

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**REPARAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS INCISIONAIS EM COELHOS
APÓS TRATAMENTO COM BARBATIMÃO E QUITOSANA**

Autora: Caroline Rocha de Oliveira Lima
Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva

GOIÂNIA
2010

CAROLINE ROCHA DE OLIVEIRA LIMA

**REPARAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS INCISIONAIS EM COELHOS
APÓS TRATAMENTO COM BARBATIMÃO E QUITOSANA**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva

Comitê de Orientação:

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Iglesias Santin (EV/UFG)

Prof. Dr. José Realino de Paula (FF/UFG)

GOIÂNIA

2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

L732r Lima, Caroline Rocha de Oliveira
Reparação de feridas cutâneas incisionais em coelhos após
tratamento com barbatimão e quitosana [manuscrito] / Caroline
Rocha de Oliveira Lima. - 2010.
104 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva; Co-
Orientador: Prof. Dr. José Realino de Paula.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, tabelas, quadros, abreviaturas.

1. Plantas Medicinais 2. Cicatrização 3. Feridas cutâneas 4.
Barbatimão 5. Quitosana 6. Coelhos – Tratamento I. Título.

CDU: 636.92:633.88

GAROLINE ROCHA DE OLIVEIRA LIMA

Dissertação defendida e aprovada em 20/03/2010, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Luiz Antonio Franco da Silva
(Orientador (a))



Profa. Dra. Eliana Marina Lima - FFA/UFPA



Profa. Dra. Liane Borges de Menezes - IPT/UFPA

À minha amada filha Letícia, minha essência e fortaleza!
Aos meus pais, Alzira e Leopoldo e minha irmã Cíntya,
responsáveis por essa conquista!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, aquele que escreve certo por linhas tortas e entre tropeços, e tempestades, me conduziu, estando sempre ao meu lado para que eu conseguisse chegar até aqui.

A minha filha, Letícia, a quem eu dei a vida e por ser tão parte de mim é minha própria vida. Obrigada por ser minha companheirinha de todas as horas, minha amiga, minha bonequinha, minha pequena, minha grande razão de ir à luta todos os dias, com sede de ter um futuro cada vez melhor. A mamãe sabe que por diversas vezes deixou a desejar como mãe, mas você criatura tão pura de espírito, respeitou todos estes momentos, às vezes dormindo logo após chegar da creche, outras brincando sozinha na sala até quase madrugada para não me incomodar. Nunca serei tão eternamente grata a Deus por me presentear com a jóia perfeita: simplesmente Letícia!

Aos meus pais, Leopoldo e Alzira, casal exemplar, que não mede esforços para ajudar ao próximo e fazer o bem. Obrigada por não desistirem de mim, mesmo quando eu achei que não queria mais! Obrigada por amarem tanto a nossa pequena Letícia. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, muitas vezes se desdobrando para que meus sonhos se tornassem realidade. Meu eterno amor e gratidão. Essa conquista é de vocês!

A minha irmã Cíntya, caçula e filhota. Agradeço a Deus por ter me presenteado com uma irmã tão doce, meiga, inteligente e carinhosa. Obrigada por sua disposição em me ajudar todas as vezes que precisei.

A tia Augusta que com certeza também foi uma, entre os responsáveis, para a obtenção desse título.

Ao meu noivo Rogério por todo o amor, dedicação e compreensão que sempre dedicou a mim. Há muito tempo escrevi em algum lugar que você era uma pessoa que eu queria ter para sempre ao meu lado. Parece que um anjo ouviu e disse amém! Dessa vez quero pedir para que Deus continue abençoando nossa trajetória. Obrigada por fazer parte de minha vida!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva por ter concedido uma segunda oportunidade a mim, se comprometendo com minha orientação nesses últimos dois anos. Sou grata por todas as chances que, direta ou

indiretamente, se apresentaram a mim por intermédio do senhor e quero que saibas que também “estou da banda de cá”.

A professora Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura pela oportunidade de conhecê-la e desfrutar de sua convivência e amizade. Obrigada por toda dedicação a mim dispensada principalmente nos momentos decisivos da conclusão desta dissertação e ainda por me acolher em uma nova etapa que irá se iniciar em breve.

Agradeço a vocês queridos amigos que durante alguns meses perderam fins-de-semana, férias e muitos horários de almoço, trabalhando arduamente com dedicação, competência e compromisso nas práticas de manejo do biotério, manipulação das feridas dos animais e leitura das lâminas. Camila, Camille, Cássia, Danilo Rezende, Jalily, Jordanna, Leandro Guimarães, Leandro Caetano, Maria Ivete, Marilene, Rejane, Sabrina e Sandro, a concretização desse estudo foi possível graças ao empenho de vocês.

Aos meus colegas de pós-graduação e amigos sinceros que conquistei e tenho guardados no coração. Camila, Cássia, Daniel, Késia, Leandro, Maria Ivete, sinto que a amizade plantada por todos nós tem raízes tão fortes que nem o tempo e distância são capazes de abalar.

Ao professor Vilmar Raganini pela ajuda com a estatística do meu trabalho.

A professora Neusa Margarida Paulo por emprestar com gentileza o dispositivo de captura de imagens para as análises morfométricas durante todo período que necessitei.

Aos professores José Realino de Paula e Ana Paula Iglesias Santin, pela co-orientação e contribuição para o desenvolvimento deste estudo.

As doutoras Leila Maria Leal Parente, Leonice Manrique Faustino Trevenzol e a Liliana Borges de Menezes pela contribuição prestada nos momentos de dificuldade e ainda em especial a Liliana pelo aceite do convite em participar da minha banca.

A doutora Eliana Martins Lima por ter aceitado com tanta alegria nosso convite para participação na minha banca de defesa.

Aos servidores técnico-administrativos, em especial, ao Antônio Souza Silva, por sua amizade e contribuição no processamento dos cortes histológicos. A Dona Vilda por estar sempre alegre e disposta cooperando com as atividades diárias

do experimento. A Joelma por suas atividades prestadas durante as práticas de manejo do biotério. Ao Valtuir por todas as vezes que sempre disposto colaborou com o transporte e ainda pela amizade que nossas famílias semeiam a cada dia e ao Edismair do Campus Jataí, pela contribuição.

À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, bem como ao seu corpo docente, pelos ensinamentos proporcionados e pela oportunidade em poder realizar este sonho profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo financiamento desse estudo.

Aos demais professores, funcionários e alunos da EV/UFG e FF/UFG.

Agradecimento especial aos nossos queridos mascotes (Black, Neve, Cinza, Panda, Rajado, Charles, John, James, Richard, Paul, Fentanil, Pencivet, Halotano, Tramadol, Propofol, Arrepiado, Branquinho, Páscoa, Pretinho, Sol, Zootecnia, Agronomia, Medicina, Veterinária, Direito, Urias, Universitário, Bueno, Marista, Itatiaia, Fusca, Belina, Chevete, Fiat-147, Corcel, Taperebá, Atemóia, Bergamota, Murici e Zamuá) carinhosamente apelidados pela nossa equipe e que além de ser fonte de estudo, alegraram nossos dias e tornaram nossa árdua jornada menos tediosa.

A empresa Farmogral, na pessoa da doutora Ildeana Carvalho, por proporcionar essa parceria, além de manipular e transportar nossas formulações todas as vezes que foi necessário.

As empresas Agener União e Rações Guabi pelos medicamentos e alimentação fornecidos aos animais durante as etapas experimentais.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indireta, os quais, por um lamentável equívoco, deixaram de ser aqui mencionados, mas que tiveram importante participação na realização deste trabalho.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS.

“Um anjo do céu que trouxe pra mim...
É a mais bonita, a jóia perfeita! Que pra
eu cuidar, que é pra eu amar, gota
cristalina, tem toda inocência!”

Maskavo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	5
1 INTRODUÇÃO	5
2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO SISTEMA TEGUMENTAR	6
2.1 Epiderme	7
2.2 Derme	8
2.3 Hipoderme.....	9
3 FERIDAS CUTÂNEAS.....	11
4 FISIOPATOLOGIA DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	13
4.1 Fase inflamatória.....	14
4.2 Fase Proliferativa.....	16
4.3 Fase de Remodelação e Resolução do Processo	17
4.4 Fatores que afetam o processo de cicatrização de feridas	18
5 EMPREGO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO EM PESQUISAS	19
6 PROTOCOLOS TERAPÊUTICOS NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS.....	21
6.1 Histórico	21
6.2 Principais protocolos terapêuticos.....	22
6.2.1 Barbatimão (<i>Stryphnodendron sp</i>)	23
6.2.2 Quitosana	27
7 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	29
7.1 Avaliação Clínica	29
7.2 Avaliação Morfométrica	30
7.3 Avaliação Histológica.....	31
REFERÊNCIAS.....	34

CAPÍTULO 2 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E MORFOMÉTRICAS DE FERIDAS CUTÂNEAS EM COELHOS TRATADAS COM CREME DE BARBATIMÃO E QUITOSANA	42
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43
INTRODUÇÃO	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS.....	51
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÃO	57
AGRADECIMENTOS	57
REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO 3 - CREMES DE BARBATIMÃO A 5% E QUITOSANA A 5% COMO COADJUVANTES NA CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM COELHOS.....	62
RESUMO.....	62
ABSTRACT.....	63
INTRODUÇÃO	63
MATERIAL E MÉTODOS.....	65
RESULTADOS.....	71
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÃO	82
AGRADECIMENTOS	82
REFERÊNCIAS.....	82
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	86

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Esquema demonstrativo das camadas da pele (Epiderme e derme), principais estruturas que compõem a derme e hipoderme associada.....	10
Figura 2	Processo de cicatrização descrito nas fases inflamatória, proliferativa e de remodelação colágena, observadas após ocorrência de injúria tissular. Dinamismo com sobreposição das fases da cicatrização ocorre em diferentes períodos de tempo.....	14
Figura 3	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Martius) Coville – Barbatimão.....	23
Figura 4	Fórmula estrutural molecular dos taninos condensados: (a) flavonóide genérico, (b) flavan-3-ol e (c) procianidina (taninos condensados).....	24
Figura 5	Esquema de preparação da casca e obtenção do extrato de barbatimão.....	26
Figura 6	Estruturas químicas dos polissacarídeos. Em A, quitina e em B, quitosana.....	27
Figura 7	Mecanismo imunomodulador da quitosana que resulta na biodegradabilidade do polímero e aceleração do processo de cicatrização.....	28

CAPÍTULO 2

Figura 1	Feridas cutâneas induzidas cirurgicamente na região dorsal de coelhos. De acordo com a localização anatômica as feridas foram denominadas de F1 – ferida paramedial cranial esquerda, F2 – ferida paramedial cranial direita, F3 – ferida paramedial caudal esquerda e F4 – ferida paramedial caudal direita.....	48
Figura 2	Aspectos macroscópicos de feridas cutâneas incisionais em coelhos, no sétimo de avaliação clínica. As setas indicam, em A e B, presença de crostas, discreta e exuberante, respectivamente. Em C, secreção mucopurulenta.....	52
Figura 3	Percentual de contração centrípeta dos subgrupos CB, CQ, CA, CN e SF, nos dias três, sete, 14 e 21 dias.....	53

LISTA DE FIGURAS (Cont.)

CAPÍTULO 3

- Figura 1 Classificação das feridas cutâneas incisionais confeccionadas no dorso das unidades experimentais de acordo com a localização anatômica: F1 – ferida paramedial cranial esquerda; F2 – ferida paramedial cranial direita; F3 – ferida paramedial caudal esquerda; F4 – ferida paramedial caudal direita..... 68
- Figura 2 Fotomicrografia da cicatrização de feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em coelhos e submetidas à cicatrização por segunda intenção. Em A, presença de infiltrado polimorfonuclear acentuado (setas verdes) em ferida do subgrupo creme base aos três dias de pós-operatório. HE, objetiva 20x. Em B, presença de tecido de granulação em ferida do subgrupo creme de barbatimão, aos sete dias de pós-operatório evidenciando angiogênese (setas azuis) e fibroplasia (setas amarelas). HE, objetiva 5x..... 74
- Figura 3 Fotomicrografia da cicatrização de feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em coelhos e submetidas à cicatrização por segunda intenção, evidenciando colagenização em ferida do subgrupo creme de quitosana (A) e reepitelização em ferida do subgrupo creme de barbatimão (B). Em A1, ausência de colagenização ao terceiro dia de avaliação. TM, objetiva 5x. Em A2, tecido conjuntivo de preenchimento evidenciando fibras colágenas coradas em azul. TM, objetiva 5x. Em B1, aos sete dias com reepitelização parcial. HE, objetiva 5x. Em B2, aos 21 dias reepitelização completa e restabelecimento dos anexos cutâneos..... 75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Percentual de contração das feridas incisionais em coelhos nos subgrupos creme de quitosana a 5% (CQ), creme de barbatimão a 5% (CB), creme de alantoína a 0,2% (CA), creme base (CN) e solução de cloreto de sódio a 0,9% (SF), nos dias três, sete, 14 e 21, durante experimento realizado na Escola de Veterinária/UFG, entre abril de 2008 e junho de 2009.....	53
----------	---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Distribuição das feridas de acordo com os escores aplicados às variáveis, infiltrado polimorfonuclear, mononuclear, neovascularização, proliferação fibroblástica, colagenização, necrose/crosta, tecido de granulação e reepitelização em relação aos subgrupos (n=5) nos dias de avaliação (3º, 7º, 14º e 21º pós-indução das feridas) em experimento na Escola de Veterinária/UFG, entre abril de 2008 e junho de 2009.....	73
Tabela 2	Comparação das variáveis infiltrado polimorfonuclear, necrose/crosta, tecido de granulação, neovascularização, proliferação fibroblástica, colagenização, infiltrado mononuclear e reepitelização tecidual nos subgrupos creme de quitosana, creme de barbatimão, creme de alantoína, creme base e solução de cloreto de sódio a 0,9% comparados aos cremes de quitosana e barbatimão, nos dias três, sete, 14 e 21 em experimento na Escola de Veterinária/UFG, entre abril de 2008 e junho de 2009...	76

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1	Terminações nervosas de superfície presentes na pele e percepções desencadeadas após sua estimulação.....	6
Quadro 2	Classificação das feridas cutâneas segundo aspectos macroscópicos.....	12
Quadro 3	Tipos celulares, mediadores liberados e seus efeitos no processo de cicatrização.....	18

CAPÍTULO 2

Quadro 1	Delineamento experimental para análise morfométrica da cicatrização de feridas cutâneas em coelhos, em pesquisa desenvolvida na Escola de Veterinária, entre os meses de abril de 2008 a junho de 2009.....	50
Quadro 2	Eventos macroscópicos hemorragia, hiperemia, secreção e reepitelização avaliados por 21 dias em feridas cutâneas incisionais em coelhos após tratamentos com creme de barbatimão a 5% (CB), creme de quitosana a 5% (CQ), creme de alantoína a 0,2% (CA), creme base (CN) e solução de cloreto de sódio a 0,9% (SF).....	51

CAPÍTULO 3

Quadro 1	Delineamento experimental para análise histopatológica da cicatrização de feridas cutâneas em coelhos durante experimento desenvolvido na Escola de Veterinária, entre abril de 2008 e junho de 2009,.....	70
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Au -	Ausente
CA -	Creme de alantoína
CA-A -	Creme de alantoína – grupo quitosana
CA-B -	Creme de alantoína – grupo barbatimão
CB -	Creme de barbatimão
CB-A -	Creme de barbatimão – grupo quitosana
CB-B -	Creme de barbatimão – grupo barbatimão
CN -	Creme base
CN-A -	Creme base – grupo quitosana
CN-B -	Creme base – grupo barbatimão
CNPq -	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COEP -	Comitê de Ética em Pesquisa
CQ -	Creme de quitosana
CQ-A -	Creme de quitosana – grupo quitosana
CQ-B -	Creme de barbatimão – grupo barbatimão
CTAP-III -	Proteína ativadora de tecido conjuntivo – 3
CYR-61 -	Proteína secretada pelo gene Cyr61
Di -	Discreto
EGF -	Fator de crescimento epidermal
EV/UFG -	Escola de Veterinária/Universidade Federal de Goiás
FAPEG -	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás
FGF1 -	Fator de crescimento firoblástico -1
FGF2 -	Fator de crescimento firoblástico – 2
FGF4 -	Fator de crescimento firoblástico – 4
FGF7 -	Fator de crescimento firoblástico – 7
FGF10 -	Fator de crescimento firoblástico -10
g -	Grama
g/ml -	Grama/mililitro
GP IIb/IIIa -	Proteínas de adesão presentes na membrana das plaquetas
GB -	Grupo barbatimão
GQ -	Grupo quitosana
HE -	Hematoxilina-Eosina
HGF -	Fator de crescimento de hepatócito
IL-1 -	Interleucina -1
IL-6 -	Interleucina – 6
IL-8 -	Interleucina – 8
IM -	Intramuscular
IP-10 -	Citocina ligante 10
LPPN/FF/UFG -	Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais/Faculdade de Farmácia/Universidade Federal de Goiás
MB -	Membrana ou lâmina basal
MCP-1 -	Proteínas quimioatraentes de macrófagos – 1
ME -	Matriz extracelular

LISTA DE ABREVIATURAS (Cont.)

MIPs (MIP-1 α ; MIP-1 β ; MIP-2) -	Proteínas inflamatórias para macrófagos (α , β e 2)
MSP -	Zinco-metaloproteinase
n -	Número
NaCl -	Cloreto de sódio
°C -	Graus Celsius
PAF -	Fator ativador de plaquetas
PDGF (PDGF- AA, PDGF-AB, PDGF-BB, DGF- CC, PDGF-DD) -	Fator de crescimento derivado de plaquetas (AA, AB, BB, CC e DD)
pH	Potencial hidrogeniônico
PLGF	Fator de crescimento placentário
PPARs – PPAR α e PPAR β -	Proliferadores de peroxissoma – α e β
Psi -	Libras por polegada quadrada
SBCAL -	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SF -	Solução de cloreto de sódio a 0,9%
SF-A -	Solução de cloreto de sódio a 0,9% - grupo quitosana
SF-B -	Solução de cloreto de sódio a 0,9% - grupo barbatimão
TGF- β 1 -	Fator de crescimento transformador – β 1
TGF- β 2 -	Fator de crescimento transformador – β 2
TGF- β 3 -	Fator de crescimento transformador – β 3
TGF- α -	Fator de crescimento de fibroblastos – α
TGF- β -	Fator de crescimento transformador – β
TM -	Tricrômico de Masson
RANTES -	Citocina membro da superfamília Interleucina – 8
TNF- α -	Fator de crescimento transformante – α
VEGF-A -	Fator de crescimento vascular endotelial-A

RESUMO

Na clínica médica veterinária as injúrias cutâneas representam casuística significativa e cursam com terapias dispendiosas, tempo de recuperação considerável e resolução muitas vezes desfavorável. Para instituir um protocolo terapêutico eficaz é imprescindível que o profissional tenha conhecimento sólido da dinâmica cicatricial, como suas fases, eventos desencadeados, particularidades, bem como acerca do potencial biológico dos coadjuvantes do processo cicatricial. Quanto a estes últimos, sabe-se que a fitoterapia possui um leque variado de espécimes botânicos com potencial na cicatrização e dentre estes o barbatimão, espécie nativa do cerrado brasileiro, por suas atividades, anti-séptica e adstringente, torna-se opção atraente quanto às terapias das injúrias cutâneas. O biomaterial quitosana também possui potencial como coadjuvante do processo, visto que por sua propriedade imunomoduladora acelera o desencadeamento das fases da cicatrização. Para esclarecer o mecanismo proposto por estes agentes, inúmeros ensaios são desenvolvidos, utilizando animais de laboratório, a fim de conferirem confiabilidade à modalidade terapêutica instituída. Para acompanhar a evolução clínica *in vivo*, o exame clínico torna-se essencial, enquanto que as análises morfométricas conferem dados precisos quanto ao percentual de contração centrípeta das lesões. Por último as análises microscópicas são empregadas para analisar a ultra-estrutura do sítio lesionado, tipos celulares predominantes em cada fase e eventos microscópicos desencadeados na busca do restabelecimento morfofuncional do tecido acometido. Diante do exposto, com o desenvolvimento desse estudo objetivou-se avaliar a atividade de formulações terapêuticas a base de creme de barbatimão a 5% (CB) e creme e quitosana a 5% (CQ) frente ao processo de cicatrização de feridas cutâneas incisionais submetidas à cicatrização por segunda intenção, tendo o coelho com o modelo experimental. No primeiro capítulo efetuou-se revisão de literatura ampla e detalhada do tema do estudo que envolveu descrição do tecido alvo, pele, fisiopatologia do processo cicatricial, atividade do fitoterápico barbatimão e do biomaterial quitosana como coadjuvantes da cicatrização, emprego de animais de laboratório em pesquisas científicas e métodos de avaliação das terapias cutâneas. No segundo capítulo, testou-se a atividade terapêutica dos CB e CQ na cicatrização de feridas cutâneas incisionais, por meio

da avaliação clínica efetuada diariamente e morfométrica nos dias três, sete, 14 e 21 pós-lesão. Foram realizadas quatro feridas em cada animal, totalizando 40 coelhos. Diariamente, todas as lesões de cada animal receberam uma terapia tópica específica, que se estendeu durante 21 dias consecutivos. Primeiramente, realizava-se a antissepsia com solução de cloreto de sódio a 0,9% e na sequência aplicavam-se os protocolos terapêuticos propriamente ditos. Em um dos protocolos empregou-se creme de barbatimão (CQ), em outro creme de quitosana (CQ), sendo estas as formulações testes. No terceiro protocolo fez uso do creme de alantoína (controle positivo) e por último o creme base (controle negativo I). Em outra lesão efetuou-se apenas antissepsia sem terapia tópica associada com solução de cloreto de sódio a 0,9% (controle negativo II). Os resultados apontaram que os CB e o CQ contribuíram para que o processo de cicatrização evoluísse satisfatoriamente. Embora não tenham ocorrido diferenças estatísticas no percentual de contração entre os dois tratamentos (CB e CQ), clinicamente, notou-se que as feridas tratadas com CB apresentaram respostas clínicas superiores ao CQ. No terceiro capítulo efetuou-se comparativamente, por meio da avaliação clínica e microscópica, a ação dos CQ e CB nas feridas dos mesmos animais submetidas aos tratamentos do capítulo dois. Para as análises histológicas foram considerados os períodos pré-definidos para morfometria e as amostras foram avaliadas quanto à predominância de infiltrado polimorfo e mononuclear, presença de crosta-necrose, tecido de granulação, fibroplasia, angiogênese, colagenização e reepitelização cutânea. A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que as atividades implicadas ao barbatimão e a quitosana contribuíram de forma semelhante para que o processo de cicatrização evoluísse satisfatoriamente, visto que os dois tratamentos não diferiram significativamente para nenhum parâmetro considerado neste estudo. Sugere-se que os protocolos terapêuticos à base de barbatimão e quitosana proporcionaram redução da inflamação aguda, bem como promoveram ativação fibroblástica, desenvolvimento precoce de tecido conjuntivo, neovascularização e reepitelização tecidual, conferindo alternativas comprovadamente eficazes e economicamente viáveis em relação ao processo de cicatrização.

Palavra-chave: Biomaterial, fitoterapia, histologia, lagomorfo, morfometria, pele, reparação tecidual.

ABSTRACT

In veterinary medicine, skin injuries represent a significant casuistry and require expensive therapies, considerable recovery time and often lead to unfavorable resolution. To establish an effective therapeutic protocol it is essential that the professional has a solid knowledge of the healing dynamic, as its phases, triggered events, features, as well as about the biological potential of the healing process coadjuvants. Regarding these ones, it is known that phytotherapy has a wide range of botanical specimens with healing potential, and, among them, the barbatiman, native species of the Brazilian cerrado, by its antiseptic and astringent activities, becomes an attractive option for skin injuries therapies. The chitosan biomaterial also has potential as coadjuvant of the process, once it accelerates the triggering of the healing stages by its immunomodulatory property. To clarify the mechanism proposed by these agents, numerous tests are developed using laboratory animals, in order to give reliability to the therapy modality established. To follow clinical evolution *in vivo*, the clinical examination becomes essential, while morphometric analysis provide accurate data regarding the percentage of centripetal contraction of the lesions. Finally, the microscopic analysis is used to analyze the ultrastructure of the injured site, predominant kinds of cells in each stage and microscopic events triggered on the search for the morphofunctional restoration of the affected tissue. Considering it, with the development of this study it was aimed to evaluate the activity of 5% barbatiman cream (CB) and 5% chitosan cream (CQ) based therapeutic formulations, on the healing process of incisional skin wounds undergone healing by secondary intention, with rabbit as experimental model. In the first chapter it was performed a wide and detailed literature review about the topic of the study, which involved description of the target tissue, skin, physiopathology of the healing process, barbatiman phytotherapeutic and chitosan biomaterial activities as healing coadjuvants, use of laboratory animals in scientific research and evaluation methods of skin therapies. In the second chapter, it was tested the therapeutic activity of CB and CQ on healing of incisional cutaneous wounds with rabbit as experimental model, by daily clinical evaluation and morphometric analysis performed on days three, seven, 14 and 21 post-injury. There were performed four wounds on each animal, totaling 40 rabbits. Daily, all lesions of each animal received a specific topical therapy, which

lasted for 21 consecutive days. First, we performed the antiseptic with 0.9% sodium chloride solution and further applied treatment protocols themselves. In one of the protocols employed in cream barbatiman (CB) in another cream chitosan (CQ), and these were formulations tests. In the third protocol was the use of allantoin cream (positive control) and finally the cream neutral vehicle (negative control I). In other injury effected only without topical antiseptic and associated 0.9% sodium chloride solution (negative control II). The results showed that the CB and CQ contributed to the satisfactory progress of the healing process. Although there has been no statistical differences in the contraction percentage between the two treatments (CB and CQ), it was clinically observed that the wounds treated with CB showed better clinical responses than CQ. In the third chapter it was comparatively performed, by clinical and microscopic evaluations, the analysis of the action of CQ and CB in the wounds of the same animals that received the treatments from chapter two. For histological analysis, there were considered the predetermined period for morphometry and the samples were evaluated regarding the prevalence of polymorphic and mononuclear infiltrate, presence of necrosis, crust, granulation tissue, fibroplasia, angiogenesis, collagenization and skin reepithelialization. From the results obtained it can be affirmed that the activities attributed to barbatiman and chitosan contributed similarly to the satisfactory progress of the healing process, once both treatments did not differ significantly for any parameter considered in this study. It is suggested that therapeutic protocols chitosan and barbatiman based provided acute inflammation reduction, as much as promoted fibroblast activation, early development of connective tissue, neovascularization and tissue reepithelialization, providing proved effective and economically viable alternatives in the healing process.

Keyword: Biomaterial, phytotherapy, histology, lagomorph, morphometry, skin, tissue repair.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 INTRODUÇÃO

Os ferimentos cutâneos apresentam importância indiscutível por apresentarem ocorrência considerável, independente da espécie e porte do animal. Esta situação tem motivado pesquisas científicas que visam à manipulação de fármacos eficazes, de baixo custo e que não provoquem reações indesejáveis ao organismo. Embora essa evolução seja considerável, não tem sido suficiente para solucionar diversos casos, pois sabe-se que a reparação tecidual depende também de variáveis, como diâmetro da lesão, espécie acometida, localização anatômica e grau de contaminação da lesão.

Mesmo considerando expressivos os avanços evidenciados nessa linha de pesquisa, muitos questionamentos ainda são alvos de reflexões, tanto por parte da comunidade científica como por profissionais que atuam na clínica médica veterinária. Sobre esse tema, não se pode negligenciar o fato de pesquisas científicas apontarem o biopolímero quitosana (SILVA et al., 2006) e o fitoterápico barbatimão (LOPES et al., 2005) como métodos alternativos empregados na cicatrização de feridas, embora o conhecimento pleno da influência proporcionada por esses medicamentos ainda dependam de maiores estudos. Assim sendo, entende-se que o comportamento macro e microscópico relacionado à evolução clínica das feridas após emprego desses protocolos, bem como a padronização quanto às concentrações dos princípios ativos e os veículos a serem preconizados motivem estudos adicionais.

Diante da relevância do tema, a presente pesquisa propôs realizar um estudo sobre reparação de feridas cutâneas, envolvendo quatro etapas ou capítulos, os quais representam os objetivos principais do trabalho:

- 1- Efetuar revisão bibliográfica detalhada dos principais aspectos relacionados a reparação tecidual;
- 2- Avaliar as características clínicas e morfométricas de feridas cutâneas incisionais em coelhos tratadas com creme de barbatimão e quitosana a 5%, após antissepsia do sítio das lesões com solução de cloreto de sódio a 0,9%;

- 3- Analisar a ação dos cremes à base de barbatimão e quitosana a 5%, após efetuar antissepsia do sítio das lesões com solução de cloreto de sódio a 0,9%, na terapia de feridas cutâneas de coelhos induzidas experimentalmente e submetidas à cicatrização por segunda intenção, por meio da análise histológica, relacionando os achados dessa avaliação aos episódios macroscópicos observados;
- 4- Propor algumas considerações gerais sobre o assunto, analisando informações obtidas na presente pesquisa e avaliar alguns aspectos atuais e futuros sobre o tema.

2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO SISTEMA TEGUMENTAR

O sistema tegumentar, tanto no homem como nos animais apresenta inúmeras particularidades e compreende a pele e os anexos cutâneos. Estes últimos incluem barbelas, cascos, chifres, componentes vasculares, linfáticos e nervosos, cornos, coxins, cristas, folículos pilosos, garras, glândulas mamárias, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas, pêlos, penas e unhas (SAMUELSON, 2007).

A pele é o maior órgão do organismo, sendo um dos tecidos de importância especial do sistema tegumentar, cuja extensão corresponde a aproximadamente 16% do peso corpóreo animal. Considerado órgão de revestimento, atua como barreira mecânica entre o ambiente externo e interno (LUCAS, 2004). Assim sendo, desempenha uma série de funções primordiais para a manutenção da fisiologia animal, protegendo o organismo contra a penetração de agentes externos e injúrias físicas, químicas ou microbiológicas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). Também participa do mecanismo de termorregulação animal, impedindo a perda de água e a movimentação de eletrólitos e macromoléculas para o meio externo. Particularmente, as glândulas sebáceas, sudoríparas e mamárias conferem função secretora a este órgão, sendo estas responsáveis pela secreção sebácea, de suor e leite, respectivamente (ARNOLD et al., 1994; FOSSUM, 2002).

Devido a dimensão, a irrigação vascular cutânea também contribui para alterações da pressão sanguínea, além de que a pele encontra-se

envolvida no mecanismo de homeostase do cálcio, participando diretamente de produção de vitamina D, em presença de radiação ultravioleta (BANKS, 1991). As terminações nervosas inseridas na porção mais interna desse órgão são responsáveis pelas sensações de frio, calor, dor, táteis e de alterações na pressão, conforme representado no Quadro 1.

QUADRO 1 – Terminações nervosas de superfície presentes na pele e percepções desencadeadas após sua estimulação

RECEPTORES DE SUPERFÍCIE	SENSAÇÃO PERCEBIDA
Receptores de Krause	Frio
Receptores de Rufini	Calor
Discos de Merkel	Tato e pressão
Receptores de Vater-Pacini	Pressão
Receptores de Meissner	Tato
Terminações nervosas livres	Principalmente dor

Fonte: <http://www.afh.bio.br/tegumentar/tegumentar.asp>

A pele está ainda associada à produção de estruturas queratinizadas e às funções de flexibilidade, reservatório, pigmentação e identificação, podendo também refletir uma variedade de processos patológicos, como distúrbios endócrinos, doenças imunomediadas, ecto e endoparasitoses, além de problemas nutricionais (FOSSUM, 2002). Histologicamente é composta por duas camadas distintas, firmemente unidas entre si, conhecidas como epiderme, camada mais superficial, e derme, mais internalizada (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

2.1 Epiderme

A epiderme é uma estrutura avascular originária do ectoderma, formada por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado, constituindo a camada mais externa da pele (ARNOLD et al., 1994). Os tipos celulares predominantes nessa camada são principalmente os queratinócitos, seguido dos

melanócitos e células de Langerhans, que compõem os estratos epidermais. Estes são distribuídos em cinco estratos de acordo com o formato de suas células, denominados a partir da derme para o meio externo, respectivamente, estratos basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (LUCAS, 2004). O estrato basal ou germinativo é o mais interno e constituído por um único cordão celular que se multiplica continuamente. As células recém sintetizadas conduzem as produzidas anteriormente à superfície corpórea, constituindo os estratos epidermais subsequentes (SAMUELSON, 2007).

Na medida em que evolui em direção à superfície, os queratinócitos sofrem o processo de queratinização ou corneificação para originar a camada córnea. No citoplasma dessas células é sintetizada uma proteína fibrosa de alto peso molecular, resistente e impermeável denominada queratina, que desempenha atividade impermeabilizante, promovendo barreira mecânica e evitando a dessecação do organismo (FOSSUM, 2002). A renovação celular constante da epiderme proporciona remoção e substituição das células mortas repletas de queratina, da camada córnea, por outras que sofrerão o mesmo processo (ARNOLD et al., 1994).

2.2 Derme

A segunda camada da pele é constituída pela derme, de origem mesodérmica, formada principalmente por tecido conjuntivo localizado na região mais interna do órgão. Esta é a porção vascular da pele que confere sustentabilidade a epiderme e vitalidade a todo o tecido. Nesta camada encontram-se inseridos vasos sanguíneos, linfáticos, fibras protéicas, glândulas, folículos pilosos, músculos eretores do pêlo, nervos e órgãos sensoriais associados. As glândulas sudoríparas, sebáceas e os folículos pilosos são formados a partir de invaginações da epiderme para a derme e histologicamente essas duas camadas são separadas por uma estrutura denominada membrana ou lâmina basal (MB) (BANKS, 1991). Por sua vez, a MB é composta por colágeno tipo IV, além da glicoproteína laminina e as proteoglicanas, que permitem a formação de barreiras e canais entre as duas camadas contíguas (ARNOLD et al., 1994).

Os fibroblastos são descritos como a principal linhagem celular presente na derme. São células que possuem prolongamento citoplasmático, sendo dotadas de mobilidade e capacidade de adaptação, podendo ainda ser modulada em tipos específicos para desempenhar atividade em determinado local do organismo. Dessa forma podem se diferenciar em fibrócitos ou miofibroblastos. Estes últimos são tipos celulares com características entre fibroblasto e célula muscular lisa e atuam principalmente no processo de contração centrípeta de feridas (FOSSUM, 2002). Adicionalmente, os fibroblastos atuam na composição da matriz extracelular (ME), por meio da síntese de colágeno, elastina e da substância fundamental amorfa. Esta última trata-se de uma estrutura gelatinosa, incolor e homogênea, formada por complexos de glicosaminoglicanas e proteoglicanas associadas à glicoproteínas estruturais, onde os elementos dérmicos encontram-se mergulhados (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; LUCAS, 2004).

O colágeno e a elastina formam fibras protéicas e compõem a porção fibrosa da ME. De acordo com a natureza da proteína sintetizada as fibras podem ser classificadas como fibras colágenas, elásticas ou reticulares, as quais conferem resistência e elasticidade à pele (SAMUELSON, 2007). Essa segunda porção da pele ainda é subdividida em duas camadas histológicas, sendo estas, a papilar e a reticular. A camada papilar encontra-se em contato com a epiderme sendo formada por tecido conjuntivo frouxo, enquanto que a papilar é constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, com predomínio de fibras colágenas fortemente entrelaçadas entre si (ZAMPROGNA, 2009).

2.3 Hipoderme

Conhecida também como tecido subcutâneo, tecido celular subcutâneo, subcútis ou panículo adiposo é um tecido que embora não faça parte do arcabouço histológico da pele, desempenha funções intimamente relacionadas a esta, merecendo, dessa forma, ser abordado neste capítulo (LUCAS, 2004). Constituída basicamente por tecido adiposo ou tecido conjuntivo frouxo com predomínio de adipócitos, trabéculas colágenas frouxas e fibras elásticas, promove conexão entre derme e fáscia muscular. Sua extensão pode variar com espécie e localização, sendo pouco desenvolvida em regiões em que a pele

encontra-se firmemente aderida às estruturas subjacentes. Acrescenta-se que, nessa camada estão inseridos os músculos paniculares que penetram na derme e permitem o movimento voluntário da pele (ZAMPROGNA, 2009).

Encontra-se subdivida nas camadas, areolar e lamelar, separadas por uma lâmina fibrosa e exerce, dentre outras, função de isolamento térmico, proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos, preenchimento e fixação de diversas estruturas, reservatório energético, além de facilitar o deslizamento da pele em relação às estruturas subjacentes (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). O esquema demonstrativo da pele, as camadas e estruturas que compõem a derme está representado na Figura 1.

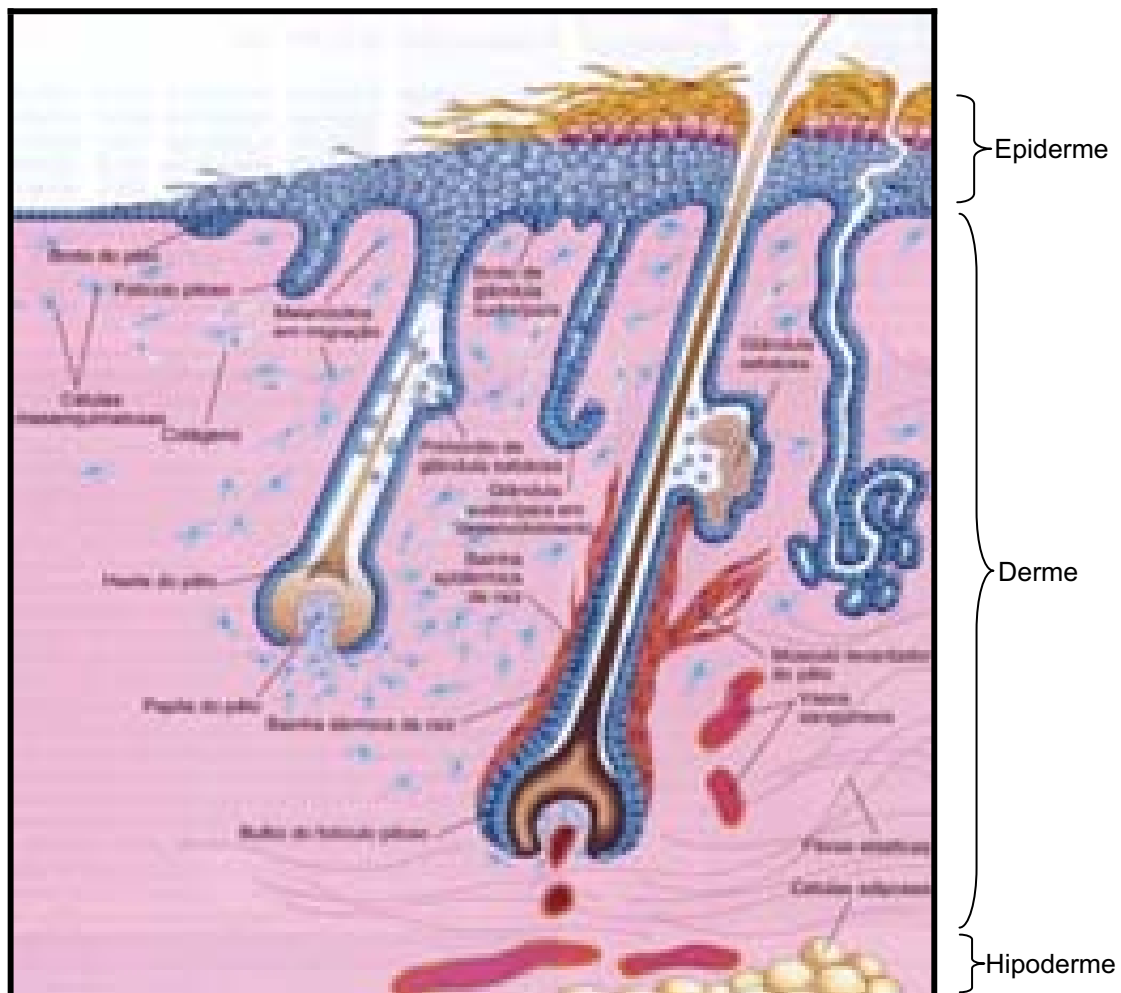


FIGURA 1 – Esquema demonstrativo das camadas da pele (Epiderme e derme), principais estruturas que compõem a derme e hipoderme associada. Fonte: Adaptado de <http://www.normalhistology.com/pt/image/skin/> Acesso em: 20/01/2010.

A dimensão do tecido cutâneo e sua localização anatômica o expõem, frequentemente, a ação de inúmeros agentes lesivos que rompem e danificam sua estrutura, instalando uma lesão ou ferida cutânea, a qual recebe classificação de acordo com diversos aspectos macroscópicos considerados (FOSSUM, 2002; BLANES, 2004).

3 FERIDAS CUTÂNEAS

As feridas cutâneas instalam-se frequentemente a partir de uma exposição a traumatismo ou injúria de caráter diverso, como químico, mecânico, físico, microbiológico ou desencadeado por enfermidade, resultando em interrupção da continuidade tecidual (LUCAS, 2004). Os aspectos macroscópicos permitem que a ferida seja conceituada a partir de suas características particulares, constituindo uma importante fonte de sistematização, necessária para o processo de avaliação e registro. Dessa forma, as feridas podem ser classificadas de acordo com o agente determinante da lesão, a morfologia, o grau de contaminação, as características do exsudato e do leito da ferida, o tempo de evolução do processo, o tipo de cicatrização, a coloração e o comprometimento tecidual (BLANES, 2004). Além destas, diversas outras classificações ainda são propostas. No entanto, como são menos evidentes e pouco referidas na literatura científica, não serão mencionadas nesse capítulo.

No Quadro 2 estão relacionadas as principais classificações das feridas cutâneas, suas subclasses e ocorrências macroscópicas observadas.

QUADRO 2 – Classificação das feridas cutâneas segundo aspectos macroscópicos.

FERIDAS CUTÂNEAS - PRINCIPAIS CLASSIFICAÇÕES	
Classificação	Conceito
CAUSA PRIMÁRIA DA INJÚRIA	
Incisa ou cortante	Lesão provocada por objeto cortante. Ex.: Bisturi, tesoura.
Corto-contusas	Lesão provocada por objeto com superfície pouco cortante, pela força aplicada contra a pele. Ex.: Machado.
Perfurantes	Provocada por objetos longos e pontiagudos. Ex: Alfinete
Pérfuro-contusas	Lesão provocada por arma de fogo.
Lácero-contusas	O processo advém de compressão ou tração. Ex.: Esmagamento ou mordida.
TIPO DE CICATRIZAÇÃO	
Primária – Primeira intenção	Quando as bordas da ferida são apostas ou aproximadas, com mínima perda tecidual.
Secundária – Segunda intenção	Ocorre perda excessiva de tecido, sem justaposição das bordas, podendo ocorrer contaminação
Terciária – Terceira intenção	Quando a sutura da ferida é efetuada tardiamente ou refeita após rompimento da mesma.
GRAU DE CONTAMINAÇÃO DA FERIDA	
Limpa	Ferida produzida em ambiente cirúrgico.
Limpa-contaminada	Também denominada potencialmente contaminada. Ocorre quando o agente causal encontra-se contaminado.
Contaminada	Há reação inflamatória acentuada.
Infectada ou suja	Apresenta sinais nítidos de infecção.
LEITO DA FERIDA	
Necrótico	Presença de necrose
Exsudativo	Presença de exsudato ou secreção
Granuloso, em epitelização	Presença de granulação saudável
TEMPO DE EVOLUÇÃO DO PROCESSO	
Aguda	Reparação ocorre em tempo adequado, sem complicações. Ex: Feridas cirúrgicas, traumas
Crônica	Ocorre tardiamente, acompanhada de complicações.

Fonte: Adaptado de BLANES, 2004 e UCHÔA, 2005.

4 FISIOPATOLOGIA DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A preocupação com a adequada manipulação da estrutura danificada além de incentivar estudos sobre a correta avaliação e classificação da região lesionada, tem intensificado a realização de pesquisas científicas relacionadas aos episódios envolvidos no processo de cicatrização (HOSGOOD, 2006). Como proposto pelo pesquisador John Hunter (1728-1793), “a injúria por si só possui tendência a produzir todos os mecanismos para chegar à cura” (BARBUL, 2006). Dessa forma a cicatrização pode ser definida como um fenômeno biológico complexo, ordenado, dinâmico, intercedido e sustentado por grupos celulares, mediadores bioquímicos e hemodinâmicos, operando de forma sincronizada a fim de garantir a restauração morfofuncional do tecido lesionado (SAHOTA et al., 2004).

Os eventos que desencadeiam a dinâmica da cicatrização são descritos em três fases fundamentais, que correspondem aos principais episódios macro e microscópicos observados em um determinado período de tempo. Estas podem ser compreendidas nas fases inflamatória, proliferativa e de remodelação colágena (ACKERMANN, 2007). No entanto, geralmente ocorre um dinamismo de sobreposição entre as diferentes fases, tornando-se impraticável o estabelecimento das mesmas em períodos sistematicamente específicos (Figura 2). Acrescente-se que tal aposição também é considerada fator que contribui sumariamente para a evolução do processo (KUMMAR et al., 2005).



FIGURA 2 – Processo de cicatrização descrito nas fases inflamatória, proliferativa e de remodelação colágena, observadas após ocorrência de injúria tissular. Dinamismo com sobreposição das fases da cicatrização ocorre em diferentes períodos de tempo. Fonte: Adaptado de CLARK, 1996.

4.1 Fase inflamatória

Imediatamente após comprometimento da integridade tecidual ocorre vasoconstrição periférica como primeira resposta. Este fenômeno é desencadeado tanto por influência nervosa, mais especificamente por descarga adrenérgica, quanto pela ação dos mediadores oriundos da degranulação de mastócitos, visando à minimização da perda sanguínea para o espaço extravascular (BALBINO et al., 2005). Simultaneamente o coágulo sanguíneo é sintetizado a partir da agregação e ativação plaquetária, mediadas por proteínas de adesão presentes na membrana das plaquetas (GP IIb/IIIa), bem como pela ativação da cascata de coagulação e substâncias agonistas presentes na matriz subendotelial e corrente sanguínea (AMBROSE & WEINRAUCH, 1996).

O coágulo atua coaptando as bordas da ferida para limitar as perdas de sangue e fluídos, formando uma barreira imediata contra a penetração de agentes exógenos, além de disponibilizar uma matriz provisória para o início da organização da lesão (BARBUL, 2006; HOSGOOD, 2006). Mastócitos e plaquetas presentes na matriz extracelular provisória liberam mediadores químicos, dentre os quais, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador (TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), que provocam vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e favorecem quimiotaxia leucocitária para o sítio da ferida. Esses eventos caracterizam a fase inflamatória da cicatrização, traduzida pelos sinais clássicos calor, rubor, dor, tumor, perda de função e permanece por um período compreendido entre três a dez dias (KUMAR et al., 2005; ACKERMANN, 2007).

Os primeiros tipos celulares a predominarem no sítio da lesão são os neutrófilos, que além de suas conhecidas atividades de produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio provocando a morte de microrganismos e degradação de macromoléculas, estão envolvidos nos processos fagocíticos de microrganismos e remoção de debris celulares (BALBINO et al., 2005). Operam também nas reações de formação tecidual por meio da síntese de fatores de crescimento e citocinas, responsáveis pela recomposição da celularidade regional e restabelecimento da homeostasia tecidual (BEER et al., 2000). Devido à meia-vida curta, após o segundo dia os neutrófilos vão sendo gradativamente substituídos por monócitos, que se transformam em macrófagos na ferida (HATANAKA & CURI, 2007).

As moléculas da superfamília das quimiocinas, como as proteínas inflamatórias para macrófagos (MIPs: MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2), proteínas quimioatraentes de macrófagos – 1 (MCP-1), Rantes e interleucina 8 (IL-8) atraem monócitos que se transformam em macrófagos na lesão (BOHLING et al., 2004). Os macrófagos desempenham papel crucial na fase inflamatória por desempenharem atividade fagocítica e de debridamento de corpos estranhos, além de atuarem como célula apresentadora de antígenos, auxiliarem no desenvolvimento do tecido de granulação e liberarem fatores de crescimento e mediadores bioquímicos que ditam e sustentam o processo cicatricial (KUMAR et al., 2005; PERANTEAU et al., 2008).

4.2 Fase Proliferativa

Sequencialmente, a cicatrização evolui para a fase proliferativa, incluindo os eventos de fibroplasia, angiogênese e intensa contração centrípeta da ferida. Essa fase predomina entre o sétimo e 14º dias pós-lesão (MANDELBAUM et al., 2003; SAHOTA et al., 2004). A fibroplasia é caracterizada pela migração e ativação de fibroblastos na ferida em decorrência da liberação de mediadores químicos produzidos principalmente por macrófagos, tais como, o fator de crescimento transformante-alfa (TGF- α). Estes grupos celulares são os principais componentes do tecido de granulação e tem como função primordial a produção de colágeno que formará o tecido conjuntivo, substituindo a matriz extracelular provisória por um tecido mais forte e elástico (HATANAKA & CURI, 2007).

Para nutrir e favorecer a troca de gases do tecido que está sendo formado é fundamental que ocorra formação de novos vasos sanguíneos no sítio da lesão. A neovascularização que também ocorre nesta etapa é modulada, sobretudo pelo fator de crescimento vascular endotelial-A (VEGF-A) propiciando condições essenciais para que os processos metabolicamente ativos evoluam em sua plenitude (HARTLAPP et al., 2001). Nesse momento a ferida apresenta-se preenchida por um tecido hiperplásico, de coloração avermelhada caracterizando o tecido de granulação. Esse tecido é composto principalmente por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que estão suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágenos tipos I e III (BREITBART et al., 2001; SAHOTA et al., 2004).

Simultaneamente, sob estímulo de fatores de crescimento e mediadores bioquímicos as células endoteliais do interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar colagenase e ativador do plasminogênio (BOHLING et al., 2004; PERANTEAU et al., 2008). Essas substâncias promovem aberturas na membrana basal, permitindo a migração das células endoteliais que, atravessando a parede do vaso e utilizando como substrato a matriz extracelular provisoriamente produzida, seguem em direção ao centro da lesão (BALBINO et al., 2005). Lentamente, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas o que confere à região anteriormente lesionada, presença de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa (ACKERMANN, 2007). Os queratinócitos nesta fase tornam-se células hiperproliferativas e migratórias que produzem e

secretam receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs – PPAR α e PPAR β) contribuindo para uma rápida reepitelização tecidual (SAHOTA et al., 2004).

4.3 Fase de Remodelação e Resolução do Processo

A fase de remodelação perdura por meses a anos. Nesta fase, ocorre reorganização da malha colágena e a cicatriz adquire maior força tênsil, tornando-se empalidecida devido a apoptose dos vasos. O remodelamento envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas colágenas (HOSGOOD, 2006). A deposição colágena ocorre, a princípio, de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina, sendo dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas pela enzima colagenase e novamente sintetizadas e arranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacentes, resultando numa configuração mais regular da cicatriz. Ao final desta etapa, os anexos cutâneos, como folículos pilosos e glândulas também podem sofrer regeneração (HATANAKA & CURI, 2007). A depender da extensão da lesão o processo final poderá evoluir para completa regeneração ou apenas para reparação tecidual (BALBINO et al., 2005).

Quando as lesões acometem apenas a epiderme, ocorre regeneração tecidual, com retorno da integridade morfofuncional do tecido. No entanto, quando o dano tissular é mais acentuado e se estende a porções da derme, acometendo glândulas, folículos pilosos, dentre outras estruturas, o processo resulta em reparação tecidual. Nesse caso, embora a homeostasia seja restabelecida, a atividade funcional do tecido apresenta-se comprometida e, como a região lesionada geralmente é substituída integral ou pelo menos parcialmente por tecido fibrótico, observa-se formação de cicatriz (MANDELBAUM et al., 2003; BALBINO et al., 2005; RÜNGER et al., 2007). No Quadro 3 estão descritos os principais mediadores bioquímicos envolvidos no processo de cicatrização de feridas cutâneas, bem como os tipos celulares que modulam a síntese e expressão destes e os efeitos desencadeados pelos mesmos.

QUADRO 3 - Tipos celulares, mediadores liberados e seus efeitos no processo de cicatrização

GRUPOS CELULARES	PRINCIPAIS MEDIADORES LIBERADOS	EFEITOS DESENCADEADOS
Plaquetas	TGF- β , PDGF (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD), PAF, fibrinogênio, fibronectina, tromboplastina	Formação do trombo plaquetário que tampona a lesão e recrutamento de neutrófilos e monócitos
Neutrófilos	IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , CTAP-III, TGF- β , HGF, MIP	Recrutamento de monócitos/macrófagos
Monócitos / Macrófagos	TGF- α , TGF- β , VEGF-A, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, HB-EGF, HGF, MIP, MSP	Quimiotaxia de monócitos e fibroblastos, proliferação de fibroblastos, angiogênese e síntese de colágeno
Fibroblastos	FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF10, IP-10, IL-8, eotaxina, PLGF, TGF-b, Cyr61	Maturação e remodelamento da matriz extracelular; angiogênese e colagenização
Queratinócitos	MCP-1, FGF1, FGF2, TGF- β , MIP-2, MSP	
Células endoteliais	MCP-1	

Fonte: Adaptado de HATANAKA & CURI, 2007

4.4 Fatores que afetam o processo de cicatrização de feridas

O tempo de cicatrização e os eventos envolvidos em cada fase do processo ocorrem de forma harmoniosa, quando o organismo encontra-se em condições favoráveis para responder ao insulto. Em condições adequadas uma cicatriz possui aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, com funcionalidade restabelecida (MANDELBAUM et al., 2003). No entanto, frequentemente a evolução do processo cicatricial torna-se prejudicada ou mesmo impedida advinda de fatores intrínsecos ou extrínsecos, sendo estes didaticamente classificados em fatores sistêmicos e locais (HOSGOOD, 2006). Os fatores sistêmicos são atribuídos as condições intrínsecas do animal, devendo ser monitorados, uma vez que, geralmente não podem ser completamente eliminados (MORAES et al., 2000). Os principais exemplares incluídos nesse tipo de classificação são a idade, particularidades inerentes a espécie, estado

nutricional, estado imunológico e uso concomitante de medicamentos, principalmente drogas imunossupressoras (STASHAK, 1999; MANDELBAUM et al., 2003; BOHLING et al., 2004).

Os fatores locais que interferem prejudicando a resolução satisfatória da cicatrização estão relacionados a condições extrínsecas ao organismo animal, relacionadas a localização anatômica da ferida, presença de infecção, hemorragia, isquemia e necrose tecidual, corpos estranhos e linhas de tensão (LAUAND et al., 2004; SANTOS et al., 2006). Na maior parte, os fatores locais podem ser prontamente observados e a precoce identificação destes é de fundamental importância para o desígnio de um tratamento que aprimore a evolução do processo cicatricial (HOSGOOD, 2006).

5 EMPREGO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO EM PESQUISAS

O emprego de animais de laboratório nas pesquisas científicas tem sido de fundamental importância no aperfeiçoamento dos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças tanto na medicina humana, quanto na veterinária (FRAJBLAT et al., 2006). Animais de laboratório são definidos como espécies desenvolvidas e/ou mantidas em biotério com finalidade de experimentação de medicamentos, vacinas, cosméticos e outros, a fim de verificar sua eficácia ou mesmo investigar sobre a possibilidade de reação desencadeada por esses agentes (NRC, 2003). A evolução da ciência e os constantes questionamentos sobre o uso de animais em experimentação científica alteraram as relações entre o ser humano e os animais transformando o bem-estar animal em uma importante área de estudo. O conhecimento da biologia, fisiologia, comportamento e necessidades das espécies são essenciais na diminuição do estresse causado por manejo inadequado proporcionando-lhes maior bem-estar e garantindo maior confiabilidade dos resultados obtidos nas pesquisas (FRAJBLAT et al., 2006). Para realização de estudos diversos, a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) aconselha a utilização de espécies pecilotérmicas ou mesmo as homeotérmicas, tendo como maiores representantes, sapos, rãs, cães, galinhas, galos, coelhos, vacas, gatos, macacos, ratos, camundongos, porcos, pombos e outros (ANDERSEN et al., 2008). Atualmente, a

utilização de animais para experimentos em laboratório é bastante questionada, pois os protetores de animais indicam a não utilização destes em pesquisas. Em contrapartida, os cientistas defendem a importância do emprego destes em experimentos e alegam que o desuso das cobaias retardaria a ciência e a economia de diversos países que buscam desenvolver suas próprias fórmulas. Além disso, os centros de pesquisas seriam inutilizados e os profissionais da área seriam impedidos de exercer suas funções (CHORILLI et al., 2007).

Em relação à cicatrização observa-se que os episódios desencadeados durante a evolução do processo são identificados em todas as espécies animais, bem como nos seres humanos, sendo um processo até certo ponto padrão, independente de ordem taxonômica. Dessa forma, estudos sobre cicatrização, frequentemente, se limitam a utilizar um número restrito de espécies animais como modelos experimentais para aplicá-los as demais (BOHLING et al., 2004). Espécies como coelhos, ratos, camundongos, são comumente utilizadas como unidades experimentais em ensaios de cicatrização de feridas, por apresentarem diversas características que contemplem esses estudos (GUL et al., 2007).

Os coelhos em especial vêm sendo apontados em grande diversidade de ensaios, em múltiplos segmentos científicos. Pertencentes à classe *Mammalia*, ordem *Lagomorpha*, família *Leporidae*, gênero *Oryctolagus* e espécie *Oryctolagus cuniculus*, são conhecidos em mais de 100 variedades dentro da espécie, sendo que as duas mais frequentemente utilizadas em investigação experimental são os coelhos das raças Nova Zelândia e Holandesa (TEMPLETON, 1996). Por serem animais de pequeno porte, permitem que as lesões cutâneas sejam facilmente reproduzidas, simulando uma injúria tecidual acidental. Além disso, a facilidade de manejo desses animais contribui para um acompanhamento mais sistemático da evolução do processo. A rapidez e a maior expressão dos eventos celulares e bioquímicos, quando comparados a outras espécies animais, como os felinos, também são fatores considerados positivos quando se pretende desenvolver um ensaio experimental envolvendo essas espécies (GOTTRUP et al., 2000; SALGADO et al., 2007).

6 PROTOCOLOS TERAPÊUTICOS NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS

6.1 Histórico

Os primeiros relatos sobre cicatrização de feridas cutâneas datam de 2.000 a.C., quando os sumérios propuseram duas formas para o tratamento dos danos tissulares, sendo estes o tratamento espiritual e a utilização de métodos auxiliares da cicatrização, como as plantas medicinais. Os egípcios foram os primeiros a classificar a ferida em contaminada e não-contaminada. Mais tarde os gregos, dando continuidade aos estudos egípcios, classificaram as feridas quanto à natureza, em agudas e crônicas. Galeno de Pérmans (120-20d.C.) apontado como o médico experiente dos gladiadores romanos, enfatizou ser de fundamental importância a manutenção de um ambiente úmido, a fim de criar condições favoráveis para que uma adequada evolução e restabelecimento da integridade tecidual ocorra (BARBUL, 2006).

O próximo grande passo na história da cicatrização ocorreu com a descoberta dos antissépticos e sua função em minimizar os riscos de infecção das feridas. A teoria da geração espontânea proposta pelo pesquisador Louis Pasteur (1.822-1.895) demonstrou que germes e microrganismos encontram-se presentes no sítio das lesões independente de contaminação (BLANES, 2004). No entanto, foi atribuído ao ícone Joseph Lister a contribuição ímpar no estudo da cicatrização de feridas. Em visita a Glasgow - Escócia, Lister observou que algumas regiões do sistema de esgoto da cidade eram mais claras que o restante, associando esse achado à ação do ácido fenólico presente nas águas residuais. Tal descoberta abriu precedentes para o estudo dessa substância de forma que o pesquisador passou a utilizar o ácido para esterilização de instrumental e pulverização dos centros cirúrgicos, reduzindo a mortalidade de pacientes submetidos a intervenções de 50 para 15% (CUZZELL & KRASNER, 2003).

Contudo, a prática provocou grande polêmica e o estudioso ficou impedido de desenvolver suas atividades até comprovação de seus resultados, o que pavimentou o caminho para seu retorno triunfante. Dez anos mais tarde, tendo como base os estudos de Lister, Robert Wood Johnson desenvolveu um curativo anti-séptico composto por gaze de algodão embebida com iodo e iniciou

os estudos no tratamento de feridas de pele (BLANES, 2004). Entre os anos 60 e 70 foi a vez do desenvolvimento dos curativos poliméricos, os quais foram personalizados para parâmetros específicos a depender, por exemplo, da extensão da injúria, presença de contaminação, absorção e forma da lesão (BARBUL, 2006). Devido a capacidade de personalizar a gama disponível de materiais que auxiliam no tratamento de feridas, estudos envolvendo os coadjuvantes do processo cicatricial vêm ganhando cada vez mais espaço no cenário contemporâneo (CUZZELL & KRASNER, 2003).

6.2 Protocolos terapêuticos

A prática da cicatrização envolve a manipulação e/ou utilização de um verdadeiro arsenal disponível para contemplar lesões de diversas classes. Existem atualmente no mercado aproximadamente 2.500 itens destinados ao tratamento de ferimentos agudos e crônicos, podendo conferir desde antissepsia, simples cobertura, ou interferir de forma ativa nas diversas fases do processo cicatricial (CUZZELL & KRASNER, 2003). Muitas vezes uma combinação de todas estas modalidades, permite uma maior otimização da cicatrização e dentre os principais métodos auxiliares envolvidos na modulação do processo destacam-se a utilização de fitoterápicos, curativos poliméricos, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, bioengenharia tecidual e medicina regenerativa envolvendo utilização de células-tronco adultas (McFARLIN et al., 2006; BERETTA et al., 2009; LEE et al., 2009; LIMA et al., 2009a; LIMA et al., 2009b).

No entanto a importância implicada na busca dos diferentes tipos de cobertura que contribuam efetivamente como coadjuvantes do processo cicatricial não se aplica à adoção de técnicas de antissepsia concomitantemente ao protocolo terapêutico considerado. Estudos de MARTINS et al. (2000) revelaram que as práticas de antissepsia com solução de cloreto de sódio a 0,9% instiladas com seringa de 20mL acoplada a agulha calibre 25x8 conferem pressão aproximada de 13,5 psi, sendo esta considerada ideal para limpeza do leito das lesões e dessa forma permitem que as coberturas atuem sistematicamente para resolução do processo.

6.2.1 Barbatimão (*Stryphnodendron sp*)

O emprego das plantas medicinais no tratamento de feridas cutâneas fundamenta-se primariamente em conhecimentos populares sobre os benefícios medicinais dos fitoterápicos, bem como nas propriedades fitoquímicas dessas substâncias (SANTORO et al., 2004). Também conhecido como barbatimão, barba-de-timão, borãozinho-roxo, casca do Brasil, casca-da-virgindade, casca-da-mocidade, enche cangalha e faveiro, o *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville é uma leguminosa nativa do cerrado brasileiro, pertencente à família *Leguminosae*, sendo uma das maiores dentre as dicotiledôneas, que estão distribuídas especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (Figura 3). Existem pelo menos três subfamílias ditas importantes na família *Leguminosae*, sendo estas, a *Fabaceae*, a *Caesalpinioideae* e a *Mimosoideae*. Fazem parte desta última, aproximadamente 40 gêneros e 2000 espécies, incluindo os espécimes do gênero *Stryphnodendron* (GILBERT et al., 2005).



FIGURA 3 - *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville - (Barbatimão).

Fonte: MOURA (2009).

O *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville possui como princípio ativo de maior expressão o tanino. Quimicamente são compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário vegetal, os quais são de grande interesse ecológico e econômico. A maioria desses compostos não são encontrados no estado livre, sendo definidos como polímeros fenólicos solúveis, sob forma de ésteres ou de heterosídeos. Por sua vez os taninos são classificados em hidrolisáveis e condensados (MONTEIRO et al., 2005). É sabido que a atividade farmacológica do barbatimão está ligada diretamente aos teores de taninos condensados, que variam de 20% a 50%, de acordo com a origem e tipo da amostra, condições climáticas e geográficas (SOUSA et al., 2007). A fórmula estrutural molecular dos taninos condensados presentes nas cascas do barbatimão encontra-se evidenciada na Figura 4.

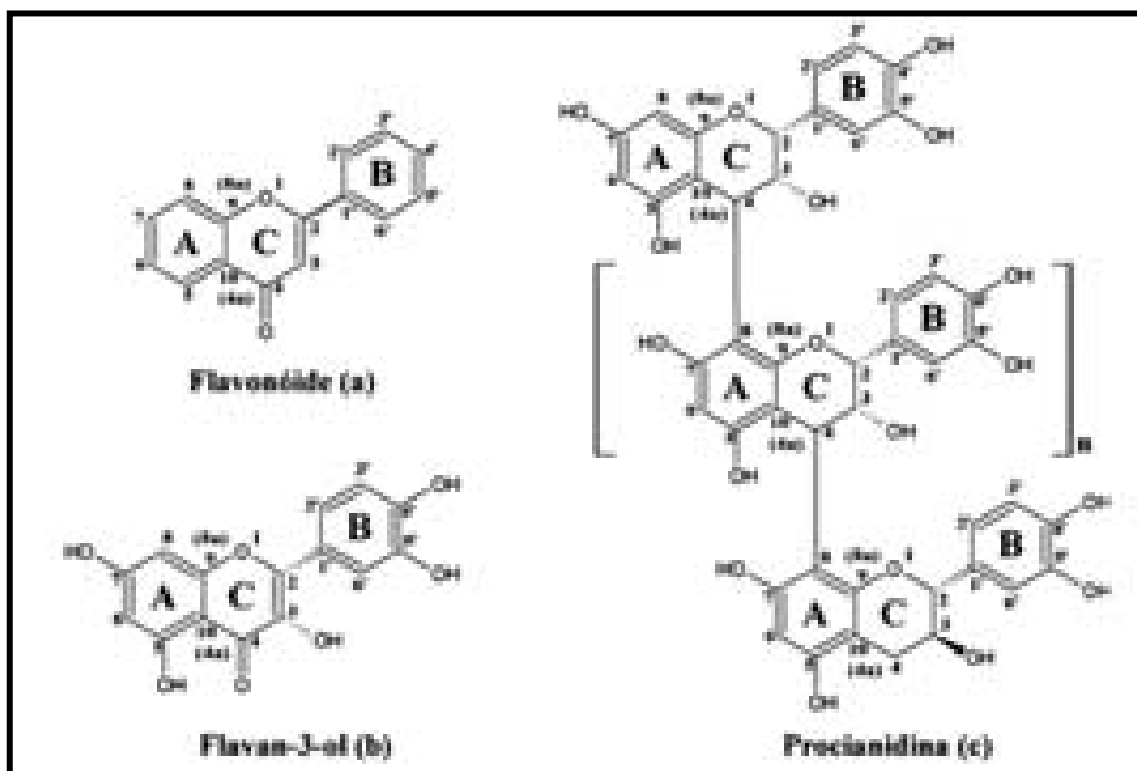


FIGURA 4 – Fórmula estrutural molecular dos taninos condensados: (a) flavonóide genérico, (b) flavan-3-ol e (c) procianidina (taninos condensados). Fonte: QUEIROZ et al. (2002).

Os compostos fenólicos exercem atividade em virtude de três propriedades gerais, sendo estas a formação de complexo com íons metálicos, a atividade antioxidante e a capacidade de formação de complexos com outras moléculas como proteínas e polissacarídeos. Quanto às propriedades

farmacológicas conferidas ao barbatimão em diferentes segmentos, destaca-se a ação adstringente e coadjuvante do processo cicatricial (RODRIGUES & CARVALHO, 2001; PINTO & MADURO, 2003; SILVA et al., 2005, LIMA et al., 2009a), atividade antiinflamatória (LIMA et al., 1998), antifúngica (COUTO et al., 2000), antimicrobiana e antidiarréica (MARTINS et al., 2003).

Dessa forma, o barbatimão pode ser empregado como coadjuvante no tratamento das infecções uterinas (PINTO & MADURO, 2003), combate à infecção hospitalar secundária de feridas (MAMBER, 1999) e tratamento de enfermidades como bronquite (RODRIGUES et al., 2002), gastrite e úlcera gástrica (AUDI et al., 1999), bem como auxiliar do processo cicatricial (LIMA et al., 2009a).

O barbatimão é utilizado na grande maioria sob a forma de extrato, sendo que a casca, as folhas e o caule são as principais partes da planta que podem se extrair o tanino. Recomendam-se a utilização das folhas principalmente no período próximo a decíduidade, evitando prejuízos ao processo fotossintético do material botânico (GILBERT et al., 2005) e como método de preparo do extrato pode-se efetuar decocção, infusão ou ebulição e maceração (PINTO & MADURO, 2003; MACEDO et al., 2007). A Figura 5 representa o esquema geral de partição e preparação do extrato de barbatimão.

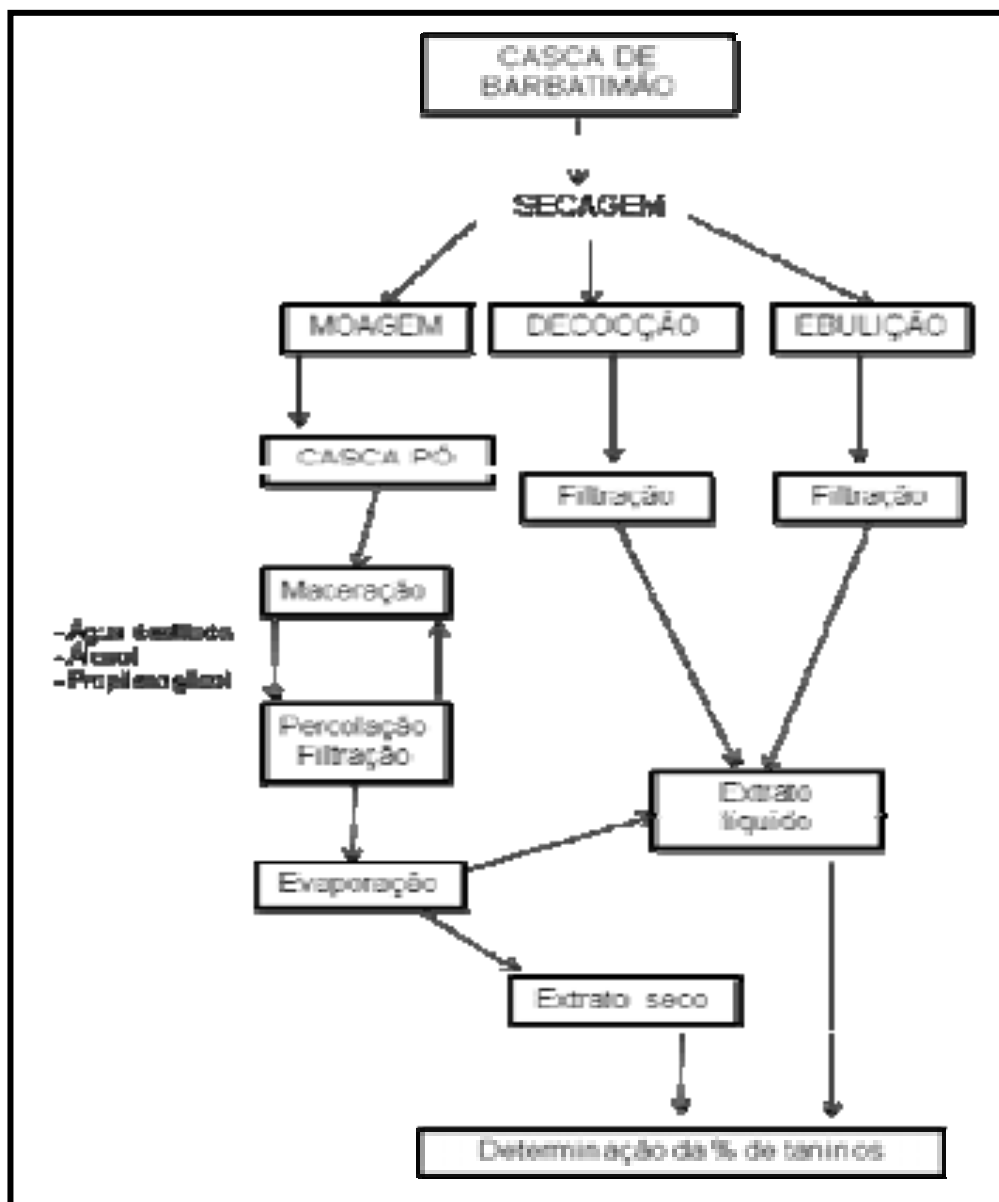


FIGURA 5 – Esquema de preparação da casca e obtenção do extrato de barbatimão. Fonte: Adaptado de GILBERT, 2005.

O valor biológico e fitoterápico dessa planta sobrepõe as barreiras impostas por sua atividade tóxica, constituindo-se em importante objeto de estudos para o desenvolvimento de novas opções menos onerosas de medicamentos (BORGES FILHO & FELFILI, 2003). Dessa forma, o emprego do barbatimão no tratamento de feridas poderá conferir uma opção significativamente relevante, sendo suas vantagens expressas principalmente quanto a sua origem vegetal, minimizando o impacto negativo que diferentes produtos ocasionam pelo efeito residual, afetando o homem, os animais e o meio-ambiente. Estudos de MARINHO et al. (2007) exemplificaram essa retórica visto que, em entrevista

acerca dos protocolos terapêuticos adotados comumente no tratamento dos animais domésticos, foram citadas terapias envolvendo utilização de 61 plantas medicinais com as mais variadas indicações terapêuticas, sendo que 100% dos entrevistados utilizavam plantas medicinais na terapêutica dos animais domésticos. O uso de plantas medicinais na terapêutica veterinária foi, dessa forma, justificado, como uma alternativa de tratamento seguro, de fácil obtenção e baixo custo. Os autores ressaltaram ainda a restituição do homem e dos animais a uma vida mais natural e saudável.

6.2.2 Quitosana

A quitosana é um polímero natural descoberto há cerca de 150 anos. É obtido a partir da hidrólise alcalina da quitina, podendo ocasionar uma desacetilação incompleta e uma despolimerização de extensões variáveis, resultando em quitosanas de diferentes massas moleculares (Figura 6) (WESKA et al., 2007). Possui elevada massa molecular, o que confere baixa solubilidade em meio aquoso, ácidos concentrados, álcalis, álcool e acetona (YOSOF et al., 2001). No entanto dissolve-se completamente em soluções de ácidos orgânicos quando o pH da solução é menor que seis. Alguns ácidos inorgânicos e diluídos tais como o nítrico, perclórico ou fosfórico, podem ser utilizados no preparo de soluções de quitosana, entretanto, esta deve ser mantida sob agitação e aquecimento durante um longo período para que ocorra a completa dissolução do polissacarídeo (INPI, 2000).

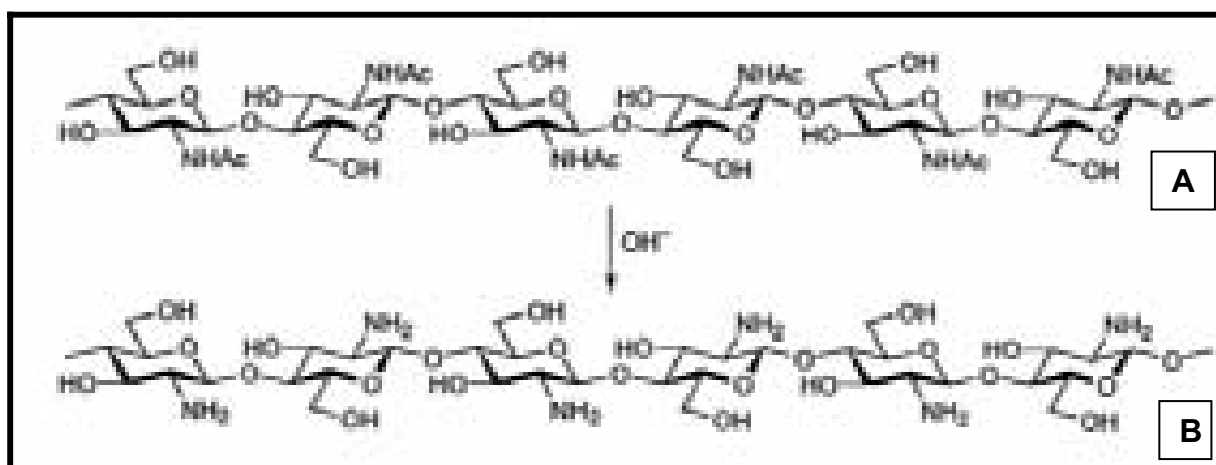


FIGURA 6 – Estruturas químicas dos polissacarídeos. Em A, quitina e em B, quitosana. Fonte: Adaptado de SILVA et al., 2006

Apresenta ainda uma gama de propriedades biológicas, desempenhando atividade antimicrobiana, efeito coagulante, analgésico, hipocolesterolêmico e hipolipidêmico. Também é empregada no tratamento da osteoartrite, redução de peso e na modulação do processo de cicatrização de feridas (LUCINDA-SILVA & EVANGELISTA, 2002; SILVA et al., 2006).

Em relação à regeneração tecidual, a quitosana possui propriedade imunomoduladora, ativando basicamente os macrófagos, explicando assim seu papel na aceleração da dinâmica da cicatrização de lesões cutâneas. Os macrófagos, ativados pelos oligômeros de quitina e quitosana, liberam interleucina -1, que estimula a proliferação de fibroblastos e colágeno. Promove migração de neutrófilos, melhorando a resposta inflamatória e atua preventivamente frente a sítios de infecção por possuir atividades bactericidas e bacteriostáticas, além de estimular a migração e proliferação celular, na reorganização da histo-arquitetura cutânea (SILVA et al., 2006). O esquema demonstrado na Figura 7 detalha os principais efeitos da quitosana frente ao processo de cicatrização de feridas.

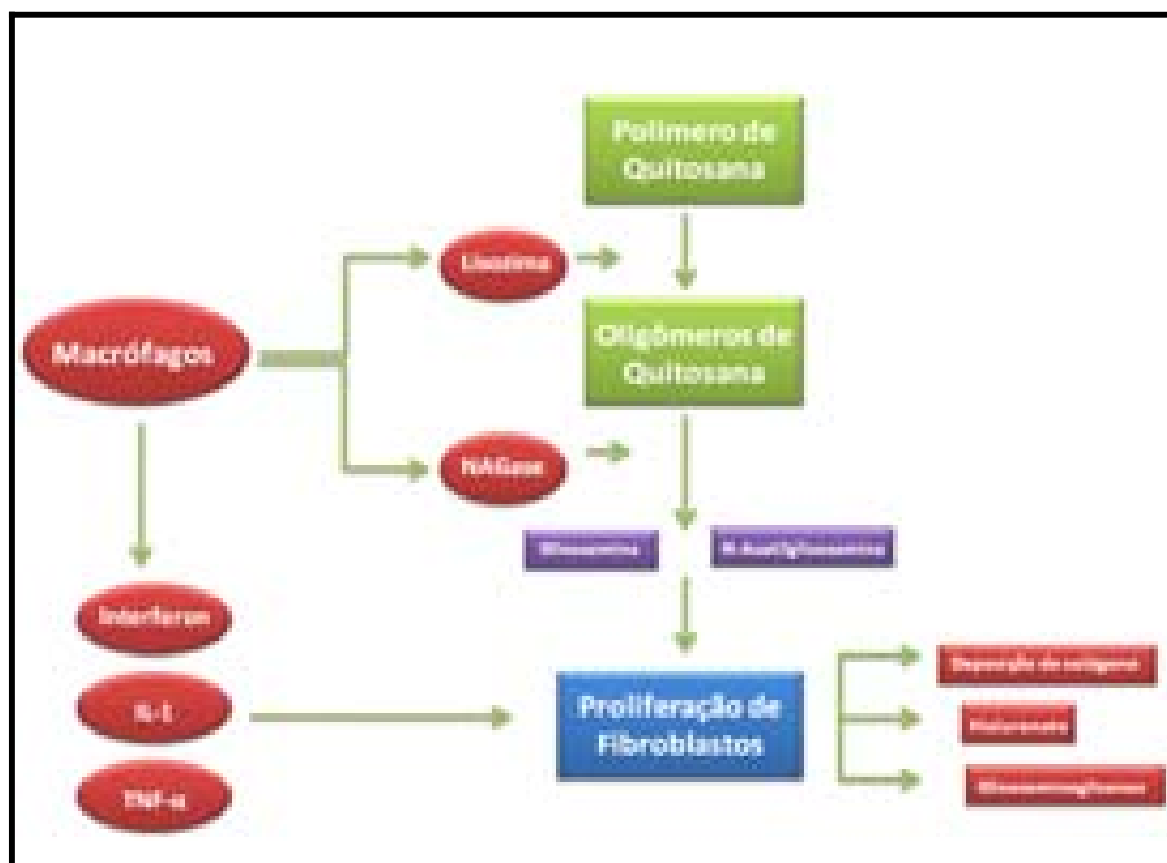


FIGURA 7 - Mecanismo imunomodulador da quitosana que resulta na biodegradabilidade do polímero e aceleração do processo de cicatrização. Fonte: Adaptado de SILVA et al., 2006.

A quitosana é biocompatível e naturalmente degradada no organismo apresentando propriedade de formar géis em soluções ácidas fracas, o que possibilita sua utilização em formulações farmacêuticas para aplicações tópicas em ferimentos, queimaduras e/ou vesículas oriundas de agressões fúngicas ou bacterianas (INPI, 2000).

7 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Para acompanhar de forma sistemática a evolução do processo cicatricial, diferentes métodos de avaliação têm sido propostos. Dentre esses, destacam-se a avaliação clínica da ferida, os achados de necropsia e as avaliações morfométrica e histológica (TYRONE et al., 2000; LOPES et al., 2005; GUL et al., 2007).

7.1 Avaliação Clínica

A avaliação clínica da cicatrização de feridas é o principal método utilizado para verificar a evolução do processo cicatricial e fundamenta-se, sobretudo, no exame macroscópico específico da lesão (LAUAND et al., 2004). Particularmente, essa avaliação pode ocorrer durante os exames, clínico ou necroscópico. A fim de garantir melhor qualidade da investigação, alternativamente, pode-se recorrer ao auxílio de lupas (MARTINS et al., 2006) e exame ultrassonográfico (RABELO et al., 2005). Os resultados do exame físico permitem que se faça uma associação entre os achados e o tempo da instalação da injúria tissular, sendo possível inferir em que fase da evolução do processo cicatricial a lesão se encontra. Acrescente-se que a avaliação clínica atua como parâmetro fundamental para efetuar correlação com as análises microscópicas (HOSGOOD, 2006). Nos primeiros dias após instalação do dano tissular, observa-se macroscopicamente em feridas abertas, a presença de coágulo sanguíneo, exsudato serossanguinolento ou purulento, ausência de tecido de granulação e pouca contração, compatíveis com a fase inflamatória da cicatrização. Quando as bordas da ferida encontram-se justapostas (cicatrização por primeira intenção), a epitelização pode se iniciar ainda nessa fase (MANDELBAUM et al., 2003).

Ainda considerando a avaliação macroscópica da lesão, a fase proliferativa é marcada pela visualização do tecido de granulação, que pode assumir aspecto variável, desde avermelhado e exuberante a róseo, esbranquiçado, granular ou nodular, de acordo com a quantidade de colágeno e vasos sanguíneos neoformados. A contração da ferida também é observada nessa fase, sendo que entre o 5º e o 9º dias pós-lesão, é notável a diminuição do seu diâmetro. Ressalte-se que a taxa de contração varia de acordo com a localização anatômica da ferida e a flexibilidade do tecido adjacente. Ainda nessa fase tem início a reepitelização, evidenciada pela presença de tecido róseo íntegro, localizado nas bordas da lesão (DE NARDI et al., 2004; MARTINS et al., 2006; GUL et al., 2007). A fase final do processo de cicatrização, ou fase de remodelação colágena, é marcada por superfície epitelial completamente íntegra, com formação ou não de cicatriz, a depender da extensão do dano e da deposição de colágeno no sítio da ferida. Inicialmente o tecido recém-epitelizado apresenta coloração rósea, devido à vascularização e com o amadurecimento das fibras colágenas e apoptose dos vasos, anteriormente formados, a lesão passa a apresentar coloração empalidecida (BRANCO NETO et al., 2006; MARTINS et al., 2006; HATANAKA & CURI, 2007).

7.2 Avaliação Morfométrica

Na avaliação da cicatrização de feridas, os testes morfométricos são empregados para a mensuração do diâmetro da área lesionada, a fim de estabelecer um parâmetro comparativo entre a medida inicial e as demais obtidas durante a evolução do processo. Dessa forma, torna-se possível a determinação da taxa de contração da lesão (CARDINAL et al., 2009). A morfometria pode ser realizada pela medição direta da área da ferida durante exame físico ou necroscópico, ou ainda, por meio de exame ultra-sonográfico, tomografia computadorizada, ressonância magnética e, mais atualmente, por meio da utilização de *softwares* de mensuração na projeção digital de imagens (RABELO et al., 2005; GUL et al., 2007; MENEZES et al., 2008).

Para a execução da análise morfométrica torna-se indispensável a utilização de equipamentos de precisão. A régua milimetrada é um instrumento que pode ser empregado para a medição das bordas da ferida, de onde se obtêm

o maior e o menor diâmetro da lesão (COELHO et al., 1999). No entanto, o paquímetro é a ferramenta mais utilizada por pesquisadores para determinação da área da ferida. Os paquímetros digitais são os mais empregados atualmente, por conferirem medida mais acurada do diâmetro da lesão (GARROS et al., 2006; MARTINS et al., 2006; GUL et al., 2007; MENEZES et al., 2008). Além desse aspecto, o campo que envolve o uso de ferramentas computacionais para acompanhamento de lesões dermatológicas ainda que recente, vem ganhando cada vez mais espaço, tanto na medicina quanto na veterinária. Também denominados testes de planimetria digital, têm a função de tornar mais objetivas e rápidas a apresentação e tabulação de resultados de mensuração de imagens digitais de feridas, visando à análise quantitativa do processo, para um acompanhamento sistemático do percentual de contração e evolução da mesma (TEIXEIRA et al., 2005).

No início, o alto custo dos programas analisadores de imagem constituía fator limitante para esse tipo de avaliação. No entanto, com o advento das câmeras digitais de preços acessíveis e programas de análise de imagem disponíveis gratuitamente na rede facilitou o desenvolvimento de técnicas de análise morfométrica de feridas e lesões cutâneas (SANTANA et al., 2008). O método consiste em posicionar uma câmera digital a um dispositivo de captura de imagens, mantendo esta a uma distância constante do animal. Dessa forma, efetua-se a captura da imagem e, após tempo pré-estabelecido, novas capturas fotográficas da lesão são efetuadas. Em seguida, as imagens são transferidas para um *software* de mensuração de imagens, para obtenção das medidas inicial e final da lesão, tornando possível a obtenção da taxa de contração da ferida (CARDINAL et al., 2009). Imagens microscópicas também podem ser avaliadas por meio dos testes de morfometria digital, podendo-se proceder à contagem dos principais tipos celulares presentes em uma lesão cutânea em determinado período de tempo (TEIXEIRA et al., 2005).

7.3 Avaliação Histológica

A análise histológica da ferida é empregada especialmente em associação à avaliação clínica do processo cicatricial, sendo que essa inter-relação confere maior credibilidade aos resultados (KUMMAR et al., 2005). A

coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) é utilizada rotineiramente para a análise microscópica das diferentes fases do processo de reparação tecidual (MARGULIS et al., 2007). Contudo, outros métodos de coloração, como Tricrômico de Masson e Picrossírius podem ser úteis para avaliar componentes específicos nas diferentes etapas de reparo da ferida cutânea (BIONDO-SIMÕES et al., 2005; EULÁLIO et al., 2007; SEZER et al., 2007).

Microscopicamente, a fase inflamatória é caracterizada pela presença de exsudato e neutrófilos, que perduram principalmente durante a fase inicial da inflamação. Ao final desse período, os neutrófilos são gradualmente substituídos por macrófagos e linfócitos (GARROS et al., 2006; MARGULIS et al., 2007; MENEZES et al., 2008). Na fase proliferativa, destaca-se a presença dos fibroblastos, neovascularização, deposição colágena e, em menor quantidade, células inflamatórias que participam da composição do tecido de granulação (MARGULIS et al., 2007). Na fase final do processo cicatricial, durante a remodelação, nota-se intensa proliferação celular, com renovação das células epiteliais, deposição de colágeno, além de organização das fibras colágenas e diminuição gradativa dos vasos neoformados, devido a apoptose dos mesmos (HATANAKA & CURI, 2007).

O colágeno é um componente fundamental no processo de reparo tecidual, sintetizado a partir dos fibroblastos e presente em abundância nas fases proliferativa e de remodelação da ferida (AZAD et al., 2004; RICH & WHITTAKER, 2005; SEZER et al., 2007). As fibras colágenas desempenham um papel vital, não só na manutenção da integridade estrutural, mas também na determinação da função tecidual (MANDELBAUM et al., 2003). Dentre os diferentes tipos descritos, os mais expressivos no processo de cicatrização são os tipos I e III, presentes na pele, vasos sanguíneos e músculos (BALBINO et al., 2005). O colágeno tipo III aparece primariamente na ferida, é caracterizado como colágeno jovem ou imaturo e confere aspecto desorganizado as fibras. Já o colágeno tipo I, maduro, substitui o tipo III em cicatrizes antigas e se caracteriza pela maior organização das fibras colágenas (RICH & WHITTAKER, 2005).

A coloração Tricrômico de Masson (TM) é um método de coloração consagrado, utilizado em inúmeras pesquisas científicas e possibilita a visualização de fibras colágenas e musculares, corando as primeiras de azul claro (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). Apesar disso, o método não permite

diferenciação entre os tipos de colágeno, presentes na ferida. Além disso, a falta da seletividade específica para esse componente tecidual e sua incapacidade de corar fibras colágenas muito delgadas, pode, sob certas circunstâncias, resultar em avaliação subestimada do colágeno presente (AZAD et al., 2004; SEZER et al., 2007). Já o método de Picrossírius, além de compreender coloração específica para colágeno, possibilita a identificação dos colágenos I e III, presentes na fibra colágena e encontrados em abundância durante o processo de cicatrização (BORGES et al., 2007). A diferenciação entre colágenos tipo I e III é dada pela birrefringência, no qual as fibras compostas pelo tipo I apresentam menor birrefringência e se coram de vermelho, enquanto que as formadas pelo tipo III apresentam maior birrefringência e se coram de verde (AZAD et al., 2004; BORGES et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, M.R. Acute inflammation. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic basis veterinary disease**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007. cap.3-4, p.101-191.
- AMBROSE, J.A.; WEINRAUCH, M. Thrombosis in ischemic heart disease. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v.156, p.1382-1394, 1996.
- ANDERSEN, M.L.; D'ALMEIDA, V.; KO, K.M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P.J.F.; MAGALHÃES, L.E.; TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP, 2008. 167p.
- ARNOLD, H.L.J.R.; ODOM, R.B.; JAMES, W.D. A pele: estrutura básica e função. In: JAMES, W.D.; BERGER, T.; ELSTON, D. **Andrew's Doenças básicas da pele**. Philadelphia: Elsevier, 1994. p.1-14.
- AUDI, E.A.; TOLEDO, D.P.; PERES, P.G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W.K.V.; MELLO, J.P.C.; NAKAMURA, C.V.; PRADO, W.A.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytotherapy Research**, London, v.13, p.264-266, 1999.
- AZAD, A.K.; SERMSINTHAM, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W.R. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, Hoboken, v.69B, n.2, p.216-222, fev. 2004.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, São Paulo, v.41, n.1, p.27-51, 2005.
- BANKS, W.J. **Histologia Veterinária Aplicada**, 2.ed. São Paulo: Manole Ltda., 1991. 655p.
- BARBUL, A. History of wound healing. In: BRUNICARDI, F.C.; SEYMOUR, I.; SCHWARTS, D.L.; DUN, D.K.; ANDERSEN, R.E. **Schwartz's Surgery**. Ontario: Companion Handbook, 2006, p.25-78.
- BEER, H.D.; FASSLER, R.; WERNER, S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair. **Vitamins and Homones**, New York, v.59, p.217-239, 2000.
- BERETTA, D.C.; EURIDES, D.; MORAES, J.R.E.; GUIMARÃES, E.C.; OLIVEIRA, W.S.; BELETTI, M.E. Efeitos da estimulação elétrica na cicatrização do tendão do músculo gastrocnêmio em coelhos (*Oryctolagus cunicullus*). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.10, n.3, p.879-886, 2009.
- BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; WESTPHAL, V.L.; PAULA, J.B.; BORSATO, K.S.; NORONHA, L. Síntese de colágeno após a implantação de telas de prolipropileno em parede abdominal de ratos jovens e velhos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.20, n.4, p.300-304, 2005.

BLANES, L. Tratamento de feridas. In: BAPTISTA-SILVA, J.C.C. **Cirurgia Vascular: guia ilustrado**. [online]. São Paulo: 2004. Disponível em: <http://www.bapbaptista.com> Acesso em: 18 jun.2009.

BOHLING, M.W.; HENDERSON, R.A.; SWAIM, S.F.; KINCAID, S.A.; WRIGHT, J.C. Cutaneous wound healing in the cat: a macroscopic description and comparison with cutaneous wound healing in the dog. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v.33, n.6, p.579-587, 2004.

BORGES, L.F.; GUTIERREZ, P.S.; MARANA, H.R.C.; TABOGA, S.R. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapsed lesions. **Micron**, New York, v.38, n.6, p.580-583, 2007.

BORGES FILHO, H.C.; FELFILI, J.M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca do barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil. **Revista Árvore**, Viçosa, v.27, n.5, p.735-745, 2003.

BRANCO NETO, M.L.C.; RIBAS FILHO, J.M.; MALAFAIA, O.; FILHO, M.A.O.; CZECZKO, N.G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V.R.; TEIXEIRA, H.M.; AGUIAR, L.R.F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.21, n.2, p.17-22, 2006.

BREITBART, A.S.; GRANDE, D.A.; LASER, J.; BARCIA, M.; PORTI, D.; MALHOTRA, S.; KOGON, A.; GRANT, R.T. MASON, J.M. et al. Treatment of ischemic wounds using cultured dermal fibroblasts transduced retrovirally with PDGF-B and VEGF genes. **Annals of Plastic Surgery**, Boston, v.46, n.5, p.555-561, 2001.

CARDINAL, M.; EISENBUD, D.E.; ARMSTRONG, D.G. Wound shape geometry measurements correlate to eventual wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.17, p.173-178, 2009.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: O camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v.28, n.1, p.11-23, 2007.

CLARK, R.A.F. Wound Repair. In: CLARK R.A.F. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2.ed. New York: Plenum Press, 1996. p.54.

COELHO, M.C.O.; REZENDE, C.M.F.; TENÓRIO, A.P.M. Contração de feridas após cobertura com substitutos temporários da pele. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.2, p.297-303, 1999.

COUTO, L.C.; FORTIN, Y.; KAMDEM, D.P.; COUTO, L. Potencial fungicida dos extratos em água quente da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no estado bruto e combinados aos íons Fe^{+++} e Al^{+++} , parte III: bioensaios sobre a madeira verde. **Revista Árvore**, Viçosa, v.24, n.1, p.105-113, 2000.

CUZZELL, J.; KRASNER, D. Curativos. In: GOGIA, P. **Feridas- tratamento e cicatrização**. Rio de Janeiro:Revinter Ltda, 2003. cap.9, p.103-114.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; BAUDI, D.L.K.; CASTRO, J.H.T. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, vitamina A e E, Lecitina de Soja e iodopolivinilpirrolidona em cães. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.9, n.1, p.1-16, 2004.

EULÁLIO, J.N.; DANTAS, A.N.M.; GÓES-NETO, A.; BARBOSA JÚNIOR, A.A.; FREIRE, A.N.M. A influência da calcitonina sintética do salmão na cicatrização cutânea de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v.34, n.4, p.237-244, 2007.

EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; BELLETI, M.E.; SILVA, L.A.F.; FIORAVANTI, M.C.S.; NETO, N.S.T.; CAMPOS, V.A.; LEMAR, R.C.; JÚNIOR, P.L.S. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Martius). **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia de Uruguáina**, Uruguáina, v.2/3, n.1, p.37-42, 1995/1996.

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2002. 1335p.

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V.L.L.; RIVERA, E.A.B. Bem Estar em Animais de Laboratório. In: CHRISTOFOLETTI, R.; BECK, A.A.H. (Org.). **Ética, Ciência e Desenvolvimento**. Itajaí:Universidade do Vale do Itajaí, 2006. p.117-128.

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

GILBERT, B.; FERREIRA, J.L.P.; ALVES, L.F. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas**, 1.ed. Curitiba: Abifito, 2005. 250p.

GOTTRUP, F.; AGREN, M.S.; KARLSMARK, T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.8, n.2, p.83-96, 2000.

GUL, N.Y.; TOPAL, A.; CANGULT, I.T.; YANIK, K. The effects of topical tripeptide copper complex and helium-neon laser on wound healing in rabbits. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v.19, n.1, p.7-14, nov. 2007.

HARTLAPP I.; ABE R.; SAEED R.W.; PENG T.; VOELTER W.; BUCALA R.; METZ, C.N. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. **The FASEB Journal**, Bethesda, v.15, n.12, p.2215-2224, 2001.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacologia**, São Paulo, v.88, n.2, p.53-58, 2007.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v.36, n.4, p.667-685, 2006.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C. **Membrana de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações**. BR n. PI9805480-5a, 19 nov. 1998, 12 set. 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Inflammation. In: ROBBINS & COTRAN. **Pathologic Basis of Disease**. 7.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. cap.2-3, p.47-118.

LAUAND, F.; FÉRES, O.; ROCHA, J.J.; CAMPOS, A.D.; CARVALHO, F.G. Efeito da hipovolemia sobre a cicatrização de anastomoses colônicas: estudo experimental em ratos. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v.24, n.4, p.317-321, 2004.

LEE, W.R.; PARK, J.H.; KIM, K.H.; KIM, S.J.; PARK, D.W. CHAE, M.H.; SUCH, S.H.; JEONG, S.W.; PARK, K.K. The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.17, p.505-510, 2009.

LIMA, C.R.O.; SILVA, L.A.F.; GOULART, D.S.; PERCIANO, C.B.; PARENTE, L.M.L.; FRANCO, L.G. Análise morfométrica da taxa de contração de feridas tratadas com extrato da casca de barbatimão a 5%. In: CONFERÊNCIA SUL-AMERICANA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 9., 2009, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos...** [CD-ROM], Rio de Janeiro, 2009a.

LIMA, C.R.O.; SILVA, L.A.F.; RABELO, R.E.; ORLANDO, C.F.P.; HELOU, J.B.; COELHO, C.M.M. Cicatrização de feridas cutâneas em coelhos tratadas com creme de quitosana a 5% - avaliação morfométrica. In: CONFERÊNCIA SUL-AMERICANA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 9., 2009, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos...** [CD-ROM], Rio de Janeiro, 2009b.

LIMA, J.D.S.; MARTINS, D.T.O.; SOUZA, P.T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phytotherapy Research**, Sussex, v.12, n.3, p.218-220, 1998.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wound in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.99, n.2, p.256-272, 2005.

LUCAS, R. Semiologia da Pele. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia Veterinária – a arte do diagnóstico**. São Paulo: Roca, 2004. cap.12, p.641-676.

LUCINDA-SILVA, R.M.; EVANGELISTA, R.C. Polissacarídeos biodegradáveis úteis para a preparação de sistemas de liberação controlada de fármacos. Parte 1: quitosana. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, v.23, n.2, p.199-213, 2002.

MACEDO, F.M.; MARTINS, G.T.; MENDES, C.S.O.; SILVA, C.M.; RODRIGUES, C.G.; OLIVEIRA, D.A. Determinação de compostos fenólicos totais em barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, n.2, p.1164-1165, 2007.

MAMBER, D. Barbatimão, a receita dos pajés. **Revista Saúde**, Natal, v.31, n.192, p.76-81, 1999.

MANDELBAUM, S.H.; SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.78, n.4, p.393-410, 2003.

MARGULIS, A.; CHAOUAT, M.; BEN-BASSAT, H.; ELDAD, A.; ICEKSON, M.; BREITERMAN, S.; NEUMAN, R. Comparison of topical iodine and silver sulfadiazine as therapies against sulfur mustard burns in a pig model. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.15, p.916-921, 2007.

MARINHO, M.L. ALVES, M.S.; RODRIGUES, M.L.C.; ROTONDANO, T.E.F.; VIDAL, I.F.; SILVA, W.W.; ATHAYDE, A.C.R. A utilização de plantas medicinais em Medicina Veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.9, n.3, p.64-69, 2007.

MARTINS, N.L.P.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J.M.; HEIBEL, M.; BALDEZ, R.N.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, H.; MAZZA, M.; NASSIF, P.A.N.; WALLBACH, T.Z. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (Babaçu). Estudo comparativo em ratos **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.21, n.3, p.66-75, jun. 2006.

MARTINS, M.F.; MACEDO, C.F.A.M.; SÍRIO, O.J.; YIOMASA, M.M.; MIZUSAKI, C.I.; FIGUEIREDO, L.D.; PACHECO, P. Avaliação macro e microscópica da cicatrização de lesões experimentalmente provocadas em pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina fulica*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.40, n.3, p.213-218, 2003.

McFARLIN, K.; XIAOHUA, G.; LIU, Y.B.; DULCHAVSKY, D.S.; KWON, D.; ARBAB, A.S.; BANSAL, M.; LI, Y.; CHOPP, M.; DULCHAVSKY, S.A. GAUTAM, S.C. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.14, p.471-478, 2006.

MENEZES, F.F.; COELHO, M.C.O.C.; LEÃO, A.M.A.C. Avaliação clínica e aspectos histopatológicos de feridas cutâneas de cães tratadas com curativo temporário de pele. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, v.2, n.4, p.1-3, 2008.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.5, p.892-896, 2005.

MORAES, S.P.; CHAVES, F.R.; BANCI, S.; ROVER, P.A.; GEORGETTI, F.; REIS NETO, J.A. Zinco e cromo na cicatrização de feridas em ratos normais e diabéticos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v.27, n.6, p.394-399, 2000.

NRC. National Research Council. **Manual sobre cuidados e usos de animais de laboratório**. Goiânia: AALAC/COBEA, 2003. 89p.

PERANTEAU, W.H.; ZHANG, L.; MUVARAK, N.; BADILLO, A.T.; RADU, A.; ZOLTICK, P.W.; LIECHTY, K.W. Il-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v.128, n.7, p.1852-1860, 2008.

PINTO, A.A.C.; MADURO C.B. Produtos e subprodutos da medicina popular comercializados na cidade de Boa Vista, Roraima. **Acta Amazônica**, Manaus, v.33, n.2, p.281-289, 2003.

QUEIROZ, C.R.A.; MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, Viçosa, v.26, n.4, p.485-492, 2002.

RABELO, R.E.; SANT'ANA, F.J.F.; PAULO, N.M.; ROMANI, A.F.; SILVA, L.A.F.; VIU, M.A.O.; ALVES, C.B.; LIMA, C.R.O.; SILVA, O.C. Emprego do compósito látex, poliamida e polilissina a 0,1% na correção cirúrgica de hérnias umbilicais recidivantes em bovinos leiteiros. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.33, n.2, p.169-175, mar. 2005.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Brazilian Journal of Morphological Science**, São Paulo, v.22, n.2, 97-104, 2005.

RODRIGUES, L.A.; CARVALHO, D.A.; GOMES, L.J.; BOTREL, R.T. **Espécies vegetais nativas usadas pela população local em Luminárias MG**: Boletim Agropecuário de Lavras – MG. Minas Gerais: UFLA, 2002. 34p.

RODRIGUES, V.F.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio cerrado na região do Alto Rio Grande, Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.1, p.102-123, 2001.

RÜNGER, T.M.; QUINTANILLA-DIECK, M.J.; BHAWAN, J. Role of cathepsin K in the turnover of the dermal extracellular matrix during scar formation. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v.127, p.293-297, 2007.

SAHOTA, P.S.; BURN, J.L.; BROWN, N.J.; MACNEIL, S. Approaches to improve angiogenesis in tissue-engineered skin. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.12, n.6, p.635-642, 2004.

SALGADO, M.I.; PETROIANU, A.; BURGARELLI, G.L.; BARBOSA, A.J.A.; ALBERTI, L.R. Cicatrização conduzida e enxerto de pele parcial no tratamento de feridas. **Revista Associação Médica Brasileira**, Belo Horizonte, v.53, n.1, p.80-84, 2007.

SAMUELSON, D.A. **Tratado de histologia veterinária**. 1ed. São Paulo: Elsevier, 2007. 544p.

SANTANA, L.A.; GOMES, F.G.; KAJIWARA, J.K.; FRADE, M.A.C. Quantificação de áreas de úlceras de perna através de um programa de análise de imagem (ImageJ). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE INFORMÁTICA EM SAÚDE, 11., 2008, Campos do Jordão. **Anais eletrônicos...** [CD-ROM], Campos do Jordão, 2008.

SANTORO, K.R.; VIEIRA, M.E.Q.; QUEIROZ, M.L.; BARBOSA, R.P. Efeito do tanino de *Stryphnodendron* spp. sobre a longevidade de abelhas *Apis mellifera* L. (Abelhas africanizadas). **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v.53, n.203, p.281-291, 2004.

SANTOS, O.J.; RIBAS FILHO, J.M.; CZECHKO, N.G.; BRANCO NETO, M.L.C.; NAUFEL JÚNIOR, C.; FERREIRA, L.M.; CAMPOS, R.P.; MOREIRA, H.; PORCIDES, R.D.; DOBROWOLSKI, S. Avaliação do extrato de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.21, n.2, p.38-45, 2006.

SEZER, A.D.; HATIPOGLU, F.; CEVHER, E.; OGURTAN, Z.; BAS, A.L.; AKBUGA, J. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro / in vivo evaluation. **AAPS PHARMSCITECH**, Istanbul v.8, n.2, maio. 2007.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, Campinas, v.29, n.4, p.776-785, 2006.

SILVA, L.A.F.; GARCIA, A.M.; FRANCO, L.G.; ARAÚJO, I.F.L.; SOUZA, M.A.; SOUSA, J.N.; SEVERINO, S.R. Utilização do extrato da casca de barbatimão em cicatrização de feridas em éguas em comparação com outros tratamentos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 32., 2005, Uberlândia. **Anais eletrônicos...** [CD-ROM], Uberlândia: GT5, 2005.

SOUZA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.17, n.1, jan./mar. 2007.

STASHAK, T.S. **Equine Wound Management**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1999. 236p.

TEIXEIRA, V.P.A.; PEREIRA, S.A.L.; RODRIGUES, D.B.R.; LINO JÚNIOR, R.S.; OLIVEIRA, F.A.; CASTRO, E.C.C.; REIS, M.A. **Textos didáticos**: Técnicas de morfometria – princípios básicos e aplicações da morfometria. In: FACULDADE DE MEDICINA DO TRIÂNGULO MINEIRO - UFTM. *Webmaster* REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.P.A.; REZENDE, R.S.R.; ANTUNES, M.P. Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2005. Disponível em: <http://www.uftm.edu.br/instpub/fmtm/patge/morfometria01.htm> Acesso em: 30 ago. 2009.

TEMPLETON, G.S. **Cria Del Conejo Domestico**. México: Companhia Editorial Continental S.A. 1996. 255p.

TYRONE, J.W.; MARCUS, J.R.; BONOMO, S.R. Transforming growth factor β_3 promotes fascial wound healing in a new animal model. **Archives of Surgery**, Chicago, v.135, n.10, p.1154-1159, 2000.

UCHÔA, G.S. **Tratamento de feridas e técnicas de curativos em pequenos animais**. São Paulo: Departamento de Enfermagem da Universidade de São Paulo, 2005. 38p. [Apostila].

WESKA, R.F.; MOURA, J.M.; RIZZI, J.; PINTO, L.A.A. Obtenção de quitosana a partir de carapaças de siri. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v.1, n.1, p.48-52, 2007.

YOSOF, N.L.B.M.; LIM, L.Y.; KHOR, E. Preparation and characterization of chitin beads as a wound dressing precursor. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B . Applied biomaterials**, Hoboken, v.54, p.59-68, 2001.

ZAMPROGNA, M.A. **Tecido conjuntivo**. [online]. 2009. Disponível em: http://www.medstudents.com.br/content/resumos/resumo_medstudents_20050920_05.doc. Acesso em 15 jan. 2010

CAPÍTULO 2 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E MORFOMÉTRICAS DE FERIDAS CUTÂNEAS EM COELHOS TRATADAS COM CREME DE BARBATIMÃO E QUITOSANA

RESUMO

A pele, maior órgão do corpo, reveste quase a totalidade da superfície corpórea e desempenha uma série de funções primordiais para a manutenção da fisiologia animal. Quando um dano compromete a continuidade desse tecido, desencadeia-se o processo de cicatrização, que pode ser definido como um fenômeno biológico complexo, sistemático e organizado, em que o organismo recruta grupos celulares, mediadores bioquímicos e fatores de crescimento a fim de restabelecer a integridade tecidual. Em muitas situações é necessário empregar coadjuvantes da reparação tecidual. O presente estudo foi desenvolvido para avaliar a ação de duas formulações tópicas, à base de quitosana e extrato aquoso do barbatimão, respectivamente, aplicadas após antissepsia das lesões com solução de cloreto de sódio a 0,9%, frente à cicatrização de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em coelhos, por meio das avaliações clínica e do percentual de retração centrípeta das lesões. Concluiu-se que embora os cremes de alantoína e base possam ter exercido influência na cicatrização, os resultados apontaram que os cremes à base do fitoterápico barbatimão e do biomaterial quitosana, dado as características clínicas e morfométricas, anteciparam a resolução do processo e conferiram melhor aspecto das cicatrizes.

Palavra-chave: Animal de laboratório, biomaterial, fitoterapia, lagomorfo, planimetria, reparação tecidual, tanino.

CHAPTER 2 – MORPHOMETRIC AND CLINICAL FEATURES OF SKIN WOUNDS IN RABBITS TREATED WITH CREAM BARBATIMAN AND CHITOSAN

ABSTRACT

Skin, the body's largest organ, covers almost the entire body surface and performs a number of essential functions for the maintenance of animal physiology. When damage endangers this tissue's integrity, the healing process initiates, which can be defined as a complex biological phenomenon, systematic and organized, in which the organism recruits cell groups, biochemical mediators and growth factors to restore the tissue integrity. In many situations it is necessary to use a coadjuvant of the tissue repair. This study was designed to evaluate the effects of two topical formulations, chitosan and aqueous barbatiman extract based, respectively, applied after antiseptics the injuries with 0.9% sodium chloride solution, compared to the healing of skin wounds experimentally induced in rabbits by clinical and the percentage of centripetal retraction of the lesions evaluations. It was concluded that, although allantoin and neutral creams may have influenced the healing process, the results showed that the barbatiman phytotherapeutic and chitosan biomaterial based creams, given the clinical and morphometric characteristics, anticipated the process resolution and gave better aspect to the scars.

Keywords: Laboratory animal, biomaterial, phytotherapy, lagomorph, planimetry, tissue repair, tannin.

INTRODUÇÃO

A pele é de importância essencial para o organismo, pois além de ser o maior órgão possui função primordial de revestimento, recobrando quase a totalidade da superfície corpórea. Além desse aspecto, desempenha uma série de outras funções essenciais para a manutenção da fisiologia animal (BEER, et al., 2000). Em caso de rompimento na integridade tissular, desencadeia-se o

processo de cicatrização, que pode ser definido como fenômeno biológico complexo, sistemático e organizado, em que o organismo recruta grupos celulares, mediadores bioquímicos e fatores de crescimento, visando o restabelecimento morfofuncional do tecido comprometido (ACKERMANN, 2007).

O processo cicatricial ocorre em três fases, sendo a primeira denominada fase inflamatória, caracterizada pelos eventos iniciais de vasoconstrição e formação de coágulo sanguíneo, seguidos por vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia leucocitária (BALBINO et al., 2005). A fase proliferativa é marcada pelo predomínio do tecido de granulação e caracteriza-se por processos intrincados de fibroplasia, angiogênese e reepitelização (KUMAR et al., 2005). E a fase final, descrita como fase de remodelação, observa-se organização da malha colágena, marcada por etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno e consequente aumento da resistência tecidual (HOSGOOD, 2006).

Uma gama de recursos, desenvolvidos para atuar em diferentes tipos de danos teciduais, são descritos na literatura com a finalidade de otimizar a dinâmica cicatricial (LEE et al., 2009). Dentre as alternativas estudadas nas diversas áreas do conhecimento destaca-se a utilização dos fitoterápicos (LIMA et al., 2009a), citocinas inflamatórias e fatores de crescimento (BARRIENTOS et al., 2008), bioengenharia tecidual (BERETTA et al., 2009), biomateriais (LIMA et al., 2009b; RABELO, 2009) e medicina regenerativa envolvendo utilização de células-tronco adultas (McFARLIN et al., 2006).

Dos métodos propostos, a molécula de quitosana e o fitoterápico barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville] merecem destaque. Ambos são apontados como alternativas eficientes e viáveis economicamente para auxiliar no processo de cicatrização de feridas em diversas espécies animais, bem como em seres humanos (LOPES et al., 2005; SEZER et al., 2007). A quitosana é um biopolímero obtido a partir da hidrólise alcalina da quitina. Apresenta valiosas características biológicas e em relação ao processo cicatricial destaca-se por sua propriedade imunomoduladora, relacionada a capacidade de ativar basicamente macrófagos, acelerando a dinâmica do processo cicatricial, bem como atuando na biodegradabilidade desse polímero (INPI, 2000). O barbatimão, leguminosa arbórea nativa e abundante do cerrado brasileiro, possui como princípio ativo de maior expressão, o tanino, composto fenólico com ação

adstringente que promove precipitação de proteínas em tecidos lesados. Tal característica confere a este fitoterápico função de revestimento protetor, minimizando permeabilidade e exsudação da ferida, com consequente influência na cicatrização. No entanto, o uso desse fitoterápico ainda está associado às crenças populares e muitas indagações são alvo de especulações científicas, sugerindo pesquisas adicionais (SILVA et al., 2006).

Para acompanhar sistematicamente a evolução clínica do processo cicatricial, diferentes métodos têm sido propostos, como a avaliação clínica e morfométrica. A avaliação morfométrica, também conhecida como planimétrica, é empregada com finalidade de obtenção do percentual de retração centrípeta das lesões cutâneas durante a evolução do processo cicatricial (CARDINAL et al., 2009). Os dados obtidos nesta avaliação em consonância com os observados durante a avaliação clínica conferem maior credibilidade aos resultados (HOSGOOD, 2006). Embora a associação entre os dois métodos de avaliação já tenha sido motivo de estudos científicos (OLIVEIRA et al., 2000), ainda existem questionamentos sobre a ação tópica de cremes enriquecidos com quitosana ou extrato aquoso do barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em coelhos.

Objetivou-se nesse estudo avaliar as características clínicas e morfométricas de feridas cutâneas incisionais em coelhos tratadas com creme de barbatimão e quitosana a 5%, após antissepsia do sítio das lesões com solução de cloreto de sódio a 0,9%.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (EV/UFG), entre os meses de abril de 2008 a junho de 2009, após apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, protocolado sob o número 39/2008, sendo desenvolvido em quatro etapas experimentais.

Na primeira etapa, o extrato aquoso de barbatimão foi processado e padronizado no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFG (LPPN/FF/UFG), tendo como fonte de matéria prima cascas

obtidas de árvores adultas. Após colheita, o material botânico foi submetido à secagem em temperatura ambiente, seguida da retirada total de umidade em estufa sob temperatura de 70°C, por 24 horas. Posteriormente, as cascas foram processadas em moinho elétrico (Tecnal TE-650[®], São Paulo-SP), reservando-se 30 gramas do pó adquirido. O material foi acondicionado em béquer e homogeneizado em 900mL de água destilada efetuando-se decocção a uma temperatura de 70°C, por duas horas. O extrato bruto foi concentrado em evaporador rotativo (Fisaton 802[®], São Paulo-SP) e a concentração foi calculada em g/mL. Em três béqueres de massa determinada, adicionaram-se dois mililitros do extrato que em seguida foi colocado em estufa de secagem a 105°C por três horas. As massas das amostras foram determinadas em balança analítica digital (AL-200[®], São Paulo-SP), sendo que a média aritmética dos pesos dos béqueres correspondeu ao peso do extrato seco de barbatimão. Seqüencialmente, efetuou-se o doseamento dos princípios ativos do extrato, taninos e fenóis totais, seguindo o método proposto por Hagerman & Butler (MOLE & WATERMAN, 1987a; MOLE & WATERMAN, 1987b), obtendo-se 20% de taninos e 50% de fenóis totais. Finalizado o processo, o extrato foi armazenado em frascos esterilizados e encaminhado para o Laboratório de Bases da Farmogral (Farmogral Farmácia de Manipulação, Brasília-DF), para realização de testes de controle da qualidade, incluindo avaliação microbiológica e caracteres organolépticos do extrato.

A segunda etapa constou da formulação dos cremes, no Laboratório de Uso Externo da Farmogral, sob a supervisão de farmacêuticos especialistas. Foram preparadas quatro formulações, constando de creme de quitosana a 5%, creme de barbatimão a 5%, creme de alantoína a 0,2%, reservando-se uma parte do creme veículo sem adição de princípios ativos. O creme de barbatimão foi manipulado a partir do extrato aquoso padronizado na primeira etapa. Após cálculo das quantidades dos componentes das formulações, efetuou-se a homogeneização dos constituintes para incorporação dos princípios ativos ao veículo. Como se tratava de um derivado da carapaça de crustáceos, o pó da quitosana possuía aspecto áspero o que limitava ou mesmo impedia completa homogeneização. Dessa forma, antecedendo a incorporação da quitosana ao veículo preconizado foi necessário efetuar o procedimento de levigação do pó dessa matéria prima. Após preparo, as formulações foram submetidas a testes

para controle da qualidade, sendo finalmente acondicionadas em frascos plásticos identificados e esterilizados, para utilização nas etapas seguintes.

Na terceira etapa procedeu-se um estudo para avaliar a ação medicamentosa das formulações. Foram utilizados 40 coelhos adultos, raça Nova Zelândia, machos, com 1.800 ± 500 g de peso corporal, adquiridos de criatórios especializados. Os animais foram alocados em biotério climatizado, temperatura média de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, mantidos em gaiolas individuais, recebendo água à vontade e ração específica para a espécie (Ração Cria Coelhos Manutenção - Guabi[®] Nutrição Animal, Anápolis - GO), proporcionando condições de conforto e bem estar animal. Antecedendo o início dos estudos, os coelhos passaram por um período de adaptação de 15 dias, visando adequação às condições experimentais. Para minimizar o estresse e desconforto das unidades experimentais, o manejo do biotério e manipulação dos animais durante toda a etapa experimental foi efetuado por uma equipe previamente treinada, com o mínimo de indivíduos e em horário específico.

Previamente à indução das feridas cutâneas, cada unidade experimental foi submetida a exame clínico completo e colheita de sangue venoso da veia auricular para realização de hemograma, com o objetivo de certificar sua condição de higidez. Paralelamente, efetuou-se a vermifugação com 0,2mg/kg de Ivermectina a 1% por via subcutânea (Puritec Gold - Vetbrands. – Grupo Ceva Sant Animale - São Paulo/SP).

O pré-operatório constou de ampla tricotomia da região dorsal dos animais e pré-anestesia com 1,0mg de cloridrato de xilazina a 2% (CALMIUN[®] - Agener União Saúde Animal S.A – São Paulo, Brasil), associado a 1,0mg/kg de sulfato de morfina a 1% (DIMORF[®] - Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA – São Paulo, Brasil), por via intramuscular (IM). Transcorridos 15 minutos da medicação efetuou-se cateterização da veia auricular com cateter intravenoso 24G (BD Insyte[™] Autoguard[™] – BD – São Paulo, Brasil) e indução anestésica com 10mg/kg de propofol a 1% (PROPOVAN[®]- Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA – São Paulo, Brasil), sendo os animais intubados e mantidos sob anestesia inalatória com isoflurano (ISOFLUORANO[®]- Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA – São Paulo, Brasil) e oxigênio a 100%, na taxa de 40mL/Kg de volume corrente.

No trans-operatório, após antissepsia com clorexidine tópico (Clorexidine Tópico - Farmogral - Brasília/DF) foram induzidas cirurgicamente quatro feridas cutâneas em regiões específicas do dorso dos animais empregando *punch* circular metálico de um centímetro de diâmetro, previamente autoclavado, deixando exposta a aponeurose da musculatura dorsal (Figura 1).

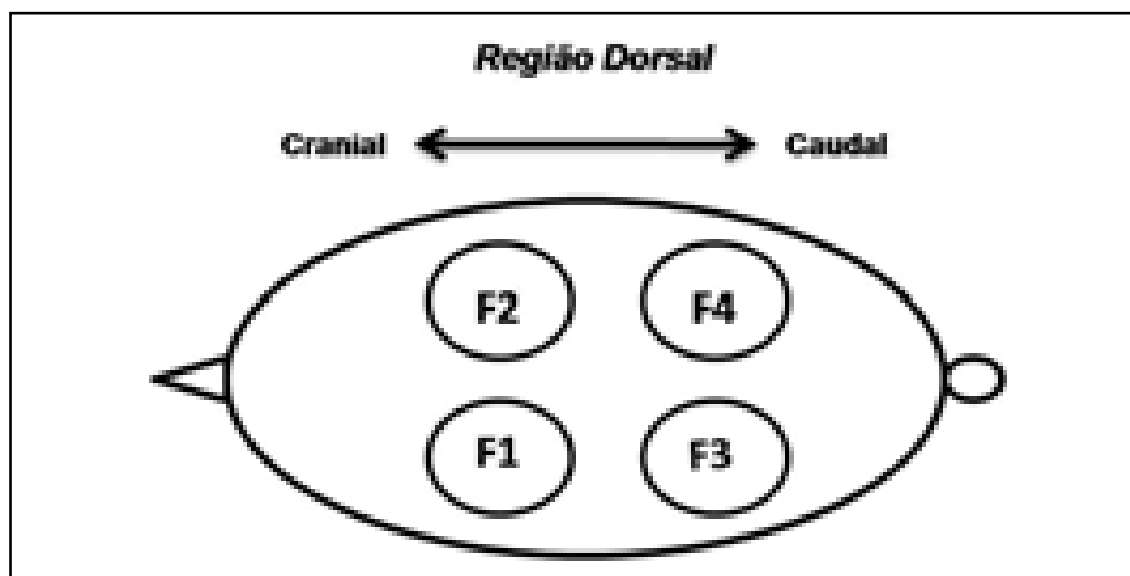


FIGURA 1 - Feridas cutâneas induzidas cirurgicamente na região dorsal de coelhos. De acordo com a localização anatômica as feridas foram denominadas de F1 – ferida paramedial cranial esquerda, F2 – ferida paramedial cranial direita, F3 – ferida paramedial caudal esquerda e F4 – ferida paramedial caudal direita.

Imediatamente após a indução das feridas incisionais efetuou-se a medição da área total de cada lesão, empregando-se paquímetro como instrumental de precisão. Na sequência, os coelhos foram transferidos para um dispositivo de captura de imagens para registro fotográfico das lesões com câmera digital modelo mvc FD 97 FD (Mavyca – Sony), posicionada em tripé e mantida a uma distância constante de 27cm da ferida. Os dados foram armazenados e utilizados posteriormente por ocasião das avaliações morfométricas das lesões.

Durante o pós-operatório, os animais foram novamente encaminhados ao biotério e mantidos em gaiolas individuais, com colar de contenção elizabetano, a fim de minimizar os efeitos indesejáveis provocados por auto-mutilação e lambedura, que poderiam resultar em contaminação da ferida ou remoção da medicação tópica aplicada. O controle da dor foi efetuado com 1mg/kg de

cloridrato de tramadol por via subcutânea, (Tramal - Laboratórios Pfizer LTDA - São Paulo), durante três dias consecutivos. Antecedendo a terapia tópica, efetuou-se higienização das feridas com solução de cloreto de sódio a 0,9%, instilada sobre a lesão com auxílio de agulha calibre 25x8 acoplada a seringa hipodérmica de 20mL. Essa manobra proporcionou pressão aproximada suficiente para limpar a superfície da lesão (MARTINS, 2000).

As feridas receberam tratamento tópico diário compreendendo o período total de estudo de 21 dias, sendo que, cada lesão de cada animal recebeu um tratamento tópico específico. Dessa forma, as unidades experimentais foram distribuídas em dois grupos de 20 animais, sendo estes identificados como grupo quitosana (GQ-A) e grupo barbatimão (GB-B). Sequencialmente, cada grupo (GQ-A e GB-B) foi distribuído em quatro subgrupos, que corresponderam aos tratamentos instituídos para cada lesão. Para o GQ-A as feridas foram distribuídas nos subgrupos, creme de quitosana a 5% (CQ-A), creme de alantoína a 0,2% (CA-A), creme base (CN-A) e solução de cloreto de sódio a 0,9%, para feridas em que foi realizado procedimento de antisepsia sem adoção de terapia tópica associada (SF-A). Para o GB-B as feridas foram distribuídas nos subgrupos creme de barbatimão a 5% (CB-B), creme de alantoína a 0,2% (CA-B), creme base (CN-B) e solução de cloreto de sódio a 0,9% (SF-B). Os subgrupos CA-A e CA-B foram considerados controles positivos, dada a consagrada ação da alantoína frente ao processo cicatricial (NETO, 2005). Já os subgrupos CN e SF de ambos os grupos compuseram os controles negativos tanto no GQ quanto no GB. Acrescente-se que a aplicação dos medicamentos foi efetuada com espátulas descartáveis.

A análise da evolução do processo cicatricial constituiu a quarta etapa da pesquisa e constou de avaliações clínicas e morfométricas das lesões. A evolução macroscópica da cicatrização foi acompanhada mediante exame clínico diário dos animais e observação dos aspectos gerais das feridas. Para efeitos de avaliação macroscópica foram considerados os parâmetros hiperemia, hemorragia, secreção, crostas e reepitelização. Os resultados foram classificados como ausente ou presente, sendo que para crostas e reepitelização estes foram considerados como ausente, parcial e total e registrados em fichas individuais.

Para as análises morfométricas foram considerados os períodos de três, sete, 14 e 21 dias. O Quadro 1 resume os grupos e subgrupos do estudo,

bem como o número de unidades experimentais avaliadas em cada período estabelecido para as análises morfométricas.

QUADRO 1 – Delineamento experimental para análise morfométrica da cicatrização de feridas cutâneas em coelhos, em pesquisa desenvolvida na Escola de Veterinária, entre os meses de abril de 2008 a junho de 2009.

Momentos	Grupo Qitosana (GQ-A) (n= 20)				Grupo Barbatimão (GB-B) (n=20)			
	Subgrupos/ número de animais				Subgrupos/número de animais			
	CQ-A	CA-A	CN-A	SF-A	CB-B	CA-B	CN-B	SF-B
Dia 03	5	5	5	5	5	5	5	5
Dia 07	5	5	5	5	5	5	5	5
Dia 14	5	5	5	5	5	5	5	5
Dia 21	5	5	5	5	5	5	5	5

Para proceder à análise morfométrica, nos dias previamente estabelecidos os animais foram submetidos à reintervenção anestésica com protocolo idêntico ao adotado para indução das feridas incisionais. Após efetuar a paquimetria os animais foram novamente colocados no dispositivo de captura de imagens, em posição constante, com a câmera mantida a distância previamente padronizada, efetuando-se novo registro fotográfico das lesões. As imagens foram digitalizadas em microcomputador e transferidas para o *software Image J 1.3.1* (NIH, Estados Unidos), procedendo-se a mensuração da área total das feridas. O percentual de contração de cada lesão foi calculado utilizando modelo matemático proposto por OLIVEIRA et al. (2000): $\frac{\text{área final} - \text{área inicial}}{\text{área inicial}} \times 100$.

área inicial.

Os resultados das avaliações clínicas foram analisados descritivamente, enquanto que, para as análises morfométricas os resultados foram submetidos a tratamento estatístico empregando o teste de U de Mann Whitney. Para realização desse teste utilizou-se o programa GraphPad InStat (Version 3.05 for Windows), considerando um nível de significância de 5% (SAMPAIO, 1998).

RESULTADOS

A avaliação macroscópica efetuada diariamente, para fins de estadiamento, propiciou acompanhamento sistemático dos eventos cicatriciais e criou condições para validar os protocolos terapêuticos testados. Devido a semelhança dos dados obtidos para CA-A e CA-B, CN-A e CN-B, SF-A e SF-B, na tabulação os resultados foram agrupados passando estes a compor apenas os subgrupos CA, CN e SF, estando os resultados apresentados no Quadro 2.

QUADRO 2 - Eventos macroscópicos hemorragia, hiperemia, secreção e reepitelização avaliados por 21 dias em feridas cutâneas incisionais em coelhos após tratamento com creme de barbatimão a 5% (CB), creme de quitosana a 5% (CQ), creme de alantoína a 0,2% (CA), creme base (CN) e solução de cloreto de sódio a 0,9% (SF).

T	Momentos de avaliação em dias/Parâmetros analisados																				
	Hemorragia																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
CB	p	p	p	p	p	p	p	p	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
CQ	p	p	p	p	p	p	p	p	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
CA	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p
CN	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p
SF	p	p	p	p	p	p	p	p	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	Hiperemia																				
CB	p	p	p	p	p	p	p	p	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
CQ	p	p	p	p	p	p	p	p	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
CA	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p
CN	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p
SF	p	p	p	p	p	p	p	p	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	Secreção																				
CB	p	p	p	p	p	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
CQ	p	p	p	p	p	p	p	p	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
CA	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p
CN	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p
SF	p	p	p	p	p	p	p	p	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
	Reepitelização																				
CB	a	a	a	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	t	t	t	t	t
CQ	a	a	a	a	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	t	t	t
CA	a	a	a	a	a	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	t
CN	a	a	a	a	a	a	a	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	t
SF	a	a	a	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	t	t	t	t

T – tratamento; a – ausente; p – presente; r – parcial; t - total

Verificou-se que crosta esteve presente a partir do terceiro dia no subgrupo SF, enquanto que para os demais, estas começaram a se formar ao segundo dia. Notou-se que as mesmas destacavam-se completamente após resolução do processo, em média aos 18 dias de tratamento. Apesar dos aspectos benéficos proporcionado pelas crostas, observou-se que sua presença dificultou a avaliação macroscópica e o contato do medicamento com a lesão. Mesmo diante dessas intercorrências a remoção das crostas foi conduta preterida nesse estudo por acreditar que sua remoção poderia desencadear traumatismos e hemorragia no epitélio recém-sintetizado, interferindo na dinâmica do processo cicatricial. Acrescente-se que especialmente em uma ferida do subgrupo CN associado a presença de crostas identificou-se presença de secreção mucopurulenta, associada a aumento de volume circunscrito e sensibilidade acentuada (Figura 2).

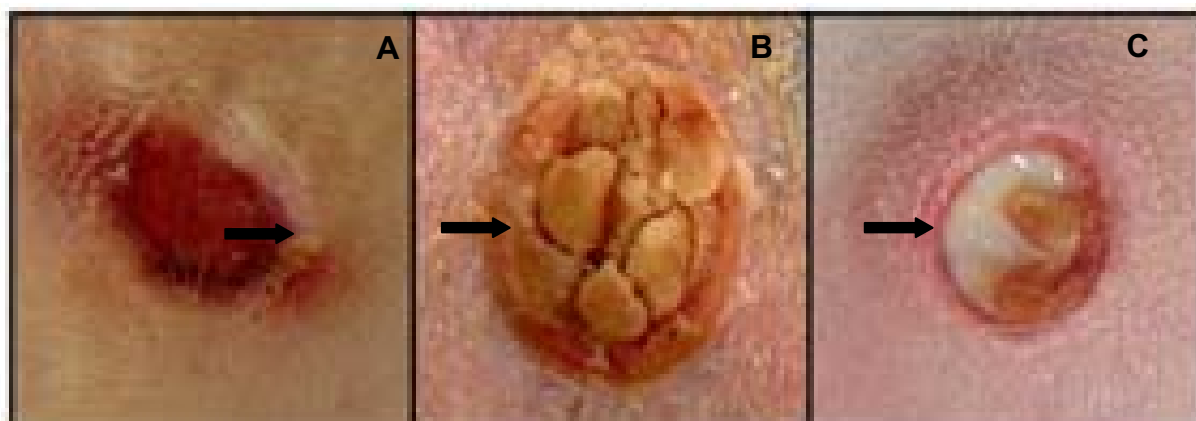


FIGURA 2 – Aspectos macroscópicos de feridas cutâneas incisionais em coelhos, no sétimo de avaliação clínica. As setas indicam, em A e B, presença de crostas, discreta e exuberante, respectivamente. Em C, secreção mucopurulenta.

A análise morfométrica para obtenção do percentual de contração das feridas durante a evolução do processo cicatricial mostrou ser um método eficiente e de fácil aplicabilidade. Os resultados obtidos nessa análise indicaram que os tratamentos com CB, CQ e SF proporcionaram maior percentual de contração em relação aos CA e CN em diferentes momentos. A análise sugeriu também que a retração, independente do protocolo instituído, ocorreu de forma mais acentuada entre os sétimo e 14^o dias de avaliação.

A Tabela 1 demonstra os resultados da análise comparativa do percentual de contração das feridas entre os cremes de quitosana e barbatimão, bem como entre estes e os demais tratamentos nos diferentes momentos preconizados.

TABELA 1 – Percentual de contração de feridas incisionais em coelhos tratadas com creme de quitosana a 5% (CQ), creme de barbatimão a 5% (CB), creme de alantoína a 0,2% (CA), creme base (CN) e solução de cloreto de sódio a 0,9% (SF), nos dias três, sete, 14 e 21, durante experimento realizado na Escola de Veterinária/UFG, entre abril de 2008 e junho de 2009.

PERCENTUAL DE CONTRAÇÃO/TRATAMENTOS					
Momentos	CQ	CB	CA	CN	SF
Dia 3	13,4 ^a	26,5 ^a	0 ^b	0 ^b	32,5 ^a
Dia 7	37,8 ^a	53,4 ^a	18,3 ^b	1,4 ^b	50,6 ^a
Dia 14	91,6 ^a	93,6 ^a	91,2 ^a	77,5 ^a	98,0 ^a
Dia 21	100,0 ^a	100,0 ^a	98,1 ^a	96,1 ^a	100,0 ^a

Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo teste U-Mann Whitney ($p < 0,05$).

Ao efetuar a comparação dos subgrupos CA e CN em relação aos subgrupos CB e CQ observou-se diferença significativa no terceiro e sétimo dias de avaliação. Todavia, essas diferenças não foram notadas quando se comparou os cremes testes com SF. Os CB e CQ também não diferiram entre si ($p > 0,05$) em nenhum momento considerado (Figura 3).

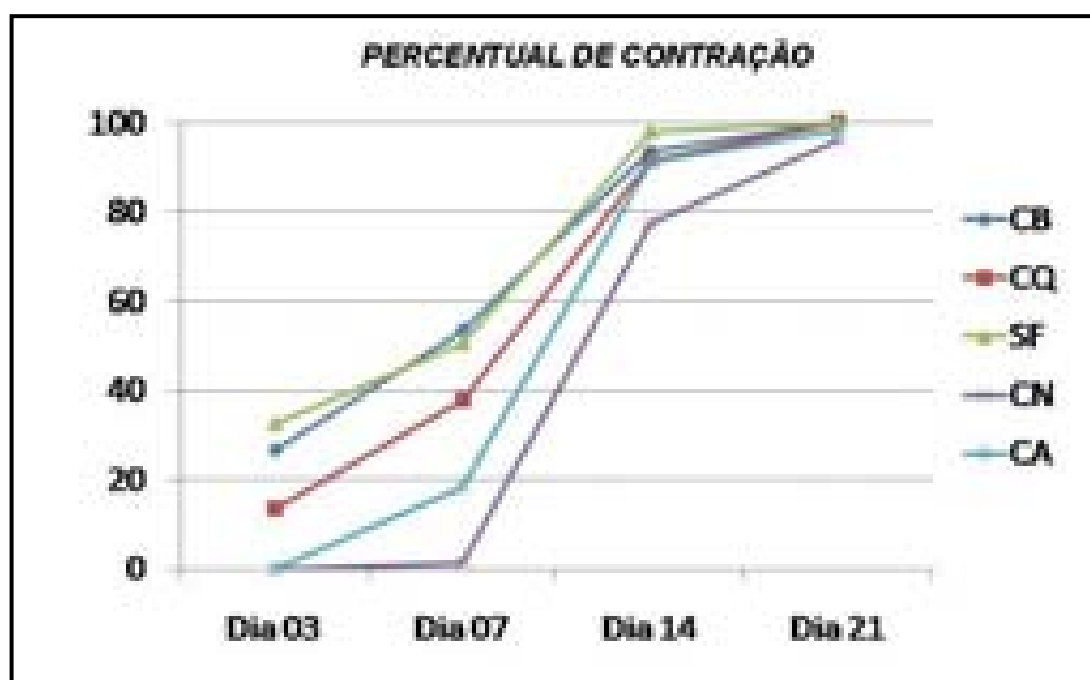


FIGURA 3 – Percentual de contração centripeta dos subgrupos CB, CQ, CA, CN e SF, nos dias três, sete, 14 e 21 dias.

DISCUSSÃO

A uniformização dos coelhos com atenção especial para o sexo, idade, origem e bem estar animal mostraram-se fundamentais para o sucesso do estudo. Particularmente, a seleção de animais do sexo masculino e as condições ambientais favoráveis podem ter minimizado respectivamente a influência dos hormônios femininos e do cortisol na reparação das feridas. MARTINS et al. (2006) e STEVENSON et al. (2008) também apontaram a exclusão desses fatores como medidas essenciais no estudo da cicatrização e mencionaram que os hormônios sexuais femininos e o cortisol interferem na dinâmica cicatricial.

O protocolo anestésico empregado na pesquisa permitiu que os procedimentos fossem efetuados sem que os animais demonstrassem sinais de desconforto ou sensação dolorosa, sendo esta conduta respaldada nas citações de FLECKNELL (1996) e TRANQUILLI et al. (2007). O emprego do cloridrato de tramadol no pós-operatório mostrou ser uma conduta eficiente, pois além de minimizar a sensação dolorosa e o estresse, não foi descrita, na literatura consultada, interferência desse opióide na evolução da cicatrização.

Apesar do comportamento de inquietude inerente a ordem lagomorfa, observou-se que a adoção do colar elizabetano impediu a auto-mutilação e a lambedura da ferida. Tal conduta contribuiu para que a medicação permanecesse maior tempo em contato com a lesão com ação contínua e duradoura dos protocolos terapêuticos instituídos. Essa preocupação também foi manifestada por MARTINS et al. (2003) salientando que o uso do colar impede a remoção dos agentes aplicados sobre a ferida, bem como a remoção das crostas. A antissepsia das lesões e a utilização de espátulas descartáveis para aplicação dos cremes, também foram consideradas medidas de fácil execução, baixo custo e que minimizaram os riscos de contaminação iatrogênica. Acrescente-se que essa conduta possibilitou a padronização da quantidade de produto aplicado, concordando com os relatos de VIEIRA et al. (2008).

Os parâmetros adotados para as observações clínicas conferiram subsídios para a caracterização macroscópica dos episódios observados em cada fase do processo cicatricial e em qual variável cada tratamento atuou de forma mais efetiva. NETO et al. (2006) e VIEIRA et al. (2008) apontaram a necessidade de acompanhar diariamente a evolução do processo cicatricial para fins de

estadiamento das lesões e instauração de protocolo terapêutico apropriado, logo concordando com a conduta adotada nessa pesquisa.

Independente do protocolo terapêutico instituído, presença de hiperemia e hemorragia nos primeiros dias pós-indução das feridas sugeriram que episódios celulares e bioquímicos compatíveis com os da fase inflamatória foram desencadeados, traduzindo os eventos do aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade capilar e extravasamento de plasma para o local da lesão. Resultados semelhantes foram descritos por PERANTEAU et al. (2008), como sinais clínicos predominantes na fase inflamatória do processo cicatricial.

Notou-se que as feridas dos subgrupos CB, CQ e SF apresentaram resolução precoce desses parâmetros quando comparados aos demais tratamentos. Esses achados legitimaram os descritos por EURIDES et al. (1996) e MARTINS et al. (2003) que utilizaram solução aquosa de barbatimão e solução de cloreto de sódio a 0,9% no tratamento de feridas, sugerindo que esses protocolos contribuíram com a resolução precoce do processo inflamatório. Apesar de não utilizarem a quitosana sob a forma de creme, SILVA et al. (2006) citaram que a utilização da quitosana sob a forma de membrana reduziu a hiperemia das lesões a partir de sete dias, também concordando com os resultados desse estudo.

Em contrapartida, presença de hemorragia, hiperemia e secreção foi descrita até o final do estudo em feridas tratadas com CA e CN. A constância desses sinais indica ação irritativa desses tratamentos prejudicando a evolução do processo de reparação tecidual. Apesar de não fazerem referência ao CA como princípio ativo, MARTINS et al. (2003) também apontaram que o contato direto do creme base sobre a lesão pode desencadear reação irritativa semelhante ao achado neste estudo, mas não apontaram as possíveis causas da intercorrência.

Presença de secreção também foi um achado que se manifestou de forma mais expressiva na etapa inicial da cicatrização. Entretanto, a partir do sexto dia não houve mais descrição de secreção em feridas tratadas com CB. Pondera-se que a resolução precoce desse sinal possa estar associada à ação adstringente implicada ao tanino, concordando com as informações descritas por EURIDES et al. (1996), os quais obtiveram resultados semelhantes utilizando este fitoterápico. Ainda sobre esse achado, acredita-se que a presença de secreção mucopurulenta em uma ferida do subgrupo CN possa estar associada a ocorrência de inflamação crônica desencadeada pela ação irritativa contínua do

creme com a lesão. De acordo com ACKERMANN (2007) quando o agente causador da inflamação não é removido o processo tende a se cronificar, concordando com os resultados obtidos nessa pesquisa.

Os resultados demonstraram que as crostas estiveram em maior quantidade na transição entre a fase inflamatória e proliferativa, estando de acordo com os resultados macroscópicos observados para a segunda fase do fenômeno cicatricial. De acordo com HOSGOOD (2006) e KIMURA et al. (2006) presença de crostas é considerada um achado comum da fase proliferativa, informação que reforça o argumento utilizado para justificar esse achado.

Apesar dos aspectos benéficos proporcionado pelas crostas, conferindo revestimento protetor e dificultando a penetração de agentes exógenos, observou-se que a presença das mesmas dificultou a avaliação macroscópica e o contato do medicamento com a lesão. Mesmo diante dessas intercorrências, remoção das crostas foi preterida nesse estudo, conforme preconizaram EURIDES et al. (1996). Entretanto discorda da conduta adotada por LOPES et al. (2005) os quais promoveram debridamento das lesões para remoção das crostas, a fim de facilitar a identificação dos achados clínicos, bem como a aplicação dos produtos.

Em relação ao parâmetro clínico de contração centrípeta, as feridas dos subgrupos CB e CQ apresentaram início e resolução do processo precoce quando comparados aos CA e CN. Portanto, esses achados sugerem que a ação exercida pelos CB e CQ favoreceu a dinâmica da reparação tecidual. De forma semelhante à encontrada nesse estudo, MARTINS et al. (2003) também verificaram que feridas tratadas com creme base apresentaram retardo na cicatrização quando comparadas às tratadas com creme terapêutico. Acrescente-se que apesar de pequenas as discrepâncias quanto ao período de resolução do processo cicatricial entre os diferentes tratamentos, ficou demonstrado que a antisepsia com solução de cloreto de sódio a 0,9% demonstrou ser um procedimento complementar associado ao coadjuvante do processo cicatricial. A adoção dessa prática também foi defendida por OLIVEIRA et al. (2000).

Os períodos pré-definidos para avaliação do percentual de contração das feridas foram embasados nos estudos de BALBINO et al. (2005) e VIEIRA et al. (2008), os quais mencionaram que os dias três, sete, 14 e 21 correspondem ao momento que melhor delimita cada fase do processo cicatricial. Os resultados da análise morfométrica apontaram menor percentual de retração centrípeta para os

CA e CN quando comparados aos demais tratamentos, sendo que nas análises dos dias três e sete essas diferenças foram estatisticamente significantes. Esses resultados concordam com MARTINS et al. (2003), que apesar de não utilizarem os mesmo tratamentos preconizados nesse estudo, também descreveram menor percentual de contração em feridas tratadas com creme base quando comparado aos demais protocolos terapêuticos. Em relação às feridas tratadas com SF infere-se que sua ação benéfica tenha se manifestado pela ausência de contaminação das feridas e desse modo a antissepsia efetuada previamente a adoção dos protocolos terapêuticos possa ter contribuído para que o processo de reparação cutânea evoluísse sem intercorrências, conforme descrito por VIEIRA et al. (2008).

Por último, argumenta-se que os resultados do presente estudo indicam que as atividades terapêuticas implicadas ao tanino e a quitosana contribuíram para que o processo de reparação tecidual evoluísse satisfatoriamente, ao longo dos períodos de avaliação estabelecidos. Ainda que a composição do CN possa ter mascarado, em parte, a expressão dos coadjuvantes do processo cicatricial empregados, não se pode negligenciar que o barbatimão e a quitosana exercem ação terapêutica frente ao processo de cicatrização. Recomenda-se que novos estudos empregando diferentes formulações e concentrações desses princípios ativos possam resultar em informações importantes sobre a ação exercida por esse fitoterápico e biopolímero frente ao processo de reparação tecidual.

CONCLUSÃO

As características clínicas e os resultados das análises morfométricas de feridas cutâneas em coelhos tratadas com creme de barbatimão e de quitosana a 5%, indicam que ambas as formulações terapêuticas atuam auxiliando na reparação tecidual, com menores intercorrências e retração centrípeta precoce das lesões, quando comparados aos cremes de alantoína e base.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Rações GUABI e AGENER.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, M.R. Acute inflammation. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic basis veterinary disease**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007. cap.3-4, p.101-191.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.41, n.1, p.27-51, 2005.
- BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M.S.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.16, p.585-601, 2008.
- BEER, H.D.; FASSLER, R.; WERNER, S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair. **Vitamins and Hormones**, New York, v.59, p.217-239, 2000.
- BERETTA, D.C.; EURIDES, D.; MORAES, J.R.E.; GUIMARÃES, E.C.; OLIVEIRA, W.S.; BELETTI, M.E. Efeitos da estimulação elétrica na cicatrização do tendão do músculo gastrocnêmio em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.10, n.3, p.879-886, 2009.
- CARDINAL, M.; EISENBUD, D.E.; ARMSTRONG, D.G. Wound shape geometry measurements correlate to eventual wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.17, p.173-178, 2009.
- EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; BELETTI, M.E.; SILVA, L.A.F.; FIORAVANTI, M.C.S.; NETO, N.S.T.; CAMPOS, V.A.; LEMAR, R.C.; JÚNIOR, P.L.S. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman Martius*). **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia de Uruguai**, Uruguai, v.2/3, n.1, p.37-42, 1996.
- FLECKNELL, P.A. **Laboratory animal anesthesia**. Califórnia: Elsevier, 1996. 269p.
- HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v.36, n.4, p.667-685, 2006.
- INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C. **Membrana de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações**. BR n. PI9805480-5a, 19 nov. 1998, 2000.
- KIMURA, Y.; SUMIYOSHI, M.; SAKANAKA, M. Effects of *Astilbe thunbergii* rhizomes on wound healing. Part. 1. Isolation of promotional effectors from *Astilbe thunbergii* rhizomes on burn wound healing. **Journal of Ethno-Pharmacology**, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Inflammation. In: ROBBINS & COTRAN. **Pathologic Basis of Disease**. 7.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. cap.2-3, p.47-118.

LEE, W.R.; PARK, J.H.; KIM, K.H.; KIM, S.J.; PARK, D.W. CHAE, M.H.; SUCH, S.H.; JEONG, S.W.; PARK, K.K. The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.17, p.505-510, 2009.

LIMA, C.R.O.; SILVA, L.A.F.; GOULART, D.S.; PERCIANO, C.B.; PARENTE, L.M.L.; FRANCO, L.G. Análise morfométrica da taxa de contração de feridas tratadas com extrato da casca de barbatimão a 5%. In: CONFERÊNCIA SUL-AMERICANA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 9., 2009, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos...** [CD-ROM], Rio de Janeiro, 2009a.

LIMA, C.R.O.; SILVA, L.A.F.; RABELO, R.E.; ORLANDO, C.F.P.; HELOU, J.B.; COELHO, C.M.M. Cicatrização de feridas cutâneas em coelhos tratadas com creme de quitosana a 5% - avaliação morfométrica. In: CONFERÊNCIA SUL-AMERICANA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 9., 2009, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos...** [CD-ROM], Rio de Janeiro, 2009b.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wound in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.99, n.2, p.256-272, 2005.

LUCINDA-SILVA, R.M.; EVANGELISTA, R.C. Polissacarídeos biodegradáveis úteis para a preparação de sistemas de liberação controlada de fármacos. Parte 1: quitosana. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, v.23, n.2, p.199-213, 2002.

MARTINS, N.L.P.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J.M.; HEIBEL, M.; BALDEZ, R.N.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, H.; MAZZA, M.; NASSIF, P.A.N.; WALLBACH, T.Z. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (Babaçu). Estudo comparativo em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.21, n.3, p.66-75, jun. 2006.

MARTINS, M.F.; MACEDO, C.F.A.M.; SÍRIO, O.J.; YIOMASA, M.M.; MIZUSAKI, C.I.; FIGUEIREDO, L.D.; PACHECO, P. Avaliação macro e microscópica da cicatrização de lesões experimentalmente provocadas em pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina fulica*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.40, n.3, p.213-218, 2003.

MARTINS, P.A.E. **Avaliação de três técnicas de limpeza do sítio cirúrgico infectado utilizando soro fisiológico para remoção de microrganismos**. 2000. 143f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

McFARLIN, K.; XIAOHUA, G.; LIU, Y.B.; DULCHAVSKY, D.S.; KWON, D.; ARBAB, A.S.; BANSAL, M.; LI, Y.; CHOPP, M.; DULCHAVSKY, S.A. GAUTAM, S.C. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.14, p.471-478, 2006.

MOLE, S. & WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, Berlin, v.72, p.137-147, 1987a.

MOLE, S. & WATERMAN, P.G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II. Techniques for biochemically defining tannins. **Oecologia**, Berlin, v.72, p.148-156, 1987b.

NETO, M.L.C.; FILHO, J.M.R.; MALAFAIA, O.; FILHO, M.A.O.; CZEEZKO, N.G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V.R.; TEIXEIRA, H.M.; AGUIAR, L.R.F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Maranhão, v.21, n.2, p.17-22, 2006.

NETO, N.M.A. **Tratamento tópico com mel, própolis em gel e creme a base de alantoína em feridas experimentalmente infectadas em coelhos**. 2005. 36f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

OLIVEIRA, S.T.; LEME, M.C.; PIPPI, N.L.; RAISER, A.G.; MANFRON, M.P. Formulações de Confrei (*Symphytum officinalis* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da Faculdade de Zootecnia e Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.7, n.1, p.61-65, 2000.

PERANTEAU, W.H.; ZHANG, L.; MUVARAK, N.; BADILLO, A.T.; RADU, A.; ZOLTICK, P.W.; LIECHTY, K.W. Il-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v.128, n.7, p.1852-1860, 2008.

RABELO, R.E. **Desvio Traumático de Pênis em Bovinos: aspectos epidemiológicos, morfofuncionais e tratamento cirúrgico empregando biomateriais**. 2009. 77f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, 1998. 221p.

SEZER, A.D.; HATIPOGLU, F.; CEVHER, E.; OGURTAN, Z.; BAS, A.L.; AKBUGA, J. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro / in vivo evaluation. **AAPS PHARMSCITECH**, Istanbul v.8, n.2, 2007.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, Campinas, v.29, n.4, p.776-785, 2006.

SOUZA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.17, n.1, 2007.

STEVENSON, S.; TAYLOR, A.H.; MESKIRI, A.; SHARPE, D.T.; THORNTON, J. Differing responses of human follicular and nonfollicular scalp cells in an in vitro wound healing assay: Effects of estrogen on vascular endothelial growth factor secretion. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.16, p.243-253, 2008.

TRANQUILLI, W.J.; THURMON, J.C.; GRIMM, K.A. **Lumb & Jones' Veterinary anesthesia and analgesia**, 4ed. New York: Blackwell Science, 2007. 1300p.

VIEIRA, A.P.; SANTOS, N.R.; BORGES, J.H.S.; VINCENZI, M.P.; SCHMITZ, W.O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e Saúde**, Londrina, v.29, n.01, p.65-74, 2008.

CAPÍTULO 3 - CREMES DE BARBATIMÃO A 5% E QUITOSANA A 5% COMO COADJUVANTES NA CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM COELHOS

RESUMO

O fenômeno biológico da cicatrização define uma série de eventos que visam restabelecer a morfofuncionalidade tecidual pós-injúria. É descrito em fases que são sequenciais e em alguns momentos sobrepostas, denominadas inflamatória, proliferativa e de remodelação colágena. Nesse trabalho avaliaram-se as alterações macroscópicas e microscópicas envolvidas na reparação de feridas cutâneas induzidas experimentalmente em coelhos e tratadas com cremes à base de quitosana e barbatimão a 5% e relacionaram-se os achados microscópicos aos episódios macroscópicos observados. Para avaliar a ação terapêutica dos tratamentos foram utilizados 40 coelhos, distribuídos em dois grupos de 20 animais, denominados grupo Quitosana (GQ-A) e grupo Barbatimão (GB-B), sendo estes subdivididos em quatro subgrupos de cinco animais. Para o GQ-A as feridas foram distribuídas nos subgrupos creme de quitosana a 5% (CQ-A), creme de alantoína a 0,2% (CA-A), creme base (CN-A) e solução de cloreto de sódio a 0,9% (SF-A). Para o GB-B as feridas foram distribuídas nos subgrupos de creme de barbatimão a 5% (CB-B), creme de alantoína a 0,2% (CA-B), creme base (CN) e solução de cloreto de sódio a 0,9% (SF-B). As feridas foram avaliadas por meio de exames clínicos diários e avaliação histológica nos dias três, sete, 14 e 21. Macroscopicamente as feridas de todos os grupos evoluíram em consonância à evolução microscópica do processo cicatricial nos diferentes momentos avaliados. Os cremes à base de quitosana e barbatimão a 5% contribuíram no processo de reparo tecidual da pele coelhos quando comparados aos demais tratamentos, uma vez que propiciaram ativação fibroblástica e deposição colágena precoce, além de modularem a neovascularização e a reepitelização, conferindo alternativas relevantes como coadjuvantes na cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas.

Palavra-chaves: Biomaterial, fitoterapia, lagomorfo, pele, reparação tecidual, tanino.

CHAPTER 3 – 5% BARBATIMAN AND 5% CHITOSAN CREAMS AS AN ADJUVANT IN SKIN WOUND HEALING BY SECOND INTENTION IN RABBITS

ABSTRACT

The biological phenomenon of healing defines a number of events that aim to restore the tissue morphofunctionality after injury. It is described in sequential stages that are, sometimes, overlapped, called inflammatory, proliferative and collagen remodeling. In this study evaluated the macroscopic and microscopic alterations involved in the repair of skin wounds induced experimentally in rabbits and treated with creams based on chitosan and barbatiman 5% and were related to the microscopic findings observed macroscopic events. To evaluate the therapeutic effects of treatments were 40 rabbits were assigned to two groups of 20 animals, called chitosan group (GQ-A) and barbatiman (GB-B), they are subdivided into four. For the GQ-A the wounds were divided into three subgroups, 5% chitosan cream (CQ-A), 0.2% allantoin cream (CA-A), base cream (CN-A) and 0.9% sodium chloride solution (SF-A). For the GB-B wounds were distributed in subgroups barbatiman cream 5% (CB-B), allantoin cream 0.2% (CA-B), base cream (CN) and 0.9% sodium chloride solution (SF-B). Macroscopically, the wounds of all groups have evolved in line to the microscopic evolution of the healing process at the different intervals. Creams based on chitosan and barbatiman 5% contributed to the process of tissue repair skin rabbits when compared to other treatments, which resulted as fibroblast activation and collagen deposition early, and modulate neovascularization and reepithelialization, providing relevant alternatives as supporting healing by secondary intention of skin wounds.

Keywords: Biomaterial, phytotherapy, lagomorph, skin, tissue repair, tannin.

INTRODUÇÃO

A cicatrização é um fenômeno biológico complexo, sistemático e organizado em resposta à dissolução da integridade tissular (BARBUL, 2006). O processo cicatricial é descrito nas fases inflamatória, proliferativa e de

remodelação colágena, que correspondem aos episódios observados em um determinado período de tempo (ACKERMANN, 2007). No entanto, em diversos momentos, os eventos de cada etapa se sobrepõem, tornando-se impraticável determinar as fases em períodos precisos. Esse dinamismo de sobreposição também é considerado fator que contribui para a evolução regular da cicatrização (KUMMAR et al., 2005). Imediatamente após o dano tecidual, compostos vasoativos, atividade plaquetária e cascata de coagulação medeiam uma vasoconstrição reflexa, visando minimizar a perda sanguínea para o espaço extravascular, bem como a formação de uma matriz extracelular provisória para a organização da arquitetura da lesão (BALBINO et al., 2005).

Na sequência, a ativação plaquetária torna-se responsável pela liberação de mediadores químicos que promovem vasodilatação e quimiotaxia leucocitária para o sítio da lesão, caracterizando a fase inflamatória, que perdura por três a dez dias (KUMAR et al., 2005; ACKERMANN, 2007). Os neutrófilos povoam o sítio da lesão e são responsáveis pela remoção de debris celulares e fagocitose de microrganismos. Devido à meia-vida curta, após o segundo dia essas células são gradativamente substituídas por monócitos, que se transformam em macrófagos na ferida (BEER et al., 2000). Os macrófagos desempenham papel crucial devido à capacidade fagocítica, além de atuarem como células apresentadoras de antígenos, fonte de fatores de crescimento e mediadores químicos que ditam e sustentam o processo de cicatrização. A presença de macrófagos, fibroblastos, ocorrência de neovascularização e reepitelização caracterizam a fase proliferativa que se estende até o 14º dia (BARBUL, 2006).

Os fibroblastos ativados sintetizam colágeno e, dessa forma, a matriz extracelular provisória começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais resistente e elástico. Ocorre também aumento no número de mitoses, formação de tecido de granulação e intensa contração centrípeta da ferida (SAHOTA et al., 2004; BALBINO et al., 2005). Na fase final do processo ocorre intensa remodelação da malha colágena, marcada por etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas, e conseqüente aumento da resistência tecidual (HOSGOOD, 2006). A dimensão e a localização anatômica da pele a tornam permanentemente susceptível a ação de agentes lesivos que rompem e danificam sua arquitetura, incitando o desencadeamento do processo cicatricial (ACKERMANN, 2007). No entanto, muitas vezes o organismo não está apto a

responder ao insulto, havendo a necessidade do auxílio dos coadjuvantes do processo cicatricial (BARBUL, 2006).

Neste sentido, inúmeras pesquisas são descritas com a finalidade de otimizar a dinâmica cicatricial (LEE et al., 2009). Dentre os métodos propostos, a quitosana (AFZALETDINOVA et al., 2000) e o barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville] (GILBERT, 2005) merecem ênfase, pois além de atuarem sistematicamente frente ao processo cicatricial, são consideradas alternativas economicamente viáveis. A molécula de quitosana, obtida a partir da desacetilação da quitina, possui características biológicas relacionadas ao processo cicatricial, destacando-se a propriedade de ativar macrófagos e modular a dinâmica da cicatrização (LIMA et al., 2009). O fitoterápico *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, conhecido como barbatimão, é uma espécie nativa do cerrado brasileiro que possui como princípio ativo de maior expressão o tanino, presente em grande quantidade na casca desta leguminosa arbórea (SANTORO et al., 2004). O tanino é um composto fenólico com ação adstringente, anti-séptica, antimicrobiana e cicatrizante (GILBERT, 2005; LIMA et al., 2009). Porém, a utilização desse fitoterápico ainda está condicionada às crendices populares, sendo escassas pesquisas envolvendo o barbatimão como coadjuvante do processo cicatricial (LOPES et al., 2005).

O presente estudo teve por objetivo avaliar a ação dos cremes à base de quitosana e barbatimão a 5%, após efetuar antissepsia do sítio das lesões com solução de cloreto de sódio a 0,9%, na terapia de feridas cutâneas de coelhos induzidas experimentalmente e submetidas à cicatrização por segunda intenção, por meio da análise histológica, relacionando os achados dessa avaliação aos episódios macroscópicos observados.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido entre os meses de abril de 2008 e junho de 2009 na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás (EV/UFG), após apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (COEP), protocolado sob o número 39/2008, sendo desenvolvido em quatro etapas.

Na primeira, efetuou-se o processamento e a padronização dos constituintes do extrato aquoso de barbatimão no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da UFG. Após colheita das cascas de exemplares de barbatimão adultos, o material foi submetido à secagem em temperatura ambiente e em estufa a 70°C, por 24 horas cada. Posteriormente, as cascas foram trituradas em moinho elétrico (Tecnal TE-650®, São Paulo-SP), reservando-se 30 gramas do pó obtido, que foram homogeneizados em 900 mL de água destilada e submetidos ao processo de decocção a temperatura constante de 70°C, por duas horas. O extrato bruto foi concentrado em evaporador rotativo (Fisaton 802®, São Paulo-SP) e a concentração calculada em g/ml. Dois mililitros do extrato foram adicionados em um béquer com massa determinada, sendo este procedimento efetuado em tréplica e armazenados em estufa de secagem a 105°C, por três horas. Em seguida, as massas das amostras foram determinadas em balança analítica digital (AL-200®, São Paulo-SP), obtendo o peso do extrato seco de barbatimão após cálculo da média aritmética do peso dos béqueres. Como técnica final do processamento, submeteu-se o extrato aquoso a testes sensíveis ao doseamento dos princípios ativos contidos no barbatimão (taninos e fenóis totais), seguindo o método proposto por Hagerman & Butler (MOLE & WATERMAN, 1987a; MOLE & WATERMAN, 1987b). O extrato foi armazenado em frascos estéreis devidamente identificados, sob temperatura que variou entre 5 e 8°C, e encaminhado ao Laboratório de Bases da Farmogral (Farmogral Farmácia de Manipulação, Brasília-DF), para análise do controle da qualidade do produto, que incluiu microbiológica e caracteres organolépticos.

A segunda etapa constituiu a manipulação das formulações terapêuticas utilizadas nas feridas cutâneas. Sob a supervisão de farmacêuticos do Laboratório de Uso Externo da Farmogral foram preparadas quatro formulações: creme de quitosana a 5%, creme de barbatimão a 5%, creme de alantoína a 0,2%, reservando uma parte do creme base. O creme de barbatimão foi manipulado a partir do extrato aquoso padronizado na primeira etapa do experimento. Os constituintes dos demais cremes foram obtidos comercialmente no Laboratório de Uso Externo da Farmogral. Após cálculo das quantidades e pesagem dos componentes efetuou-se a homogeneização dos constituintes até a incorporação completa ao creme veículo. Antecedendo a incorporação da quitosana ao creme, efetuou-se a levigação do agente para garantir completa

incorporação do produto, visto que, por se tratar de um derivado da carapaça de crustáceos, o pó da quitosana possui aspecto áspero, impedindo homogeneização sistemática. Após manipulação, os cremes foram submetidos a testes de controle da qualidade, sendo avaliadas características organolépticas, pH, viscosidade e densidade dos produtos, os quais foram acondicionados em embalagens plásticas esterilizadas, devidamente identificadas.

A terceira etapa constou dos procedimentos de indução e tratamento das feridas cutâneas de coelhos, para avaliar a ação terapêutica das formulações. Foram utilizados 40 coelhos da raça Nova Zelândia, adultos, machos, com peso corpóreo de 1.800 ± 500 g, oriundos de criatórios especializados. Os animais foram alocados no biotério da EV/UFG, climatizado a temperatura média de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sendo alojados em gaiolas individuais, recebendo água à vontade e ração espécie-específica (Ração Cria Coelhos Manutenção - Guabi[®] Nutrição Animal, Anápolis - GO). Antecedendo o início dos estudos os coelhos passaram por um período de adaptação de 15 dias, visando melhor adequação às condições experimentais, ocasião em que cada unidade experimental foi submetida a exame clínico completo e colheita de sangue para realização de hemograma (NELSON & COUTO, 2006), com o objetivo de certificar a condição de hígidez dos animais. Paralelamente, os animais foram vermifugados com 0,2 mg/kg/SC de Ivermectina a 1% (Puritec Gold - Vetbrands. – Grupo Ceva Sant Animale - São Paulo/SP). Para minimizar o estresse e desconforto, a manipulação dos animais e o manejo do biotério durante todo o estudo foram efetuados por equipe selecionada que obedeceu a rigorosos critérios de treinamento e cumprimento de normas e horários pré-estabelecidos.

Para a confecção das feridas experimentais os animais foram pré-medicados com 1,0 mg de cloridrato de xilazina à 2% (CALMIUN[®] - Agener União Saúde Animal S.A – São Paulo, Brasil), associado à 1,0mg/kg de sulfato de morfina à 1% (DIMORF[®] - Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA – São Paulo, Brasil), por via intramuscular (IM). Após 15 minutos efetuou-se cateterização da veia auricular com cateter intravenoso 24G (BD Insyte[™] Autoguard[™] – BD, Brasil – São Paulo, Brasil). A indução anestésica foi realizada com 10mg/kg de propofol à 1% (PROPOVAN[®]- Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA – São Paulo, Brasil). Os animais foram intubados e mantidos sob anestesia inalatória com isofluorano (ISOFLUORANO[®]- Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA – São

Paulo, Brasil) e oxigênio a 100%, na taxa de 40mL/Kg de volume corrente. Sequencialmente efetuou-se ampla tricotomia da região dorsal e antissepsia do campo cirúrgico com clorexidine tópico (Clorexidine Tópico - Farmogral - Brasília/DF).

Durante os procedimentos cirúrgicos, com o auxílio de um *punch*, foram confeccionadas quatro feridas cutâneas de um centímetro de diâmetro em locais específicos no dorso de cada animal, até a exposição da aponeurose da musculatura dorsal, conforme ilustra a Figura 1. Após a confecção das feridas os coelhos foram novamente encaminhados ao biotério e mantidos com colar de contenção *Elizabethano* para minimizar os efeitos provocados por auto-mutilação, como lambedura e mordedura, que poderiam resultar em contaminação da ferida ou remoção da medicação tópica aplicada. Para promover controle eventual da dor, empregou-se 1mg/kg de cloridrato de tramadol, por via subcutânea, durante os três primeiros dias pós-indução das lesões.

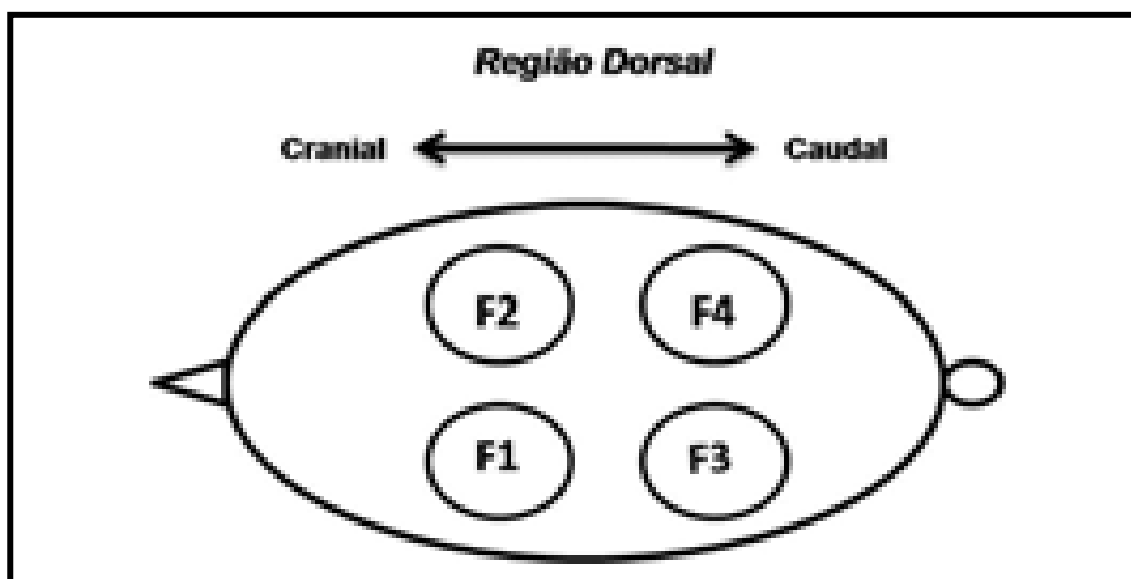


FIGURA 1 - Classificação das feridas cutâneas incisionais confeccionadas no dorso das unidades experimentais de acordo com a localização anatômica: F1 – ferida paramedial cranial esquerda; F2 – ferida paramedial cranial direita; F3 – ferida paramedial caudal esquerda; F4 – ferida paramedial caudal direita.

Antecedendo os tratamentos, efetuou-se antissepsia de cada ferida com solução de cloreto de sódio a 0,9%, instilada sob pressão proporcionada por agulha calibre 25x8 acoplada a seringa hipodérmica de 20mL (MARTINS, 2000).

Para avaliar a ação terapêutica dos cremes foram formados dois grupos de 20 animais, sendo estes identificados como grupo quitosana (GQ-A) e grupo barbatimão (GB-B). Em seguida, cada grupo foi distribuído em quatro subgrupos, que corresponderam aos tratamentos instituídos às feridas. Em GQ-A formaram-se os subgrupos creme de quitosana a 5% (CQ-A), creme de alantoína a 0,2% (CA-A), creme base (CN-A) e solução de cloreto de sódio a 0,9%, em que efetuou-se antissepsia sem terapia tópica posterior (SF-A).

Em GB-B os subgrupos foram creme de barbatimão a 5% (CB-B), creme de alantoína a 0,2% (CA-B), creme base (CN-B) e solução de cloreto de sódio a 0,9% (SF-B). As feridas foram tratadas diariamente durante 21 dias, sendo que cada uma das quatro feridas recebeu tratamento definido previamente por meio de sorteio. A aplicação dos cremes foi efetuada empregando espátulas descartáveis. Os subgrupos CA-A e CA-B foram considerados controles positivos, dada a consagrada ação da alantoína frente ao processo cicatricial (NETO, 2005). Já os subgrupos CN e SF de ambos os grupos compuseram os controles negativos.

A análise da evolução do processo cicatricial constituiu a quarta etapa da pesquisa e constou de avaliações macro e microscópicas das lesões. A evolução macroscópica da cicatrização por segunda intenção em cada ferida foi acompanhada mediante exame clínico diário dos animais e observação dos aspectos gerais das feridas. Os resultados foram registrados em fichas clínicas individuais. Para proceder aos exames histopatológicos realizou-se colheita de material das feridas em períodos pré-estabelecidos por meio de biopsias de pele, conforme especificado no Quadro 1.

QUADRO 1 - Delineamento experimental para análise histopatológica da cicatrização de feridas cutâneas em coelhos, durante experimento desenvolvido na Escola de Veterinária, entre abril de 2008 e junho de 2009.

Avaliações	Grupo Qitosana (GQ-A) (n= 20)				Grupo Barbatimão (GB-B) (n=20)			
	Subgrupos/ número de animais				Subgrupos/número de animais			
	CQ-A	CA-A	CN-A	SF-A	CB-B	CA-B	CN-B	SF-B
Dia 03	5	5	5	5	5	5	5	5
Dia 07	5	5	5	5	5	5	5	5
Dia 14	5	5	5	5	5	5	5	5
Dia 21	5	5	5	5	5	5	5	5

Após re-intervenção anestésica com protocolo idêntico ao adotado na indução das feridas, efetuou-se antissepsia local e removeu-se, com auxílio de bisturi e tesoura, um fragmento de pele abrangendo a totalidade da lesão, com margem de um centímetro de tecido íntegro à lesão, aprofundando até a exposição da aponeurose da musculatura dorsal. Terminado o procedimento, as bordas da lesão foram suturadas e os animais acompanhados no pós-operatório até recuperação clínica, ficando disponíveis para utilização em outras pesquisas.

O material colhido foi identificado, fixado em formol tamponado a 10% por 24 horas, processado e incluído em parafina de acordo com técnicas histológicas de rotina. Na sequência, de cada bloco foram obtidos dois cortes de 5µm, distendidos em lâminas histológicas e corados pelas técnicas de hematoxilina e eosina (HE) (LUNA, 1968) e tricrômico de Masson (TM). A análise microscópica do material foi efetuada às cegas por um único observador empregando-se microscópio óptico de campo claro. O campo histológico de cada lâmina foi avaliado utilizando-se os aumentos de cinco, 10 e 40 vezes. Os parâmetros analisados na coloração HE incluíram crosta serocelular (necrose/crosta), infiltrado polimorfonuclear, infiltrado mononuclear, tecido de granulação, proliferação fibroblástica, neovascularização e reepitelização. A coloração TM foi utilizada para a análise da colagenização. Os dados classificados de acordo com a intensidade e classificados de acordo com NETO et al. (2006) em ausente (0), discreto (1), moderado (2) e acentuado (3). Para crosta serocelular e tecido de granulação os resultados foram considerados como ausente e presente e para

reepitelização, ausente, parcial e total. Os dados das avaliações macroscópicas foram submetidos à análise descritiva. Para as avaliações microscópicas os resultados foram analisados utilizando-se o programa estatístico Statistica for Windows 5.1 (MICROSOFT), empregando-se o teste de *U-Mann Whitney*, considerando-se o nível de significância de 5% (SAMPAIO, 1998).

RESULTADOS

Devido a semelhança dos dados obtidos para os subgrupos CA-A e CA-B; CN-A e CN-B; SF-A e SF-B, para efeitos de tabulação os resultados foram agrupados passando estes a compor apenas subgrupos CA, CN e SF. Todas as feridas cutâneas evoluíram de forma similar até o quarto dia de tratamento, com predomínio de hiperemia adjacente às lesões, hemorragia, exsudação serosa e crostas. Em seguida, os sinais começaram a regredir, não sendo mais descritos para os subgrupos CQ, CB e SF após o oitavo dia de terapia. Acrescente-se que hiperemia e secreção foram observadas em 40% das feridas tratadas com CA e CN ao término do estudo. Após o 13º dia uma ferida do CN (20%) apresentou secreção mucopurulenta de odor desagradável associada a aumento de volume circunscrito, de consistência macia. Identificou-se ainda aumento na sensibilidade distinguida pelo desconforto apresentado pelo animal durante a manipulação da lesão. Crosta foi identificada nas feridas do subgrupo SF a partir do terceiro dia, enquanto que nos demais se formou a partir do segundo. Um segundo tipo de crosta foi identificado nas feridas que receberam terapias com creme, sendo esta constituída pelo resíduo do produto aplicado à lesão. As crostas se destacavam espontaneamente após a reepitelização ou ocasionalmente durante a antisepsia.

Retração centrípeta foi identificada em 100% das feridas dos animais dos subgrupos CB e SF no quarto dia de avaliação. No subgrupo CQ a retração foi visualizada no quinto dia, enquanto que nos subgrupos CA e CN, aos sexto e oitavo dias, respectivamente. O restabelecimento da integridade tecidual ocorreu em 80% das feridas do subgrupo CB, em 60% no subgrupo CQ e em 40% do subgrupo SF, ao 14º dia de avaliação, respectivamente. Nos dias 17, 18 e 19 as feridas dos subgrupos CB, SF e CQ, respectivamente, encontravam-se

reepitelizadas. Já em relação aos subgrupos CA e CN, a reepitelização ocorreu em apenas 40% das feridas de cada subgrupo ao final da pesquisa.

Na análise histopatológica, observou-se diferença estatística quanto às variáveis infiltrado polimorfonuclear, neovascularização, proliferação fibroblástica, colagenização e reepitelização tecidual entre os subgrupos nos diferentes momentos de avaliação. Quanto ao infiltrado mononuclear, necrose/crosta e tecido de granulação não houve diferença entre os subgrupos, sendo os resultados descritivos apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Distribuição das feridas de acordo com os escores aplicados às variáveis, infiltrado polimorfonuclear, mononuclear, neovascularização, proliferação fibroblástica, colagenização, necrose/crosta, tecido de granulação e reepitelização em relação aos subgrupos (n=5) nos dias de avaliação (3°, 7°, 14° e 21° pós-indução das feridas) em experimento na Escola de Veterinária/UFG, entre abril de 2008 e junho de 2009.

Dias	Sub-grupo	IP			IM			NV			PF			CL			N/C			TG			REE							
		A	D	M	C	A	D	M	C	A	D	M	C	A	D	M	C	A	D	M	C	A	P	A	P	A	I	T		
3 dias	CQ	0	0	5	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	3	2	0	0	0	5	0	0	5	0	5	0	0
	CB	0	0	4	1	5	0	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	3	2	0	0	0	5	0	0	5	0	5	0	0
	CA	0	0	4	1	5	0	0	0	0	5	0	0	4	1	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	5	0	5	0	0
	CN	0	0	0	5	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	5	0	5	0	0
	SF	0	0	5	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	5	0	0	3	2	0	0	0	5	0	0	5	0	5	0	0
7 dias	CQ	0	0	4	1	5	0	0	0	0	1	4	0	0	0	2	3	1	3	1	0	0	5	0	0	5	0	5	0	0
	CB	0	2	3	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	1	4	1	2	2	0	0	5	0	0	5	0	5	0	0
	CA	0	0	5	0	5	0	0	0	0	1	4	0	0	0	5	0	1	4	0	0	0	5	0	0	5	0	5	0	0
	CN	0	0	0	5	5	0	0	0	2	3	0	0	2	3	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	5	0	5	0	0
	SF	0	3	2	0	5	0	0	0	0	2	3	0	0	0	4	1	3	2	0	0	0	5	0	0	5	0	5	0	0
14 dias	CQ	1	3	1	0	5	0	0	0	1	4	0	0	0	3	2	0	0	0	4	1	5	0	0	0	5	0	5	0	2
	CB	3	2	0	0	5	0	0	0	3	2	0	0	0	3	2	0	0	0	3	2	3	2	0	0	5	0	1	4	0
	CA	0	0	5	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	4	1	0	0	3	2	0	1	4	1	0	4	0	5	0	0
	CN	0	0	4	1	5	0	0	0	0	3	2	0	0	4	1	0	0	4	1	0	0	5	0	0	5	0	5	0	0
	SF	1	4	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	2	3	0	3	2	0	2	3	0	0	5	0	5	0	3
21 dias	CQ	5	0	0	0	5	0	0	0	1	3	1	0	3	2	0	0	0	0	2	3	5	0	3	2	0	0	0	0	5
	CB	5	0	0	0	5	0	0	0	3	2	0	0	4	1	0	0	0	0	1	4	5	0	3	2	0	0	0	0	5
	CA	2	3	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	2	3	0	0	0	0	3	2	5	0	5	0	0	0	3	2	0
	CN	0	4	0	1	3	2	0	0	0	3	2	0	0	2	3	0	0	1	3	1	3	2	2	3	0	0	3	0	2
	SF	5	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	3	2	0	0	0	1	4	5	0	4	1	0	0	0	0	5

CQ: creme de quitosana; **CB:** creme de barbatimão; **CA:** creme de alantoina; **CN:** creme base; **SF:** solução de cloreto de sódio a 0,9%; **IP:** infiltrado polimorfonuclear; **IM:** infiltrado mononuclear; **NV:** neovascularização; **PF:** proliferação fibroblástica; **CL:** colagenização; **N/C:** necrose/crosta; **TG:** tecido de granulação; **REE:** reepitelização; **A:** ausente; **D:** discreto; **M:** moderado; **C:** acentuado; **P:** presente; **I:** parcial; **T:** total.

Na análise comparativa entre os cremes de quitosana e barbatimão, bem como entre estes e os demais tratamentos houve diferença quanto à variável infiltrado polimorfonuclear do subgrupo CN em relação aos CQ e CB em todos os momentos de avaliação, sendo este parâmetro mais acentuado em CN (Figura 2A). Ainda, nas avaliações dos dias 14 e 21 também foi constatada diferença do subgrupo CA em relação aos CQ e CB quanto ao infiltrado polimorfonuclear (Tabela 2).

Neovascularização foi observada a partir da primeira avaliação e persistiu em todos os períodos do estudo, em maior ou menor quantidade nas feridas dos diferentes tratamentos, sendo verificada diferença estatística para esta variável entre as feridas do subgrupo CN e aquelas dos tratamentos CQ e CB em todos os momentos de avaliação (Tabela 2). Foi observada menor proliferação fibroblástica nas feridas dos subgrupos CA e CN em comparação àquelas de CQ e CB nos dias três e sete ($p < 0,05$). Já no dia 14 as lesões dos subgrupos SF apresentaram maior proliferação fibroblástica que às de CQ e CB ($p < 0,05$), bem como as de CN e SF em relação às de CQ e CB ($p < 0,05$) ao 21º dia de terapia (Tabela 2). Neovascularização e proliferação fibroblástica estão ilustradas na Figura 2B.

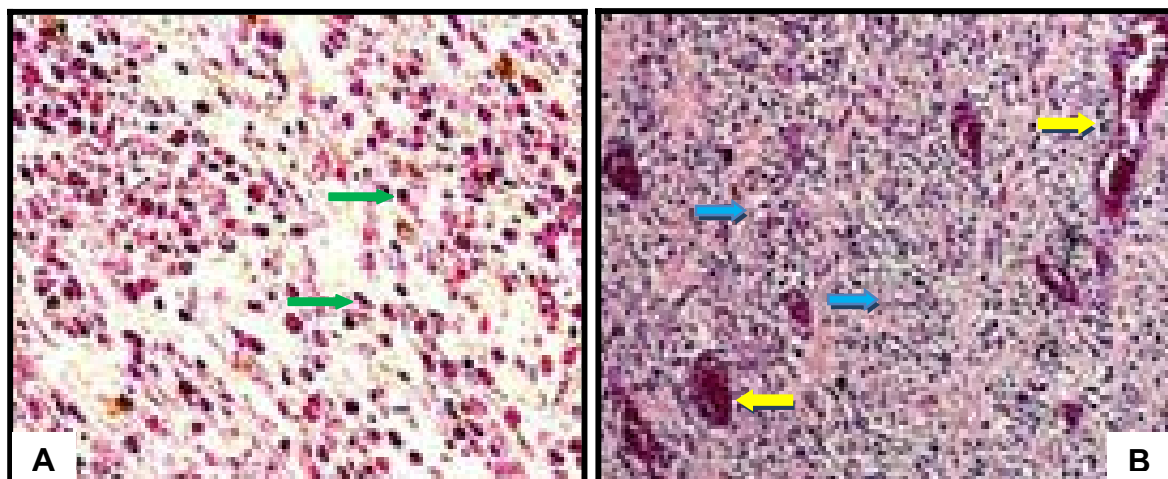


FIGURA 2 - Fotomicrografia da cicatrização de feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em coelhos e submetidas à cicatrização por segunda intenção. Em A, presença de infiltrado polimorfonuclear acentuado (setas verdes) em ferida do subgrupo creme base aos três dias de pós-operatório. HE, objetiva 20x. Em B, presença de tecido de granulação em ferida do subgrupo creme de barbatimão, aos sete dias de pós-operatório evidenciando fibroplasia (setas azuis) e angiogênese (setas amarelas). HE, objetiva 5x.

Colagenização decorrente da síntese fibroblástica foi constatada a partir do sétimo dia e aumentou nos dois últimos momentos de avaliação (14° e 21° dias) (Figura 3A), apresentando menor intensidade nas feridas do subgrupo CN quando comparadas àquelas de CQ e CB no sétimo dia ($p < 0,05$). No 14° dia também foi verificada diferença para esta variável entre os subgrupos creme de quitosana e barbatimão em relação aos demais (CA, CN e SF) (Tabela 2). Reepitelização foi caracterizada por migração epitelial das bordas íntegras circunvizinhas em direção ao centro da lesão (Figura 3B). Diferença estatística ocorreu nas análises dos dias sete e 14 quando se comparou à variável reepitelização dos subgrupos CA e CN em relação aos CQ e CB (Tabela 2).

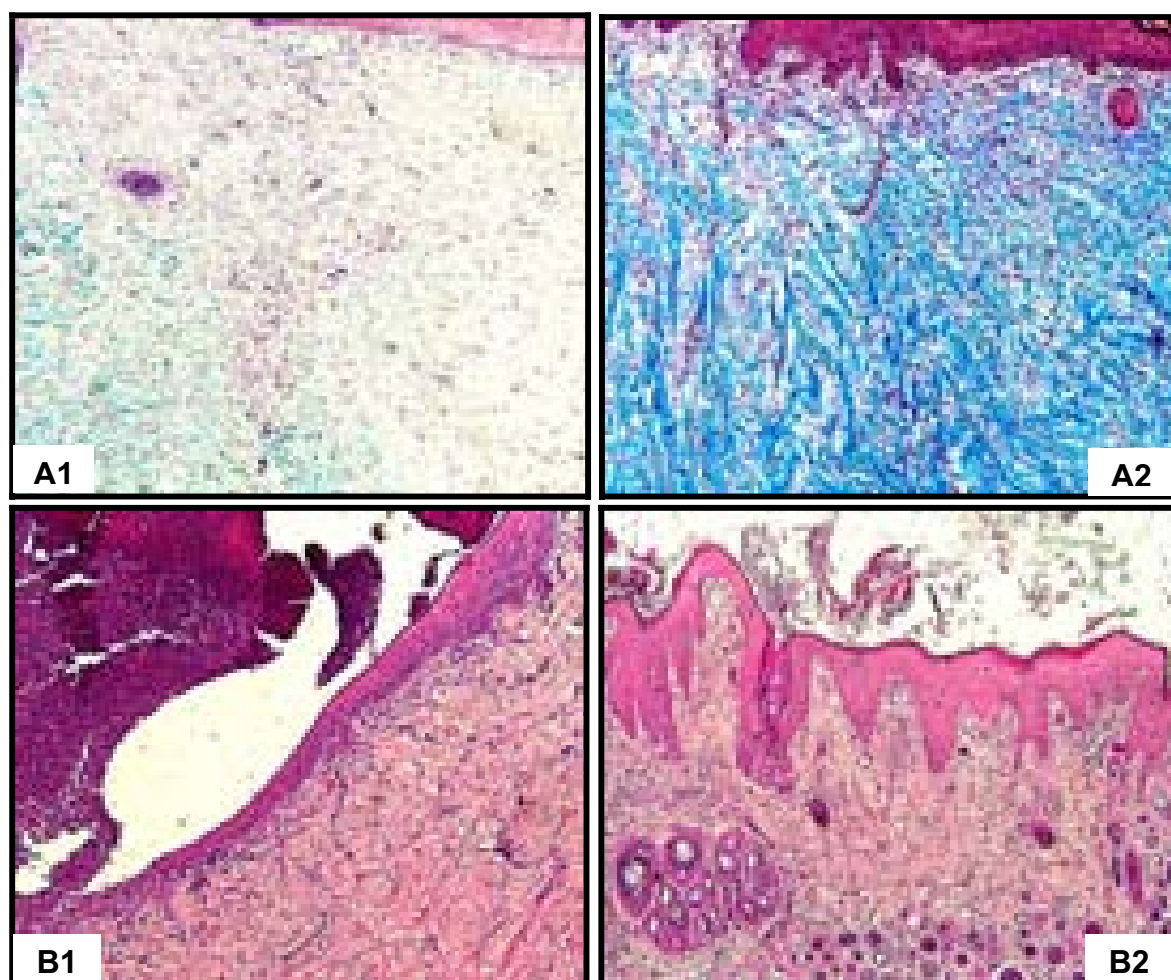


FIGURA 3 – Fotomicrografia da cicatrização de feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em coelhos e submetidas à cicatrização por segunda intenção, evidenciando colagenização em ferida do subgrupo creme de quitosana (A) e reepitelização em ferida do subgrupo creme de barbatimão (B). Em A1, ausência de colagenização ao terceiro dia de avaliação. TM, objetiva 5x. Em A2, tecido conjuntivo de preenchimento evidenciando fibras colágenas coradas em azul ao 21° dia de terapia. TM, objetiva 5x. Em B1, aos sete dias com reepitelização parcial. HE, objetiva 5x. Em B2, aos 21 dias reepitelização completa e restabelecimento dos anexos cutâneos.

À análise histopatológica observou-se ainda que, na ferida do subgrupo CN que macroscopicamente apresentava secreção mucopurulenta e aumento de volume circunscrito, foi detectada presença de abscesso intra-epidermal caracterizado por área necrótica encapsulada com predominância de infiltrado polimorfonuclear subjacente. Presença de hiperqueratose também foi notada em aproximadamente 80% das lâminas pós reepitelização completa, independente da terapia instituída.

TABELA 2 – Comparação das variáveis infiltrado polimorfonuclear, necrose/crosta, tecido de granulação, neovascularização, proliferação fibroblástica, colagenização, infiltrado mononuclear e reepitelização tecidual nos subgrupos creme de quitosana, creme de barbatimão, creme de alantoína, creme base e solução de cloreto de sódio a 0,9% comparados aos cremes de quitosana e barbatimão, nos dias três, sete, 14 e 21 em experimento na Escola de Veterinária/UFG, entre abril de 2008 e junho de 2009.

Momentos	Tratamentos	IP	N/C	TG	NV	PF	CL	IM	REE
3 dias	CQ	2 ^a	1 ^a	0 ^a	1 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	CB	2 ^a	1 ^a	0 ^a	1 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	CA	2 ^a	1 ^a	0 ^a	1 ^a	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	CN	3 ^b	1 ^a	0 ^a	0 ^b	0 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	SF	2 ^a	1 ^a	0 ^a	1 ^a	1 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
7 dias	CQ	2 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a	2 ^a	1 ^a	0 ^a	1 ^a
	CB	2 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	0 ^a	1 ^a
	CA	2 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a	2 ^b	1 ^a	0 ^a	0 ^b
	CN	3 ^b	1 ^a	0 ^a	1 ^b	1 ^b	0 ^b	0 ^a	0 ^b
	SF	1 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a	2 ^a	1 ^a	0 ^a	1 ^a
14 dias	CQ	1 ^a	0 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	2 ^a	0 ^a	2 ^a
	CB	0 ^a	0 ^a	1 ^a	0 ^a	1 ^a	2 ^a	0 ^a	2 ^a
	CA	2 ^b	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^a	1 ^b	0 ^a	2 ^a
	CN	3 ^b	1 ^a	1 ^a	1 ^b	1 ^a	1 ^b	0 ^a	2 ^a
	SF	1 ^a	0 ^a	1 ^a	1 ^a	3 ^b	1 ^b	0 ^a	2 ^a
21 dias	CQ	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1 ^a	0 ^a	3 ^a	0 ^a	2 ^a
	CB	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	3 ^a	0 ^a	2 ^a
	CA	1 ^b	0 ^a	0 ^a	1 ^a	0 ^a	2 ^a	0 ^a	2 ^a
	CN	1 ^b	0 ^a	1 ^a	1 ^b	2 ^b	2 ^a	1 ^a	2 ^a
	SF	0 ^a	0 ^a	0 ^a	1 ^a	1 ^b	3 ^a	0 ^a	2 ^a

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste U-Mann Whitney ($p < 0,05$). Valores numéricos das colunas correspondem às medianas de cada tratamento. **CQ**: creme de quitosana; **CB**: creme de barbatimão; **CA**: creme de alantoína; **CN**: creme base; **SF**: solução de cloreto de sódio a 0,9%; **IP**: infiltrado polimorfonuclear; **IM**: infiltrado mononuclear; **NV**: neovascularização; **PF**: proliferação fibroblástica; **CL**: colagenização; **N/C**: necrose/crosta; **TG**: tecido de granulação; **REE**: reepitelização.

DISCUSSÃO

A seleção dos coadjuvantes do processo cicatricial, empregados neste estudo, fundamentou-se nas peculiaridades inerentes a esses agentes. Embora já seja estabelecido que as propriedades adstringentes do tanino contribuam para o restabelecimento de injúrias diversas, observa-se que a maior parte das publicações encontra-se fundamentada em ensaios empíricos baseados na medicina popular conforme relatos de LOPES et al. (2005). Contrariando essa afirmação, optou-se por formular um extrato seguindo as normas da farmacopéia brasileira, conforme metodologia de GILBERT (2005), padronizado quanto à constituição e quantificação dos princípios ativos, a fim de depositar maior caráter científico a pesquisa. A quitosana, segundo SILVA et al. (2006) possui atividades antimicrobiana, coagulante e imunomoduladora conhecidas, acelerando a dinâmica do processo cicatricial, podendo representar nova opção de terapia tópica das lesões cutâneas, visto que, o biomaterial é empregado sob a forma de filmes, géis, membranas e telas, conforme citado por SEZER et al. (2007), enquanto que este estudo teve a intenção de sugerir uma proposta inovadora quanto a aplicabilidade da quitosana no estudo da cicatrização.

Ao avaliar a ação terapêutica dos cremes de barbatimão e quitosana a 5% na terapia de feridas cutâneas incisionais em coelhos verificou-se que os resultados macroscópicos predominantes até o oitavo dia, bem como os histopatológicos dos dias três e sete, foram condizentes com achados descritos para fase inflamatória do processo cicatricial. Infere-se que os sinais macroscópicos conferiram respostas clínicas à predominância de polimorfonucleares na fase inicial da cicatrização. Posteriormente, a ausência precoce desses sinais para os subgrupos CB e CQ, quando comparados aos demais tratamentos, provavelmente esteve relacionada à atividade antiinflamatória dos princípios ativos tanino e quitosana, interferindo de forma benéfica na dinâmica do processo cicatricial. Achados semelhantes foram apontados por TROMBETTA et al. (2006) e ERMERTCAN et al. (2008) na fase inicial da evolução da cicatrização, concordando com os resultados desse estudo.

Em contrapartida, a persistência dos sinais macroscópicos como hiperemia e secreção e, sinais de inflamação aguda na análise microscópica para os subgrupos CA e CN, bem como presença de secreção mucopurulenta com

aumento de volume circunscrito em uma lesão tratada com CN, associada à formação de abscesso intra-epidermal, sugerem desencadeamento de reação irritativa ao veículo empregado na pesquisa. Acrescente-se a possível insuficiência do mecanismo antiinflamatório proposto pela alantoína, conforme citado por NETO (2005). De forma semelhante à encontrada neste estudo, VIEIRA et al. (2008) também fizeram referência a extensão do processo inflamatório em feridas tratadas com CN. No entanto, os autores não apontaram quais prováveis fatores influenciaram tal achado.

Possivelmente, a presença de secreção mucopurulenta esteve associada à contaminação exógena da lesão que recebeu CN, visto que, tal achado não foi descrito para as demais terapias. Segundo afirmações de YOSOF et al. (2001), NETO (2005) e SILVA et al. (2006), barbatimão, alantoína e quitosana, respectivamente, exercem ação antimicrobiana, confirmadas pela ausência de contaminação nas feridas que receberam estes tratamentos. Acrescente-se que, embora não tenha atividade antimicrobiana reconhecida, como mencionado por COSTA et al., 2008, a anti-sepsia proporcionada pela SF também se mostrou eficaz na limitação da contaminação exógena das feridas pertencentes a este subgrupo. No entanto, resultados distintos foram demonstrados por MARTINS et al. (2003), com presença de secreção mucopurulenta em feridas de equinos. Dessa forma infere-se que as práticas de antisepsia também minimizaram os riscos de contaminação das feridas.

A formação de crostas iniciada nos primeiros dias pós-lesão, limitou parcialmente a manipulação e avaliação macroscópica das feridas no decorrer da pesquisa. No entanto, optou-se pela não debridamento mecânico, por acreditar que tal manobra poderia desencadear alterações, como traumatismo e hemorragia do epitélio recém-sintetizado, interferindo com toda a dinâmica da reparação tecidual. Mesmo acreditando que a remoção das crostas poderia facilitar a avaliação clínica da lesão cutânea, EURIDES et al. (1996) também optaram pela não retirada das mesmas, concordando com a metodologia empregada neste estudo. Contrariando esta conduta, LOPES et al. (2005), promoveram aos dez dias de pós-operatório, debridamento das lesões para remoção das crostas, alegando que a permanência destas, dificultava a interpretação dos achados clínicos e aplicação dos produtos. Os autores não apontaram inconvenientes, pela adoção de tal metodologia, quanto à resolução do processo cicatricial. Embora

também não se tenha observado intercorrências advindas do preterimento desta manobra, notou-se que a presença das crostas, em diversos momentos, reduziu a superfície de contato entre as lesões e os protocolos terapêuticos adotados. Infere-se que tal conduta restringiu, em parte, a expressão dos coadjuvantes do processo cicatricial adotados nesse estudo.

Macroscopicamente as crostas permaneceram recobrimdo a superfície das feridas até completa reepitelização tecidual, embora esse achado na avaliação microscópica tenha perdurado somente até o sétimo ou 14° dias para os subgrupos CQ ou CB, CA e SF, respectivamente. Assim, a permanência desse achado na avaliação clínica, particularmente para o CQ, esteve associada, também, ao resíduo do creme aplicado sobre as lesões. Ressalte-se que devido sua constituição, sob a forma de filme este biomaterial se adere firmemente à superfície da lesão. Segundo AZAD et al. (2004) este é fator essencial para a atuação da quitosana nesse tipo de apresentação. Porém, quando se efetuou a incorporação do pó da quitosana ao veículo em forma de creme este passou a apresentar um aspecto pegajoso tendo sua remoção prejudicada.

Embora intercorrências não tenham se desenvolvido por esta característica da quitosana recomenda-se que novos ensaios em diferentes tipos de apresentações e concentrações sejam tentados. Já em relação às crostas formadas em decorrência da propriedade adstringente do tanino, admite-se que estas tenham fornecido revestimento protetor conferindo proteção adicional as feridas contra a penetração de agentes exógenos. EURIDES et al. (1996) também mencionaram que o barbatimão favorece uma cicatrização subcristal, concordando com os achados desse estudo, visto que, ausência de tal parâmetro ocorreu somente após reepitelização completa das feridas cutâneas.

Mesmo que já tenha se iniciado por volta do quarto dia para as feridas pertencentes aos subgrupos CQ, CB e SF, retração centrípeta das lesões ocorreu de forma mais expressiva após o sétimo dia para todos os subgrupos considerados. Histopatologicamente esse achado foi caracterizado por início de reepitelização cutânea. Associado a este parâmetro, tecido de granulação, proliferação fibroblástica, colagenização e neovascularização também foram desencadeados nesse momento. Dessa forma pode-se depreender que, o processo evoluíra para a fase proliferativa da cicatrização, visto que tais achados

foram condizentes com os principais parâmetros descritos para esta fase, corroborando com HOSGOOD (2006).

Quando se considerou a variável proliferação fibroblástica notou-se que, em momentos variados, os subgrupos CA, CN e SF apresentaram menor intensidade deste tipo celular quando comparados aos CB e CQ. Segundo KUMMAR et al. (2005) fibroplasia é considerado o marco principal do processo de cicatrização e pelos achados aqui encontrados pressupõe-se que os CB e CQ estimulem a proliferação fibroblástica. MARTINS et al. (2003) também mencionaram que o barbatimão favoreceu o processo de fibroplasia em feridas de equinos, relacionando tal ação a baixa tensão de oxigênio e o acúmulo de fibrina proporcionado pelo fitoterápico no centro da lesão. Assim, a cicatrização subcrostral proporcionada pelo tanino, neste estudo, pode ser responsabilizada em parte pela multiplicação e migração centrípeta dos fibroblastos estimulados pela malha de fibrina presente das crostas formadas pelo CB.

A propriedade imunomoduladora implicada a quitosana também pôde ser confirmada visto que a proliferação fibroblástica também ocorreu de forma mais acentuada nesse tratamento, sugerindo que o biomaterial estimulou a ativação macrofágica que diante dessa condição liberaram interleucina-1, responsável pela atração dos fibroblastos para o sítio da lesão, conforme afirmaram SILVA et al. (2006). Associado a ativação fibroblástica obteve-se formação de tecido colágeno mais acentuado e maior preenchimento da área da lesão com tecido conjuntivo em substituição ao tecido íntegro anterior a indução da injúria também para os dois subgrupos teste do estudo. LOPES et al. (2005) utilizando extrato de barbatimão e SEZER et al. (2007) trabalhando com filme de quitosana, ambos frente ao processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos e coelhos, também obtiveram resultados semelhantes quanto a colagenização, concordando com os resultados desse estudo.

Acrescente-se ainda que a formação de novos vasos também foi mais concentrada entre a segunda e terceira avaliações e que por ocasião da avaliação no 21° esse parâmetro já havia regredido sensivelmente independente do protocolo terapêutico empregado. Fundamentando-se nos relatos de BALBINO et al. (2005), presume-se que por ocasião da última avaliação os vasos neoformados já se encontravam em processo de apoptose, identificado na fase final do processo cicatricial. BARBUL (2006) reafirmaram a importância da angiogênese

na dinâmica da cicatrização, tendo em vista que a cicatrização compreende um fenômeno biológico metabolicamente ativo, havendo necessidade de trocas gasosas e nutrição dos grupos celulares para que o mesmo se desenvolva sem intercorrências. Dessa forma infere-se que a angiogênese, independente dos tratamentos, foi importante, conferindo suporte necessário para que o processo de reparação tecidual evoluísse de forma satisfatória para todos os subgrupos.

Reepitelização parcial foi caracterizada pela migração do epitélio das bordas íntegras das feridas em direção ao centro da lesão. TROMBETTA et al. (2006) também descreveram aspecto semelhante de migração epitelial diante do processo de cicatrização, descrevendo ainda que tal migração ocorria em diferentes pontos das bordas íntegras. Como em todo decorrer da evolução do processo de cicatrização as feridas dos subgrupos CB, CQ e SF também apresentaram reepitelização completa mais precoce que os subgrupos CA e CN, acontecendo por volta dos 18 dias de tratamento. O retardo na evolução do processo cicatricial respalda ainda mais as inferências de que o CN aplicado isoladamente sobre a lesão não desempenha atividade significativa ao processo de cicatrização, podendo o mesmo atuar de forma maléfica e corrobora com VIEIRA et al. (2008). Quanto a alantoína, observou-se que, sua expressão foi inferior em diversos parâmetros quando comparada aos CB e CQ.

Finalmente após análise dos resultados dessa pesquisa também foi possível comprovar o dinamismo de sobreposição entre as diferentes fases do processo cicatricial, pois de modo geral, diversos achados clínicos e microscópicos condizentes com uma determinada fase também estiveram presentes para as demais etapas do processo. Confirmou-se que o dinamismo com sobreposição entre as diferentes fases contribui sumariamente para a evolução satisfatória do processo cicatricial conforme mencionado por ACKERMMAN (2007).

Apesar dos grandes avanços verificados nas últimas décadas possibilitando, em parte, a compreensão dos diversos fatores e fenômenos envolvidos no processo de reparação tissular e mesmo com a descoberta dos benefícios de novos recursos e tecnologias, acredita-se que muito ainda precisa ser desvendado, visto que ainda é elevada a ocorrência de complicações advindas do processo de cicatrização.

CONCLUSÃO

Os cremes de quitosana e barbatimão a 5% auxiliam no processo de reparação tecidual, pois, reduziram a inflamação aguda e promovem ativação fibroblástica, desenvolvimento precoce de tecido conjuntivo, neovascularização e reepitelização tecidual. Ambos os protocolos são alternativas eficazes, além de serem economicamente viáveis como coadjuvantes do processo cicatricial.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Rações GUABI e AGENER.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, M.R. Acute inflammation. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic basis veterinary disease**. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007. cap.3-4, p.101-191.
- AFZALETDINOVA, N.G.; MURINOV, Y.I.; MULLAGALIEV, I.R.; ZARUDII, F.S.; DAVYDOVA, V.A.; ISMAGILOVA, A.F. Synthesis and wound healing and antiulcer activity of a chitosan-rhodium (III) complex. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, New York, v.34, n.5, p.26-30, 2000.
- AZAD, A.K.; SERMSINTHAM, N.; CHANDRKRACHANG, S.; STEVENS, W.R. Chitosan membrane as a wound-healing dressing: characterization and clinical application. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, Hoboken, v.69B, n.2, p.216-222, 2004.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, São Paulo, v.41, n.1, p.27-51, 2005.
- BARBUL, A. History of wound healing. In: BRUNICARDI, F.C.; SEYMOUR, I.; SCHWARTS, D.L.; DUN, D.K.; ANDERSEN, R.E. **Schwartz's Surgery**. Ontario: Companion handbook, 2006. p.25-78.
- BEER, H.D.; FASSLER, R.; WERNER, S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair. **Vitamins and Hormones**, New York, v.59, p.217-239, 2000.

COSTA, E.M.M.B.; ESMERALDO, M.R.A.; CARVALHO, M.G.F.; PINHEIRO, R.L.D'A.; PASTRO, M.F.; SILVA JÚNIOR, F.L.. Avaliação da ação antimicrobiana da própolis e de substâncias utilizadas na endodontia sobre o *Enterococcus faecalis*. Pesquisa Brasileira de Odontopediatria e Clínica Integrada, João Pessoa, v.8, n.1, p.21-25, 2008.

ERMERTCAN; A.T.; INAN, S.; OZTURKCAN, S.; BILAC, C.; CILAKER, S. Comparison of the effects of collagenase and extract of *Centella asiatica* in an experimental model of wound healing: an immunohistochemical and histopatological study. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.16, p.674-681, 2008.

EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; BELLETI, M.E.; SILVA, L.A.F.; FIORAVANTI, M.C.S.; NETO, N.S.T.; CAMPOS, V.A.; LEMAR, R.C.; JÚNIOR, P.L.S. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman Martius*). **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia de Uruguáina**, Uruguáina, v.2/3, n.1, p.37-42, 1996.

GILBERT, B.; FERREIRA, J.L.P.; ALVES, L.F. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas**, 1.ed. Curitiba: Abifito, 2005. 250p.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v.36, n.4, p.667-685, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Inflammation. In: ROBBINS & COTRAN. **Pathologic Basis of Disease**. 7.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. cap.2-3, p.47-118.

LEE, W.R.; PARK, J.H.; KIM, K.H.; KIM, S.J.; PARK, D.W. CHAE, M.H.; SUCH, S.H.; JEONG, S.W.; PARK, K.K. The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.17, p.505-510, 2009.

LIMA, C.R.O.; SILVA, L.A.F.; GOULART, D.S.; PERCIANO, C.B.; PARENTE, L.M.L.; FRANCO, L.G. Análise morfométrica da taxa de contração de feridas tratadas com extrato da casca de barbatimão a 5%. In: 9ª CONFERÊNCIA SUL-AMERICANA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2009, Rio de Janeiro. **Anais eletrônicos...** [CD-ROM], Rio de Janeiro, 2009.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wound in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.99, n.2, p.256-272, 2005.

LUNA, L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.

MARTINS, M.F.; MACEDO, C.F.A.M.; SÍRIO, O.J.; YIOMASA, M.M.; MIZUSAKI, C.I.; FIGUEIREDO, L.D.; PACHECO, P. Avaliação macro e microscópica da cicatrização de lesões experimentalmente provocadas em pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina fulica*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.40, n.3, p.213-218, 2003.

MARTINS, P.A.E. **Avaliação de três técnicas de limpeza do sítio cirúrgico infectado utilizando soro fisiológico para remoção de microrganismos**. 2000. 143f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

MOLE, S. & WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I. Techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, Berlin, v.72, p.137 – 147, 1987a.

MOLE, S. & WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II. Techniques for biochemically defining tannins. **Oecologia**, Berlin, v.72, p.148 – 156, 1987b.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1324p.

NETO, M.L.C.; FILHO, J.M.R.; MALAFAIA, O.; FILHO, M.A.O.; CZEEZKO, N.G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V.R.; TEIXEIRA, H.M.; AGUIAR, L.R.F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Maranhão, v.21, n.2, p.17-22, 2006.

NETO, N.M.A. **Tratamento tópico com mel, própolis em gel e creme a base de alantoína em feridas experimentalmente infectadas em coelhos**. 2005. 36p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SAHOTA, P.S.; BURN, J.L.; BROWN, N.J.; MACNEIL, S. Approaches to improve angiogenesis in tissue-engineered skin. **Wound Repair and Regeneration**, Denmark, v.12, n.6, p.635-642, 2004.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, 1998. 221p.

SANTORO, K.R.; VIEIRA, M.E.Q.; QUEIROZ, M.L.; BARBOSA, R.P. Efeito do tanino de *Stryphnodendron* spp. sobre a longevidade de abelhas *Apis mellifera* L. (Abelhas africanizadas). **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v.53, n.203, p.281-291, 2004.

SEZER, A.D.; HATIPOGLU, F.; CEVHER, E.; OGURTAN, Z.; BAS, A.L.; AKBUGA, J. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro / in vivo evaluation. **AAPS PHARMSCITECH**, Istanbul v.8, n.2, 2007.

SILVA, H.S.R.C.; SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, Campinas, v.29, n.4, p.776-785, 2006.

TROMBETTA, D.; PUGLIA, C.; PERRI, D.; LICATA, A.; PEGOLIZZI, S.; LAURIANO, E.R.; PASQUALE, A.D.; SAIJA, A.; BONINA, F.P. Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, Jena, v.13, p.352-358, 2006.

VIEIRA, A.P.; SANTOS, N.R.; BORGES, J.H.S.; VINCENZI, M.P.; SCHMITZ, W.O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e Saúde**, Londrina, v.29, n.01, p.65-74, 2008.

YOSOF, N.L.B.M.; LIM, L.Y.; KHOR, E. Preparation and characterization of chitin beads as a wound dressing precursor. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B . Applied biomaterials**, Hoboken, v.54, p.59-68, 2001.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento desta pesquisa, associada às experiências vivenciadas na rotina profissional, retoma a importância da temática abordada, reparação tecidual, alternativas medicamentosas, biomateriais, fitoterápicos, visto que muitos questionamentos relacionados a particularidades da cicatrização ainda não foram completamente esclarecidos.

As condições proporcionadas para o desenvolvimento desse experimento, como estrutura física da Escola de Veterinária, financiamento obtido junto a Fapeg, concessão da bolsa de Pós-graduação junto ao CNPq, bem como ambiente padronizado para desenvolvimento do estudo, uniformização das unidades experimentais, parceria entre a Escola de Veterinária/UFG e a Faculdade de Farmácia/UFG, bem como com as empresas particulares Farmogral (Farmácia de Manipulação), rações Guabi e Agener União foram fundamentais, para a idealização, desenvolvimento e conclusão desta pesquisa.

Sabe-se que as injúrias cutâneas, bem como as intercorrências que resultam em não resolução do processo apresentam casuística significativa em todos os segmentos da medicina humana e veterinária. Embora existam cerca de mais de 2.500 itens desenvolvidos para atuarem como coadjuvantes da cicatrização observa-se que a maior parte, estes não proporcionam desempenho satisfatório frente a situações adversas. Esta realidade ocorre tanto pela performance insuficiente de muitos destes, quanto pela falta de embasamento sólido, por parte dos profissionais, no momento da escolha para determinada situação.

A realização do experimento propiciou acompanhamento sistemático desde a mínima evolução até à reparação completa das feridas lesionadas, fornecendo subsídios essenciais para maior compreensão acerca desse processo muitas vezes fisiológico, outrora não. Os resultados obtidos nas avaliações clínica, morfométrica e histológica forneceram informações importantes para que se pudessem sugerir prováveis mecanismos de ação dos agentes testados nessa pesquisa (barbatimão e quitosana).

Embora os resultados desse estudo tenham sido satisfatórios, observou-se, em diversos momentos, que a constituição do creme veículo empregado impediu que os princípios ativos tivessem contato mais íntimo com a

superfície da lesão, bem como as análises fossem efetuados em sua plenitude. Atribuiu-se esse fator as características intrínsecas do veículo proposto, visto que possui maior resistência e fixação a superfície da ferida. No entanto, independente desse apontamento, as suspeitas de que o fitoterápico e do biomaterial pudessem atuar de forma benéfica em relação ao processo de cicatrização de feridas cutâneas, foram confirmadas, por contemplação aos objetivos propostos, e pode-se indicar que tanto o tanino quanto a quitosana atuam de forma satisfatória frente aos processos de cicatrização de feridas cutâneas.

Dessa forma espera-se que em breve produtos manipulados a partir dessas matérias-primas possam estar disponíveis no mercado, posto que são compostos naturais e possivelmente suscitam em menos reações indesejáveis ao organismo, além de apresentarem menor poder residual. Adicionalmente estes são conseguidos a custos reduzidos estando acessível à grande parte da população, além de servirem como fonte de renda para comunidades que fazem uso sustentável destes produtos.

Particularmente sobre a fitoterapia, ficou demonstrado que existe explicação científica para as indicações terapêuticas milenares de determinadas aplicações. Acrescente-se que ao associar esse argumento ao fato de muitos produtos farmacêuticos alopáticos conterem em suas formulações, princípios ativos advindos da fitoterapia, tem-se idéia da importância de estudos envolvendo essa área do conhecimento. Além de não negligenciar a importância dos fitoterápicos nas diversas formulações terapêuticas, fato comprovado em varias situações, não se pode ignorar o fato de muitos princípios ativos extraídos de plantas medicinais brasileiras serem patenteados em outros países e depois revendidos as empresas brasileiras por valores vultosos. Nesse caso, investimentos financeiros mais expressivos por parte dos órgãos governamentais de fomento e iniciativa privada, bem como maiores incentivos a comunidade científica, poderiam representar um ganho substancial e definitivo para a população em geral.

Sobre a valorização das pesquisas envolvendo fitoterápicos, um acontecimento recente, de domínio publico, foi a criação de redes e grupos de pesquisas nesta área e fomento a estas sendo disponibilizados, especialmente pela FAPEG, FAPESP, FAPEMIG e CNPq. Isso pode ser considerado um marco na história da pesquisa científica em Goiás e no Brasil. Paralelamente, em Goiás,

foram criadas outras redes envolvendo pesquisadores de diferentes instituições goianas, UFG, UEG, AGRODEFESA e EMBRAPA, com a finalidade estudar a questão residual de medicamentos, efluentes pecuários, herbicidas e resíduos urbanos, bem como a conservação de recursos naturais, envolvendo a proteção da flora, fauna e recursos hídricos.

Mas, é preciso se conscientizar que os recursos naturais, pela ação irresponsável do homem em termos gerais estão se esgotando, necessitando de ações governamentais urgentes para minimizar os prejuízos ambientais decorrentes de tal hostilidade praticada, sobretudo contra as plantas medicinais. Portanto, é premente que campanhas educativas sejam veiculadas nos diversos órgãos de divulgação disponíveis, em especial com a finalidade de preparar o homem para a exploração sustentável dos recursos naturais.

Finalmente, espera-se que os resultados obtidos nesse estudo possam servir como base para o surgimento de maiores pesquisas envolvendo a utilização desses dois fármacos, tanto em relação ao estudo de novas técnicas ou aprimoramento dessas aqui utilizadas. Sugere-se ainda pesquisas adicionais no sentido de uma compreensão mais exaustiva dos mecanismos específicos desencadeados pelo barbatimão e pela quitosana. Caso esses estudos se concretizem poderiam conferir subsídios visando a instituição de terapias baseadas em fenômenos específicos da cicatrização, o que aumentará a eficiência dos protocolos e, conseqüentemente, a expectativa e qualidade de vida de animais acometidos.