

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ NO REPARO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM EQUINOS E RATOS WISTAR**

Isabela Cristina de Souza Marques

Médica Veterinária

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ NO REPARO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM EQUINOS E RATOS WISTAR**

Isabela Cristina de Souza Marques

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado

Co orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Cirurgia Veterinária.

M357o Marques, Isabela Cristina de Souza
Óleo de Semente de Maracujá no Reparo de Férias Cutâneas em Equinos e Ratos Wistar. -- Jaboticabal, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Márcia Rita Fernandes Machado

Co-orientador: Andriago Barboza de Nardi

Banca examinadora: Andriago Barboza de Nardi, Sérgio Britto Garcia, Angélica Trazzi Bento de Moraes, Paola Castro Moraes, Márcia Ferreira da Rosa Sobreira

Bibliografia

1. Óleo semente maracujá.
2. Equinos.
3. Ratos wistar.
4. Processo cicatricial.
5. Imunoistoquímica. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:615,322:636.1

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

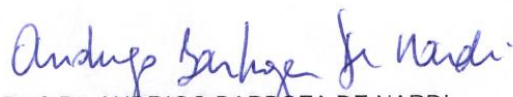
TÍTULO: ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ NO REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM EQUINOS E RATOS WISTAR

AUTORA: ISABELA CRISTINA DE SOUZA MARQUES

ORIENTADORA: MÁRCIA RITA FERNANDES MACHADO

COORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

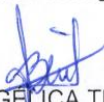
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:



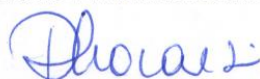
Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. SÉRGIO BRITO GARCIA
Departamento de Patologia / USP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP



Profa. Dra. ANGÉLICA TRAZZI BENTO DE MORAES
Universidade Anhembi Morumbi / São Paulo/SP



Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MÁRCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA
Núcleo Hospitalar Veterinário / Centro Universitário Moura Lacerda - Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 05 de fevereiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ISABELA CRISTINA DE SOUZA MARQUES – nasceu em Ituverava – SP, no dia 16 de agosto de 1982, filha de José Antonio Marques e Maria Madalena de Souza Marques. Em novembro de 2008 graduou-se em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto – SP - Brasil. Em agosto de 2009 iniciou no curso de Direito do Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto – SP - Brasil. Em março de 2012 concluiu o curso de Mestrado do programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, SP – Brasil. Em março de 2012 ingressou no curso de Doutorado do programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, SP – Brasil, tendo com Orientadora a Professora Doutora, Márcia Rita Fernandes Machado. Em agosto de 2014 iniciou estágio no Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-SP, USP, onde faz parte da equipe de pesquisa do Professor Doutor, Sergio Britto Garcia.

"Se você quer transformar o mundo, experimente primeiro promover o seu aperfeiçoamento pessoal e realizar inovações no seu próprio interior. Essas atitudes se refletirão em mudanças positivas no seu ambiente familiar. Deste ponto em diante, as mudanças se expandirão em proporções cada vez maiores. Tudo o que fazemos produz efeito, causa impacto."

(Dalai Lama)

Ofereço

A Deus e a Nossa Senhora, por sempre estarem presentes em minha vida, me dando força, coragem, discernimento, paciência, saúde, paz e amor, por sempre aliviarem meu coração em momentos de desespero e dificuldades.

“Deus é a lei e o Legislador do Universo”

(Albert Einstein)

Dedicatoria

Dedico aos meus pais, José Antonio e Maria Madalena, que me deram a vida. A eles, que sempre acreditaram em mim, sempre tiveram paciência, sempre me deram todo amor, carinho e compreensão. Me ensinaram tudo que sei e que sou, com honestidade, dignidade e muito respeito. Sem eles não conseguiria chegar até aqui e não sei o que seria da minha vida. Aos meu pais meu eterno carinho, reconhecimento e todo meu amor. Vocês são tudo na minha vida. Amo vocês.

Agradecimentos Especiais

Agradeço a minha querida e amada irmã, sempre presente na minha vida. Sempre junto comigo em todos os momentos difíceis e alegres, sempre superando tudo com muito amor. Te amo irmã.

Ao meu cunhado, pela amizade, confiança e lealdade em todos os momentos.

A minha querida, eterna amiga-mãe e minha orientadora, Márcia Rita Fernandes Machado, uma mulher batalhadora, amiga, que sempre esteve e está pronta a me ajudar em todos os momentos, em todas as minhas dificuldades. Que sempre divide comigo momentos de alegria, otimismo e superação. Sempre me dando oportunidade, sempre confiando e acreditando, contribuindo para o meu crescimento profissional e pessoal. Nunca esquecerei tudo que sempre fez e faz por mim. Meus eternos e sinceros agradecimentos a você.

Agradeço ao meu querido professor, orientador e amigo, Sérgio Britto Garcia que me recebeu de braços abertos em seu laboratório, sempre pronto a me ajudar, a me aconselhar, por nunca me deixar desistir. Obrigada pela oportunidade, pela confiança. Cada dia convívio, uma nova lição era aprendida. Agradeço por dividir comigo seus conhecimentos e experiências. Nunca esquecerei o que sempre fez por mim. A você minha eterna gratidão.

Agradecimentos

A minha querida e amada avó Aparecida (in memoriam), exemplo de mulher, filha, mãe, avó, amiga. Uma pessoa que está eternamente no meu coração, a senhora sempre esteve e está na minha vida. Amo infinitamente.

Aos meus avós Luís (in memoriam), Joaquim (in memoriam) e Benedita, pelo amor, carinho, compreensão que sempre me deram e por sempre torcerem por mim desde quando eu era pequena. Amo muito vocês.

Aos meus tios, tias, primos e primas, por todas as alegrias e sempre por acreditarem no meu sucesso.

Ao professor doutor José Antonio Marques (meu pai), que sempre me tratou como aluna de pós-graduação, sempre cobrando e exigindo, mas me dando força, discernimento e coragem para seguir em frente. Te amo muito.

Ao Dr. Marco Aurélio Guimarães pela conhecimentos científicos passados, pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Ao professor Andriago Barboza de Nardi, pelo o aceite em me co-orientar, pela ajuda em todos os momentos.

A minha grande e eterna amiga Paola Moraes, sempre ao meu lado desde a graduação, sempre me aconselhando, me dando broncas, fazendo críticas, pela ajuda, paciência e tolerância, me fazendo crescer como profissional e como pessoa, amiga para todas horas. Muito obrigada por tudo desde sempre. Pessoa querida que levo sempre comigo. Muito obrigada pela sua amizade.

A minha grande e querida amiga Angélica Moraes, que foi minha professora, me orientou na graduação me dando a oportunidade de trabalhar com o que sempre gostei. Pela amizade inestimável, pelas risadas, desabafos, conselhos profissionais e pessoais. Minha eterna gratidão pela amizade desde sempre.

A querida e doce Márcia Sobreira, amiga ímpar, para todas as horas de alegrias e desespero. Sempre orientando, ajudando, tendo toda paciência nos momentos de estresse, como palavras sempre amáveis e calmas. Meu muito obrigada por todo seu carinho, desde sempre.

A minha querida professora, orientadora e amiga Lúcia Sobreira, pessoa maravilhosa que tive o prazer de conviver e

aprender muito, não apenas como profissional, mas como pessoa, meu muito e eterno obrigada.

As minhas grandes e queridas amigas do laboratório de patologia e medicina Legal, Rose Lopes, Erika, Stefania Minto, Andrea Terada e Nice Garcia, pela imensa e grandiosa ajuda nesse trabalho, pela amizade em todos os momentos, sem vocês esse trabalho e meu crescimento profissional não seria possível, minha eterna gratidão.

As minhas grandes e inestimáveis amigas Maria Ines Martines e Ana Tereza Marques, pelas risadas, confidências, apoio e ajuda em todos os momentos, sou eternamente grata.

A minha grande amiga Adriana Messias, pelas risadas, pelas broncas, por me fazer enxergar o quanto é importante a espiritualidade e a fé, a você meu muito e eterno obrigada, adoro você.

Ao professor e coordenador do curso de cirurgia veterinária, Bruno Watanabe Minto, minha gratidão pela ajuda nesse trabalho de doutorado, pela compreensão e amizade.

Aos amigos do Centro Universitário Moura Lacerda, Fernanda Dacanal, Carina Saia, Ana Regina e Carolina Assed, pela ajuda e conselhos dentro e fora da faculdade.

Aos amigos Dailton de Lima, Maria Antonia de Lima e Fernanda de Lima e Teresa Bortolin obrigada pela amizade e confiança.

A Unesp de Jaboticabal e seus professores, por tanto me ensinarem durante esses anos de convívio.

A Capes e ao CNPQ, pela bolsa de doutorado concedida durante o curso de doutorado.

A todas as pessoas, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	03
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1.1 Considerações Éticas.....	12
4.1.2 Animais e Cirurgia.....	12
4.1.3. Avaliação Macroscópica.....	13
4.1.4 Avaliação Microscópica.....	13
4.1.5 Análise Estatística.....	15
4.2.1 Considerações Éticas.....	15
4.2.2. Animais e Cirurgia.....	15
4. 8. Avaliação Microscópica.....	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1.1 Avaliação Macroscópica.....	19
5.1.2 Avaliação Microscópica.....	24
5.2.1 Avaliação Microscópica.....	25
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	54
8. REFERÊNCIAS.....	55

ÓLEO DE SEMENTE DE MARACUJÁ NO REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM EQUINOS E RATOS WISTAR

Resumo – O presente trabalho, teve como objetivo avaliar o potencial cicatricial do óleo de semente de maracujá. O óleo de semente de maracujá é um fitoterápico, inovador com grandes perspectivas para para acelerar o processo cicatricial de lesões cutâneas. Nesse estudo foram avaliados feridas de equinos e ratos Wistar. Foram feitas avaliações macroscópicas e microscópicas nos equinos e avaliação imunistoquímica nos ratos Wistar. Nas primeiras avaliações macroscópicas e microscópicas nos equinos, pudemos notar a diferença entre o grupo controle e o grupo tratado com óleo de semente de maracujá, os resultados fora estatisticamente significativos, em relação ao grupo tratado com óleo de semente de maracujá. Quando feita a imunoistoquímica no material biológico coletado dos ratos, obtivemos um resultado significativo, estatisticamente comprovado, avaliando COX-2, TGF β , VEGF, Alfa Actina, Fator VIII, CD68. São marcadores de extrema importância na evolução cicatricial. Com os resultados obtidos, pudemos comprovar que o fitoterápico, óleo de semente de maracujá é eficiente e a acelera o processo cicatricial.

Palavras-Chave: óleo de semente de maracujá, equino, ratos wistar, processo cicatricial, imunistoquímica.

PASSION FRUIT SEED OIL IN WOUND REPAIR SKIN IN EQUINE AND RATS WISTAR

ABSTRACT - This study aimed to evaluate the healing potential of passion fruit seed oil. The passion fruit seed oil is a herbal, innovative with great prospects for to accelerate the healing process of skin lesions. In this study were evaluated wounds of horses and Wistar rats. Macroscopic and microscopic evaluations were done in horses and inmunistoquímica assessment in Wistar rats. In the first macroscopic and microscopic evaluations in horses, could tell the difference between the control group and the group treated with passion fruit seed oil, the results had been statistically significant, compared to the group treated with passion fruit seed oil. When done immunohistochemistry biological material collected from the mice, we obtained a significant result, demonstrated statistically evaluating COX-2, TGFb, VEGF, Actin alpha, Factor VIII, CD68. Markers are very important in scar evolution. With the results, we could confirm that the herbal medicine, passion fruit seed oil is efficient and speeds up the healing process.

Keywords: herbal, passion fruit seed oil, equine, Wistar rats, healing process.

1. Introdução

O processo de reparação tecidual é um tema de grande importância multidisciplinar para todas as áreas da saúde. As cicatrizes podem implicar em complicações, além do aspecto estético, como dores locais, retrações do tecido, diminuição do movimento (IRVIN, 1981.). A cicatrização ao longo dos anos tem merecida atenção de pesquisadores, especialmente no que tange a fatores que retardam ou dificultam este processo.

A pele, que representa 15% do peso corpóreo é um órgão multifuncional, composto por três camadas distintas. A epiderme, queratinizada, estratificada e não vascularizada; a derme, rica em fibras colágenas e elásticas, responsável pela nutrição da epiderme; o tecido subcutâneo, que constitui a porção mais profunda formada por tecido conjuntivo frouxo e gordura. (DYCE et. al., 1990; BANKS, 1992).

Após um ferimento, inicia-se uma sequência de eventos biológicos, dinâmicos e complexos, que visam promover o reparo da lesão que caracterizam a cicatrização. Ela é formada por três fases evolutivas sobrepostas: fase inicial ou inflamatória, fase proliferativa ou de fibroplasia e fase de remodelação ou maturação (Araújo, 1965).

O tratamento das feridas começou desde a antiguidade e veio sofrendo uma grande variação com o objetivo de ter um melhor resultado na cicatrização, sendo esta em um menor tempo possível

Podemos ter como principal exemplo para este trabalho, a pré-história pela qual a população usava vários agentes que eram aplicados sobre as feridas, mas utilizavam principalmente os extratos de plantas (ARAÚJO, 2004)

A eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos fitoterápicos, pelos efeitos medicinais que produzem.

Fitoterápicos vêm sendo empregados na recuperação de feridas com sucesso e seguindo essa linha de pesquisa o óleo de semente de maracujá, por suas propriedades físico-químicas como índice de saponificação, índice de acidez,

índice de iodo e ácidos graxos, pode ser uma substância que auxilie o processo cicatricial.

Partindo dessa hipótese, a presente proposta foi de estudar a evolução cicatricial de feridas cutâneas em equinos e ratos Wistar, utilizando óleo de semente de maracujá no tratamento de feridas.

2. Revisão de Literatura

2.1 Ferida

A pele recobre o organismo e protege da agressão, desempenha um papel importante no controle da temperatura e permite ao animal responder a vários estímulos externos em razão de suas muitas terminações nervosas (DYCE, 1997).

A pele é composta por partes: um epitélio superficial (epiderme) e uma camada fibrosa firme (derme), que repousa em estrato de tecido conjuntivo frouxo (subcutâneo) (DYCE, 1997).

A principal célula componente da epiderme é o queratinócito e, da derme, é o fibroblasto (JUNQUEIRA, 1999).

As feridas são eventos que podem afetar a fisiologia da pele, em especial aquelas que acometem a camada dérmica (ISAAC, 2010).

Os ferimentos de pele representam uma das mais frequentes ocorrências na clínica de equinos e, embora tratando-se de uma enfermidade de prognóstico bom, as feridas possuem um potencial significativo quanto a decorrências indesejáveis (COCHRANE, 1997).

2.2 Reparação Tecidual

A cicatrização da ferida pode ocorrer por primeira intenção quando é utilizada a reaproximação cirúrgica; por segunda intenção, na qual a ferida permanece aberta, ocorrendo sua contração e epitelização após a formação do tecido de granulação (PEYTON & PATTIO, 1987; MURPHY & MIHM JR, 2000); ou por terceira intenção com ressecção tecidual seguida de sutura (TURNER & McILWRAITH, 1985).

O processo de cicatrização de feridas está dividido em quatro fases: a inflamatória e coagulação, imediatamente após o trauma, a de granulação, a de contração da ferida e, finalmente, a fase de remodelamento. Deve-se entender que esta é uma classificação subjetiva e não se pode adotá-la de forma rigorosa. Na realidade, as transições entre as fases não são muito bem definidas e é normal que a fase seguinte se inicie quando a anterior ainda não tenha terminado. Além disso, nem todas as áreas de uma mesma ferida se encontram, durante determinado momento na mesma fase. A princípio, esta classificação se aplica tanto ao

processo de cicatrização por primeira intenção quanto por segunda intenção, porém, nesse último caso, as fases são muito mais evidentes (WILMINK et.al., 2001).

Na primeira fase, ocorrem hemostasia, migração de leucócitos e início da cascata de reparação tecidual. Inicialmente, em resposta a agentes inflamatórios, há diminuição do afluxo sanguíneo pela vasoconstrição. Com extravasamento de sangue dos vasos lesionados, plaquetas são ativadas pelas substâncias da matriz extracelular que envolve o endotélio, fazendo com que tenha início os processos de adesão e agregação celular. Ao mesmo tempo, o fibrinogênio sérico é clivado pela trombina resultante das vias de coagulação, formando monômeros de fibrina que se polimerizam pela ação do fator XIII, para que, junto com plaquetas, forme-se um tampão hemostático e não haja mais perda de sangue. Durante este processo, em resposta a produção endotelial de eicosanoides e leucotrienos, há um aumento progressivo da permeabilidade vascular às células migrantes e substâncias biologicamente ativas. Deste processo surgiram elementos essenciais para a continuação fisiológica da cicatrização: um arcabouço de fibrina, necessário para a migração das células que chegarão, e os primeiros fatores de crescimento com atividade. Estes últimos são polipeptídeos secretados na ferida que podem ter como função estimular ou inibir a síntese de determinadas proteínas, além de atuarem na ativação e migração de células. Dentre os que são secretados pelas plaquetas por degranulação, se destacam PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TGF- β (fator transformador do crescimento beta), que neste primeiro momento terão como função atrair neutrófilos e monócitos, e o EGF (fator de crescimento epidérmico), que será mais ativo na fase proliferativa na fase inflamatória, ocorrerá, primeiramente, a migração de neutrófilos dos vasos sanguíneos para a ferida, que será mediada pela ligação a selectinas super-expressas de endotélio ativado. Este tecido teve sua fisiologia alterada por IL-1 (interleucina-1) e TNF- α (fator de necrose tumoral- α), ambos secretados por macrófagos e pelo próprio endotélio, sendo que a primeira citocina também é expressa por queratinócitos. Porém, ao saírem do vaso sanguíneo os polimorfonucleares migrarão em resposta a elementos do sistema complemento

(C3a e C5a), da degranulação das plaquetas, produtos bacterianos e IL-8 (interleucina-8), produzida por macrófagos e fibroblastos.

Em seguida, monócitos se infiltrarão em resposta a estímulos semelhantes aos de neutrófilos, e se diferenciarão em macrófagos sob o estímulo de substâncias como o IFN- γ (interferon- γ), de modo a aumentar a síntese proteica, seu tamanho celular, o aparelho de Golgi e o número de lisossomos, microtúbulos e microfilamentos. Este último tipo celular, juntamente com os neutrófilos, removerá partículas estranhas, bactérias e tecido morto do leito da ferida, sendo que a ação antimicrobiana dos polimorfonucleares é pela produção de radicais livres de oxigênio e, a dos macrófagos, é pela síntese aumentada de NO, que reage com peróxidos e gera um agente ainda mais potente do que o primeiro. Nesta fase do processo de cicatrização o NO também age na vasodilatação e no aumento da permeabilidade vascular, sendo majoritariamente produzido por enzimas intracelulares presentes em todos os tecidos (NOSi/NO-sintase induzida). A síntese dessas enzimas é estimulada principalmente por IL-1, TNF- α e IFN- γ , e inibida por TGF- β .

Visando degradar elementos da matriz extracelular e tecido necrótico para facilitar a migração celular no leito cruento, neutrófilos e macrófagos utilizam, além da fagocitose, metaloproteinases (proteinases de elementos da matriz). Macrófagos também são importantes por produzirem uma diversidade de fatores de crescimento, dentre os quais se incluem: EGF, FGF (fator de crescimento dos fibroblastos), PDGF, TGF- β e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). A quimiotaxia de fibroblastos e sua proliferação é uma das funções dos três primeiros fatores de crescimento, sendo que FGF também atua positivamente na migração e proliferação de queratinócitos, e TGF- β na deposição de elementos da matriz pelos fibroblastos. O VEGF e o FGF atuarão como potentes fatores angiogênicos.

No segundo estágio do processo de cicatrização é a fase de proliferação, que se caracteriza por fibroplasia, angiogênese e reepitelização. Na fibroplasia ocorrerão migração e proliferação de fibroblastos, concomitante à síntese de novos componentes da matriz extracelular. Os fibroblastos são células fusiformes com núcleo elíptico que, em geral, constituem o maior número de células do tecido conjuntivo, além de sintetizarem grande parte da matriz extracelular que o compõe.

Na derme, tecido conjuntivo denso não-modelado, eles são importantes na secreção de proteoglicanos, fibronectina, elastina, laminina e colágeno, que é a proteína mais abundante nos seres humanos e o principal componente da pele, constituindo 80% do peso seco da derme e a base de sua estrutura e resistência.

Nesta fase migração e proliferação de fibroblastos se darão a partir das margens livres da ferida e de células mesenquimais, ao passo que os principais estímulos quimioatraentes e mitogênicos dos primeiros serão o EGF e o PDGF. Por outro lado, PDGF e TGF- β induzirão a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, os quais expressam α -actina, α -miosina e desmina. Estes fibroblastos diferenciados possuem capacidade de se contrair e se expandir, movimentando-se, assim, pela ferida. Durante a movimentação dos miofibroblastos, ocorre deposição de fibronectina sobre o arcabouço de fibrina. A nova estrutura de fibronectina é denominada de fibronexus. Assim, começa a deposição de colágeno na ferida que se ligará à fibronectina em um sítio diferente da fibrina. O colágeno é uma fita tripla helicoidal formada por três cadeias polipeptídicas possuindo, até o momento, cerca de 20 tipos. Na matriz extracelular cutânea ele pode se ligar à fibronectina e laminina, sendo que nas células ele se conecta a receptores de integrina, estruturas estas supra-reguladas pelo TNF- α . Particularmente, na matriz dérmica há essencialmente dois tipos de colágeno: tipo I e tipo III, correspondendo respectivamente a cerca de 80-85% e 15-20% do total desta proteína. O tipo I é formado por duas cadeias α 1 e uma cadeia α 2 diferentes quanto à sequência de aminoácidos. Apresenta diâmetro total de 1 a 20 μ m e está localizado principalmente na derme reticular, a mais profunda da pele. O colágeno tipo III constitui-se de três cadeias α 1, apresenta diâmetro de 0,5 a 2 μ m e está presente, em sua maioria, na derme papilar, localizada mais superficialmente.

Na ferida há, ao contrário da derme íntegra, uma maior proporção de colágeno III em relação ao tipo I. Neste contexto, os miofibroblastos alinham-se e ligam-se às fibras de colágeno de maior espessura²⁰ puxando-as em direção a eles, sendo este fenômeno responsável pela contração da ferida e estimulado por TGF- β e PDGF. Deste modo, quanto maior o número de fibras de grande diâmetro, maior será a contração dessa ferida.

Os fibroblastos também produzem TGF- β , FGF, TIMPs (inibidores de metaloproteinases) e KGF (fator de crescimento dos queratinócitos), sendo que este último tem ação mais efetiva na reepitelização.

Simultaneamente aos fenômenos descritos, há formação de novos vasos a partir dos adjacentes à ferida. O FGF, o VEGF e o TGF- β são os principais agentes angiogênicos envolvidos, sendo que a ação do segundo é dependente da presença de NO, o qual estimula a síntese daquele, que, por sua vez, induz uma supra-regulação da enzima NOS. Essas citocinas angiogênicas ativam as células endoteliais, que iniciam a expressão do ativador de plasminogênio, o qual cliva o plasminogênio sérico e a pró-colagenase em, respectivamente, plasmina, com ação fibrinolítica, e colagenase (MMP-1), que degrada colágeno. Deste modo ocorre degradação local da membrana basal circundante e o endotélio começa a proliferar em uma estrutura tubular em resposta às mesmas citocinas que o ativaram, as quais se encontram concentradas entre o entrelaçamento do arcabouço circundante. Essa migração ocorre através da interação entre as integrinas supra-reguladas e os componentes da matriz extracelular, principalmente a fibronectina e a laminina. A seguir elas sintetizam uma nova membrana basal, mas regredem e involuem no final, em resultado a menor secreção total de fatores angiogênicos, mudança do arcabouço provisório rico em moléculas pró-angiogênicas para um rico em colágeno (anti-angiogênico) e aumento da expressão de outras substâncias inibitórias do processo²². Esses vasos recém-formados são característicos do tecido de granulação, e tem por finalidade nutrir e oxigenar os tecidos em crescimento. O endotélio também participa da síntese de PDGF, TGF- β e FGF.

A reepitelização tem por função reestruturar as funções da epiderme que foram perdidas com a ocorrência da lesão: proteção mecânica, regulação da temperatura local, defesa contra microorganismos e barreira hídrica. Para tanto ela deve reestruturar os estratos de queratinócitos: basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo, que possuem quantidades crescentes de queratina (um filamento intermediário) e, na pele íntegra, entram em processo de apoptose nas duas últimas camadas. Os queratinócitos na epiderme fisiológica mantêm a coesão através de, principalmente, moléculas de adesão ligadas a tonofilamentos de

queratina: desmossomos (célula-célula) e hemidesmossomos (célula-membrana basal). Assim, primeiramente, ocorre a perda de aderência dos queratinócitos à membrana basal e às células adjacentes pela retração dos tonofilamentos; concomitantemente ocorre a expressão de filamentos periféricos de actina, receptores de integrina e ativador de plasminogênio, que permitem a formação de lamelipódios e a clivagem de elementos da matriz, e, portanto, a migração sobre o leito cruento.

Dentre os fatores que facilitam a reepitelização estão a presença de HGF (fator de crescimento dos hepatócitos), FGFs, EGF, KGF, estímulos a receptores peroxissomo-proliferador-ativados (PPARs) e de um campo elétrico na ferida. O HGF, secretado por células mesenquimais juntamente com FGFs, EGF e KGF, favorece a proliferação dos queratinócitos e atua como quimioatraente enquanto que a estimulação de PPARs por citocinas pró-inflamatórias diminui a apoptose e favorece a migração dessas células. Já a formação de um campo elétrico endógeno no plano lateral, entre as margens da ferida, se desenvolve de maneira a direcionar a migração de queratinócitos através de moléculas de sinalização celular. A migração dessas células cessa pelo contato entre elas, com posterior síntese de membrana basal e moléculas de adesão, além da queda da expressão de substâncias pró-migração (ativador de plasminogênio, por exemplo). Além disso, a epiderme influencia o processo de cicatrização produzindo VEGF, PDGF e TGF- β .

A terceira do processo de cicatrização é a de remodelação. Sendo o colágeno o principal componente da derme, esta etapa constitui-se da mudança do tipo de colágeno que a compõe e de sua disposição. O colágeno tipo III, inicialmente mais abundante que o tipo I, vai sendo degradado mais ativamente com o decorrer do tempo, enquanto que o colágeno I vai tendo sua produção aumentada pelos fibroblasto. Juntamente com a substituição do tipo de colágeno, ocorre uma alteração em sua organização, a qual muda de fibras paralelas dispostas aleatoriamente para entrelaçadas e organizadas ao longo das linhas de *stress*. Enquanto PDGF estimula maior degradação de colágeno I e síntese de colágeno III, TGF- β induz maior secreção do primeiro e sua menor degradação por aumento da expressão de TIMPs (inibidores de metaloproteinases) e menor da de

MMPs, sendo a remodelagem e a contração da ferida parcialmente controladas pela relação entre eles.

A última fase do processo de cicatrização é responsável pelo aumento da resistência do tálamo danificado. Ao final da primeira semana após o surgimento da ferida, ocorre restauração de 3% da resistência da pele íntegra; da terceira semana, 30%, e de três meses, 80%. Isto reflete uma diminuição da deposição de colágeno, do número de ligações cruzadas feitas entre monômeros desta substância e da mudança do tipo III para o I. Em cerca de um ano ou mais, a relação entre o colágeno I e III atinge proporção semelhante a anterior à ferida, entretanto a ferida nunca atingirá 100% de sua resistência fisiológica.

Os fenômenos descritos referem-se ao processo de cicatrização fisiológica, porém há situações em que ocorre diminuição da resposta do organismo, como a exposição excessiva à radiação (Mandelbaum, 2010), contaminações por meio de bactérias, que podem levar ao retardo ou a ausência de cicatrização. Pode, também, ocorrer aumento dessa resposta, como nos casos de cicatriz queloidiana ou cicatriz hipertrófica que se apresentam como cicatrizes exuberantes. A ocorrência destas respostas não-fisiológicas exige um completo conhecimento dos fenômenos apresentados para que se possa corrigi-los ou melhorá-los (Mandelbaum, 2010).

2.3 Óleo de Semente de Maracujá

O maracujá (*Passiflora edulis*) é originário da América Tropical é um fruto muito cultivado no Brasil. É rico em vitamina C, cálcio e fósforo. A maior importância econômica do fruto do maracujazeiro está no produto industrializado sob a forma de suco concentrado. A produção de maracujá está em torno de 364 mil de toneladas, com rendimento de 7,5 t/ha.

O Brasil destaca-se como principal produtor, com cerca de 90% da produção mundial, seguido do Peru, Venezuela, África do Sul, Sri Lanka e Austrália. O Brasil apresenta produção em torno de 330,8 mil toneladas, com rendimento de 9,9 t/ha. Esta produção é estimada em área de 33,4 mil hectares, dos quais 51% encontram-se nos Estados da Bahia, São Paulo e Sergipe, e 46% da área colhida.

O maracujá pode ser consumido ao natural ou industrializado, e seu suco destaca-se entre os produzidos com frutas tropicais, tendo excelente aceitação entre os consumidores, representando uma boa porcentagem dos sucos exportados (IBGE, 2002).

Cascas e sementes de maracujá, resíduos industriais provenientes do processo de esmagamento da fruta para a obtenção do suco, atualmente, são utilizados por produtores rurais na suplementação da alimentação animal, como ração para bovinos e aves, ainda sem muita informação técnica adequada. Como este volume representa inúmeras toneladas, agregar valor a estes subprodutos é de interesse econômico, científico e tecnológico.

O suco de maracujá é um produto de aroma e acidez acentuados, e o aroma deve-se a um óleo insolúvel em água, constituindo cerca de 36ppm de suco.

As sementes, no maracujá, representam cerca de 6 a 12% do peso total do fruto e, segundo Tocchini (1994), são boas fontes de óleo, carboidratos, proteínas e minerais, apesar do alto conteúdo de celulose e lignina que podem limitar seu uso na alimentação animal, principalmente monogástricos. O óleo de sabor agradável e odor suave compara-se ao óleo de algodão em valor nutritivo e digestibilidade.

O óleo extraído das sementes, que corresponde a 25,7% do peso do farelo seco obtido, apresentou elevado teor de ácidos graxos insaturados, com predominância do ácido linoléico, com índice de iodo de 136,5g I2/100g.

Este óleo pode ser utilizado tanto na alimentação humana e animal, quanto na indústria de cosméticos, tintas, sabões, alimentos e outras.

O óleo das sementes de maracujá possui coloração amarela, sabor agradável e odor suave, com as seguintes características físico-químicas: baixa secatividade, médio índice de saponificação e baixa estabilidade, sendo suscetível a rancidez oxidativa devido ao grande conteúdo de ácido linoléico. O óleo da semente de maracujá ainda pode ser utilizado para fabricação de sabonetes, tintas, vernizes e, após refinação ou hidrogenação, para fins comestíveis (MEDINA et al., 1980). As indústrias farmacêuticas tanto humanas quanto veterinárias também começaram a investir no óleo de semente de maracujá como cicatrizante, devido as suas propriedades físico químicas e por ser um subproduto, o custo é mais baixo.

3. Objetivo

Investigar o comportamento de feridas cutâneas na região de garupa de equinos e região dorsal de ratos Wistar que foram submetidos ao tratamento com óleo de semente de maracujá.

4. Material e Método

4.1. Equinos

4.1.1. Considerações Éticas

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV, Campus de Jaboticabal, UNESP, sob protocolo n° 17345/15, pois está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.1.2. Animais e Cirurgia

O presente experimento foi conduzido Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Jaboticabal.

Foram utilizados oito animais da espécie equina, machos e fêmeas, sem raça definida e com idades variando entre dezoito a oitenta meses, oriundos da região de Ribeirão Preto e Jaboticabal, Estado de São Paulo, os oito animais foram mantidos em baias individuais e alimentação a base de ração comercial para equinos, com 12% de proteína, e feno de gramíneas (Coast-Cross).

Após jejum hídrico e alimentar de três e oito horas, respectivamente, os animais foram contidos em tronco individual apropriado e pré-medicados com acepromazina na dose de 0,05 mg/kg de peso vivo, por via intravenosa, anestesiados com xilazina 2%, na dose de 5ml/100kg, por via endovenosa.

No pós-operatório, foi utilizado Flunixin Meglumina na dose de 1ml/45kg por dia, por via intramuscular, durante sete dias.

O campo operatório foi preparado empregando ampla tricotomia da região da garupa, anti-sepsia com iodo degermante e posteriormente com solução alcoólica de iodo a 2%. A anestesia local infiltrativa, formando um paralelogramo, foi realizada com solução de lidocaína a 2%, na área pré estabelecida como campo cirúrgico.

As lesões cutâneas foram produzidas do lado direito e esquerdo na região da garupa, situadas no ponto médio e imediatamente acima de uma linha imaginária traçada entre a base da cauda e a tuberosidade coxal, em forma de retângulo com 3cm de largura e 6 cm de comprimento, utilizando-se o auxílio de

um molde metálico para a obtenção de lesões uniformes. Após incisão com bisturi, a pele e o tecido subcutâneo foram removidos por dissecação utilizando-se tesoura romba e pinça anatômica com dente de rato.

As feridas produzidas na região da garupa do lado direito (grupo tratado I), receberam tratamento diário, com óleo de semente de maracujá.

As feridas produzidas na região da garupa do lado esquerdo (grupo controle II), receberam tratamento diário, com soro fisiológico.

Ambas foram cobertas com gaze e fixadas com esparadrapo.

4.1.3. Avaliação Macroscópica

Após o ato cirúrgico, os animais foram colocados em piquetes e baias individuais até a completa cicatrização clínica. A cada três dias, a contar do ato cirúrgico, as feridas foram avaliadas, sempre pelo mesmo observador, observou-se o desenvolvimento do processo cicatricial. As avaliações são realizadas no decorrer da realização dos curativos das feridas cutâneas e na colheita do material destinado a análise histopatológica (biópsias).

As lesões são avaliadas em seu caráter evolutivo, as mesmas tem seus contornos delineados com o uso de plástico transparente e caneta marcadora para retroprojektor, que serão submetidas a avaliação do tamanho da área de cada ferida no decorrer da evolução cicatricial. Utilizando-se o software image J 1.45s.

4.1.4. Avaliação Microscópica

Para o estudo anátomo histopatológico foram colhidos fragmentos de tecido da ferida tratada e controle de aproximadamente 5mm de espessura nos dias três, sete, 15, 21 e 30 dias após o procedimento cirúrgico em todos os animais.

Os animais foram submetidos à biópsia da região anteriormente excisada, para tanto utilizou-se o protocolo anestésico descrito anteriormente.

Os fragmentos foram conservados em bouin para posterior inclusão em parafina plástica. Depois de fixado, o material foi incluído em paraplast) mediante realização de rotina histológica convencional, seguida da microtomia em micrótomo automático, com auxílio de navalhas descartáveis. Cortes de cinco micrometros (μm) foram obtidos. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina, para

visibilização dos componentes do tecido e com Tricrômio de Masson para corar fibras elásticas.

Na leitura das lâminas foram avaliados os seguintes parâmetros: inflamação aguda e crônica, regeneração epitelial, fibroblastos, tecido de granulação e colágeno, como mostra tabela 1.

Tabela 1. Escore de avaliação características microscópicas das feridas cirúrgicas (MEDEIROS, 1999)

VARIÁVEIS	0	+1	+2	+3	+4	FATOR	TOTAL
	Ausente	Leve	Moderado	Marcante	Maciço		
Abscesso						-10	
Crosta						-1	
Inflamação aguda						-4	
Inflamação crônica						+2	
Regeneração epitelial						+5	
Fibroblasto						+5	
Tecido de granulação						+5	
Colágeno						+10	
ESCORE TOTAL							

As intensidades das variáveis (de 0 a +4) foram multiplicadas por fatores positivos ou negativos baseadas na sua importância para a cicatrização. A soma desses produtos correspondeu ao escore total para cada animal.

4.1.5. Análise Estatística

Os dados de avaliação macroscópica e microscópica por escore foram analisados utilizando teste não paramétrico para avaliação de pares ordenados Wilcoxon quando comparadas a ferida tratada e a ferida controle contralateral de cada produto. Considerando em todos os casos nível de significância de 5%.

4.2. Ratos Wistar

4.2.1. Considerações Éticas

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV, Campus de Jaboticabal, UNESP, sob protocolo n° 22907/15, pois está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2.2. Animais e Cirurgia

O presente experimento foi conduzido no biotério do departamento de patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP, USP.

Foram utilizados 20 ratos Wistar, machos com 3 meses de idade, pesando 180 gramas.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e alimentação a base de ração comercial para ratos.

Os animais foram submetidos a jejum hídrico e alimentar, uma e duas horas respectivamente, antes do ato cirurgico.

Os animais foram pré-medicados com acepromazina na dose de 0,05 mg/kg de peso vivo, intra-muscular e anestesiados com xilazina 2%, na dose de 5ml/100kg e ketamina intra-muscular.

O campo operatório foi preparado empregando ampla tricotomia da região do dorso, anti-sepsia com clorexidine, anestesia local infiltrativa, formando um retângulo , foi realizada com solução de lidocaína a 2%, na área pré estabelecida como campo cirúrgico.

Foram duas lesões cutâneas com punch de 4mm de espessura. Uma das ferida era tratada com óleo de semente de maracujá, a outra ferida era apenas para controle.

4.2.3 Avaliação Microscópica

Os animais foram mortos na câmara de CO₂, com 24 horas, 72 horas, 5 dias e 15 dias após o ato cirúrgico e tratamento.

Foi coletado a pele de todos os animais onde foram feitas as lesões cirúrgicas.

Os fragmentos foram conservados em formol a 10% para posterior inclusão em parafina plástica. Depois de fixado, o material foi incluído em paraplast) mediante realização de rotina histológica convencional, seguida da microtomia em micrótomo automático, com auxílio de navalhas descartáveis. Cortes de cinco micrometros (μm) foram obtidos.

Para a realização da imunistoquímica os reagentes usados foram: PBS pH 7,4; Tampão Citrato pH 6,0; H₂O₂ 3%; BSA 0,1%; Superkit ABC (Easy Path®); Kit picture™ - MAX (Invitrogen®).

5. Resultados

5.1. Avaliação Equinos

5.1.1. Avaliação Macroscópica

Ao avaliar a evolução das feridas do grupo tratado com óleo de semente de maracujá, verificou-se aos três dias após a cirurgia, pouca hiperemia, edema periférico caracterizado por aumento de volume das bordas das lesões, pouca hemorragia, presença de secreção e gaze bem aderida a lesão. No grupo controle, notava-se maior hiperemia, edema periférico, pouca hemorragia, presença de secreção e gaze bem aderida.

No sétimo dia pós-operatório, as lesões do grupo tratado com óleo de semente já apresentam crostas por toda extensão da ferida, discreto edema periférico. No sétimo dia o grupo controle, as lesões apresentavam hiperemia, discreto edema periférico (Figura 1 e 2).

Quinze dias após o ato cirúrgico, as lesões tratadas ainda se mostravam hiperêmicas, presença de tecido de granulação, presença de crostas, a epitelização apresentava uma faixa de tecido de coloração rósea e de aspecto delgado que infiltrava pelas bordas da lesão em direção ao centro da mesma. Não foi observado edema. O grupo controle aos quinze dias após o ato cirúrgico, as lesões ainda se mostravam hiperêmicas, hemorragia, presença de tecido de granulação. A epitelização apresentava uma faixa de tecido de coloração rósea e de aspecto delgado que infiltrava pelas bordas da lesão em direção ao centro da mesma, observou-se discreto edema. (Figura 3 e 4)

Aos vinte e um dias de pós-operatório as feridas tratadas com óleo de semente de maracujá, mostravam discreta hiperemia, tecido de granulação com aspecto brilhante e coloração rosada, crostas em alguns pontos próximo as bordas, as bordas apresentam faixas largas de tecido epitelial. No mesmo período a lesão controle apresentava, discreta hiperemia, tecido de granulação com aspecto brilhante e coloração rosada, ausência de crostas, pouca secreção, discreta hemorragia as bordas apresentam faixas finas de tecido epitelial. (Figura 4 e 5)

Na última avaliação aos trinta dias, a área da ferida tratada estava praticamente fechada, com ausência de hiperemia, com tecido de granulação na

fase final da lesão, uma granulação rasa, coloração avermelhada, ausência de crostas, as lesões apresentavam 90% da área cicatrizada. A cicatrização total das lesões ocorreram 4 dias após a última avaliação. No grupo controle aos trinta dias as lesões tratadas com óleo de semente de maracujá apresentavam discreto tecido de granulação, coloração avermelhada, apresentava pouca crosta nas bordas, hiperemia e discreta hemorragia. Após a última avaliação as feridas tratadas foram cicatrizadas em 10 dias, ou seja, com quarenta dias as lesões estão totalmente cicatrizadas. (Figura 5 e 6)



Figura 1 e 2: Ilustração fotográfica da ferida cirúrgica na garupa do equino aos sete dias. A ferida controle (A), apresenta brilho e hiperemia. A ferida tratada (B) apresenta crosta.

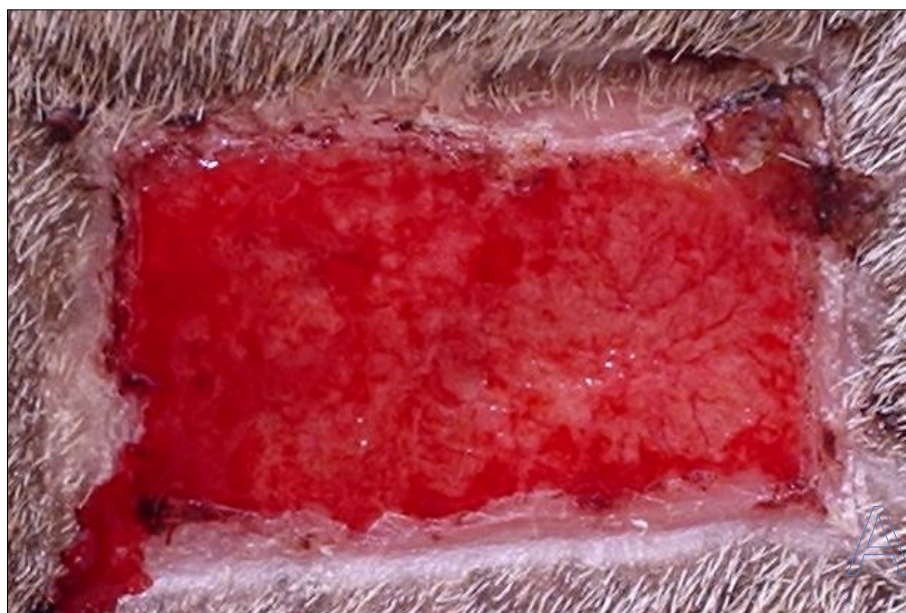


Figura 3 e 4: Ilustração fotográfica da ferida cirúrgica na garupa do equino aos 15 dias. A ferida controle (A), apresenta hemorragia, fina faixa de cicatrização. A ferida tratada (B) apresenta crosta nas bordas, discreta hemorragia.

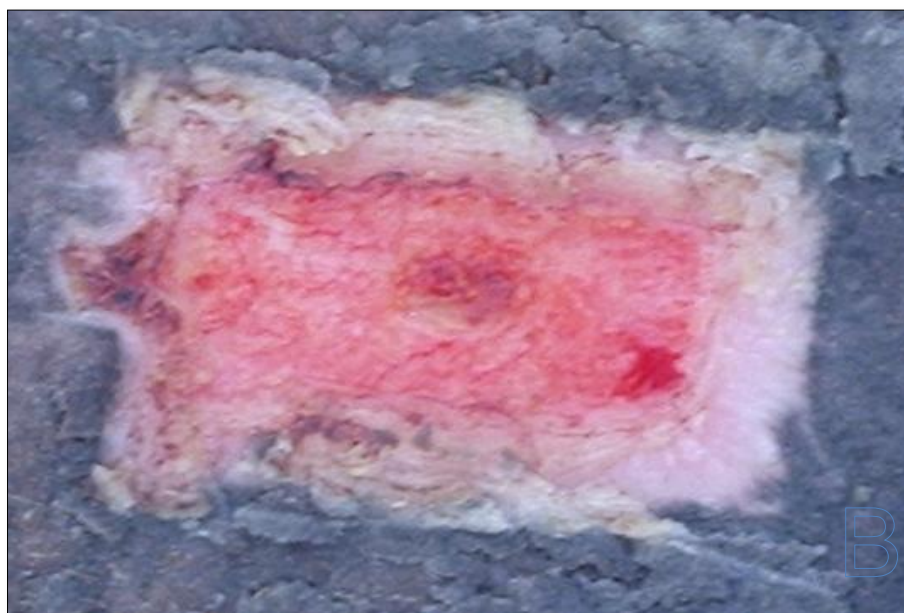
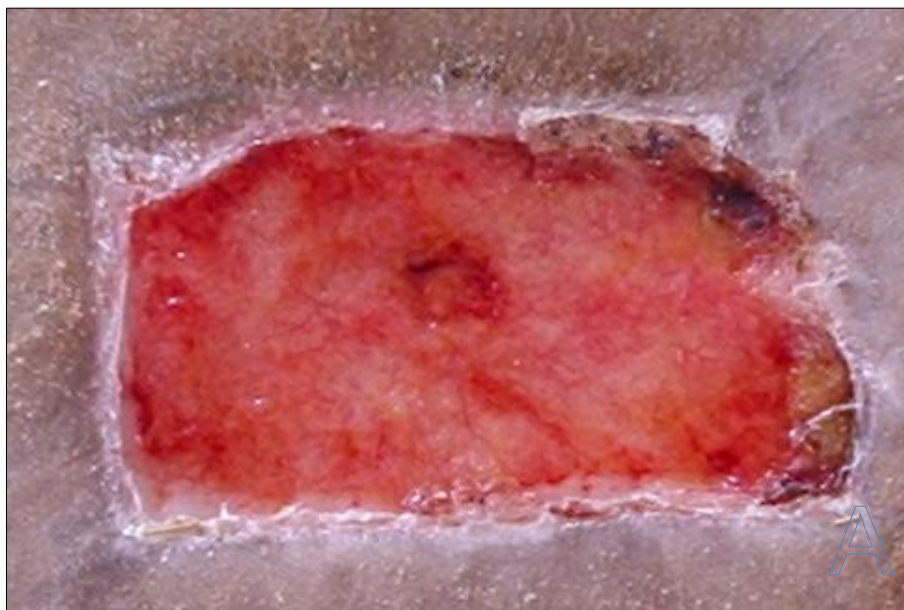


Figura 5 e 6: Ilustração fotográfica da ferida cirúrgica na garupa do equino aos 21 dias. A ferida controle (A), apresenta brilho e hiperemia, tecido de granulação, crosta em alguns pontos próximo a borda. A ferida tratada (B) apresenta faixas de cicatrização, discreta hiperemia, crosta em alguns pontos da borda.

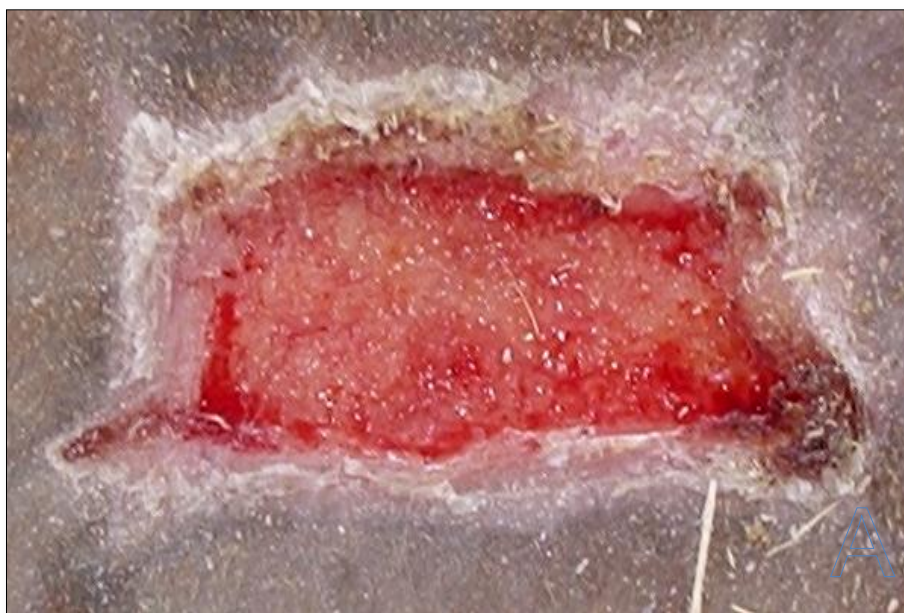


Figura 7 e 8: Ilustração fotográfica da ferida cirúrgica na garupa do equino aos 30 dias. A ferida controle (A), apresenta brilho e hiperemia, tecido de granulação, pequena faixa de cicatrização. A ferida tratada (B) apresenta 90% de cicatrização.

Nos tempos três, sete, 15, 21 e 30 dias, foram feitas as medidas das áreas das feridas. A área da ferida diminuiu gradativamente com a evolução do tempo. A média e o desvio para cada grupo estão demonstrados na tabela 2 e representados na figura. Como pode ser observado nessa tabela, as áreas das feridas diminuíram

progressivamente, de maneira significativa. Foram verificadas diferenças significativas entre as áreas das feridas tratadas com óleo de semente de maracujá e controle em todos os tempos.

Tabela 2. Média, desvio padrão e significância estatística da área da ferida cirúrgica nos grupos controle e tratado com óleo de semente de maracujá.

Dias	Controle	Óleo Semente Maracujá	P=
3 dias	21,99±1,22	20,86±1,30	0,0078
7 dias	20,48±1,07	19,26±1,28	0,0078
15 dias	18,89±2,10	15,45±0,93	0,0156
21 dias	13,19±2,42	8,54±2,39	0,0078
30 dias	7,51±1,66	3,72±0,86	0,0078

Médias diferem pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$)

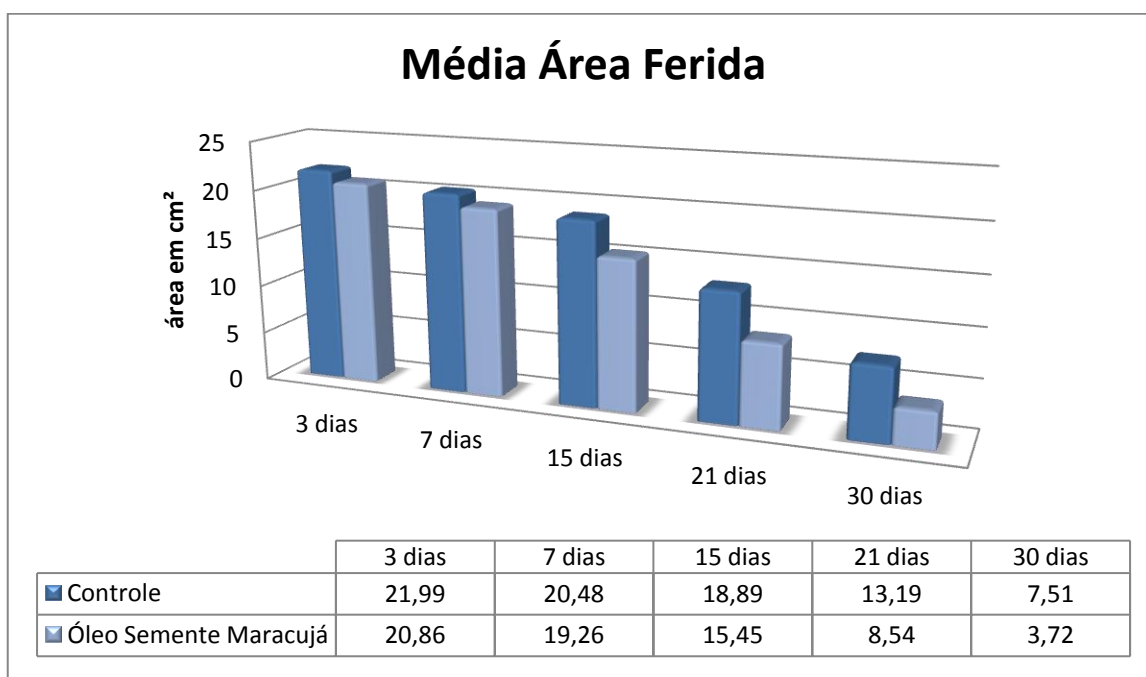


Figura 07. Ilustração gráfica dos valores médios (cm^2) das áreas das feridas controle e tratadas no decorrer do tempo.

5.1.2. Avaliação Microscópica

A avaliação microscópica das biópsias das feridas cirúrgicas revelou a seguinte evolução.

No terceiro dia de pós-operatório observa-se na área biopsiada do grupo controle, ausência de tecido epitelial na superfície de corte, depósito de fibrina, edema, congestão vascular, discreta hemorragia e intenso infiltrado de células inflamatórias na derme, com predomínio dos polimorfonucleares neutrófilos. Nesse período o grupo tratado mostra-se semelhante ao controle.

No sétimo dia, em alguns animais do grupo controle ainda há presença de fibrina na superfície do corte com acentuada reação inflamatória, de alta celularidade predominando as células mononucleares. Há o início da formação de um tecido de granulação com ausência de epitélio sobre a superfície do corte. No grupo tratado com óleo de semente de maracujá, o processo inflamatório é menos acentuado e a quantidade de vasos neoformados e fibroblasto é maior quando comparado ao grupo controle, com algumas fibras colágenas em organização.

Aos 15 dias do grupo controle, predomina uma reação inflamatória crônica, de moderada intensidade, com formação de um tecido de granulação mais evoluído que no 7º dia, com um número maior de fibroblasto e algumas fibras colágenas depositadas sem organização. Não há reepitelização da superfície do corte.

No grupo tratado com óleo de semente de maracujá aos 15 dias observa-se que a reação inflamatória é bastante discreta e o tecido de granulação mostra-se mais maduro, com uma quantidade menor de fibroblasto e rico em fibras colágenas. Há um início de reepitelização nas bordas da ferida.

Com 21 dias o grupo controle apresenta resquícios de células mononucleares. O tecido de granulação ainda possui um número razoável de fibroblastos e vasos neoformados, com presença de fibras colágenas espessas e desorganizadas. No grupo tratado observa-se um processo cicatricial bem mais evoluído que o controle, com maior organização das fibras colágenas e um processo de reepitelização mais avançado.

No último dia de avaliação (30 dias), o grupo controle, ainda podem ser observadas células mononucleares, fibroblastos, vasos neoformados, fibras colágenas em início de organização e epitélio em formação. Nesse período a ferida tratada com óleo de semente de maracujá apresenta um tecido fibrosado, organizado, em fase bastante avançada do processo de reepitelização.

Os parâmetros avaliados foram neutrófilos, edema, congestão, mononucleares, tecido de granulação, fibrose e crostas.

Com três e sete dias foram observados neutrófilos, congestão, edema e tecido de granulação em ambos os lados.

Aos quinze dias começaram a surgir fibrose principalmente no tratamento, onde começou a aparecer diferenças entre o lado tratamento e lado controle, tendo nível de significância estatística de 5%, através do Wilcoxon. (Tabela 3 e 4)

Com vinte e um dias, ficou evidente a diferença de cicatrização entre o lado tratamento e o lado controle.

Com trinta dias estatisticamente não havia nenhuma significância entre o lado tratamento e o lado controle.

Tabela 3: Valores médios de escore microscópico do fragmento coletado na borda da ferida.

Dias	Controle	Tratamento	P=
3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
7	1,20 ± 0,22	1,70 ± 0,31	0,1507
15	1,63 ± 0,18*	2,60 ± 0,20*	0,0179
21	2,29 ± 1,60	3,00 ± 0,17	0,1729
30	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	-

*Médias diferem pelo teste de Wilcoxon (P<0,05).

Escore: (0): processo inflamatório agudo; (1) processo inflamatório subagudo; (2) processo inflamatório crônico; (3) Reparo.

Foi observado diferença estatística significativa (P=0,0179) para o escore dos grupos controle e tratado no dia 15 de observação. Nos demais dias os escores foram semelhantes.

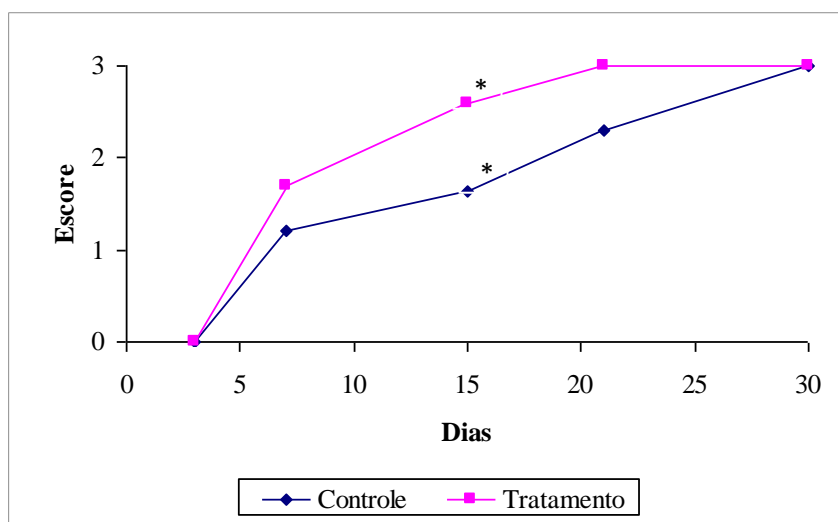


Figura 08 : Representação gráfica do escore microscópico do fragmento coletado na borda da ferida do dia 3 ao dia 30 do tratamento.

Tabela 4: Valores médios de escore microscópico do fragmento coletado no centro da ferida.

Dias	Controle	Tratamento	P=
3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
7	0,43 ± 0,17	1,00 ± 0,30	0,0678
15	1,18 ± 0,22*	2,40 ± 0,15*	0,0179
21	2,14 ± 0,12	2,70 ± 0,16	0,1083
30	2,37 ± 0,18	2,90 ± 0,12	0,0678

*Médias diferem pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$).

Escore: (0): processo inflamatório agudo; (1) processo inflamatório subagudo; (2) processo inflamatório crônico; (3) Reparo.

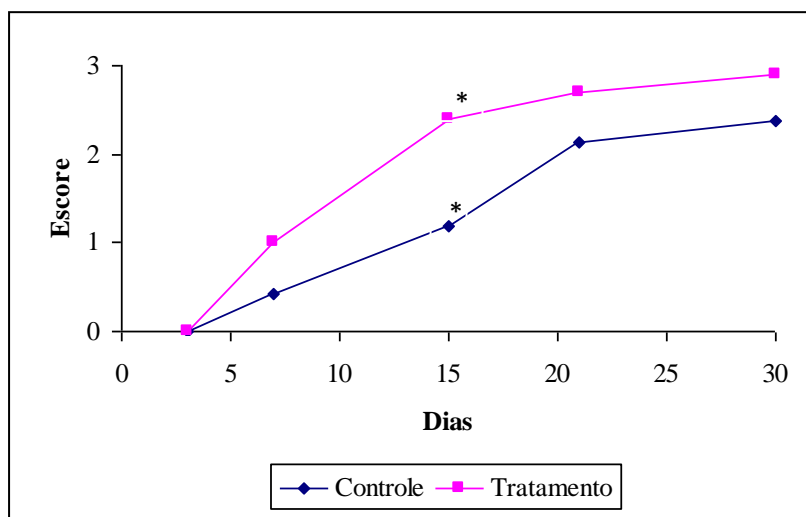


Figura 09: Representação gráfica do escore microscópico do fragmento coletado no centro da ferida do dia 3 ao dia 30 do tratamento.

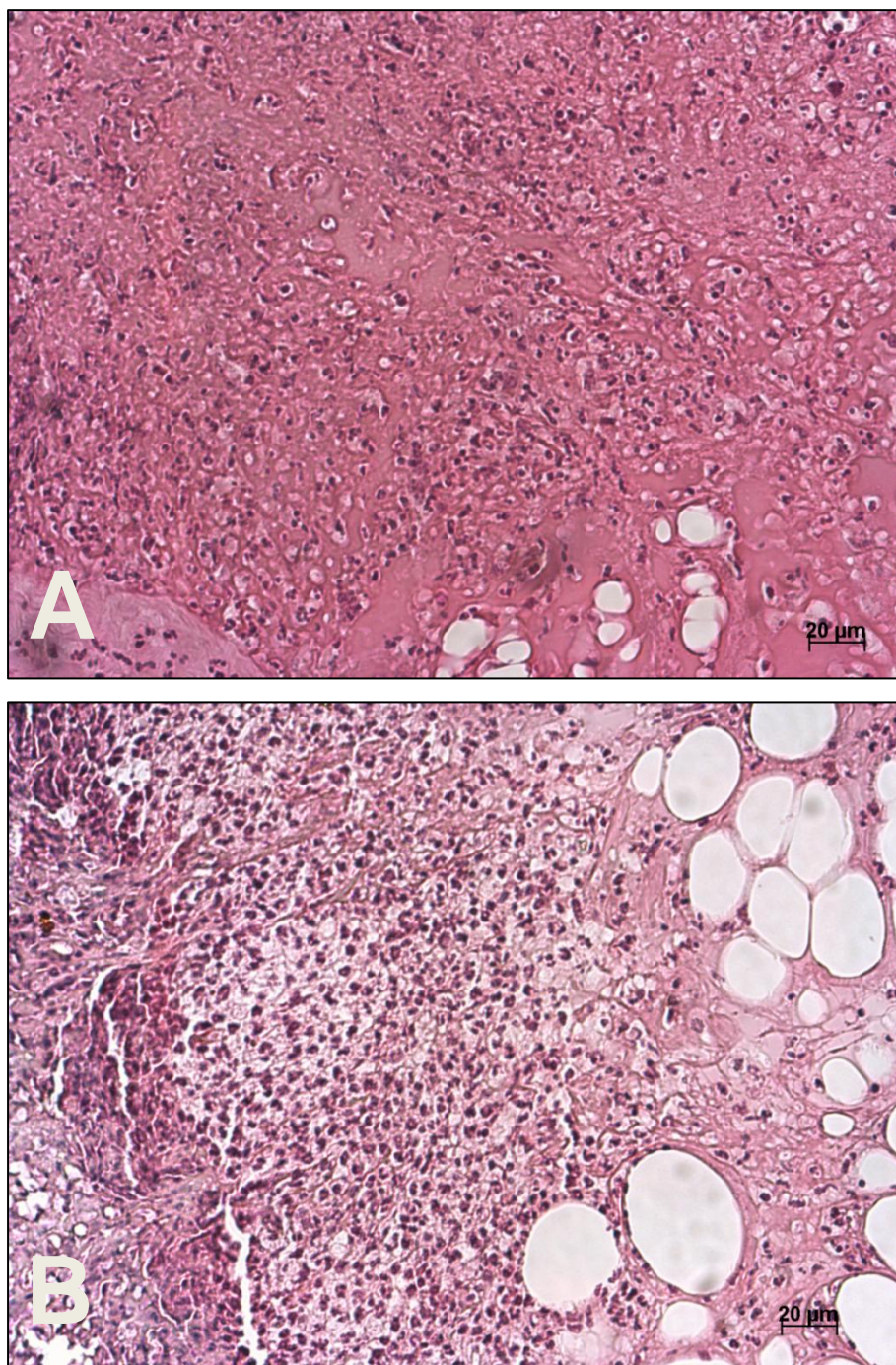


Figura 10 e 11: Fotomicrografia da biópsia de pele da garupa de equino aos três dias coradas com hematoxilina e eosina (HE), mostrando intenso infiltrado inflamatório no grupo controle (A) e no grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B).

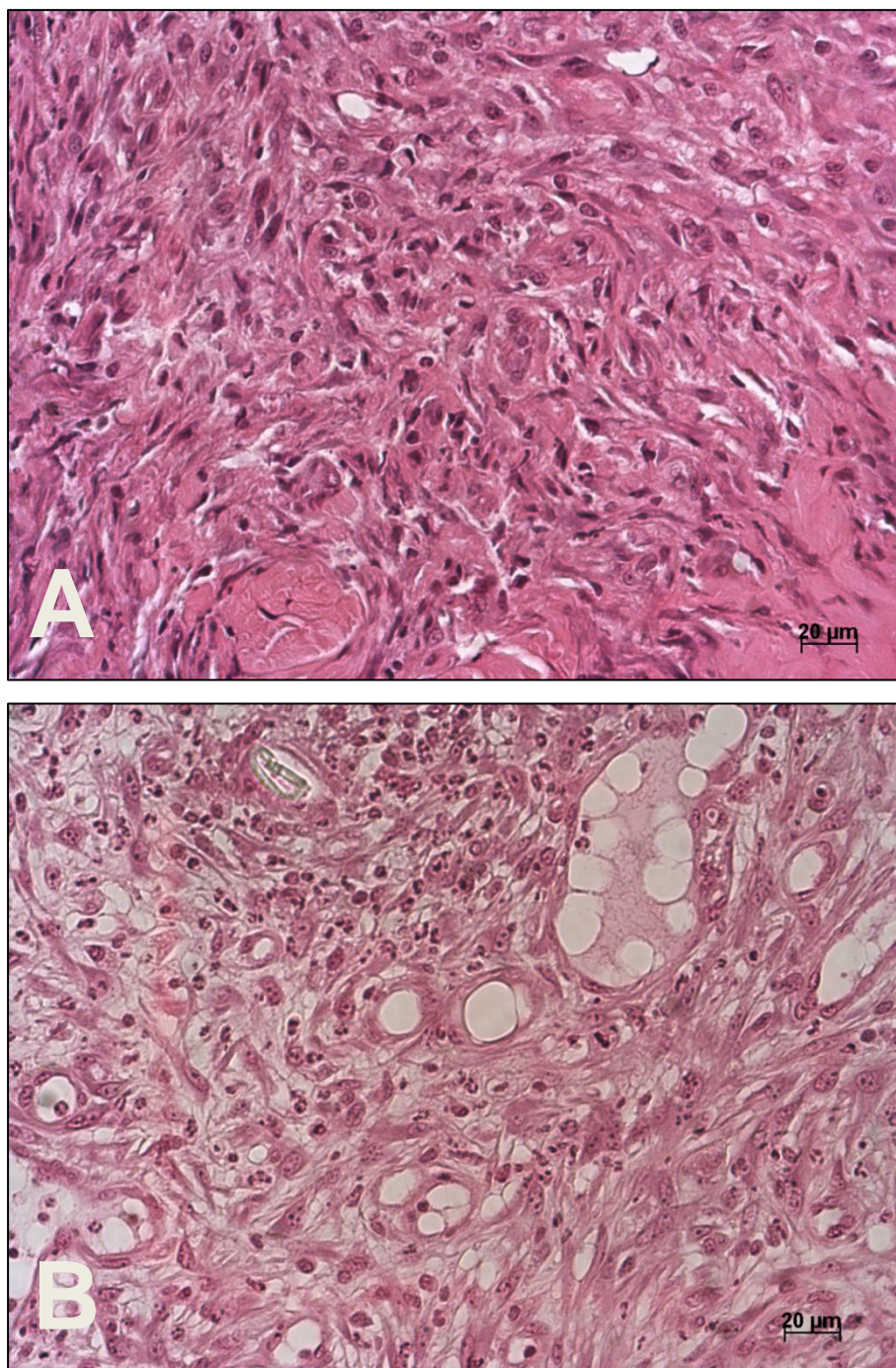


Figura 12 e 13: Fotomicrografia da biópsia de pele da garupa de equino aos sete dias coradas com hematoxilina e eosina (HE), mostrando acentuada reação inflamatória no grupo controle (A) e no grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B), o processo inflamatório é menos acentuado.

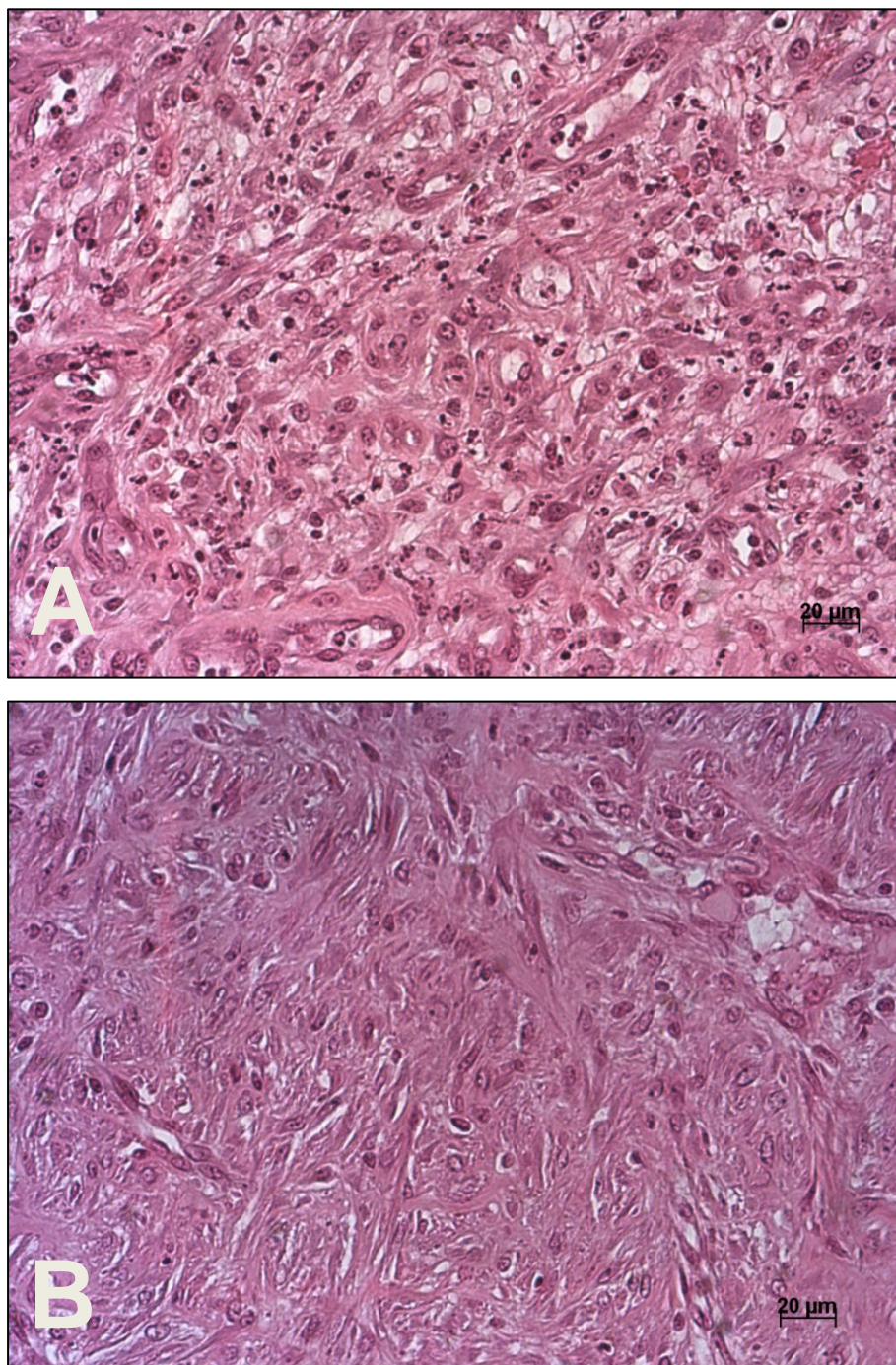


Figura 14 e 15: Fotomicrografia da biópsia de pele da garupa de equino aos 15 dias coradas com hematoxilina e eosina (HE), mostrando acentuada reação inflamatória crônica e algumas fibras colágenas no grupo controle (A) e no grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B), tecido de granulação madura e rico em fibras colágenas.

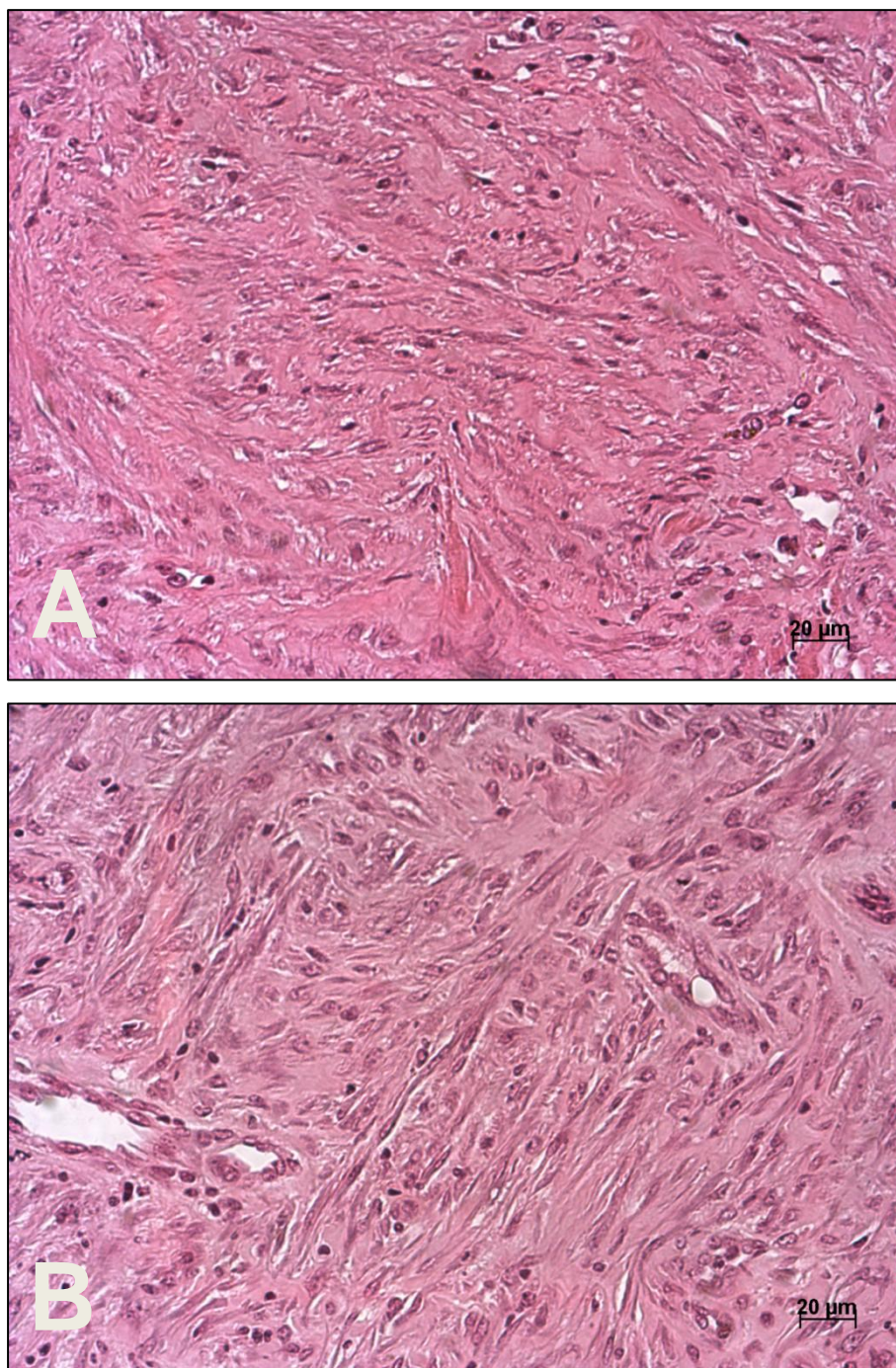


Figura 16 e 17: Fotomicrografia da biópsia de pele da garupa de equino aos 21 dias coradas com hematoxilina e eosina (HE), mostrando fibras colágenas espessas e desorganizadas no grupo controle (A) e no grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B), organização das fibras colágenas e processo de epitelização mais avançado.

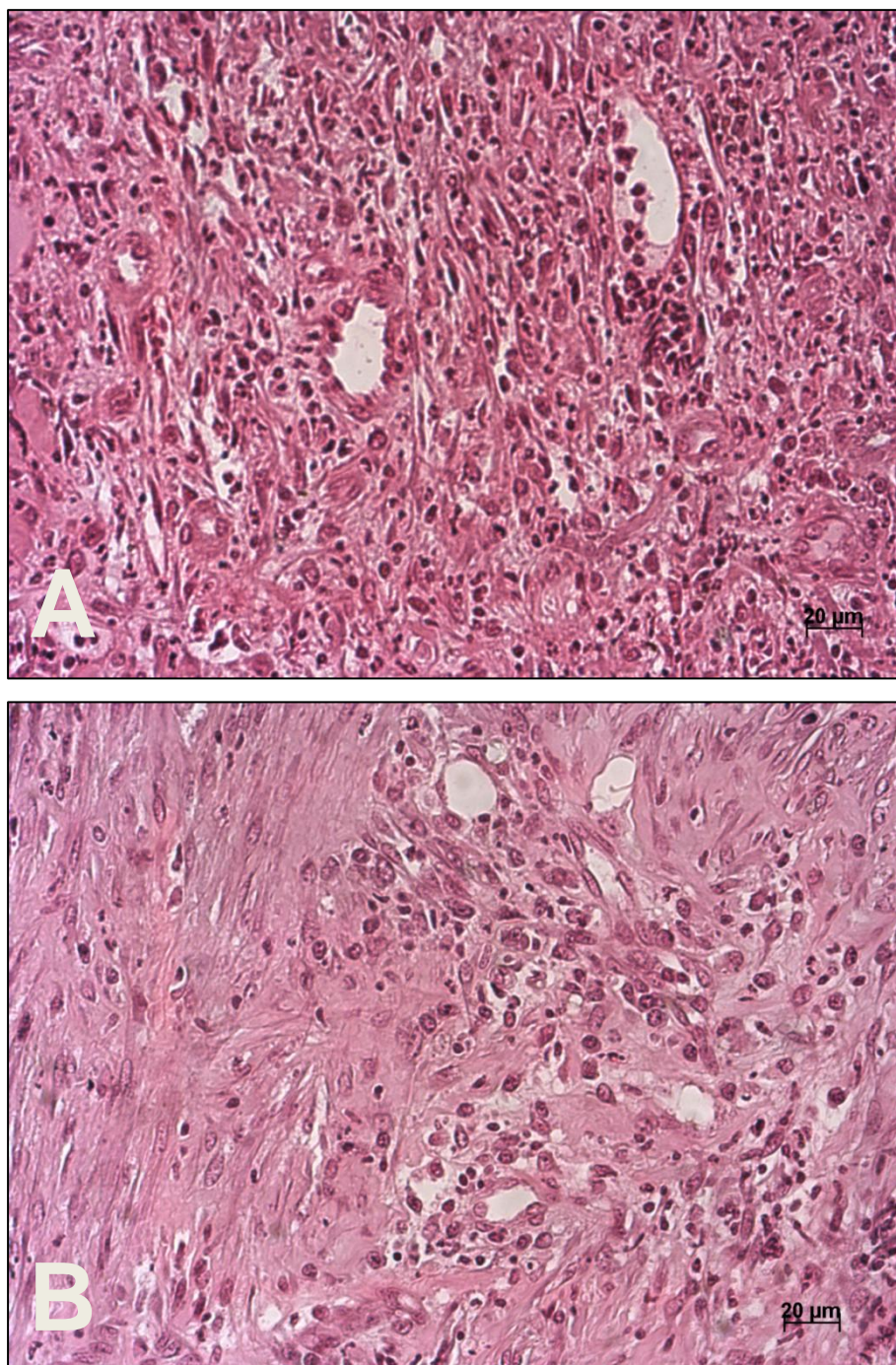


Figura 18 e 19: Fotomicrografia da biópsia de pele da garupa de equino aos 30 dias coradas com hematoxilina e eosina (HE), mostrando fibras colágenas em início de organização e epitélio em formação no grupo controle (A) e no grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B), tecido fibrosado organizado e fase avançada do processo de reepitelização.

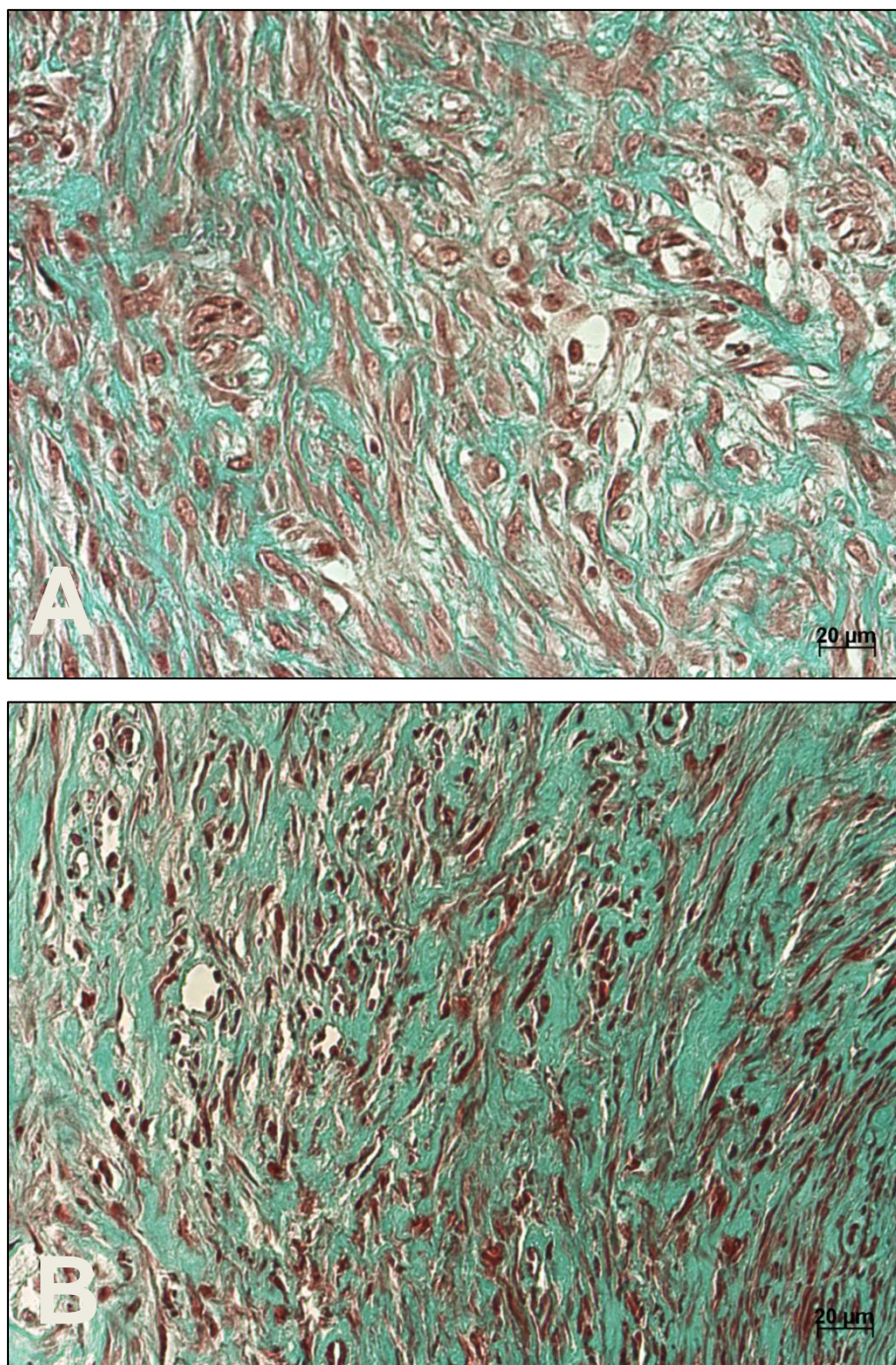


Figura 20 e 21: Fotomicrografia da biópsia de pele da garupa de equino aos 15 dias coradas com tricrômio de masson (TM), mostrando algumas fibras colágenas depositadas sem organização (verde) no grupo controle (A) e no grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B), rico em fibras colágenas (verde).

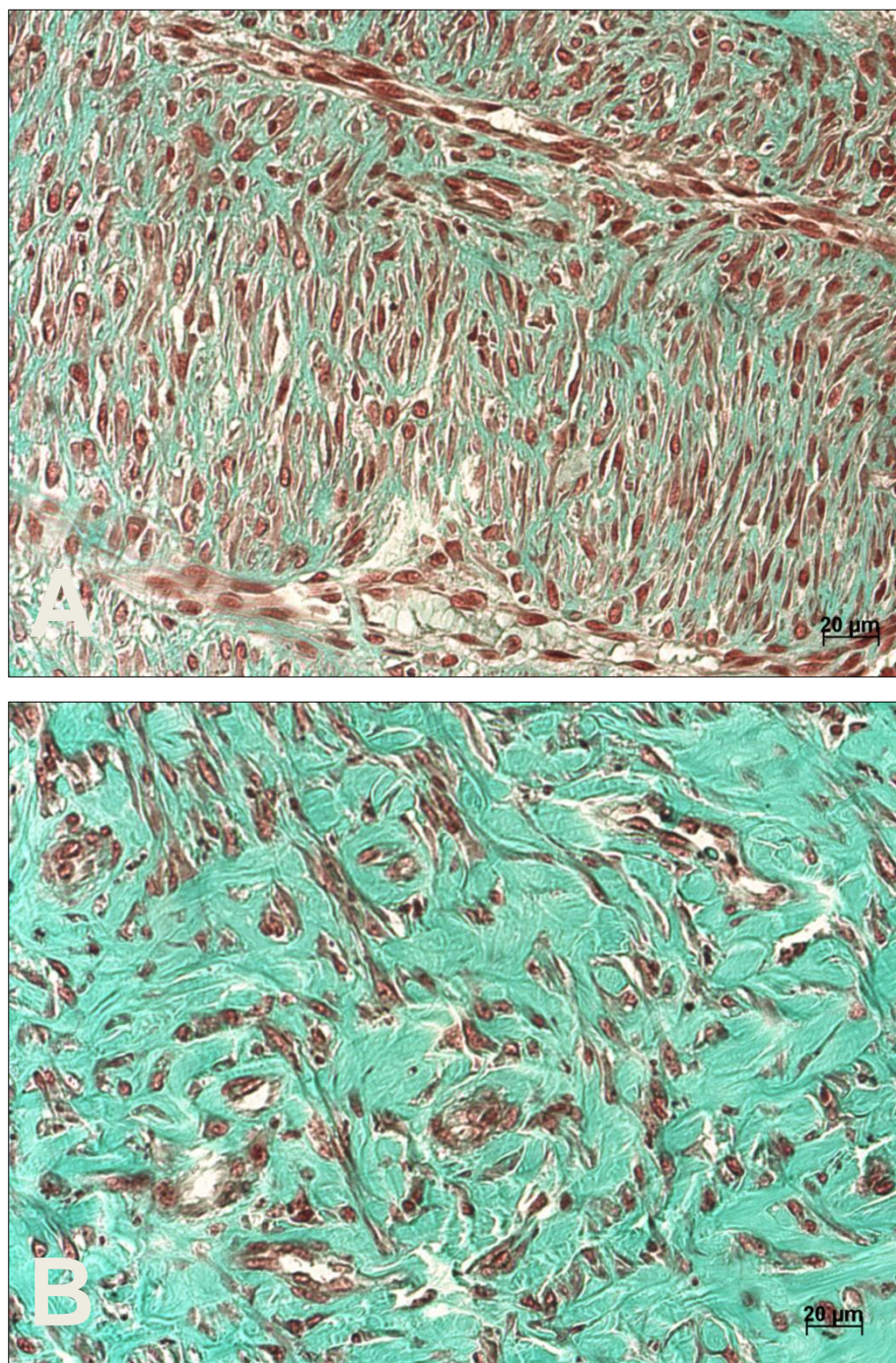


Figura 22 e 23: Fotomicrografia da biópsia de pele da garupa de equino aos 30 dias coradas com tricrômio de masson (TM), mostrando fibras colágenas em início de organização no grupo controle (verde) (A) e no grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B), fase avançada do processo de reepitelização.

5.2. Avaliação Ratos Wistar

5.2.1. Avaliação Microscópica

5.2.1.1 Ciclooxygenase-2 (COX-2)

A avaliação foi feita em 24 horas e 72 horas após o ato cirúrgico.

Em todos os tempos (24h, 72h). avaliados o grupo tratado com óleo de semente de maracujá apresentou menor reação inflamatória em relação ao grupo controle. A expressão de COX-2 foi maior no grupo controle. Como podemos demonstrar na tabela e figura.

Tabela 5. Média, desvio padrão e significância estatística da expressão de COX-2 nos grupos controle e tratado com óleo se semente de maracujá.

Dias	Controle	Óleo de Semente de Maracujá	P=
24 horas	50,6±11,4	34,6±6,28	0,0465
72 horas	76±14,2	29,6±9,8	0,0079

Médias diferem pelo teste de Wilcoxon (P<0,05)

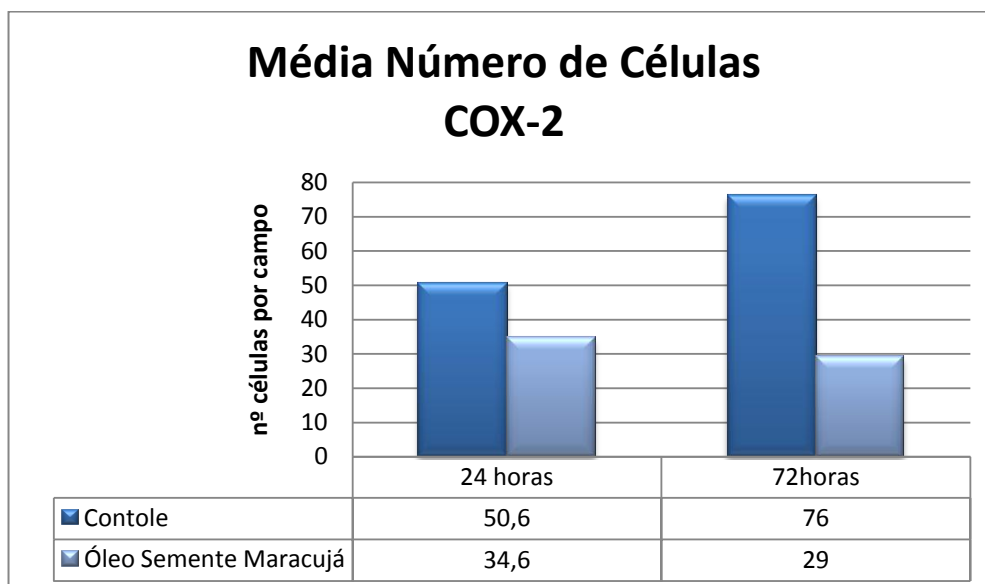


Figura 24. Ilustração gráfica dos valores médios da contagem de células por campo, nos grupos controle e tratado.

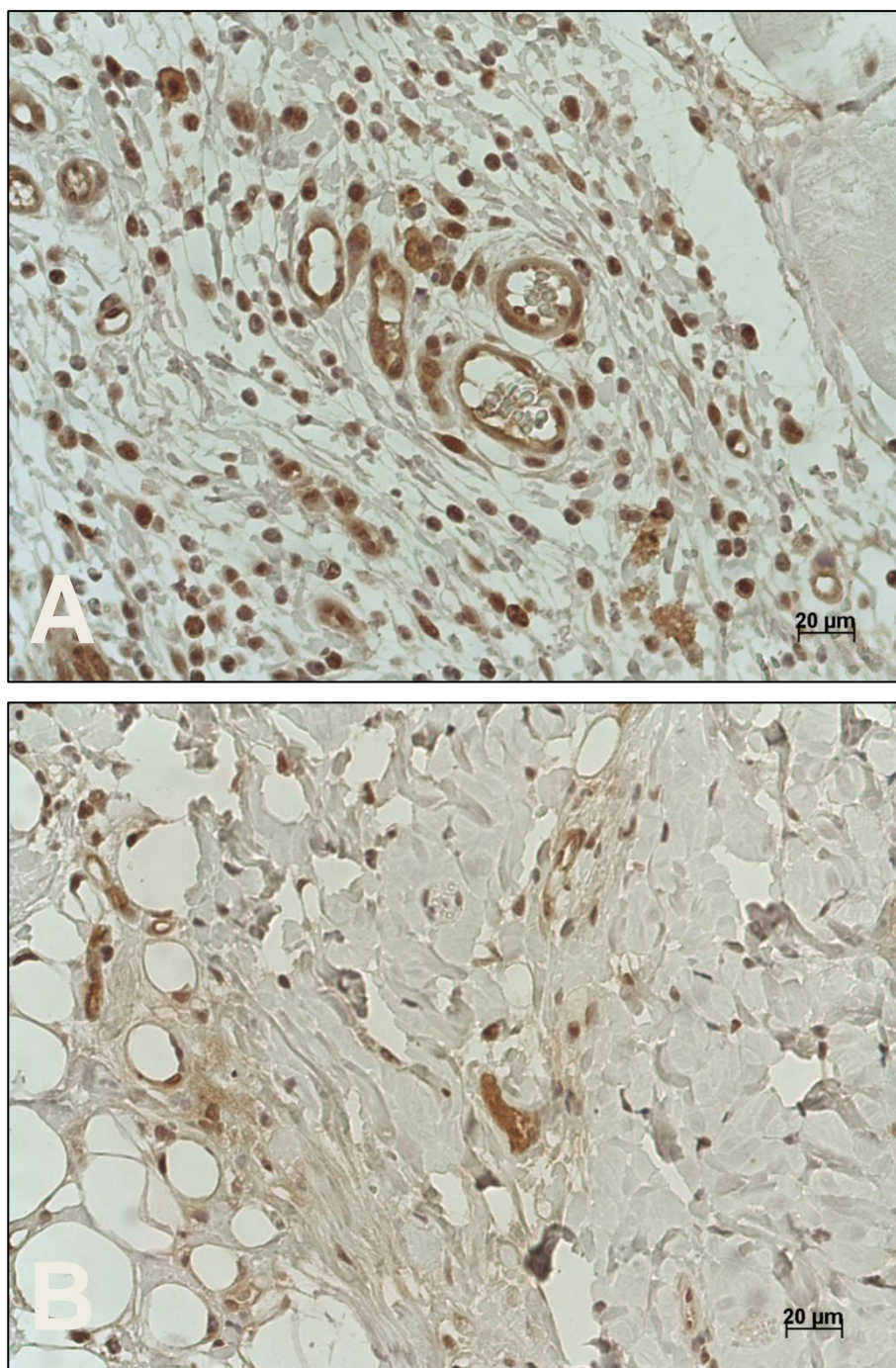


Figura 25 e 26: Fotomicrografia, expressão imunoistoquímica de COX-2 no grupo controle (A), evidenciando mais células marcadas do que no grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B) com 24 horas.

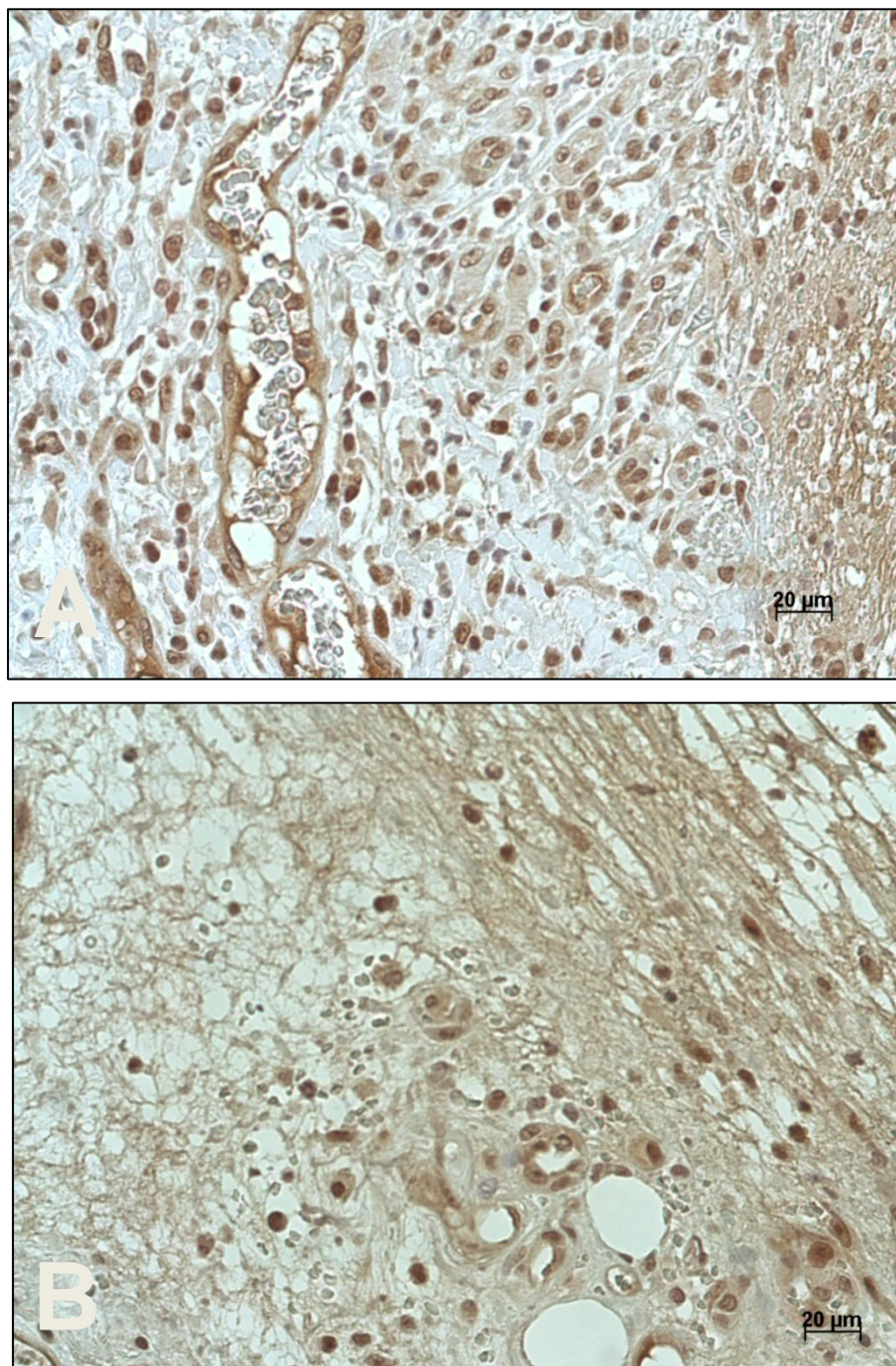


Figura 27 e 28: Fotomicrografia, expressão imunoistoquímica de COX-2 no grupo controle (A), evidenciando mais células marcadas do que no grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B) com 72 horas.

1.2.1.2 Fator de Crescimento Beta (TGF β)

A avaliação foi feita em 24 horas, 72 horas e 5 dias após o ato cirúrgico.

Em todos os tempos (24h, 72h E 5 dias). avaliados o grupo tratado com óleo de semente de maracujá apresentou menor reação inflamatória em relação ao grupo controle. A expressão de TGF β foi menor no grupo controle. Como podemos demonstrar na tabela e figura.

Tabela 6. Média, desvio padrão e significância estatística da expressão de TGF β nos grupos controle e tratado com óleo se semente de maracujá.

Tempo	Controle	Óleo Semente Maracujá	P=
24 h	15,2 \pm 5,77	12,8 \pm 2,56	0,8125
72h	34,66 \pm 5,73	45 \pm 0,81	0,0355
5 dias	31,2 \pm 4,53	54 \pm 8,19	0,0079

Médias diferem pelo teste de Wilcoxon (P<0,05)

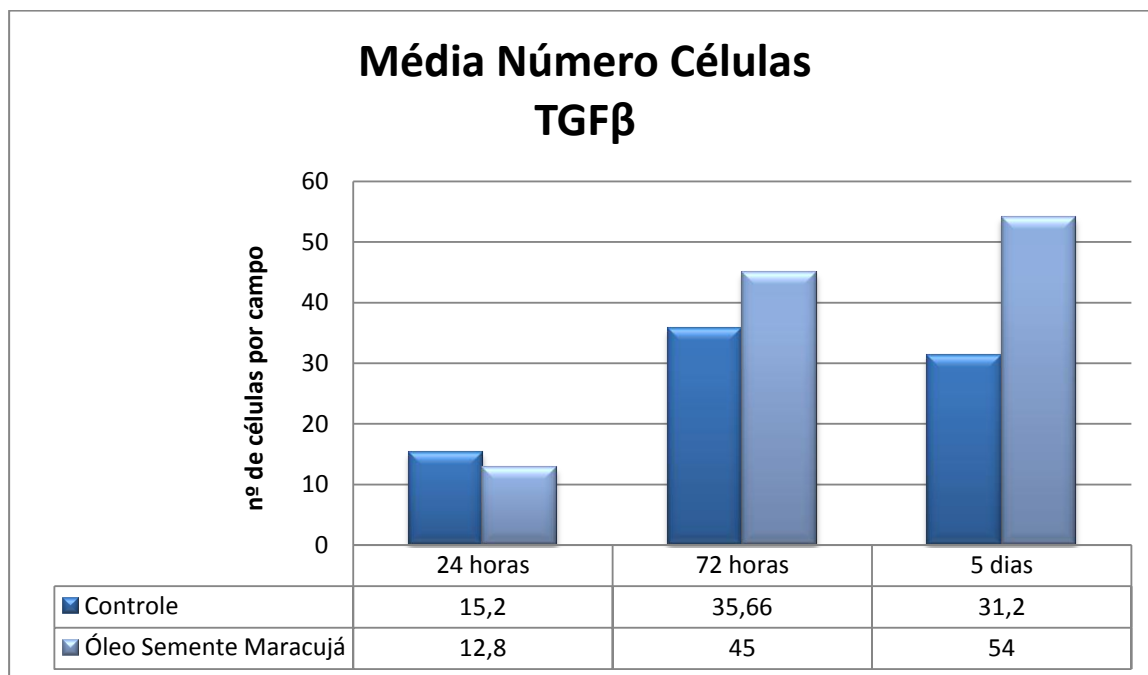


Figura 29. Ilustração gráfica dos valores médios da contagem de células por campo, nos grupos controle e tratado.

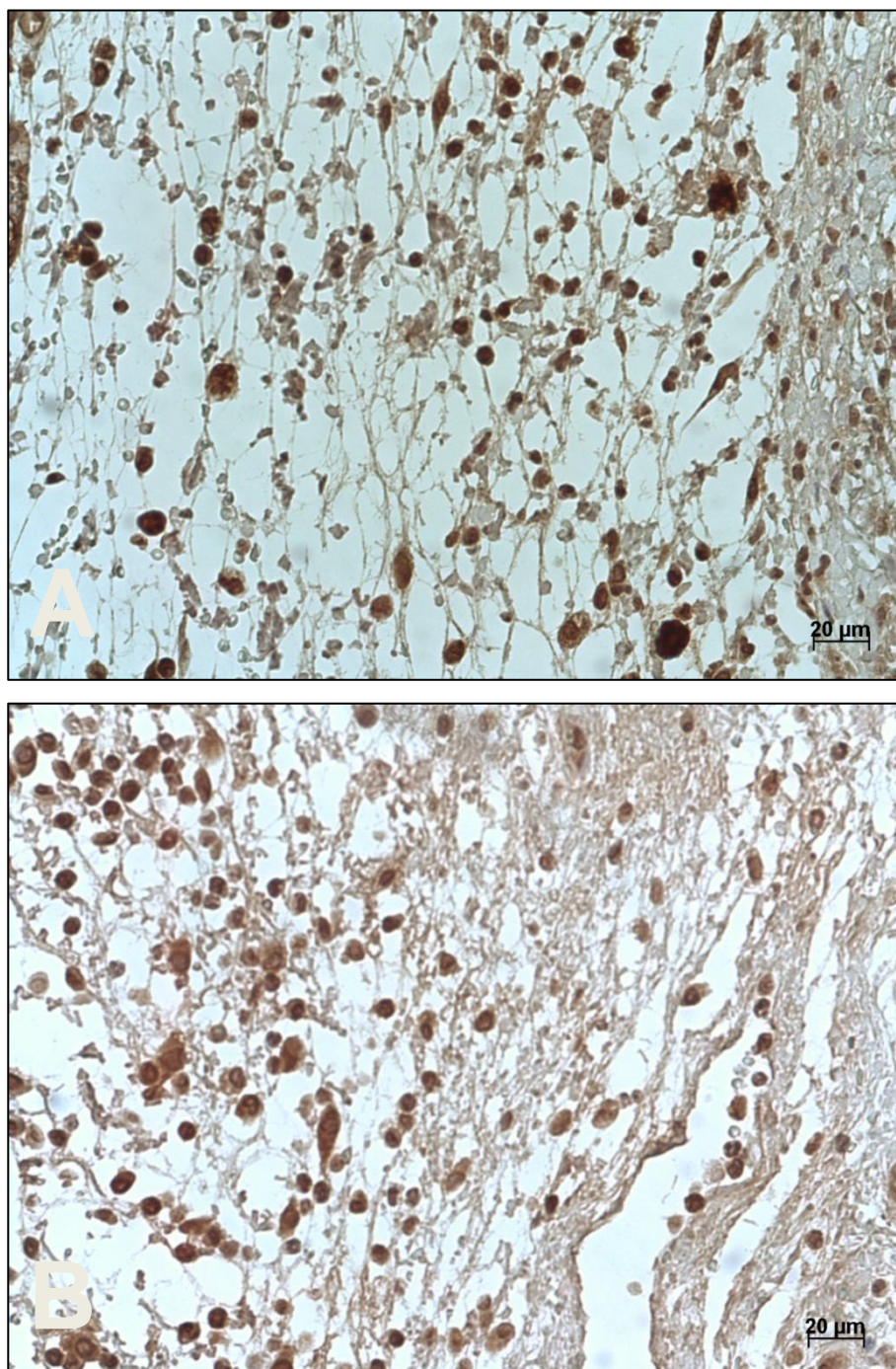


Figura 30 e 31: Fotomicrografia, expressão imunoistoquímica de TGFβ no grupo controle (A), evidenciando menor número células marcadas em relação ao grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B) com 24 horas.

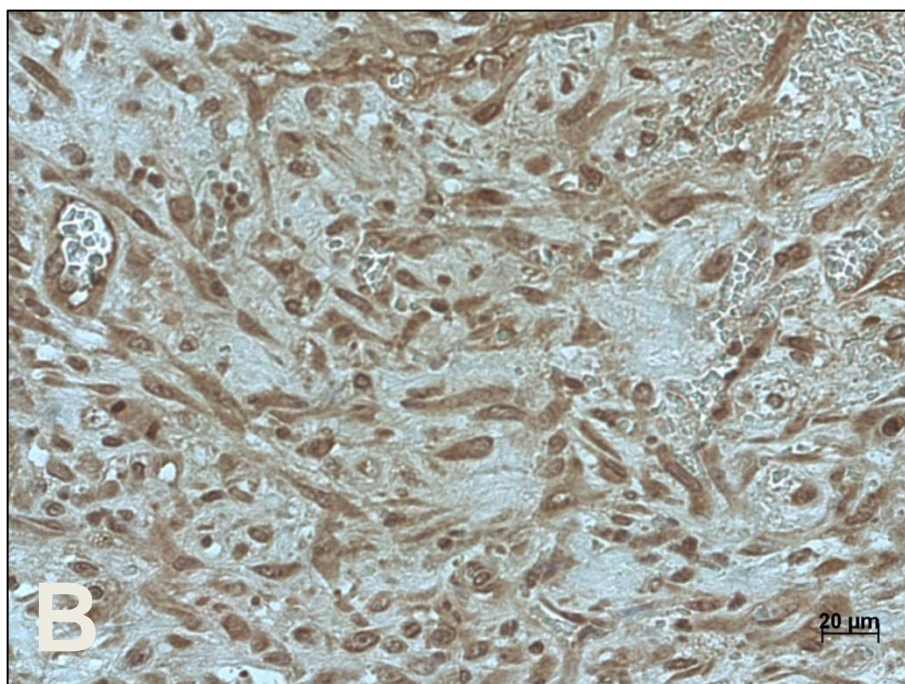
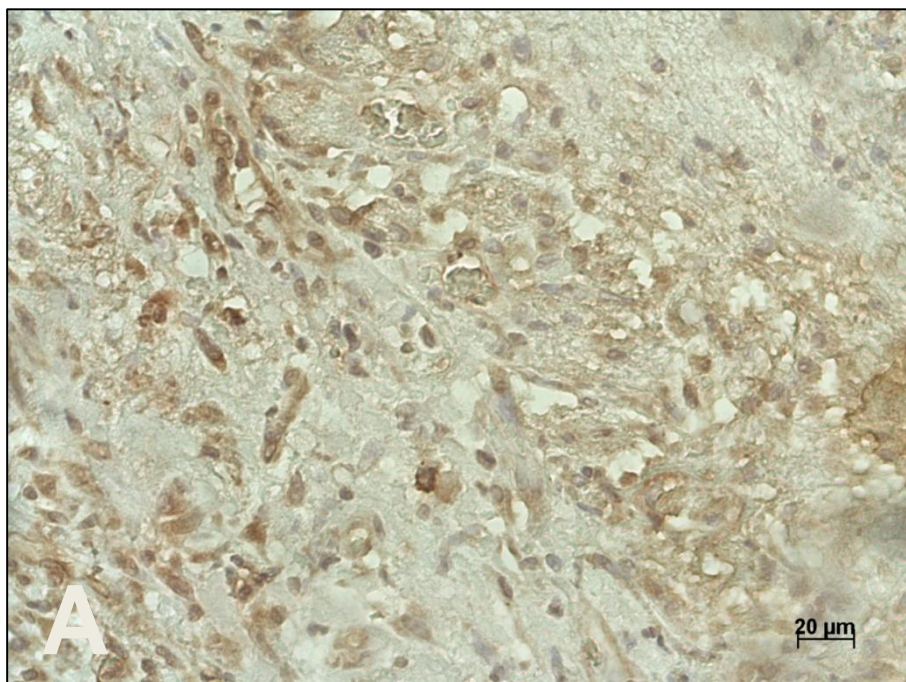


Figura 32 e 33: Fotomicrografia, expressão imunoistoquímica de TGF β no grupo controle (A), evidenciando menor número células imunomarcadas em relação ao grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B) com 5 dias.

1.2.1.3 Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

Com relação ao fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), analisados nos dias cinco e 15, após ato cirúrgico, foi constatado que o grupo com óleo de semente de maracujá foi significativo em relação o grupo controle, na avaliação de cinco dias. Já na avaliação de 15 dias, não houve diferença significativa. Aos 15 dias foi constata apenas a diferença entre o grupo tratado e controle, através da média, como pode observar na tabela e figura.

Tabela 7. Média, desvio padrão e significância estatística da expressão de VEGF nos grupos controle e tratado com óleo se semente de maracujá.

Tempo	Controle	Óleo Semente Maracujá	P=
5 dias	12,6±3,92	23,6±7,22	0,0411
15 dias	16±5,54	19,2±6,58	0,5476

Médias diferem pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$)

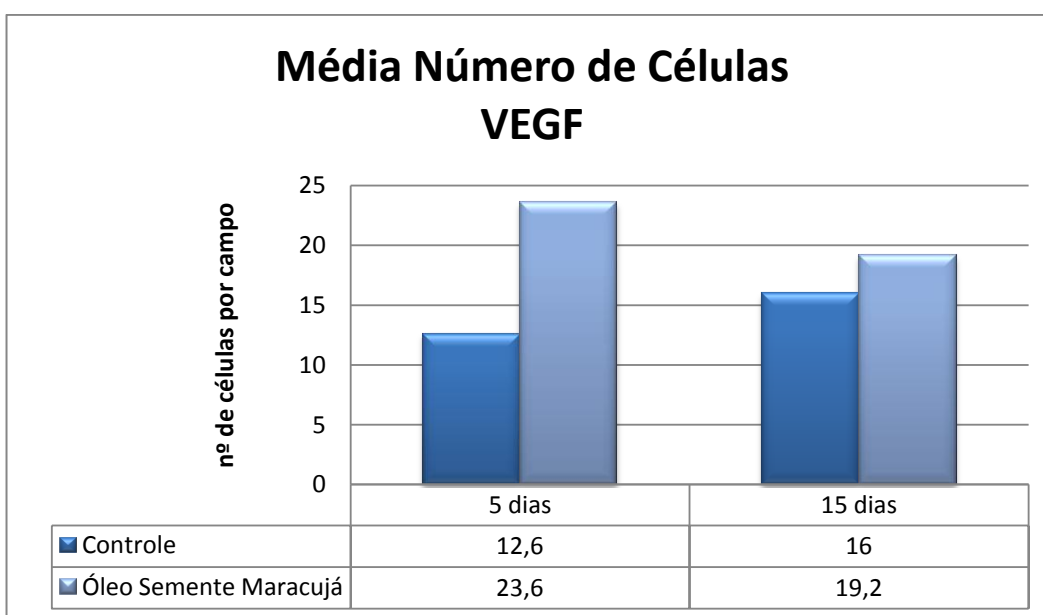


Figura 34. Ilustração gráfica dos valores médios da contagem de células por campo, nos grupos controle e tratado.

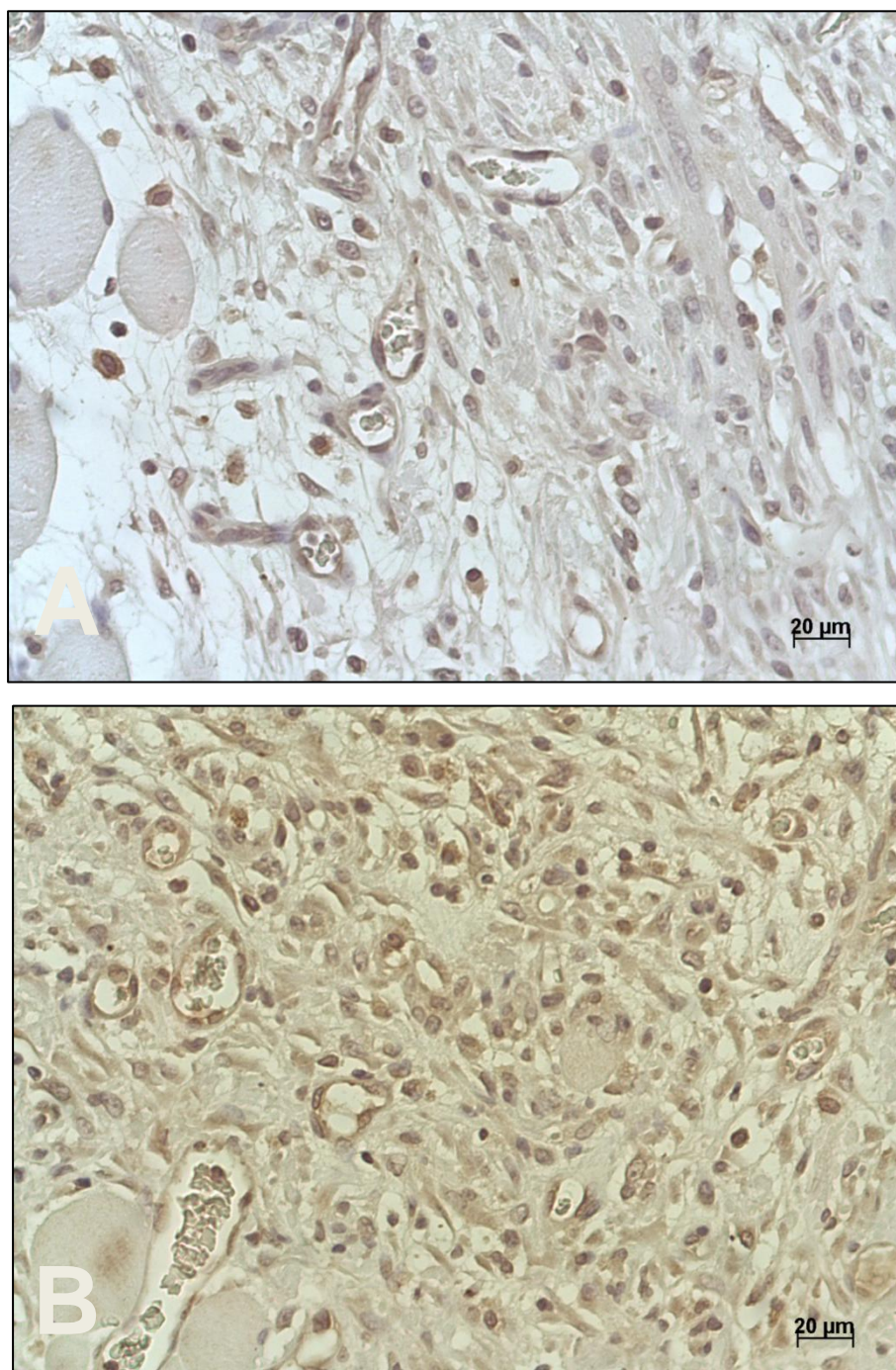


Figura 35 e 36: Fotomicrografia, expressão imunoistoquímica VEGF no grupo controle (A), evidenciando menor número células imunomarcadas em relação ao grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B) com 5 dias.

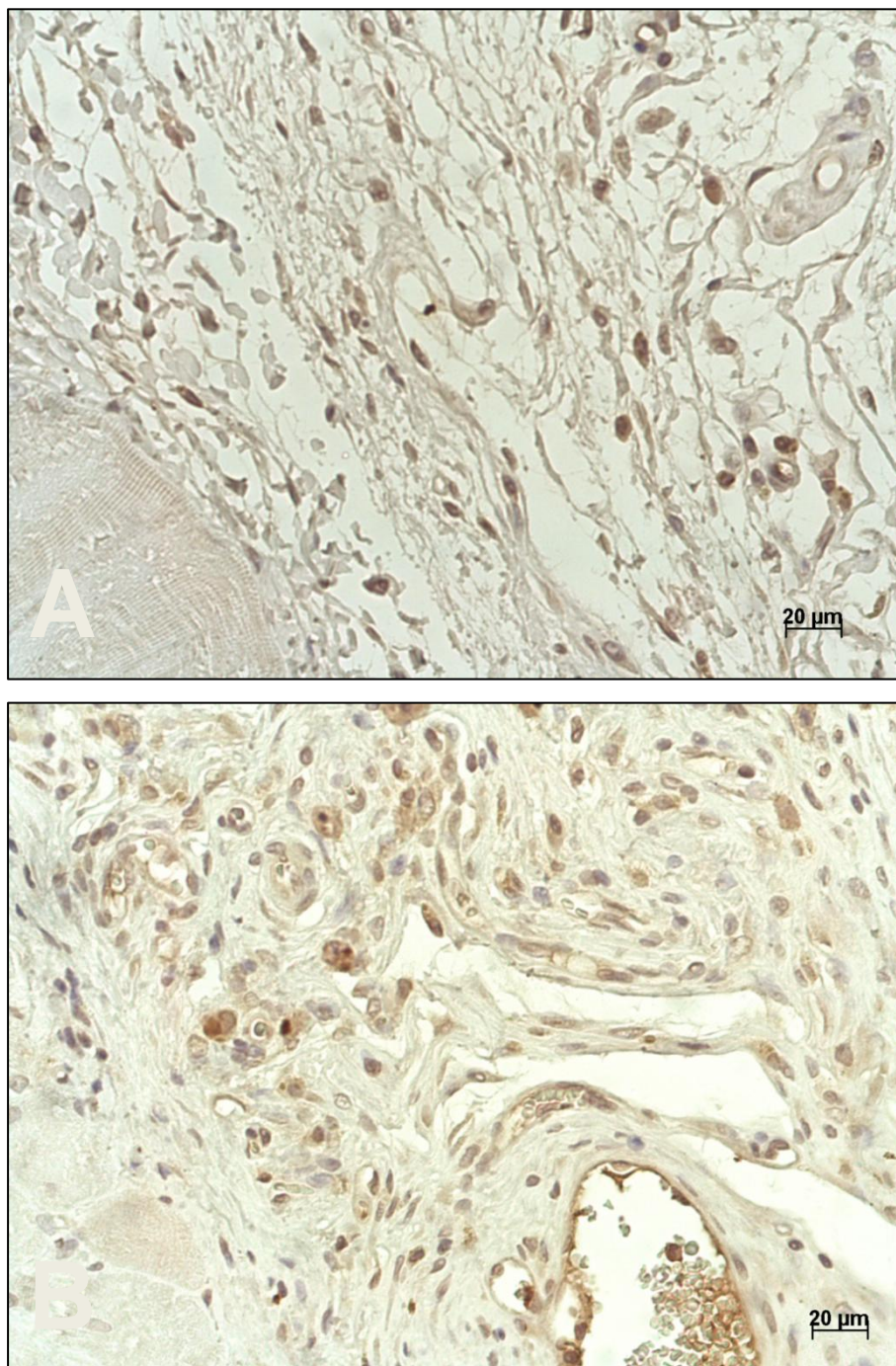


Figura 37 e 38: Fotomicrografia, expressão imunoistoquímica VEGF no grupo controle (A), evidenciando menor número células imunomarcadas em relação ao grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B) com 15 dias.

1.2.1.4 Alfa Actina

A expressão da alfa actina foi avaliada nos tempos cinco e 15 dias.

Aos cinco dias não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com óleo de semente de maracujá. Houve diferença quando foi feita a média e o desvio padrão, como mostra tabela 8.

Com 15 dias de avaliação houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado, apresentando maior número de fibroblastos. (foto)

Tabela 8. Média, desvio padrão e significância estatística da expressão de Alfa Actina nos grupos controle e tratado com óleo se semente de maracujá.

Tempo	Controle	Óleo Semente Maracujá	P=
5 dias	11±3,16	14,8± 3,24	0,1679
15 dias	21,8±4,62	35,8±5,26	0,0079

Médias diferem pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$)

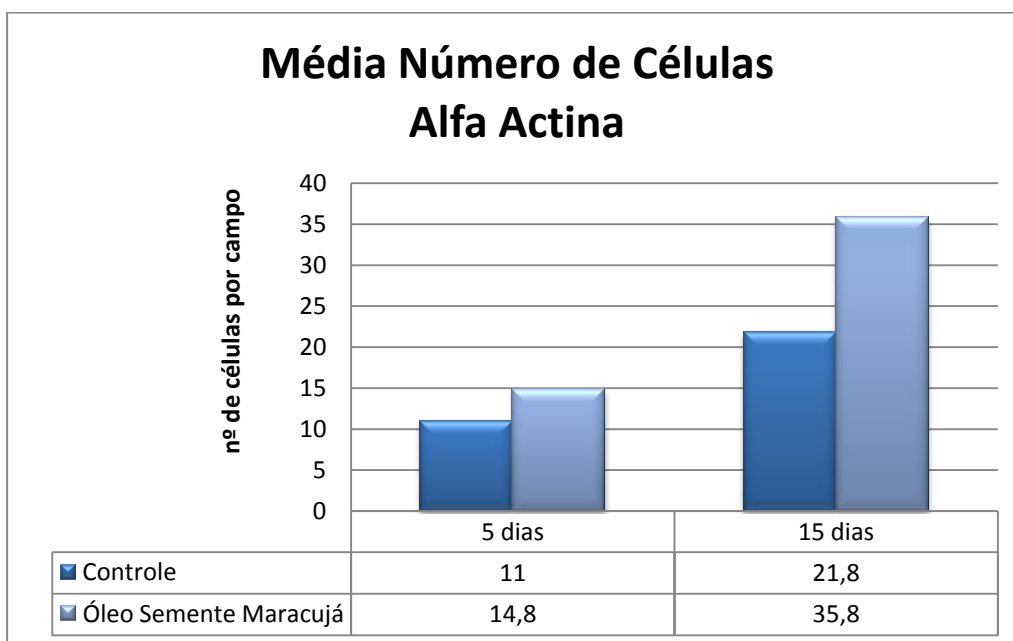


Figura 05. Ilustração gráfica dos valores médios da contagem de células por campo, nos grupos controle e tratado.

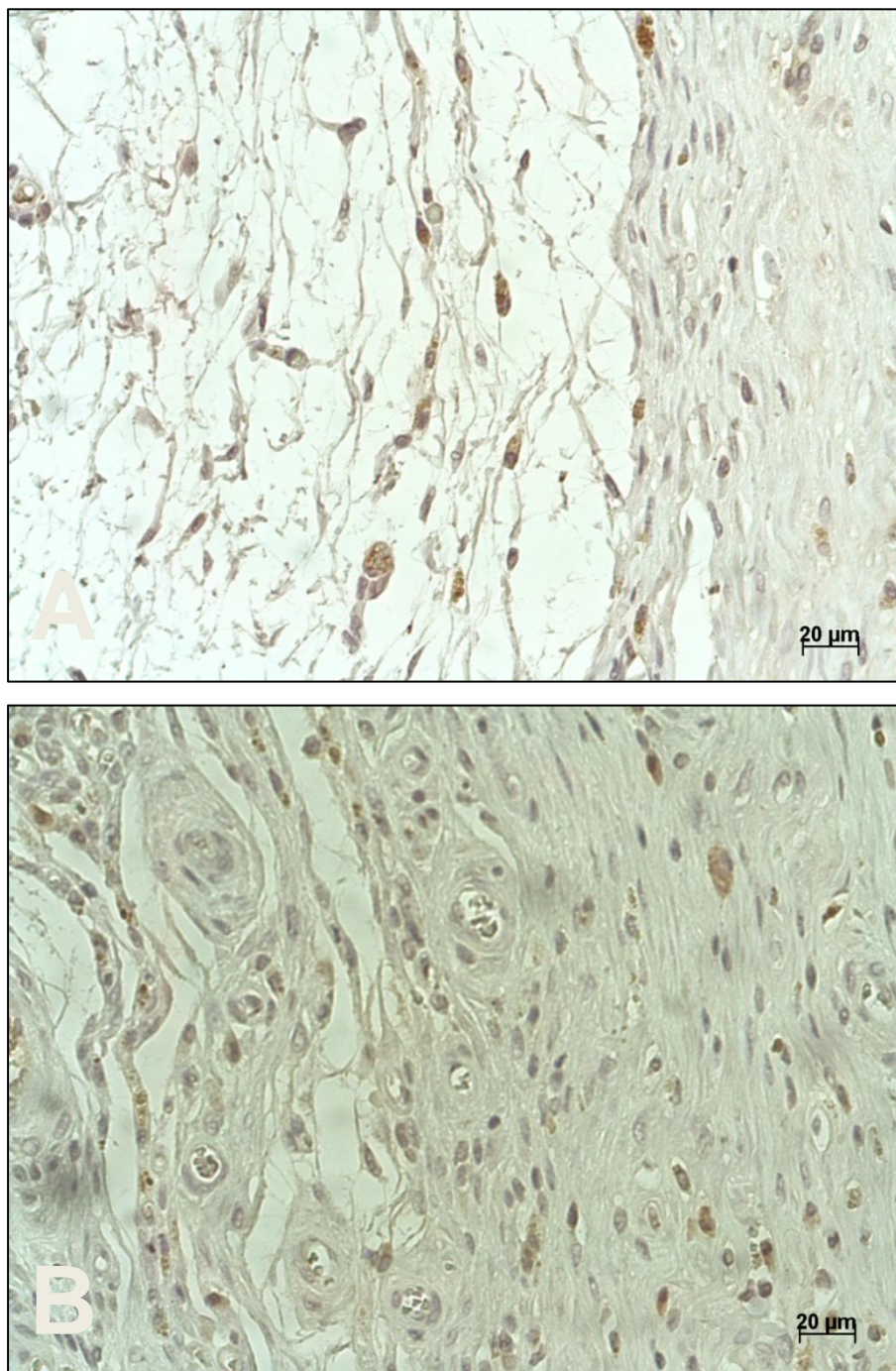


Figura 39 e 40: Fotomicrografia, expressão imunoistoquímica Alfa Actina no grupo controle (A), evidenciando menor número células imunomarcadas em relação ao grupo tratado com óleo de semente de maracujá (B) com 15 dias.

1.2.1.5 Fator de von Willebrand (Fator VIII)

A expressão do fator VIII foi avaliada nos tempos cinco e 15 dias.

Aos cinco dias não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado com óleo de semente de maracujá. Houve diferença quando foi feita a média e o desvio padrão, como mostra tabela 9.

Com 15 dias de avaliação houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado, apresentando maior número de fibroblastos.

Tabela 9. Média, desvio padrão e significância estatística da expressão do Fator VIII nos grupos controle e tratado com óleo de semente de maracujá.

Tempo	Controle	Óleo Semente Maracujá	P=
5 dias	9±2,82	10,6±3,26	0,625
15 dias	15,6±1,49	29,8±5,30	0,0117

Médias diferem pelo teste de Wilcoxon (P<0,05)

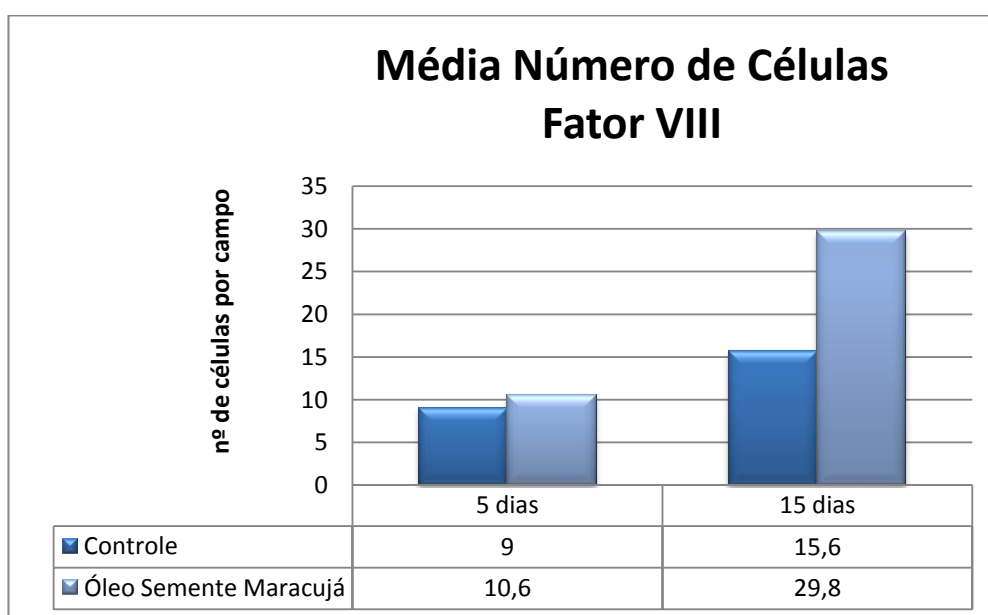


Figura 41. Ilustração gráfica dos valores médios da contagem de células por campo, nos grupos controle e tratado.

1.2.1.6 CD68

Os macrófagos podem produzir fatores de crescimento e outros tipos de citocinas, que inclui o fator de crescimento fibroblástico-1, fator de crescimento derivado de plaquetas, IL-1, TGF- β . Nos grupos tratado e controle não foi observado diferença significativa em nenhum momento, apenas diferença na média no tempo 5 dias.

Tabela 1. Média, desvio padrão e significância estatística da expressão do CD68 nos grupos controle e tratado com óleo se semente de maracujá.

Tempo	Controle	Óleo Semente Maracujá	P=
5 dias	10,6 \pm 3,07	20,4 \pm 2,57	0,0625
15 dias	10 \pm 2	10 \pm 4,33	0,6742

Médias diferem pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$)

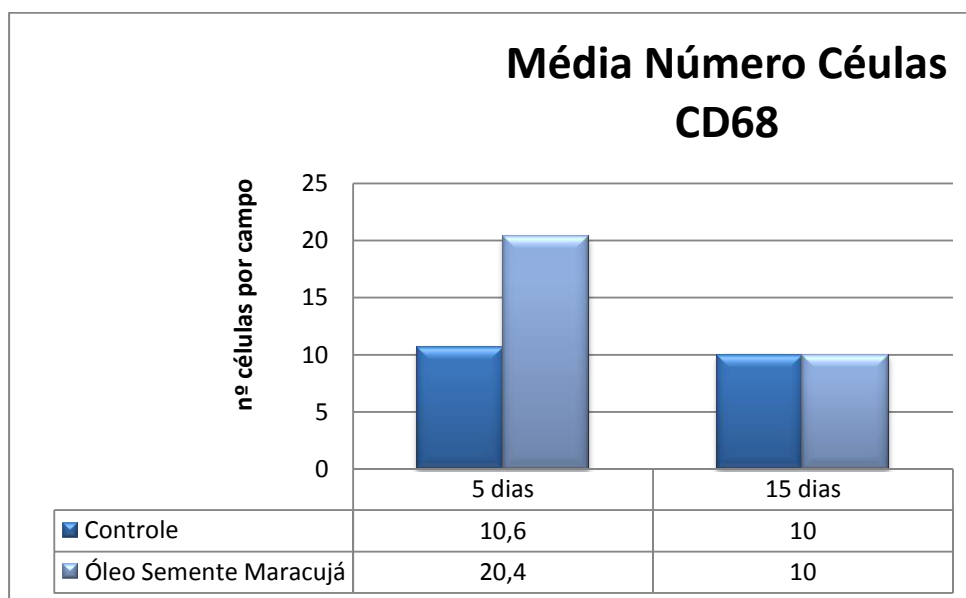


Figura 42. Ilustração gráfica dos valores médios da contagem de células por campo, nos grupos controle e tratado.

6. Discussão

Os resultados apresentados neste trabalho de cicatrização com óleo de semente de maracujá, revelaram no decorrer do processo cicatricial diferenças entre os grupos controle e tratado.

As características evolutivas pesquisadas apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

O fechamento de uma ferida depende de vários fatores, dentre eles a extensão e localização anatômica da lesão, e a presença de infecção local. O processo de cicatrização das feridas nos equinos é muito semelhante ao dos humanos (Theoret et al. 2013), o que se dá por reepitelização da superfície cutânea, com a derme cicatrizando por granulação do estroma, migração de miofibroblastos e contração da ferida (Greenwood 2010). De forma clássica, o processo de cicatrização da pele é dividido em quatro fases bem definidas que se sobrepõem, incluindo hemostasia, inflamação, proliferação e, por último, remodelação (Enoch & Leaper 2007, Young & McNaught 2011).

Os resultados apresentados neste trabalho de cicatrização com óleo de semente de maracujá, revelaram no decorrer do processo cicatricial diferenças entre os grupos controle e tratado.

As características evolutivas pesquisadas apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

O emprego de óleo de semente de maracujá em feridas cutâneas é em feridas cutâneas em equinos revelou aos três dias de pós operatório pouca diferença na avaliação clínica.

A partir do sétimo dia as avaliações macroscópicas já apresentavam diferença significativa.

A morfometria da área cirúrgica foi feita através do software Imagej. Podemos notar que nos tempo três, sete, 15, 21 e 30 dias, as áreas reduziram significativamente em relação ao grupo tratado com óleo de semente de maracujá. Garros 2006, utilizou extrato de *Passiflora edulis*, na forma de infuso das folhas, na morfometria realizada, não foi observada diferença estatística.

Marques 2012, ao analisar pomadas formuladas com óleo de semente de maracujá em concentrações diferentes, a morfometria foi feita com planímetro e foi notada diferença estatística em duas concentrações da pomada a base de óleo de semente de maracujá, nas concentrações de 30% e 15% do óleo de semente de maracujá.

O tecido de granulação foi observado macroscopicamente em alguns momentos das avaliação. Ribeiro 2005, avaliando uso tópico de kentanserina e fitoterapia em lesões cutâneas em equinos por segunda intenção não notou tecido de granulação macroscopicamente, apenas na microscopia.

Em continuidade a primeira fase de cicatrização há o extravasamento de sangue dos vasos lesionados e plaquetas são ativadas pelas substâncias da matriz extracelular que envolve o endotélio, iniciando-se os processos de adesão e agregação celular (LI et. al., 2007), este evento nos grupos tratado e controle.

A formação de crostas no processo de cicatrização foi melhor observada nos grupos do que no controle. No segundo estágio do processo de cicatrização é a fase de proliferação, que se caracteriza por fibroplasia, angiogênese e reepitelização. Na fibroplasia ocorrerão migração e proliferação de fibroblastos, concomitante à síntese de novos componentes da matriz extracelular (GURTHUR, 2008). Os fibroblastos são células fusiformes com núcleo elíptico (KIERSZENBAUM et. al., 2004) que, em geral, constituem o maior número de células do tecido conjuntivo, além de sintetizarem grande parte da matriz extracelular que o compõe (GRAY, 1995). Na derme, tecido conjuntivo denso não-modelado, eles são importantes na secreção de proteoglicanos, fibronectina, elastina, laminina e colágeno, que é a proteína mais abundante nos seres humanos e o principal componente da pele, constituindo 80% do peso seco da derme e a base de sua estrutura e resistência (LI et. al., 2007).

O grupo tratado com óleo de semente de maracujá tiveram diferença macroscópica e microscópica, já o trabalho de Garros (2006), não houve diferença estatisticamente significante entre as áreas cirúrgicas

das feridas tratadas com *Passiflora edulis* e o grupo Controle; entretanto, histologicamente houve colagenização significativamente maior no 14º dia de pós-operatório nos animais do grupo *Passiflora*.

Ao se comparar as observações da aplicação a de óleo de semente de maracujá, realizada nesta oportunidade, aos achados de EURIDES et al. (1996), que utilizaram solução aquosa de barbatimão em feridas induzidas no tórax de ratos e às observações de SÉRVIO et al (2011) ao utilizarem mastruz em lesões cutâneas de ratos, observou-se que tanto na aplicação de barbatimão, quanto na de mastruz ocorre diferença significativa no processo de cicatrização a partir do 14º dia, fato que, no uso de óleo de semente de maracujá começa a ser significativo entre sétimo e o décimo dia.

Nos trabalhos em que se avaliou o processo de cicatrização cutânea ao se aplicar fitoterápicos (EURIDES et al., 1996; ESTEVÃO et al., 2009; ANDRADE et al., 2010; BATISTA et al., 2010; SERVIO et al., 2011), bem como neste trabalho onde se analisou o efeito da pomada a base de óleo de semente de maracujá, verificou-se que o processo cicatricial descrito por COTRAN (2000). foi acelerado. As fases do processo cicatricial são as mesmas, independentemente do medicamento e metodologia utilizados. Nos estudos e pesquisas buscam-se substâncias, especialmente fitoterápicos, que acelerem esse processo cicatricial

As propriedades físico químicas e a presença de ácidos graxos essenciais no óleo de semente de maracujá, provavelmente promoveram a boa cicatrização observada nas lesões cutâneas dos ratos deste experimento, entretanto, CAVAZANA et al. (2009), ao realizarem estudo experimental com a aplicação de cloreto de sódio a 0,9%, de açúcar e de AGE-TG sobre feridas experimentalmente induzidas em ratos, descreveram que apenas o grupo açúcar apresentou uma modulação positiva da resposta inflamatória celular entre os grupos tratados.

A imunoistoquímica é o método diagnóstico que tem com objetivo detectar um antígeno tecidual ou celular, mediante a utilização de

anticorpo específico. Para estudo da cicatrização cutânea a determinação da angiogênese e dos miofibroblastos são de extrema importância.

A quantificação de vasos sanguíneos foi realizada por meio de imunistoquímica, utilizando o antifator VIII. O fator VIII é altamente específico para marcar tecido vascular (Wener, 2002), e foi utilizado em vários estudos. Seguindo essa linha de estudos nesse trabalho realizado com óleo de semente de maracujá, quantificamos os vasos sanguíneos através de imunistoquímica obtendo um resultado estaticamente significativo aos 15 dias de tratamento.

A reação inflamatória se torna mais extensa pelo fato de que há mais tecido necrótico, maior formação de fibrina e exsudato para se remover. O fenômeno de contração da ferida é o fator principal de diferenciação dos dois tipos de cicatrização. Essa diferenciação ocorre devido aos fibroblastos e miofibroblastos. Essas células possuem propriedades e características das células musculares lisas, são contráteis, através da expressão de actina alfa de músculo liso exercem a função de aproximação das bordas da ferida (Mandelbaum, 2003; Silva, 2003).

A quantificação de miofibroblastos foi realizada pelo anticorpo alfa actina. Estudos comprovam a importância do miofibroblasto no processo cicatricial e demonstram que existe relação direta entre nível de alfa actina e a capacidade contrátil dos miofibroblastos (Hinz, 2001).

A participação importante da α -actina de músculo liso (α -SMA) foi demonstrada na produção de miofibroblasto in vitro, utilizando modelos que envolvem fibroblastos cultivados em substratos flexíveis e flutuantes utilizados em experimentos que envolvem o processo cicatricial de feridas em ratos (Hinz, 2003). Células expressando esta proteína, ou seja, diferenciadas em miofibroblastos, possuem uma forte atividade retrátil, em comparação aos protomiofibroblastos que apresentam ausência de qualquer outra alteração na expressão da proteína contrátil (Kato, 2002; Bogatkevich, 2003).

Na contagem de miofibroblastos nos animais tratados com óleo de semente de maracujá revelou significância estatística aos 15 dias, em relação ao grupo controle, demonstrando que o tratamento com óleo de semente de maracujá adianta o processo de aproximação das bordas da lesão com 15 dias.

Os macrófagos podem produzir fatores de crescimento e outros tipos de citocinas, que inclui o fator de crescimento fibroblástico-1, fator de crescimento derivado de plaquetas, IL-1, TGF- β .

A identificação de macrófagos em espécimes incluídos em parafina pode ser adequadamente avaliada por meio de reações imunoistoquímicas. Embora alguns estudos realizados nos últimos 20 anos tenham utilizado a metodologia histoquímica por meio das técnicas de azul de toluidina e Giemsa, para evidenciação metacromática da heparina, para a detecção de mastócitos (STERN et al., 1981a; LEDESMA-MONTES et al., 2004; CHATTERJEE et al., 2008; SHARMA & SAXENA, 2010), evidências atuais sustentam que métodos imunoistoquímicos sejam preferencialmente utilizados, visto que evidenciam de forma adequada estas células (NETTO et al., 2012).

As reações imunoistoquímicas utilizando anticorpos anti-CD68 são consideradas eficazes na detecção de macrófagos, como demonstrado nos resultados do presente estudo, mesmo não tendo uma diferença significativa estatisticamente demonstrada.

Na primeira fase de cicatrização várias citocinas estão envolvidas nesse processo, incluindo o TGF β (Fator transformador de crescimento beta), que neste momento tem a função de atrair neutrófilos e monócitos. TGF β tem como função biológica a quimiotaxia de polimorfonucleares; síntese de NOSi; proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblasto; degradação do colágeno III e síntese do fator I; fator angiogênico, neste trabalho com óleo de semente de maracujá foi possível avaliar as células imunomarcadas e verificar que houve aumento significativo nos tempos de 24 horas, 72 horas e 5 dias em relação ao grupo controle.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é membro de uma família de citocinas que exerce importantes funções nas angiogêneses fisiológica e patológica (Dvorak, 1995). VEGF atua sobre angioblastos transformando-os em células endoteliais, além de levar à formação de brotos vasculares. No trabalho realizado com óleo de semente de maracujá o VEGF mostrou diferença estatística aos cinco dias evidenciando e comprovando o aumento endotelial vascular, o que acelera o processo cicatricial.

A COX2 pertence à família de enzimas que convertem o ácido araquidônico em prostaglandina (PG). A forma induzível desta enzima é estimulada por citocinas inflamatórias, lipopolissacarídeos (LPS) e fatores de crescimento. No presente trabalho foi constatado o efeito anti-inflamatório do óleo de semente de maracujá, foi estatisticamente comprovado seu efeito anti-inflamatório.

De acordo com a literatura, até o momento apenas Marques, 2012, analisou o óleo de semente de maracujá em concentrações diferentes como forma de pomada a base de água e obteve resultados favoráveis na cicatrização.

O óleo de semente de maracujá foi estudado individualmente, observando os mesmos efeitos na cicatrização em vários tempos e momentos, ou seja, a estrutura físico-química do óleo de semente de maracujá permanece sempre a mesma.

7. Conclusão

O emprego de óleo de semente de maracujá no processo de cicatrização de feridas cutâneas produz efeitos benéficos na reparação tecidual em todos os momentos estudados. No entanto é importante que se amplie o estudo. Os resultados do presente trabalho permitem concluir que o uso do óleo de semente de maracujá apresenta efeitos estatisticamente significativos em todas as fases de reparação tecidual.

Assim, podemos concluir que em feridas cutâneas, tratadas com óleo de semente de maracujá acelera o processo cicatricial.

8. Referências

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed; p.1090-125, 2004.

ANDRADE, Z. A. **Tecido conjuntivo, reparo, regeneração e cicatrização**. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. *Patologia Processos Gerais*. 4 ed. São Paulo: Atheneu, , p. 135-151, 1999.

ANDRADE, A. L.; LUVIZOTTO, M. C. R.; SAKAMOTO, S. S.; SOUZA, T. F. B.; FERNANDES, M. A. R. **Eficácia do extrato aquoso *Triticum vulgare* no tratamento de radiodermatites geradas pelo uso de radioterapia em gatos**. *Archives of Veterinary Science*, v.15, n.3, p.135-142, 2010.

BANKS, W. J. 1992. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2ª ed. Manole, São Paulo.

BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M. S.; BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. **Grow factors and citokines in wound healing**. *Wound Repair Regen.*, 2008; 16: 585-601.

BATISTA, J. S.; SILVA, A. E.; RODRIGUES, C. M. F.; COST, K. M. F. M.; OLIVEIRA, A. F.; PAIVA, E. S.; NUNES, F. V. A.; OLINDA, R. G. **Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*CARYOCAR CORIACEUM WITTM*) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos**. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.77, n.3, p.441-447, jul./set., 2010.

BERRY, D. P.; HARDING, K. G.; STANTON, M. R. JASANI, B.; EHRLICH, H. P. **Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts na myofibroblasts**. *Plast. Reconstr. Surg.* 1998; 102: 124-31.

BOJARB, J.W. Wound management. **Mod. Vet. Prat., Canada**, v.63, n.10 p.791 – 796, out., 1982.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg.** 2006; 117 (7 Suppl):12S-34S.

CLARK, R.A. **The molecular and cellular biology wound repair**. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1996.

CARRICO, T. J.; MEHRHOF, Al. Jr., Cohen IK. Biology of wound healing. **Surg Clin North Am.** 1984; 4(4):721-33.

CAVAZANA, W. C.; SIMÕES, M. L. P. B.; YOSHII, S. O.; AMADO, C. A. B.; CUMAN, R. K. N. **Açúcar (sacarose) e triglicerídeos de cadeia média com ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas cutâneas: estudo experimental em ratos.** An Bras Dermatol., 84(3):229-36, 2009.

COELHO, U. M.; ANTONIOLLI, A. B.; SILVA, D. N.; CARVALHO, T. M. M. B.; PONTES, E. R. J. C.; ODASHIRO, A. N. **O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos.** Rev. Col. Bras. Cir.; 37(1): 045-051, 2010.

DIEGELMANN R.F.; COHEN, I. K., KAPLAN, A. M. The role of macrophages in wound repair: a review. **Plast Reconstr Surg.**, (68):107, 1981.

DYCE, K. M.; W. O.; WENSING, C. J. G. O tegumento comum. In: DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara, 1990, p. 277-291.

EMING, A.S.; BRACHVOGEL, B.; ODORISO, T.; KOCH, M. **Regulation of angiogenesis: wound healing as a model**. Progr Histochem Cytochem. 42:115-70, 2007.

ESTEVIÃO, L. R. M.; MEDEIROS, J. P.; SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; GUIMARÃES, E. C.; CÂMARA, C. A. G.; EVÊNCIO-NETO, J. **Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaiba**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.44, n.4, p.406-412, abr. 2009.

EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; BELLETI, M. E.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTE, M. C. S.; NETO, N. S. T.; CAMPOS, V. A.; JUNIOR, P. L. S. **Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de barbatimão (*STRYPHYNODENDRON BARBATIMAN MARTIUS*)**. Revista da FZVA Uruguaiana, v. 2/3, n. 1, p. 30-40. 1995/1996.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. **Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá – aproveitamento das sementes**. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 26, n. 1, p. 101-102, 2004.

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

GRAY, H. Grays anatomy: the anatomical basis of medicine and surgery. Nova Iorque: **Churchill Livingstone**, 1995. P. 76.

GUYURON B.; JOHN, P., CHUNG, K.; ARUN, G.; KINNEY, B.; RUBIN, J. P.
Plastic surgery: indications and practice. St Louis, MO: Elsevier; p.9-26, 2009.

GURTNER, G. C.; WEMER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. **Wound repair and regeneration.** Nature, 2008; 453:314-21.

ISSAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÊGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. **Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica.** Rev. Med., São Paulo – SP, v. 89, n. ¾, p. 125-131, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.303.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia.** Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p.168-70.

LI, J.; CHEN, J., KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol.** 2007;25(1):9-18

MANDELBAUM , S H.; Di SANTIS E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. **Na. Bras. Dermatol.,** Rio de Janeiro, 78 (4): 393-410, 2003.

MEDINA, J. C.; GARCIA, J. L. M.; KATO, K.; MARTÍN, Z. J. de; VIEIRA, L. F.; ERNESTO, O. V. **Goiaba: da cultura ao processamento e comercialização.** São Paulo: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1978. cap. 3. (Série Frutas Tropicais, 6).

MURPHY, G. F.; MIHM JR, M. C. A pele. In: ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 1048-1086.

PEYTON, L. C.; PATTIO, N. Wound care and excessive granulation tissue. In: ROBINSON, N. E. **Current therapy in equine medicine**. 2 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1987, p. 642-645.

SÉRVIO, E. M. L.; ARAÚJO, K. S.; NASCIMENTO, L. R. S.; COSTA, C. L. S.; MENDES, L. M. S.; FILHO, A. L. M. M.; SANTOS, I. M. S. P.

SINGER, A. J., CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**. 1999;341:738-46.

TOWNSEND, C. M.; BEAUCHAMP, D.; EVERS, M.; MATTOX, K. L. **Sabiston textbook of surgery**. St Louis, MO: Elsevier. p.192-207, 2011.

TROTTER, G.W. Principles of early wound management. **The Vet. Clin. N. A.: Eq. Prat.**, v.5, n.3, p.485 – 489, 1989.

TURNER, A. S.; MCILWRAITH, C. W. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo: Roca, 1985, cap. 7, p. 103-113.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil, 2000.