

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Dissertação

**Avaliações da cicatrização de feridas abertas tratadas com *Bixa orellana* L.**

**Sabrina de Oliveira Capella**

Pelotas, 2015

**Sabrina de Oliveira Capella**

**Avaliações da cicatrização de feridas abertas tratadas com *Bixa orellana* L.**

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

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Márcia de Oliveira Nobre  
Coorientadores: Mariana Teixeira Tillmann e Samuel Rodrigues Felix

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

C238a Capella, Sabrina de Oliveira

Avaliações da cicatrização de feridas abertas tratadas com *Bixa orellana* L. / Sabrina de Oliveira Capella ; Márcia de Oliveira Nobre, orientadora ; Mariana Teixeira Tillmann, Samuel Rodrigues Felix, coorientadores. — Pelotas, 2015.

41 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Cicatrização. 2. Urucum. 3. Fitoterápico. 4. Inflamação. I. Nobre, Márcia de Oliveira, orient. II. Tillmann, Mariana Teixeira, coorient. III. Felix, Samuel Rodrigues, coorient. IV. Título.

CDD : 633.88

Sabrina de Oliveira Capella

Avaliações da cicatrização de feridas abertas tratadas com *Bixa orellana* L.

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23 de Fevereiro de 2015

Banca examinadora:

Prof. Dra. Márcia de Oliveira Nobre (orientadora)  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Cristina Gevehr Fernandes  
Doutora em Patologia pela Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Eduardo Negri Mueller  
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Rosema Santin  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **Agradecimentos**

A família, que acima de tudo são meu alicerce e não mediram esforços para que eu chegasse até aqui;

Ao meu noivo, pelo amor, carinho, paciência e por sua capacidade de me trazer paz e tranquilidade nos momentos mais conturbados;

Aos meus avós, mesmo sem saber por que exatamente eu sempre estava em Pelotas, traziam carinho e apoio.

Aos amigos, pelas alegrias, tristezas e apreensões compartilhadas. Pela parceria nos barzinhos para descontrair e pela compreensão nas vezes em que não me fiz presente entre vocês.

A Prof<sup>a</sup> Márcia, pela orientação, ensinamentos, paciência e confiança para que os trabalhos se concretizassem;

A Prof<sup>a</sup> Cristina, pelos ensinamentos em patologia e pelas horas dedicadas a discutir sobre histologia da pele;

Ao ClinPet, pelo companheirismo e disposição de sempre;

Aos colegas da pós, pelo convívio diário, conversas intermináveis e o apoio em todos os momentos dentro e fora da faculdade;

A Mariana Tillmann, por me acompanhar durante esses dois anos me passando todo seu conhecimento no assunto com paciência e atenção;

Aos animais, que são meu incentivo para seguir estudando.

Muito Obrigada!

## Resumo

CAPELLA, Sabrina de Oliveira. **Avaliações da cicatrização de feridas abertas tratadas com *Bixa orellana* L.** 2015. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A cicatrização de feridas cutâneas é um processo complexo que envolve diversas vias biológicas as quais buscam restaurar a integridade do tecido. Atualmente existem diversos tratamentos que visam auxiliar nesse processo estimulando a cicatrização. Nesse sentido, as plantas medicinais já utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades são uma alternativa de baixo custo e fácil acesso para o tratamento de lesões cutâneas. Objetivou-se avaliar a ação do extrato oleoso de *Bixa orellana* L. na cicatrização de feridas abertas em modelo experimental. Inicialmente, foi realizado a identificação dos compostos oleosos através de cromatografia gasosa e teste de citotoxicidade com o óleo da semente de urucum determinando as doses de 0,1% e 0,01% para o ensaio *in vivo*. Para o experimento *in vivo* foram confeccionadas cirurgicamente duas lesões no dorso de ratos wistar que foram tratadas diariamente até 21 dias com: Extrato oleoso de urucum 0,1% (U 0,1%), extrato oleoso de urucum 0,01% (U 0,01%), vaselina (V) e solução fisiológica (SF). As avaliações ocorreram nos períodos de quatro, sete, 14 e 21 dias e ao final de cada período os animais foram eutanasiados para realização de análises e coleta de fígado, rins e pele. Foram analisadas a presença/ausência de exsudato, crosta e epitelização. Além disso, foi realizado registro fotográfico para determinar as áreas das lesões observando a retração da ferida. As amostras de tecido foram processadas e avaliadas microscopicamente, fígado e rins quanto à presença de alterações morfológicas e a pele quanto à fase da cicatrização e a quantidade de fibrina. Aos 21 dias de tratamento as peles foram analisadas tensiometricamente. Os ácidos graxos identificados foram: ácido linoleico, geranyl linalool, ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico, escaleno e geranyl- $\alpha$ -terpinene. Nos aspectos clínicos todas as amostras apresentaram evolução cicatricial considerada fisiológica, não diferindo nos parâmetros de exsudato e crostas. Quanto à epitelização os grupos tratados com urucum apresentaram maior presença aos sete dias e maior retração cicatricial aos quatro dias quando comparado aos demais grupos. Na análise tensiométrica os grupos tratados com urucum apresentaram menor tensão que os grupos tratados com vaselina e solução fisiológica. Na histopatologia dos rins e fígado, não foram observadas alterações significativas. Na histologia aos setes dias os grupos tratados com urucum apresentavam-se na fase inflamatória enquanto os demais grupos caracterizavam-se na fase proliferativa. Quanto à quantidade de fibrina, as lesões tratadas com urucum apresentaram exuberante rede de fibrina nos dois primeiros momentos de avaliação enquanto as lesões tratadas com vaselina e solução fisiológica apresentaram quantidades menores nestes momentos. Assim conclui-se que o

extrato oleoso de urucum nas doses de 0,1% e 0,01% acelera a cicatrização nos primeiros dias de tratamento, porém proporciona a formação de uma cicatriz menos resistente.

Palavras-chave: cicatrização; fitoterápico; inflamação; urucum.

## Abstract

CAPELLA, Sabrina de Oliveira. **Evaluation of the healing process in open wounds treated with *Bixa orellana* L.** 2015. 41 f. Dissertation (Master in science) – Programa de Pós-graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Skin wound healing is a complex process that involves several biological signaling routes in order to restore tissue integrity. Diverse treatment options are available, and they will aid the healing process. Alternatively, medicinal plants are also used, and represent a low cost, easy access option. This study assessed the oil extract of *Bixa orellana* L. as a healing agent in the rat model of open wound healing. Initially, the oil was obtained and characterized through gas chromatography. Furthermore, the cytotoxic potential of the oil was assessed, in culture. For the *in vivo* assays, 0.1% and 0.01% oil doses were used. Wounds were surgically produced in Wistar rats, these were treated with the oil extract at 0.1% (U 0.1%), 0.01% (U 0.01%), petrol jelly (V) and saline (SF). The animals were assessed at four, seven, 14 and 21 days of treatment. The animals were euthanized at each evaluation date and skin, liver, and kidney samples were harvested. Clinically, the wounds were assessed regarding the presence of crust, exudate, and epithelialization. Photographic records were used to assess the wound area at each date. Tissue samples were processed and evaluated microscopically regarding morphological alterations (kidney and liver), and the healing phase and fibrin collection (skin). At 21 days, the skins were also assessed regarding the tension strength of the healed tissues. Major components of the oil were: ácido linoleico, geranyl linalool, ácido palmítico, ácido oleico, ácido esteárico, escaleno e geranyl- $\alpha$ -terpinene. The *in vivo* essays revealed similar clinical evolution of the wounds, throughout the treatment groups, especially regarding crust and exudate. An earlier onset of epithelialization was observed in the oil treated wounds, when compared to the controls. Likewise, these wound had a faster shrinkage rate by day four. Tension resistance of the oil treated wounds was, however, inferior to that of the controls. Histopathologically, no alterations were observed in kidney and liver tissues. The skin samples of oil treated wounds at seven day had more lesions in the inflammatory stage, when compared to the controls, which were majorly in the proliferatory phase. Oil treated wounds also had more fibrin in the first two assessment dates, when compared to the controls. *B. orellana* L oil, at 0.1% and 0.01%, seems to have hurried the healing process in the first days of treatment, though promoting a final wound capable of resisting lower tension strengths.

Key-words: healing; phytotherapy; inflammation; urucum.

## Lista de Figuras

- Figura 1 Ensaio de citotoxicidade em células VERO demonstrando o percentual de viabilidade celular em diferentes concentrações do extrato oleoso de urucum (*Bixa orellana* L.) comparadas aos grupos controle..... 26
- Figura 2 Percentual de presença de epitelização em feridas tratadas com diferentes concentrações de extrato oleoso de urucum (*Bixa orellana* L.), vaselina e solução fisiológica aos quatro, sete, 14 e 21 dias. Letras diferentes representam frequências estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )..... 27
- Figura 3 Demonstração de média (desvio padrão) das áreas de lesão em  $\text{mm}^2$  representando a retração cicatricial de feridas tratadas com óleo de urucum (*Bixa orellana* L.) nas concentrações de 0,1% e 0,01% de vaselina e solução fisiológica aos quatro, sete, 14 e 21 dias. Letras diferentes representam frequências estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )..... 28
- Figura 4 Médias (desvio padrão) da tensão suportada pelas amostras de pele dos grupos tratados com extrato de urucum nas concentrações de 0,1% e 0,01%, vaselina e solução fisiológica aos 21 dias. Letras diferentes representam frequências estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )..... 29
- Figura 5 Demonstração da prevalência de fase da cicatrização nos grupos U0,1%, U0,01%, V e SF aos sete dias de tratamento. Marcadores representam a mediana do grupo, barras representam o alcance (escore máximo e mínimo). Letras diferentes representam frequências estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )..... 30

Figura 6 Quantidade de fibrina presente nos grupos U0,1%, U0,01%, V, SF, aos quatro dias (A) e aos sete dias (B). Marcadores representam a mediana do grupo, barras representam o alcance (escores máximo e mínimo). Letras diferentes representam frequências estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )..... 31

## Lista de Abreviaturas

CEEA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
DMSO	Dimetilsulfóxido
MEM	Meio essencial mínimo
MTT	Brometo de 3-4,5dimetiltiazol-2-ilo – 2,5-difeniltetrazólio
Pel	Pelotas
RO	Rondônia
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
VERO	African Green Monkey Kidney

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Revisão de Literatura.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Cicatrização.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Plantas medicinais.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3. Urucum.....</b>	<b>17</b>
<b>3 Artigo.....</b>	<b>19</b>
<b>4 Considerações Finais.....</b>	<b>36</b>
<b>Referências.....</b>	<b>37</b>

## 1 Introdução

Lesões cutâneas fazem parte da rotina clínica veterinária, com diferentes causas que exigem atenção para que se realize o tratamento correto (TILLMANN et al., 2015). Após o trauma, o processo de cicatrização inicia imediatamente, com a evolução da reparação cicatricial acontecendo em três fases. A primeira chamada de fase inflamatória ocorre em três a quatro dias, com a constrição de vasos lesionados e trombogênese. Após o quarto dia inicia a fase de proliferação do tecido, esta, podendo durar quatro semanas ou mais, é caracterizada pela geração de um novo endotélio. Após quatro semanas da ocorrência da lesão a cicatrização chega a fase de remodelação e esta pode durar dois anos ou mais, promovendo a contração e maturação da pele (ACKERMANN, 2009).

Conhecendo a ferida é possível escolher o tratamento adequado para que o processo de cicatrização ocorra de forma harmônica. Dentre os tantos medicamentos disponíveis no mercado, os produtos tópicos são usados para estimular o processo cicatricial e prevenir contaminações. São frequentemente utilizados na prática veterinária: antissépticos, açúcar e formulações de pomadas e géis com agentes antibacterianos (HUPPES et al., 2013). Contudo, mesmo com uma gama de recursos existente no mercado suas ações são contraditórias. Assim, é importante o desenvolvimento de estudos que não só busquem aperfeiçoar fármacos existentes, mas também novos recursos igualmente eficientes porém mais simples e acessíveis (MANDELBAUM et al., 2003A).

Nesse contexto, uma alternativa são as plantas medicinais, em geral de baixo custo e facilmente encontrados no mercado, ganham espaço no mercado com o intuito de aumentar as opções terapêuticas (KLEIN et al., 2009). O uso de fitoterápicos é impulsionado pela “Política de Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos” que entendendo a necessidade de reconhecer as terapias utilizadas na medicina tradicional, estabeleceu diretrizes para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovações no setor fitoterápico. Esta política visa garantir a segurança, a eficácia e a qualidade dos fitoterápicos para que possam ser produzidos em escala industrial. Desta forma a fitoterapia vem ganhando projeção

no Brasil por ser uma oportunidade de acumulação e inovação tecnológica que se reflete no desenvolvimento econômico do país (MACEDO & GEMAL, 2009).

Dentre as plantas medicinais mais utilizadas no Brasil está a *Bixa orellana* L. conhecido popularmente como urucum, que apresenta o óleo da semente rico em carotenóides, açúcares, ácidos-graxos fixos e essenciais. Amplamente utilizado nas comunidades aborígenes do Brasil, já teve diversas das suas funções terapêuticas comprovadas academicamente, porém são raros os estudos direcionados à cicatrização cutânea (VILAR et al., 2014).

Considerando os pontos abordados, essa dissertação se propõe a investigar o potencial do extrato da semente de urucum na cicatrização de feridas cutâneas abertas em modelo animal. Para tanto, se realizou extensa busca bibliográfica acerca do tema. Considerando a hipótese de que o extrato oleoso de urucum, em doses não citotóxicas ou sub-citotóxicas, interage no processo cicatricial, acelerando-o e promovendo uma cicatrização mais resistente e harmônica. Assim se desenhou um roteiro experimental para avaliar o potencial terapêutico do urucum em feridas cutâneas abertas em modelo murino.

O planejamento experimental teve como objetivo descrever a evolução e a qualidade da cicatrização de feridas cutâneas abertas em modelo experimental tratadas com diferentes concentrações de extrato oleoso de urucum. Considerando os seguintes objetivos específicos: I - avaliar a toxicidade de varias concentrações do extrato oleoso de urucum em ensaio *in vitro*, determinando as doses a serem estudadas em modelo animal; II - observar as lesões tratadas quanto a parâmetros clínicos e de retração cicatricial aos quatro, sete, 14 e 21 dias; III - avaliar fígado e rins histologicamente, quanto a efeitos deletérios aos quatro, sete, 14 e 21 dias de tratamento; IV - analisar a evolução morfológica do tecido das feridas tratadas classificando-as quanto a fase cicatricial; V - determinar a força de tensão suportada pela cicatriz formada após 21 dias de tratamento.

Por fim, os resultados destes experimentos foram compilados na forma do artigo intitulado “Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental” que esta formatado segundo as normas, e será submetido à revista Arquivo Brasileiro em Medicina Veterinária e Zootecnia.

## **2 Revisão de Literatura**

### **2.1. Cicatrização**

A pele é o maior e o mais complexo órgão do corpo animal, desempenhando múltiplas funções como barreira protetora, termo regulação, síntese de vitamina D, sede de receptores sensoriais e reservatório de água, minerais e gorduras. Estruturalmente, a pele é composta por duas camadas, a epiderme e a derme. A primeira é um epitélio estratificado queratinizado organizado em subcamadas, as quais se restauram por divisão celular conforme as porções mais superficiais são descamadas (BRAGULLA et al., 2004). A epiderme possui três tipos celulares principais, os queratinócitos, com função de barreira protetora, os melanócitos, responsáveis pela pigmentação da pele e células de Langerhans, que servem como mediadoras da resposta inflamatória. Já na porção mais profunda da pele temos a derme, uma camada basal conjuntiva espessa, com diversos tipos celulares. Os fibroblastos, fibrócitos, fibras colágenas e elásticas que proporcionam resistência e elasticidade a pele, os capilares sanguíneos que nutrem a epiderme sem penetrá-la, terminações nervosas sensoriais e anexos da pele (BLANES, 2004).

No momento em que a pele sofre um trauma, de qualquer natureza, ocorre a interrupção da continuidade do tecido corpóreo, afetando a fisiologia da pele e desencadeando imediatamente a frente de defesa do organismo (ISAAC et al., 2010). Uma série de eventos dinâmicos vão regenerar o tecido lesionado reestabelecendo sua continuidade tissular. O processo de cicatrização pode ser didaticamente dividido em três principais fases: inflamatória, proliferativa e de maturação. A fase inflamatória, que inicia imediatamente após o trauma, com a vasoconstrição para conter a hemorragia local. Concomitantemente, ocorre a deposição e ativação plaquetária com infiltração de fibrina e eritrócitos, os quais formam um primeiro tampão na lesão que se torna mais consistente conforme a fibrina vai se polimerizando pelas vias da coagulação (BLANES, 2004). A ativação plaquetária libera mediadores quimiotáticos que vão promover a migração de células inflamatórias para o local lesionado. Nesta fase, predominam neutrófilos e

macrófagos, os quais vão digerir e fagocitar bactérias e restos celulares. Além, disso os macrófagos produzem diversos fatores de crescimento, estes por sua vez, atraem para o local lesionado e induzem a proliferação fibroblastos e queratinócitos que são as principais células de regeneração da pele (BALBINO et al., 2005) iniciando assim a fase proliferativa.

A fase proliferativa caracteriza-se pela reepitelização, angiogênese e fibroplasia. Os queratinócitos migram das bordas da ferida e multiplicam-se, reestruturando as camadas da epiderme e promovendo a reepitelização tecidual. Ocorre a angiogênese, ou seja, a abundante formação de vasos novos e finos a partir de vasos íntegros adjacentes, estes com a função de fornecer oxigênio e nutrientes para cicatrização. Simultaneamente ocorre a deposição e proliferação de fibroblastos sobre a rede de fibrina formando um tecido frouxo, denominado tecido de granulação. Os fibroblastos secretam elastina, fibronectina, glicosaminoglicana, proteases e colágeno, principalmente colágeno tipo III, os quais são responsáveis pela regeneração tecidual (MANDELBAUM et al., 2003 A; ISAAC et al., 2010).

A terceira etapa da cicatrização é marcada pela remodelação tecidual. Nesta fase o colágeno tipo III, presente em maior quantidade no tecido de granulação, é degradado dando lugar à produção fibroblástica de colágeno tipo I. Além da reorganização das fibras colágenas que primeiramente estão dispostas de forma aleatória e com o tempo se entrelaçam organizando-se em linhas. Concomitantemente a reorganização das fibras colágenas, há a redução de todos os elementos celulares, inclusive dos fibroblastos e elementos do tecido conjuntivo. Ao final desta etapa há redução da neovascularização, permanecendo apenas alguns capilares espessos e a regeneração dos anexos da pele como glândulas e folículos pilosos (ACKERMANN, 2009).

O processo de maturação da ferida é lento, podendo levar meses para reorganizar as fibras colágenas e atingir as quantidades adequadas de colágeno tipo I e III que irão aumentar a força da cicatriz, diminuir sua espessura e fornecer elasticidade. Assim, a cicatrização normal pode atingir características semelhantes ao tecido íntegro e sua resistência pode chegar a 80% da força de tensão fisiológica original (MANDELBAUM et al., 2003A).

A cicatrização de feridas pode decorrer de três formas: de primeira intenção, quando há perda de tecido, mas os bordos da pele permanecem justapostos; por segunda intenção, quando há perda de tecido e as extremidades da pele ficam

afastadas; e por terceira intenção, quando a lesão em um primeiro momento tem os bordos afastados iniciando um processo cicatricial de segunda intenção, mas posteriormente é realizada sutura de aproximação de bordos para que siga uma cicatrização de primeira intenção (BLANES, 2004).

Uma cicatrização que transcorreu naturalmente sem alterações em nenhuma etapa tende a formar uma cicatriz normotrófica, ou seja, o tecido regenerado possui textura e consistência semelhante a pele íntegra. Entretanto, quando o processo cicatricial não evolui harmonicamente, seja por fatores intrínsecos ou extrínsecos, observa-se uma cicatriz hipertrófica, com coloração avermelhada ou rosa, rígida, tridimensionalmente pouco elevada e que não ultrapassa os bordos da ferida. Quando observadas em microscopia visualiza-se colágeno produzidos em quantidade adequada, porém suas fibras são desorganizadas, o que demonstra a falta de harmonização do processo (CANDIDO, 2006).

Diferente da cicatriz hipertrófica, o quelóide é uma cicatriz com crescimento celular exacerbado, elevada, que ultrapassa os bordos da lesão, com coloração arroxeada e superfície brilhante. Histologicamente, ocorre proliferação exacerbada e contínua de colágeno imaturo, desorganização das fibras colágenas, excesso de produção de fibroblastos e miofibroblastos indicando a persistência do processo cicatricial (RABELLO et al., 2014). Assim para que ocorra uma cicatrização regular e harmônica, é essencial conferir devida atenção às feridas cutâneas, priorizando o tratamento adequado da lesão desde a sua origem (MANDELAUM et al., 2003B).

Para escolha do tratamento é necessário caracterizar a ferida, por tipo e grau de contaminação. Uma ferida do tipo cirúrgica é aquela induzida assepticamente com instrumental cortante apropriado, enquanto a lesão traumática é derivada de uma ação mecânica qualquer formando uma ferida séptica e com bordos irregulares. Quanto ao grau de contaminação, a ferida pode ser limpa, normalmente estas são as feridas cirúrgicas que transcorreram dentro dos padrões assépticos. Feridas contaminadas, são as traumáticas não infectadas e por último as feridas infectadas, sendo também do tipo traumática, porém com presença de exsudato purulento (TILLMANN et al., 2015).

Determinar o tratamento adequado a cada lesão é de extrema importância, pois existe uma gama de estudos em cicatrização (TILLMANN et al., 2015), o que remete em uma diversidade de recursos destinados ao auxílio deste processo. Diversos fatores extrínsecos e intrínsecos interferem na evolução da cicatrização,

assim é crucial uma correta avaliação da lesão e do paciente, para que se determine o tratamento a ser utilizado (MANDELAUM et al., 2003A).

A utilização de produtos tópicos visa higienizar e/ou proteger o local lesionado. Sendo comumente utilizados na medicina veterinária os antissépticos clorexidine e polivinilpirrolidona iodo por possuírem ação antimicrobiana. Contudo, se sabe que estes agem nas proteínas e membranas celulares, tanto de microorganismos quanto da pele, sendo contestada sua utilização no tratamento de feridas. Estudos demonstram que clorexidine e polivinil pirrolidona iodo atuam reduzindo a contaminação do local lesionado, mas não estimulam o processo cicatricial, pelo contrário demonstram prejudicar a qualidade da cicatriz (TILLMANN, 2011).

Outros agentes foram estudados visando atuar no processo cicatricial. De Nardi et al (2004) observaram a utilização de ácidos graxos no tratamento de feridas abertas em cães, ressaltando sua ação na aceleração da cicatrização de feridas limpas, quando comparado ao antisséptico polivinilpirrolidona iodo. Os ácidos graxos influenciam a angiogênese e fibroplasia favorecendo a cicatrização, além de umidificar a lesão. A manutenção da umidade no local lesionado acelera a angiogênese, evita desidratação e morte tecidual local, promove desbridamento autolítico e reduz a dor local (BLANES, 2004).

Outra medida terapêutica difundida na prática veterinária para o tratamento de feridas abertas é o açúcar, muito utilizado na cultura popular e estudado para ser uma alternativa de baixo custo nesse processo. A sacarose da cana de açúcar reduz o edema local, favorece a granulação tecidual e demonstra ação bactericida e/ou bacteriostática frente às principais bactérias encontradas em lesões de cães e gatos, podendo ser escolha para tratamento de feridas contaminadas (MONTEIRO et al., 2007).

## **2.2. Plantas medicinais**

Registros históricos comprovam a utilização de diversas espécies de plantas nativas brasileiras para cura de enfermidades desde o século XIX (BRANDÃO et al., 2008). As práticas empíricas com plantas medicinais muitas vezes são as únicas formas de tratamentos disponíveis em uma região, assim desenvolveram-se várias

formas de preparo e o aproveitamento de diferentes partes de uma mesma planta empregando-as para mais de um problema de saúde (RIBEIRO et al., 2014).

A medicina atual tem como base as plantas medicinais para desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos levando em consideração a necessidade do reconhecimento das terapias populares como parte integrante dos sistemas de saúde (MACEDO & GEMAL, 2009). Contudo, a ANVISA (2010) considera a medicação fitoterápica como um produto industrializado, oriundo de uma planta medicinal e para que possa ser comercializado deve ter sua ação comprovada cientificamente além de seguir as normas sanitárias, cuidados de uso e registro. Os estudos de fitoterapia em cicatrização comprovam a ação de algumas plantas populares como babosa, maracujá amarelo e trigo, usadas para estimular a cicatrização (GARROS et al., 2006; MARTINS et al., 2006; TILLMANN et al., 2009; SOARES et al., 2013). Enquanto Neto et al (2006) contestam a crença popular do uso da aroeira demonstrando ações prejudiciais a cicatrização. Estes estudos ressaltam a importância de estudar as plantas com potencial cicatricial verificando seus reais efeitos.

### **2.3. Urucum**

Urucum é o nome popular da planta da espécie *Bixa orellana* L., família Bixaceae e gênero *Bixa*. É uma planta nativa dos trópicos latino-americanos, abundante no Brasil, especialmente na região amazônica (ULBRICHT et al., 2012). Considerado um arbusto, possui em média quatro metros de altura, suas sementes são rígidas e pequenas medindo de 0,3 a 0,5 cm, encontradas em cápsulas ovóides cobertas por espículos flexíveis de cor avermelhada. As sementes atraem o maior foco comercial, pois contém os pigmentos que oferecem coloração avermelhada, sendo amplamente utilizado na indústria alimentícia e cosmética como corante natural (VILAR et al., 2014).

As sementes de urucum são ricas em carotenóides, cerca de 30%, responsáveis pelo pigmento vermelho. Os outros 70% é composto por cinzas, proteínas, lipídeos, carboidratos e umidade (CARVALHO et al., 2010). O óleo de *Bixa orellana* dispõe dos ácidos graxos linoléico, ácido palmítico, ácido oléico e ácido esteárico, importantes compostos dos processos metabólicos do organismo (COSTA et al., 2013).

Esta planta é historicamente utilizada por indígenas para colorir cerâmicas e demais utensílios de uso da tribo, além de técnica de embelezamento, sendo aplicado na pele em rituais religiosos e em guerras para camuflagem e proteção da pele (VILAR et al., 2014). O urucum obtido empiricamente através da decocção e suco de folhas tem sido utilizado para tratar indigestão, febre, fortificar o fígado, disenteria e hepatite. Outros produtos obtidos da semente e flores são comercializados com indicação para hipercolesterolemia, inflamações em geral, emagrecedor, para doenças gástricas e urinárias, apneias, asma, infecções bacterianas, catarata e outras (ULBRICHT et al., 2012).

Assim estudos investigam as ações farmacológicas da *Bixa orellana* L. estimulados pelas descrições empíricas. Ferreira et al (2013), observaram ação hipolipidêmica do extrato aquoso de urucum e sugerem sua capacidade hepato-protetora. O extrato aquoso da folha do urucuzeiro possui propriedades anti-histamínicas, modulando a permeabilidade vascular (YONG et al., 2013). Anteriormente, Gonçalves et al (2005) comprovaram, em ensaio *in vitro*, a sensibilidade das bactérias *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilise*, *Staphylococcus aureus* ao extrato da planta. Além destes, Souza et al (2014) observaram que o urucum aumentou a densidade de mastócitos a longo prazo na cicatrização de feridas bucais de modelos experimentais, sugerindo estudos mais detalhados para elucidar o mecanismo de ação desta planta nos tecidos.

### **3 Artigo**

**Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental**

**S.O. Capella, M.T. Tillmann, A.O.C. Felix, E.G. Fontoura, C.G. Fernandes, R.A. Freitag, M.A.Z. Santos, S.R.Felix, M.O. Nobre.**

**Submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**

1 **Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em**  
2 **modelo experimental**

3 **Therapeutic potential of *Bixa orellana* L. in skin wounds: a study in the**  
4 **rat model of open wound**

5  
6 **Resumo**

7 O uso de fitoterápicos é uma alternativa de baixo custo e fácil acesso para o  
8 tratamento de feridas cutâneas. Objetivou-se avaliar a ação do extrato oleoso de urucum  
9 na cicatrização de feridas cutâneas abertas. Inicialmente, identificou-se os principais  
10 ácidos graxos do óleo de urucum. Foi realizado ensaio citotóxico para determinar as  
11 concentrações a serem utilizadas no ensaio *in vivo*. No experimento feridas cutâneas em  
12 ratos wistar foram diariamente tratadas com: Extrato de urucum 0,1% (U 0,1%), extrato  
13 de urucum 0,01% (U 0,01%), vaselina (V) e solução fisiológica (SF), por até 21 dias.  
14 Aos quatro, sete, 14 e 21 dias foram avaliadas clinicamente a presença de exsudato,  
15 crosta e epitelização. Determinaram-se as áreas da lesão e amostras de pele, fígado e  
16 rins foram coletadas para avaliação histológica. Aos 21 dias amostras de pele foram  
17 coletadas para análise tensiométrica. Clinicamente todos os grupos de tratamento  
18 apresentaram evolução cicatricial fisiológica. Os grupos U 0,1% e U 0,01%  
19 apresentaram maior presença de epitelização aos sete dias e maior retração cicatricial  
20 aos quatro dias. Na histologia, U 0,1% e U 0,01% apresentaram aos quatro e sete dias  
21 uma maior quantidade de fibrina e inflamação que V e SF e nos demais momentos não  
22 houve diferenças entre os grupos. Quanto a fase cicatricial, aos quatro dias todos os  
23 grupos encontravam-se na fase inflamatória, aos sete dias, U 0,1% e U 0,01%  
24 permaneciam na fase inflamatória diferindo de SF e V que caracterizavam-se na fase  
25 proliferativa. Aos 14 dias os grupos apresentavam-se em transição de fase proliferativa  
26 para maturação e aos 21 dias estavam todos na fase de maturação. Os grupos tratados  
27 com urucum expressaram menor resistência à tensão que V e SF. Concluiu-se com esse  
28 estudo que o extrato oleoso de urucum acelera o processo cicatricial nos primeiros dias,  
29 mas proporciona uma cicatriz de baixa qualidade.

30  
31 Palavras-chave: fitoterápico, urucum, fibrina, cicatrização.

33 **Abstract**

34         Phytotherapies are a low cost, easily accessible alternative to traditional  
35 medicines in wound healing management. The purpose of this study was to assess the  
36 oil extract of *Bixa orellana* L. as a healing agent in the rat model of open wound  
37 healing. Initially, the oil was obtained and characterized through gas chromatography.  
38 Furthermore, the cytotoxic potential of the oil was verified in cell cultures to determine  
39 the doses used in the animal experiments. Wounds were surgically produced in Wistar  
40 rats, these were treated with the oil extract at 0.1% (U 0.1%), 0.01% (U 0.01%), petrol  
41 jelly (V) and saline (SF) for up to 21 days. At four, seven and 14 days of treatment the  
42 wounds were assessed clinically regarding the presence of exudate, crust and  
43 epithelialization. The wound area was also determined and skin, kidney and liver tissue  
44 were harvested for histopathology. At 21 days of treatment the skins were also  
45 harvested for tension resistance assessment. Clinically, all groups evolved similarly,  
46 however, those treated with U 0.1% and U 0.01% had a greater amount of epithelialized  
47 wounds by day seven, and grater shrinkage by day four. Histopathologicaly, the skin  
48 samples of oil treated wounds had more lesions in the inflammatory phase at seven  
49 days, when compared to the controls, which were majorly in the proliferation phase. By  
50 14 days no difference was observed among groups, which were all in the transition from  
51 the proliferation to the maturation phase. By day 21, all wounds were in the maturation  
52 phase. Oil treated wounds also had more fibrin in the first two assessment dates, when  
53 compared to the controls. Tension resistance of the oil treated wounds was, however,  
54 inferior to that of the controls. This study shows that *B. orellana* L. oil will hasten the  
55 onset of the healing process and its initial phases, but will ultimately produce a scar of  
56 poorer quality.

57

58 Key words: phytotherapy, annatto, fibrin, healing.

59

## 60 **Introdução**

61 O ferimento cutâneo, de qualquer origem, é uma alteração anatômica da pele que  
62 afeta sua fisiologia, especialmente quando acomete a camada dérmica (Issac et al.,  
63 2010). Imediatamente após a lesão se inicia o processo de cicatrização com a infiltração  
64 de neutrófilos e macrófagos, fibroplasia, deposição de matriz extracelular, angiogênese  
65 e reepitelização. Esta sequência de eventos ocorre de forma interdependente e  
66 sobreposta, sendo divididos didaticamente em três fases (inflamatória, proliferativa e de  
67 maturação) para melhor compreensão e acompanhamento da evolução do processo  
68 cicatricial (Balbino et al., 2005; Laureano e Rodrigues, 2011). Os tratamentos tópicos  
69 de feridas abertas vêm sendo estudados desde a antiguidade e apresentam grandes  
70 avanços. Estes visam proteger a lesão e favorecer a cicatrização. Os medicamentos  
71 alopáticos mais utilizados no tratamento de feridas cutâneas são os antissépticos e  
72 degermantes (iodo povidona 1%, clorexidina 0,05%, açúcares, etc) e os antibióticos  
73 tópicos a base de bacitracina-neomicina-polimixina e sulfato de gentamicina  
74 (Mandelbaum et al., 2003; Tillmann et al., 2015).

75 A utilização empírica de plantas medicinais em diversos tipos de enfermidades é  
76 comum no Brasil, por serem elementos naturais e uma alternativa de baixo custo e fácil  
77 acesso a população (Leão et al., 2007; Ribeiro et al., 2014). A *Bixa orellana* L. é uma  
78 planta nativa brasileira, da região amazônica, conhecida popularmente por urucum.  
79 Possui em sua composição química aminoácidos (triptofano, metionina e lisina),  
80 carotenoides (bixina e norbixina), além de alto teor de ácidos graxos e pequenas  
81 quantidades de ácido linoleico e oléico. É amplamente utilizada nas indústrias  
82 alimentícia e cosmética por ser um corante natural, além disso, estudos demonstram sua  
83 atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, laxativa e hipotensora, quando  
84 extraído de diferentes formas e de partes variadas da planta (Vilar et al., 2014).

85 Desta forma, mesmo com a gama de produtos encontrados no mercado, são  
86 poucos os ensaios que avaliaram o seu uso na cicatrização de feridas (Santos et al.  
87 20014). Assim, o presente estudo busca determinar o uso do extrato oleoso da semente  
88 de urucum observando sua ação no tratamento de feridas abertas, em modelos  
89 experimentais.

90

91

## 92 **Materiais e Métodos**

93 Os extratos foram obtidos a partir de amostras da planta Urucum (*Bixa orellana*  
94 L.), colhida no mês de maio de 2013, na cidade de Jaru-Rondônia-Brasil. A planta foi  
95 previamente identificada e registrada (PEL N° 25.971), pelo Herbário Botânico  
96 (Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas-UFPel) através da análise das  
97 folhas, flores, frutos e sementes.

98 Após a identificação, as sementes secas de urucum foram trituradas para  
99 aumentar sua superfície de contato, favorecendo a extração. Utilizou-se a técnica Sohlet  
100 com hexano como solvente a uma temperatura de 68°C, por seis horas. O óleo obtido  
101 passou pelo evaporador rotativo para remoção do solvente e obtenção do óleo de  
102 urucum purificado. O óleo foi então acondicionado em refrigerador (4 °C), ao abrigo da  
103 luz, até sua utilização.

104 A quantificação e identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi  
105 realizada utilizando o cromatógrafo a gás acoplado ao detector de massas, modelo  
106 GC/MS-QP 2010SE (Shimadzu, Japão) equipado com auto injetor AOC-20i. A  
107 separação ocorreu em uma coluna capilar RTX-5MS (Restek, USA) com dimensões de  
108 30m x 0,25mm x 0,25µm nas seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial  
109 de 50°C elevando 10°C/min até atingir 280°C, permanecendo nesta condição por 11  
110 min; volume injetado: 1µL ; interface: 300°C; temperatura do injetor: 280° C; gás de  
111 arraste: hélio; fluxo linear de gás: 1,22mL.min-1; split: 1:50; corrida em modo scan;  
112 faixa de massa 40 a 700m/z e voltagem do filamento 70eV. As quantificações foram  
113 estabelecidas por área normatizada e as identificações dos compostos pelo espectro de  
114 massas utilizando a biblioteca NIST 8 do GC/MS a qual armazena informações de  
115 compostos previamente identificados.

116 Com a obtenção do extrato de *Bixa orellana* L. foi realizado o ensaio de  
117 citotoxicidade em células VERO (*African Green Monkey Kidney*), determinando a dose  
118 a ser utilizada no ensaio *in vivo*. As células VERO foram cultivadas em meio essencial  
119 mínimo (MEM), após formarem uma monocamada confluyente, alíquotas foram  
120 coletadas para realizar o subcultivo em placas de 96 cavidades com fundo chato, para a  
121 realização do teste do efeito citotóxico por 48 horas através do MTT (brometo de 3-  
122 (4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio). Para que o tratamento testado fosse  
123 emulsificado ao MEM, foi adicionado à este DMSO (dimetilsulfóxido) numa diluição

124 de 1:200. As diluições utilizadas foram da seguinte relação, 10% de tratamento (10 µL  
125 extrato/90 µL MEM/DMSO), 5%, 1% e seguida uma diluição seriada de 0,1% até  
126 0,00001% (conforme legenda da figura 1). Cada ensaio contou com oito poços de cada  
127 concentração (e controle). Os testes foram feitos em triplicata (para um N final de 24  
128 ensaios por concentração) e a viabilidade celular foi obtida através do seguinte cálculo:  
129 média da absorbância dos tratados/ média dos controles x 100.

130 De acordo com o teste *in vitro* estabeleceram-se as concentrações de 0,1% e  
131 0,01% (fig. 1) para a utilização em ensaio *in vivo*. Este o estudo foi aprovado pelo  
132 Comitê de Ética e Experimentação Animal – UFPel, processo nº 23110.007605/2012-  
133 21, registro CEEA 7605-2012. Foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvegicus*), Wistar,  
134 machos, com idade média de 60 dias, os quais foram alocados dois animais por caixa e  
135 mantidos com água e ração específica *ad libitum* durante todo período experimental. Os  
136 animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de acordo com o tratamento  
137 recebido: solução fisiológica (Grupo SF), vaselina (Grupo V), extrato oleoso de urucum  
138 0,1% (Grupo U 0,1%) e extrato oleoso de urucum 0,01% (Grupo U 0,01%). Sendo  
139 utilizada a vaselina sólida como veículo para a administração do extrato de urucum nas  
140 diferentes concentrações.

141 Os animais receberam anestesia dissociativa com associação de xilasina  
142 (10mg/Kg) e Cetamina (100mg/Kg) por via intraperitoneal para a confecção de duas  
143 lesões no dorso, utilizando *punch* metálico (nº 8mm). Cada ferida foi tratada  
144 imediatamente após o procedimento cirúrgico e diariamente com 0,5 mL de solução  
145 fisiológica (NaCl 0,9%) para a limpeza e posteriormente a aplicação de 0,1mL dos  
146 tratamentos. O período experimental foi de 21 dias de tratamento e aos quatro, sete, 14 e  
147 21 dias os animais foram eutanasiados (conforme a resolução nº 1000 de 12 de maio de  
148 2012, CFMV) para avaliação clínica, histopatológica e tensiométrica das lesões.

149 Na avaliação clínica foram analisadas as lesões de cada grupo nos diferentes  
150 tempos de tratamento quanto à presença/ausência de exsudato, crosta e epitelização.  
151 Para a análise de retração cicatricial foi realizado registro fotográfico das lesões  
152 utilizando câmera fotográfica digital (Samsung ES17) fixada ao tripé de modo mantê-la  
153 a 15 cm de distância da ferida. A imagem obtida foi transferida para programa GIMP 2<sup>®</sup>  
154 e recebeu tratamento para obtenção de uma camada única da lesão. Posteriormente a

155 imagem tratada foi exportada para o programa Image J<sup>®</sup>, onde se determinou a área da  
156 lesão em mm<sup>2</sup>.

157 As amostras de tecidos coletadas na necropsia foram fixadas em formol 10%,  
158 processadas e coradas em hematoxilina-eosina. Nas amostras de fígado e rins observou-  
159 se a presença/ausência de alterações degenerativas, inflamatórias ou proliferativas. As  
160 amostras de pele foram analisadas, atribuindo-se escores aos seguintes parâmetros:  
161 crosta, debris celular, epitelização, quantidade de inflamação, padrão inflamatório,  
162 densidade fibroblástica, padrão de colágeno e angiogênese. Com o somatório dos  
163 escores classificou-se as amostras quanto à fase de cicatrização (inflamatória,  
164 proliferativa, maturação). Além destes avaliou-se a quantidade de fibrina na lesão.

165 Na avaliação tensiométrica, utilizou-se um molde em formato de ampulheta para  
166 que as amostras de pele tivessem duas extremidades para fixação ao equipamento e a  
167 ferida não apresentasse pele integra adjacente. Foram utilizadas 15 amostras de cada  
168 grupo de tratamento aos 21 dias as quais se verificou a tensão (Pascal) máxima  
169 suportada pela área da lesão no momento da deformação, através da máquina universal  
170 de ensaio (DL 500).

171 Os dados contínuos foram comparados através do teste T de Student. Dados  
172 categóricos foram comparados através do teste de Fisher (nominais) ou de Kruskal-  
173 Wallis (ordinais) e as comparações múltiplas entre os grupos foram feitas com o teste de  
174 Mann-whitney (ordinais). Todos os ensaios foram rodados nos pacotes  
175 de *software* GraphPad Prism<sup>®</sup> e Microsoft<sup>™</sup> Excel 11.

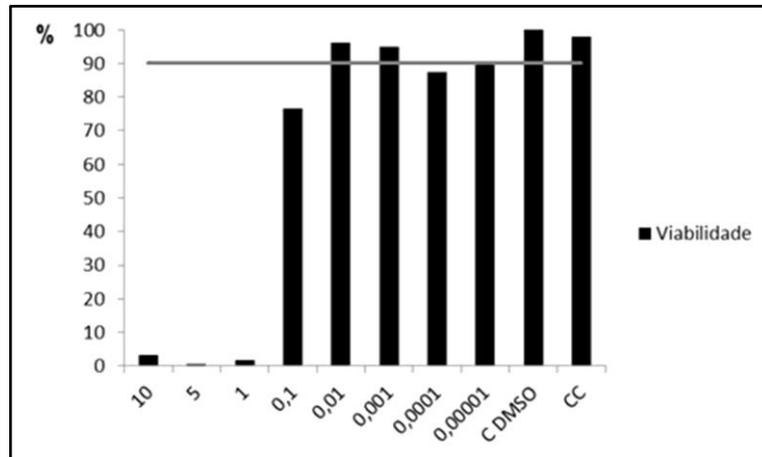
176

## 177 **Resultados**

178 Na caracterização cromatográfica foram encontrados os seguintes compostos  
179 majoritários: ácido linoleico (37%), geranil linalool (28%), ácido palmítico (16%) e  
180 ácido oleico (9%), além de ácido esteárico (4%), escaleno (3%) e geranil- $\alpha$ -terpinene  
181 (3%).

182 No teste de citotoxicidade as diluições iguais ou menores que 0,1% se  
183 mostraram tóxicas e diluições maiores apresentaram viabilidade superior a 90% (exceto  
184 a diluição 0,0001%), quando comparadas ao controle. Os resultados completos do  
185 ensaio de citotoxicidade estão expressos na Fig. 1. Optou-se por utilizar para o estudo  
186 experimental *in vivo* a primeira concentração não citotóxica (0,01%) e a última

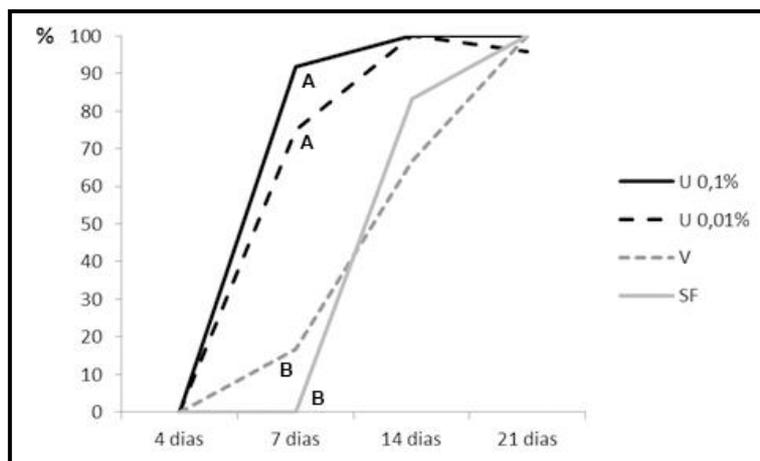
187 citotóxica (0,1%), pelo fato da célula ser uma unidade básica enquanto os tecidos são  
188 formados pela união de diversas células se mostrando uma unidade mais complexa  
189 (Moura et al.,2013) e podendo ser mais resistente a maiores concentrações do extrato.  
190



191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200

Figura 1. Percentual de viabilidade celular em diferentes concentrações do extrato oleoso de urucum (*Bixa orellana* L.) evidenciado por ensaio de citotoxicidade em células VERO. A viabilidade do grupo controle (CC) representa 100%. A barra horizontal representa 90% do CC (ponto de corte para viabilidade). Estão apresentados resultados médios de oito poços/tratamento/ensaio e três repetições (N final=24 por tratamento).

201 Nas análises clínicas verificou-se a presença dos parâmetros exsudato, crosta e  
202 epitelização em percentuais esperados no processo cicatricial nos distintos momentos de  
203 avaliação. Aos quatro dias, todos os grupos expressavam presença de exsudato em 50%  
204 ou mais das lesões, reduzindo em todos ao longo do tempo. Quanto aos percentuais de  
205 crosta, aos quatro dias os grupos U 0,1% e U 0,01% (83% e 66%) apresentaram  
206 percentuais iguais ou maiores que os grupos V e SF (66% e 41%) mesmo não havendo  
207 diferenças estatísticas. Aos sete dias todos os grupos expressaram 100% de presença de  
208 crostas e reduzindo ao longo do período de tratamento. A presença de epitelização foi  
209 evidenciada, aos sete dias, nos grupos U 0,1% (92%) e U0,01% (75%) com  
210 significativa diferença ( $p < 0,05$ ) dos grupos V (16%) e SF (ausência) (Fig. 2).  
211



212  
 213 Figura 2. Percentual de presença de epiteliação em  
 214 feridas tratadas com diferentes doses de extrato oleoso de  
 215 urucum (*Bixa orellana* L.), vaselina e solução fisiológica  
 216 aos quatro, sete, 14 e 21 dias. Letras diferentes  
 217 representam frequências estatisticamente diferentes  
 218 ( $p < 0,05$ )  
 219

220 Na planimetria digital foi observado, em todas as lesões tratadas, a aproximação  
 221 dos bordos da ferida ao longo do período experimental. Sendo que aos quatro dias de  
 222 tratamento os grupos U 0,1% e U 0,01% apresentaram áreas médias de  $37,2\text{mm}^2$  e  
 223  $34,1\text{mm}^2$ , diferindo ( $p < 0,05$ ) dos grupos V e SF ( $55\text{mm}^2$  e  $52,6\text{mm}^2$ ). Aos setes dias foi  
 224 constatada áreas médias de  $36,4\text{mm}^2$ ,  $39,2\text{mm}^2$ ,  $32,7\text{mm}^2$  e  $24,5\text{mm}^2$  (U 0,1%, U  
 225 0,01%, V e SF, respectivamente) resultando em diferença ( $p < 0,05$ ) do grupo SF quando  
 226 comparados aos grupos U0,1% e U0,01% (Fig. 3).

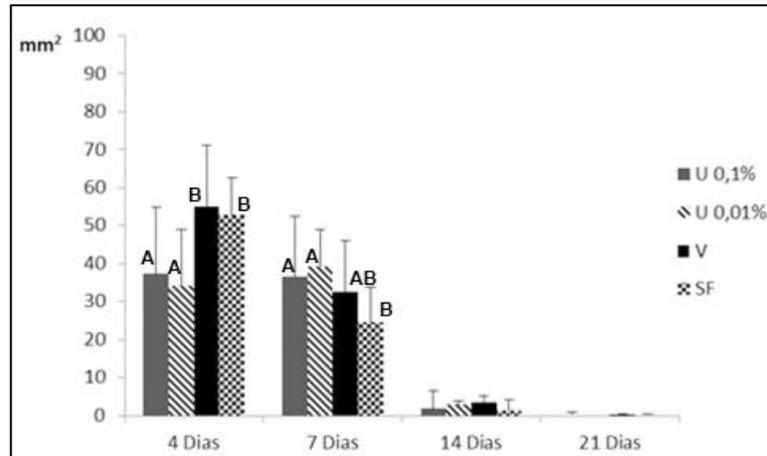


Figura 3. Demonstração de média (desvio padrão) das áreas de lesão em mm<sup>2</sup> representando a retração cicatricial de feridas tratadas com óleo de urucum (*Bixa orellana* L.) nas concentrações de 0,1% e 0,01% de vaselina e Solução fisiológica aos quatro, sete, 14 e 21 dias. Letras diferentes representam frequências estatisticamente diferentes (p<0,05).

A análise tensiométrica, realizada aos 21 dias de tratamento, demonstrou que U 0,1% e U 0,01% apresentaram tensão significativamente menor (p<0,05) que os tratamentos com V e SF (Fig. 4).

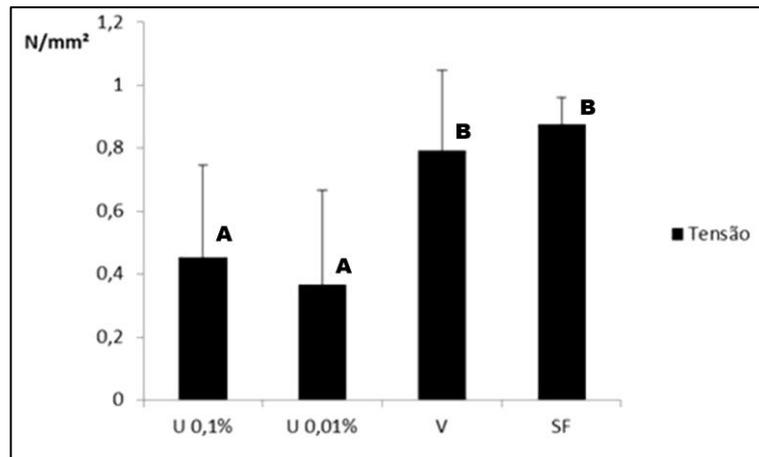


Figura 4. Médias (desvio padrão) da tensão suportada (em Pascal) pelas amostras de pele dos grupos tratados com extrato de urucum nas concentrações de 0,1% e 0,01%, vaselina e solução fisiológica aos 21 dias. Letras diferentes representam frequências estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

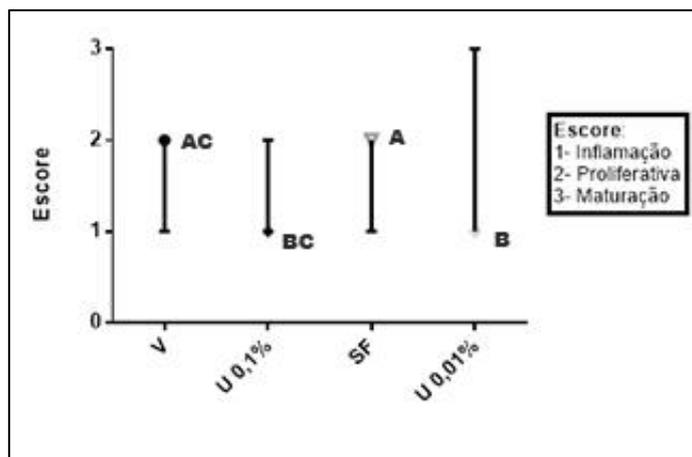
257

258

259

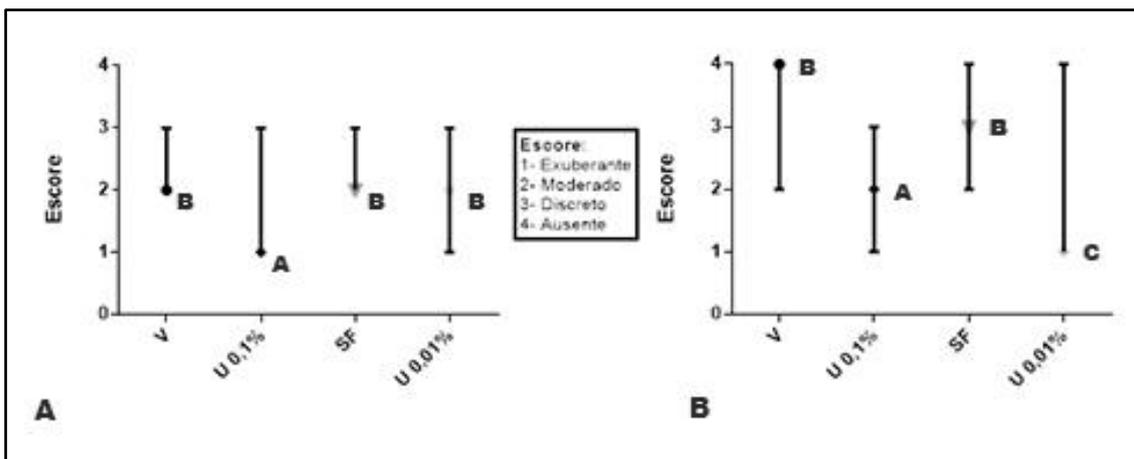
260

Histologicamente, quando observadas as amostras de pele, verificou-se em todos os grupos a evolução cicatricial dentro dos padrões fisiológicos. Aos quatro dias, todos os grupos encontravam-se majoritariamente na fase inflamatória. Entretanto, aos sete dias o grupo SF apresentou mais lesões na fase proliferativa, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) dos grupos tratados com extrato oleoso de urucum, nos quais prevalecia a fase inflamatória. Assim como o grupo V mostrou maior percentual de amostras na fase proliferativa (75%), quando comparado ao grupo U 0,01% (17%) (Fig. 5). Aos 14 dias de tratamento todos os grupos apresentavam em uma etapa de transição entre as fases proliferativa e de maturação, não diferindo significativamente. Ao final dos 21 dias de tratamento predominava a fase de maturação em todos os grupos. Nas amostras teciduais de rins e fígado, observaram-se características celulares dentro dos padrões fisiológicos, sem alterações degenerativas, inflamatórias ou proliferativas.



261  
 262 Figura 5. Demonstração da prevalência de fase da  
 263 cicatrização nos grupos U 0,1%, U 0,01%, V e SF aos  
 264 sete dias de tratamento. Marcadores representam a  
 265 mediana do grupo, barras representam o alcance  
 266 (escores máximo e mínimo). Letras diferentes  
 267 representam frequências estatisticamente diferentes  
 268 ( $p < 0,05$ )

269 Na visualização do padrão fibrina, o grupo U 0,1% expressou maior quantidade  
 270 quando comparado aos grupos V e SF aos quatro dias de tratamento ( $p < 0,05$ ) (Fig. 6A).  
 271 Esta diferença se manteve aos sete dias, percebendo-se uma abundante quantidade de  
 272 fibrina nos grupos tratados a base do extrato oleoso de urucum quando comparados às  
 273 lesões tratadas com Vaselina ( $p < 0,05$ ) e solução fisiológica ( $p < 0,05$ ). Além disso, o  
 274 grupo U 0,01% apresentou importante exuberância de fibrina diferindo estatisticamente  
 275 do grupo U 0,1% ( $p < 0,05$ ) (Fig. 6B). Quando observada a fibrina aos 14 dias houve  
 276 uma redução de sua densidade, sem diferenças significativas entre os grupos, porém os  
 277 grupos tratados com óleo de urucum (U 0,1% e U 0,01%) apresentavam algumas  
 278 amostras com discreta ou moderada presença de fibrina quando comparadas aos grupos  
 279 vaselina e solução fisiológica. Aos 21 dias não havia presença de fibrina em nenhum  
 280 dos grupos de tratamento.



281

282

283

284

285

286

## 287 **Discussão**

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

Figura 6. Quantidade de fibrina presente nos grupos U 0,1%, U 0,01%, V, SF, aos quatro dias (A) e aos sete dias (B). Marcadores representam a mediana do grupo, barras representam o alcance (escores máximo e mínimo). Letras diferentes representam frequências estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

Os resultados gerados neste estudo mostram que o tratamento de feridas cutâneas com extrato oleoso da semente de urucum é capaz de acelerar as fases iniciais da cicatrização. No extrato oleoso utilizado foram identificados ácidos graxos com conhecida importância terapêutica, como os ácidos linoleico e oleico. De Nardi et al. (2004) indicam o uso de tratamento a base ácidos graxos essenciais, lecitina e vitaminas para acelerar a cicatrização de feridas abertas limpas e sugerem que a ação ocorra devido a capacidade quimiotática dos ácidos graxos para células poli e mononucleares. Neste estudo o extrato oleoso de urucum expressou ação pró-inflamatória, acelerando o processo cicatricial com maior formação de crostas e epitelização em menor tempo quando comparado aos demais grupos. Além disso, os grupos U 0,1% e U 0,01% proporcionaram uma maior retração cicatricial aos quatro dias do reparo tecidual, possivelmente pela ação dos ácidos linoleico e oleico que aceleram a retração de feridas nos primeiros dias de tratamento (Cardoso et al., 2004). Já nos demais períodos de avaliação a retração cicatricial evoluiu em todos os grupos de forma semelhante.

Na análise histopatológica da pele, aos quatro dias de tratamento não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados quanto as fase da cicatrização prevalente, exibindo os eventos fisiológicos esperados do processo cicatricial no período. No

305 entanto as feridas tratadas com óleo de urucum apresentaram uma maior densidade  
306 inflamatória que os demais tratamentos, possivelmente devido à ação quimiotática dos  
307 ácidos graxos presentes no extrato de urucum. Além disso, os ácidos graxos agem  
308 facilitando a ação de fatores de crescimento, mantem o meio úmido e estimulam a  
309 formação de tecido de granulação acelerando a cicatrização (Marques et al., 2004;  
310 Manhezi et al., 2008). Este último é formado por uma fibrina que se deposita como uma  
311 rede no local lesionado e é infiltrada por plaquetas e eritrócitos (Balbino et al., 2005).  
312 Apoiando neste estudo, aos quatro dias de tratamento o grupo U 0,1% apresentou maior  
313 densidade de fibrina em relação aos grupos V e SF ( $p < 0,05$ ) e o grupo U 0,01% também  
314 evidenciou um ligeiro aumento na quantidade de fibrina quando comparado aos grupos  
315 V e SF, apesar de não expressar diferença estatística.

316 Aos setes dias, houve a permanência de intenso infiltrado inflamatório e a  
317 formação exuberante de uma rede de fibrina nos grupos U 0,1% e U 0,01%, o que não  
318 foi observado nos grupos V e SF mais uma indicação da ação pró-inflamatória e  
319 quimiotática deste extrato. Nesse momento as amostras tratadas com urucum, em sua  
320 maioria, apresentaram-se na fase inflamatória, diferindo dos grupos V e SF, os quais se  
321 classificavam na fase proliferativa, estas últimas demonstraram menor densidade  
322 inflamatória e maior densidade de fibroblastos e colágeno. O infiltrado inflamatório é  
323 responsável pela degradação de fibrina (Laureano et al., 2011), aos sete dias foi  
324 observado que a rede de fibrina era menos exuberante no grupo com menor  
325 concentração de urucum (U 0,01%) em relação ao grupo de maior concentração (U  
326 0,1%) ( $p < 0,05$ ). Este fato se justifica, mais uma vez, pelo efeito pró-inflamatório do  
327 urucum.

328 Com a evolução da cicatrização, já aos 14 dias todos os grupos de tratamento  
329 encontram-se nas fases proliferativa ou de maturação, não diferindo significativamente  
330 entre si. O mesmo pode ser observado aos 21 dias, quando predominou a fase de  
331 maturação em todos os grupos. Apesar da semelhança clínica e histopatológica das  
332 lesões aos 21 dias, os grupos U 0,1% e U 0,01% suportaram menor força de tensão  
333 demonstrando menor resistência do que os grupos V e SF. Dessa forma, ambos os  
334 tratamentos a base de urucum levaram a uma cicatriz de baixa qualidade, sugerindo a  
335 formação de um tecido imaturo. Fato corroborado com o observado nas análises  
336 histopatológicas onde se visualizou um padrão desorganizado de colágeno nas feridas

337 tratadas com urucum em comparação as tratadas com vaselina e solução fisiológica. A  
338 qualidade da cicatriz depende da quantidade e da organização do colágeno, sendo a  
339 cicatriz mais resistente conforme as fibras de colágeno vão se organizando, mesmo  
340 assim, jamais uma cicatriz atinge a mesma resistência de um tecido integro (Balbino et  
341 al., 2005).

342 Quando avaliada a morfologia do fígado e rins, não se observou alterações  
343 degenerativas, inflamatórias ou proliferativas, indicando que o extrato oleoso de urucum  
344 não possui efeito deletério a nível sistêmico. Corroborando com estudo que observou a  
345 ação positiva do extrato aquoso de urucum no controle da hipertrigliceridemia  
346 sugerindo seu efeito hepatoprotetor (Ferreira et al., 2013).

347 No extrato oleoso de urucum foram identificados ácidos graxos com conhecida  
348 importância terapêutica que asseguram a ação pró-inflamatória do óleo de urucum,  
349 acelerando o processo de cicatrização nos primeiros dias. Contudo, a aplicação a longo  
350 prazo implicou na persistência de células inflamatórias, retardando o processo de  
351 remodelação tecidual. Assim, sugere-se a utilização do extrato oleoso de urucum para o  
352 tratamento de feridas abertas extensas, em que há risco de contaminação, visando a  
353 aceleração da fase inicial da cicatrização e a formação rápida de um tecido de  
354 granulação que forme uma barreira protetora.

355

## 356 **Conclusões**

357 Nas condições apresentadas neste estudo, demonstrou-se que o extrato oleoso de  
358 urucum acelera o processo cicatricial nos primeiros dias da cicatrização, mas  
359 proporciona uma cicatriz que suporta menor força de tensão.

360

361

## 362 **Agradecimento**

363 A CAPES e CNPq (305072/2012-9) pela concessão de bolsas de estudo e apoio  
364 financeiro. Ao Instituto de Biologia - UFPel; Ao Instituto de Química – UFPel; Ao  
365 Centro de desenvolvimento e controles de Biomateriais da Faculdade de Odontologia –  
366 UFPel; Ao Biotério Central – UFPel.

367 **Referências**

- 368 BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização:  
369 uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- 370 CARDOSO, C.R.B.; SOUZA, M.A.; FERRO, E.A.V. Influence of topical  
371 administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of  
372 cutaneous wounds. *Wound repair and regeneration*. n.12, p.235-243, 2004.
- 373 DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S. et al. Cicatrização secundária em  
374 feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, vitaminas A e E,  
375 lecitina de soja e iodo polivinilpirrolidona em cães. *Archives of Veterinary Science*, v. 9,  
376 n. 1, p. 1-16, 2004.
- 377 FERREIRA, J.M.; SOUSA, D.F.; DANTAS, M.B. et al. Effects of *Bixa orellana* L.  
378 seeds on hyperlipidemia. *Phytotherapy Research*, v.27, p.144-147, 2013.
- 379 ISAAC, C.; LADEIRA, P.R.S.; RÊGO, F.M.P. et al. Processo de cura das feridas:  
380 cicatrização fisiológica. *Revista Medicina*, v. 89, n. ¾, p. 125-131, 2010.
- 381 LAUREANO, A.; RODRIGUES, A.M. Cicatrização de Feridas. *Revista da Sociedade*  
382 *Portuguesa de Dermatologia e Venerologia*, v.69, n.3, p.355-367, 2011.
- 383 LEÃO, R.B.A.; FERREIRA, M.R.C.; JARDIM, M.A.G. Levantamento de plantas de  
384 uso terapêutico no município de Santa Barbara do Pará, estado do Pará, Brasil. *Revista*  
385 *Brasileira de Farmacologia*, v.88, n.1, p.21-25, 2007.
- 386 MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, É.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização:  
387 Conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. *Anais Brasileiros de Dermatologia*,  
388 v.78, n.5, p. 525-542, 2003.
- 389 MANHEZI, A.C.; BACHION, M.M.; PEREIRA, Â.L.. Utilização de ácidos graxos  
390 essenciais no tratamento de feridas. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v.61, n.5, p.620-  
391 629, 2008.
- 392 MARQUES, S.R.; PEIXOTO, C.A.; MESSIAS, J.B. et al. The effects of topical  
393 application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. *Acta Cirurgica*  
394 *Brasileira*, V.19, n.3, p.196- 209, 2004.
- 395 MOURA, J.; DEUS, M.S.M.; GONÇALVES, N.M.N.; PERON, A.P. Biologia/genética:  
396 O ensino de biologia, com enfoque a genética, das escolas públicas no Brasil – Breve  
397 relato e reflexão. *Semina: Ciências biológicas e da Saúde*, v.34, n.2, p.167-174, 2013.

398 RIBEIRO, D.A.; MACÊDO, D.G.; OLIVEIRA, L.G.S. et al. Potencial terapêutico e uso  
399 de plantas medicinais em uma área da Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil.  
400 *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, v.16, n. 4, p. 912-930, 2014.

401 SANTOS, J.A.A.; SOUSA, M.F.A.M.; SILVA, E.L.V.; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A..  
402 Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no  
403 processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Revista Brasileira de Plantas*  
404 *Mediciniais*, Campinas, v.16, n.3, supl. I, p. 637-643, 2014.

405 TILLMANN, M. T.; FELIX, S. R.; MUNDSTOK, C.P. et al. Tratamento e manejo de  
406 feridas cutâneas em cães e gatos (revisão de literatura). *Nosso Clínico*, n.103, p. 12-19,  
407 2015.

408 VILAR, D.A.; VILAR, M.S.A.; MOURA, T.F.A.L. et al. Traditional uses, chemical  
409 constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: A review. *The Scientific*  
410 *World Journal*, v. 2014, p.11, 2014.

411  
412  
413  
414  
415  
416

## 4 Considerações Finais

Com os resultados alcançados neste estudo conclui-se:

- Em ensaio *in vitro* determinaram-se que concentrações de óleo de urucum iguais ou maiores a 0,1% são citotóxicas;
- Clinicamente o extrato oleoso de urucum nas concentrações de 0,1% e 0,01% acelerou a cicatrização de feridas abertas, promovendo maior retração cicatricial aos quatro dias e demonstrando maior presença de epitelização aos sete dias de tratamento;
- Na análise tensiométrica, as amostras tratadas com extrato oleoso de urucum demonstraram suportar menor tensão que as amostras tratadas com vaselina e solução fisiológica;
- Na análise histopatológica da pele, observou-se que os grupos tratados com extrato oleoso de urucum exacerbaram a fase inflamatória da cicatrização e a densidade de fibrina, diferindo dos demais grupos, aos quatro e sete dias de tratamento.
- Nenhum dos tratamentos avaliados provocaram alterações morfológicas no fígado e rins.

Assim observamos a ação cicatrizante do extrato oleoso de urucum, o qual influenciou principalmente a fase inicial no processo cicatricial e a remodelação tecidual. Assim sugere-se a continuidade dos estudos buscando especificar a ação do óleo de urucum nesses momentos. Também foi evidenciada neste estudo, a ausência de alterações histopatológicas hepáticas e renais nos animais tratados, entretanto para garantir a segurança da utilização do extrato ensaios específicos de toxicidade ainda devem ser realizados.

## Referências

ACKERMANN, Mark R. Inflamação Crônica e Cicatrização de Feridas. In: **Bases da patologia em veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p.153-192.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. O que devemos saber sobre medicamentos. **Plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos**: manual. Brasília: Copyright, 2010. 101p.

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, jan/mar 2005.

BLANES, Leila. Tratamento de feridas. In: **Cirurgia Vasculuar: guia ilustrado**. 1. ed. São Paulo: Baptista-Silva JCC, 2004.

BRAGULLA, H.; BUDRAS, D.; MÜLLING, CHR.; REESE, S.. Tegumento comum. In: **Anatomia dos Animais Domésticos volume 2**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

BRANDÃO, M.G.L.; ZANETTI, N.N.S.; OLIVEIRA, P.; GRAEL, C.F.F; SANTOS, A.C.P.; MONTE-MÓR, R.L.M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopeia. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 120, p. 141-148, ago 2008.

CANDIDO, Luiz Claudio. **Livro do Feridólogo**: Tratamento clínico-cirúrgico de feridas cutâneas agudas e crônicas. Luiz Claudio Candido – Santos, 2006. 647p.

CARDOSO, C.R.B.; SOUZA, M.A.; FERRO, E.A.V. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound repair and regeneration**. n.12, p.235-243, 2004.

CARVALHO, P.R.N.; DA SILVA, M.G.; FABRI, E.G.; TAVARES, P.E.R.; MARTINS, A.L.M.; SPATTI, L.R.. Concentração de bixina e lipídeos em sementes de urucum da coleção do instituto agrônômico (IAC). **Bragantia**, Campinas, v.69, n. 3, p. 519-524, 2010.

COSTA, C.K.; SILVA, C.B.; LORDELLO, A.L.L.; ZANIN, S.M.W.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.. Identificação de  $\delta$  tocotrienol e de ácidos graxos no óleo fixo de urucum (*Bixa orellana* Linné). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 12, n. 4, p. 508-512, 2013.

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

FERREIRA, A.M.; SOUZA, B.M.V.; RIGOTTI, M.A.; LOUREIRO, M.R.D.. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Revista da Escola de Enfermagem USP**, v.46, n.3, p.752-760, 2012.

FERREIRA, J.M.; SOUSA, D.F.; DANTAS, M.B.; FONSECA, S.G.C.; MENEZES, D.B.; MARTINS, A.M.C.; QUEIROZ, M.G.R.. Effects of *Bixa orellana* L. seeds on hyperlipidemia. **Phytotherapy Research**, n. 27, p. 144-147, 2013.

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

GONÇALVES, A.L.; FILHO, A.A.; MENEZES, H.. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p.353-358, jul/set 2005.

HUPPES, R. R.; VIEIRA, E. R.; PAZZINI, J. M.; DE 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 cirurgia veterinária**, v.2, n.5, p. 24-34, 2013.

ISSAC, C.; DE LADEIRA, P. R. S.; DO RÊGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C.. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina [da] Universidade de São Paulo**, v. 89, n. 3, p. 125-131, jul/dez 2010.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P.. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.3, p.241-248, 2009.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A.M. Cicatrização de Feridas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venerologia**, v.69, n.3, p.355-367, 2011.

LEÃO, R.B.A.; FERREIRA, M.R.C.; JARDIM, M.A.G.. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 88, n. 1, p. 21-25, 2007.

MACEDO, E.V.; GEMAL, A.L.. A produção de fitomedicamentos e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.4, p.290-297, 2009.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. AS.. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.78, n. 4, p.393-410, jul/ago 2003 A.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. SA. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 5, p. 525-542, set/out 2003 B.

MANHEZI, A.C.; BACHION, M.M.; PEREIRA, Â.L.. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.61, n.5, p.620-629, 2008.

MARQUES, S.R.; PEIXOTO, C.A.; MESSIAS, J.B.; ALBUQUERQUE, A.R.; JUNIOR, V.A.S.. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. **Acta Cirúrgica Brasileira** V.19, n.3, p.196- 209, 2004.

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

MONTEIRO, V.L.C.; COELHO, M.C.O.C.; CARRAZZONI, P.G.; MOTA, R.A.; MELO, F.A.D.; CARVALHO, E.C; ANDRADE, L.S.S. Cana-de-açúcar no tratamento de feridas cutâneas por segunda e terceira intenção. **Medicina Veterinária**, Recife, v.1, n. 1, p. 1-8, jan/jun 2007.

MOURA, J.; DEUS, M.S.M.; GONÇALVES, N.M.N.; PERON, A.P. Biologia/genética: O ensino de biologia, com enfoque a genética, das escolas públicas no Brasil – Breve relato e reflexão. **Semina: Ciências biológicas e da Saúde**, v.34, n.2, p.167-174, 2013.

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

RABELLO, F. B.; SOUZA, C. D.; JÚNIOR, J. A. F.. Update na hypertrophic scar treatment. **Clinics**, v. 69, n. 8, p.565-573, fev 2014.

RIBEIRO, D.A.; MACÊDO, D.G.; OLIVEIRA, L.G.S.; SARAIVA, M.E.; OLIVEIRA, S.F.; SOUZA, M.M.A.; MENEZES, I.R.A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área da Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n. 4, p. 912-930, 2014.

SANTOS, J.A.A.; SOUSA, M.F.A.M.; SILVA, E.L.V.; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A.. Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.3, supl.I, p.637-643, 2014.

SOARES, J.A.; BARROS, M.; GONÇALEZ, W.P.; CRISCI, A.R.; JORGE, M.H.S.. Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia férrea ex. TUL. Var férrea* e da *Aloe vera* (L.) *Burm. f.* em lesões cutâneas totais em ratos. **Perspectivas online: ciências biológicas e da saúde**, Campos dos Goyatacazes, v. 11, n. 3, p. 33-42, 2013.

SOUZA, M.F.A.M.; SANTOS, J.A.S.; SILVA, E.L.V.; JÚNIOR, F.C.A.A.. Avaliação da densidade de mastócitos durante o processo de cicatrização de feridas bucais induzidas tratadas com extrato de urucum: estudo em ratos. **Revista enfermagem atual in derme**, v. 68, n. 6, p. 22-26, jan/mar 2014.

TILLMANN, Mariana Teixeira. **Anti-sépticos e fitoterápico na cicatrização de feridas**. 2011. 52f. Dissertação (mestrado em ciências) – Programa de pós-graduação em veterinária, Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

TILLMANN, M.T.; BERGAMANN, L.K.; SILVA, J.S.; CAMPELLO, A.; MUELLER, E.N.; WILHELM, G.; SANTIN, R.; PEREIRA, I.C.; SCHUCH, L.F.D.; NOBRE, M.O.. Eficácia do *Triticum vulgare* e da solução de polivinilpirrolidona-iodo na cicatrização de incisões cirúrgicas. **Revista Vet News**, v. 16, n. 96, out/dez 2009.

TILLMANN, M.T.; FELIX, A.O.C.; MUELLER, E.N.; FELIX, S.R.; ALVES, G.H.; RAMOS, T.S.; FREITAG, R.A.; FERNANDES, C.G.; Nobre, M.O.. Use of *Triticum*

*aestivum* in open wound healing: a clinical, pathological, and tensiometric assessment in the rabbit model. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**. v. 66, n. 6, p. 1757-1761, 2014.

TILLMANN, M. T.; FELIX, S. R.; MUNDSTOK, C. P.; MUCILLO, G. B.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O.. Tratamento e manejo de feridas cutâneas em cães e gatos (revisão de literatura). **Nosso Clínico**, n. 103, p. 12-19, jan/fev 2015.

ULBRICHT, C.; WINDSOR, R.C.; BRIGHAM, A.; BRYAN, J.K.; CONQUER, J.; COSTA, D.; GIESE, N.; GUILFORD, J.; HIGDON, E.R.B.; HOLMES, K.; ISAAC, R.; JINGST, S.; KATS, J.; PEERY, L.; RUSIE, E.; SAVINAINEN, A.; SCHOEN, T.; STOCK, T.; COLUCCI, S.T.; WEISSNER, W. An evidence-based systematic review of annatto (*Bixa Orellana* L.) by the natural standard research collaboration. **Journal of Dietary Supplements**, v. 9, n. 1, p. 57-77, 2012.

VILAR, D.A.; VILAR, M.S.A.; MOURA, T.F.A.L.; RAFFIN, F.N.; OLIVEIRA, M.R.; FRANCO, C.F.O.;ATHAYDE-FILHO, P.F.; DINIZ, M.F.F.M.; BARBOSA-FILHO, J.M. Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: A review. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p.11, 2014.

YONG, Y.K.; ZAKARIA, Z.A.; KADIR, A.A.; SOMCHIT, M.N.; LIAN, G.E.C.; AHMAD, Z.. Chemical constituents and antihistamine activity of *Bixa orellana* leaf extract. **Biomed Central Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 32, 7p., 2013.