha um papel bastante relevante no processo de cicatrização, só foi encontrado com a aplicação do gás hélio, apontando que esse gás foi o que promoveu o fechamento total da ferida. Uma limitação desse estudo é o fato de ter sido utilizada a mesma ferida para tal aplicação.

Já Kubinova *et al.* (2017) defendem o uso do ar ambiente devido à ausência de efeitos adversos. Enquanto outros autores que utilizaram o argônio também relataram a contribuição desse gás. Isso pode ser visto no estudo de Shao *et al.* (2016) através da aplicação do microplasma com argônio, com uma potência variando de 5–18 W (com uma média de 17 W) e uma taxa de fluxo de ar de 5 slm, a uma temperatura abaixo de 40 °C. Os autores concluíram que a aplicação dessa modalidade contribuiu para a diminuição do leito da ferida a partir de uma avaliação da cinética da lesão tanto nos dias sete e 14 como no dia 21, com comprovação de tecido neoformado. A concentração de NO presente no tecido aumentou progressivamente associada aos tempos de 30, 60 e 90 segundos.

Hung *et al.* (2016), trataram ratos com o plasma com 99% de argônio (1,8L/min) e 1% de oxigênio (0,01L/min), durante cinco minutos diários, com uma frequência entre 0,5kHz e 4kHz, e encontraram diferenças com relação ao tempo de cicatrização e presença de exsudato na ferida com relação ao grupo controle que apresentou persistência do exsudato. Ao final do estudo, os autores concluíram que o uso do plasma promoveu a estimulação da proliferação, migração celular e adesão celular para a área da ferida, apontando que o plasma melhora o processo de cicatrização por meio do aumento de espécies reativas, como o ROS, além de promover o reparo histológico precoce.

Portanto, antes de pensar na escolha do gás, é preciso compreender os mecanismos de ação de cada um deles para que, no momento da terapêutica, essa escolha esteja embasada em critérios consistentes, como o tipo da lesão, a situação e o tempo que o tecido está lesionado, as doenças sistêmicas associadas, bem como o fator espécie, que, apesar de apresentar mecanismos fisiológicos similares para a cicatrização, possui suas especificidades, como é o caso do cão e do gato, por exemplo (BOHLING e HENDERSON, 2006).

Recebido: abr./2022.

Publicado: dez./2022.

disso, há o caso dos cavalos, que apresentam a grande problemática da alta incidência de feridas e dificuldade de cicatrização (PRADO *et al.*, 2020). Ou ainda a correlação entre o ambiente que o animal vive, os hábitos de vida e a predisposição para infecções e possíveis novos traumas. Nessa perspectiva, cabe ao médico-veterinário analisar os efeitos do plasma de acordo com as especificidades e necessidades do seu paciente.

Efeitos diretos do CAP nas etapas de cicatrização da ferida

Com relação à influência do CAP no processo de cicatrização, Lopes *et al.* (2013) relataram em seu estudo que, quando comparado os infiltrados presentes no momento da inflamação, o grupo tratado com plasma apresentou um quantitativo maior de infiltrados, contrapondo-se ao grupo controle. Da mesma forma com relação à concentração de colágeno, que se apresentou mais próxima numericamente das taxas de colágeno da pele normal. Contrariando isso, Kubinova *et al.* (2017) afirmaram que apesar de ter ocorrido aumento no número de colágeno do grupo tratado não foi significativo. Além do que a quantidade de colágeno diminuiu, aumentando somente no dia sete. Esses autores sugerem ainda que o plasma apresentou um efeito positivo no processo de contração da ferida e reepitelização na fase posterior, a partir da diminuição da granulação no dia sete. Com relação ao número de macrófagos na região, não houve diferença entre os grupos.

A respeito das avaliações hematológicas, Hung *et al.* (2016) relataram que o número de leucócitos se manteve maior no grupo controle no segundo dia após a lesão, quando comparado ao grupo experimento; comportamento esse mantido após um mês, porém não apresentou diferença significativa. Entretanto, houve menos infecção e processo inflamatório no grupo experimento. A toxicidade dos órgãos pelo plasma também foi avaliada, apontando para resultados que comprovaram a segurança do seu uso.

Com relação à angiogênese, Kubinova *et al.* (2017) relataram que a mesma não ocorreu na fase inflamatória, ao contrário do estudo de Lopes *et al.* (2013), que comprovou um aumento de vasos sanguíneos no grupo tratado com plasma no segundo dia do experimento, em contrapartida ao controle que foi somente no sétimo dia.

Essa discussão, portanto, remete mais uma vez à escolha dos parâmetros ideais e, principalmente, seguros, pois, devido grande variabilidade na aplicação e suas definições, alguns efeitos acabam não sendo bem elucidados. Porém, já se sabe que a letalidade para as células ou efeitos terapêuticos está diretamente relacionada à dose oferecida ao tecido. Pesquisas apontam que diferentes concentrações de gases, seja de hélio, nitrogênio, oxigênio ou outro com ação isolada ou combinados, possuem efeitos deletérios nas células do corpo de forma diferenciada (SHAO *et al.*, 2016; DEZEST *et al.*, 2017).

Entretanto, vale lembrar que, para danificar uma célula do organismo, as doses precisam ser muito maiores do que aquelas necessárias para eliminar uma bactéria, já que as espécies reativas são utilizadas por nosso sistema imunológico para esse fim. Isso desponta como uma fundamentação teórica para o uso do plasma similarmente a um antibiótico tópico (WOEDTKE *et al.*, 2014; KURAHASHI e FUJII, 2015).

A partir desta análise da literatura, já se pode inferir que há uma relação direta entre o tempo de exposição e a toxicidade do plasma. No caso de células epiteliais, doses intermediárias de 60 segundos e doses maiores de 300 segundos, foram capazes de ativar a apoptose celular (RECEK *et al.*, 2016). Essa apoptose está relacionada extensivamente à

Recebido: abr./2022.

Publicado: dez./2022.

atuação dos radicais livres (NO e ROS, predominantemente) no processo oxidativo da membrana celular; além da fragmentação do DNA da célula (LOPES *et al.*, 2013).

No entanto, Kim *et al.* (2010) relataram que essas espécies reativas surgem de forma natural durante o reparo tecidual, e o plasma surge como uma fonte auxiliar nesse processo, potencializando as respostas e agindo diretamente no processo da cicatrização, que viabiliza seu uso. Porém, Kos *et al.* (2017) aplicaram um plasma com gás hélio no espaço de 2cm entre o dispositivo e a pele do rato, com um fluxo de 5L/min por 0,5s, um, dois, três e quatro minutos. No caso do tratamento de quatro minutos, o dano à pele foi avaliado adicionalmente usando taxas de fluxo de plasma variando de 1±5L/min. Os autores dividiram os danos em precoces ou diretos, que se referiam às queimaduras, e indiretos ou tardios, fazendo alusão à presença de edema ao redor da área tratada. O tempo de aplicação influenciou no aparecimento dos danos ditos precoces ou imediatos, com aqueles animais tratados por um tempo mais prolongado, que correspondeu a quatro minutos, apresentando maiores danos com queimaduras graves.

Porém, com relação aos danos indiretos, não houve influência do tempo, mas sim do ângulo de jateamento da pele, sendo que quando o jato esteve totalmente perpendicular, foi associado ao maior aparecimento. Com relação ao fluxo do jato, a intensidade também foi responsável por causar danos. Quando no valor mínimo (1L/min) não conseguiu alcançar a pele e no valor máximo causou danos maiores atingindo até a derme. O fluxo também influenciou no aumento da temperatura, sendo que no menor fluxo praticamente não ocorreu alteração dessa variável, nos demais fluxos foi atingido o máximo e mantido o padrão, e na taxa de fluxo de 2L/min as temperaturas da pele foram ligeiramente elevadas, já nas taxas de 3±5L/min, apresentaram as medidas mais altas. De acordo com o fluxo, houve também o aparecimento de mais espécies reativas, que acabou causando danos na pele tardiamente (KOS *et al.*, 2017).

Portanto, isso desperta para a necessidade de melhor entendimento e aprofundamento acerca dos caminhos bioquímicos da ação do plasma, além da escolha correta do tipo de gás, parâmetros utilizados e modo de aplicação. De toda forma, a partir dos dados já disponíveis na literatura, é possível o médico veterinário despertar para a aplicabilidade dessa técnica como uma possibilidade de sucesso terapêutico, tendo em vista a particularidade dos seus pacientes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A padronização e o aprimoramento da aplicação do plasma são, neste momento, as necessidades mais urgentes dentro do campo da medicina do plasma. Isso será obtido através da melhor elucidação dos seus mecanismos de ação, e, para o médico-veterinário, do entendimento das especificidades morfológicas e fisiológicas da pele tratada no momento.

Mesmo diante dessa lacuna, os efeitos do plasma a nível microscópico, desde a angiogênese, a produção de colágeno, a liberação de espécies reativas, a sinalização para células de defesa, entre outros, embasam o seu uso para a terapêutica de cicatrização de feridas ao passo que impacta positivamente a nível macroscópico.

Portanto, torna-se possível um direcionamento para a prática clínica veterinária, a partir da definição de parâmetros já estabelecidos de maneira pontual ou dentro de intervalos considerados seguros, sendo o tempo de aplicação, o fluxo e o posicionamento em relação à ferida, medidas a serem consideradas nessa tomada de decisão.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, E.G.; CALLEJAS, R.L.; PEDRO, RAMÍREZ, R.M.; EGUILUZ, R.P.; MUÑOZ, R.F.; CABRERA, A.M.; BAROCIO, S.R.; ALVARADO, R.V.; MÉNDEZ, B.G.R.; CASTRO, A.E.M.; BENEITEZ, A.P.; OLMEDO, I.A.R. Accelerated Mice Skin Acute Wound Healing In Vivo by Combined Treatment of Argon and Helium Plasma Needle. *Archives of Medical Research*, v.44, n.3, p.69–177, 2013.

ALVES D.P.; PINHEIRO C.J.G.; RIBEIRO C.M. Construção de um reator de plasma frio à pressão atmosférica com materiais de baixo custo. *The Brazilian Journal of Development*, v.5, n.4, p.3914-3919, 2019.

ARPAGAUS, C.; OBERBOSSSEL, G.; ROHR, P.R.V. Plasma treatment of polymer powders from laboratory research to industrial application. *Plasma Process Polymer*, v.5, n.12, p.1-60, 2018.

BARDOS, L.; BARANKOVA, H. Cold atmospheric plasma: sources, processes, and applications. *Thin Solid Films*, v.518, n.23, p.6705–6713, 2010.

BOHLING, M.W.; HENDERSON, R.A. Differences in cutaneous wound healing between dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.36, n.4, p.687-92, 2006

BRASSOLATTI, P.; BOSSINI, P.S.; OLIVEIRA, M.C.; KIDO, D.H.W.; TIM, C.R., LOPES, L.A.; DE AVÓ, L.R.S.; MOREIRA, F.M.A.; PARIZOTTO, N.A. Comparative effects of two different doses of low-level laser therapy on wound healing third-degree burns in rats. *Microscopy Research and Technique*, v.79, n.4, p.313–20, 2016.

BREHMER, F.; HAENSSLE, H.A.; DAESCHLEIN, G.; AHMED R., PFEIFFER, S.; GÖRLITZ, A.; SIMON, D.; SCHÖN, M.P.; WANDKE, D.; EMMERT, S.; Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm VU-2010): results of a monocentric two-armed open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v.29, n.1, p.148-155, 2015.

CAMPOS, A.C.L.; BRANCO, A.B.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. *ABCD, Arquivos Brasileiros de Dermatologia*, v.20, n.1, p.51-58, 2007.

CHAVES, M.E.A.; ARAÚJO, A.R.; PIANCASTELLI, A.C.C.; PINOTTI, M. Effects of low-power light therapy on wound healing: LASER x LED. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v.89, n.4, p.616-623, 2014.

Recebido: abr./2022.

Publicado: dez./2022.

KIM, C.H.; KWON, S.; BAHN, J.H.; LEE, K.; JUN, S.I.; RACK, P.D.; BAEK, S.J.; SEUNG, J.B. Effects of atmospheric nonthermal plasma on invasion of colorectal cancer cells. *Applied physics Letters*, v.96, n.24, p.3701, 2010.

DAESCHLEIN, G.; SCHOLZ, S.; AHMED, R.; VON WOEDTKE, T.; HAASE, H.; NIGGEMEIER, M.; KINDEL, E.; BRANDENBURG, R.; WELTMANN, K.D.; JUENGER, M. Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. *Journal of Hospital Infection*, v.81, n.3, p.177-183, 2012.

DEZEST, M.; CHAVATTE, L.; BOURDENS, M.; QUINTON, D.; CAMUS, M.; GARRIGUES, L.; DESCARGUES, P.; ARBAULT, S.; SCHILTZ, O.B.; CASTEILLA, L.; CLÉMENT, F.; PLANAT, V.; BULTEAU, A.L. Mechanistic insights into the impact of Cold Atmospheric Pressure Plasma on human epithelial cell lines. *Scientific Reports*, v.7, n.1, p.41163, 2017.

GORDON, S. Phagocytosis: an immunobiologic process. *Immunity*, v.44, n.3, p.463-476, 2016.

HUNG, Y.W.; LEE, L.T.; PENG, Y.C.; CHANG, C.T.; WONG, Y.K.; TUNG, K.C. Effect of a nonthermal-atmospheric pressure plasma jet on wound healing: An animal study. *Journal of the Chinese Medical Association*, v.79, n.6, p.320-328, 2016.

HUSSNI, C.A.; GROH, T.M.; ALVES, A.L.G.; CROCCI, A.J.; DE MELLO, N.J.L.; WATANABE, M.J. Efeitos da fenilbutazona na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em equinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.47, n.4, p.262-267, 2010.

ISAAC, C., LADEIRA, P.R.S.; REGO, F.M.P.; ALDUNATE, J.C.B.; FERREIRA, M.C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Revista de Medicina (São Paulo)*, v.89, n.3/4, p. 125-31, 2010.

IZADJOO, M.; ZACK, S.; KIM, H.; SKIBA, J. Medical applications of cold atmospheric plasma: state of the Science. *Journal of Wound Care North American*, v.27, n.9, p.4-10, 2018.

JO, H.; JUN, H.W.; SHIN, J.; LEE, S.H. Biomedical Engineering: Frontier Research and Converging Technologies, v.9, p.1-511, 2015.

KALGHATGI, S.U.; FRIDMAN G.; FRIDMAN A.; FRIEDMAN G.; CLYNE, A.M. Non-Thermal Dielectric Barrier Discharge Plasma Treatment of Endothelial Cells. *Conferência Internacional Anual da IEEE Engenharia em Medicina e Biologia.*, v.30, n.1, p.3578-3581, 2008.

KURAHASHI, T.; FUJII, J. Roles of Antioxidative Enzymes in Wound Healing *Journal of Developmental Biology*, v.3, n.2, p.57-70, 2015.

KUBINOVA, S.; ZAVISKOVA, K.; UHERKOVA, L.; ZABLITSKII, V.; CHURPITA O.; LUNOV O.; DEJNEKA, A. Non-thermal air plasma promotes the healing of acute skin wounds in rats. *Scientific Reports*, v.7, n.45183, p.1-11, 2017.

KOS, S.; BLAGUS, T.; CEMAZAR, M.; FILIPIC, G.; SERSA, G.; CVELBAR, U. Safety aspects of atmospheric pressure helium plasma jet operation on skin: In vivo study on mouse skin. *PLoS ONE*, v.12, n.4, p.1-5, 2017.

LADEMANNA J.; ULRICHA C.; PATZELTA A.; RICHTERA H.; KLUSCHKEA F.; KLEBESA M.; LADEMANNB O.; KRAMERB A.; WELTMANNK D.; LANGE-ASSCHENFELDT B. Risk assessment of the application of tissue-tolerable plasma on human skin. *Clinical Plasma Medicine*, v.1, n.1, p.5–10, 2013.

LENDECKEL, D.; EYMANN, C.; EMICKE, P.; DAESCHLEIN, G.; DARM, K.; O'NEIL, S.; BEULE, A.G.; WOEDTKE, T.V.; VÖLKER, U.; WELTMANN, K.D.; JÜNGER, M.; HOSEMANN, W.; SCHARF, C. Proteomic changes of tissue-tolerable plasma treated airway epithelial cells and their relation to wound healing. *BioMed Research International*, v.2015, n.1, p.1-17, 2015.

LOPES, B.B.; KRAFT, M.B.P.L.; REHDER, J.; BATISTA, F.R.X.; PUZZI, M.B. The interactions between non-thermal atmospheric pressure plasma and ex-vivo dermal fibroblasts. *Procedia Engineering*, v.59, n.1, p.92–100, 2013.

LU, X.; LAROUCSI, M.; PUECH, V. On atmospheric-pressure non-equilibrium plasma jets and plasma bullets. *Plasma Sources Science and Technology*, v.21, n.3, p.1-17, 2012.

MARTINES, E.; BRUNB, P.; CAVAZZANAA, R.; CORDAROA, L.; ZUINA, M.; MARTINELLOC, T.; GOMIEROC, C.; PERAZZID, A.; MELOTTIC, L.; MACCATROZZOC, L.; PATRUNOC, M.; IACOPETTI, I. Wound healing improvement in large animals using an indirect helium plasma treatment. *Clinical Plasma Medicine*, v.17, n.18, p.17-18, 2020.

METELMANN, H.R.; WOEDTKE, T.V.; BUSSIAHN, R.; WELTMANN, K.D.; RIECK, M.; KHALILI, R.; PODMELLE, F.; WAITE, P.D. Experimental Recovery of CO₂-Laser Skin Lesions by Plasma Stimulation. *The American Journal of Cosmetic Surgery*, v.29, n.1, p.52–56, 2012.

METELMANN, H.R.; THI, T.V.; HOANG, T.D.; THI, N.B.L.; HOANG, T.T.H.; THI, T.T.P.; TRAN, M.L.L.; VAN, T.D.; NGUYEN, T.T.H.; NGUYEN, T.L.; LE, D.Q.; LE, T.K.X.; WOEDTKE, T.V.; BUSSIAHN, R.; WELTMANN, K.D.; KHALILI, R.; PODMELLE, F. Scar formation of laser skin lesions after cold atmospheric pressure plasma (CAP) treatment: A clinical long term observation. *Clinical Plasma Medicine*, v.1, n.1, p.30–35, 2013.

NASTUTA, A.V.; TOPALA I.; GRIGORAS, C.; POHOATA, V.; POPA, G. Stimulation of wound healing by helium atmospheric pressure plasma treatment. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v.44, n.10, p.1-9, 2011.

PARK, J.W.; HWANG, S.R.; YOON, A.S. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. *Molecules*, v.22, n.8, p.1259, 2017.

PINTO, E.K.M. Desenvolvimento de um Dispositivo de Jato de Plasma para o tratamento de cancro da pele, 2018. 106p. (Dissertação Mestrado em Engenharia Biomédica). Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2018.

PRADO L.G.; MARTINS, N.A.; MACHADO, M.R.F.; ARAUJO, G.H.M. Ozonioterapia no tratamento de feridas em equino. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.34, n.6, p.375-387, 2020.

RAKOCEVIC, J.; ORLIC, D.; AJTIC, O.M.; TOMASEVIC, M.; DOBRIC, M.; ZLATIC, N.; MILASINOVIC, D.; STANKOVIC, G.; OSTOJIĆ, M.; BOROVIĆ, M.L. Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Experimental and Molecular Pathology*, v.102, n.2, p.303-313, 2017.

RECEK, N.; RESNIK, M.; MOTALN, H.; TURNŠEK, T.L.; AUGUSTINE, R.; KALARIKKAL, N.; THOMAS, S.; MOZETIČ, M. Cell Adhesion on Polycaprolactone Modified by Plasma Treatment. *International Journal of Polymer Science*, v.60, n.9, p.1551-1642, 2016.

REIS FILHO, N.P.; MENDES, D.S.; SOUZA, M.S.B.; ARIAS, M.V.B. Uso de coberturas no tratamento de feridas de cães e gatos: Revisão de literatura. *Medvop - Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação*, v.12, n.41, p.1-637, 2014.

SÁNCHEZ, G.M.; CEPERO, S.M.; RE, L.; ALDALAIEN, S.E.M. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *European Journal of Pharmacology*, v.523, n.1/3, p.151-161, 2005.

UZÊDA-E-SILVA, V.D.; RODRIGUEZ, T.T.; ROCHA, I.A.; XAVIER, F.C.; DOS SANTOS, J.N.; CURY, P.R.; RAMALHO, L.M. Laser phototherapy improves early stage of cutaneous wound healing of rats under hyperlipidic diet. *Lasers in Medical Science*, v.31, n.7, p.1363-70, 2016.

SHAO, P.L.; LIAO, J.D.; WONG, T.W.; WANG, Y.C.; LEU, S.; YIP, H.K. Enhancement of Wound Healing by Non-Thermal N₂/Ar Micro-Plasma Exposure in Mice with Fractional-CO₂-Laser-Induced Wounds. *PLoS ONE*, v.11, n.6, p.1-15, 2016.

SORG, H.; TILKORN, D.J.; HAGER, S.; HAUSER, J.; MIRASTSCHIJSKI, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, v.58, n.1-2, p.81-94, 2017.

TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. *Revista Medicina*, v.41, n.3, p.259-264, 2018.

TIPA, R.S.; KROESEN, G.M.W. Plasma-Stimulated Wound Healing. *IEEE Transactions on Plasma Science*, v.39, n.11, p.2978-2979, 2011.

TUMMEL, S.; MERTENS, N.; WANG, J.; VIÖL, W. Low Temperature Plasma Treatment of Living Human Cells. *Plasma Processes and Polymers*, v.4, n.1, p.465-469, 2007.

ULRICH, C.; KLUSCHKE, F.; PATZELT, A.; VANDERSEE, S.; CZAIKA, V.A.; RICHTER, H.; BOB, A.; VON HUTTEN, J.; PAINSI, C.; HÜGE, R.; KRAMER, A.;
Recebido: abr./2022.

Publicado: dez./2022.

ASSADIAN, O.; LADEMANN, J.; LANGE-ASSCHENFELDT, B. Clinical use for cold atmospheric pressure argon plasma in chronic leg ulcers: a pilot study. *Journal of Wound Care*, v.24, n.5, p.196-203, 2015.

UNISHIME, T.M.C.; BORGES, A.C.; KOGA-ITOB, C.Y.; MACHIDAC, M.; HEINAL.R.O.; KOSTOVA K.G. Non -thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. *Surface and Coatings Technology*, v.312, p.19–24, 2016.

WOEDTKE, T.V.; METELMANN, H.R.; WETLMANN, K.D. Clinical Plasma Medicine: State and perspective of in vivo application of cold atmospheric Plasma. *Contributions to Plasma Physics*, v.54, n.2, p.104-117, 2014.