

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



TESE

**Caracterização citotóxica e cicatricial dos extratos  
de *Triticum aestivum* e *Copaifera* sp.**

**Mariana Teixeira Tillmann**

Pelotas, 2014

**MARIANA TEIXEIRA TILLMANN**

**Caracterização citotóxica e cicatricial dos extratos de *Triticum aestivum* e  
*Copaifera* sp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Sanidade Animal).

Orientador: Márcia de Oliveira Nobre

Pelotas, 2014

**Dados de catalogação na fonte:**

Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

**T577c**      **Tillmann, Mariana Teixeira**

**Caracterização citotóxica e cicatricial dos extratos de *Triticum aestivum* e *Copaifera* sp. / Mariana Teixeira Tillmann. – 59f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Clínica médica de pequenos e grandes animais. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2014. – Orientadora Márcia de Oliveira Nobre.**

**1.Veterinária. 2.Cães. 3.Copaíba. 4.Gatos. 5.Trigo. 6.Cicatrização. I.Nobre, Márcia de Oliveira. II.Título.**

**Banca examinadora:**

Prof. Dr. Márcia de Oliveira Nobre

Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Dr. Samuel Rodrigues Felix

Dr. Anelize de Oliveira Campello Felix

## **Agradecimentos**

Aos meus pais que sempre me proporcionaram as melhores condições para que eu estudasse e fosse uma profissional competente, claro sempre afirmando que “Um mundo melhor é possível”;

A minha família que sempre acreditou em mim;

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo nas horas boas e ruins, me apoiando e orientando em todas as decisões;

A Universidade Federal de Pelotas e todos os laboratórios que frequentei durante o período de pós-graduação;

Ao Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Rio Grande pela infraestrutura e disponibilidade durante todo o período de doutorado;

Aos colegas da pós-graduação que me aturam a anos;

A orientadora Márcia Nobre por acreditar no meu potencial e orientar as minhas decisões acadêmicas.

## Resumo

TILLMANN, Mariana Teixeira. **Caracterização citotóxica e cicatricial dos extratos de *Triticum aestivum* e *Copaifera* sp.** 2014. 59f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

Feridas cutâneas ocorrem com grande frequência em pequenos animais, devido a isso a validação terapêutica de produtos cicatrizantes em ensaios pré-clínicos são de suma importância para a realização de estudos clínicos na espécie alvo. Considerando isso objetivou-se realizar ensaios pré-clínicos para determinar a ação pró-cicatrizal dos extratos de *T. aestivum* e *Copaifera* sp. Os ensaios avaliaram a citotoxicidade de extratos vegetais e a cicatrização *in vivo* de feridas cutâneas durante 21 dias. No experimento *in vitro* com o *T. aestivum* foi observado que a dose de 2mg/mL foi citotóxica para as células e que doses até 10 mg/mL apresentaram viabilidade celular. As feridas de coelhos tratadas com essa dose apresentaram resultado superior as tratadas com 10 mg/mL. Esse dado foi possível, pois no tratamento com a menor dose não houve uma formação exacerbada de colágeno permitindo assim uma formação padrão do tecido epitelial. No estudo *in vitro* com a *Copaifera* sp. foi constatado que as doses seguras são as iguais e menores a 0,01%. No ensaio *in vivo*, com ratos, foi observado que as feridas tratadas com copaíba a 0,1% e 0,01%, aceleram o processo cicatricial nos primeiros dias, devido a maior contração da ferida. Porém ao final do período apresentavam qualidade cicatricial inferior que as feridas tratadas com solução fisiológica e vaselina. Concluiu-se que a dose do extrato *T. aestivum* a 2mg/mL é ideal para ensaios clínicos em cães e gatos. Com relação ao óleo resina de copaíba não foi constatada dose eficiente para experimentos clínicos.

Palavras –chave: Cães. Copaíba. Cicatrização. Gatos. Trigo.

## Abstract

TILLMANN, Mariana Teixeira. **Caracterização citotóxica e cicatricial dos extratos de *Triticum aestivum* e *Copaifera* sp.** 2014. 59f. Tese (Doutorado)- Programa de Pós Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas

Wounds in the skin area occur frequently in small animals. Consequently, the therapeutic validation of healing products in preclinical studies are critical to conducting clinical trials in the target species. This study aimed to perform preclinical studies to determine the healing action of different doses of *T. aestivum* extracts and *Copaifera* sp. The tests evaluated the cytotoxicity of phytotherapeutic and the *in vivo* healing of skin wounds for a period of 21 days. In the *in vitro* experiment with *T. aestivum* it was observed that a dose of 2mg/mL was cytotoxic to the cells and that higher doses showed cell viability. The wounds made in rabbits treated with the aforementioned dose presented a superior result to those treated with a 10 mg/mL dose. This outcome was feasible due to the fact that during the treatment with the lower dose there was not an excessive formation of collagen, thus allowing a standard epithelial tissue formation. It was found in the *in vitro* study with *Copaifera* sp. that the safe doses are the equal and less than 0.01%. In the *in vivo* assay with rats that wounds treated with copaiba at 0.1% and 0.01% have their healing process accelerated in the early days due to the higher wound contraction. However, in the scar quality, these wounds showed less results to those treated to saline and vaseline. It is possible to conclude that doses of *T. aestivum* extracts to 2 mg/mL. In relation to the copaiba oil resin, an efficient dose for clinical trials was not achieved.

Keywords: Cats. Copaiba. Dogs. Healing. Wheat.

## Lista de Figuras

### **Artigo 1 Tratamento e manejo de feridas cutâneas em cães e gatos- revisão de literatura**

Figura 1 Diferenças histológicas da pele em cães e gatos. A- Fotomicrografia do tecido cutâneo de um cão, demonstrando a maior espessura da epiderme (setas). B-Fotomicrografia do tecido cutâneo de um felino, demonstrando menor espessura da epiderme quando comparado com a de um cão e maior presença de histióctios (setas). (ClinPet- Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Clínica de Pequenos Animais-Faculdade de Veterinária- UFPel)..... 26

Figura 2 Lesão por trauma no membro anterior esquerdo em um canino SRD. Demonstrando a presença de granulação (seta branca) e epitelização (seta preta). (ClinPet- Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Clínica de Pequenos Animais- Faculdade de Veterinária- UFPel)..... 26

### **Artigo 2 *Triticum aestivum* em feridas cutâneas abertas: Citotoxicidade e histopatologia de colágeno**

Figura 1 Percentual de viabilidade celular em linhagem celular 3T6 referente as doses utilizadas (2mg/mL, 4mg/mL, 6mg/mL, 8mg/mL e 10mg/mL) para o tratamento com extrato aquoso de *T.aestivum* durante 48 horas.Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ )..... 39

Figura 2 Percentual de contração em feridas cutâneas abertas (HE) em coelhos tratadas com extrato aquoso de *Triticum aestivum* 2 mg/mL (T2), extrato aquoso de *Triticum aestivum* 10 mg/mL (T10) e creme não iônico (TC), nos dias sete, 14 e 21..... 40

Figura 3 Percentual de birefringência (picro sirius) em feridas cutâneas abertas em coelhos tratadas com extrato aquoso de *Triticum aestivum* 2 mg/mL (T2), extrato aquoso de *Triticum aestivum* 10 mg/mL (T10) e creme não iônico (TC) nos dias sete,14 2 21..... 41

**Artigo 3 Avaliação Citotóxica e Cicatricial da *Copaifera* sp.**

- Figura 1 Percentual de viabilidade celular em linhagem Vero referente as doses utilizadas (10%-0,00001%) para o tratatamento com extrato aquoso de *T.aestivum* durante 48 horas.Linha indica a viabilidade celular..... 48
- Figura 2 Presença dos parâmetros clínicos: crosta, exsudato e epitelização nas lesões dos grupos I ( tratadas com óleo-resina de copaíba 0,1%); grupo II (tratadas com óleo-resina e copaíba 0,01%); grupo III (tratadas com vaselina) e grupo IV ( tratadas com solução fisiológica a 0,9%) nos dias quatro, sete, 14 e 21. Os dados estão expressos em porcentagem das lesões apresentando cada parâmetro no respectivo dia. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ )..... 48
- Figura 3 Média da área ( $\text{mm}^2$ ) da contração em feridas cutâneas em ratos durante 21 dias, nas lesões dos grupos I ( tratadas com óleo resina de copaíba 0,1%); grupo II (tratadas com óleo resina de copaíba 0,01%); grupo III ( tratadas com vaselina) e grupo IV (tratadas com solução fisiológica a 0,9%) nos dias quatro, sete, 14 e 21. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ )..... 50

## Lista de Tabelas

### **Artigo 1 Tratamento e manejo de feridas cutâneas em cães e gatos- revisão de literatura**

Tabela 1	Classificação dos tipos de ferida de acordo com o seu grau de contaminação. Modificado <sup>28</sup> .....	24
Tabela 2	Classificação da camada primária de bandagens de acordo com o seu grau de absorção e formação de gel, considerando a sua utilização de acordo com a quantidade de exsudato presente na ferida e o tipo de desbridamento necessário. Modificado <sup>5,7,13,16</sup> .....	25

## Lista de Abreviaturas

$\mu\text{L}$	Microlitros
3R's	Redução, Refinamento e Substituição
BCRJ	Banco de Células da Universidade do Rio de Janeiro
DAD	Detector de Arranjos de Diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	Gramas
HE	Hematoxilina & Eosina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MEM	Meio essencial mínimo
mL	Mililitros
$\text{mm}^2$	Milímetros Quadrado
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-Difeniltetrazólio
SFB	Soro Fetal Bovino
<i>T.aestivum</i>	<i>Triticum aestivum</i>

## Sumário

1 Introdução .....	11
2 Objetivos .....	15
3.1 Artigo 1 Tratamento e manejo de feridas cutâneas em cães e gatos – revisão de literatura .....	16
3.2 Artigo 2 <i>Triticum aestivum</i> em feridas cutâneas abertas: Citotoxicidade e histopatologia de colágeno.....	27
3.3 Artigo 3 Avaliação Citotóxica e Cicatricial da <i>Copaifera sp.</i> ....	42
4 Metodologia da análise cromatográfica do artigo: use of <i>triticum aestivum</i> in open wound healing: a clinical, pathological, and tensiometric assessment in the rabbit model .....	55
5 Conclusão geral .....	56
6 Referências .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

Plantas com componentes bioativos são utilizadas, de forma empírica, desde os tempos pré-históricos. Em tempos recentes, estes compostos vem sendo isolados e sua ação farmacológica negada ou confirmada, descrita e padronizada (WANG et al, 2011). Por outro lado, a ideia difundida de que fitoterápicos são naturais e não causam danos à saúde resulta devido a falta de estudos toxicológicos em plantas medicinais (TUROLA & NASCIMENTO, 2006). Essa análise independe dos resultados farmacológicos e é imprescindível para o uso seguro dos extratos vegetais que se conheça as informações toxicológicas de cada fitoterápico (CUNHA et al., 2009).

A indústria farmacêutica possui interesse em formulações com compostos fitoterápicos devido a uma tendência mundial por alternativas ditas “naturais” aos produtos alopáticos, porém, esses não devem apresentar perda na eficácia dos produtos. (WANG et al., 2011). O Brasil possui uma condição ímpar na diversidade de sua flora, com o potencial de se tornar referência no setor, porém isso só vai ocorrer se os produtos gerados aqui passarem pelos exigentes critérios internacionais. Com isso, percebe-se a necessidade de pesquisas com os extratos vegetais quanto ao seu potencial tóxico antes de encaminhá-los ao mercado consumidor (MACIEL et al., 2002).

Com a intenção de utilizar o principio dos 3 R's (redução, refinamento e substituição de animais de laboratórios), e pela tendência mundial em diminuir a utilização de animais experimentais existe a alternativa da realização de testes de toxicidade *in vitro* (RAYMUNDO & GOLDIM, 2002). Dessa maneira refinando o estudo, para o uso futuro dessas doses nos ensaios *in vivo*, permitindo assim a redução no número de nos experimentos.

Entre as plantas presentes na flora brasileira e que possuem interesse medicinal encontram-se: *Triticum aestivum* (trigo) e a *Copaifera* sp. (copaíba) (PIERI et al., 2009; TILLMANN et al, 2014). A copaíba (*Copaifera* sp.) é uma árvore de grande

porte, encontrada principalmente na região norte do Brasil, da qual é extraída sua resina através de um corte realizado no tronco (PIERI et al., 2009). Os estudos desta resina demonstram a presença de compostos sesquiterpênicos e diterpênicos (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002; NASCIMENTO et al., 2012). O trigo é uma gramínea de ciclo anual sendo que a ação terapêutica dos seus extratos está relacionada com a presença de compostos fenólicos, as partes da planta utilizadas em estudos terapêuticos foram a planta íntegra, o gémem de trigo e as proteínas presentes na planta (MASTROIANI et al., 1998; COMIN-ANDUIX et al., 2002; HAMEL et al., 2006; TILLMANN et al., 2014).

Existem estudos conduzidos com essas plantas determinando algumas de suas ações farmacológicas, tais como: o efeito promotor da cicatrização, como agente anti-tumoral, assim como relatos de ação anti-inflamatória e na inibição de microrganismos. No entanto, existem lacunas do conhecimento quanto ao efeito cicatrizante e não constam pesquisas relacionando essa ação terapêutica com ensaios toxicológicos (MASTROIANI et al., 1998; BRITO et al., 1999; PAIVA et al., 2002; VIEIRA et al., 2008; PIERI et al., 2009; TILLMANN et al., 2014). O entendimento do processo cicatricial torna-se importante para a determinação da metodologia e de possíveis inovações a serem aplicada no estudo.

A cicatrização compreende um dinâmico processo celular e molecular que garante a restauração tissular (AQUINO et al., 2006; GARROS et al., 2006). No local lesionado ocorre a quimiotaxia de vários fatores de crescimento que controlam a deposição da matriz extracelular e a epitelização, sendo esse processo dividido nas fases de inflamação, proliferação e remodelação (MCNEES, 2006). Qualquer alteração nesses mecanismos pode determinar a formação de uma cicatriz hipertrófica ou da demora do processo cicatricial (ACKERMANN, 2005). Devido aos fatores que podem prejudicar o processo cicatricial, estudos que avaliem a citotoxicidade *in vitro* de fármacos com ação cicatrizante são cruciais para a determinação de resultados eficientes *in vivo* (WANG et al., 2011; IDRUS et al., 2012).

A fase de inflamação ocorre imediatamente após a injúria tissular, sendo caracterizada pela presença de polimorfonucleares devido à fagocitose de microorganismos e tecidos necrosados. A intenção dessa fase é de preparar o local

da lesão para a formação do novo tecido (MANDELBAUM, 2003). A fase de reparação é caracterizada pela angiogênese, proliferação celular e desenvolvimento do tecido de granulação. Sendo que o tipo celular predominante são fibroblastos que são responsáveis pela secreção de colágeno e conseqüentemente pela formação do tecido epitelial (ACKERMANN, 2005). A formação desse tecido é dependente da ocorrência do tecido de granulação, pois as células da camada basal da epiderme necessitam de um estrato adequado para poderem migrar em direção ao bordo oposto da lesão (BALBINO et al., 2005).

Na fase de maturação ocorrem transformações no tecido cicatricial tais como, diminuição progressiva da vascularização e dos fibroblastos. Conseqüentemente ocorre um aumento da força tênsil do tecido cicatricial, pois ocorre um alinhamento adequado e amadurecimento das fibras de colágeno. Essa fase é a mais longa de todo o processo, pois para ocorrer o alinhamento é necessário que as fibras sejam digeridas pela colagenase, ressintetizadas e se realinharem de acordo com a organização das fibras de tecido conjuntivo adjacente e ligar-se a estas lateralmente por ligações covalentes (MANDELBAUM, 2003; BALBINO et al., 2005; AQUINO et al., 2006).

Com o intuito de preconizar que o processo cicatricial mantenha o seu padrão fisiológico é importante que seja realizado previamente ao estudo ensaios de citotoxicidade *in vitro*, pois esse é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material permitindo assim o seu estudo pré-clínico (ROGERO et al., 2003). O parâmetro mais utilizado para avaliar a citotoxicidade é a viabilidade celular, a qual pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais, como o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio) (WANG et al., 2011). Dentre as linhagens celulares de mamíferos para a realização de ensaios de toxicidade *in vitro* a *African green monkey kidney* (Vero) é a preconizada para estudos de citotoxicidade em fitoterápicos (BRASIL, 2000 ).

No desenvolvimento desse estudo foi determinada a dose inócua de cada um dos fitoterápicos, através de teste de citotoxicidade. Ainda, foi definido a influência desses extratos no equilíbrio dos eventos que compõem a cicatrização, avaliando a proliferação de fibroblastos, assim como a resistência da cicatriz ao estiramento. Dessa maneira tendo uma dose padronizada para futuros ensaios clínicos em cães e gatos. Estudos globais que avaliem o *Triticum aestivum* e a *Copaifera* sp. determinando esses parâmetros (farmacológicos, citotoxicidade e pré-clínico) não

são encontrados na literatura, sendo assim essa tese aborda assuntos inédito além de alavancar e aprimorar os conhecimentos na área da fitoterapia.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral foi realizar avaliação do efeito citotóxico e cicatricial em feridas cutâneas tratadas com os extrato de *Triticum aestivum* (coelhos) e *Copaifera* sp (ratos). Com relação aos objetivos específicos foram: fazer análise química para identificação dos constituintes majoritários do *T. aestivum*; determinar o grau de citotoxicidade causados pelos extratos estudados em cultivo celular; avaliar no extrato de óleo resina de copaíba as fases cicatriciais em cada período do experimento *in vivo*, determinando a qualidade e a resistência do tecido cicatricial; analisar no extrato aquoso de *T. aestivum* o padrão e o tipo das fibras colágenas no tecido epitelial.

### **3 ARTIGOS**

#### **3.1 Artigo 1**

**Tratamento e manejo de feridas cutâneas em cães e gatos – revisão de literatura**

**Mariana Teixeira Tillmann, Samuel Rodrigues Felix, Cristina Pinto Mundstock, Giulia Bonfiglio Mucillo, Cristina Gevehr Fernandes, Márcia de Oliveira Nobre**

**Aceito pela revista Nosso Clínico**

**Tratamento e manejo de feridas cutâneas em cães e gatos – revisão de literatura**  
**Care and treatment for skin wounds in cats and dogs – a review**  
**Tratamiento y manejo de heridas cutâneas en perros y gatos – revisión de literatura**

Mariana Teixeira Tillmann, Samuel Rodrigues Felix, Cristina Pinto Mundstock, Giulia Bonfiglio Mucillo, Cristina Gevher Fernandes, Márcia de Oliveira Nobre

**Resumo:** As feridas cutâneas ocorrem por diversas causas e com grande frequência na clínica de pequenos animais, e devem ser classificadas conforme o seu tipo e o grau de contaminação para favorecer a definição terapêutica. O manejo adequado de injúrias tissulares cutâneas, sua avaliação individual e diária devem ser consideradas para o sucesso da terapia recomendada, em função das particularidades de cada espécie. Considerando as diferenças quantitativas e qualitativas na estrutura epitelial e na cicatrização em cães e gatos, estudos que avaliem o processo cicatricial e a metabolização de fármacos cutâneos entre as espécies são imprescindíveis para garantir a inocuidade e eficácia de um medicamento. Devido à casuística diversificada de feridas em cães e gatos e a dificuldade de acesso a trabalhos que relatem essas diferenças, realizou-se uma revisão sobre tratamento e as diferenças do processo cicatricial em cães e gatos.

**Unitermos:** cicatrização, pequenos animais, medicamentos

**Abstract:** In small animal veterinary practice, skin wounds are frequent, and occur due to several different causes. These wounds are classified according to the cause and degree of contamination, in order to aid the clinicians in deciding an appropriate treatment strategy. Management of these wounds must account for structural differences of the skin of cats and dogs, though they rarely do. Studies that assess the healing process and different drug metabolization among these species are essential to ensure therapeutic success. Due to the diverse causes of skin wounds in dogs and cats, and the lack of access to studies that compare these two species regarding this subject, this paper reviews the differences in the wound healing process of cats and dogs, with particular focus on their treatments.

**Key Words:** healing, small animals, drugs

### Resumen

Heridas cutâneas ocurren debido a diversas causas y con gran frecuencia en pequeños animales, y deben ser clasificadas de acuerdo a su tipo y grado de contaminación para favorecer el entorno terapéutico. El manejo adecuado de injurias tisulares cutâneas, su evaluación individual y diaria se debe considerar para éxito de la terapia recomendada, en función de las particularidades de cada especie. Teniendo en cuenta las diferencias cuantitativas y cualitativas en la estructura epitelial y la cicatrización en las especies, estudios que evalúen el proceso de curación y el metabolismo de los fármacos cutâneos entre especies son esenciales para garantizar la inocuidad y la eficacia de un medicamento. Debido a la casuística diversificada de heridas éstos especies y la dificultad de acceso a trabajos que relaten esas diferencias, se realizó una revisión sobre la cicatrización y tratamiento de heridas cutâneas en perros y gatos.

Palabras clave: Curación, Pequeños animales, Medicamentos

### INTRODUÇÃO

O sistema tegumentar é fundamental para manter a integridade do organismo, sendo uma barreira protetora cuja estrutura é altamente variável entre as espécies animais<sup>11,31,34,35</sup>. A descontinuidade desse sistema, após uma injúria, desencadeia o processo cicatricial que consiste em uma cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido, sendo dividido nas fases de inflamação, proliferação e maturação<sup>24</sup>. O manejo adequado de injúrias tissulares cutâneas determina a qualidade cicatricial e a homeostase do órgão, sendo assim, para o êxito no tratamento de feridas deve ser considerada a dinâmica do processo cicatricial assim como as diferenças anatomo- histológicas entre as espécies<sup>5,20</sup>.

As feridas cutâneas ocorrem com grande frequência na clínica de pequenos animais, sendo ocasionados por diversas causas tais como: cirurgias, traumas, neoplasias, entre outros. Na medicina humana a cicatrização de feridas é considerada um problema social e existem diversos trabalhos sobre o assunto, considerando diferenças entre etnias e idades, além de inúmeros estudos com fármacos novos e inovadores, com utilização exclusiva para essa espécie<sup>15,16,21,28,32</sup>.

Na medicina veterinária foi verificada uma pequena quantidade de trabalhos sobre fármacos aplicados especificamente a pequenos animais, e ainda em menor volume pesquisas relatando diferenças entre a cicatrização de cães e gatos<sup>3,5,6,13</sup>. Devido à casuística diversificada de feridas em

pequenos animais, e à dificuldade de acesso a literatura relatando as diferenças no processo cicatricial em cães e gatos, demonstra-se a necessidade de um estudo específico, para tanto desenvolvemos o presente artigo com o objetivo de revisar a bibliografia em periódicos nacionais e internacionais referente à cicatrização de feridas cutâneas nesses animais.

### ASPECTOS ESTRUTURAIS E ANATOMO-FISIOLOGICOS DA PELE EM CÃES E GATOS

Quanto à estrutura histológica da pele de pequenos animais, há evidências de diferenças com relação à espessura da epiderme, a qual nos cães é mais espessa, e no que diz respeito à derme dos gatos, que possui uma maior quantidade de histiócitos (Figura 1). Essas particularidades possivelmente afetem a absorção e metabolização dos fármacos, visto que há diferenças no perfil de barreiras físico-químicas cutâneas assim como da sua metabolização devido ao diferencial de células no tecido<sup>12,23</sup>. Adicionalmente foi observado que a microcirculação cutânea ao redor de suas feridas de caninos é mais dinâmica que em gatos<sup>5,6,31</sup>.

**Figura 1-** Demonstração das diferenças histológicas da pele em cães e gatos. A- Fotomicrografia do tecido cutâneo de um cão, demonstrando a maior espessura da epiderme (setas). B- Fotomicrografia do tecido cutâneo de um felino, demonstrando menor espessura da epiderme quando comparado com a de um cão e maior presença de histiócitos (setas). (ClinPet- Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Clínica de Pequenos Animais- Faculdade de Veterinária- UFPel)

### PROCESSO CICATRICAL

A cicatrização de feridas em caninos e felinos difere em inúmeros aspectos e para a compreensão desse processo é necessário o conhecimento histológico do tecido cutâneo e das estruturas relacionadas a esse, além do entendimento global do processo cicatricial. A fase inflamatória ocorre imediatamente após a injúria tissular, e tem como objetivo realizar fagocitose de microorganismos e tecidos necrosados deixando o local da lesão preparado para a formação de um novo tecido<sup>20</sup>. Na fase proliferativa, ocorre a contração da ferida devido à mitose celular que proporciona o desenvolvimento do tecido de granulação e a posterior epitelização da ferida<sup>4</sup> (Figura 2). A fase de maturação é caracterizada pelas transformações no tecido neoformado tais como: diminuição progressiva da vascularização e dos fibroblastos, aumentando a força tênsil devido à maturação e reorientação das fibras de colágeno<sup>2,20</sup>.

**Figura 2-** Lesão por trauma no membro anterior esquerdo em um canino SRD. Demonstrando a presença de tecido de granulação (seta branca) e epitelização (seta preta). (ClinPet- Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Clínica de Pequenos Animais- Faculdade de Veterinária- UFPel)

### PARTICULARIDADES DO PROCESSO CICATRICAL EM CÃES E GATOS

As diferenças quantitativas e qualitativas no processo cicatricial em cães e gatos<sup>5</sup> podem ser evidenciadas desde a fase de inflamação, que nos felinos apresenta-se menos intensa, na contração e na epitelização da ferida que ocorrem mais tardiamente. Embora a contração da lesão tissular em felinos seja mais lenta no início do processo cicatricial, aos 21 dias essa é mais intensa que em cães<sup>6</sup>. Além da distinção cronológica ocorrem contrastes com relação à morfologia do tecido de granulação e da tensão das feridas entre as espécies. Nos felinos, o tecido de granulação é mais claro, sendo que pode ser difícil a sua visualização. Já em cães, tanto as feridas abertas em fase de maturação, como as cirúrgicas, aos sete dias de tratamento apresentaram-se com maior tensão<sup>6</sup>. As principais diferenças entre as espécies ocorrem no início do processo cicatricial, sendo assim possível afirmar que a cicatrização de feridas em gatos é mais lenta que em cães, pois conforme a literatura, as diferenças entre tratamentos no processo cicatricial tem que ser notáveis nos primeiros dias do processo (10-15 dias), já que após esse período ocorre o nivelamento dos parâmetros<sup>13</sup>.

Dessa forma, reconhecendo que o processo cicatricial em felinos é mais lento que em cães e que são processos diferenciados, se justifica o fenômeno conhecido como “*false healing*” (cicatrização falsa). Esse fenômeno refere-se ao procedimento de deiscência completa ao retirar os pontos de uma ferida cirúrgica aparentemente saudável e cicatrizada, assim que o animal retorna a sua movimentação normal. Esse processo é relatado com certa regularidade em felinos e raro em caninos e sua etiologia ainda precisa investigada, pois a literatura sobre a cicatrização de feridas em gatos é escassa<sup>5,6,34</sup>. A ocorrência deste evento provavelmente está vinculada ao fato das feridas em gatos serem tratadas da mesma maneira que em cães, devido ao desconhecimento da sua estrutura tegumentar ser mais frágil que em cães.

Como pode ser visto, existem várias peculiaridades da cicatrização que diferem entre cães e gatos, sendo que as particularidades relacionadas ao arranjo cronológico do processo cicatricial entre as espécies podem ser explicadas pela anatomia dos vasos sanguíneos entre elas, pois, o maior

aporte sanguíneo dos cães pode determinar a cicatrização em período mais curto que nos felinos<sup>5,6</sup>. Outro fator no qual o padrão de vascularização dos felinos pode interferir é na coloração pálida do tecido de granulação, o qual é constituído por angiogênese e proliferação de fibroblastos<sup>1,17</sup>. A maior tensão das feridas em cães provavelmente está relacionada com uma distinção na histologia das fibras elásticas e colágenas entre as espécies. Acredita-se que os cães possuam maior percentual de fibras colágenas e menor de elásticas, porém não há estudos que comprovem essa hipótese<sup>5,6</sup>. Da mesma forma, os felinos são animais ágeis dependendo de alta mobilidade, o que justificaria um maior percentual de fibras elásticas e menor de colágenas<sup>5</sup>.

## CARACTERÍSTICAS DAS FERIDAS

### Tipos de Feridas

Além da divisão das fases cicatriciais, as feridas são classificadas conforme o tipo (cirúrgicas e traumáticas) e o grau de contaminação (Tabela 1), sendo importante a determinação desses tipos para a definição terapêutica. São consideradas cirúrgicas, as feridas induzidas de maneira asséptica por um instrumento cirúrgico cortante. As traumáticas estão associadas a uma ação mecânica que proporciona uma lesão séptica com superfície irregular<sup>22</sup>. Em pequenos animais as lesões traumáticas são bastante frequentes, principalmente as decorrentes de mordidas e atropelamentos, as quais são consideradas contaminadas/infectadas. O tratamento dessas exige a administração de antibiótico sistêmico (Tabela 1). Com relação às feridas cirúrgicas, o manejo é mais simples, pois se trata de uma lesão por primeira intenção<sup>21</sup>. Por outro lado, a ressecção de neoplasias cutâneas está entre as causas mais comuns de feridas cirúrgicas abertas, devido à necessidade de excisão ampla para permitir a presença de margens livres de células neoplásicas. Todavia as técnicas de retalho cutâneo possibilitam ao cirurgião a excisão de margens de segurança, adequadas ao redor de toda a formação cutânea, e a certeza da oclusão do defeito anatômico<sup>29</sup>.

**Tabela 1**-Classificação dos tipos de feridas de acordo o seu grau de contaminação. Modificado<sup>28</sup>

### Feridas Traumáticas

As feridas cutâneas referentes a traumas em pequenos animais ocorrem com maior frequência na porção anterior do corpo, principalmente nos membros, pescoço e cabeça<sup>26,27</sup>. Na literatura veterinária as feridas são caracterizadas como contaminadas e/ou infectadas em função da sintomatologia clínica e também pelo seu tempo de evolução (Tabela 1). No entanto, há divergências com relação a esses períodos<sup>26,28</sup>.

Com relação à incidência das feridas traumáticas, não existem estudos relatando qual espécie é mais acometida. Existem diversos trabalhos sobre feridas traumáticas nos quais são globalizadas as espécies canina e felina<sup>5,16,28</sup>, porém os estudos individuais são mais prevalentes nos cães<sup>3,26,30</sup>. Entretanto, o recente interesse em cicatrização de feridas em felinos tem gerado novos estudos e consequentemente disponibilidade de literatura sobre o manejo de feridas traumáticas somente em gatos<sup>19</sup>.

## MANEJO DE FERIDAS CUTÂNEAS

### Tratamento

Devido às divergências quanto à classificação de feridas contaminadas/infectadas, ocorre uma dificuldade em se determinar um tratamento padrão. Sendo assim, para a escolha da intervenção terapêutica de uma ferida é necessário avaliar o estado geral do paciente; o manejo hospitalar e domiciliar correto, além do mais importante: a avaliação clínica diária da evolução da cicatrização, pois a terapêutica deve ser realizada de acordo com a sintomatologia<sup>7</sup>.

De maneira geral, pacientes com feridas cirúrgicas (primeira intenção) e os que estão hígidos e com presença de feridas abertas com tempo de evolução menor que 6 horas, necessitam de lavagem do local lesionado e observação do aspecto clínico diário, vários estudos relatam que a antibioticoterapia profilática é desnecessária nesses casos<sup>7,26,28</sup>. No caso de feridas contaminadas e/ou infectadas, a utilização de antibioticoterapia sistêmica é unânime, além de uma avaliação global dessa para verificar os procedimentos a serem realizados<sup>3,7,26,28</sup>. A realização de uma higienização asséptica da ferida é sempre aconselhável, seguida de possíveis intervenções cirúrgicas de acordo com o aspecto da lesão. Em casos de tecidos desvitalizados torna-se necessário a exérese e, quando houver avulsões, o correto é realizar a síntese do local com materiais não absorvíveis e com técnicas que possibilitem a menor tensão possível. Esses procedimentos são necessários para estabilizar o local lesionado, permitindo a cicatrização adequada. O tratamento diário dessas feridas deve ser realizado com antibioticoterapia sistêmica, lavagem diária e troca de curativos. Além disso, a

avaliação deve ser diária, pois com a evolução da cicatrização podem ocorrer modificações no manejo da ferida, bem como ser necessário recorrer novamente a procedimentos cirúrgicos<sup>3,7,27,28</sup>.

Com relação à antibioticoterapia sistêmica, a maioria dos trabalhos relata que as bactérias presentes em feridas infectadas/contaminadas apresentam sensibilidade *in vitro* à amoxicilina com clavulanato de potássio<sup>3,7,26</sup>. No caso de terapia antimicrobiana empírica não responsiva há três dias, torna-se necessário a realização de cultura microbiológica, antibiograma e administração da terapia de acordo com o exame. No entanto, o mais correto seria a realização desse exame ao início do tratamento, para garantir a sua efetividade e evitar a multirresistência bacteriana aos antibióticos. Atualmente, com a intenção de se evitar a multirresistência tem se estudado possíveis ações bactericida/bacteriostático em fitoterápicos, no entanto a maior parte dos estudos quanto a essa ação dos extratos vegetais são *in vitro*, não afirmando se possuem ação *in vivo*<sup>18</sup>.

Para a lavagem diária da ferida, essa deve ser realizada sob pressão, podendo ser utilizado um antisséptico gluconato de clorexidine a 0,05%, promovendo assim a anti-sepsia e desbridamento mecânico do local lesionado. Dentre os antissépticos, o mais recomendado é o gluconato de clorexidine a 0,05%, pois possui ação bactericida eficiente e atua de maneira satisfatória na cicatrização<sup>27,33</sup>.

### Bandagens

As bandagens são envoltórios ao redor da ferida que permitem a sua proteção, auxiliando assim no processo cicatricial e minimizando a dor. Essas são divididas em camadas primárias, secundárias e terciárias, sendo que as primeiras são as que entram em contato direto com a ferida devendo ser de material estéril. As demais permitem a fixação, proteção e imobilização da primária. A secundária ainda tem por função absorver o exsudato que a primária não suportou. Existem diversos materiais/medicamentos que podem ser utilizados na camada primária, devendo essa escolha ser cautelosa e de acordo com o estado da lesão. Para a camada secundária e terciária os materiais porosos que permitam a evaporação do exsudato não absorvido pela primária são ideais<sup>7,8,14,16</sup>.

Embora as bandagens, tenham o propósito de auxiliar o processo cicatricial, a sua utilização em felinos deve ser cuidadosa, pois alguns materiais utilizados podem estressar o paciente deixando-o agitado e impaciente, dificultando o manejo da ferida. Para evitar isso, o material de escolha deve ser o mais leve possível e que interfira o mínimo possível na mobilidade do animal, além disso, é importante um bom controle para dor e possíveis sudações a cada troca de curativo<sup>7</sup>.

Com relação ao manejo da ferida, mesmo com a presença de bandagens é importante a utilização de colar elizabetano, evitando assim a sua mutilação. As trocas das bandagens devem ser realizadas da maneira mais asséptica possível para evitar possíveis contaminações. É importante que até a granulação do leito da ferida as trocas sejam realizadas pelo veterinário ou por seu assistente, não devendo ocorrer em ambiente domiciliar<sup>7,9</sup>.

De uma maneira geral o tratamento deve considerar a quantidade de exsudato presente na ferida e a necessidade de desbridamento. Quando a ferida tiver grande quantidade de exsudato deve ser escolhido uma terapia absorvente e, conforme esse for diminuindo, deve ser alterado para um que umidifique a ferida, pois feridas úmidas tendem a cicatrizar melhor e apresentam melhor efeito estético. Com relação ao desbridamento, a sua intensidade deve estar relacionada com a quantidade de tecido desvitalizado e necrosado. Assim que esse tecido for minimizado deve-se optar por tratamentos com ausência de desbridamento. O tipo ideal seria o autolítico, pois é seletivo e não lesiona o tecido neoformado. Na fase de proliferação de feridas o ideal é a escolha de tratamentos não absorventes e que promovam a granulação e epitelização da ferida, porém deve ser mensurada a quantidade de exsudato e aspecto antes da escolha de terapias não absorptivas<sup>8,16</sup>.

A maioria dos tratamentos absorventes forma um gel, sendo resultado da troca de meios com o exsudato presente na ferida facilitando a drenagem desta, porém deve-se ter cuidado no momento da avaliação desse gel, pois ele tem coloração amarelada e odor característico podendo ser confundido com infecção na ferida<sup>7,8</sup>. Devido a dificuldade em encontrar a intervenção terapêutica ideal, foi realizado um esquema (Tabela 2) para orientar a escolha da terapia de acordo com o tipo de lesão, porém esse tratamento não deve ser utilizado durante todo o período cicatricial. A resolução da ferida com um aspecto estético e com tecido saudável requer avaliação diária e modificações na terapia sempre que forem necessárias<sup>7,13,16,28</sup>.

**Tabela 2-** Classificação da camada primária de bandagens de acordo com o seu grau de absorção e formação de gel, considerando a sua utilização de acordo com a quantidade de exsudato presente na ferida e o tipo de desbridamento necessário. Modificado<sup>5,7,13,16</sup>.

Com relação aos diversos tipos de medicamentos/materiais para a camada primária foi verificada a presença de resultados diferentes para a mesma terapia quando consultada a literatura veterinária, dificultando assim a afirmação de qual seria o mais eficaz<sup>7,14,16,28</sup>. Além disso, os trabalhos delimitando a intervenção terapêutica para a cicatrização são basicamente em cães, ou globalizando as duas espécies, prejudicando assim a escolha da terapia para felinos. Considerando as diferenças na estrutura do tecido epitelial e na cicatrização entre as duas espécies, estudos que avaliem a metabolização de fármacos cutâneos entre as espécies são imprescindíveis para o veterinário, pois, para garantir a inocuidade e eficácia de um medicamento, é necessário considerar a individualidade de cada espécie<sup>5,7,9,25</sup>.

### Manejo de Feridas Cirúrgicas

As feridas cirúrgicas necessitam de lavagem diária, preferencialmente com gluconato de clorexidina 0,05%, conforme descrito anteriormente, e de avaliação clínica constante para verificar possíveis hemorragias, deiscências, seromas e/ou hematomas. Os animais devem ser mantidos com colar elizabetano até a retirada dos pontos. Em casos de cirurgias nas quais a exérese de tecido cutâneo for mais extensa é recomendado a utilização de malhas cirúrgicas. As malhas cirúrgicas irão realizar a compreensão do tecido, prevenindo consequências pós-operatórias indesejáveis. Contudo, mais uma vez é necessário ter atenção com os pacientes felinos devido ao fenômeno de “*false healing*”. Os estudos recomendam a manutenção dos pontos por um período mais longo em felinos, principalmente em locais de maior tensão e movimentação. Outra recomendação seria a realização de sutura de alívio e da utilização de produtos veterinários que auxiliem na cicatrização<sup>5,6,7,19</sup>.

### Conclusão

A cicatrização de feridas cutâneas é um processo dinâmico e individual para cada espécie animal, havendo variações no processo cicatricial entre cães e gatos. A principal diferença entre essas espécies se refere ao tempo do processo cicatricial, que em felinos é mais lento do que em cães. Devido a isso, bem como ao caráter individual de cada ferida, torna-se necessário avaliar cada caso e espécie para determinar os procedimentos e fármacos ideais, considerando as variações entre espécies e lesões. Ainda assim, tanto em cães quanto em gatos, as avaliações do processo cicatricial devem ser realizadas diariamente até a resolução do processo, permitindo mudanças terapêuticas assim que essas se tornarem necessárias. A avaliação diária é essencial, pois o acompanhamento por um veterinário garante a eficácia do processo cicatricial, sendo este profissional capacitado para intervir, sempre que houver necessidade. Esse profissional deve buscar estar sempre atualizado, tanto nas novidades terapêuticas como nas diferenças do processo cicatricial, podendo assim conduzir corretamente as intervenções ao longo do tratamento.

### AGRADECIMENTOS

A Capes e ao CNPq (CNPq 305072/2012-9) pela concessão de bolsa e auxílio financeiro.

### REFERÊNCIAS

- 1-ACKERMANN, M. R. Inflamação crônica e cicatrização de feridas. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. Elsevier, 2009. Capítulo 4, p.175-177.
- 2- AQUINO, J. U.; CZECZKO, N. G.; MALAFAIA, O.; DIETZ, U. A.; RIBAS-FILHO, J. M.; NASSIF, P. A. N.; ARAÚJO, U.; BORONCELLO, J.; SANTOS, M. F. S.; SANTOS, E. A. A. Avaliação fitoterápica da *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de suturas na parede abdominal ventral de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, n.2, p.61-66, 2006.
- 3-ARIAS, M. V. B.; BATTAGLIA, L. A.; AIELLO, G.; CARVALHO, T. T.; FREITAS, J. C. Identificação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de cães e gatos com feridas traumáticas contaminadas e infectadas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n.4, p.861-874, 2008.
- 4-BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, p.27-51, 2005.
- 5-BOHLING, M. W.; HENDERSON, R. A. Differences in Cutaneous Wound Healing Between Dogs and Cats. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.36, n.4, p.687-692, 2006.
- 6-BOHLING, M. W.; HENDERSON, R. A.; SWAIN, 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**, v.33, n.6, p.579-587, 2004.
- 7-CAMPBELL, B. G. Dressings, Bandages, and Splints for Wound Management in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics Small Animals Practice**, v. 36, n.4, p.759-791, 2006.

- 8-CANDIDO, L. C. Livro do Feridólogo-Tratamento clínico-cirúrgico de feridas cutâneas agudas e crônicas.** Santos: Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Tratamento de Feridas, 2006.
- 9-CARR, M. Wound cleansing: sorely neglected?.** *Primary Intention*, v.14, n.4, p.150-161, 2006.
- 10-COLÉGIO AMERICANO DE CIRURGIÕES. Definição de classificação de feridas.** Disponível em: <http://www.facs.org>. Acesso em: 01 dez. 2014
- 11-CONCEIÇÃO, L. G.; LOURDES, F. H.; CLEMENTE, J. T.; FABROS, V. E. Biópsia e histopatologia da pele: um valioso recurso diagnóstico na dermatologia -revisão- Parte 1. *Clínica Veterinária*, v.9, n.51. p.36-44, 2004.**
- 12- DIAS, A.T.N.;NUNES, P. B.; COELHO, H. L. L.; SOLÉ, D. Reações alérgicas a medicamentos. *Jornal de Pediatria*, v.80, n.4, p.259-266, 2004.**
- 13- FAHIC, M. A.; SHETTKO, D. Evidence-Based Wound Management: A Systematic Review of Therapeutic Agents to Enhance Granulation and Epithelialization. *Veterinary Clinics Small Animals Practice*, v.37, n.3, p.559-577, 2007.**
- 14-GOMEZ, J. H.; HANSON, R. R. Use of Dressings and Bandages in Equine Wound Management. *Veterinary Clinics Equine Practice*, v.21, n.1, p.91-104, 2005.**
- 15- GUNASEKARAN, T.; NIGUSSE, T.; DHANARAJU, M. D. Silver Nanoparticles as Real Topical Bullets for Wound Healing. *Journal of the American College of Clinical Wound Specislits*, v.3, n.4, p.82-96, 2012.**
- 16-HUPPES, R. R.; VIEIRA, E. R.; PAZZINI, J. M.; NARDI, A. B.; MINTO, B. W.; SANTALUCIA, S.; AMORIM, R. L.; CASTRO, J. L. C. Manejo de feridas abertas em cães e gatos. *Jornal Brasileiro de Medicina Veterinária*, v.5, n.2, p.24-34, 2013.**
- 17- JÚNIOR, A. M. R.; ANDRADE, L. C. F.; OLIVEIRA, R. G.; AARESTRUP, F. M.; FARIAS, R. E. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.81, n.2, p.150-156, 2006.**
- 18- LAVOR, A. K. L. S.; MATIAS, E. F. F.; ALVES, E. F.; SANTOS, B. S.; FIGUEREDO, F. G.; LIMA, L. F.; LEITE, N. F.; SOUZA, C. E. S.; ANDRADE, J. C.; ALENCAR, L. B. B.; BRITO, D. I. V.; ALBUQUERQUE, R. S.; COUTINHO, H. D. M. Association between drugs and herbal products: *In vitro* enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae). *European Journal of Integrative Medicine*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eujim.2014.03.002>**
- 19- MALIK, R.; NORRIS, J.; WHITE, J.; JANTULIK, B. Wound Cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.8, n.2, p.135-140, 2006.**
- 20- MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P. D.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte I. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 4. p. 393-410, 2003.**
- 21-MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P. D.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte II. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 5. p. 525-542, 2003.**
- 22- MARIN, H. F.. Cipe Versão 2- Classificação Internacional para a Prática de Enfermagem, 2 ed.São Paulo:Algol, 2011.**
- 23- MARTINS, M. F. R. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.38, n.1, p.33-54, 2002.**
- 24-MCNESS, P. Skin and wound assessment and care in oncology. *Oncology nursing*, v.22, n.3, p.130-143, 2006.**
- 25-MEDEIROS, R. J.; MONTEIRO, F. O.; SILVA, G. C.; JÚNIOR, A. N. Casos de intoxicação exógenas em cães e gatos atendidos na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense durante o período de 2002 a 2008. *Ciência Rural*, v.39, n.7, p.2105-2110, 2009.**
- 26-MOURO, S.; VILELA, C. L.; NIZA, M. M. R. E. Clinical and bacteriological assessment of dog-to-dog bite wounds. *Veterinary Microbiology*, v.144, n.9, p.127-132, 2010.**
- 27-PAVLETIC, M. M.; TROUT, N. J. Bullet, Bite, and Burn Wounds in Dogs and Cats. *Veterinary Clinics Small Animals Practice*, v.36, n.4, p.873-893, 2006.**
- 28-PEREIRA, A. M.; ARIAS, M. V. B. Manejo de feridas em cães e gatos – revisão. *Clínica Veterinária*, v.38, n.?, p.33-35, 2002.**
- 29-SAKUMA, S. H.; MATERA, J. M.; VALENTE, N. S. Estudo clínico sobre aplicação do retalho cutâneo pediculado em cirurgia oncológica no cão. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*,v.40, n.1, p.32-37, 2003.**
- 30-SHAMIR, M. H.; LEISNER, S.; KLEMENT, E.; GONEN, E.; JOHNSTON, D. E. Dog Bite Wounds in Dogs and Cats: a Retrospective Study of 196 Cases. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, v.49, n.2, p.107-112, 2002.**

- 31-SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L.** Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n.2, p. 177-190, 2009.
- 32-TANDON, N.; CIMETTA, E.; VILLASANTE, A.; KUPFERSTEIN, N.; SOUTHALL, M. D.; FASSIH, A.; XIE, J.; SUN, Y.; NOVAKOVIC, G. V.** Galvanic microparticles increase migration of human dermal fibroblasts in a wound-healing model via reactive oxygen species pathway. **Experimental Cell Research**, v.320, n.1, p.79-91, 2013.
- 33-TILLMANN, M. T.; Anti-sépticos e Fitoterápicos na cicatrização de feridas.** 2011. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências – área de conhecimento: Sanidade Animal) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas
- 34-VOLK, S. W.; BOHLING, M. W.;** Comparative wound healing – Are the small animal veterinarian's clinical patients an improved translational model for human wound healing research?. **Wound Repair and Regeneration**,v.21, n.3, p.372-381, 2013.
- 35-WERNER, J.** Padrões dermahistopatológicos no diagnóstico dermatológico. **Clínica Veterinária**, v.13, n.73, p.38-42, 2008.

**Tabela 1-**Classificação dos tipos de feridas de acordo o seu grau de contaminação. Modificado<sup>28</sup>

<b>Grau de contaminação de feridas</b>	<b>Conceito</b>	<b>Tratamento</b>
<b>Limpa</b>	Ferida cirúrgica dentro dos padrões na técnica de anti-sepsia	Limpeza com gluconato de clorexidine a 0,05%; Avaliação diária;
<b>Contaminada</b>	Ferida Traumática com ausência de sinais clínicos de infecção (tempo de evolução de 6 a 12 horas)	Antibioticoterapia sistêmica; Limpeza diária; Tratamento da ferida de acordo com a sintomatologia; Avaliação diária;
<b>Infectada</b>	Ferida Traumática com presença de tecido desvitalizado e de exsudato purulento (tempo de evolução maior que 12 horas).	Antibioticoterapia sistêmica; Limpeza diária; Desbridamento; Exérese de tecidos desvitalizados; Síntese de avulsão de tecidos.

**Tabela 2-** Classificação da camada primária de bandagens de acordo com o seu grau de absorção e formação de gel, considerando a sua utilização de acordo com a quantidade de exsudato presente na ferida e o tipo de desbridamento necessário. Modificado<sup>5,7,13,16</sup>.

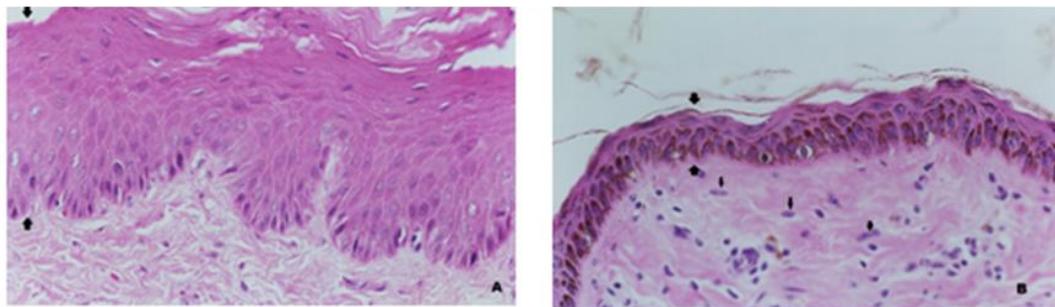
Tipo de camada Primária/ Quantidade de exsudato	Grau de absorção	Observações
Solução Hipertônica/ Alto	Alta Absorção* <sup>1</sup>	Não forma gel/ desbridamento não seletivo/ <b>Comentário:</b> Incrementa a circulação na ferida
Alginato de Cálcio/ Moderado- Alto		Forma gel, desbridamento autolítico. <b>Comentário:</b> Hemostático, promove granulação e epitelização
Polímeros naturais (amido)/ Moderado- Alto		Forma gel, desbridamento autolítico. <b>Comentário:</b> Promove granulação e epitelização
Gaze/ Moderado- Alto		Não forma gel, desbridamento mecânico (seco) e autolítico (úmida). <b>Comentário:</b> Risco de contaminação grande, ideal com 2 <sup>o</sup> camada
Espuma de poliuretano/ Moderado	Retém umidade	Tratamento absorvente, não forma gel, desbridamento autolítico. <b>Comentário:</b> ↑ epitelização, ↓ granulação, opção mais umidade
Hidrocoloíde/ Baixo- Moderado		Tratamento absorvente, forma gel, desbridamento autolítico. <b>Comentário:</b> ↑ granulação e epitelização, adere a área adjacente da ferida, pode atrasar a contração
Hidrogel/ Ausente- Baixo		Tratamento absorvente ou doador, forma gel, desbridamento autolítico. <b>Comentário:</b> ↑ granulação e epitelização, efeito variável na contração e na reidratação de feridas secas
Filme de Poliretileno/ Ausente- Mínimo		Tratamento não absorvente, não forma gel, desbridamento autolítico. <b>Comentário:</b> ↑ epitelização e não se adere ao tecido adjacente a ferida
Ausência de Tratamento/ Baixo	Poroso com baixo ou nenhuma absorção* <sup>2</sup>	Desbridamento mínimo. <b>Comentário:</b> ↑ epitelização e granulação se o leito da ferida estiver úmido
Impregnatos a base de petróleo/ Baixo- Ausente		Desbridamento mínimo. <b>Comentário:</b> Pode inibir a epitelização em alguns casos e tecido de granulação pode impregnar gaze
Colágeno de bovino hidrolisado*/ Baixo	Derivados de Matriz Extracelular* <sup>3</sup>	Não forma gel e não faz desbridamento. <b>Comentário:</b> Hidrofílico, ↑ a granulação
Intestino delgado ou submucosa de bexiga/ Baixo		Não forma gel e não faz desbridamento. <b>Comentário:</b> Específicos para alguns tipos de tecidos, antibacteriano, ↑ granulação

\* Caso o colágeno não esteja hidrolisado pode causar reação inflamatória.

\*<sup>1</sup> Não recomendado em feridas secas e nas que estão em fase de proliferação.

\*<sup>2</sup> Não absorvente e transferem exsudato para 2<sup>a</sup> camada, não formam gel.

\*<sup>3</sup> Cobre a 1<sup>a</sup> bandagem, apropriado para exsudato



**Figura 1-** Demonstração das diferenças histológicas da pele em cães e gatos. A- Fotomicrografia do tecido cutâneo de um cão, demonstrando a maior espessura da epiderme (setas). B- Fotomicrografia do tecido cutâneo de um felino, demonstrando menor espessura da epiderme quando comparado com a de um cão e maior presença de histiócitos (setas). (ClinPet- Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Clínica de Pequenos Animais- Faculdade de Veterinária- UFPel)



**Figura 2-** Lesão por trauma no membro anterior esquerdo em um canino SRD. Demonstrando a presença de tecido de granulação (seta branca) e epitelização (seta preta). (ClinPet- Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Clínica de Pequenos Animais- Faculdade de Veterinária- UFPel)

## **3.2 Artigo 2**

***Triticum aestivum* em feridas cutâneas abertas: Citotoxicidade e histopatologia  
de colágeno**

**Irá ser submetido a revista Research in Veterinary Science**

# ***Triticum aestivum* em feridas cutâneas abertas: Citotoxicidade e histopatologia de colágeno**

## **Resumo**

Objetivo foi avaliar a citotoxicidade de diversas doses de *T. aestivum* em linhagem de celular de fibroblasto, além de avaliar *in vivo* a contração da ferida, a formação do colágeno e seus tipos na cicatrização de feridas cutâneas tratadas com diferentes doses de *T. aestivum* durante 21 dias. Para isso foi realizado o teste de MTT em linhagem celular 3T6 e realizadas feridas em coelhos que foram tratadas *T. aestivum* 2mg/mL, *T. aestivum* 10 mg/mL e creme não iônico por 21 dias. O resultado *in vitro* demonstrou que a dose de 2mg/mL foi citotóxica para as células e que doses maiores apresentaram viabilidade celular. As feridas tratadas com essa dose apresentaram resultado superior as tratadas com 10 mg/mL. Esse dado foi possível, pois no tratamento com a menor dose não houve uma formação exacerbada de colágeno permitindo assim uma formação padrão do tecido epitelial.

**Key-Words:** *cicatrização, coelhos, picro Sirius, tricrômico de golmori, trigo*

## **1. Introdução**

A cicatrização de feridas cutâneas compreende um dinâmico processo celular e molecular que garante a restauração tissular (Mcnees, 2006). No entanto para que o tecido neoformado seja normotrófico e resistente é fundamental que esse processo ocorra de forma gradual (Wolfram *et al.*, 2009). Permitindo assim, a formação organizada do tecido conjuntivo culminando com uma fase de maturação com predomínio de fibras colágenas orientadas e do tipo I (Kahan, *et al.*, 2009 e Kim *et al.*, 2013).

25 Com o intuito de se obter uma cicatriz estética e resistente tem se estudado a  
26 ação terapêutica dos fitoterápicos (Krishanan, 2006 e Cesca et al., 2012). O trigo  
27 (*Triticum aestivum*), tem se distinguido entre as plantas com propriedades cicatriciais  
28 (Souza et al., 2006 e Tillmann et al, 2014), devido possuir ação antioxidante e  
29 fitoestimulinas que agem sobre os fibroblastos, estimulando a síntese de colágeno e  
30 glicosaminoglicanos (Mastroinanni et al 1988, Solárzono et al 2001, Tillmann et al,  
31 2014). Devido a isso esse trabalho teve por objetivo avaliar a citotoxicidade do *T.*  
32 *aestivum* (doses 2mg/mL, 4mg/mL, 6mg/mL, 8mg/mL e 10 mg/mL) em linhagem de  
33 celular de fibroblasto, além de avaliar a contração da ferida, a formação do colágeno  
34 e seus tipos na cicatrização de feridas cutâneas tratadas com diferentes doses de *T.*  
35 *aestivum* durante 21 dias.

## 36 2. Materiais e métodos

### 37 2.1. Obtenção do extrato

38 Para a realização do estudo foi utilizado um extrato aquoso de *T. aestivum*  
39 (Herbário PEL, número: PEL 24.600) obtido através da técnica de sonificação por  
40 ultra-som, utilizando 50 gramas de trigo em 500 ml de água destilada que foram  
41 mantidos em sonificação durante 30 minutos, após o extrato foi filtrado. Os  
42 componentes majoritários presentes no extrato eram: ácido carnósico (117 mg/g),  
43 caempferol (163 mg/g), quercetina (77 mg/g) e apigenina (38 mg/g).

44

45

### 46 2.2. Ensaio de citotoxicidade (*in vitro*)

47

48 A linhagem celular utilizada foi a 3T6, oriunda do Banco de Célula da  
49 Universidade do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio  
50 essencial mínimo (MEM), contendo 1% de solução antibiótica e acrescido de 8% de  
51 soro fetal bovino (SFB) e mantida em estufa umidificada a 37°C com atmosfera de  
52 5% de CO<sub>2</sub>. Após formarem a monocamada confluenta, alíquotas foram coletadas  
53 para realizar o subcultivo em placas com fundo chato de 96 cavidades, para a  
54 realização do teste do efeito citotóxico por 48 horas através do MTT (brometo de 3-  
55 (4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio).

56 As doses utilizadas no ensaio foram as de 2 mg/mL (2 µL do extrato aquoso  
57 de *T. aestivum* a 100mg/mL em 98 µL de MEM), 4 mg/mL (4 µL do extrato aquoso  
58 de *T. aestivum* a 100mg/mL em 96 µL de MEM), 6 mg/mL (6 µL do extrato aquoso  
59 de *T. aestivum* a 100mg/mL em 94 µL MEM), 8 mg/ mL (8 µL do extrato aquoso de  
60 *T. aestivum* a 100mg/mL em 92 µL de MEM) e 10 mg/mL (10 µL do extrato aquoso  
61 de *T. aestivum* a 100mg/mL em 90 µL de MEM). Os testes foram feitos em  
62 duplicadas, utilizando MEM como controle negativo (0 mg/mL), onde as células  
63 foram expostas a condições normais. A viabilidade celular foi obtida através do  
64 seguinte cálculo: média da absorbância dos tratados/ média dos controles x 100.

65

### 66 2.3. Ensaio *In vivo*

67

68 Esse estudo foi aprovado na comissão de ética e em experimentação animal  
69 da Universidade Federal de Pelotas (CEEA 5104-23110.005104\2009-13). Foram  
70 utilizados 13 coelhos Nova Zelândia, machos com peso variando entre 2-3 kg  
71 oriundos do Biotério Central da UFPel, mantidos em gaiolas individuais. Os animais  
72 receberam anestesia dissociativa (xilazina 5 mg/kg e quetamina 75 mg/kg) e foram

73 realizadas incisões com *punch* número oito, produzindo assim 78 feridas  
74 experimentais. Todos os animais foram medicados com analgésico (cloritrado de  
75 tramadol 2 mg/kg, 12-12 horas, por via sub-cutânea) após o procedimento cirúrgico,  
76 durante três dias (Schanaider; Silva, 2004).

77 As feridas foram aleatoriamente divididas em três grupos de acordo com os  
78 tratamentos, sendo denominados T2: as feridas tratadas com creme contendo  
79 extrato aquoso de *T. aestivum* na concentração de 2mg/mL, e T10 as tratadas com  
80 creme contendo extrato aquoso de *T. aestivum* 10mg/mL, e TC as tratadas com  
81 creme não iônico (controle). Os curativos eram realizados a cada 24 horas, sendo  
82 feita a limpeza da ferida com solução fisiológica 0,9% seguido dos tratamentos. Ao  
83 final dos curativos era realizada proteção das feridas com gaze hidrófila e malha  
84 cirúrgica que eram trocadas diariamente.

85 Aos sete, 14 e 21 dias do experimento os animais foram eutanasiados de  
86 acordo com a Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012 do CFMV e a área  
87 contendo a cicatriz foi dissecada e acondicionada de em frasco com formol a 10%  
88 sendo encaminhada para o Laboratório de Histologia-Instituto de Biologia da  
89 Fundação Universidade Federal do Rio Grande. No laboratório de histologia as  
90 amostras foram incluídas em parafina e seccionadas no micrótomo rotativo  
91 motorizado automático (Leica – RM2255), com espessura padronizada de 5 µm,  
92 sendo confeccionadas três cortes consecutivos para cada bloco. As lâminas foram  
93 coradas com hematoxilina e eosina (HE), tricrômico de gomori e picro sirius.

94

95

96 2.4 Análises histológicas

97 Nas lâminas de HE e tricrômico de gomori foram realizadas leitura  
98 quantitativa em microscópio óptico de campo claro, sendo avaliado a presença ou  
99 ausência da contração da ferida e das fibras colágenas e de sua organização,  
100 respectivamente. Já nas lâminas com o corante de picro sirius foram realizadas em  
101 microscópio de luz polarizada e obtidas imagens as quais foram analisadas através  
102 dos softwares *Image J*<sup>®</sup>. No software foi avaliado o percentual por área (em pixel)  
103 de colágeno tipo I, conforme Rich e Whittaker, 2005. Para a análise estatística dos  
104 resultados foi utilizado o teste de T (Graphpad) para o ensaio *in vitro*. Para avaliação  
105 das colorações de HE e tricrômico de gomori foi realizado o teste de Fischer  
106 (Graphpad), e nas de picrosirius foram avaliadas por Kruskal- Wallis (Statistic 9.0).

107

### 108 3. Resultados e Discussão

#### 109 3.1. Ensaio de citotoxicidade (*in vitro*)

110 Os resultados do ensaio *in vitro* demonstraram que somente as células  
111 tratadas com o extrato aquoso de *Triticum aestivum* a 2mg/mL diferiram do controle  
112 ( $p \leq 0,05$ ). Essa diferença ocorreu pelas células desse tratamento possuir menor  
113 viabilidade celular que o controle, e dos demais tratamentos (Figura 1).

#### 114 3.2. Ensaio *In vivo*

115 Nos resultados da contração da ferida com a coloração de HE foi observado  
116 nos grupos T2 e TC o fisiológico do processo cicatricial para esse parâmetro. Onde  
117 foi observado um aumento constante de feridas com contração e ao final do período  
118 com 100% das feridas apresentando oclusão da injúria tissular ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 2).  
119 No entanto, o grupo T10 não seguiu esse padrão, por possuir no início do processo  
120 cicatricial possuir superior (100%) presença de contração de feridas que os demais

121 grupos (Grupo T2: 50%;Grupo TC:87,5%) ( $p \geq 0,05$ ). Sendo esse resultado  
122 determinado devido a maior presença de crosta, no dia sete, que os demais grupos  
123 (T2: 75%; T10: 90%,TC: 42%). Entretanto no dia 14, essa análise regrediu sendo  
124 esse o grupo que apresentava o menor percentual de contração ( $p \leq 0,05$ ) (Figura 2).  
125 Esse fato ocorreu, pois, a crosta que realizava a contração total da ferida foi sendo  
126 substituída gradativamente por colágeno. Esse resultado pode ser observado na  
127 coloração de tricrômico de gomori onde no grupo T10, houve um aumento  
128 exacerbado da presença de colágeno total entre os dias sete (44,4%) e 14 (100%).

129 Com relação ao colágeno total, os resultados da coloração do tricrômico de  
130 gomori não demonstraram diferença estatística entre os grupos a cada dia avaliado  
131 ( $p \geq 0,05$ ). Nas lesões dos grupos T2 e T10, a formação de colágeno ao longo do  
132 período experimental foi mais constante e padronizada que no grupo TC. Nesses  
133 grupos as feridas obtiveram a formação dessa proteína característica com o  
134 processo fisiológico cicatricial, sendo que provavelmente permitiu a formação mais  
135 organizada do colágeno (Kahan *et al.*, 2009 e Kim *et al.*, 2013). Essa organização  
136 possivelmente se deve pela menor formação de crosta, e conseqüentemente  
137 formação gradual da proteína devido ao tecido estar hidratado, permitindo o fluxo e  
138 sinalização celular adequada para o local lesionado (Mandelbaum *et al.*, 2003 e  
139 Balbino *et al.*, 2005).

140 Na avaliação dos resultados dos tipos de colágeno, pode ser visualizado que  
141 no T2 houve presença de uma ferida com colágeno tipo III no dia sete, sendo que  
142 nos demais grupos, foi observado somente a presença de colágeno tipo I. Nas  
143 avaliações seguintes (dias 14 e 21) nas feridas de todos os grupos houve a  
144 presença constante de colágeno tipo I. Dessa forma pode ser observado que nas  
145 feridas do T2 houve uma formação do colágeno mais uniforme, seguindo o padrão

146 do processo de amadurecimento das fibras colágenas (Mandelbaum *et al.*, 2003 e  
147 Balbino *et al.*, 2005).

148 Ao longo do período experimental os grupos demonstraram resultados  
149 divergentes na formação de colágeno tipo I ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 2), sendo que no fim do  
150 experimento as feridas do T2 apresentavam maior frequência que os demais grupos  
151 (Figura 2) ( $p \geq 0,005$ ). No grupo T10, essa formação foi constante, porém nos grupos  
152 T2 e TC pode ser observado um declínio desse percentual do dia 14 para o sete  
153 (Figura 2). No entanto sabe-se que nessa coloração a fibrina e a queratina,  
154 constituintes da matriz extracelular, são coradas da mesma forma que o colágeno,  
155 devido possuírem birrefringência (Rich e Whittaker, 2005). Dessa forma, é possível  
156 que esse maior percentual de colágeno nas feridas tratadas com 2mg/mL e o  
157 controle, no dia sete, esteja vinculado à possuírem um maior percentual de matriz  
158 extracelular que as feridas do grupo T10. Como no dia 14, as feridas já estavam na  
159 fase proliferativa havendo basicamente a formação de colágeno, e consequente  
160 declínio da matriz extracelular (Mandelbaum *et al.*, 2003 e Balbino *et al.*, 2005).  
161 Houve esse decréscimo no percentual de pixel lido pelo programa, pois diminuiu a  
162 quantidade de material birrefringente nas amostras desses grupos.

163 Com os resultados obtidos foi observado que as feridas do grupo T2 tiveram  
164 resposta semelhante ao grupo controle, além de estarem mais próximas do padrão  
165 fisiológico cicatricial (Mandelbaum *et al.*, 2003 e Balbino *et al.*, 2005), fato que não foi  
166 observado nas feridas do grupo T10. Devido a esses fatores, e pela maior  
167 frequência de colágeno tipo I nas feridas do grupo I no dia 21 ( $p = \geq 0,05$ ), se justifica  
168 os resultados da maior tensão das feridas tratadas com extrato aquoso de *T.*  
169 *aestivum* a 2mg/mL em estudos anteriores (Tillmann *et al.*, 2014). Com relação ao  
170 motivo pelo qual o tratamento com a menor concentração do *T. aestivum* (2mg/mL)

171 tem apresentado resultados superiores que o de maior concentração (10 mg/mL),  
172 provavelmente se justifica pelo efeito citotóxico deste tratamento em linhagem de  
173 fibroblasto. Como os fibroblastos realizam a síntese de colágeno, o estímulo a sua  
174 produção ocasiona uma produção mais exacerbada e rápida do tecido, desta  
175 maneira não permitindo o alinhamento e maturação adequada do tecido (Kahan, *et*  
176 *al.*, 2009 e Kim *et al.*, 2013). No caso dele ser citotóxico, provavelmente leva a morte  
177 celular e conseqüentemente a diminuição dessa síntese permitindo dessa forma  
178 uma formação adequada e padronizada do tecido (Schreml *et al.* 2010 e Süntar *et*  
179 *al.* 2012)

#### 180 4. Conclusão

181 Com este estudo foi possível concluir que a dose de 2mg/mL do extrato aquoso de  
182 *T. aestivum* é citotóxica para a linhagem celular 3T6, enquanto doses até 10mg/ mL  
183 não apresentaram dano celular ao teste de MTT. As feridas cutâneas abertas em  
184 coelhos tratadas com extrato aquoso de *T. aestivum* 2 mg/ mL durante 21 dias  
185 apresentam resultado superior na avaliação cicatricial do que lesões tratadas com  
186 extrato aquoso de *T. aestivum* 10 mg/ mL.

187

#### 188 5. Agradecimentos

189 A Capes e ao CNPq (CNPq 305072/2012-9) pela concessão de bolsa e auxílio  
190 financeiro.

191

192

193

#### 194 6.Referências

- 195
- 196 Balbino, A., Pereira, M., Curi, R. *Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma*  
197 *revisão*. 2005. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 41, 27-51.
- 198 Cesca, G., Faqueti, G., Rocha, W., Meira, N., Meyre-Silva, C., Souza, M., Quintão,  
199 M., Silva, L., Cechinel Filho, V., Bresolin, B. 2012. *Antinociceptive, anti-*  
200 *inflammatory wound healing features in animal models treated with a semisolid*  
201 *herbal medicine based on Aleurites moluccana L. Willd. Euforbiaceae standardized*  
202 *leaf extract: Semisolid Herbal*. Journal of Ethnopharmacology 143, 2355–362.
- 203 CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA-CFMV. RESOLUÇÃO N°  
204 1000, de 11 de maio de 2012
- 205 Kahan, V., Andersen, M.L., Tomimori, J., Tufik, S. 2009. *Stress, immunity and skin*  
206 *collagen integrity*. Brain, Behavior, and Immunity 23, 1089-1095.
- 207 Kim, J., Carvalho, C., Souza, A., Gonçalves, C., Nogueira, V., Spolidório, C., Roque-  
208 Barreira C., Cirelli, A. 2013. *Topical application of the lectin Artin M accelerates*  
209 *wound healing in rat oral mucosa by enhancing TGF- $\beta$  and VEGF production*. Wound  
210 Repair and Regeneration. 21, 456-463.
- 211 Krishnan, P. 2006 *The scientific study of herbal wound healing therapies: Current*  
212 *state of play*. Current Anaesthesia & Critical Care 17,21-27
- 213
- 214 Mandelbaum, H., Di Santis, P., Mandelbaum, S. 2003. *Cicatrização: conceitos atuais*  
215 *e recursos auxiliares- Parte I*. Anais Brasileiro de Dermatologia 78, 393-410.
- 216

- 217 Mastroianni, A., Celleno, L., Borgia G., Cerimele, D. 1998. *Léstratto acquoso di*  
218 *“Triticum vulgare”- valutazione clinico-istologica Nei processi riparativi tissutali*  
219 *cutanei*. Giornale Italiano Dermatologia Venereologia 133,145-53.
- 220 Mcnes, P. *Skin and wound assessment and care in oncology*. 2006. Oncology  
221 Nursing 22,130-143.
- 222 Schanaider, A., Silva, P.C. 2004. *Uso de animais em cirurgia experimental*. Acta  
223 Cirúrgica Brasileira 19, 441-447.
- 224 Schreml, S., Rolf-Markus Szeimies, R., Lukas Prantl,L., Landthaler, M., Babilas,P.  
225 2010. *Wound healing in the 21st century*. Journal of American academy of  
226 Dermatology 63, 866-881.
- 227
- 228 Solórzano, O. T., Hurtado H. R., López J. L. V., Paquentín, J.Á., Garibay, M. V.  
229 2001.*Evaluación de la actividad reepitelizante del Triticum vulgare en la cervicitis*  
230 *crônica erosiva*. Revista de la Faculdade Medicina-UNAM, 44,79-83.
- 231 Souza, W., Machado, L,., Zoppa, V.,Cruz, F., Garague, P., Silva, C.2006.*Ensaio da*  
232 *aplicação de creme à base de Triticum vulgare na cicatrização de feridas cutâneas*  
233 *induzidas em eqüinos*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 8, 9-13.
- 234 Süntar, I., Akkol, E., Nahar, L., Sarke, S .2012. *Wound healing and antioxidant*  
235 *properties: do they coexist in plants?* Free Radicals and Antioxidants 2, 1-7
- 236 Tillmann, M., Felix, A., E.N. Mueller, E., Felix, S., Alves, G., Ramos, T., Freitag, R.,  
237 Fernandes, C., Nobre, M. 2014. *Use of Triticum aestivum in open wound healing: a*  
238 *clinical, pathological, and tensiometric assessment in the rabbit model*. Arquivo  
239 Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 66, 1757-1761

240 Rich. L ., Whittaker, P. 2005. *Collagen and picrosirius red staining: a polarized light*  
241 *assessment of fibrillar hue and spatial distribution.* Brazilian Journal of Morphological  
242 Sciences 22, 97-104

243 Wolfram, D., Tzankov, A., Püzl, P., Piza-katzer, H.2009. *Hypertrophic scars and*  
244 *keloids--a review of their pathophysiology, risk factors,and therapeutic management.*  
245 *Dermatologic surgery* 35,171-181.

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287

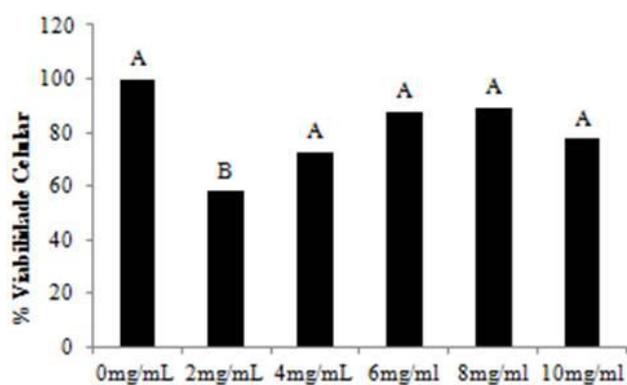


Figura 1- Percentual de viabilidade celular em linhagem celular 3T6 referentes as doses utilizadas (2 mg/mL, 4 mg/mL, 6 mg/mL, 8 mg/mL e 10 mg/mL) para o tratamento com extrato aquoso de *T. aestivum* durante 48 horas. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p \leq 0,05$ )

288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313

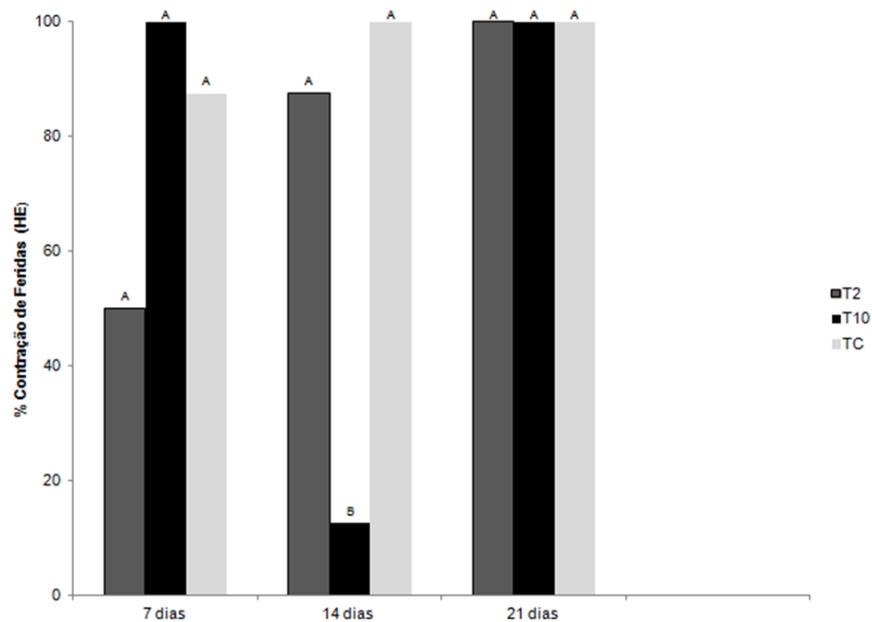
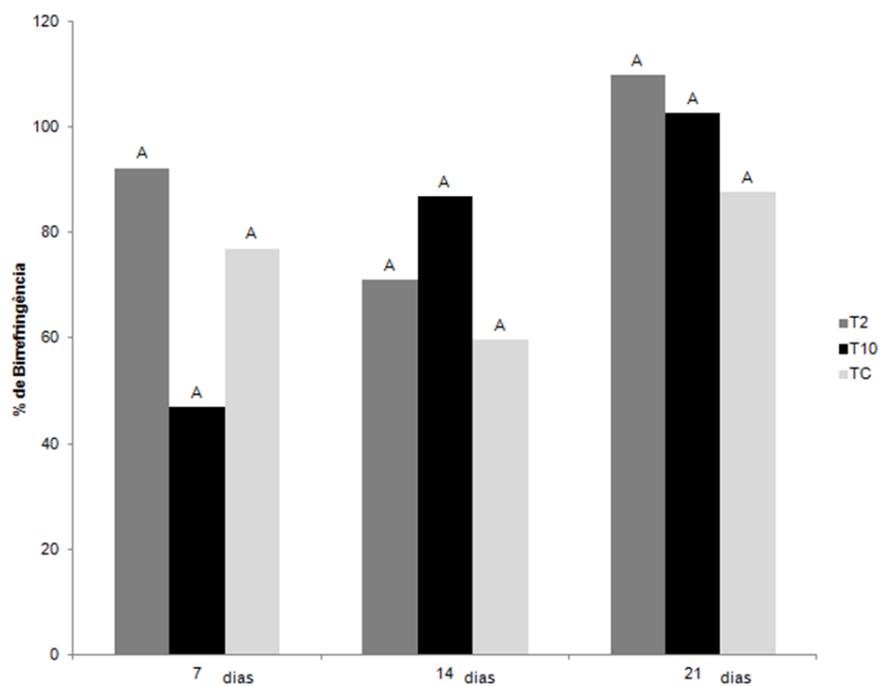


Figura 2- Percentual de contração em feridas cutâneas abertas (HE) em coelhos tratadas com extrato aquoso de *Triticum aestivum* 2 mg/mL (T2), extrato aquoso de *Triticum aestivum* 10 mg/mL (T10) e creme não iônico (TC), nos dias sete, 14 e 21

314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322



323  
324  
325  
326  
327

Figura 3- Percentual de birrefringência (picro sirius) em feridas cutâneas abertas em coelhos tratadas com extrato aquoso de *Triticum aestivum* 2 mg/mL (T2), extrato aquoso de *Triticum aestivum* 10 mg/mL (T10) e creme não iônico (TC) nos dias sete, 14 e 21

### **3.3 Artigo 3**

**Avaliação Citotóxica e Cicatricial da *Copaifera sp.***

**Irá ser submetido a revista Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**

## Avaliação Citotóxica e Cicatricial da *Copaifera* sp.

### Cytotoxic and Healing evaluation of *Copaifera* sp.

**Resumo:** Objetivou-se avaliar a citotoxicidade e ação cicatricial da *Copaifera* sp. em feridas cutâneas em ratos durante 21 dias. Foi realizado o teste de MTT com diversas doses de copaíba em células VERO. Após, a determinação da dose a ser utilizada no ensaio *in vivo*, foram realizado 150 feridas cutâneas abertas em ratos e avaliada a cicatrização quanto aos sinais clínicos, planimetria, qualidade cicatricial, histopatologia e tensiometria. Os tratamentos foram divididos em quatro grupos: grupo I (tratadas com 0,1%); grupo II (tratadas com 0,01%); grupo III (tratadas com vaselina) e grupo IV (tratadas com solução fisiológica 0,9%). Esses grupos foram subdivididos em dias de avaliações (quatro, sete, 14 e 21). O resultado *in vitro* demonstrou que as doses seguras são as iguais e menores a 0,01%. Nas análises clínicas os grupos I e II demonstraram epitelizar as feridas em menor tempo que os grupos III e IV, no entanto ao final do período cicatricial os grupos I e II apresentavam maior presença de crosta que os demais tratamentos. Com relação ao exsudato as feridas do grupo I obtiveram menor frequência que os demais tratamentos no dia quatro. As feridas dos grupos I e II foram mais eficientes em contrair as lesões nos primeiros dias do processo cicatricial, porém ao fim do processo ainda tinham aéreas a serem epitelizadas, o que não foi observado nos grupos controles. A qualidade cicatricial das feridas dos grupos I e II foi inferior as dos grupos III e IV. Na histopatologia, as feridas dos grupos I e III aceleraram o início do processo cicatricial, porém ao fim do período experimental as feridas dos grupos II e IV apresentavam maior frequência de feridas na fase de maturação. Na análise tensiométrica os grupos com maior tensão foram os controles, demonstrando assim maior qualidade cicatricial que as feridas dos grupos I e II. Conclui-se, que feridas cutâneas abertas em ratos tratadas por 21 dias com copaíba a 0,1% e 0,01% apresentaram resultado prejudicial ao tecido epitelial.

**Palavras Chaves:** copaíba, cutâneo, ferida, toxicidade

**Abstract:** This study aimed to evaluate the cytotoxicity and healing action of *Copaifera* sp. in skin wounds present in mice for a period of 21 days. The MTT assay was performed with various doses of copaiba in VERO cells. After determining the dose to be used in the *in vivo* assay, 150 wounds were opened in the mice, and the wound healing was evaluated the clinical signs, planimetry, scar quality, histopathology and tensiometers. The treatments

33 were divided into four groups: group I (treated with 0.1%); group II (treated with 0.01%);  
34 group III (treated with vaseline) and group IV (treated with 0.9% saline). These groups  
35 were further divided into different days for evaluation (four, seven, 14 and 21). The *in vitro*  
36 results showed that safe doses are equal and lower than 0.01%. In clinical analysis, groups  
37 I and II epithelialized wounds in less time than groups III and IV. However, in the end of  
38 the healing period the groups I and II had a higher presence of crust than the other  
39 treatments. Regarding the exudate, wounds of Group I had a lower frequency than the  
40 other treatments on day four. The wounds of groups I and II were more efficient in  
41 showing the lesions in the early days of the healing process. Nonetheless, at the end of the  
42 process there were still areas to be epithelialized, which were not observed in the control  
43 groups. The healing quality of the wounds in groups I and II was lower than those of  
44 groups III and IV. In histopathology, the wounds of groups I and III accelerated the  
45 beginning of the healing process. However at 21 days the wounds of groups II and IV  
46 showed higher frequency of wounds in the ripening phase and higher tensiometric strength  
47 than the other groups. As a result, open wounds in mice treated for 21 days with copaíba  
48 0.1% presented detrimental results to the epithelial tissue while the wounds treated with  
49 copaiba 0.01% are efficient in healing the epithelial tissue. Regarding histopathology, the  
50 wounds of groups I and III had the beginning of the healing process accelerated. However,  
51 in the end of the trial period, the wounds of groups II and IV presented a higher frequency  
52 of wounds in the maturation phase. In the tensiometric analysis the control groups  
53 presented higher tension, thus demonstrating higher healing quality than the wounds of  
54 groups I and II. It is possible to conclude that the treatment of open wounds in rats for 21  
55 days with copaíba 0.1% and 0.01% had a harmful effect to the epithelial tissue.

56 **Keywords:** copaiba, skin, toxicity, wound

## 57 **Introdução**

58 Atualmente a indústria farmacêutica tem interesse nos produtos naturais,  
59 principalmente advindos da biodiversidade da Amazônia, pois são um potencial inédito  
60 para as empresas (Lima *et al*, 2011). Em vista disso, estudo com fitoterápicos tem  
61 aumentado nos últimos anos, sendo que um que se destaca é a copaíba (Klein *et al*, 2009;  
62 Lima *et al*, 2011). A *Copaifera* é uma árvore abundante na região Amazônica e que,  
63 através de uma perfuração no seu caule, é extraído o óleo resina. Esse extrato é utilizado  
64 empiricamente pela população para cura de diversas patologias e sintomas. No entanto,

65 existem comprovações farmacológicas do seu uso, sendo a mais citada a sua ação anti-  
66 inflamatória (Pieri *et al*, 2009).

67 Uma das indicações terapêuticas mais antigas do óleo resina de copaíba é para a  
68 cicatrização de feridas (Breitbach *et al*, 2013). Apesar disso, a comprovação científica da  
69 ação cicatricial do fitoterápico tem sido estudada recentemente, no entanto há divergências  
70 entre os dados relatados na literatura (Brito *et al*, 1999; Paiva *et al*, 2002; Vieira *et al*,  
71 2008; Pieri *et al.*, 2009). Em vista disso esse estudo teve por objetivo avaliar a  
72 citotoxicidade de doses diferentes do óleo resina de copaíba em células VERO (*African*  
73 *Green Kidney Monkey*) e avaliar o processo cicatricial *in vivo* em ratos durante 21 dias.

## 74 **Material e Métodos**

75 O extrato do óleo resina de copaíba (*Copaifera* sp.) foi colhido através de uma  
76 perfuração no tronco da árvore *Copaifera* sp. (Herbário- HFSL:6726). A coleta foi  
77 realizada pela Fundação Universidade Federal de Rondônia no estado de Rondônia (RO-  
78 463, Theobroma, RO, 2.4 Km- NE-10.294235, -62.404860). Com a obtenção do óleo foi  
79 realizado o ensaio de citotoxicidade em células VERO (*African Green Kidney Monkey*),  
80 com o intuito de determinar a dose a ser utilizada no ensaio *in vivo*. As células foram  
81 cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo 1% de solução antibiótica e  
82 acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantida em estufa umidificada a 37°C com  
83 atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após formarem a monocamada confluyente, alíquotas foram  
84 coletadas para realizar o subcultivo em placas com fundo chato de 96 cavidades, para a  
85 realização do teste do efeito citotóxico por 48 horas através do MTT (brometo de 3-(4,5-  
86 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio).

87 Para realizar o tratamento das células o MEM foi emulsificado em DMSO  
88 (dimetilsulfóxido) permitindo assim a penetração do óleo resina de copaíba nas células. As  
89 doses utilizadas foram as seguintes: 10% (10 µL extrato/90 µL MEM/DMSO, sendo  
90 denominada: solução A), 5% (5µL extrato/95 µL MEM/DMSO), 1% (10 µL solução A/90  
91 µL MEM/DMSO, sendo denominada: solução B), 0,1% (10 µL solução B/90  
92 MEM/DMSO, sendo denominada: solução C), 0,01% (10 µL solução C/90 µL  
93 MEM/DMSO, sendo denominada: solução D), 0,001% (10 µL solução D/90 µL  
94 MEM/DMSO, sendo denominada: solução E), 0,0001% (10 µL solução E/90 µL  
95 MEM/DMSO, sendo denominada: solução F) e 0,00001% (10 µL solução F/90 µL

96 MEM/DMSO). Após as placas foram mantidas em estufa umidificada a 37°C e com 5% de  
97 CO<sub>2</sub>. Os testes foram feitos em triplicata, utilizando MEM como controle negativo (CC) e  
98 MEM emulsificado em 1:200 de DMSO como controle positivo (CDMSO). A viabilidade  
99 celular foi obtida através do seguinte cálculo: média da absorbância dos tratados/ média  
100 dos controles x 100 conforme (Wang *et al.*,2011).

101 Para o ensaio *in vivo* foram utilizados 75 ratos (*Rattus norvegicus*) machos Wistar,  
102 oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (CEEA: 7605-  
103 23110.007605/2012-21). Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos.  
104 Sendo dois controle e as duas doses do óleo resina de copaíba previamente estipuladas no  
105 ensaio *in vitro*, as quais foram diluídas em veículo vaselina. Os grupos foram  
106 denominados de grupo I (feridas tratadas com copaíba 0,1%); grupo II (feridas tratadas  
107 com copaíba de 0,01%); grupo III (feridas tratadas com vaselina) e grupo IV (feridas  
108 tratadas com solução fisiológica 0,9%), Além da divisão em grupos, os animais foram  
109 subdivididos de acordo com o período experimental (4, 7, 14 e 21 dias) totalizando dessa  
110 forma 150 feridas.

111 Após a determinação dos grupos de cada animal, esses foram submetidos a  
112 anestesia com atropina 5mg/kg por via subcutânea e associação de xilazina (10 mg/kg) e  
113 quetamina (100mg/kg) por via intramuscular (Schanaider e Silva, 2004) para a realização  
114 do procedimento cirúrgico. Com os animais em plano anestésico, foi realizada tricotomia e  
115 antissepsia da pele com álcool etílico 70°. Após eram realizadas duas incisões no dorso de  
116 cada animal com *punch* número 8. As feridas eram tratadas diariamente com 0,1 mL do  
117 tratamento estipulado de acordo com o grupo experimental. Ao final de cada período  
118 experimental (quatro, sete, 14 e 21 dias) os animais eram eutanasiados seguindo  
119 recomendações da Resolução nº 1000 de 2012 do CFMV. As análises realizadas nesse  
120 período foram as: clínica, de planimetria e histopatológica. Aos 21 dias eram realizadas as  
121 avaliações de qualidade cicatricial (normotrófica e hipertrófica) e tensiométrica. Nas  
122 avaliações clínicas as lesões eram avaliadas macroscopicamente, considerando a presença  
123 ou ausência de exsudato, de crosta e da epitelização. Para determinação da contração das  
124 feridas era realizada a análise de planimetria.Sendo traçado o contorno do perímetro  
125 externo de cada ferida através da sobreposição de um papel manteiga, e posteriormente  
126 calculada a área da lesão com auxílio de papel milimetrado.

127 As amostras teciduais foram processadas para inclusão em parafina e realizados  
128 cortes histológicos de 7µm, para posteriormente serem corados por hematoxilina-eosina. A

129 leitura das lâminas histológicas foi realizada em microscópio de luz claro, sendo  
130 caracterizada cada fase cicatricial (inflamatória, proliferativa e de maturação). Para essa  
131 determinação o tipo de infiltrado inflamatório foi avaliado e categorizado quanto à  
132 quantidade (discreto, moderado ou acentuado) e quanto ao tipo celular predominante.  
133 Além de determinado o padrão predominante de neoformação de vasos sanguíneos assim  
134 como a presença de fibroblastos, perfil de deposição de fibras colágenas, epitelização e  
135 presença de crostas ou restos celulares.

136 Aos 21 dias, 15 feridas de cada grupo experimental eram processadas para análise  
137 de tração axial em máquina universal de ensaio (DL 500) no Centro de Desenvolvimento e  
138 Controle de Biomateriais para realização da análise tensiométrica. Para isso, as amostras  
139 eram confeccionadas em formato de ampulheta (com auxílio de um molde metálico) e  
140 acondicionadas em solução fisiológica 0,9%. O formato de ampulheta permitia que as duas  
141 extremidades da pele que eram fixadas ao equipamento, apresentassem ausência de pele  
142 adjacente à região da ferida.

143 Para a análise estatística dos dados foi utilizado o teste de kruskal wallis (Statistix  
144 9.0) para os parâmetros de planimetria, tensiometria e histopatológico. Já para os clínicos e  
145 de qualidade cicatricial foi utilizado o teste de análise de variância e tukey para a  
146 comparação das médias (Statistix 9.0).

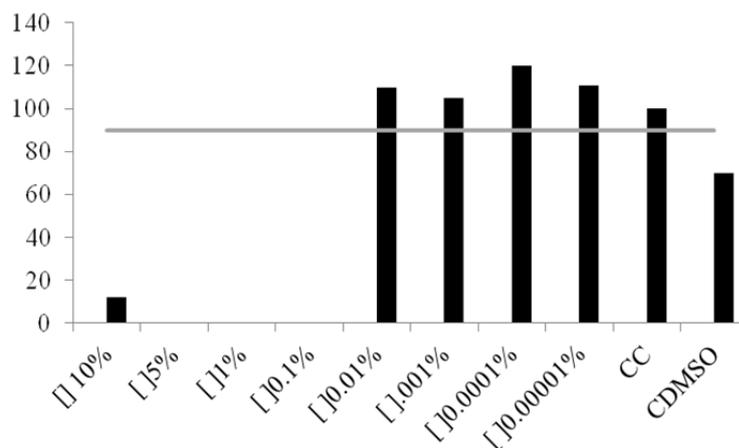
147

## 148 **Resultados e Discussão**

149 O resultado do ensaio de citotoxicidade com o MTT utilizando o óleo resina de  
150 *Copaifera* sp. demonstrou que as doses que apresentaram viabilidade foram as seguintes:  
151 0,01%; 0,001%; 0,0001%, 0,00001% (Fig. 1). Considerando que a maioria dos ensaios  
152 com cicatrização de feridas utilizando o óleo resina de copaíba apresentaram resultados  
153 satisfatórios, e as doses utilizadas são mais altas do que as que apresentaram viabilidade no  
154 ensaio *in vitro* (Brito *et al.*, 1999; Paiva *et al.*, 2002; Vieira *et al.*, 2008; Pieri *et al.*, 2009).  
155 Optou-se por, no experimento *in vivo* utilizar a primeira dose inócua (0,01%- Grupo II) e a  
156 primeira citotóxica (0,1% Grupo I). Visto que nenhum desses estudos realizou ensaio de  
157 citotoxicidade previamente ao pré-clínico, e que os experimentos *in vitro* nem sempre  
158 correspondem aos resultados *in vivo*.

159

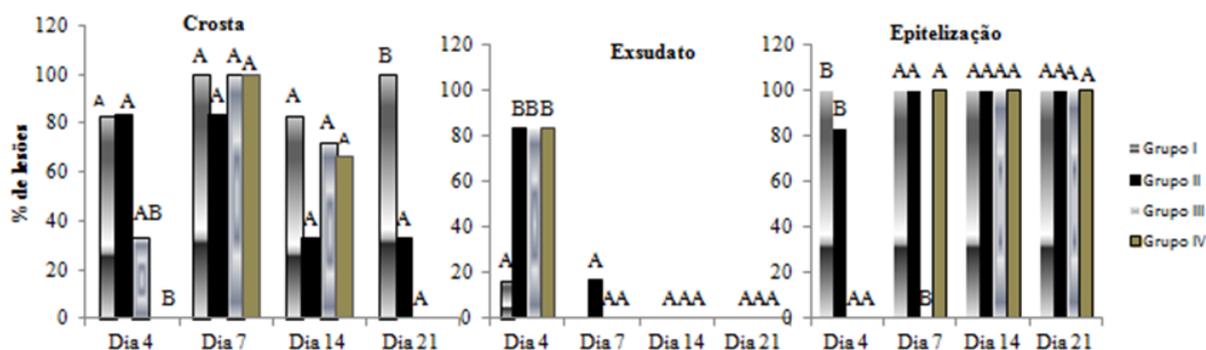
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166



167  
168  
169  
170  
171

Figura 1. Determinação do percentual de viabilidade celular em linhagem Vero referente as doses utilizadas (10%-0,00001%) para o tratamento com óleo resina de copaíba durante 48 horas. (CC: controle de células- MEM; CDMSO: Controle de células com DMSO). Linha indica a viabilidade celular.

172  
173  
174  
175  
176  
177



178  
179  
180  
181  
182  
183  
184

Figura 2. Presença dos parâmetros clínicos: crosta, exsudato e epitelização nas lesões dos grupos I (tratadas com óleo resina de copaíba 0,1%); grupo II (tratadas com óleo resina de copaíba 0,01%); grupo III (tratadas com vaselina) e grupo IV (tratadas com solução fisiológica a 0,9%) nos dias quatro, sete, 14 e 21. Os dados estão expressos em porcentagem das lesões apresentado cada parâmetro no respectivo dia. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

185 Nos dados clínicos foi observado que as feridas tratadas com as duas concentrações do  
186 óleo resina de copaíba, aceleram o início do processo cicatricial, pois foram os únicos  
187 grupos que apresentavam presença de epitelização no dia quatro ( $p \leq 0,05$ ) (Mandelbaum  
188 *et al*, 2003). Com relação aos demais parâmetros podem ser constatados o fisiológico do  
189 processo cicatricial em todos os grupos. Com presença de exsudato e crosta nos primeiros  
190 dias evoluindo ao longo do período para epitelização completa e ausência dos dois  
191 primeiros sinais clínicos (Fig.2) (Balbino *et. al*, 2005).

192 Apesar disso, alguns grupos durante o período experimental se destacaram em  
193 alguns critérios. Como o grupo IV que demonstrou menor percentual de formação de  
194 crosta em todo o período experimental, diferindo ( $p \leq$  que 0,05) aos quatro dias dos  
195 grupos tratados com o fitoterápico (Fig.2). Esse resultado demonstrou um atraso do  
196 processo cicatricial nos primeiros dias com esse tratamento (Balbino *et al.*, 2004). No  
197 entanto esse foi o único tratamento que aos 21 dias apresentava epitelização completa e  
198 ausência de crosta (Fig.2). Padrão não observado nas feridas tratadas com as duas  
199 concentrações do fitoterápico, pois eram as únicas que possuíam presença de crosta aos 21  
200 dias. E o grupo I diferiu ( $p \leq$  que 0,05) dos demais grupos por ter 100% de presença de  
201 crosta nesse dia. Dessa forma, pode ser observada uma evolução da cicatrização com os  
202 tratamentos com as duas concentrações do óleo resina de copaíba nos primeiros dias e ao  
203 final do período um resultado desfavorável.

204 Com relação ao exsudato pode ser observado que as feridas do grupo I  
205 diferiram dos demais grupos no dia quatro ( $p \leq 0,05$ ) por apresentar menor frequência  
206 desse parâmetro (Fig.2), esse fato pode estar relacionada com a ação anti-inflamatória da  
207 copaíba (Veiga Júnior *et al*, 2007), visto que as feridas desse grupo eram a que  
208 apresentavam maior concentração do fitoterápico. No dia sete as feridas do grupo II foram  
209 as únicas que ainda apresentavam presença de exsudato, no entanto era apenas em uma  
210 ferida e esse fato é fisiológico no processo cicatricial (Mandelbaum *et al*, 2003; Balbino *et*  
211 *al*, 2005). Na epitelização, foi observado ausência de desse padrão aos sete dias no grupo  
212 III (Fig.2). Entretanto esse resultado foi observado devido a presença de 100% de crosta  
213 nesse mesmo dia, dessa maneira impossibilitando a visualização do tecido epitelial.

214

215

216

217

218

219

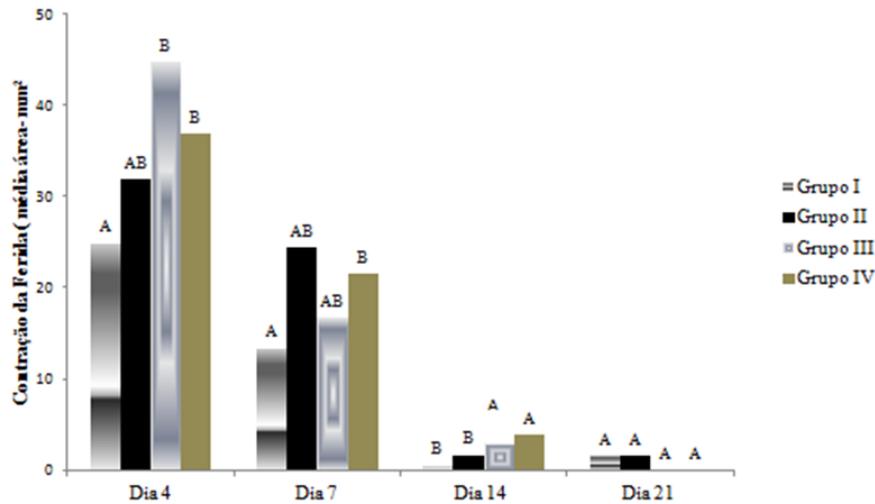
220

221

222

223

224



225

226

227

228

229

230

231

232

Figura 3. Demonstração da média da área ( $\text{mm}^2$ ) da contração em feridas em ratos durante 21 dias, nas lesões dos grupos I (tratadas com óleo-resina de copaíba 0,1%); grupo II (tratadas com óleo-resina de copaíba 0,01%); grupo III (tratadas com vaselina) e grupo IV (tratadas com solução fisiológica a 0,9%) nos dias quatro, sete, 14 e 21. Letras diferentes no mesmo dia indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

Os resultados da contração da ferida demonstraram que ao longo do período experimental as feridas tratadas com as duas concentrações do óleo resina de copaíba não diferiram entre si ( $p \geq 0,05$ ). No entanto no início e meio do processo cicatricial apresentaram a menor contração quando comparado com os demais tratamentos, demonstrando novamente a ação do fitoterápico em acelerar o processo cicatricial inicial (Aquino *et al*, 2003; Garros *et al*, 2006). Aos quatro e sete dias do experimento as feridas do grupo I apresentaram menor média de contração quando comparado com os demais tratamentos (Fig. 3), tanto que aos quatro dias diferiu ( $p \leq 0,05$ ) dos dois grupos controle e no dia sete do grupo IV ( $p \leq 0,05$ ). Demonstrando assim, uma aceleração no processo cicatricial nas feridas desse grupo e conseqüentemente uma menor possibilidade de contaminação das mesmas, devido a sua retração em menor tempo (Mandelbaum *et al*, 2003; Balbino *et al*, 2005). No dia sete, as lesões do grupo II, apresentavam a maior média de contração dos tratamentos, possivelmente por ter sido o único grupo a apresentar

246 exsudato nesse dia, então provavelmente suas lesões possuíam diâmetro maior (Vieira *et*  
247 *al.*, 2008).

248 No dia quatorze, as feridas tratadas com as duas concentrações de copaíba  
249 obtiveram menor média de retração, que os dois grupos controles ( $p \leq 0,05$ ) (Fig. 3),  
250 demonstrando assim que o fitoterápico tem ação eficiente em realizar a oclusão da ferida  
251 em menor tempo. Já no 21º dia, as feridas dos grupos controle estavam totalmente ocluídas  
252 fato que não foi observado nas feridas tratadas com as duas concentrações de copaíba (Fig.  
253 3). Estes dados corroboram com Vieira *et al.*(2008) que demonstrou que feridas tratadas com  
254 óleo resina de copaíba apresentaram uma proliferação de tecido epitelial na fase inicial do  
255 processo cicatricial. No entanto, ao longo do período gerou uma desordem tecidual,  
256 finalizando com uma cicatrização ineficiente. Esse resultado também pode ser observado  
257 no nosso estudo, pois as feridas tratadas com as duas doses do fitoterápico apresentaram  
258 maior frequência de cicatrizes hipertróficas (66,7%) que os demais tratamentos (grupo III:  
259 50%, e grupo IV: 0%). Dessa forma, pode ser observado que todos os tratamentos que  
260 possuíam um veículo oleoso demonstraram resultados inferiores na qualidade cicatricial,  
261 podendo essa ser a causa da desordem tecidual relatada por Vieira *et al* (2008).

262 Na análise histopatológica foi possível observar uma evolução padrão do processo  
263 cicatricial nos grupos II e IV. No grupo I as feridas demonstraram uma evolução acelerada  
264 no início do processo cicatricial quando comparado com os demais grupos. Isso pode ser  
265 visto, pois era o único grupo que no dia quatro possuía feridas (16,7%) na fase  
266 proliferativa, devido a presença de colágeno (Aquino *et al.*, 2006). No dia sete, além do  
267 grupo II apresentar (16,7%) feridas na fase proliferativa o grupo III também possuía  
268 (16,7%), enquanto os demais grupos obtinham somente feridas na fase inflamatória. Com  
269 esse resultado, pode ser visto que somente o grupo I, que também possuía tratamento  
270 oleoso não tinha feridas na fase proliferativa. Podendo ser justificado por esse ser o único  
271 grupo que possuía exsudato nos dados clínicos, nesse dia.

272 Aos 14 dias todos os grupos, como era esperado, apresentavam feridas na fase  
273 proliferativa e de maturação (Mandelbaum *et al.*, 2003; Balbino *et al.*, 2005). Sendo que o  
274 grupo IV apresentava maior frequência de lesões na fase de maturação (50%) que os  
275 demais grupos (grupo III e II: 33,3% e grupo I: 16,7%). Dessa forma, foi constatado que o  
276 grupo I diferiu ( $p \leq 0,05$ ) do grupo IV, pois era o grupo que apresentava menor frequência  
277 de feridas na fase de maturação. No final do período experimental pode ser observado, que

278 todos os grupos ainda possuíam feridas na fase proliferativa. Sendo observado que os  
279 grupos que possuíam maior frequência de feridas em fase de maturação foram o IV e o II  
280 (66,7%), seguido do III (50%) e I (33,3%). No entanto na análise tensiométrica, os grupos  
281 que obtiveram a maior tensão foram os controles (grupo III: 0,78 Pa e grupo:IV 0,86 Pa)  
282 seguidos das feridas tratadas com as duas concentrações do óleo resina de copaíba (grupo  
283 II: 0,62 Pa e grupo I (0,63 Pa). Desta forma, foi constatado que as feridas do grupo IV  
284 diferiram das dos grupos I e II ( $p \leq 0,05$ ), devido possuírem menor tensão que as feridas  
285 tratadas com solução fisiológica 0,9%. Demonstrando assim, que a aceleração inicial do  
286 processo cicatricial com as duas concentrações do óleo resina de copaíba, apresentou  
287 resultados inferiores na qualidade cicatricial ao fim do período experimental.

288 No início do processo cicatricial as feridas tratadas com as duas doses de copaíba  
289 tiveram uma proliferação tecidual intensa possivelmente pela ação imunoestimulatória do  
290 fitoterápico que ocasionou um maior aporte quimiotático para o local lesionado (Vieira *et*  
291 *al.*, 2008). No entanto essa aceleração inicial da cicatrização foi exacerbada, pois não  
292 permitiu que o tecido epitelial se organizasse até o final do período experimental. Visto,  
293 que as feridas do grupo II que, obtiveram a mesma frequência de lesões na fase de  
294 maturação que as tratadas do grupo IV, tiveram uma menor tensão, demonstrando assim  
295 que a qualidade do tecido formado foi inferior.

296

## 297 **Conclusão**

298 Com este estudo podemos concluir que doses iguais ou menores a 0,01% não  
299 apresentam dano celular a células VERO no ensaio do MTT. As feridas cutâneas abertas  
300 em ratos tratadas por 21 dias com copaíba a 0,1% e 0,01% apresentaram resultado  
301 prejudicial ao tecido epitelial.

302

## 303 **Agradecimento**

304 A Capes e ao CNPq (CNPq 305072/2012-9) pela concessão de bolsa e auxílio financeiro.

305

306

307

308 **Referências Bibliográficas**

- 309
- 310 AQUINO, J.U.; CZECZKO, N.G.; MALAFAIA, O. *et al.* Avaliação fitoterápica da  
311 *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de suturas na parede abdominal ventral de ratos.  
312 *Acta Cirurg. Bras.* v.21, p.61-66, 2006.
- 313 BALBINO, C.A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização:  
314 uma revisão. *Brazi J Pharm Scienc.*,v. 41, p.27-51, 2005.
- 315
- 316 BREITBACH, U. B.; MICHAEL NIEHUES, M.; NORBERTO P. LOPES,N.P.*et al.*  
317 Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martiusnin the 19th  
318 century. *J Ethnopharm* , v.147,p.180–189, 2013
- 319
- 320 BRITO, M.V.H.; OLIVEIRA, R.V.B.; MORAIS, M.R.; LAMEIRA, O.A.; Efeito da  
321 copaíba no comportamento de ratos. *Rev. Par. Med.*, v.34, p.34-37, 1999.
- 322
- 323 GARROS, I.C; CAMPOS, A.C.L; TÂMBARA, E.M. *et al.* Extrato de *Passiflora edulis* na  
324 cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta*  
325 *Cirurg Bras.* v. 21, p.55-65, 2006.
- 326 KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado  
327 promissor. *Rev Ciênc. Farm. Básica Apl.* ,v. 30,p.241-248, 2009
- 328
- 329 LIMA, C.S.; DE MEDEIROS, B.J.L.; FAVACHO, H.A.S. *et al.* Pre-clinical validation of a  
330 vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). *Phytom*, v.18,  
331 p.1013– 1023, 2011
- 332
- 333 MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização I:  
334 conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte I. *Anais Bras. Derm.* v. 78, p. 393-407, 2003.
- 335
- 336 PAIVA, L.A.; ALENCAR CUNHA, K.M.; SANTOS, F.A. *et al.* Investigation on the  
337 wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffi* in rats. *Phyto. Res.* v.16,  
338 p.737-739, 2002.

- 339 PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.):  
340 histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. *Rev. Bras. Pl Med.*,  
341 v.11, p.465-472, 2009.
- 342
- 343 RESOLUÇÃO N<sup>o</sup> 1000, DE 11 DE MAIO DE 2012 DO Conselho Federal de Medicina  
344 Veterinária-CFMV.
- 345 SCHANAIDER, A.; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cirurg*  
346 *Bras.*, v.19, p.441-447, 2004.
- 347 VEIGA JUNIOR, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V *et al.* Chemical composition  
348 and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex  
349 Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne- A comparative  
350 study. *J. Ethnopharm.*, v.112, p.248-254, 2007.
- 351 WANG, J. P.; RUAN, J.I.; CAI, Y. I. *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of the wound  
352 healing properties of *Siegesbeckia pubescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 134, p.  
353 1033-1038, 2011.

#### **4 METODOLOGIA DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO ARTIGO: USE OF *TRITICUM AESTIVUM* IN OPEN WOUND HEALING: A CLINICAL, PATHOLOGICAL, AND TENSIO-METRIC ASSESSMENT IN THE RABBIT MODEL**

Durante o período de doutorado foi realizada a revisão e acompanhamento do ensaio cromatográfico do *T. aestivum*, o qual faz parte do artigo: Use of *Triticum aestivum* in open wound healing: a clinical, pathological, and tensiometric assessment in the rabbit model (aceito pela revista Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia). Para análise cromatográfica do extrato foi empregada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando o equipamento da Varian® com detector de arranjo de diodos (DAD) com varredura de 200 a 800 nm. Coluna Cromatográfica com fase estacionária C18 Phenomenex Gemini (25cm x 4,6mm x 5 µm) e uma pré-coluna de mesma fase. Fase móvel binária de água com 6% de ácido acético e 2mM de acetato de sódio (eluente A) e acetonitrila (eluente B), fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 25°C e volume de injeção de 10 µL. O seguinte gradiente aplicado: 0 min, 5% B; 45 min, 15% de B; 55 min, 30% de B; 60 min, 50% de B; 65 min, 100% de B, e finalmente, em 75 min. 5% de B. Os compostos separados foram monitorados com DAD.

Os padrões utilizados foram adquiridos através da Sigma Aldrich® com elevado teor de pureza, sendo solubilizados em metanol e água 50:50 v/v. A água destilada e deionizada foi ultra purificada empregando um sistema da marca Human UP 900/Scholar-UV, com seis colunas de troca iônica, lâmpada germicida 185/254 nm, filtro de carvão ativado e filtro de saída de 0,22 µm. A solução do extrato aquoso foi solubilizadas em água ultrapura em balão volumétrico individualmente

## 5 CONCLUSÃO GERAL

Nas condições desse estudo foi possível constatar que os resultados permitem concluir que:

- A dose de extrato aquoso de *Triticum aestivum* 2mg/mL é citotóxica para a linhagem celular 3T6, enquanto as doses de 4mg/mL, 6mg/mL, 8mg/mL, 10mg/mL não apresentaram dano celular ao teste de MTT;

- Doses iguais ou menores que 0,01% do óleo resina de copaíba não apresentam citotoxicidade celular ao teste do MTT para linhagem celular VERO ;

- Feridas cutâneas abertas em coelhos tratadas com extrato aquoso de *T. aestivum* 2 mg/ mL durante 21 dias apresentam resultado superior na avaliação cicatricial do que lesões tratadas com extrato aquoso de *T. aestivum* 10 mg/ mL;

- Feridas cutâneas abertas em ratos tratadas com 0,1% e 0,01% de óleo resina de copaíba apresentam resultado prejudicial ao tecido epitelial

## 6 REFERÊNCIAS

ACKERMANN, Mark. Inflamação crônica e cicatrização de feridas. In: \_\_\_\_\_ . **Bases da Patologia em Veterinária**. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2005, p.175-77.

AQUINO, J.U.; CZECZKO, N.G.; MALAFAIA, O.; DIETZ, U.A.; RIBAS-FILHO, J.M.; NASSIF, P.A.N.; ARAÚJO, U.; BORONCELLO, J.; SANTOS, M.F.S.; SANTOS, E.A.A. Avaliação fitoterápica da *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de suturas na parede abdominal ventral de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** (São Paulo, SP), n.2, p.61-66, 2006.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** (São Paulo, SP) n. 41, p.27-51, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas Públicas. Áreas de Atuação. Medicamentos. **Legislação. Resoluções**. Resolução – RDC nº. 17 de 24 de fevereiro de 2000.

BRITO, M.V.H.; OLIVEIRA, R.V.B.; MORAIS, M.R.; LAMEIRA, O.A.; Efeito da copaíba no comportamento de ratos. **Revista Paraense Medicina** (Belém, PA), n.34, p.34-37 , 1999.

COMÍN-ANUIX, B.; BOROS, L.G.; MARIN, S.; BOREN, J.; CALLOL-MASSOT, C.; CENTELLES, J.J.; TORRES, J.L.; AGELL, N.; BASSILIAN, S.; CASCANTE, M. Fermented wheat germ extract inhibits glycolysis/pentose cycle enzymes and induces apoptosis through poly(ADP-ribose) polymerase activation in Jurkat T-cell leukemia tumor cells. **The Journal of Biological Chemistry** (Rockville, MA) n.48, p.46408-46414, 2002.

CUNHA, L.C.; AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. S.; LINO, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia** (Curitiba, PR) n.2, p.403-411, 2009.

GARROS, I.C; CAMPOS, A.C.L; TÂMBARA, E.M; TENÓRIO, S.B; TORRES, O.J.M; AGULHAM, M.A; ARAÚJO, A.C.F; SAINS-ISOLAN, P.M.B; OLIVEIRA, E.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, SP), n. 21, p.55-65, 2006.

HAMEL, F.; GRONDIN, M.; DENIZEAU, F.; AVERILL-BATES, D.A.; SARHAN, F. Wheat extracts as an efficient cryoprotective agent for primary cultures of rat hepatocytes. **Biotechnology and Bioengineering** (Singapura, SG),n.4, p.661-70, 2006.

IDRUS, R.B.H.; CHOWDHURY, S.R.; MANAN, N.A.B.A; FONG, O.S; ADENAN, M.I.; SAIM, A.B. Aqueous extract of *Centella asiatica* promotes corneal epithelium wound healing *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology** (Sydney, NGS), n.2, p.333-338, 2012.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C; VEIGA JR, V. F; GRYNBERG, N. F; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova** (São Paulo, SP) n.25, p. 429-438, 2002.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização I: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte I. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. (Rio de Janeiro, RJ), n 4, p. 393-407, 2003.

MASTROIANNI, A.; CELLENO, L.; BORGIA M.G., CERIMELE, D. Léstratto acquoso di "Triticum vulgare"- valutazione clinico-istologica Nei processi riparativi tissutali cutanei. **Giornale Italiano Dermatologia Venereologia** (Turim, PM) n.133, p.145-53, 1998.

MCNES, P. Skin and wound assessment and care in oncology. **Oncology Nursing** (Pitsburgo, PA), n.22, p.130-143, 2006.

NASCIMENTO, M.E.; ZOGHBI, M.G.B.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V. Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology** (Sydney, NGS) n.43, p.1-6, 2012.

PAIVA, L.A.; ALENCAR CUNHA, K.M.; SANTOS, F.A.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research** (Singapura, SG) n.8, p.737-739, 2002.

PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais** (Paulínia: SP),n.4, p.465-472, 2009.

RAYMUNDO, M.M.; GOLDIM, J.R. Ética da pesquisa em modelos animais. **Revista de Bioética** (Brasília, DF), n.10, p.31-44, 2002

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; ÁUREA SILVEIRA CRUZ, A.S. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Material Research** (São Carlos, SP), n.3, p. 317-320, 2003.

TILLMANN, M.; FELIX, A.; MUELLER, E.N.; FELIX, S.; ALVES, G.; RAMOS, T.; FREITAG, R.; FERNANDES, C.; NOBRE, M. 2014. Use of *Triticum aestivum* in open wound healing: a clinical, pathological, and tensiometric assessment in the rabbit model. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Belo Horizonte, MG), n. 6, p. 1757-1761, 2014.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, (São Paulo, SP), n.2, p.289-306, 2006.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova** (São Paulo, SP), n.2, p.273-286, 2002.

VIEIRA, R. C.; Bombardiere, E.; Oliveira, J.J.; Lino-Júnior, R.S.; Brito, L.A.B.; Junqueira, A.P.. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira** (Rio de Janeiro, RJ), n.8, p. 358-366, 2008.

WANG, J.; RUAN, Y.; CAI, Q.; HAIXING, X.; YUN-XIA, W. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the wound healing properties of *Siegesbeckia pubescens*. **Journal of ethnopharmacology** (Sydney, NGS), n.134, p.1033-1038, 2011.