

GEISLA TELES VIEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DE *Inga subnuda* e
Pseudopiptadenia contorta EM FERIDAS CIRÚRGICAS EM COELHOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal
de Viçosa - Campus Viçosa

T

V657a
2015
Vieira, Geisla Teles, 1980-
Avaliação do efeito cicatrizante de *Inga subnuda* e
Pseudoptadenia contorta em feridas cirúrgicas em coelhos / Geisla
Teles Vieira. - Viçosa, MG, 2015.
xvii, 123f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Tânia Toledo de Oliveira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.103-122.

1. Cicatrização de feridas. 2. Plantas medicinais. 3. *Inga subnuda*. 4. *Pseudoptadenia contorta*. 5. Coelho como animal de laboratório. 6. Pele - Tratamento. 7. Estereologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22, ed. 636.089607

GEISLA TELES VIEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DE *Inga subnuda* e
Pseudopiptadenia contorta EM FERIDAS CIRÚRGICAS EM COELHOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 10 de julho de 2015.

José Humberto de Queiroz

Marlene Isabel Vargas Vilorio

Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira

Angélica Alves de Lima

Tânia Toledo de Oliveira
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

A Deus e aos anjos de luz, pela fé e sabedoria nos momentos de fraqueza.

À minha mãe querida e amorosa, pela dedicação, amor, carinho e compreensão.

Ao meu irmão Wesner, fiel e companheiro, pela preocupação e esforço em me ajudar.

Ao meu pai Wilson, pelo exemplo de trabalho forte.

Às minhas irmãs Gislaine e Alessandra, pela amizade e compreensão.

Ao meu querido Carlos, meu amor, meu amigo, meu companheiro, meu anjo, pelos anos dedicados em me fazer uma pessoa melhor, pela paciência nos momentos de crise, pelo amor e carinho em todas as etapas deste doutorado, pelo incentivo e orientação em cada fase desta jornada, pela ajuda em enfrentar meus medos e inseguranças, e por me mostrar que nada é impossível quando se tem um pouco de vontade e dedicação!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, pela oportunidade da realização do curso.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof^a. Tânia Toledo de Oliveira, pela orientação, e acima de tudo pela amizade, pelo carinho maternal, pela confiança incondicional e pelos ensinamentos durante esses anos.

Aos professores Marcelo Rocha da Costa, Sérgio da Matta, Célia Luces Lúcia Ferreira e Reggiane Villela pela colaboração.

Ao técnico José Geraldo, pela amizade, carinho, pela ajuda durante toda fase experimental e pela dedicação nas análises bioquímicas.

À Prof^a. Virgínia Pizziolo, pela co-orientação e atenção.

Ao Prof. Marcelo Rocha da Costa pela colaboração.

Ao secretário Eduardo, pela competência, amizade e alegria.

Aos amigos do Laboratório Biofármacos, Wander, Mateus, Ana Luisa, Thaís, Dalila, Cíntia e Fábio, pela colaboração, dedicação, esforço, e acima de tudo pela amizade que construímos.

Às minhas amigas Grazielle e Mônica, pelas horas de estudos, risadas, e incentivo nesses quatro anos de convivência.

A toda minha família e amigos que, de alguma forma, colaboraram para o sucesso deste trabalho.

BIOGRAFIA

GEISLA TELES VIEIRA, filha de Maria Diones Ferreira Vieira e Wilson Teles Vieira, nasceu em 06 de junho de 1980, na cidade de João Monlevade, Minas Gerais.

Em 1999 concluiu o curso Técnico em Química, João Monlevade, MG.

Em agosto de 2001, ingressou na Universidade Federal de Ouro Preto, diplomando-se em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas em julho de 2005.

Em agosto de 2005, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, MG.

Em fevereiro de 2008, diplomou-se em Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

Durante os anos de 2009 a 2013 atuou como docente na Universidade do Estado de Minas Gerais, campi João Monlevade, lecionando disciplinas da graduação e pós-graduação.

Em agosto de 2011, ingressou no Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada da Universidade Federal de Viçosa, em nível de doutorado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	03
2.1 Feridas.....	03
2.1.1 Queimaduras.....	05
2.2 Cicatrização.....	09
2.2.1 Fase inflamatória.....	10
2.2.2 Fase Proliferativa.....	14
2.2.2.1 Fibroplasia.....	14
2.2.2.2 Angiogênese.....	17
2.2.2.3 Reepitalização.....	18
2.2.2.4 Contração da ferida.....	20
2.2.3 Fase de maturação ou remodelação.....	22
2.3 Fatores que influenciam na reparação de feridas.....	23
2.4 Tratamento de feridas.....	25
2.5 Plantas medicinais e cicatrização.....	26
2.6 Inga subnuda.....	32
2.7 Pseudopiptadenia contorta.....	36
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Material botânico.....	39
4.2 Preparo do extrato vegetal.....	40
4.3 Preparo do creme tópico.....	41
4.4 Prospecção fitoquímica.....	41
4.5 Determinação da atividade antioxidante.....	42
4.6 Animais.....	43
4.7 Indução das feridas.....	44
4.8 Organização dos grupos experimentais.....	45
4.9 Avaliação das feridas.....	47

4.10 Dosagem dos parâmetros sanguíneos.....	47
4.11 Análise esterológica.....	47
4.12 Análise estatística.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1. Prospeção fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos da casca de Inga subnuda e Pseudopiptadenia contorta.....	49
5.2 Determinação da atividade antioxidante	51
5.3 Análise dos resultados de feridas e queimaduras tratadas com extrato de Inga subnuda.....	53
5.3.1 Parâmetros hematológicos.....	53
5.3.2 Parâmetros bioquímicos.....	55
5.3.3 Avaliação clínica dos animais e feridas.....	63
5.4 Análise dos resultados de feridas e queimaduras tratadas com extrato de Pseudopiptadenia contorta.....	77
5.4.1 Parâmetros hematológicos.....	77
5.4.2 Parâmetros bioquímicos.....	78
5.4.3 Avaliação clínica dos animais e feridas.....	86
6. CONCLUSÕES.....	101
7. BIBLIOGRAFIA.....	103
ANEXO A.....	123

LISTA DE FIGURAS

	Página
01: Classificação de queimaduras de acordo com a profundidade.....	06
02: Desenho esquemático da utilização do bisturi elétrico.....	08
03: Visão geral da resposta imune na fase inflamatória da cicatrização.....	12
04: Desenho esquemático de ferida cutânea após três dias de injúria: fase minflamatória da cicatrização.....	13
05: Fase Proliferativa da cicatrização.....	17
06: Esquema ilustrativo da investigação de plantas medicinais na cicatrização de feridas.....	28
07: Estrutura de taninos hidrolisáveis.....	29
08: Estrutura química de taninos condensados	29
09: Estrutura química de flavonóide.....	31
10: Inga subnuda subsp. subnuda Salzm. ex. Benth., a. Ramo com botões florais; b. Botões florais em diversos estádios de desenvolvimento; c. Corte longitudinal da flor completa; d. Ramo com flor e fruto maduro.....	34
11: Detalhes da morfologia de Inga subnuda subsp. subnuda Salzm. ex. Benth A. Ramo jovem com lenticelas; B. Detalhe da folha mostrando uma pequena ala apenas abaixo de cada par de folíolos; C. Nectário em vista frontal; D, E, F. Flores em antese; G. Botão floral com cálice aberto e flor em antese; H, I. Fruto maduro; J. Semente madura.....	35
12: Pseudopiptadenia contorta (q-r, t Lima 379; s Lopes 37) – q. folha; r. nectário peciolar; s. detalhe da inflorescência; t. fruto.....	37
13: Folha e fruto de Inga subnuda (ingá).....	39
14: Fruto, flor e casca de Pseudopiptadenia contorta (angico).....	39
15: Cascas de Inga subnuda (ingá) e Pseudopiptadenia contorta (angico) em pedaços e moídas.....	40

16:	Etapas do preparo dos extratos hidroalcoólicos de ingá e angico.....	40
17:	Cremes tópicos produzido a partir dos extratos hidroalcoólicos das cascas de Inga subnuda (ingá) e Pseudopiptadenia contorta (angico).....	41
18:	Coelhos da raça Albino Nova Zelândia.....	44
19:	Procedimento de indução de ferida por lâmina de bisturi e bisturi elétrico.....	45
20:	Representação fotográfica da evolução da contração das feridas controles e experimental. Grupo tratado com solução salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar® (GFIT). F1 = ferida; F2 = queimadura.....	68
21:	Fotomicrografia de cortes transversais do tecido cicatricial da pele de coelhos no 14º dia de tratamento. As setas indicam a presença de vasos (v), tecido de granulação (tg), células inflamatórias (ci) e fibroblastos (fb). (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de ingá 1%, (C) tratado com extrato de ingá 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 200X.....	71
22:	Fotomicrografia obtida sob microscopia de polarização que mostra a distribuição das fibras de colágeno no tecido cicatricial da pele de coelhos após quatorze dias de tratamento. (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de ingá 1%, tratado com extrato de ingá 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Picrosirius. Aumento: 200X.....	71
23:	Fotomicrografia de cortes transversais do tecido cicatricial de queimadura coelhos no 14º dia de tratamento. As setas indicam a presença de vasos (v), tecido de granulação (tg), células inflamatórias (ci) e fibroblastos (fb). (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de ingá 1%, (C) tratado com extrato de ingá 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 200X.....	76
24:	Fotomicrografia obtida sob microscopia de polarização com distribuição das fibras de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde) de queimaduras em coelhos após quatorze dias de tratamento. (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de ingá 1%, tratado com extrato de ingá 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Picrosirius. Aumento: 200X.....	76
25:	Aspectos macroscópicos das lesões. Grupo tratado com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar® (GFIT). F1 = ferida; F2 = queimadura.....	90

- 26:** Fotomicrografia de cortes transversais do tecido cicatricial de ferida em coelhos no 14º dia de tratamento. As setas indicam a presença de vasos (v), tecido de granulação (tg), células inflamatórias (ci) e fibroblastos (fb). (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de angico 1%, (C) tratado com extrato de angico 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 200X.....93
- 27:** Fotomicrografia obtida sob microscopia de polarização com distribuição das fibras de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde) de feridas em coelhos após quatorze dias de tratamento. (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de angico 1%, tratado com extrato de angico 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Picrosirius. Aumento: 200X.....93
- 28:** Fotomicrografia de cortes transversais do tecido cicatricial de queimadura em coelhos no 14º dia de tratamento. As setas indicam a presença de vasos (v), tecido de granulação (tg), células inflamatórias (ci) e fibroblastos (fb). (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de angico 1%, (C) tratado com extrato de angico 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 200X.....100
- 29:** Fotomicrografia obtida sob microscopia de polarização com distribuição das fibras de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde) de queimaduras em coelhos após quatorze dias de tratamento. (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de angico 1%, tratado com extrato de angico 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Picrosirius. Aumento: 200X.....100

LISTA DE TABELAS

Página

01:	Formulação de creme segundo a Farmacopeia Brasileira IV Edição (1988).....	41
02:	Grupos de coelhos utilizados na avaliação da atividade cicatrizante.....	46
03:	Grupos de coelhos utilizados na avaliação da atividade cicatrizante tratados com solução salina, creme dos extratos hidroalcoólicos de ingá (EHI) 1% e 5% e, Fitoscar [®]	46
04:	Grupos de coelhos utilizados na avaliação da atividade cicatrizante tratados com solução salina, creme dos extratos hidroalcoólicos de angico (EHA) 1% e 5% e, Fitoscar [®]	46
05:	Prospecção fitoquímica dos extratos hidroalcoólico de I. subnuda e Pseudopiptadenia contorta.....	49
06:	Valores de absorbância e porcentagem de atividade antioxidante do controle positivo Gingko biloba e, dos extratos de Pseudopiptadenia contorta e Inga subnuda na concentração de 5 µm/mL em diferentes tempos de observação.....	52
07:	Valores hematológicos de referência para coelhos machos adultos, encontrados na literatura.....	53
08:	Média dos valores hematológicos dos diferentes grupos experimentais aos 14 dias após a realização das feridas nos animais.....	54
09:	Valores médios de proteínas totais e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de ingá 1% (GI1%) e 5% (GI5%) e pomada Fitoscar [®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.....	55
10:	Valores médios de cálcio (Ca) e zinco (Zn) em soro sanguíneo de coelhos tratadas com solução salina (GSS), extrato de ingá 1% (GI1%) e 5% (GI5%) e pomada Fitoscar [®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.....	56
11:	Valores médios de cobre (Cu) e fósforo (P) e m soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de ingá 1%(GI1%) e 5% (GI5%) e pomada Fitoscar [®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.....	58

- 12:** Valores médios de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transpeptidase (γ -GT) em soro sanguíneo de coelho e feridas tratadas com solução salina (GSS), extrato de ingá 1% (GI1%) e 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.....59
- 13:** Valores médios de bilirrubina total e fosfatase alcalina em soro sanguíneo de coelhos tratados com solu salina (GSS), extrato de ingá 1% (GI1%) e 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.....61
- 14:** Valores médios de glicose, triacilglicerol e colesterol total em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de ingá 1% (GI1%) e 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.....62
- 15:** Percentual médio de contração em relação ao tamanho das feridas dos grupos tratados com sol salina (GSS), extrato de Ingá 1%(GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) no 7 °, 10 ° e 14 ° dia pós-operatório.....64
- 16:** Percentual médio de contração da ferida em relação a intervalos de tempo e a taxa de contração diária (IC/Dia) dos grupos tratados com solução salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) no 7°, 10° e 14° dia pós-operatório.....65
- 17:** Resultados estereológicos de densidade volumétrica (Vv) de vasos sanguíneos, fibroblastos, células inflamatória (ci) e índice de maturação do colágeno (IMaC) para feridas em coelhos tratados com sol. salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento.....68
- 18:** Percentual médio de contração em relação ao tamanho original das queimaduras dos grupos tratados com solução salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) no 7 °, 10 ° e 14 ° dia pós-operatório.....72
- 19:** Percentual médio de contração da queimadura em relação a intervalos de tempo e a taxa de contração diária (IC/Dia) dos grupos tratados com sol. Salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) no 7°, 10° e 14° dia pós-operatório.....73
- 20:** Resultados estereológicos de densidade volumétrica (Vv) para vasos, fibroblastos, células inflamatória (ci) e índice de maturação do colágeno (IMaC) para queimaduras em coelhos tratados com solução salina (GSS) extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento.....75
- 21:** Valores hematológicos de referência para coelhos machos adultos, encontrados na literatura.....77

22:	Média dos valores hematológicos grupos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e Fitoscar [®] (GFIT) aos 14 dias de tratamento.....	77
23:	Valores médios de proteínas e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e pomada Fitoscar [®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.....	79
24:	Valores médios de cálcio e zinco em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e pomada Fitoscar [®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.....	80
25:	Valores médios de cobre e fósforo em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e pomada Fitoscar [®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.....	81
26:	Valores médios de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transpeptidase (γ - GT) em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e pomada Fitoscar [®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.....	82
27:	Valores médios de bilirrubina total e fosfatase alcalina em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e pomada Fitoscar [®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.....	83
28:	Valores médios de glicose, triacilglicerol e colesterol em soro sanguíneo de coelhos e feridas tratadas com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e pomada Fitoscar [®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.....	84
29:	Percentual médio de contração em relação ao tamanho original das feridas dos grupos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar [®] (GFIT) no 7º, 10º e 14º dia pós-operatório.....	87
30:	Percentual médio de contração da ferida em relação a intervalos de tempo e a respectiva taxa de contração diária (IC/Dia) dos grupos tratados com solução salina, extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar [®] (GFIT).....	88
31:	Resultados estereológicos de densidade volumétrica (Vv) para vasos, fibroblastos, células inflamatória (ci) e índice de maturação do colágeno (IMaC) para feridas em coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar [®] (GFIT) após 14 dias de tratamento.....	91

- 32:** Percentual médio de contração em relação ao tamanho original das queimaduras dos grupos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) nos 7º, 10º e 14º dia pós-operatório.....94
- 33:** Percentual médio de contração da queimadura em relação a intervalos de tempo e a respectiva taxa de contração diária (IC/Dia) dos grupos tratados com solução salina, extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT).....95
- 34:** Resultados estereológicos de densidade volumétrica (Vv) para vasos, fibroblastos, células inflamatória (ci) e índice de maturação do colágeno (IMaC) para queimaduras em coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento.....98

RESUMO

VIEIRA, Geisla Teles, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Avaliação do efeito cicatrizante de *Inga subnuda* e *Pseudopiptadenia contorta* em feridas cirúrgicas em coelhos.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Coorientadora: Virgínia Ramos Pizziolo.

Cicatrização de ferida é um processo sistêmico e dinâmico que envolve as etapas de inflamação, proliferação e remodelação e, tem por objetivo restaurar a continuidade do tecido. Embora a reparação tecidual seja um processo sistêmico, é necessário favorecer condições locais por meio de terapia tópica adequada para viabilizar o processo fisiológico. Na medicina popular, tinturas das cascas das espécies arbóreas de *Inga subnuda* (ingá) e *Pseudopiptadenia contorta* (angico) são utilizadas no tratamento de feridas cutâneas. Tendo em vista esse uso popular, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito destas plantas na cicatrização de feridas cirúrgicas induzidas em coelhos. Foram preparados extratos hidroalcoólicos das cascas de ingá e angico por maceração, e realizadas análises de prospecção fitoquímica e atividade antioxidante pelo método de DPPH. Preparados, os extratos de ingá e angico foram adicionados a Creme Lanette 24% até atingir as concentrações de 1% e 5%. Foram utilizados 36 coelhos machos, da raça Albino Nova Zelândia, 60 dias de vida e peso médio de 2,8 Kg (CEUA/UFV, nº064/2012). Duas feridas cirúrgicas de dimensão 1,5 x 1,5 cm foram produzidas na região dorsal-torácica dos animais e tratadas durante 14 dias. A primeira foi confeccionada com lâmina de bisturi e denominada Ferida e a segunda com bisturi elétrico, denominada Queimadura. Os animais, divididos em grupos de seis animais, foram tratados com solução salina; extrato de ingá 1%; extrato de ingá 5%, extrato de angico 1%; extrato de angico 5% e pomada Fitoscar®. Índice de contração da ferida (IC) foi medido no 7º, 10 e 14º dia pós-operatório. Após o 14º dia de tratamento os animais foram eutanasiados e amostras de sangue coletadas para análise bioquímica e hematológica. Em seguida, amostras das feridas e queimaduras foram extraídas cirurgicamente, processadas rotineiramente e coradas com hematoxilina-eosina e picrossirrius. O parâmetro estereológico de densidade volumétrica foi calculado para contagem de fibroblasto, vaso sanguíneo, células inflamatórias, e índice de maturação do colágeno (IMaC). Os resultados foram analisados pela ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Resultados da prospecção fitoquímica e de DPPH mostram presença de flavonoides, taninos e saponinas, e, atividade antioxidante dos extratos de ingá e angico. Os resultados hematológicos e bioquímicos mostram que os animais tratados com os

extratos vegetais não apresentaram infecção sistêmica e nem alterações hepáticas e renais. Os parâmetros estereológicos indicam que os extratos de ingá e angico contribuíram para a promoção da fibroplasia, angiogênese e maturação do colágeno nas feridas cirúrgicas. Pelo índice de contração, conclui-se que os extratos de ingá e angico apresentaram efeito cicatrizante tanto na ferida quanto na queimadura, sendo mais efetivos na fase proliferativa. Este estudo forneceu evidências do efeito cicatrizante dos extratos de ingá e angico e do potencial uso como medicamento fitoterápico. Porém, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação destes extratos no processo terapêutico.

ABSTRACT

VIEIRA, Geisla Teles, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Evaluation of the healing effect of *Inga subnuda* and *Pseudopiptadenia contorta* in surgical wounds in rabbits.** Adviser: Tânia de Oliveira Toledo. Co-adviser: Virgínia Ramos Pizzio.

Wound-healing is a systemic and dynamic process involving the steps of inflammation, proliferation and remodeling, and aims to restore the continuity of the tissue. Although the tissue repair is a systemic process, it is necessary to offer local conditions by appropriate topical therapy to enable the physiological process. Traditionally, bark extract of *Inga subnuda* (inga) and *Pseudopiptadenia contorta* (angico) has been used on the treatment of skin wounds. The objective of this study was to investigate the healing effect of the extract inga and angico on the surgical wounds induced in rabbits. Barks extract of inga and angico was extracted by maceration, and they were carried out analysis of phytochemical prospecting and antioxidant activity by DPPH method. Thirty-six male rabbits, type Albino New Zealand, 60 days, weighing 2,8Kg, from the Federal University of Viçosa were used (CEUA/UFVn°064/2012). Two surgical wounds of 1.5 x 1.5 cm were made in the dorsal thoracic region. The first wound was made by removing the skin with a scalpel blade, called Wound, and the second wound with an electric scalpel, called Burn. Animals were treated for 14 days. The animals were randomized in groups of six rabbits and were treated with saline solution; extract of inga 1%; extract of inga 5%, extract of angico 1%; extract of angico 5% and Fitoscar[®] ointment. Wound contraction index (WCI) was measured on the 7th, 10th and 14th post-wounding. After 14 days of treatment the animals were euthanized and blood samples collected for biochemical and hematological analysis. Samples of wounds and burns were taken, processed routinely, and stained with hematoxylin-eosin and picrosirius. The stereological parameters of bulk density was calculated by counting of fibroblasts, blood vessels and inflammatory cells and collagen maturation index. The results were analyzed by ANOVA and by Tukey test. The results of phytochemical prospecting and DPPH show the presence of flavonoids, tannins, saponins and antioxidant activity. The hematological and biochemical results show that animals treated with plant extracts showed no systemic infection or hepatic and renal disorders. The stereological parameters indicate that inga and angico extracts contributed to promoting fibroplasia, angiogenesis and maturation of collagen in surgical wounds. by contraction index, it is concluded that inga and angico extracts has healing activity

on the wound and burn, significantly accelerating healing in the proliferative phase. This study provided evidence of the healing effect of the extracts inga and angico and potential use as herbal medicine, but more studies are needed to elucidate the mechanism of action of these extracts in the therapeutic process.

1. INTRODUÇÃO

Ferida cutânea ainda é um problema de saúde humana e animal devido à sua complexidade de tratamento e complicações recorrentes, gerando custos elevados.

Dentre outros fatores, o custo do tratamento de feridas relaciona-se ao seu modo de evolução. Feridas agudas correspondem às traumáticas ou cirúrgicas, que evoluem no processo cicatricial de maneira e em tempo previsíveis, a partir do momento da injúria até o fechamento (BRODERICK, 2009). Essas feridas concorrem para a maioria das lesões da pele. Em todo o mundo, existem mais que 110 milhões de incisões cirúrgicas por ano. Feridas traumáticas ocorrem a uma taxa de 1,6 milhão de casos por ano (McDERMOTT-SCALES et al., 2009). Acrescentam-se ainda, nessa classificação, as queimaduras. Essas feridas, quando não requerem internamento, são tratadas em domicílio, unidades de saúde ou em ambulatório. Dessa forma, um grande número desses casos nunca entra nas estatísticas do sistema de saúde. Estima-se que, aproximadamente, 3,4 milhões de pacientes pertençam a essa categoria (BRODERICK, 2009).

Dentre as feridas crônicas, estima-se que em todo o mundo, 8,5 milhões de pessoas sofram de úlceras de pressão, 12,5 milhões de úlceras venosas e 13,5 milhões de úlceras diabéticas (LAWALL, 2012). Os gastos no tratamento de feridas, só nos Estados Unidos foram de US\$1 bilhão para o tratamento de úlceras crônicas por insuficiência venosa (McDERMOTT-SCALES et al., 2009).

A cura de feridas agudas é um processo complexo e dinâmico, que envolve a participação de mediadores solúveis, células sanguíneas, matriz extracelular e células do parênquima. Os eventos que desencadeiam a dinâmica da cicatrização são descritos em três fases fundamentais que se sobrepõem: inflamatória, proliferativa e de remodelação colágena (ACKERMAN, 2007). Com exceção da queimadura, que são feridas complicadas e tendem a cicatrizar mais lentamente, as feridas agudas são mais rápidas para cicatrizarem. Entretanto, no Brasil, as feridas constituem um sério problema de saúde pública, devido ao grande número de pacientes com alterações na integridade da pele.

Existem no mercado aproximadamente 2.500 produtos destinados ao tratamento de ferimentos agudos e crônicos, podendo incluir desde antissepsia, simples cobertura, ou interferir de forma ativa nas diversas fases do processo cicatricial (CUZZELL & KRASNER, 2003). Muitas vezes uma combinação de todas estas modalidades, permite

uma maior otimização da cicatrização. Dentre os principais métodos auxiliares envolvidos na modulação do processo destacam-se a utilização de fitoterápicos, curativos poliméricos, fatores de crescimento, bioengenharia tecidual e medicina regenerativa envolvendo utilização de células-tronco adultas (McFARLIN et al., 2006; BERETTA et al., 2009; LEE et al., 2009; LIMA et al., 2009).

A procura de um recurso químico-medicamentoso ou físico que acelere o fechamento das feridas têm sido alvo de vários estudos (Dos SANTOS et al., 2012; ASADI et al., 2013; BEHEREGARAY et al., 2014). O uso de produtos tradicionais produzidos a partir de plantas medicinais é uma alternativa no processo de cicatrização, bem como para reduzir os encargos financeiros (WU et al., 2012).

Na medicina popular brasileira, tinturas das cascas das árvores de *Inga subnuda* e *Pseudopiptadenia contorta* têm sido utilizadas como cicatrizante. Entretanto, apesar do uso pela população, não se têm relatos científicos que comprovem a ação terapêutica ou toxicidade do uso das cascas destas plantas no processo de cicatrização, o que torna necessária uma investigação.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo investigar o potencial uso cicatrizante de *Inga subnuda* e *Pseudopiptadenia contorta* por meio de: preparação de extrato vegetal; formulação de cremes em diferentes concentrações a partir dos extratos vegetais; testes farmacológicos in vivo com indução experimental de feridas e queimaduras cirúrgicas em coelhos; análise de parâmetros hematológicos e bioquímicos; avaliação do índice de contração das feridas e análise histológicas do tecido cicatricial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Feridas

Ferida denomina-se como toda e qualquer ruptura da continuidade do tecido, não apenas da pele, mas também dos tecidos subcutâneos, músculos e ossos decorrente da lesão por agentes mecânicos, térmicos, químicos e bacterianos (COLTRO et al., 2011). As feridas são classificadas quanto à causa, ao conteúdo microbiano, ao tipo de cicatrização, ao grau de abertura e ao tempo de duração. As classificações das feridas são úteis para determinar qual melhor tratamento para um dado ferimento (PAVLETIC, 2010).

Quanto à causa, as feridas podem ser cirúrgicas, traumáticas ou ulcerativas. As feridas cirúrgicas são provocadas intencionalmente mediante: a) incisão: quando não há perda de tecido e as bordas são geralmente fechadas por sutura; b) excisão: quando há remoção de uma área da pele, e; c) punção: quando resultam de procedimentos terapêuticos diagnósticos (por exemplo, cateterismo cardíaco, biópsia, entre outros). As feridas cirúrgicas são realizadas em ambiente controlado e estéril, com instrumentos cortantes, como por exemplo: lâmina de bisturi, tesoura, punch, agulhas e bisturi elétrico (MANTOVANI & FONTELLES, 2003).

As feridas traumáticas podem ser provocadas acidentalmente por agentes: a) mecânico: contenção, perfuração ou corte; b) químico: iodo, cosméticos, ácido sulfúrico; c) físico: frio, calor ou radiação (MANTOVANI & FONTELLES, 2003). As feridas ulcerativas são feridas escavadas, circunscritas na pele (formadas por necrose, sequestração do tecido), resultantes de traumatismo ou doenças relacionadas com o impedimento do suprimento sanguíneo. As úlceras de pele representam uma categoria de feridas que incluem úlceras por pressão, de estase venosa, arteriais e diabéticas (SANTOS, 2011).

Quanto ao conteúdo microbiano, as feridas podem ser: Limpas, Limpas contaminadas (ou Potencialmente contaminadas), Contaminadas ou Infectadas (MANTOVANI & FONTELLES, 2003). As feridas limpas são lesões que ocorrem em condições assépticas, em cirurgias eletivas, em sítios cirúrgicos onde não é encontrada inflamação e microrganismos. As feridas limpas contaminadas são aquelas com evolução inferior a 6 horas entre o trauma e o atendimento, sem contaminação significativa (SANTOS, 2011). As feridas contaminadas são aquelas com mais de 6

horas de evolução entre o trauma e o atendimento, onde a lesão não apresenta sinais de infecção (MANTOVANI & FONTELLES, 2003). As feridas infectadas apresentam presença de agente infeccioso no local com evidência de intensa reação inflamatória (dor, rubor, calor e edema), destruição de tecidos, podendo conter secreção purulenta (SANTOS, 2011).

Quanto ao tipo de cicatrização, as feridas podem ser de Primeira Intenção, Segunda Intenção ou Terceira Intenção, correspondentes aos tipos de fechamento da ferida que são divididos em reparo primário, secundário e terciário (MENEZHIN & VATTIMO, 2003, ETHRIDGE et al., 2010; SANTOS, 2011;). A cicatrização por primeira intenção ocorre quando há aproximação direta das bordas das feridas, com pouca ou mínima perda de tecido, em geral feridas fechadas cirurgicamente com antissepsia e sutura das bordas. Cicatrização por segunda intenção são aquelas em que há perda de tecidos e as bordas da pele ficam distantes, sendo o processo de cicatrização mais lento, quando comparado com a de primeira intenção. Em geral, este tipo de reparo está associado à ferida altamente contaminada, que irá fechar por epitelização, se for mais superficial ou por formação de cicatriz, o que resultará, antes, em contração (ETHRIDGE et al., 2010). Feridas de terceira intenção são aquelas corrigidas cirurgicamente após a formação de tecido de granulação, ou para controle da infecção, a fim de que apresentem melhores resultados funcionais e estéticos (SANTOS, 2011).

Quanto ao grau de abertura, as feridas podem ser Abertas ou Fechadas. As feridas são Abertas quando as bordas da pele estão afastadas, já Fechadas são quando as bordas da pele estão justapostas (SANTOS, 2011).

Quanto ao tempo de duração, as feridas podem ser Agudas ou Crônicas. As Agudas são originadas por cirurgias ou traumas, em que a reparação ocorre em tempo adequado, sem complicações. As feridas agudas evoluem em um processo reparador ordenado e cronológico para atingir restauração permanente da estrutura e da função. As feridas crônicas são aquelas em que o tempo de cicatrização é maior que o esperado devido a sua etiologia. São feridas que não apresentam a fase de regeneração em tempo esperado, havendo um retardo na sua cicatrização, sendo sua ocorrência mais frequente em indivíduos com problemas sistêmicos (ETHRIDGE et al., 2010). Além de feridas Abertas e Fechadas, consideram-se também a classificação de Feridas Complexas. Estas correspondem a lesões que acometem extensas áreas que necessitam de métodos especiais para a sua resolução, que têm seu processo de evolução imprevisível ou que representa ameaça à viabilidade de um membro ou à própria vida (FERREIRA &

CARVALHO, 2007). Os grupos de feridas complexas mais conhecidas são: úlceras neuropáticas (em pé diabético e Hanseníase), úlceras por pressão, úlceras venosas, úlceras arteriais e as queimaduras.

2.1.1 Queimaduras

Queimaduras são lesões dos tecidos orgânicos em decorrência de trauma de origem térmica resultante da exposição ou contato com chamas, líquidos quentes, superfícies quentes, eletricidade, frio, substâncias químicas, radiação, atrito ou fricção (ARTZ et al., 1979; GOMES et al., 1995). Na queimadura ocorre a destruição da barreira epitelial e da microbiota resistente da pele, rompendo seu efeito protetor (BARBOSA et al., 2007).

São classificadas de acordo com a profundidade da destruição tecidual como lesões de espessura parcial superficial (antes referido como primeiro grau), espessura parcial profunda (referidas como segundo grau) ou lesões de espessura plena (referidas como terceiro grau) (LINDE, 2002). As queimaduras superficiais afetam apenas a epiderme, apresentando-se hiperemiadas, edematosas e dolorosas, resolvendo-se dentro 5 a 7 dias. As queimaduras de espessura parcial podem ser superficiais ou profundas. As superficiais cicatrizam em 14 a 21 dias, acometem a derme e sua camada superior (derme papilar) apresentando bolhas, umidade e dor acentuada, deixando mínimo tecido cicatricial. As queimaduras profundas de espessura parcial acometem quase toda a espessura da derme, apresentando coloração pálida e menos dor. O tempo necessário para cicatrização pode ser de três a seis semanas ou mais, e tais queimaduras deixarão um tecido cicatricial que pode hipertrofiar e contrair. Nas queimaduras de espessura total, a lesão acomete toda a espessura da pele e, em alguns casos, se estende ao tecido subcutâneo, músculo e osso. São de aspecto esbranquiçado e rígido e, por não haver elementos dérmicos para regeneração, só cicatrizam com enxerto (LINDE, 2002; JHONSON, 2003) (Figura 01).

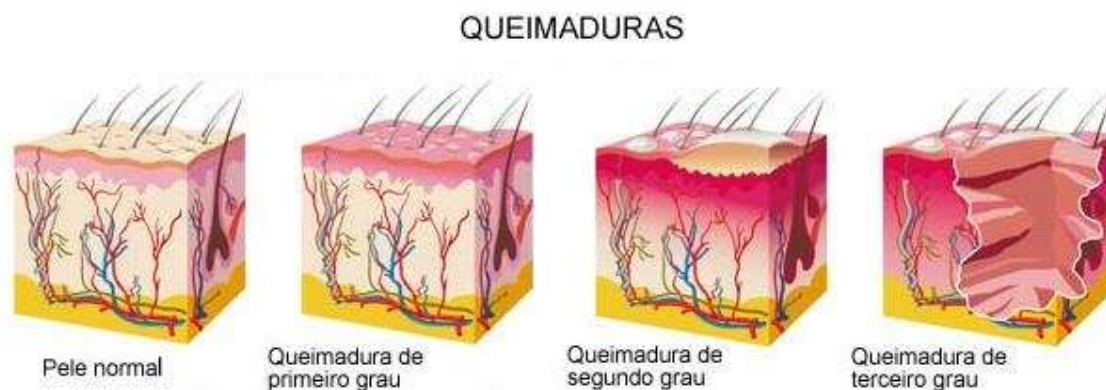


Figura 01: Classificação de queimaduras de acordo com a profundidade

As lesões por queimadura representam um importante problema de saúde em termos de tratamento e cuidados com os sobreviventes e, o traumatismo ocasionado por estas injúrias representa um gasto dispendioso para os cofres públicos. Estima-se que no Brasil ocorrem em torno de um milhão de acidentes por queimaduras ao ano, sendo que 100.000 pacientes procuram atendimento hospitalar e, destes, cerca de 2.500 pacientes falecem direta ou indiretamente de suas lesões (GOMES, 2006). Globalmente, em 2004, a incidência de queimaduras graves, o suficiente para exigir atenção médica, foi de 11 milhões de pessoas e ficou em quarto lugar entre todos os traumas (atrás apenas dos acidentes automobilísticos, quedas e violência interpessoal); maior do que a combinação da incidência de infecções por tuberculose e HIV e ligeiramente menor do que a incidência de todas as neoplasias malignas (PECK, 2011). Felizmente, apesar de causarem mais de 300.000 mortes/ano em todo o mundo (MOCK et al., 2008), a grande maioria das queimaduras não são fatais. Entretanto, estão entre as principais causas de sequelas em países pobres e em desenvolvimento.

As queimaduras comprometem a integridade funcional da pele, quebrando a homeostase hidroeletrolítica e alterando o controle da temperatura interna, flexibilidade e lubrificação da superfície corporal (SHERIDAN, 2003). O comprometimento da pele ocorre em virtude da extensão e profundidade das lesões. MÉLEGA (2002) relata a participação de dois eventos fisiopatológicos nas queimaduras: o aumento da permeabilidade e, conseqüentemente, o edema.

Com o trauma térmico, há exposição do colágeno e, conseqüente ativação e liberação de histamina pelos mastócitos. A histamina leva ao aumento da permeabilidade capilar que, por sua vez, permite a passagem do infiltrado plasmático

para o interstício dos tecidos afetados, provocando edema tecidual e hipovolemia. A ativação do sistema caliceína produz cininas que colaboram, ainda mais, para o aumento da permeabilidade capilar, agravando o edema e a hipovolemia. As cininas e a exposição do colágeno ativam o sistema fosfolipase ácido araquidônico, originando prostaglandinas, mais especificamente a prostaglandina E2 (PGE2), potencializando a vasodilatação e causando dor. Outra via ativada é a fosfolipase com liberação de tromboxano (TXA), que junto com a plasmina e trombina circulantes, provoca tampão nas paredes capilares, ocasionando um aumento na pressão hidrostática de até 250%, contribuindo para o edema tecidual (MÉLEGA, 2002).

As queimaduras são consideradas lesões altamente agressivas, por causar alterações não só físicas como também psicológicas. O indivíduo é afetado por distúrbios físicos como alterações metabólicas, perda de volume de líquidos, risco para infecção, dor, além dos estressores psicológicos como separação da família, deformidades corporais, e submissão de cuidados (SANTOS et al., 2009)

O tratamento tópico ideal para o tratamento local da lesão por queimadura seria aquele que, ao mesmo tempo, controla o crescimento bacteriano, remove o tecido desvitalizado e estimula o crescimento dos queratinócitos. Até agora, estas três funções não se encontram em um mesmo tópico, portanto não existe um tópico ideal (BOLGIANI & SERRA, 2010). O tratamento local das queimaduras é dinâmico, complexo e dependente tanto da resolução da inflamação quanto da promoção da cicatrização; necessitando de curativos que atuem diretamente neste binômio (FRANCO & GONÇALVES, 2008; BOLGIANI & SERRA, 2010). Apesar dos avanços da medicina no tratamento das queimaduras com o uso de enxertia e novas técnicas de curativos, as taxas de mortalidade ainda são grandes devido às complicações como infecções, sepse e desnutrição (STANLEY & RICHARD, 2004). No entanto, outros autores afirmam que, apesar dos avanços em vigência, a eficácia dos diversos tratamentos continua a ser insatisfatória (HERSON et al., 2009).

Trabalhos na literatura utilizam diferentes métodos para induzir queimadura experimental. Para este propósito são utilizados laser de CO₂ (MELO et al., 2014; ALIASL et al., 2015), água escaldante (LYRA et al., 2012), chapa de alumínio (FREITAS et al., 2013; MEHRABANI et al., 2015), HCl (SENTHIL, 2011), ácido sulfúrico (KAMESHWARAN et al., 2014) e bisturi elétrico (GARCIA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013).

O bisturi elétrico é uma máquina especializada no corte de tecidos orgânicos, que se dá através da utilização de corrente elétrica de alta frequência. Mais precisamente, o bisturi elétrico é um gerador de corrente de alta frequência que produz calor em contato com os tecidos. Essa corrente aquece a ponta metálica do eletrodo positivo e passa através do corpo do paciente, que está situado entre dois eletrodos: a ponta do bisturi e a placa dispersiva. Após atravessar o corpo, sai pela placa dispersiva, que está ligada ao fio neutro, pela qual será eliminada. Se o contato entre o corpo do paciente e a placa dispersiva for regular homogêneo, a corrente que se distribui pela placa será de fraca densidade não causando dano ao paciente. Esse aquecimento gerado pela passagem decorrente elétrica de alta frequência provoca o rompimento das células teciduais e posterior corte do tecido. Com relação às vantagens da utilização de tal tipo de sistema técnico, pode-se considerar o menor extravasamento de sangue proveniente do paciente, pois, ao cortar, o bisturi promove a coagulação dos vasos sanguíneos danificados pelo corte, diminuindo, também, o tempo cirúrgico (Figura 02) (BISINOTTO, 1996).

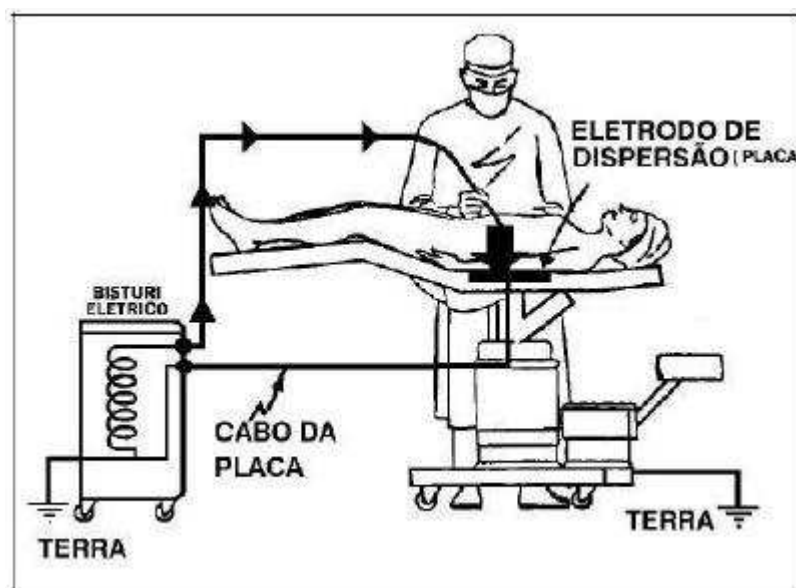


Figura 02: Desenho esquemático da utilização do bisturi elétrico

O corte eletrocirúrgico consiste no aquecimento das células do tecido tão rapidamente que elas explodem pelo vapor produzido internamente. Este processo também é conhecido por vaporização celular. O calor gerado é dissipado pelo vapor não havendo, portanto, condução para as células adjacentes. Quando o eletrodo é deslocado e entra em contato com novas células de tecido, estas explodem produzindo a incisão. A

forma de onda de corte é uma senóide contínua na frequência de trabalho do bisturi (TRINDADE et al., 1998). Estudos testes pré-clínicos de cicatrização utilizando animais como cobaias ainda são escassos na literatura, uma vez que este equipamento é de uso hospitalar e geralmente caros.

2.2 Cicatrização

A cicatrização de ferimentos começa imediatamente após uma lesão ou incisão e corresponde a uma combinação coordenada de eventos celulares e moleculares que interagem para restaurar um tecido ferido (HEDLUND, 2007). A regeneração pode ser definida como a reconstrução de um tecido pelas células que sobreviveram à lesão tecidual (SLATTER, 1998), ou seja, é a restauração da forma e função do tecido. Em contraste, a reparação é a substituição do tecido danificado por outro, ao exemplo do tecido cicatricial, que difere estruturalmente e, portanto, funcionalmente do tecido original (DYSON, 1997).

Uma sequência de eventos acontece após o ferimento, para tanto, diferentes classificações didáticas são utilizadas para facilitar o entendimento. Convenientemente, o processo de cicatrização tem sido dividido em três fases que se sobrepõem de forma contínua e temporal: inflamatória, proliferativa e de remodelagem (CLARK, 1996; PAVLETIC, 2010; SCHREMI et al., 2010). Entretanto, alguns autores consideram mais detalhadamente essas três fases, dividindo-as em cinco estádios principais: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação (MANDELBAUM, DI SANTIS & MANDELBAUM, 2003). As fases da cicatrização são processos entrelaçados e é possível haver um agente terapêutico que acelere uma fase, contudo poderia causar a inibição de outra (FAHIE & SHETTKO, 2007).

A possibilidade de acelerar a cicatrização e o fechamento de lesões cutâneas, por meio de recursos químico-medicamentosos ou físicos, tem sido objeto de investigação de inúmeros pesquisadores (BEHEREGARAY, 2009). A cicatrização dos ferimentos é dinâmica (HEDLUND, 2007) e o tratamento pode necessitar de modificações durante as diferentes fases. O entendimento dos processos de cicatrização é essencial para uma abordagem ponderada ao tratamento das feridas (LIPTAK, 1997; PAVLETIC, 2010).

2.2.1 Fase inflamatória

A fase inflamatória, exsudativa, reativa, defensiva ou inicial da cicatrização começa imediatamente após o início do trauma, ou seja, no momento em que ocorre a lesão tecidual se estendendo por um período de três a seis dias (PAVLETIC, 2010). É a fase de ocorrência dos sinais clínicos da inflamação aguda de calor, rubor, dor e edema. Esta fase tem como característica ativar o sistema de coagulação, promover o desbridamento e defender a ferida contra bactérias.

A lesão tecidual provoca a ruptura dos vasos sanguíneos e o extravasamento dos constituintes sanguíneos. Pela ação de mediadores oriundos da degranulação de mastócitos e pela influência nervosa (descargas adrenérgicas) ocorre vasoconstrição como primeira resposta. Em seguida, ocorre ativação da cascata de coagulação, que faz com que o colágeno exposto faça aderência na superfície interna e externa dos vasos sanguíneos (PEERSCHKE et al., 2008). Ocorre a formação de trombo, que, juntamente com a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea formam o coágulo, que sela os vasos rompidos, impedindo o extravasamento sanguíneo adicional (DYSON, 1997; PEERSCHKE et al., 2008). O coágulo, formado por plaquetas, fibrina, eritrócitos e leucócitos (BEHEREGARAY, 2009), também é responsável por estabilizar as bordas da ferida e fornecer a ela uma resistência mínima (HOSGOOD, 2006).

A adesão inicial das plaquetas na superfície lesada ocorre pela ação de proteínas de adesão presentes nas suas membranas. As principais delas são os receptores da glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). O colágeno subendotelial exposto pela ruptura do vaso e a trombina gerada pelos processos de coagulação são fortes agonistas da ativação e agregação plaquetárias. Além disso, a plaqueta ativada aumenta a ação da protrombinase, que promove maior produção da trombina, a partir da protrombina, criando assim, condições para a amplificação da adesão plaquetária. O ADP (adenosina difosfato) liberado das hemácias e grânulos densos das próprias plaquetas é outro elemento amplificador da agregação das plaquetas. Este induz nelas a exposição do receptor GP IIb/IIIa ao fibrinogênio e fator de Von Willebrand. Contribuindo também para a agregação plaquetária, o ácido araquidônico da membrana das plaquetas em processo de agregação, é convertido em tromboxano A₂ (TxA₂) pelas enzimas ciclooxigenase e tromboxano sintetase. O TxA₂, além de forte agonista da agregação plaquetária, é um potente vasoconstritor e, assim como o ADP, também induz a exposição dos sítios de ligação da GP IIb/IIIa ao fibrinogênio e fator de Von

Willebrand. Outro importante derivado do ácido araquidônico, que é liberado por macrófagos e mastócitos, plaquetas e outras células ativadas, é o fator ativador plaquetário. Este é um ativador importante de plaquetas e indutor da sua agregação. Como agonistas da agregação plaquetária, podem também ser citadas a noradrenalina e a serotonina. Esses mediadores estimulam diferentes cascatas de ativação plaquetária, porém, a via final comum a todos é a ativação do receptor da GP IIb/IIIa que pela interação com o fator de Von Willebrand e o fibrinogênio é o verdadeiro efector da agregação e ativação plaquetárias (BALBINO et al., 2005).

As plaquetas secretam citocinas como o fator de crescimento derivado de plaqueta (platelet-derived growth factor – PDGF), fator de crescimento transformador β (transforming growth factor- β – TGF- β), fator de crescimento transformador α (transforming growth factor- α – TGF- α) os quais promovem a formação tecidual, secretam mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos para o recrutamento de leucócitos. Além disso, a cascata de coagulação gera agentes da cascata do complemento como as anafilatoxinas C3a e C5a, as quais aumentam a permeabilidade vascular e atraem neutrófilos e monócitos para o sítio da ferida (DYSON, 1997; PAVLETIC, 2010).

Os leucócitos passam através da membrana basal dos vasos sanguíneos por diapedese. As células endoteliais apresentam em sua superfície receptora (selectinas) que auxilia na aderência dos neutrófilos ao endotélio enquanto os receptores de integrina na superfície do neutrófilo auxiliam na ligação deste com a matriz extracelular. Neutrófilos e monócitos migram para a ferida na mesma proporção em que são encontrados no sangue, portanto os neutrófilos apresentam maior número devido a sua abundância na circulação (HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010). Os neutrófilos e macrófagos removerão partículas, bactérias e tecido morto da ferida. A ação antimicrobiana dos neutrófilos consiste na produção de radicais livres de oxigênio e, a dos macrófagos, na síntese aumentada de óxido nítrico (NO), que reage com peróxidos, gerando um agente antimicrobiano potente (ISAAC et al., 2010) (Figura 03).

Visão Geral da Inflamação

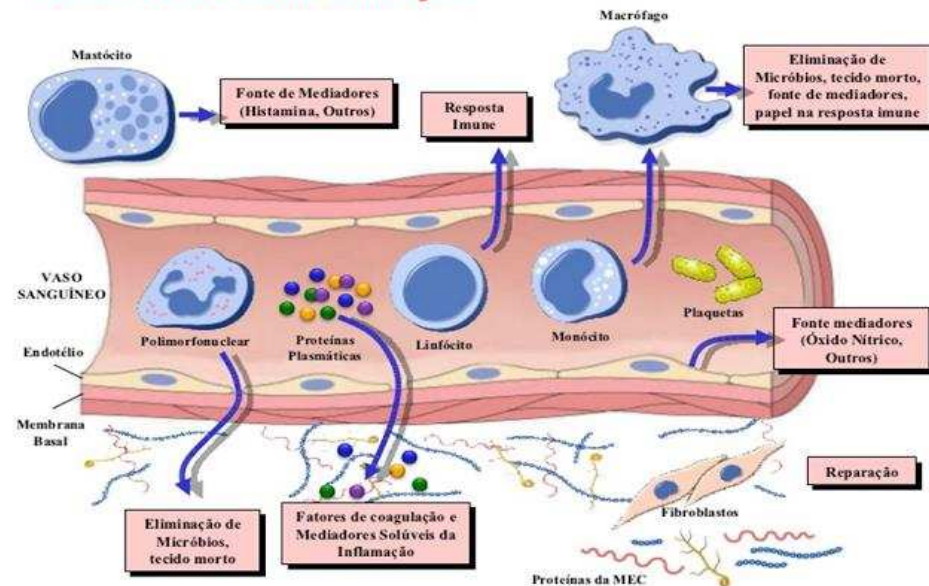


Figura 03: Visão geral da resposta inflamatória da cicatrização.

Os monócitos são essenciais para a cicatrização do ferimento e tem sua migração estimulada por: PDGF, fragmentos de colágeno, elastina, fibronectina, trombina enzimaticamente ativa e TGF- β , tornando-se macrófagos após ativação e penetração na ferida. São importantes fontes de fatores de crescimento e são responsáveis por fagocitar os neutrófilos que entram em morte celular programada (apoptose) durante a cicatrização. Os macrófagos são capazes de sobreviver em um meio anaeróbico, removendo bactérias, contaminantes e restos de tecido por fagocitose.

Os macrófagos são responsáveis pela produção de muitos mediadores que regulam a cicatrização, como fator de crescimento fibroblástico (fibroblast growth factor – FGF), fator de crescimento epidérmico (epidermal growth factor – EGF), fator de crescimento endotelial vascular (Vascular endothelial growth factor VEGF). PDGF, TGF- α , TGF- β , TNF, interleucinas e MMPs e seus inibidores teciduais (TIMPs). Os macrófagos também liberam proteases (colagenase, elastase e ativador de plasminogênio), que facilitam o desbridamento da ferida, e lactato, que estimula a fibroplasia e a produção de colágeno. Cada citosina exerce um papel fundamental e orquestrado no processo de cicatrização. A citosina PDGF promove a quimiotaxia e a proliferação de fibroblasto, VEGF estimula a angiogênese e aumenta a permeabilidade vascular, FGF β e FGF α também estimulam a angiogênese e a proliferação de fibroblasto e a família dos TGF realizam a quimiotaxia de macrófagos, estimulam a motilidade células epidérmicas e síntese da matriz extracelular (Figura 4) (SINGER & CLARK, 1999).

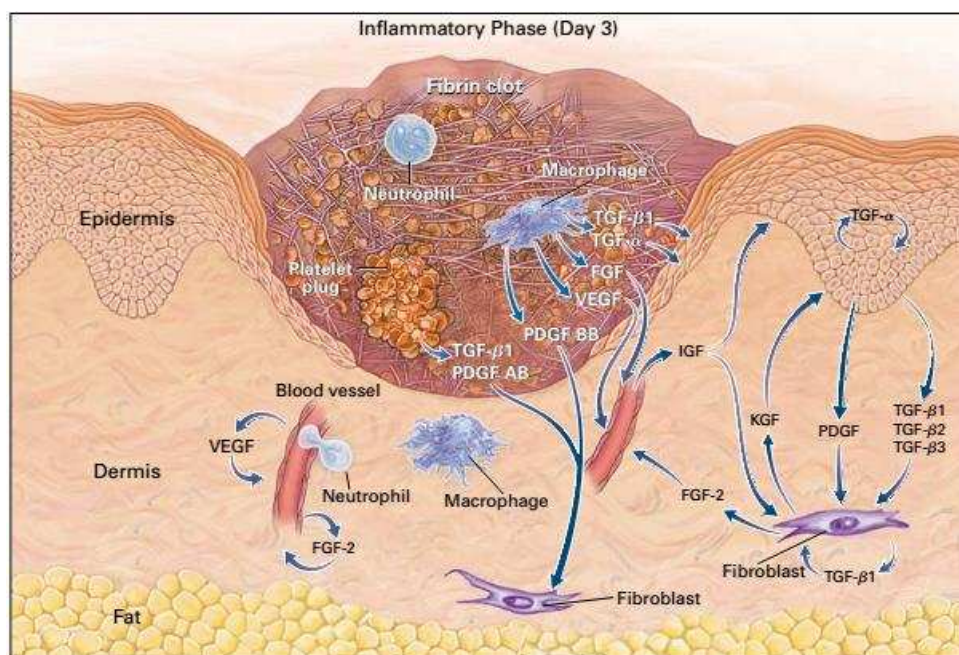


Figura 04: Desenho esquemático de ferida cutânea após três dias de injúria – fase inflamatória da cicatrização. Fonte: SINGER & CLARK, 1999.

Outras citocinas importantes expressas por monócitos e macrófagos são as interleucinas IL-1, que induz a expressão de outros fatores de crescimento, fator de crescimento de queratinócitos (KGF), considerado um potente estimulador mitótico das células epiteliais e tecido de granulação. A participação dos monócitos e macrófagos no processo da inflamação e cicatrização é fundamental. Animais que possuem depleção de macrófagos apresentam defeitos no reparo de feridas. A presença dos macrófagos no início da cicatrização é importante para o desbridamento da ferida devido à sua capacidade fagocítica e sua presença no final da cicatrização, juntamente com os neutrófilos, é importante para a modificação da matriz extracelular provisória em tecido de granulação (HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010). Portanto, o esgotamento dos macrófagos na ferida é seguido não somente por um bloqueio no desbridamento, mas também retarda o recrutamento e proliferação dos fibroblastos e a produção da matriz por essas e outras células (DYSON, 1997).

Em termos de tratamento de ferida e aceleração do processo cicatricial, o ideal nesta fase é que se realize a redução da contaminação da ferida, por meio de limpeza e desbridamento adequados, visando favorecer as defesas do indivíduo e prevenir o desenvolvimento de uma infecção. Também se faz necessária a proteção da ferida no intuito de prevenir possíveis novas contaminações, e a aplicação de antimicrobianos

sistêmicos. A aplicação de um curativo apropriado possibilita a elevação do desbridamento natural e facilita a cicatrização, pois mantém o exsudato rico em mediadores na superfície da ferida (HOSGOOD, 2006).

Medicamentos anti-inflamatórios também são requeridos na fase inflamatória. O anti-inflamatório fitoterápico Acheflan[®] é indicado no tratamento local de processos inflamatórios. É um produto oriundo de pesquisa 100% nacional e encontrado nas formas farmacêuticas de aerosol e de creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*, Boraginaceae), padronizado em 2,3-2,9% do terpeno α -humuleno. Um outro exemplo é o Daflon 500 mg[®], medicamento composto por fração flavonoídica purificada, sob forma micronizada contendo 450 mg de diosmina e 50 mg de flavonoides titulados em hesperidina. Apresenta ação venotônica e vasoprotetora. Os flavonoides atuam modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró- inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipooxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (KIM et al., 2004; KASSUYA et al., 2006; LÓPEZ-POSADAS et al., 2008; BIESALSKI et al., 2007; CAZAROLLI et al., 2008; COUTINHO et al., 2009).

2.2.2 Fase Proliferativa

É a fase responsável pelo fechamento da ferida, e corresponde ao período entre 5 e 20 dias após a lesão (HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010). Resumidamente, esta fase caracteriza-se pela formação de tecido de granulação, que é constituído por um leito capilar, fibroblastos, macrófagos, um frouxo arranjo de colágeno I e II, fibronectina e ácido hialurônico (TAZIMA et al., 2008).

A fase proliferativa consiste nos seguintes eventos: fibroplasia, angiogênese, reepitelização e contração da ferida.

2.2.2.1 Fibroplasia

Com a presença de macrófagos derivados de monócitos no local da ferida e a produção e liberação dos mediadores químicos produzidos por eles, a migração e

ativação de fibroblastos é intensificada. Fibroplasia é o componente do tecido de granulação que inclui os fibroblastos e a matriz extracelular associados. Citocinas (PDGF, TGF- β e FGF) e a matriz provisória estimulam a proliferação de fibroblastos, que se originam de células mesenquimatosas indiferenciadas no tecido conjuntivo circundante. Os fibroblastos migram para o interior da ferida, à medida que a fase inflamatória diminui, através da ligação de seus receptores de integrina com fibrinas ou outros filamentos protéicos, e através do esqueleto formado pela ligação entre as próprias fibrinas. Durante sua migração, os fibroblastos são seguidos pelos brotamentos dos novos capilares (angiogênese). Com a fibroplasia se inicia a formação do tecido de granulação composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que estão suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipos I e II (GUIDUGLI-NETO, 1992).

No interior da ferida, fibroblastos secretam fibronectina (estimulada pelo TGF- β) proteoglicanos, elastina, laminina, proteases (responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico da célula) e colágeno, que é o principal componente da pele, constituindo a base de sua estrutura e resistência (HEDLUND, 2007; PAVLETIC, 2010). Os fibroblastos passam a depositar grandes quantidades de fibronectina que, embora seja substrato que desempenha outras funções, basicamente serve para a fixação da própria célula. Outra substância produzida em grande quantidade neste segundo estágio é o ácido hialurônico, um polissacarídeo glicosaminoglicano não sulfatado com facilidade de se ligar à água, que auxilia na resistência do tecido à compressão. Estas duas substâncias predominam na matriz durante as primeiras fases do reparo, pois esta combinação propicia um microambiente eficiente para a movimentação das células, necessárias nesta etapa.

À medida que o processo de maturação da ferida avança, as células endoteliais dos vasos neoformados se diferenciam em células de revestimento e os vasos neoformados assumem as características funcionais de capilares. Os fibroblastos são as células que passam por mudanças fenotípicas mais acentuadas. Do fenótipo de células imaturas migratórias e replicativas no início do processo, passam para fenótipo característico de células ativamente engajadas na síntese protéica, ou seja, o seu citoplasma se torna volumoso e apresenta um retículo endoplasmático rugoso abundante. Com isto, eles passam a secretar grandes quantidades de colágeno. Este aos poucos substitui os proteoglicanos e a fibronectina até se tornar o principal componente da cicatriz em formação. A síntese de colágeno é dependente da oxigenação das células,

da hidroxilação da prolina e lisina, reação essa mediada por uma enzima produzida pelo próprio fibroblasto, em presença de co-enzimas (vitaminas A, C e E), ferro, testosterona, tiroxina, proteínas e zinco (TAZIMA et al., 2008).

Durante a fixação dos fibroblastos e seu amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança a sua eficiência máxima. Isto ocorre devido à mudança de fenótipo dos fibroblastos das margens da ferida para miofibroblastos (aspecto morfológico e bioquímico de células musculares lisas) pela ação dos fatores de crescimento PDGF e TGF- β . Os miofibroblastos expressam α -actina do músculo liso (α -SMA), α -miosina e desmina. Os miofibroblastos participam na síntese da matriz extracelular e na produção de força mecânica, com influência na reorganização da matriz e na contração da ferida (TOMASEK et al., 2002). Sua atividade contrátil (união de célula a célula gerando força de tensão) é responsável pelo fechamento de feridas após a lesão, processo conhecido como contração da ferida (GABBIANI, 2003). Durante a movimentação dos miofibroblastos, ocorre deposição de fibronectina sobre o arcabouço de fibrina. Começa a deposição de colágeno na ferida que se ligará à fibronectina em um sítio diferente da fibrina¹. 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. Na ferida há, ao contrário da derme íntegra, uma maior proporção de colágeno III em relação ao tipo I (THOMPSON, 2002). Neste contexto, os miofibroblastos alinham-se e ligam-se às fibras de colágeno de maior espessura puxando-as em direção a eles, sendo este fenômeno responsável pela contração da ferida e estimulado por TGF- β e PDGF.

O colágeno é diretamente responsável pela força de tensão na ferida em cicatrização e quanto maior for a concentração de colágeno tipo I mais madura é a ferida. Um aumento na deposição de colágeno está relacionado com um aumento no número de fibroblastos e um aumento na deposição de colágeno por cada célula. A enzima collagenase, produzida por células inflamatórias, endoteliais, fibroblastos e queratinócitos na ferida, é importante no controle da deposição de colágeno (PAVLETIC, 2010).

Os fibroblastos também produzem inibidores de metaloproteinases (TIMPs). As metaloproteinases (MMPs) são enzimas que catalisam proteínas da matriz extracelular. Juntas, as MMPs e TIMPs formam um sistema biológico complexo que mantém a homeostase da matriz extracelular (MEC). A maioria das MMPs é expressa após estímulo de citocinas ou fatores de crescimento. Essas enzimas estão armazenadas em

grânulos presentes em células inflamatórias, principalmente nos neutrófilos (TRENGOVE et al., 1999; GILL & PARKS, 2008) (Figura 05).

As MMPs são uma família de enzimas zinco-dependentes, intimamente relacionadas, que degradam a matriz extracelular. Mais importante, a família das MMPs inclui as únicas enzimas capazes de clivar e desnaturar fibras do colágeno. A collagenase intersticial é também denominada de Metaloproteíase-1 (MMP-1) e degrada, especificamente, os colágenos tipo I, II e III (SUNAMI et al., 2000; SARDINHA et al., 2000). Estas enzimas são codificadas por diferentes genes, e produzidas por uma variedade de tipos celulares, incluindo células epiteliais, mesenquimais, inflamatórias e neoplásicas.

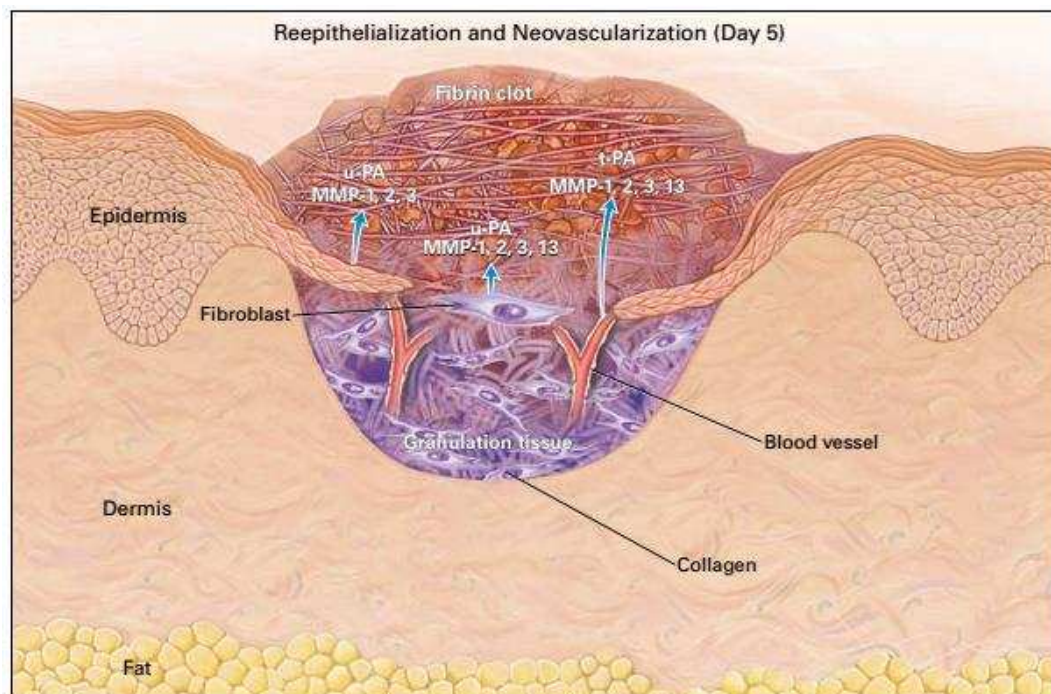


Figura 05: Fase Proliferativa da cicatrização. Fonte: SINGER & CLARK, 1999.

2.2.2.2 Angiogênese

Concomitantemente aos fenômenos descritos, há formação de novos vasos (angiogênese) a partir dos adjacentes à ferida. A angiogênese é o crescimento de novos capilares na área da ferida (DYSON, 1997; HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010). A fase inicial desse processo envolve a liberação de collagenase pelas células endoteliais dos capilares intactos ou recentemente lesados. Esta enzima é liberada em resposta aos fatores angiogênicos e degrada o colágeno da membrana basal dos capilares. Após a

fragmentação da membrana basal, células endoteliais migram para espaço perivascular da derme adjacente a ferida, formando brotamentos que crescem rapidamente em direção à superfície livre do tecido de granulação, onde eles se ramificam, se unem e formam canais que correspondem ao plexo capilar superficial (DYSON, 1997). As células epiteliais destes novos capilares contêm um ativador do plasminogênio. Assim, à medida que novos capilares vão crescendo num ferimento imediatamente atrás dos fibroblastos em migração, ocorre a fibrinólise e a rede de fibrina se rompe e é removida. Os estímulos mais prováveis para a angiogênese são os fatores mitogênicos e quimiotáticos produzidos pelos macrófagos, como FGF, fator de crescimento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor – VEGF), TGF- β , angiogenina, angiotropina, angipectina 1 e trombospondina. A baixa tensão de oxigênio e o aumento de ácido láctico na ferida também são estímulos para a angiogênese através dos efeitos causados na produção dos mediadores. Os novos capilares aumentam a tensão de oxigênio na ferida, o que aumenta a fibroplasia, e a atividade mitótica das células mesenquimatosas adjacentes se eleva à medida que o sangue começa a fluir. Conforme a cicatrização da ferida progride, os novos capilares entram em apoptose e a coloração da ferida, anteriormente caracterizada pelo vermelho vivo do tecido de granulação, torna-se mais pálida (HOSGOOD, 2006; HEDLUND, 2007).

2.2.2.3 Reepitalização

A reepitelização tem por função reestruturar as funções da epiderme que foram perdidas com a ocorrência da lesão, ou seja: proteção mecânica, regulação da temperatura local, defesa contra microrganismos e barreira hídrica.

A cicatrização é incompleta sem a restauração da superfície epitelial (PAVLETIC, 2010). O epitélio é uma barreira importante contra infecções externas e perdas hídricas internas (HEDLUND, 2007). As alterações que iniciam a reepitelização ocorrem na epiderme adjacente à ferida poucas horas após à lesão pelo mecanismo de "efeitos de vizinhança livre" (DYSON, 1997). Células primitivas da camada basal do tecido epidermal possuem potencial mitótico latente. Em tecidos normais, este se encontra inibido pelo contato existente entre as células pela "inibição por contato". Com a ocorrência de uma lesão, este mecanismo inibitório desaparece e as células entram imediatamente em processo mitótico. A ineficiência e dificuldade de constatação do processo mitótico destas células nas etapas iniciais são devidas à, ainda, inexistência de

um substrato adequado para isto na região da ferida. Este somente é fornecido quando o tecido de granulação alcança o nível da epiderme.

Na reepitalização, a atividade inicial predominante é a mobilização e migração das células epiteliais na margem da ferida, seguida pela proliferação das células epiteliais subsequentes (HOSGOOD, 2006). Logo após a lesão, as células epidérmicas da margem da ferida sofrem alterações fenotípicas, como a retração dos monofilamentos intracelulares, a dissolução da maioria dos desmossomos que proporcionam conexões físicas entre as células, e a formação de filamentos citoplasmáticos de actina, localizados no citoesqueleto periférico da rede de actina e que permitem a célula o movimento. O movimento lateral das células epidérmicas é facilitado pela falta de aderência entre estas e as células dérmicas devido à dissolução dos hemidesmossomos entre a epiderme e a membrana basal, esta dissolução é induzida pela collagenase produzida pelas células epidérmicas. Os receptores de integrina presentes nas células epidérmicas permitem a interação destas com uma variedade de proteínas da matriz extracelular, incluindo a fibronectina e a vitronectina, as quais se encontram espalhadas no colágeno tipo I na margem da ferida e na matriz extracelular provisória que a preenche (HOSGOOD, 2006). A migração epitelial é guiada pelas fibras de colágeno (HEDLUND, 2007; PAVLETIC, 2010).

O teor de água no leito da ferida aparentemente facilita a migração epitelial, pois feridas com tecidos adequadamente úmidos curam mais rapidamente do que feridas ressecadas (HANKS & SPODNICK, 2005). As glicoproteínas hidrossolúveis (calônio) encontradas na epiderme, que normalmente atuam na inibição da mitose epitelial nos tecidos normais, se encontram diminuídas em ferimentos, permitindo a multiplicação das células epiteliais presentes ao redor da ferida e sua migração para o tecido de granulação adjacente. Enquanto as células epiteliais se deslocam, há a liberação de collagenase para facilitar sua migração abaixo da crosta, que será posteriormente separada da superfície da ferida devido à ação desta enzima. O contato entre as células epiteliais em todos os lados resulta na inibição de uma migração celular adicional (inibição por contato) (HARARI, 1999; HOSGOOD, 2006; HEDLUND, 2007; PAVLETIC, 2010).

Os estímulos para a proliferação e migração das células epidérmicas incluem o EGF, o TGF- α , e o fator de crescimento do queratinócito (keratinocyte growth factor – KGF) produzidos pelas células epiteliais, fibroblastos e macrófagos, além de 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 (SINGER & CLARK, 1999; GURTNER et al., 2008); 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.

À medida que a região da lesão vai sendo coberta pelas células epidermais é acionado o mecanismo de "inibição por contato". As células voltam a apresentar o fenótipo original, a membrana basal é refeita e os hemidesmossomos e desmossomos são reconstituídos e tornam-se firmemente aderidas à membrana basal e à derme subjacente (HOSGOOD, 2006). O epitélio cicatricial formado é normalmente caracterizado pela sua fragilidade e pouca espessura. A camada epitelial inicial é composta por apenas uma camada de células, mas vai se espessando gradualmente conforme novas camadas de células vão se formando. O resultado é a restauração da arquitetura epitelial escamosa estratificada normal.

Em ferimentos suturados, com uma separação mínima na derme, as células epiteliais podem ligar as bordas mais próximas em 48 horas (HEDLUND, 2007; PAVLETIC, 2010). Em ferimentos superficiais, a migração das células epidérmicas ocorre imediatamente após a lesão a partir das margens da ferida e apêndices anexos, como folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Em ferimentos mais profundos, a ferida somente poderá ser coberta pelas células epiteliais a partir das suas margens após a formação adequada do tecido de granulação e as estruturas anexas não serão regeneradas. A pigmentação ocorre devido à mitose e migração dos melanócitos presentes na pele adjacente à ferida para o interior da epiderme em regeneração (HOSGOOD, 2006).

2.2.2.4 Contração da ferida

A contração da ferida é o processo no qual a pele periférica à lesão avança de forma centrípeta em direção ao centro da lesão (PAVLETIC, 2010). Para que a contração ocorra é necessária presença de quantidade significativa de fibroblastos e a complexa interação de células, da matriz extracelular e mediadores, como TGF- β 1, TGF- β 2 e PDGF (HOSGOOD, 2006). Os fibroblastos presentes na ferida desenvolvem

propriedades da musculatura lisa, como proteínas contráteis (microfilamentos de F-actina) ao longo da face citoplasmática da membrana basal. Estes fibroblastos são chamados de miofibroblastos (PAVLETIC, 2010).

As integrinas presentes nos miofibroblastos ligam estas células à rede de fibronectina e às fibrilas de colágeno na matriz extracelular. Os feixes de colágeno, por sua vez, interligam-se dentro do tecido de granulação e da camada dérmica das margens da pele. Estas ligações possibilitam aos miofibroblastos aplicar uma força de tração na matriz pericelular. Esta força é manifestada assim que os miofibroblastos alinham-se com as linhas de contração da ferida. As margens da ferida interligadas ao colágeno, durante a contração da ferida, são literalmente arrastadas em direção ao centro do leito de granulação (PAVLETIC, 2010), o tecido adjacente estica-se e a ferida assume uma aparência estrelada (HOSGOOD, 2006). A ferida continua contraindo-se até que as bordas se encontrem e ocorra um feedback negativo devido ao contato entre as células das extremidades opostas resultando no encerramento do processo. A contração também cessa quando a tensão do tecido ao redor da ferida iguala ou excede a força de contração (HARARI, 1999; HOSGOOD, 2006) ou se houver falha no desenvolvimento ou função dos miofibroblastos (HEDLUND, 2007). Se a contração cessar e a ferida permanecer com tecido de granulação exposto, a reepitelização poderá continuar ocorrendo e cobrir o restante da ferida.

A contração da ferida pode ser prejudicada pela administração de anti-inflamatórios, drogas antimicrotubulares e uma aplicação local de relaxantes musculares com ação na musculatura lisa (HOSGOOD, 2006; HEDLUND, 2007). Devido ao estiramento da pele de forma centrípeta, a derme e a epiderme se estreitam em resposta à tensão. Este processo estimula o crescimento intussusceptivo da pele, que corresponde à proliferação epitelial e à deposição de colágeno apresentada dentro da pele estirada visando amortecer e reparar áreas cutâneas que se encontram sob tensão significativa (PAVLETIC, 2010). Conforme a cicatrização progride, o número de miofibroblastos diminui, correspondendo à redução na contração de ferida (HOSGOOD, 2006).

A contração da ferida deve ser diferenciada do processo patológico conhecido como contratura. Na contratura, a contração da ferida é excessiva, resultando na limitação do movimento dos tecidos subjacentes. Este evento pode ser um problema particular nos membros, onde pode haver limitações na mobilidade de articulações além da atuação como um torniquete natural, causando prejuízo na drenagem venosa da região distal do membro e edema (HANKS & SPODNICK, 2005).

2.2.3 Fase de maturação ou remodelação

Esta fase tem início após aproximadamente aos 14 dias e pode durar por meses. Ocorre diminuição progressiva da vascularização e fibroblastos, aumento da força tênsil e reorganização das fibras de colágeno pela collagenase (PEERSCHKE et al., 2008). A característica mais marcante desta fase do reparo é a grande e acelerada deposição de colágeno na região da ferida. Nesta etapa ocorre a formação do tecido cicatricial propriamente dito (GAHARY et al., 1995).

O processo de remodelação da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. 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 fibroblastos. 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 das MMPs (metaloproteinases), sendo a remodelagem e a contração da ferida parcialmente controladas pela relação entre eles (SINGER & CLARK, 1999).

Os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação e presume-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento (TODD et al., 1991). Quando a ferida completou o seu fechamento e os microrganismos foram eliminados, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante em feridas humanas (ENGELHARD et al., 1998). Os linfócitos não somente são efetores imunes, mas também, produtores de fatores de crescimento (BLOTNIK et al., 1994). De forma notável, nesta etapa, eles são atraídos para a região da ferida em igual número que os monócitos e, a partir do décimo quarto dia, são os leucócitos que predominam na região (BLOTNIK et al., 1994).

Com o decorrer do processo de maturação e remodelagem, a maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local da ferida mediante processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos desconhecidos de morte celular (ARNOLD & WEST, 1991). Com isso, ocorre redução do volume da cicatriz e mudança gradual da coloração da ferida, passando do vermelho ao róseo pálido, o que caracteriza o processo cicatricial. Ao final desta etapa, os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz

permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente (JOHNSTON, 1990) e as cicatrizes são hipo-vascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares.

2.3 Fatores que influenciam na reparação de feridas

Fatores locais e sistêmicos podem interferir em maior ou menor grau no processo de cicatrização. Fatores sistêmicos são aqueles relacionados ao paciente, como, por exemplo: faixa etária (ex.: idade avançada diminui a resposta inflamatória); o estado nutricional (ex.: a hipoproteïnemia diminui a resposta imunológica, síntese de colágeno e função fagocítica), a existência de doenças (ex.: diabetes, alterações cardiovasculares e de coagulação, disfunção renal, quadros infecciosos sistêmicos) e o uso de medicamentos sistêmicos (ex.: anti-inflamatórios, antibióticos, esteróides e agentes quimioterápicos) (MANDELBAUM et al., 2003; CANDIDO, 2006).

Com o avanço da idade, acontece o envelhecimento natural, com flacidez da musculatura. A pele apresenta sinais de involução por volta dos 40 anos, sendo mais evidente após 65 anos. Ocorrem alterações estruturais numéricas e funcionais dos componentes das três camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme), redução no número e na luz dos vasos, tornando a pele mais fria, atrofia das glândulas sudoríparas e queda da resposta inflamatória devido à redução do número de anticorpos.

A nutrição exerce um papel fundamental na cicatrização. É importante o controle e manutenção dos níveis adequados de carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e sais minerais. Estudos realizados por DEALEY (2001) mostraram cicatrização deficiente de feridas em pacientes cirúrgicos desnutridos e melhora na cicatrização após aplicação de nutrição intravenosa nestes pacientes.

A glicose é a principal fonte de energia para fibroblastos e leucócitos e sua carência resultará em prejuízo no funcionamento celular (PAVLETIC, 2010). As proteínas estão associadas aos processos de resposta imunológica, fagocitose, angiogênese, proliferação dos fibroblastos, síntese de colágeno, remodelagem da ferida. Níveis diminuídos de proteínas plasmáticas reduzem a fibroplasia (SLATTER, 1998). Os lipídeos estão envolvidos na provisão de energia, formação de novas células. Vitamina A participa da síntese e ligação cruzada do colágeno, resistência da ferida à tração, sendo que na sua carência aumenta a suscetibilidade às infecções e compromete a estabilidade do colágeno. Vitaminas do complexo B participam da resposta imunológica, ligação cruzada do colágeno, resistência da ferida à tração. Vitamina C

participa da síntese do colágeno, resistência da ferida à tração, função dos neutrófilos, migração dos macrófagos, resposta imunológica. O mineral cobre participa da síntese do colágeno e formação de leucócitos; ferro - síntese do colágeno, liberação de oxigênio; zinco – amplifica a proliferação das células, aumenta a epitelização, melhora a resistência do colágeno.

O zinco em níveis adequados é necessário para a multiplicação das células epiteliais e dos fibroblastos, visto que a proliferação epitelial e fibroblástica normais necessitam de enzimas dependentes de zinco, DNA-polimerase e transcriptase reversa. O zinco também pode ser prejudicial à cicatrização se em níveis elevados, já que este metal estabiliza as membranas lisossômicas e celulares, podendo também inibir macrófagos resultando na diminuição da fagocitose (SLATTER, 1998; PAVLETIC, 2010).

Com a deficiência de cobre ocorre uma falha na formação de colágeno, onde atua a enzima lisil-oxidase, que contém cobre. Essa enzima permite a ligação cruzada entre fibras colágenas, onde essa ligação confere rigidez estrutural e elasticidade (McDOWELL, 1992). Sabe-se que, na deficiência de cobre, diminui a atividade da superóxido dismutase, que é uma cupro-enzima que catalisa a dismutação de O_2^- para H_2O_2 , que corresponde ao grupo oxidante que participa nas reações de defesa dos neutrófilos (BABIOR et al., 1973).

O surgimento de uma ferida em um organismo desencadeia uma cascata de reações celulares e bioquímicas com objetivo de reparar o tecido lesionado. Mais de 100 fatores fisiológicos conhecidos contribuem para as deficiências de cura de ferida em indivíduos com diabetes. Em geral, estes fatores incluem: a redução ou deficiência da produção de fatores de crescimento, na resposta angiogênica, na função e quantidade de macrófagos, na acumulação de colágeno, na barreira epidérmica, na quantidade de tecido de granulação, na migração de queratinócitos e proliferação de fibroblastos, e equilíbrio entre a acumulação dos componentes da matriz extracelular e sua remodelação por metaloproteinases (MMPs), produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição do óxido nítrico (NO) (BREM & TOMIC-CANIC, 2007).

Indivíduos imunodeprimidos podem estar impossibilitados de produzir uma resposta inflamatória efetiva, favorecendo infecção e atrasando a cicatrização (HANKS & SPODNICK, 2005). Hepatopatia pode causar deficiência dos fatores de coagulação (HEDLUND, 2007). Hipotireoidismo também pode ter efeito negativo na cicatrização, podendo estar associado à infecção crônica (AMALSADVALA & SWAIN, 2006). A

uremia prejudica a cicatrização por meio da alteração dos sistemas enzimáticos, das vias bioquímicas e do metabolismo celular (HEDLUND, 2007). Ela deprime a velocidade de formação do tecido de granulação e da divisão das células epiteliais (SLATTER, 1998). Por fim, a infecção sistêmica afeta a cicatrização, porque a ferida precisa disputar os glóbulos brancos e os nutrientes com qualquer infecção, e parece também inibir a capacidade dos fibroblastos de produzir colágeno. A infecção prolonga o estágio inflamatório da cicatrização à medida que as células combatem um grande número de bactérias. A cicatrização só ocorrerá depois que o organismo tiver superado a infecção.

Além dos corticosteróides, outras drogas podem interferir na cicatrização, como a aspirina, que pode retardar a coagulação sanguínea (STEED, 2004; HEDLUND, 2007), e algumas drogas quimioterápicas (HEDLUND, 2007). Os agentes quimioterápicos podem interferir com o metabolismo das vitaminas B6, B12, B9 e C e do zinco e ferro (PAVLETIC, 2010). O propósito da quimioterapia é a interrupção do ciclo celular e, como tal, pode retardar a cicatrização (HANKS & SPODNICK, 2005).

Fatores locais são aqueles ligados à ferida, que podem interferir no processo cicatricial, causando o prolongamento da resposta inflamatória no local da ferida e consequentemente retardo da regeneração ou cicatrização da lesão, tais como: as características específicas da ferida, incluindo tamanho, localização, profundidade, condições teciduais (ocorrência de tecido necrótico, pressão e tensão locais aumentadas) e o tipo de tecido envolvido (músculo, tendão e/ou osso) (MANDELBAUM et al., 2003).

São considerados elementos lentificadores: a) presença de infecção, fístulas, abscessos, sinus e/ou corpos estranhos; b) isquemia, alterações da viscosidade e perfusão sanguíneas; c) alterações na drenagem do tecido lesado; d) traumas repetidos e recorrentes, causando sítio de lesão que pode retornar à fase inflamatória; e) manejo inadequado da ferida, como utilização de substâncias potentes e tóxicas aos fibroblastos e linfócitos humanos, como anti-sépticos (ex.: hipoclorito de sódio, povidine-iodine, rifocina), desidratação e quedas de temperatura durante a troca de curativos (BURD et al., 1994).

2.4 Tratamento de feridas

Embora a reparação tecidual seja um processo sistêmico, é necessário favorecer condições locais através de terapia tópica adequada para viabilizar o processo

fisiológico. A terapia tópica de feridas é fundamentada em estudos científicos sobre a fisiologia de reparação tecidual, e é norteado pelos seguintes princípios: remover tecidos necróticos e corpos estranhos do leito da ferida, eliminar processos infecciosos, obliterar espaços mortos, absorver o excesso de exsudato, manter o leito da ferida úmida, promover isolamento térmico e proteger a ferida de traumas e invasão bacteriana (BLANES, 2004).

O agente tópico é uma substância que é aplicada na ferida e o penso é a cobertura que visa provocar a cicatrização e a proteção da lesão. A escolha dos agentes tópicos e dos tipos de pensos pode variar de acordo com a dinâmica das feridas (GODOY & PRADO, 2005).

Os medicamentos utilizados para melhorar a função de cicatrização da ferida utilizam uma variedade de mecanismos diferentes. Estes incluem a manutenção de ambiente úmido (hidrogéis, hidrocolóides, alginatos); o fornecimento de fonte de energia local (maltodextrina, mel, açúcar); a redução do edema da ferida por ação hidrofílica (alginatos, acemanann, mel, açúcar); o aumento do nível de fatores de crescimento (acemanann, complexo tripeptídeo-cobre); o fornecimento de fonte de substância ativa (colágeno, membranas biológicas); o aumento da resposta inflamatória (maltodextrina); o controle da infecção (agentes antimicrobianos); o auxílio no desbridamento (enzimas tópicas); o aumento do teor de oxigênio (oxigênio hiperbárico); e, o aumento do fluxo de sangue (laser, radiação ultravioleta, estimulação elétrica (KRAHWINKEL & BOOTHE, 2006).

Apesar da variedade de medicamentos tópicos para cicatrização e desenvolvimentos de novos fármacos, tanto pela química sintética como na biotecnologia, os produtos naturais como plantas medicinais, continuam sendo grande fonte de medicamentos para este fim. Ressalta-se ainda que alguns agentes medicinais comumente usados para o tratamento de várias condições patológicas têm sua origem na medicina popular (OLIVEIRA et al., 2000).

2.5 Plantas medicinais e cicatrização

As plantas medicinais são mencionadas desde a pré-história, no processo de cicatrização de feridas. As plantas e seus extratos vegetais foram e ainda são utilizados na forma de cataplasmas, com o intuito de estancar hemorragias e favorecer a

cicatrização, sendo muitas dessas plantas ingeridas, para atuação em via sistêmica (SILVA & MOCELIN, 2007).

O Ministério da Saúde brasileiro, nos últimos anos, busca estimular a inserção das práticas complementares de cuidado no sistema oficial de saúde. Destaca-se a implementação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006a) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (BRASIL, 2006b), que visam estimular o acesso às práticas complementares e às plantas medicinais, para o cuidado em saúde, de forma eficaz e segura.

Outras publicações importantes são a Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), lançada em 2009, contendo 71 plantas medicinais que devem ser objeto de pesquisa e implementação dos setores e serviços de saúde públicos brasileiros (BRASIL, 2009). Já a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10, do ano de 2010, lista 66 plantas medicinais com comprovadas ações na saúde humana; dentre estas, algumas espécies são indicadas para o processo de cicatrização, o que implica em avanço da saúde pública brasileira no sentido de valorizar a utilização de novas terapias baseadas nas plantas medicinais, prática tão difundida ao redor do mundo e das gerações.

Dentre as plantas medicinais indicadas para cicatrização de feridas, com ações comprovadas estão: *Anacardium occidentale* L.(cajueiro), *Caesalpinia ferrea* Mart. (pau-ferro), *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga), *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira), *Stryphnodendrom adstrigens* (Mart.) Coville (barbatimão), *Calendula officinalis* L. (calêndula), *Polygonum punctatum* Elliott (erva-de-bicho), *Coronopus didymus* (L.) Smith (mastruço), *Aloe Vera* (L.) (babosa), *Helianthus annuus* (girassol) (PIRIZ et al., 2014; BRASIL 2010; BRASIL 2011).

As plantas medicinais têm potencial para o tratamento de feridas e queimaduras. Elas podem induzir a cura natural e regeneração do tecido lesado por vários-mecanismos, sendo muitas vezes mais baratos e acessíveis à população. Laboratórios fito-farmacêuticos estão concentrando esforços para identificar os componentes bioativos e os modos de ação de várias plantas medicinais. Artigos sobre efeito antibacteriano, anti-inflamatório, e atividade cicatrizante de várias plantas têm surgido na literatura, mas a grande maioria ainda não foi totalmente explorada. A ilustração esquemática de práticas com ferida em estudos de plantas medicinais é mostrado na Figura 06 (THAKUR et al., 2011).

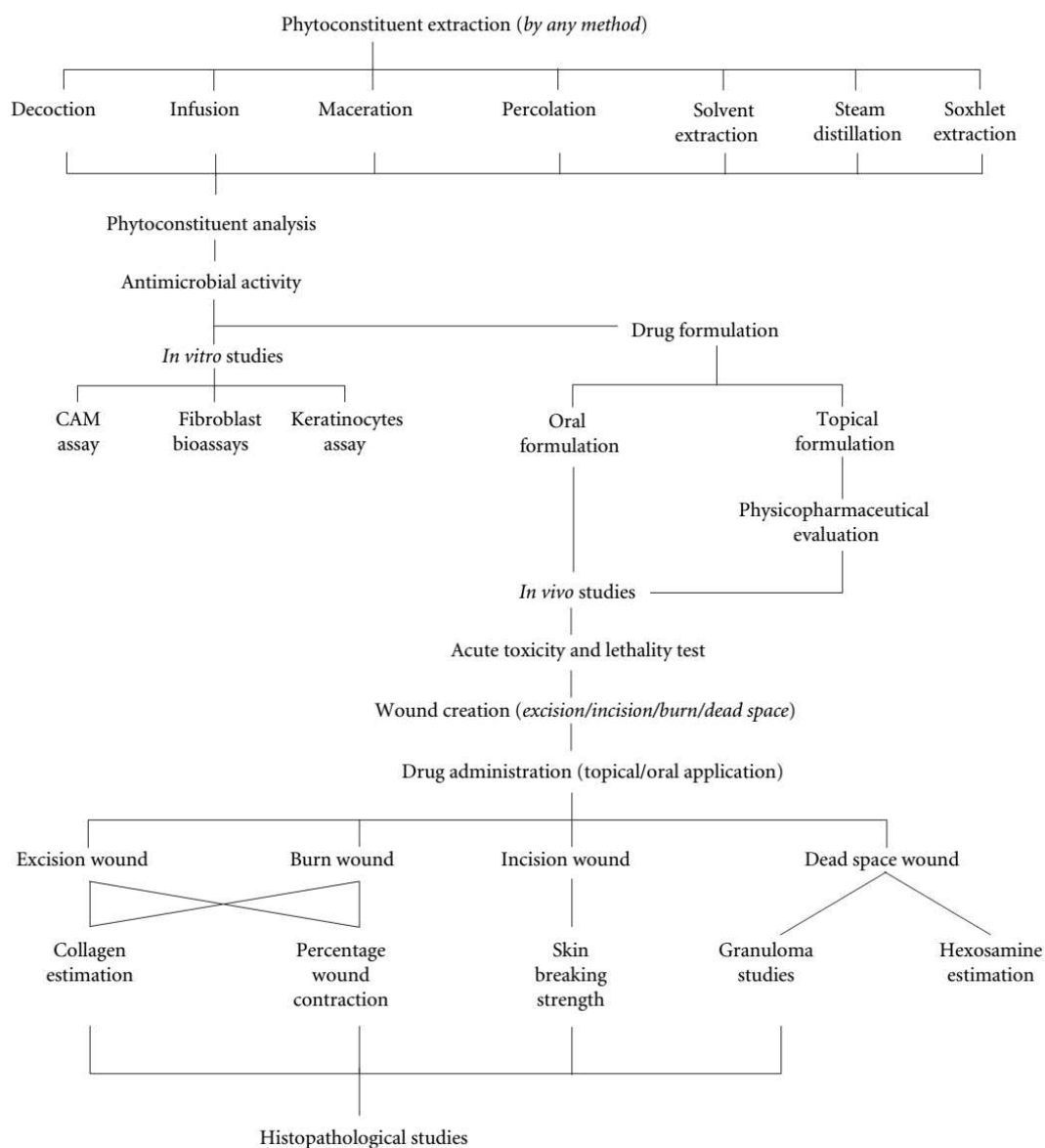


Figura 06: Esquema ilustrativo da investigação de plantas medicinais na cicatrização de feridas.
Fonte: THAKUR et al., 2011.

O potencial efeito medicinal de uma planta deve-se à presença de princípios ativos capazes de produzir efeitos farmacológicos diversos. Dentre as substâncias bioativas que podem ser encontradas nas diversas partes de uma planta, podem ser citadas: alcalóides, saponinas, taninos, glicosídeos, flavonóides e óleos essenciais (EDEOGA et al., 2005).

Os taninos são compostos fenólicos do metabolismo secundário vegetal. São responsáveis pela adstringência das plantas. Dividem-se em dois grupos, as proantocianidinas, que são os taninos condensados, responsáveis pela adstringência e precipitação de proteínas e os taninos hidrolisáveis. São bastante empregados na

medicina tradicional no tratamento de feridas, queimaduras e inflamações (FUNARI & FERRO, 2006).

Taninos hidrolisáveis (Figura 07) possuem um grupo poliol central (em sua maioria, é β -d- glicose, mas também o ácido quínico, outros fenóis e outros glicósidos); e hidroxilas esterificadas pelo ácido gálico (parte fenólica) (KHANBABAE & REE, 2001).

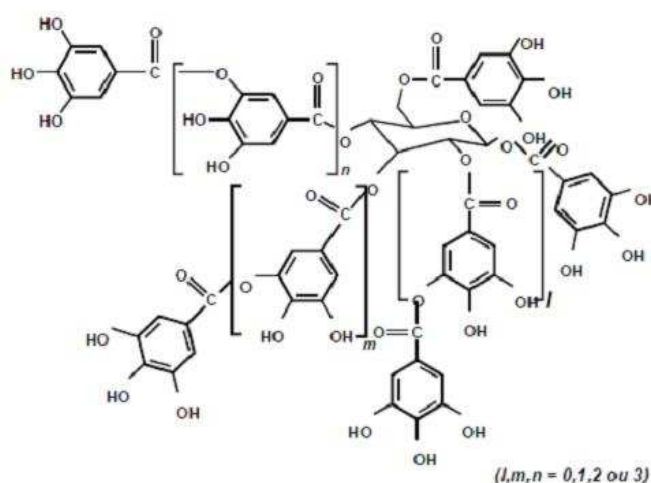


Figura 07: Estrutura de taninos hidrolisáveis. Fonte: NAKAMURA et al. (2003).

Os taninos condensados ou proantocianidinas estão distribuídos por diversas famílias do reino vegetal, em geral, em plantas lenhosas. São polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol (Figura 08), produtos do metabolismo do fenilpropanol (HEIL et al., 2002). As proantocianidinas são assim denominadas pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina. As moléculas têm grande variação estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições das ligações e a estereoquímica (MELLO & SANTOS, 2001).

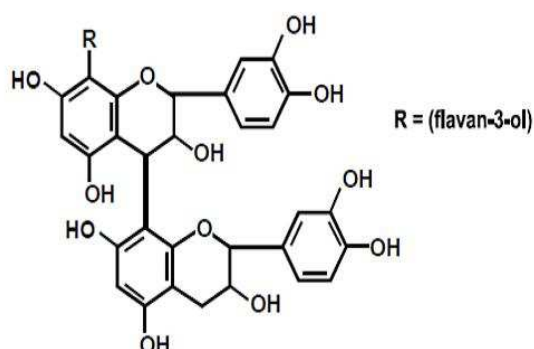


Figura 08 - Estrutura química de taninos condensados. Fonte: LEKHA & LONSANE (1997).

Diversos estudos sobre atividade dos taninos evidenciaram importante ação antibacteriana, ação sobre protozoários, na reparação de tecidos, regulação enzimática e protéica. Atividades bactericidas e fungicidas ocorrem por três características gerais comuns aos dois grupos de taninos: complexação com íons metálicos; atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; habilidade de complexar com outras moléculas, principalmente proteínas e polissacarídeos (MELLO & SANTOS, 2001).

Têm sido atribuídas aos taninos várias atividades fisiológicas humanas, como a estimulação das células fagocíticas e a ação tumoral, e atividades anti-infectivas (LOGUERCIO, 2005). Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, permitindo que, logo abaixo dessa camada, o processo de reparação tecidual ocorra naturalmente (MELLO & SANTOS, 2001). Em patologias estomacais, o mecanismo de ação é bem semelhante, com a formação de uma camada de tanino-proteína complexados que envolvem a mucosa estomacal (HASLAM, 1989).

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou terpenos policíclicos, que estruturalmente possuem uma parte lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra hidrofílica (carboidratos), que determina a propriedade de redução da tensão superficial da água, característica de sua ação emulsificante. A palavra saponina provém do fato de liberarem espuma quando misturadas com água à semelhança do sabão. A capacidade das saponinas de interagir com esteróis, presentes na membrana plasmática de eritrócitos, aumenta a permeabilidade da membrana, permitindo a entrada de íons e água para o interior das células resultando na ruptura das mesmas e liberação de hemoglobina. As propriedades tensoativa e hemolítica não são comuns a todas as saponinas e, portanto, não podem ser usadas para definir esse grupo de compostos (KARABALIEV & KOCHEV, 2003; SIMÕES et al., 2003).

Foram atribuídas às saponinas atividades antifúngicas, anti-inflamatória e cicatrizante em feridas abertas e queimaduras. Estudos com a espécie *Centella asiatica* (L.) mostraram atividade cicatrizante em queimaduras e queloides (SIMÕES et al., 1999). Dentre as aplicações mais importantes das saponinas podem ser citados: redução nas taxas de colesterol e triglicerídeos sanguíneos, o efeito imunogênico, a redução na produção de amônia, o controle de parasitas e o efeito citostático sobre células malignas (FRANCIS et al., 2002). Outras aplicações consistem na sua utilização

em indústrias farmacêuticas, sendo precursores na síntese de compostos esteroidais como hormônios, contraceptivos, diuréticos, entre outros (SANTOS et al., 2011).

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de metabólitos secundários é amplamente distribuída no reino vegetal (SIMÕES et al., 2004). São encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos (NIJVELDT et al., 2001). Apresentam um núcleo característico C₆-C₃-C₆, sendo biossintetizados a partir das vias do ácido chiquímico e do ácido acético (CAZAROLLI et al., 2008) (Figura 09). As modificações no anel central dessas substâncias levam à diferenciação em subclasses distintas, tais como: chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols e antocianidinas (VEITCH et al., 2008; BOOTS et al., 2008).

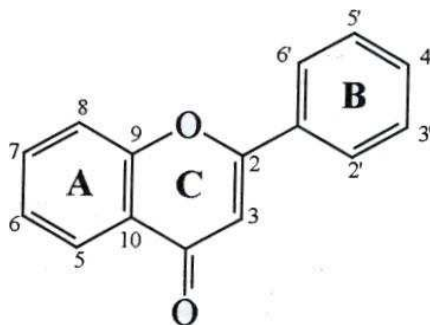


Figura 09: Estrutura química de flavonóide.

Os flavonoides agem como antioxidantes, combatendo os radicais livres, possuem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune, apresentam ação antiinflamatória, analgésica, regenerativa de cartilagens, ossos e produzem vasodilatação (CHEN et al., 2005; MENEZES, 2005; FERNANDES JUNIOR et al., 2006).

Na medicina popular brasileira, muitas espécies vegetais são utilizadas no tratamento de feridas e queimaduras cutâneas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Dentre estas espécies podemos citar a tinturas da casca de ingá (*Inga subnuda*) e angico (*Pseudopiptadenia contorta*).

2.6 *Inga subnuda*

O Ingá, também chamado ingazeira, é uma árvore do gênero *Inga*, da subfamília Mimosoideae, família Leguminosae. Leguminosae é a terceira maior família de angiospermas sendo estimada a ocorrência de 727 gêneros e 19.325 espécies nos mais diversos tipos de ecossistemas de todos os continentes (LEWIS et al., 2005). Para o Brasil estima-se que ocorram 178 gêneros e 1.550 espécies de leguminosas (BARROSO et al., 1984).

A subfamília Mimosoideae compreende cerca de 60 gêneros e 2.500 espécies distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e subtemperadas. Entre as Mimosoideae, o gênero *Inga* é um grupo notável pela sua morfologia uniforme. É facilmente reconhecido pelo seu porte arbóreo, chegando a 40m de altura, folhas paripinadas e pequenos nectários foliares localizados entre cada par de folíolos. Suas flores são típicas da subfamília, cálice e corola 5-lobados, estames longos unidos em tubo, fruto legume indeiscente e semente com sarcotesta branca, adocicada (OLIVEIRA & BELTRATI, 1992).

O termo Ingá significa "embebido" e tem sua origem na língua de Tupi (CORREIA, 1969). Este termo foi empregado por MARCGRAVE (1648) para descrever essas plantas utilizadas na dieta dos índios Tupis do estado da Paraíba e de Pernambuco.

O gênero *Inga* possui cerca de 300 espécies, com maior diversidade no sopé dos Andes do Peru, Equador, Colômbia e no Sul da América Central. Esta última região é considerada como sendo o centro de origem, enquanto o Brasil é considerado centro de dispersão do gênero. A maioria das espécies ocorre em florestas úmidas de clima tropical e subtropical, mas algumas são restritas às zonas semi-úmidas, ocorrendo ao longo das margens dos rios. Ocupa uma larga variedade de habitats, desde o nível do mar até altitudes em torno de 3000 metros (PENNINGTON, 1997).

Várias espécies do gênero *Inga* são utilizadas no sombreamento de culturas como café e cacau e na recuperação de solos degradados (PITTIER, 1929; LÉON, 1966 e PENNINGTON, 1997). Sua madeira é utilizada como lenha, em caixotaria, fabricação de brinquedos e de lápis, sendo considerada de baixa qualidade (DUCKE, 1925; MATTOS, 1983). A polpa do fruto do ingá é utilizada in natura e na preparação de sucos, doces e licores e tem grande importância ecológica, pois serve de alimento para aves, peixes e macacos (SANCHOTENE, 1989; LORENZI, 1992). Algumas

propriedades medicinais como laxantes, antixodiantes, antiulcerogênicas e antiinflamatório são reconhecidas para a espécie *Inga edulis* (SILVA et al., 2007; POMPEU et al., 2012), descongestionante nasal e atenuante da infertilidade feminina, para as espécies *Inga rubiginosa* e *Inga capitata*, respectivamente (GARCIA, 1998).

O gênero é pouco estudado em relação à taxonomia, citogenética, teste de viabilidade de sementes, potencial germinativo, armazenamento de sementes, química e atividades biológicas de folhas, sementes, frutos e cascas.

Alguns trabalhos demonstraram a presença de compostos bioativos em *I. edulis*. Em suas folhas foram identificados alguns compostos fenólicos: ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina-3-O-a-L-glucopiranosídeo, quercetina-3-O-a-L-ramnopiranosídeo e miricetina-3-O-a-L-ramnopiranosídeo (SOUZA et al., 2007). Nas raízes foram identificados: 5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-metoxiflavona, 6,3',4'-tri-hidroxi-aurona e 5,7,4'-tri-hidroxi-6,8-dimetilflavonona (CORREA et al., 1995).

Tradicionalmente, uma espécie muito disseminada no estado de Minas Gerais, a *Inga subnuda* Salzm. ex Benth. (Figura 10 e 11), tem sido utilizado na medicina popular para tratamento de diferentes afecções. Da polpa do fruto prepara-se um xarope usado contra bronquites e a decocção da casca é empregada na cura da diabetes, e a tintura da casca na cicatrização (PRANCE & SILVA, 1975). A casca é rica em tanino e serve para curtume (PRANCE & SILVA, 1975). Entretanto, apesar dos relatos populares do seu uso no tratamento de doenças, não há, até o momento, estudos científicos demonstrando a eficácia ou toxicidade dos preparados desta planta na cicatrização, nem tampouco estudos sobre fitoquímica.

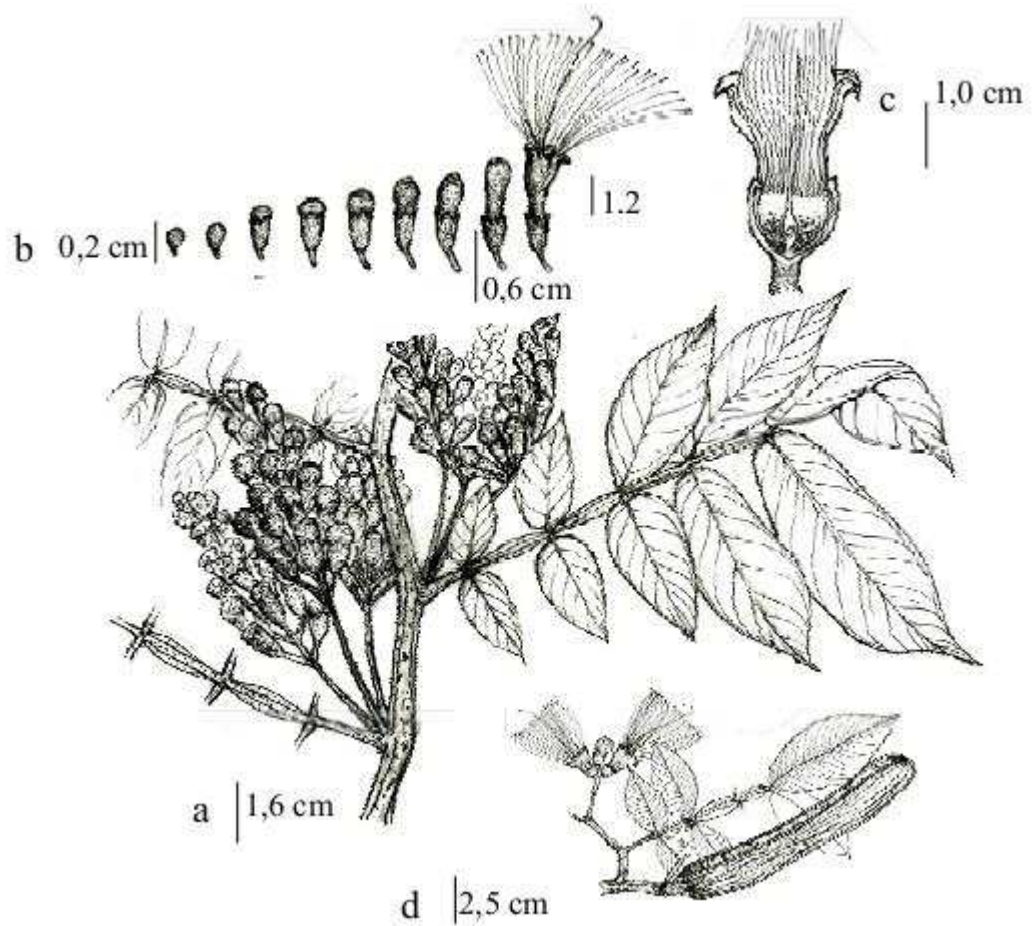


Figura 10. *Inga subnuda* subsp. *subnuda* Salzm. ex. Benth., **a.** Ramo com botões florais; **b.** Botões florais em diversos estádios de desenvolvimento; **c.** Corte longitudinal da flor completa; **d.** Ramo com flor e fruto maduro. Fonte: MOTA, 2009.



Figura 11. Detalhes da morfologia de *Inga subnuda* subsp. *subnuda* Salzm. ex. Benth **A.** Ramo jovem com lenticelas; **B.** Detalhe da folha mostrando uma pequena ala apenas abaixo de cada par de folíolos; **C.** Nectário em vista frontal; **D, E, F.** Flores em antese; **G.** Botão floral com cálice aberto e flor em antese; **H, I.** Fruto maduro; **J.** Semente madura. Fonte: MOTA, 2009.

2.7 *Pseudopiptadenia contorta*

Pseudopiptadenia contorta (DC.) G.P. Lewis & M.P. Lima (Figura 12) é uma espécie arbórea da família Leguminosae, subfamília Mimosoideae, conhecida popularmente como angico (Figura 11). Outros nomes científicos podem correlacionar a mesma espécie uma vez que são considerados sinônimos. Os sinônimos da espécie *Pseudopiptadenia contorta* são: *Acacia contorta* DC., *Newtonia nitida* (Benth.) Brenan, *Piptadenia nitida* Benth. (TROPICOS, 2014).

O gênero *Pseudopiptadenia* possui 10 espécies que ocorrem na América do Sul, sendo que uma delas chega à América Central (LEWIS et al., 2005). As espécies do gênero são: *Pseudopiptadenia contorta* (DC.) G.P. Lewis & M.P. Lima; *Pseudopiptadenia bahiana* G.P. Lewis & M.P. Lima; *Pseudopiptadenia brenanii* G.P. Lewis & M.P. Lima; *Pseudopiptadenia colombiana* (Britton & Killip) G.P. Lewis; *Pseudopiptadenia inaequalis* (Benth.) Rauschert; *Pseudopiptadenia leptostachya* (Benth.) Rauschert; *Pseudopiptadenia pittieri* (Harms) G.P. Lewis; *Pseudopiptadenia psilostachya* (DC.) G. P. Lewis & M. P. Lima; *Pseudopiptadenia suaveolens* (Miq.) J.W. Grimes; *Pseudopiptadenia warmingii* (Benth.) G.P. Lewis & M.P. Lima (TROPICOS, 2014).

O gênero é exclusivo da região neotropical e tem como centro de diversidade o Nordeste e Sudeste do Brasil. Esta área parece ser o centro de diversificação genérica, pois, além de concentrar um maior número de espécies, é onde os táxons habitam diferentes tipos de formações vegetais. Verifica-se, entretanto, ser a Floresta Atlântica o bioma predominante das espécies do gênero e, às vezes, exclusivo, como é o caso das espécies: *P. inaequalis*, *P. leptostachya* e *P. warmingii* (LEWIS & LIMA 1990).

Pseudopiptadenia contorta ocorre em ambientes abertos às margens de estradas e no interior das florestas, em ambientes secos e úmidos. Tem ocorrência registrada da Paraíba até São Paulo, em formações da Floresta Atlântica e Caatinga. Porém, para o estado de Minas Gerais foi registrada a ocorrência de indivíduos desta espécie apenas em formações da Floresta Atlântica (LEWIS & LIMA 1990; MENDONÇA-FILHO 1996; MORIM 2012).

Na medicina popular, o angico vem sendo utilizado de diversas formas, dentre elas, o decocto da casca (na preparação de xaropes), usado no tratamento das tosse, coqueluches, bronquites e diabetes; a maceração da casca, utilizada no tratamento de inflamações e leucorreias e quando preparado com álcool ou cachaça, pode ser utilizada em ferimentos externos, agindo como hemostático e cicatrizante (MATTOS, 1997). Sua

casca tem propriedade hemostática, depurativa, adstringente e cicatrizante e, é utilizada na medicina popular em infusão, xarope, maceração e tintura (CORDEIRO et al., 2003; LIMA et al., 2006).

Apesar da utilização de preparados da casca de angico na medicina popular, não há, até o momento, registros científicos na literatura demonstrando efeito cicatrizante, o que torna necessário uma investigação, uma vez que já são utilizados pela população.

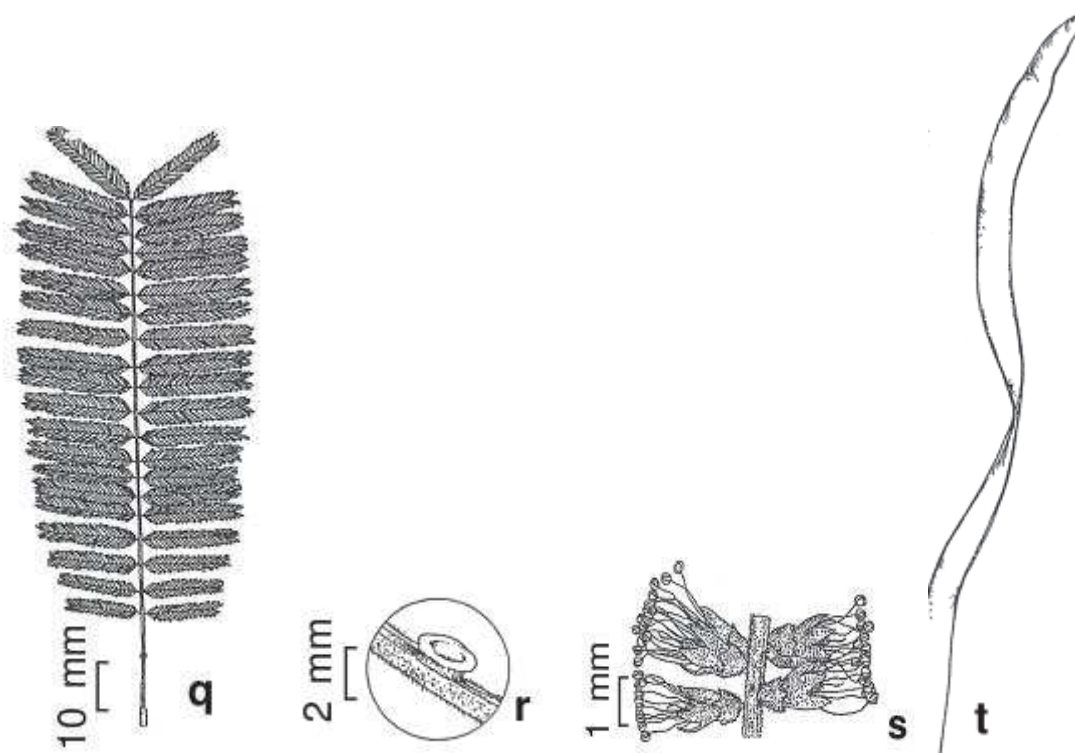


Figura 12: *Pseudopiptadenia contorta* (q-r, t Lima 379; s Lopes 37) – q. folha; r. nectário peciolar; s. detalhe da inflorescência; t. fruto. Fonte: LIMA et al.; 2010.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito cicatrizante dos extratos hidroalcoólicos das cascas de *Inga subnuda* e *Pseudopiptadenia contorta* em dois modelos de feridas cirúrgicas cutâneas induzidas em coelhos.

3.2 Objetivos específicos

- Obter extrato hidroalcoólico das cascas de *Inga subnuda* e *Pseudopiptadenia contorta*;
- Preparar formulações farmacêuticas a partir dos extratos em diferentes concentrações;
- Induzir dois modelos de lesão cirúrgica em coelhos, um modelo com uso de lâmina de bisturi e outro com bisturi elétrico.
- Tratar as feridas com formulações do extrato de *Inga subnuda* e *Pseudopiptadenia contorta*.
- Avaliar o efeito cicatrizante dos extratos através do índice de contração da ferida e análise estereológica de densidade volumétrica de fibroblastos, vasos sanguíneos e células inflamatórias e índice de maturação do colágeno.
- Analisar os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais após tratamento experimental.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

Cascas e amostras do material vegetal reprodutivo (flores e frutos) das árvores ingá e angico foram coletados em um fragmento de Mata Atlântica, nas dependências do Embaúbas Tênis Clube, na cidade de João Monlevade, MG, localizado na latitude 19,5°S e longitude de 43,7°W, no mês de outubro de 2011. O material reprodutivo foi herborizado e as exsicatas enviadas para identificação botânica. As amostras vegetais foram identificadas pelo botânico taxonomista Dr. José Martins Fernandes do herbário VIC da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa-MG). As exsicatas foram depositadas no mesmo herbário com o código de registro VIC 38.758 para a espécie *Inga subnuda* e VIC 38.757 (Figura 13) para a espécie *Pseudopiptadenia contorta* (Figura 14).



Figura 13: Folha e fruto de *Inga subnuda* (ingá).



Figura 14: Fruto, flor e casca de *Pseudopiptadenia contorta* (angico).

As cascas de ingá e angico foram limpas mecanicamente, lavadas em água corrente, desinfetadas com hipoclorito de sódio 2% por 30 min, dispostas em papéis absorventes para retirar o excesso de água, secas em estufa a 40°C até peso constante, trituradas e moídas. Em seguida, foram armazenadas a 4°C até o preparo dos extratos (Figura 15).



Figura 15: Cascas de Inga subnuda (ingá) e Pseudopiptadenia contorta (angico) em pedaços e moídas.

4.2 Preparo do extrato vegetal

Os extratos hidroalcoólicos das cascas de ingá (EHI) e angico (EHA) foram preparados pelo método de maceração (SONAGLIO et al., 2004). Para produção de cada extrato vegetal foram utilizados 400 g das cascas moídas. Elas foram maceradas em 1,2 L de solução água:álcool etílico (1:1) por 72 h, ao abrigo da luz. O macerado foi filtrado e o extrato concentrado em evaporador rotativo à baixa pressão entre 45 a 55°C até a retirada dos solventes. Este procedimento foi repetido até a extração exaustiva do material vegetal. Extratos de ingá e angico foram pesados e o rendimento de cada extrato foi de 10% (p/p) em relação à quantidade de casca seca utilizada. Ao final, os extratos brutos foram liofilizados e armazenados a 4°C até preparação das formulações farmacêuticas (Figura 16).



Figura 16: Etapas do preparo dos extratos hidroalcoólicos de ingá e angico

4.3 Preparo do creme tópico

Os extratos brutos de ingá e angico foram encaminhados para a Farmácia de Manipulação HUMANUS, sob gerência da farmacêutica Dr.^a Márcia Saraiva, localizada na cidade de Viçosa/MG para produção de um creme tópico (Tabela 01). Foram preparados dois cremes de cada extrato nas concentrações finais de 1% e 5% (p/p) (Figura 17).

Tabela 01: Formulação de creme segundo a Farmacopeia Brasileira IV Edição (1988)

Constituintes do creme	Quantidade relativa (%)
Lanette [®]	24%
Alcool cetílico	2,5%
Glicerina	5%
Propilparabeno	0,15%
Oleato de decila	12%
Nipagin [®]	0,15%
Nipagol	0,05%
Extrato hidroalcoólico	Concentração desejada
Água deionizada	QSP 100 g



Figura 17: Cremes tópicos produzidos a partir dos extratos hidroalcoólicos das cascas de Inga subnuda (ingá) e Pseudopiptadenia contorta (angico).

4.4 Prospecção fitoquímica

As alíquotas dos extratos hidroalcoólico de ingá e angico foram submetidos ao método de prospecção fitoquímica, conforme metodologia descrita por MATOS (1997). Os métodos utilizados foram apenas qualitativos e esta metodologia teve como objetivo detectar a presença das principais classes químicas: fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonóides, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, xantonas e saponinas.

- Teste para fenóis e taninos: os extratos secos de ingá e angico foram inserido em tubos de ensaio e enumerados como tubo 1 e 2, respectivamente. A um terceiro tubo de ensaio foi colocado apenas água destilada e solução alcoólica de FeCl_3 1%, e numerado como branco (tubo 3). Nos tubos 1 e 2 foram colocadas 3 gotas de FeCl_3 . Em seguida agitou-se os tubos e observou-se a cor resultante comparando com o tubo 3 (branco). Coloração inicial entre o azul e o vermelho, é indicativo da presença de fenóis e, precipitado escuro de tonalidade azul, indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, presença de taninos catéquicos.
- Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides: foi colocado em três tubos de ensaio o extrato seco bruto. O tubo 1 foi acidulado até pH 3, o tubo 2 foi alcalinizado até pH 8,5 e o tubo 3 foi alcalinizado até pH 11. Aparecimento de coloração vermelho-laranja indica teste positivo.
- Teste para flavonóis, flavonas, flavanonóis e xantonas: foi adicionado a um tubo de ensaio (tubo 1) o extrato bruto seco e foi colocado algumas centigramas de magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. Foi aguardado o término da reação que foi indicada pelo fim da efervescência e foi então reservado o tubo de ensaio. Para a amostra do branco colocou-se num segundo tubo de ensaio (tubo 2) somente o 0,5 mL de HCl concentrado e centigramas de magnésio granulado. Comparou-se então a coloração do tubo 1 com o tubo 2. O aparecimento ou intensificação da cor vermelha é indicativo da presença dos metabólitos acima citados.
- Teste para saponinas: em tubo de ensaio foi adicionado uma quantidade do extrato bruto e em seguida agitado por 1 min em alta velocidade. A formação e permanência da espuma por 30 min ou mais indica a presença de saponina.

4.5 Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

No presente estudo, foi analisada a porcentagem de moléculas do radical DPPH sequestrado após determinado tempo, de acordo com a metodologia da avaliação da

capacidade sequestrante de radicais DPPH, descrita por ESPIN et al. (2000) e PUKALSKAS et al. (2002) com modificações. A solução de DPPH possui uma coloração roxa intensa e a ação antioxidante de um extrato pode ser visualizada pelo progressivo descoloramento da solução, ao final do qual a mesma torna-se amarelada.

A solução de DPPH foi preparada na forma de uma solução de 0,1 mmol/L de DPPH• em etanol:água 80% (v/v). Em seguida, 50 mg de cada extrato foi diluído em solução de água:álcool 80% (v/v) e, dessa solução estoque, 100 µL foram aliqüotados e diluídos na proporção de 1:120. Em um tubo de ensaio, foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL da fração das amostras (devidamente diluída para que ocorra a redução parcial do DPPH) e 3,5 mL da solução etanólica de DPPH á temperatura ambiente (25 ± 1°C). Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda de 517 nm em espectrofotômetro (UV-1601 PC Shimadzu), no tempo zero e a cada 5 minutos até o final da reação (estabilização do valor da absorbância). Todo o experimento foi realizado em ambiente desprovido de luz e a absorbância foi considerada estável quando o resultado teve variação inferior a 0,005. Realizou-se a análise apenas na concentração de 5,0 µg/mL. O resultado foi expresso em porcentagem de moléculas de radical DPPH sequestrado, a uma determinada diluição, pela equação 1 descrita abaixo (OLIVEIRA, 2011). Como controle positivo foi utilizado o extrato padronizado de Ginkgo biloba, que possui alta capacidade antioxidante.

Equação 1 – Equação usada para cálculo da atividade sequestrante pelo ensaio do DPPH.

$$atividade\ sequestrante = \left[1 - \frac{(DPPH)^f}{(DPPH)^o} \right] \times 100$$

(DPPH•)⁰ – Absorbância no início da reação – (somente amostra de DPPH)

(DPPH•)^f – Absorbância no final da reação

4.6 Animais

Neste estudo foram aplicados os princípios éticos da experimentação animal. O protocolo de pesquisa foi submetido à análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa e aprovado, segundo o parecer com o número de protocolo n°.064/2012.

Foram utilizados 36 coelhos (*Oryctolagus cuniculatus*) machos adultos, da raça Albino Nova Zelândia, com média de peso variando entre 2,0 a 3,0 kg. Os animais

foram adquiridos no Departamento de Zootecnia, setor de Cunicultura da UFV e mantidos em gaiolas individuais de aproximadamente 0,5 m² à temperatura ambiente. Os animais receberam diariamente 120 g de ração da marca Presence[®] e água potável ad libitum. Durante o experimento, os coelhos foram mantidos na área experimental do Laboratório de Biofármacos da UFV (Figura 18). Após sete dias de adaptação, os coelhos foram divididos em seis grupos aleatoriamente, de forma que cada grupo tivesse seis animais cada.

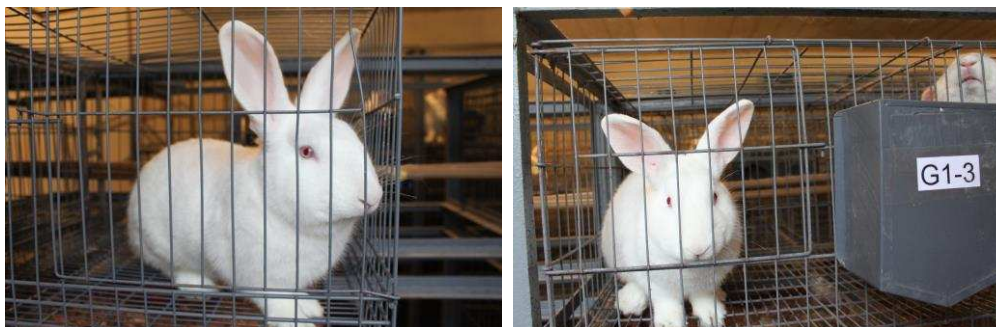


Figura 18: Coelhos da raça Albino Nova Zelândia

4.7 Indução das feridas

No período pré-operatório os coelhos foram tricotomizados na região dorsal-torácica com auxílio de máquina de tosa. Em seguida, receberam medicação anestésica de 50 mg/kg de cloridrato de quetamina (Dopalen[®]) e 10 mg/kg de xilazina (Anasedan[®]), adicionados na mesma seringa e administrados pela via intramuscular (região posterior da coxa - ventre dos músculos semitendíneo e semimembranáceo) (CEUA/FIOCRUZ, 2008). Após a perda do reflexo córneo-palpebral e ausência de reação motora pela preensão do coxim adiposo de sua pata dianteira, o que ocorreu em média 10 minutos após aplicação da combinação anestésica, o animal foi considerado anestesiado. Uma vez anestesiados, os animais foram colocados em posição de decúbito ventral horizontal sobre uma mesa cirúrgica apropriada. Realizou-se assepsia com solução de álcool etílico 70% na região tricotomizada e demarcação da área de cada ferida (1,5 cm x 1,5 cm) com caneta de demarcação cirúrgica na região torácica dorsal, o que limitou o acesso do animal à área de indução e/ou tratamento.

Após demarcação, foram realizadas duas feridas cirúrgicas cutâneas por excisão em cada coelho: uma com lâmina estéril de bisturi, denominada no modelo deste estudo como **Ferida**, e outra com ponteira estéril de bisturi elétrico, induzindo assim, uma ferida com bordas características de queimadura elétrica, denominada no modelo deste

estudo como **Queimadura**. Os cortes foram seccionados até a exposição da fáscia muscular (Figura 19). Todo procedimento operatório foi acompanhado e supervisionado por um médico veterinário.

No pós-operatório imediato, procedeu-se a compressão local com auxílio de uma gaze estéril para obter hemostasia. Após hemostasia, a região da ferida recebeu higienização com solução salina de cloreto de sódio a 0,9% morna, em jato, sem fricção, para remoção de resíduos sanguíneos presentes. Em seguida, as feridas foram medidas com paquímetro digital, fotografadas com máquina Canon[®] a 40 cm de distância e iniciado o tratamento tópico. Os coelhos foram devolvidos às suas gaiolas e observados quanto à recuperação anestésica, avaliando presença de atividade física e disposição para alimentar-se. Para o controle da dor, os animais receberam uma dose de 13 mg/Kg de paracetamol (Medley[®]), dissolvidos em 1 mL de água, via oral, a cada seis horas, nas primeiras 24 h após cirurgia (CEUA/UFV N°.64/2012).



Figura 19: Procedimento de indução de ferida por lâmina de bisturi e bisturi elétrico.

4.8 Organização dos grupos experimentais

A divisão dos grupos e a frequência do tratamento foram estabelecidas de acordo com a Tabela 02. Solução salina de cloreto de sódio 0,9% foi escolhida como controle negativo e a pomada fitoterápica comercial Fitoscar[®] (Aspen Farmacêutica) como controle positivo. Fitoscar[®] é composto pelo extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, na concentração de 6%, indicado como agente cicatrizante

em vários tipos de lesão. O tratamento foi realizado durante 14 dias, pois se pretendia avaliar o índice de maturação do colágeno. Tanto os cremes dos extratos e Fitoscar[®] foram aplicados com espátulas esterilizadas em quantidade suficiente para cobrir a ferida. A cada aplicação, o excesso de cremes e pomada foi retirado com pinças esterilizadas sem causar danos ao tecido lesionado. Solução salina foi aplicada na quantidade de 1 mL em temperatura morna, em forma de jatos.

Tabela 02: Grupos de coelhos utilizados na avaliação da atividade cicatrizante.

Grupos	Tratamentos	Aplicação
GSS	Feridas + solução salina 0,9%	1/dia
GI1%	Feridas + creme EHI 1%	1/dia
GI5%	Feridas + creme EHI 5%	1/dia
GA1%	Feridas + creme EHA 1%	1/dia
GA5%	Feridas + creme EHA 5%	1/dia
GFIT	Feridas + Fitoscar [®]	1/dia

Com o objetivo de avaliar o efeito cicatrizante de cada extrato independente com os grupos controles (GSS e GFIT), os resultados serão apresentados e analisados a partir da distribuição abaixo (Tabelas 03 e 04).

Tabela 03: Grupos de coelhos utilizados na avaliação da atividade cicatrizante tratados com solução salina, creme dos extratos hidroalcoólicos de ingá (EHI) 1% e 5% e, Fitoscar[®].

Grupos	Tratamentos	Aplicação
GSS	Feridas + solução salina 0,9%	1/dia
GI1%	Feridas + creme EHI 1%	1/dia
GI5%	Feridas + creme EHI 5%	1/dia
GFIT	Feridas + Fitoscar [®]	1/dia

Tabela 04: Grupos de coelhos utilizados na avaliação da atividade cicatrizante tratados com solução salina, creme dos extratos hidroalcoólicos de angico (EHA) 1% e 5% e, Fitoscar[®].

Grupos	Tratamentos	Aplicação
GSS	Feridas + solução salina 0,9%	1/dia
GA1%	Feridas + creme EHA 1%	1/dia
GA5%	Feridas + creme EHA 5%	1/dia
GFIT	Feridas + Fitoscar [®]	1/dia

4.9 Avaliação das feridas

As feridas foram avaliadas pelo Índice de Contração (IC), mensurado no 7º, 10º e 14º dia após confecção das feridas, com uso de paquímetro manual, em duas direções: o maior comprimento e a maior largura e calculado pela fórmula: $((\text{área inicial da ferida} - \text{área no dia da medida})/\text{área inicial}) \times 100$ (AGREN et al., 1997).

4.10 Dosagens de parâmetros sanguíneos

Todos os animais foram eutanasiados no 14º dia com overdose da associação de cloridrato de quetamina (200mg/kg,) e xilazina (40 mg/kg,), aplicados na mesma seringa via intramuscular (CEUA/FIOCRUZ, 2008). Amostra de sangue foi retirada por punção cardíaca e coletadas em tubos de polipropileno sem anticoagulante para análises bioquímicas sorológicas, com anticoagulante EDTA sódico para análises hematológicas, e mantidas sob refrigeração até o momento das análises.

Para análises bioquímicas, o sangue foi centrifugado a 7100 x g durante 15 minutos e retirados 500 µL do soro para quantificar os níveis de proteínas totais, cálcio, fósforo, colesterol total, triglicerídeos, glicose, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, gama glutamil transpeptidase (γ -GT), albumina e bilirrubina com uso de Kits comerciais e equipamento Auto-Analisador Multiparamétrico de Bioquímica – Alizé (Lisabio B652). Os micronutrientes cobre e zinco foram analisados por espectrometria de absorção atômica (Varian Techtron, mod. Spectra 220FS)

Foram analisados os parâmetros hematológicos de contagem total de eritrócitos (ERT), hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina globular média (HCM), concentração hemoglobínica globular média (CHCM), contagem de plaquetas (PLT), contagem total de leucócitos (LEU), monócitos (MON) e granulócitos (GRA) em analisador hematológico automático.

4.11 Análise estereológica

As feridas foram retiradas com margem de 1 cm de pele íntegra ao redor da lesão com profundidade até a fáscia muscular. As amostras de pele foram imediatamente fixadas em solução de formol 10% por 24 h e posteriormente inseridas

em frascos com álcool 70% até confecção das lâminas histológicas. Para confecção das lâminas, as amostras de pele foram desidratadas em etanol, clareadas em xilol, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo com 5 µm de espessura em cortes seriados. As lâminas foram coradas rotineiramente com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação de fibroblasto, vasos e células inflamatórias e, coloração picrosirius para diferenciação das fibras colágenas do tipo I e III sob microscopia de polarização.

As lâminas coradas com HE foram visualizadas usando microscópio de luz (BX-60® - Olympus, São Paulo, Brazil) conectado a uma câmera digital (QColor-3®, Olympus, São Paulo, Brazil). Usando uma lente objetiva de 20X, dez campos de cada lâmina foram fotografados aleatoriamente, fazendo uma área total de tecido de $7,2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ submetido à análise estereológica. Para esta análise, uma grade contendo 300 pontos dentro de uma área teste padrão (AT) de $1,2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ foi sobreposta a cada imagem. Os parâmetros estereológicos de densidade volumétrica (Vv) foram calculados para fibroblasto, vaso sanguíneo, células inflamatórias, colágeno tipo I e III, usando a razão: $Vv = Pp/PT$; na qual Pp é o número de pontos que ocorria sobre a estrutura de interesse e PT é o número total de pontos no sistema teste (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003; GONÇALVES et al., 2013).

Análise do colágeno foi baseada na propriedade de birrefringência das fibras de colágeno, uma vez que sob a polarização, as fibras colágenas grossas (tipo I) aparecem em tons de cores brilhantes que vão do vermelho ao amarelo, ao passo que as fibras reticulares finas (colágeno tipo III) aparecem em verde brilhante. O índice de maturação do colágeno (IMaC) foi calculado pela razão entre as porcentagens de densidade volumétrica do colágeno tipo I por tipo III, onde valores acima de um (1) representam predominância de colágeno tipo I e os abaixo de 1 representam predomínio de colágeno tipo III (COELHO-LEMOS et al., 2004). Análise estereológica foi realizada utilizando o software Image Pro-Plus, versão 4.5 (Media Cybernetics®, Prata Spring, EUA).

4.12 Análise estatística

Os resultados foram analisados no programa MINITAB® versão 16.1.0. A análise estatística utilizou o método de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey com $p < 0,05$ (5%) para as diferenças estatísticas significativas.

Independentemente de a interação ser ou não significativa optou-se pelo

desdobramento da mesma realizando o teste de Dunnet ao nível de 5% de probabilidade, devido ao interesse em estudo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Prospecção fitoquímica dos extratos hidroalcoólicos da casca de *Inga subnuda* e *Pseudopiptadenia contorta*.

Os resultados obtidos em relação às determinações de metabólitos secundários mostram presença de taninos condensados (tonalidade azul com formação de precipitado); flavanonóis (coloração vermelho-laranja em pH 11) e saponinas (espuma persistente por mais de 15 minutos). Os resultados foram negativos para xantonas (Tabela 05).

Tabela 05: Prospecção fitoquímica dos extratos hidroalcoólico de *Inga subnuda* e *Pseudopiptadenia contorta*.

Metabólitos secundários	I. subnuda	P. contorta
	Resultado	Resultado
Fenóis	(-)	(-)
Tanino hidrolizável	(-)	(-)
Tanino condensável	(+)	(+)
Antocianinas e antocianidinas	(-)	(-)
Flavononóis	(+)	(+)
Flavonóis, flavanonas, flavonóis e xantonas	(-)	(-)
Saponinas	(+)	(+)

Legenda: (+) presença; (-) ausência.

Os resultados indicam a presença de metabólitos secundários que estão relacionados com atividades biológicas benéficas no tratamento de várias patologias. Os compostos fenólicos, como os flavonóis, agem como antioxidantes, neutralizando os radicais livres, possuem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune, apresentam ação anti-inflamatória, analgésica e regenerativa de cartilagens (CHEN et al., 2005; MENEZES et al., 2005; FERNANDEZ-JUNIOR, et al., 2006). Os flavonóis apresentam coloração amarelo pálido, e como principais representantes os flavonoides quercetina, rutina, mircetina e kaempferol (PETERSON & DWYER, 1998). Taninos são empregados na medicina tradicional no tratamento de hipertensão arterial,

reumatismo, feridas, antioxidante, anti-hemorragico, cicatrizante, anti-ulcerogênico e anti-inflamatório em geral. Segundo MENDES et al. (2011) a presença de taninos e flavonoides pode conferir atividade antimicrobiana a um extrato. Em processo de cura de feridas, queimaduras e inflamação, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, permitindo que, logo abaixo dessa camada, o processo de reparação tecidual ocorra naturalmente (MELLO & SANTOS, 2001).

LEITÃO et al. (1999) identificaram no extrato das folhas de *P. contorta* flavonóides como a proantocianidina. Proantocianidina são comumente conhecidas por suas atividades biológicas antivirais, anticancerígenas, antioxidante e antimicrobiológicas (HASLAM, 1996; FOO et al., 2000). MOREIRA et al. (2002) relataram atividades antioxidantes e antivirais do extrato bruto (acetona/água 7:3) das folhas de *P. contorta* e suas frações. Entretanto, nenhum estudo foi realizado com as cascas de *P. contorta*.

Diferentes estudos apontaram que outras espécies do mesmo gênero *Inga* são fontes de biomoléculas. Alguns trabalhos demonstraram a presença de compostos bioativos em *Inga edulis*. Em suas folhas foram identificados alguns compostos fenólicos: ácido gálico, catequina, epicatequina, quercetina-3-O-a-L-glucopiranosídeo, quercetina-3-O-a-L-ramnopiranosídeo e miricetina-3-O-a-L-ramnopiranosídeo (SOUZA et al., 2007). Nas raízes foram identificados: 5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-metoxiflavona, 6,3',4'-tri-hidroxiaurona e 5,7,4'-tri-hidroxi-6,8-dimetilflavonona (CORREA et al., 1995).

Na área farmacêutica, as leguminosas constituem-se fontes de alto potencial farmacológico ou de compostos com aplicações diretas nos processos de industrialização de produtos farmacêuticos. Assim, a investigação de extratos obtidos tanto da madeira quanto da casca, sementes e folhas dessas plantas podem conduzir à caracterização e isolamento de metabólitos com atividades biológicas e a novos materiais para a indústria de cosméticos, alimentícia, madeireira e em outras aplicações. Como primeiro passo, analisar fitoquimicamente os extratos quanto à presença dos grupos ou classes de metabólitos mais relevantes, e depois segue as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal. Para a identificação de substâncias, podem-se realizar reações de caracterização diretamente sobre o tecido do material vegetal. Nos tecidos lenhosos, como na madeira, deve-se primeiro extrair as substâncias com um solvente adequado, para então

caracterizá-las. As substâncias ou compostos químicos que ocorrem com bastante frequência nos vegetais lenhosos, como na madeira, são fenóis, flavonoides e derivados, terpenos, alcalóides, compostos cianogênicos, quinonas, e outros (FENGEL & WEGENER, 1984; SANTOS, 2003; SIMÕES et al., 2003).

5.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•. Radical livre, ou simplesmente radical, pode ser definida como uma partícula (atômica ou molecular) que possui um elétron desemparelhado numa orbital (atômica ou molecular) externa. Esta definição exclui os átomos dos metais de transição, mas inclui átomos de metais alcalinos e de halogênios (Na• , Cl• , etc.) (CORRÊA, 2014). A formação de radicais livres in vivo ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (fatores endógenos) e pela exposição a fatores exógenos (ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro, etc.)

Os antioxidantes são substâncias que reagem com radicais livres, impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo e a consequente destruição tissular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Entre os antioxidantes mais conhecidos presentes nos vegetais estão as vitaminas, principalmente C e E, e os flavonóides, entre os quais se pode citar quercetina, rutina, hesperidina, naringina, naringenina, e sakuranetina. Estudos mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis (MELLO & SANTOS, 2001).

As porcentagens encontradas de atividade antioxidante, pelo método de DPPH, para os extratos hidroalcoólicos das cascas de *P. contorta* (angico), *I. subnuda* (ingá) estão apresentados na Tabela 06. Foi utilizado extrato de *Gingko biloba* como referência de comparação para atividade antioxidante.

Os resultados mostram que o tempo final de reação do extrato de *P. contorta* (angico) foi aos 45 minutos atingindo a porcentagem de atividade antioxidante de 48,18%. Já o tempo final de reação do extrato de *Inga subnuda* foi de 80 minutos, atingindo 67,83% de atividade antioxidante pelo teste de DPPH. O tempo de reação do extrato de *Gingko biloba* foi de 40 minutos e 36,50% de atividade antioxidante.

Tabela 06: Valores de absorbância e porcentagem de atividade antioxidante do controle positivo Gingko biloba e, dos extratos de Pseudopiptadenia contorta e Inga subnuda na concentração de 5 µm/mL em diferentes tempos de observação.

Tempo de reação da amostra	Gingko biloba	Atividade Antioxidante	P. contorta	Atividade Antioxidante	I. subnuda	Atividade Antioxidante
Minutos	Absorbância		Absorbância	%	Absorbância	%
0	0,934	27,76%	0,821	36,50%	0,814	37,05%
5	0,885	31,55%	0,744	42,46%	0,595	53,98%
10	0,868	32,87%	0,726	43,85%	0,567	56,15%
15	0,857	33,72%	0,71	45,09%	0,544	57,93%
20	0,848	34,42%	0,7	45,86%	0,524	59,47%
25	0,839	35,11%	0,692	46,48%	0,508	60,71%
30	0,831	35,73%	0,685	47,02%	0,494	61,79%
35	0,825	36,19%	0,68	47,41%	0,482	62,72%
40	0,821	36,50%	0,675	47,80%	0,471	63,57%
45			0,67	48,18%	0,462	64,27%
50					0,452	65,04%
55					0,444	65,66%
60					0,438	66,13%
65					0,43	66,74%
70					0,424	67,21%
75					0,419	67,59%
80					0,416	67,83%

Tanto extrato de ingá como de angico apresentaram maior atividade antioxidante quando comparado ao Gingko biloba. O extrato de Ginkgo biloba é uma mistura padronizada de substâncias ativas obtidas das folhas verdes da árvore Ginkgo biloba L.

Os resultados da prospecção fitoquímica dos extratos de I. subnuda e P. contorta mostram a presença de flavonoides (flavonóis), taninos e saponinas. Os taninos atuam como captadores de radicais e interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis (MELLO & SANTOS, 2001). O flavonol quercetina impede o dano oxidativo e morte celular eliminando radicais de oxigênio, protegendo contra a peroxidação lipídica e interrompendo a reação em cadeia de formação de radicais livres, quelando íons metabólicos para formar complexos inertes que não participarão da conversão de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio em radicais hidroxila (COTELLE, 2001). Estudos com a aplicação tópica de componentes com propriedade de limpeza de radicais livres têm mostrado que estes melhoram significativamente o processo cicatricial e protegem o tecido do dano oxidativo (GOMATHI et al., 2003).

5.3 Análise dos resultados de ferida e queimadura tratadas com extrato de *Inga subnuda*

5.3.1 Parâmetros hematológicos

O grau de segurança no uso de drogas só pode ser avaliado quando se analisa uma série de fatores, relacionados não somente com as propriedades físicas, químicas e farmacodinâmicas das drogas, mas também com as características biológicas do indivíduo. É importante observar alterações físicas e comportamentais, além de parâmetros bioquímicos e hematológicos. A interpretação dos resultados é específica para cada constituinte em particular, mas existem princípios básicos e associações que devem ser seguidas (KEER, 2003). Junto com a avaliação do processo de cicatrização, foram realizadas dosagens de alguns parâmetros sanguíneos dos coelhos.

A tabela 07 apresenta os valores hematológicos para coelhos conforme dados da literatura. A tabela 08 apresenta os parâmetros hematológicos avaliados neste estudo. Os resultados mostram que os parâmetros hematológicos de todos os grupos mantiveram-se dentro dos padrões de normalidade para coelhos.

Tabela 07: Valores hematológicos de referência para coelhos machos adultos, encontrados na literatura.

Referência	ERT	HCT	HGB	VCM	HCM	CHCM	PLT	LEU	LINF	MON	GRA
	10 ⁶ /mm ³	%	g/dL	fL	Pg	g/dL	10 ³ /mm ³	10 ³ /mm ³	%	%	%
Brito et al.		33,0 a	10,0 a	57,8 a	17,1 a	29,0 a	250,0 a	5,2 a	30,0 a	1,0 a	20,0 a
2004	5,1 a 7,9	55	17,4	70,4	23,5	37,0	650,0	12,5	85,0	4,0	75,0
Campbell		36,6 a	5,2 a				250,0 a	6,0 a			
2006	5,0 a 6,8	47,4	6,8	-	-	-	610,0	10,0	-	-	-
Paiva et al.									20,0 a	6,0 a	30,0 a
2005	4,5 a 7,0	41,5	13,6	-	-	-	-	9,0	90,0	30,0	50,0
Quesenberry											
1994	6,4	45,5	11,1		17,3	-	310,0	13,0	53	4,8	39,0
Silva et al.		39,0 a	11,4 a	70,8				8,0 a	36,0 a	2,0 a	28,0 a
2008	4,9 a 5,6	41	12,5	70,0 a	-	31,3 a	-	8,8	41,0	4,0	31,0
Trindade				73,7		33,4		5,9 a			
1954	5,2	-			-	-	-	14,5	50,0	6,5	40,0

Legenda: Contagem total de eritrócitos (ERT), hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina globular média (HCM), concentração hemoglobínica globular média (CHCM), contagem de plaquetas (PLT), contagem total de leucócitos (LEU), monócitos (MON) e granulócitos (GRA). Fonte: CARVALHO, 2010.

Tabela 08: Média dos valores hematológicos dos diferentes grupos experimentais aos 14 dias após a realização das feridas nos animais.

Grupos	ERT	HCT	HGB	VCM	HCM	CHCM	PLT	LEU	LINF	MON	GRA
	10 ⁶ /mm ³	%	g/dL	fL	Pg	g/dL	10 ³ /mm ³	10 ³ /mm ³	%	%	%
GSS	5,60a	37,5a	12,0a	67,0a	21,6a	32,25a	262,3a	9,68a	46,2a	7,28a	46,5a,b
GI1%	5,79a	36,7a	11,6a	61,7b	20,1a	31,65a	338,8a	6,77a	47,8a	6,22a	46a,b
GI5%	5,68a	36a	11,6a	63,5a,b	20,5a	32,28a	337,8a	7,4a	57,5a	6,17a	36,2b
GFIT	5,58a	35,8a	11,7a	64,3a,b	21,1a	32,72a	428,2a	6,44a	44,9a	6,38a	48,7a

Legenda: Contagem total de eritrócitos (ERT), hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina globular média (HCM), concentração hemoglobínica globular média (CHCM), contagem de plaquetas (PLT), contagem total de leucócitos (LEU), monócitos (MON) e granulócitos (GRA). Teste de Tukey. Grupo tratado com solução salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar® (GFIT). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Apesar dos valores hematológicos estarem dentro da normalidade, a análise estatística mostrou diferença significativa entre os grupos para as medidas de volume corpuscular médio (VCM) e porcentagem de granulócitos (GRA). O grupo GI1% apresentou menor valor médio de VCM (61,7%) e o grupo GI5% o menor valor médio de granulócitos (36,2%). Os dados encontrados neste estudo são semelhantes aos de estudos realizados com água-de-coco e água magnetizada ingerida por coelho com feridas, no qual os parâmetros hematológicos se apresentaram dentro dos valores de normalidade (CARVALHO, 2010).

Alguns fatores podem influenciar o perfil hematológico dos animais, como sexo, linhagem, genótipo, idade, dieta, ambiente, entre outros (SANTOS et al., 2010). Para resultados obtidos neste experimento, estes fatores não variavam e as diferenças entre os valores hematológicos podem ter ocorrido por influência dos tratamentos utilizados ou pela variabilidade individual.

O volume corpuscular médio é o índice que auxilia na observação do tamanho das hemácias e no diagnóstico da anemia. Pela clínica, um VCM mais baixo, diminui a capacidade de carrear oxigênio e com isso retardo na cicatrização em algum nível (BAFFA et al., 2005).

Os granulócitos são importantes na fagocitose e eliminação de microrganismos, principalmente no combate às infecções bacterianas (PEREIRA, 2012). Evidências sugerem que a presença de bactérias na ferida interfere em várias etapas do processo de cicatrização. A infecção prolonga a fase inflamatória e interferem na epitelização, contração e deposição de colágeno. As endotoxinas e metaloproteases bacterianas

alteram a resposta inflamatória na ferida e liberam collagenases que contribuem para o turnover de colágeno e destruição tecidual (PAGGIARO, 2010).

5.3.2 Parâmetros bioquímicos

A tabela 09 apresenta os resultados para os parâmetros proteínas totais e albumina. Os resultados mostram que houve diferença significativa entre os grupos para proteínas totais e albumina ($p < 0,05$), sendo que o grupo tratado com Fitoscar[®] foi o que apresentou menores valores médios para os dois parâmetros (Tabela 09). Ao se comparar cada grupo com o grupo tratado com solução salina, observa-se que o GFIT apresentou redução de 9,97% para proteínas totais e 8,69% para albumina. O grupo G1% apresentou maiores valores médios para proteínas totais (60,92 g/L) e albumina (4,52 g/L).

Tabela 09: Valores médios de proteínas totais e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de ingá 1% (GI1%) e 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.

Grupos	Proteínas totais (mg/dL)			Albumina (g/L)		
	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var
GSS	60,15	2,63a		4,37	0,28a,b	
GI1%	60,92	2,61a	1,28	4,52	0,19a	3,43
GI5%	59,38	3,1a	-1,28	4,28	0,15a,b	-2,06
GFIT	54,15	1,85b	-9,97	3,99	0,19b	-8,69

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Pelos resultados apresentados, podemos sugerir que as substâncias (biomoléculas) e concentrações presentes no extrato de ingá 1% favoreceram a produção e/ou manutenção dos níveis de proteína e albumina. Geralmente, em processos inflamatórios, proteínas e albumina apresentam baixos níveis, pois durante a inflamação há aumento da atividade collagenase elastase, entre outras proteases que hidrolisam proteínas teciduais. É possível que alguma substância participante do processo de reconstituição do colágeno requeira mais proteína da corrente sanguínea para os tecidos (SAMUELSEN, 2000).

Um dos objetivos da medida de albumina é pesquisar a quantidade de substâncias que ela possa transportar no plasma. Se esta se encontra reduzida no

plasma, provavelmente uma menor quantidade de substâncias será transportada. A síntese de albumina geralmente é reduzida por citocinas inflamatórias (MOTTA, 2009). As lesões ou queimaduras resultam na perda direta de albumina, comprometendo o fluxo sanguíneo (GAW et al., 2001). Pelos resultados apresentados neste estudo, as moléculas bioativas do extrato de ingá 1% e 5% conseguiram minimizar esta perda de albumina pela lesão nos coelhos. Entretanto, o mesmo não aconteceu com o grupo tratado com a pomada Fitoscar[®], que apresentou menores níveis de albumina e proteínas totais. Estes resultados estão de acordo com a literatura, que afirma que durante a cicatrização proteínas como albumina, lipoproteínas e properdina estão diminuídas (GAW et al., 2001).

Não houve diferença significativa entre os grupos para os teores de cálcio e zinco plasmático (Tabela 10). Os maiores valores médios de cálcio foram encontrados nos grupos tratados com ingá 1%, seguido pelo grupo Fitoscar[®], com concentração média de 7,83 e 7,59 mg/dL, respectivamente. Já para os teores de zinco, os grupos tratados com solução salina e extrato de ingá 5% apresentaram as maiores médias, com 0,46 e 0,42 mg/dL, respectivamente. Todas as concentrações, no entanto, se mantiveram dentro das variações normais em coelhos, as quais se situam entre 5,84 e 14,4 mg/dL (LIMA et al., 2003).

Tabela 10: Valores médios de cálcio (Ca) e zinco (Zn) em soro sanguíneo de coelhos tratadas com solução salina (GSS), extrato de ingá 1% (GI1%) e 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.

Grupos	Ca (mg/dL)			Zn (mg/dL)		
	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var
GSS	7,47	2,35a		0,46	0,12a	
GI1%	7,83	1,66a	4,82	0,38	0,02a	-17,39
GI5%	7,27	1,72a	-2,68	0,42	0,03a	-8,69
GFIT	7,59	1,16a	1,61	0,4	0,05a	-13,04

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Reduções nas concentrações de albumina em soro de pacientes sadios, geralmente produzem mudanças na concentração de cálcio total, uma vez que existe uma fração do cálcio ligado à albumina plasmática (GAW et al., 2001). Reduções de cálcio e albumina foram detectadas apenas no grupo tratado com ingá 5%. Entretanto,

estas reduções foram discretas, o que não permite dizer que houve um estado de hipocalcemia.

O cálcio exerce várias funções no organismo: participa da coagulação sanguínea, do metabolismo ósseo, influi no transporte de membranas celulares, afeta a transferência dos íons através das organelas, facilita a liberação dos neurotransmissores, atua na liberação e ativação de enzimas, entre outras. Os seus níveis são alterados principalmente em hiperparatireoidismo, hipervitaminose D, transplantes de rins, neoplasias, síndrome nefrótica, pancreatite aguda e também pelo uso de diuréticos (LIMA et al., 2003).

Trabalho realizado por ARAÚJO (2010) com fitoderivados (extratos de marcela, tanchagem, assa-peixe) na cicatrização de feridas cutâneas em coelhos mostram reduções significativas de cálcio no soro sanguíneo. O autor atribuiu tais reduções a algum componente da formulação dos fitoderivados, que esteja favorecendo a reconstituição do tecido epitelial, e então promovendo a utilização de cálcio do sangue para os tecidos, diminuindo assim, sua concentração no plasma.

Apesar de não ter ocorrido diferenças entre os grupos para o parâmetro zinco (Tabela 10), todos os grupos apresentaram reduções em relação ao grupo tratado com solução salina, sendo que os grupos GI1% e GFIT reduziram 17,31% e 13,04%, respectivamente.

No corpo humano, o zinco, encontra-se concentrado da seguinte forma: 57% na musculatura esquelética, 29% nos ossos, 6% na pele e 5% no fígado, além de estar presente em secreções e fluidos corporais (OLIVEIRA & MARCHINI, 1998). O fígado é o órgão mais importante na regulação da homeostase do zinco. Níveis reduzidos de zinco têm sido relacionados tanto a estados agudos quanto crônicos de doença hepática, mas sua propriedade hepatoprotetora não foi completamente esclarecida (STAMOULIS et al., 2007). Na deficiência moderada de zinco ocorre letargia mental e redução do apetite, retardo do crescimento e da puberdade, pele espessa e dificuldade para cicatrização (BRASILEIRO FILHO, 2006).

No processo de cicatrização o zinco é fundamental para a coagulação sanguínea. O zinco atua amplificando a proliferação das células, aumentando a epitelização e melhorando a resistência do colágeno durante o processo de cicatrização da ferida (DEALEY, 2001). A carência de zinco também compromete a fase de epitelização das feridas. Os valores de zinco encontrados neste trabalho parecem não comprometer a integridade do fígado e nem no processo de cicatrização.

A Tabela 11 apresenta os resultados de cobre e fósforo. Os resultados mostram que houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Ao analisar os valores médios dos grupos com o grupo tratado com solução salina, verifica-se que todos os grupos apresentaram aumento no mineral cobre, sendo o GFIT apresentou aumento de 54,17% e GI5% aumento de 37,5%. Os grupos GI1%, GI5% e GFIT apresentaram menores níveis de fósforo quando comparado ao grupo GSS. O GFIT apresentou maior redução, com 23,37%, seguido pelos grupos GI5% (13,95%) e GI1% (13,04%).

Tabela 11: Valores médios de cobre (Cu) e fósforo (P) em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de ingá 1% (GI1%) e 5% (GI5%) e pomada Fitoscar® (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.

Grupos	Cu (mg/dL)			P (mg/dL)		
	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var
GSS	0,24	0,06b		5,52	1,17a	
GI1%	0,26	0,05a,b	8,33	4,80	0,41a,b	-13,04
GI5%	0,33	0,06a,b	37,5	4,75	0,62a,b	-13,95
GFIT	0,37	0,07a	54,17	4,23	0,52b	-23,37

Legenda: Grupo tratado com solução salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar® (GFIT). Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

O cobre atua na cicatrização de feridas contribuindo na síntese de colágeno e na formação de leucócitos (DEALEY, 2001). DANTAS & JORGE (2005) afirmam que o cobre participa da maturação do colágeno e síntese de elastina, e também atua como antioxidante. Sua atividade antioxidante auxilia no processo de cicatrização. Pode-se sugerir que componentes bioativos dos extratos de ingá e também da formulação da pomada Fitoscar® promoveram o aumento de concentração de cobre no soro sanguíneo dos coelhos. Pelo teste antioxidante de DPPH realizado neste estudo, extrato de ingá atingiu uma atividade antioxidante de 67,8%, mostrando ser mais efetivo que o padrão Gingko biloba (36,5%). Os resultados de cobre e atividade antioxidante podem estar relacionados.

Estes resultados foram diferentes aos de ALVARENGA (2008) que constatou aumento nos níveis de fósforo em coelhos tratados com extrato de Cissus verticillata. O fosfato intracelular mantém funções como: contractibilidade muscular, função neurológica e transporte eletrolítico. Aumento do catabolismo ou dano celular pode ocorrer no trauma, queimaduras, acidose láctica, cetoacidose diabética e alcoólica, elevando-se, portanto, os níveis de fósforo plasmático (MOTTA, 2003).

Pode-se sugerir que, o extrato de ingá e pomada Fitoscar[®] não permitiram o possível catabolismo ou dano celular gerado pela indução da queimadura neste experimento e, por isso, o nível de fósforo foi menor nestes grupos tratados.

A Tabela 12 apresenta os resultados das concentrações das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamil transpeptidase (γ -GT). Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos para todos os três parâmetros analisados ($p>0,05$).

Ao se comparar todos os grupos com o grupo tratado com solução salina, observa-se uma redução nos níveis de AST, sendo o grupo GI5% o que apresentou maior redução (50,8%). Em relação ao ALT, o grupo GI1% apresentou redução de 24,05% em relação ao grupo GSS, seguido pelo GI5% (13,93%). Os valores encontrados para o parâmetro γ -GT mostram que houve um aumento neste parâmetro nos grupos GFIT e GI5%, de 14,86% e 4,47%, respectivamente.

Tabela 12: Valores médios de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transpeptidase (γ -GT) em soro sanguíneo de coelhos e feridas tratadas com solução salina (GSS), extrato de ingá 1% (GI1%) e 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.

Grupos	AST (U.I)			ALT (U.I)			γ -GT (U.I)		
	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var
GSS	49,83	19,56a		61,00	36,92a		11,17	4,12a	
GI1%	37,33	11,64a	-25,1	46,33	10,71a	-24,05	10,17	1,47a	-8,95
GI5%	24,5	4,42a	-50,8	52,50	16,62a	-13,93	11,67	4,08a	4,47
GFIT	32,67	6,98a	-34,4	64,67	31,66a	6,02	12,83	4,79a	14,86

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Os resultados foram semelhantes aos de ALVARENGA (2008) em que observou reduções nos níveis sanguíneos das enzimas AST e ALT em coelhos com feridas e tratadas com géis de extrato de *Cissus verticillata*.

As aminotransferases catalizam a transferência reversível de grupos amino de um aminoácido para o alfa-ceto-glutarato, tendo piridoxal fosfato como coenzima. As reações catalisadas por estas aminotransferases exercem papéis centrais tanto na síntese como na degradação de aminoácidos, atuando como uma ponte entre o metabolismo de aminoácidos e carboidratos.

Níveis elevados da enzima AST ocorrem em hepatites infecciosas, hepatopatias crônicas, icterícias, infarto do miocárdio. Atividades elevadas de ALT ocorrem em doenças hepatobiliares, uma vez que esta enzima é encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito. Em dano hepatocelular leve há aumento da enzima citoplasmática, a ALT (LIMA, 1985). Níveis muito elevados de AST e ALT sugerem a presença de hepatite viral aguda ou obstruções nas vias biliares. Pelos resultados encontrados neste experimento podemos sugerir que embora tenham ocorrido reduções das aminotransferases, seus valores ainda encontram semelhantes aos do grupo tratado com solução salina, o que descarta a possibilidade de um dano hepático causado pelo extrato de ingá.

A enzima γ -GT é uma enzima sensivelmente indicadora de doenças hepáticas (MURRAY et al., 1994). Está presente principalmente no fígado, rins e pâncreas, e atua no transporte de aminoácidos e peptídeos por meio das membranas celulares, na síntese proteica e na regulação dos níveis de glutathione tecidual. A atividade aumentada de γ -GT pode significar, dentre outras doenças, esteatose hepática, hepatites medicamentosas e infecciosas, neoplasmas, fibrose cística ou câncer prostático ou a indução de aumento de sua atividade por determinados fármacos (MOTTA, 2003).

A avaliação dos parâmetros sanguíneos de γ -GT, AST e ALT demonstraram que os compostos testados por via tópica não ocasionaram efeitos adversos significativos no metabolismo hepático dos coelhos, portanto, não sendo considerados tóxicos para fígado.

A tabela 13 apresenta os resultados para bilirrubina total e fosfatase alcalina. A atividade da fosfatase alcalina do GI5% aumentou 9,6% em relação ao grupo GSS. Resultado diferente foi obtido pelo GI1% que reduziu 7,1% em relação ao GSS. Estes resultados foram semelhantes aos de ALVARENGA (2008). Ao analisar os resultados de bilirrubina total, os grupos GFIT e GI5% apresentaram reduções de 28,3% e 30,3%, respectivamente quando comparados ao grupo GSS. Esta diferença não foi significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Tabela 13: Valores médios de bilirrubina total e fosfatase alcalina em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de ingá 1% (GI1%) e 5% (GI5%) e pomada Fitoscar® (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.

Grupos	Bilirrubina total (mcg/dL)			Fosfatase alcalina (U/L)		
	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var
GSS	20,07	3,91a		59,00	15,27a	
GI1%	19,47	5,56a	-3,0	54,83	15,05a	-7,1
GI5%	13,98	3,01a	-30,3	64,67	12,96a	9,6
GFIT	14,39	6,69a	-28,3	58,17	44,40a	-1,4

Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

A fosfatase alcalina (FAL) é uma enzima fosfohidrolase, encontrada em vários tecidos, com maiores concentrações no fígado, no epitélio do trato biliar e nos ossos. No fígado, a FAL é secretada pelos hepatócitos e pelas células da mucosa do trato biliar. Geralmente qualquer hepatopatia ativa pode aumentar os valores de FAL, mas as maiores elevações nos níveis da enzima ocorrem nos casos de obstrução do trato biliar. Nos casos de drogas hepatotóxicas, as elevações da enzima são menores (VASCONCELOS et al., 2007).

A hiperfosfataseemia alcalina ocorre na obstrução intra-hepática em carcinomas hepatocelulares, hepatites, cirroses, por efeito de diversos fármacos (anti-fúngicos, benzodiazepínicos, anabolizantes, anti-hipertensivos e anti-inflamatórios não esteroidais). Os resultados na tabela 13 mostram que os valores de fosfatase alcalina foram semelhantes entre os grupos tratados com extrato de ingá 1% e 5% e o grupo tratado com solução salina, o que é um indicativo que os bioativos presentes no extrato não exerceram efeito de elevar a atividade dessa enzima.

As bilirrubinas são produtos da quebra da molécula heme da hemoglobina. Cerca de 70% a 80% da bilirrubina são provenientes da destruição dos eritrócitos velhos, 15% de fontes hepáticas, e o restante é proveniente da destruição das hemácias defeituosas na medula óssea. Quando o valor sanguíneo da bilirrubina total está elevado o paciente pode apresentar icterícia. Os resultados deste trabalho não apresentaram elevação de bilirrubina nos animais tratados com extrato de ingá, o que sugere que estes animais não apresentaram quadro de icterícia ou dano hepático.

A tabela 14 apresenta os resultados de glicose, triacilglicerol e colesterol total. Os resultados mostram que não houve diferença significativa pelo teste de Tukey ($p>0,05$) entre os grupos para estes três parâmetros analisados.

A concentração de glicose no plasma não variou entre os tratamentos. Houve redução insignificante nos valores de glicose quando comparado ao grupo tratado com solução salina.

Em relação às concentrações de triacilgliceróis, os resultados mostram que houve uma redução em todos os grupos quando comparado ao grupo solução salina, embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey. O grupo GI5% apresentou maior redução (55,1%), seguido pelos grupos GFIT (50,9%) e GI1% (19,5%).

A análise do colesterol mostrou que os grupos tratados com extrato de ingá 1% e 5% apresentaram reduções de 18,2% e 10,9% quando comparado ao grupo GSS. Já o grupo tratado com Fitoscar[®] apresentou um aumento de 25,9%.

Tabela 14: Valores médios de glicose, triacilglicerol e colesterol total em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de ingá 1% (GI1%) e 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.

Grupos	Glicose (mg/dL)			Triacilglicerol (mg/dL)			Colesterol (mg/dL)		
	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var
GSS	113,0	9,03a		71,80	49,17a		54,52	13,01a	
GI1%	108,7	6,8a	-3,8	57,8	32,69a	-19,5	44,60	28,80a	-18,2
GI5%	111,5	7,42a	-1,3	32,20	13,65a	-55,1	48,53	08,08a	-10,9
GFIT	109,5	8,02a	-3,1	35,2	17,89a	-50,9	68,67	37,62a	25,9

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. N=6.

A nutrição é um dos aspectos determinantes no sucesso do processo de cicatrização, pois a dinâmica da regeneração tecidual exige um adequado estado nutricional do paciente e consome boa parte de suas reservas corporais. Estudos realizados por DEALEY (2001) mostraram que pacientes desnutridos apresentaram cicatrização deficiente e, após a introdução de nutrição intravenosa nestes mesmos pacientes, houve melhora significativa na cicatrização.

As calorias fornecidas por carboidratos e lipídeos possibilitam que as proteínas sejam destinadas para seus fins construtivos e impedidas de serem convertidas à glicose e consequentemente energia. Além disso, glicose é a principal fonte de energia para fibroblastos e leucócitos e sua carência resultará em prejuízo no funcionamento celular (PAVLETIC, 2010). Já os lipídeos estão envolvidos na provisão de energia e formação de novas células.

Os resultados de carboidratos e lipídeos, apresentados neste trabalho, mostram que os tratamentos utilizados não influenciaram no metabolismo energético dos animais. Além disso, pode-se sugerir que as lesões induzidas nos animais não provocaram um catabolismo energético considerável, uma vez que os valores de carboidratos e lipídeos foram semelhantes entre os grupos.

5.3.3 Avaliação clínica dos animais e feridas

A frequência de aplicação de um potencial fitoterápico não está padronizada na literatura. Também não está padronizado o uso do fitoterápico via oral associado ao uso tópico, o que poderia potencializar o seu efeito curativo. Neste estudo foi escolhido o tempo experimental de 14 dias, assim como outros estudos que usaram o mesmo período de avaliação (TRESVENZOL et al., 2013; SÉRVIO et al., 2011).

Durante todo o estudo, as feridas e queimaduras não apresentaram sinais macroscópicos de infecção nos grupos. A partir do segundo dia de tratamento, houve formação de uma crosta nas feridas em todos os grupos avaliados. Também não foi constatada perda de peso dos animais após os primeiros dias da cirurgia e nem durante o experimento. Ao final de 14 dias, a média do peso dos coelhos aumentou em 450g. A redução do peso está relacionada com processo inflamatório, na qual ocorre produção de interleucinas inflamatórias e fator de necrose tumoral. Este, por sua vez, pode causar perda de peso, devido à estimulação da elevação da leptina (PASCHOALINI et al., 2005).

A Tabela 15 apresenta os valores de índice de contração (expressa em %) das feridas cirúrgicas produzidas por lâmina de bisturi (Ferida) em coelhos e tratados com extrato de ingá nas concentrações 1 e 5% e substâncias controles. A representação fotográfica do índice de contração está representada na Figura 20.

Tabela 15: Percentual médio de contração em relação ao tamanho original das feridas dos grupos tratados com solução salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) no 7º, 10º e 14º dia pós-operatório.

Grupos	Índice de Contração da Ferida (%)					
	7º dia		10º dia		14º dia	
	Média	σ	Média	σ	Média	σ
GSS	13,29	9,91a	40,33	24,1a	79,97	7,74a,b
GI1%	13,27	19,18a	35,61	12,51a	80,59	5,72b
GI5%	19,25	10,52a,b	60,88	7,72a	69,94	11,17a,b
GFIT	41,42	16,74b	48,46	19,94a	65,51	10,75a
Valor de p	0,009		0,092		0,022	

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

No 7º dia, os grupos tratados com Fitoscar[®] e extrato de Ingá 5% apresentaram as maiores porcentagens de contração da ferida, reduzindo a área da ferida em 41,4% e 19,2%, respectivamente (Tabela 15).

No 10º dia as maiores porcentagens de contração da ferida foram obtidas nos grupos GI5% (60,88%), seguida pelos grupos GFIT (48,46%), GSS (40,33%) e GI1% (35,61%). Ao se comparar cada grupo com o grupo controle negativo (GSS), verifica-se que o GI5% foi o que apresentou maior porcentagem de contração (51%) (Tabela 15).

No 14º dia, o grupo GI1% apresentou maior índice de contração (80%) e o grupo GFIT, o menor índice (65%). Não houve completo fechamento das feridas no tempo avaliado.

A tabela 16 apresenta o índice de contração em relação aos intervalos de medida, ou seja, entre o 1º e 7º dia de tratamento, entre o 7º e 10º dia, entre o 10º e 14º dia, e por fim, entre o 7º e 14º dia. O objetivo desta análise separada entre os dias foi avaliar o efeito de cada tratamento nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização. Há também, nesta tabela, a taxa de contração diária (IC/dia), que consiste na relação entre índice de contração no período avaliado dividido pelo número de dias deste período.

Tabela 16: Percentual médio de contração da ferida em relação a intervalos de tempo e a respectiva taxa de contração diária (IC/Dia) dos grupos tratados com solução salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) no 7º, 10º e 14º dia pós-operatório.

Grupos	Índice de Contração da Ferida (%)				
	1º-7º dia	7º-10º	10º-14º	7º-14º	1º-14º
	Média	Média	Média	Média	Média
GSS	13,29	27,04	39,64	66,68	79,97
GI1%	13,27	22,34	44,98	67,32	80,59
GI5%	19,25	41,63	9,06	50,65	69,94
GFIT	41,42	7,04	17,05	24,05	65,51
	Taxa de Contração Diária da Ferida (%)				
	IC/Dia	IC/Dia	IC/Dia	IC/Dia	IC/dia
GSS	1,89	9,01	9,91	9,52	5,71
GI1%	1,89	7,44	11,24	9,62	5,75
GI5%	2,75	13,87	2,26	7,24	4,99
GFIT	5,91	2,38	4,26	3,44	4,67

Ao analisar os resultados baseado nas fases da cicatrização, podemos observar que durante a fase inflamatória (período entre o 1º e 7º dia), Fitoscar[®] apresentou melhores resultados, reduzindo a área da ferida em 41%. Entretanto, durante a fase proliferativa (7º ao 14º dia), extrato de ingá nas concentrações de 1% e 5% foram melhores que o medicamento fitoterápico do mercado Fitoscar[®], capazes de reduzir a área da ferida em 67,3% e 50,4%, respectivamente. Já o Fitoscar[®] apresentou contração de ferida de apenas 24,09% (Tabela 16).

Ao analisar a taxa de contração diária (IC/dia), observa-se uma dinâmica dos resultados e dos tratamentos aplicados, o que podemos sugerir uma “rota” adequada para melhor cicatrização para este estudo (Tabela 16). O medicamento Fitoscar[®] é claramente melhor no processo cicatricial na primeira etapa da cicatrização, com índice de contração diária de 5,91%, ou seja, a cada dia a área da ferida reduz em 5,9%. Posteriormente a esta fase, percebe-se pelos valores diários de contração que o seu efeito não é mais expressivo. Na fase proliferativa há uma mudança de comportamento entre os tratamentos. O extrato de ingá na concentração de 5% foi capaz de atingir uma taxa de contração diária de 13,87% entre o período do 7º ao 10º dia. Este valor é quase sete vezes superior ao que foi obtido pelo Fitoscar[®] (2,38%). Ainda na fase proliferativa, entre o 10º e 14º dia o extrato de ingá 1% atinge uma taxa de contração diária de 11,24%, ou seja, aproximadamente três vezes melhor que o Fitoscar[®]. Observando estes valores, e tendo como objetivo acelerar a cicatrização, uma sequência de tratamentos se

apresenta neste estudo através dos dados da tabela 16. A melhor sequência de tratamentos seria Fitoscar[®] na fase inflamatória e extrato de ingá 5% e 1% na fase proliferativa. Os índices de contração diária no grupo tratado com solução salina também aumentaram a partir do início da fase proliferativa, sendo inclusive superiores aos valores de Fitoscar[®].

A contração da ferida é considerada um indicativo do potencial de cicatrização, ou seja, quanto melhor a cicatrização maior é a percentagem de contração (BRITO et al., 2001). Os curativos geralmente são utilizados em feridas cirúrgicas limpas, corte pequenos, suturas e escoriações. Os curativos tem como objetivos: auxiliar o organismo a promover a cicatrização; eliminar os fatores desfavoráveis que retardam a cicatrização da lesão e diminuir a infecção cruzada, por meio de técnicas e procedimentos adequados.

Os resultados encontrados neste trabalho podem ser explicados baseados nas propriedades dos compostos bioativos presentes na pomada Fitoscar[®], no extrato de ingá e também nos efeitos da solução salina.

O medicamento Fitoscar[®] é composto por extrato seco da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, conhecido por barbatimão. A principal característica do barbatimão quanto aos seus efeitos medicinais é justificada pelo elevado teor de taninos na composição de sua casca, entre 20 a 50% (LIMA et al., 2010). Para tratar feridas, queimaduras e inflamações, o poder anti-séptico dos taninos pode ser explicado por sua capacidade de formar pontes de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas duradouras com proteínas formando o complexo tanino-proteína. Este complexo, por ser insolúvel em água, forma uma camada protetora, crosta, sobre a lesão, favorecendo a hemostasia após a injúria e impedindo o desenvolvimento de microrganismos (HERNANDES et al., 2010; HASLAM, 1996). Outra propriedade que contribui para o efeito cicatrizante do barbatimão é o estímulo à proliferação de queratinócitos circundantes a região lesionada, o que poderia facilitar a re-epitelização da ferida. Os taninos têm a capacidade de aumentar o número de ligações cruzadas entre as fibras colágenas presentes na matriz extracelular auxiliando na orientação destas fibras (HERNANDES et al., 2010).

Estudos mostraram que extrato de barbatimão tem ação antisséptica contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (FERREIRA et al., 2010; COSTA et al., 2011), *Escherichia coli* (SOUZA et al., 2007a) e *Candida albicans*

(ISHIDA et al., 2006). Ação antibacteriana e antifúngica provavelmente contribuíram para acelerar a cicatrização na fase inflamatória, desta forma obtendo maior IC.

A eficiência dos fitoterápicos no processo de cicatrização está relacionada, principalmente, aos flavonoides. Os resultados da prospecção fitoquímica realizadas neste trabalho detectaram a presença de flavonóides, taninos e saponinas no extrato da casca de ingá. Flavonóides são capazes de inibir as enzimas ciclo-oxigenase (COX) e a 5-lipoxigenase, enzimas importantes no metabolismo do ácido araquidônico. A COX é uma enzima responsável pela síntese de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico e é encontrada sob duas isoformas (COX-1 e COX-2). A COX-1 é uma enzima constitutiva, presente em quase todas as células, enquanto a COX-2 é uma enzima induzida, sendo altamente expressa em células relacionadas ao processo inflamatório, incluindo macrófagos e leucócitos (KIM et al., 2004). Além da COX, os flavonoides também parecem inibir a fosfolipase A₂ (PLA₂), principal enzima responsável pela liberação de ácido araquidônico (precursor dos eicosanoides) a partir da membrana (KIM et al., 2004).

Além disso, compostos fenólicos são utilizados para elevar a eficácia do processo de cicatrização, agindo como antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios e moduladores do sistema imune (VIEIRA, 2008).

Durante os dias analisados, observou-se que o grupo tratado com solução salina e o grupo tratado com extrato de ingá 1% apresentaram resultados semelhantes em relação ao índice de contração da ferida. Por se tratar de um experimento com animais hígidos e com feridas limpas, ou seja, não houve a adição de cepas de bactérias e/ou fungos no leito da ferida, espera-se um processo de cicatrização normal. A aplicação de solução salina diariamente proporcionou à ferida um ambiente limpo e úmido, auxiliando, portanto na cicatrização. Estudos de cicatrização em feridas limpas e contaminadas tratadas com solução salina e mel mostraram que não houve diferença no tempo médio de cicatrização nos grupos de ferida limpa tratadas com mel e solução salina. Entretanto, nas feridas contaminadas com bactérias o tempo médio de cicatrização foi menor no grupo tratado com mel. Os autores atribuíram este resultado à capacidade do mel em estimular a resposta imunológica adequada e, portanto acelerar a cicatrização (ALVES et al., 2008).

A Figura 20 apresenta os aspectos macroscópicos das feridas no final da fase inflamatória (7º dia) e na fase proliferativa (14º dia).

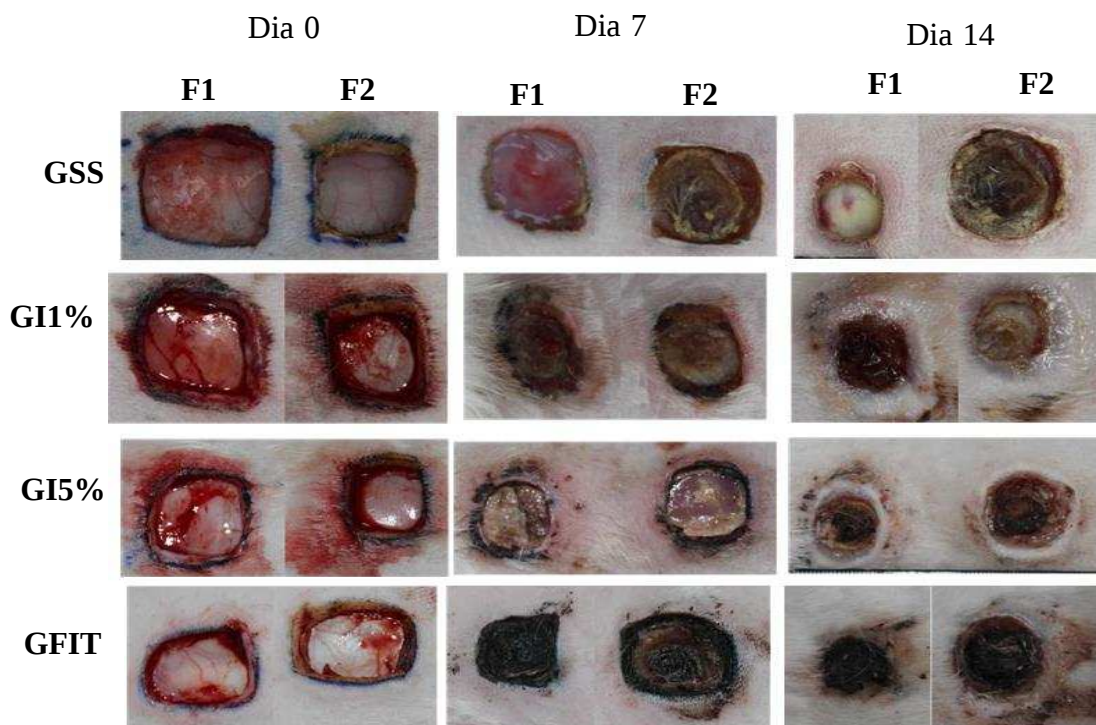


Figura 20: Representação fotográfica da evolução da contração das feridas controles e experimental. Grupo tratado com solução salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar® (GFIT). F1 = ferida; F2 = queimadura.

A Tabela 17 apresenta os resultados da estereologia. A Figura 21 apresenta fotomicrofragias do tecido cicatricial de feridas, com presença de tecido de granulação, neovasos, fibroblastos e células inflamatórias coradas por hematoxilina-eosina. A Figura 22 apresenta fotomicrografias do colágeno tipo I e III, corada com pricosirius.

Tabela 17: Resultados estereológicos de densidade volumétrica (Vv) de vasos sanguíneos, fibroblastos, células inflamatória (ci) e índice de maturação do colágeno (IMaC) para feridas em coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar® (GFIT) após 14 dias de tratamento.

Grupos	Estereologia da Ferida (%)							
	Vv_vasos		Vv_fibroblastos		Vv_ci		IMaC	
	Média	σ	Média	σ	Média	σ	Média	σ
GSS	4,24	2,21a	11,61	3,95a	6,07	1,36a	12,61	1,31b
GI1%	4,05	2,51a	15,02	2,12a	9,4	4,43a	18,00	2,1a
GI5%	5,17	3,43a	10,23	2,48a	10,95	5,4a	14,28	2,2a,b
GFIT	3,53	0,78a	9,95	2,56a	10,54	5,65a	12,15	1,91b

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

O grupo tratado com extrato de ingá 5% apresentou maior porcentagem de vasos neoformados, sendo os valores médios 32% acima daqueles encontrados pelo grupo GFIT e 18% acima do grupo GSS. A angiogênese, independente dos tratamentos, foi importante, conferindo suporte necessário para que o processo de reparação tecidual evoluísse de forma satisfatória para todos os grupos, uma vez que ao final do tratamento o IC entre eles não foi estatisticamente significativo.

O grupo tratado com extrato de ingá 1% apresentou maior porcentagem de fibroblastos, sendo os valores médios 34% acima daqueles encontrados pelo grupo GFIT e 23% acima do grupo GSS. O grupo tratado com extrato de ingá 1% também apresentou maior porcentagem do IMaC, sendo os aumentos semelhantes aos resultados encontrados para fibroblastos. A produção de colágeno está relacionada com a quantidade de fibroblastos. Resultados semelhantes foram encontrados por PAGNANO et al. (2008) e GONÇALVES et al. (2013) que investigaram extrato vegetal da espécie *Brassica oleracea* no processo cicatricial e obtiveram maiores valores médios de fibroblastos e índice de maturação do colágeno em relação aos grupos controle. Pelos resultados pode-se sugerir que os compostos bioativos presentes no extrato de ingá promoveram a produção de fibroblastos e aumento do índice de maturação do colágeno.

Os resultados de atividade antioxidante, neste trabalho, mostram que extrato de *Inga subnuda* apresentou bons resultados para atividade antioxidante. Estudos apontam que baixas taxas de espécies reativas de oxigênio estimulam a produção de fibroblastos e que radicais livres em contato com culturas de fibroblastos inibem seu crescimento (SHUKLA & PATNAIK, 1998). A atividade antioxidante do extrato de ingá pode ter contribuído para manter baixa a taxa de radicais livres na região da ferida, permitindo e estimulando a produção de fibroblastos, o que poderia justificar a maior densidade de vasos encontrados no grupo tratado com extrato de ingá 1%.

Os grupos GI5% e GFIT apresentaram as maiores porcentagens de células inflamatórias, o que também pode ser observado na Figura 21 (C-D). Histologicamente, ao 14º dia estes grupos apresentaram reação inflamatória, caracterizada pela presença de elementos celulares, com presença de neutrófilos e outras células leucocitárias. Estes resultados foram semelhantes aos estudos realizados em feridas cirúrgicas induzidas em cobaias e tratadas com mel e açúcar mascavo por 14 dias (DOS SANTOS, 2012). Os autores atribuíram a persistência de neutrófilos nas feridas após 14 dias à presença de contaminação, de acordo com os swabs realizados. A

presença de células inflamatórias, como os neutrófilos, no 14º dia do processo cicatricial, não estão de acordo com o citado pela literatura (SINGER & CLARK, 1999), que afirmam que os neutrófilos são as principais células encontradas na fase aguda da inflamação e que depois se degeneram, não estando mais presentes.

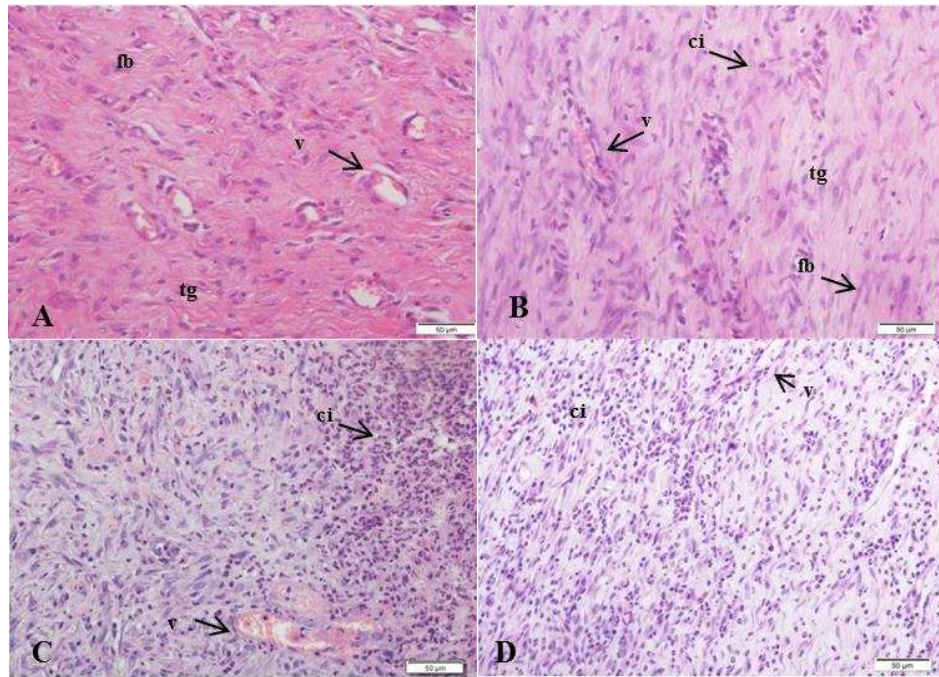


Figura 21: Fotomicrografia de cortes transversais do tecido cicatricial da pele de coelhos no 14º dia de tratamento. As setas indicam a presença de vasos (v), tecido de granulação (tg), células inflamatórias (ci) e fibroblastos (fb). (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de ingá 1%, (C) tratado com extrato de ingá 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 200X.

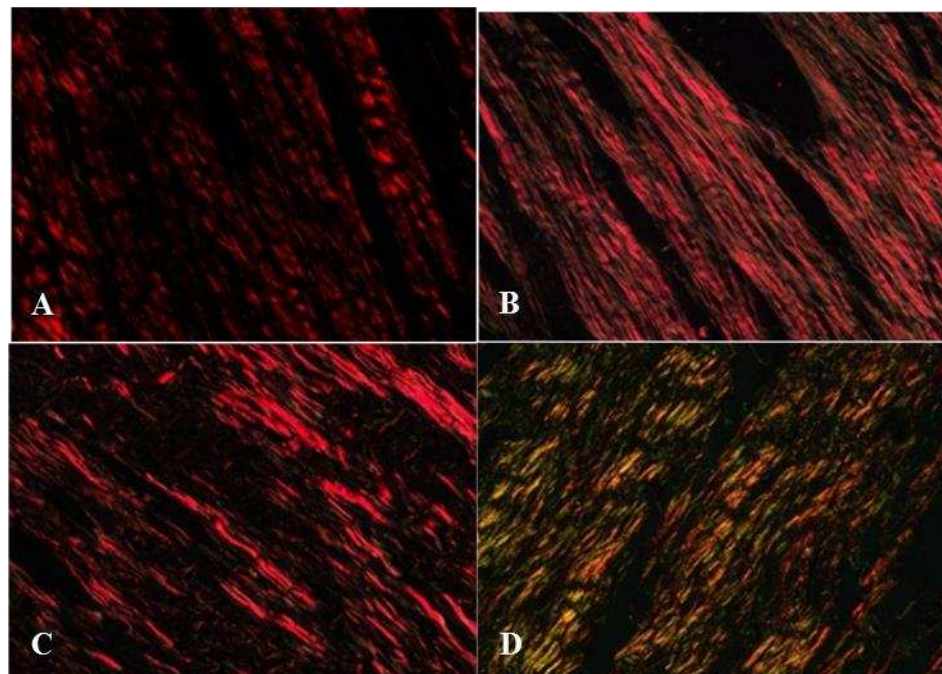


Figura 22: Fotomicrografia obtida sob microscopia de polarização que mostra a distribuição das fibras de colágeno tipo I (vermelha) e III (verde) no tecido cicatricial da pele de coelhos após quatorze dias de tratamento. (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de ingá 1%, (C) tratado com extrato de ingá 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Picrosirius. Aumento: 200X.

A Tabela 18 apresenta os valores de índice de contração (expressa em %) das queimaduras produzidas por bisturi elétrico em coelhos e tratados com extrato de ingá e controles em diferentes dias de avaliação.

Tabela 18: Percentual médio de contração em relação ao tamanho original das queimaduras dos grupos tratados com solução salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar® (GFIT) no 7º, 10º e 14º dia pós-operatório.

Grupos	Índice de Contração da Queimadura (%)					
	7º dia		10º dia		14º dia	
	Média	σ	Média	σ	Média	σ
GSS	5,46	15,38a	29,02	23,6a	64,67	19,1a
GI1%	8,97	13,55a	34,66	21,48a	72,11	15,7a
GI5%	-2,42	14,96a	51,07	20,88a	64,64	11,68a
GFIT	14,25	16,39a	31,08	30,79a	44,41	28,28a
Valor de p	0,306		0,412		0,12	

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

No 7º dia de tratamento, os grupos tratados com Fitoscar® e extrato de Ingá 1% apresentaram as maiores porcentagens de contração da queimadura, reduzindo a área em 14,25% e 8,97%, respectivamente (Tabela 18). Em todos os grupos houve uma expansão inicial da ferida, seguida por contração. Outros estudos também observaram esta variação e, atribuíram esta diferença à retração centrípeta pela tensão elástica da pele circunjacente, pela perda de aderência à fáscia profunda e devido à mobilidade e falta de aderência da pele dos coelhos (OLIVEIRA et al., 2000; DOS SANTOS et al., 2012).

No 10º dia, os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$), e as maiores porcentagens de contração da queimadura foram obtidas pelos grupos GI5% (51,07%) e GI1% (34,66%).

No 14º dia, o grupo tratado com extrato de ingá 1% apresentou maior índice de contração (72,11%) e o Fitoscar® (44,41%), o menor. Não houve completo fechamento das feridas no tempo avaliado.

A tabela 19 apresenta o índice de contração em relação aos intervalos de medida, ou seja, entre o 1º e 7º dia de tratamento, entre o 7º e 10º dia, entre o 10º e 14º dia, e por fim, entre o 7º e 14º dia. O objetivo desta análise separada entre os dias foi avaliar o comportamento de cada tratamento nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização.

Há também nesta tabela a taxa de contração diária (IC/dia) em cada período de observação descrito acima.

Tabela 19: Percentual médio de contração da queimadura em relação a intervalos de tempo e a respectiva taxa de contração diária (IC/Dia) dos grupos tratados com solução salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) no 7º, 10º e 14º dia pós-operatório.

Grupos	Índice de Contração da Queimadura (%)				
	1º-7º dia	7º-10º	10º-14º	7º-14º	1º-14º
	Média	Média	Média	Média	Média
GSS	5,46	23,56	35,65	59,21	64,67
GI1%	8,97	25,69	37,45	63,14	72,11
GI5%	-2,42	53,49	13,57	67,06	64,64
GFIT	14,25	16,83	13,33	30,16	44,41
	Taxa de Contração Diária da Queimadura (%)				
	IC/Dia	IC/Dia	IC/Dia	IC/Dia	IC/dia
GSS	0,78	7,85	8,91	8,46	4,62
GI1%	1,28	8,56	9,36	9,02	5,15
GI5%	-0,35	17,83	3,39	9,58	4,62
GFIT	2,04	5,61	3,33	4,31	3,17

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Ao analisar os resultados baseado nas fases da cicatrização, podemos observar que durante a fase inflamatória (período entre o 1º e 7º dia), Fitoscar[®] apresentou melhores resultados, reduzindo a área da queimadura em 14,25%. Entretanto, durante a fase proliferativa (7º ao 14º dia), extrato de ingá nas concentrações de 1% e 5% foi melhor que Fitoscar[®], reduzindo a área da queimadura em 63,14% e 67,06% respectivamente, enquanto Fitoscar[®] contraiu em apenas 30,16% (Tabela 19).

Ao analisar o índice de contração por período e a taxa de contração diária (Tabela 16) observa-se uma dinâmica dos resultados pelos tratamentos aplicados, o que podemos sugerir uma “rota” que apresenta uma cicatrização mais rápida para queimadura no modelo proposto neste trabalho. Fitoscar[®] é melhor na primeira etapa da cicatrização, com IC/dia de 2,04%, ou seja, a cada dia a área da ferida reduz em 2,04%. Depois desta fase, percebe-se pelos valores diários de contração que o seu efeito não é mais expressivo. Durante a fase proliferativa há uma mudança de comportamento entre os tratamentos. O extrato de ingá 5% foi capaz de atingir uma taxa de contração diária de 17,83% entre o 7º e 10º dia. Este valor é cerca de três vezes maior daquele encontrado pelo Fitoscar[®] (5,61%) no mesmo período. Ainda na fase proliferativa, entre

o 10º e 14º dia, extrato de ingá 1% atingiu uma taxa de contração diária de 9,36%, também cerca de três vezes melhor que o Fitoscar®. Observando estes valores, e tendo como objetivo acelerar o processo de cicatrização, uma sequência de tratamentos está clara e desenhada na tabela 19. A melhor sequência de tratamentos para este estudo seria Fitoscar® na fase inflamatória e extrato ingá 5% e 1% na fase proliferativa com inclusão de solução salina para limpeza local.

Uma das graves causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo são queimaduras térmicas, o que resulta em uma grande quantidade de despesas e custos em cuidados de saúde. O tratamento clínico da perda de pele devido queimaduras ou feridas graves ainda é um grande problema em procedimentos cirúrgicos. A escolha de um agente terapêutico para o tratamento de queimadura e feridas deveria melhorar idealmente uma ou mais fases da cicatrização, sem produzir qualquer efeito nocivo para a área ferida ou mesmo para o indivíduo tratado (SUMITRA et al., 2005).

Os resultados deste trabalho mostrou que extrato de ingá 1 e 5% apresentaram efeito cicatrizante na queimadura, acelerando o fechamento da ferida na fase proliferativa. Além disso, promoveu fibroplasia, angiogênese e maturação do colágeno. Estudos realizados com extrato de *Arnebia* genus em queimaduras induzidas em ratos mostrou que os grupos tratados com *A. genus* apresentaram melhora na reepitelização, proliferação de fibroblastos e na síntese de colágeno (ASHKANI-ESFAHANI et al., 2012). Estes resultados mostram que o uso de produtos tradicionais produzidos a partir de plantas medicinais é uma alternativa no processo de cicatrização, bem como para reduzir os encargos financeiros (XIAO-BO et al., 2012).

RIBEIRO et al. (2013), em seu trabalho, também induziu queimaduras por bisturi elétrico em coelhos albino Nova Zelândia. O autor tratou as feridas com solução salina e plasma rico em plaquetas. Em 14 dias de tratamento a feridas tratadas com solução salina e plaquetas apresentam contração de 38% e 37,9%, respectivamente. Em 21 dias as mesmas queimaduras apresentaram contração de 58,8% e 52,2%. Entretanto, os resultados neste trabalho mostram que aos 14 dias de tratamento as queimaduras tratadas com extrato de ingá 1% e 5% apresentaram IC de 72,11% e 64,6%, quase o dobro do valor encontrado por RIBEIRO et al. (2013) para queimaduras tratadas com plaquetas no mesmo período.

A tabela 20 apresenta os resultados dos parâmetros estereológicos para queimaduras tratadas com extrato de ingá. A figura 23 (A a D) apresenta o tecido cicatricial da queimadura, mostrando o tecido de granulação, vasos neoformados,

fibroblastos e células inflamatórias. A Figura 24 apresenta as fibras colágenas do tipo I (vermelha) e tipo III (verde) do tecido cicatricial da queimadura nos grupos.

Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos para os parâmetros densidade de vasos (Vv_vasos), densidade de fibroblastos (Vv_fibroblastos) e densidade de células inflamatórias (Vv_ci). O grupo tratado com ingá 1% apresentou maior porcentagem de vasos sanguíneos e fibroblastos. Os resultados mostram que houve diferença entre os grupos para o índice de maturação do colágeno (IMaC) pelo teste de Tukey. Grupo tratado com solução salina (GSS) apresentou maior IMaC (15,46%) e o grupo GI5% (8,89%) o menor. Estes resultados foram semelhantes aos de RIBEIRO et al. (2013) que observou pela análise histológica maior presença e organização das fibras colágenas em queimaduras tratadas com plasma rico em plaquetas aos 14 dias de tratamento.

Tabela 20: Resultados estereológicos de densidade volumétrica (Vv) para vasos, fibroblastos, células inflamatória (ci) e índice de maturação do colágeno (IMaC) para queimaduras em coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de Ingá 1% (GI1%), extrato de Ingá 5% (GI5%) e pomada Fitoscar® (GFIT) após 14 dias de tratamento.

Grupos	Estereologia da Queimadura (%)							
	Vv_vasos		Vv_fibroblastos		Vv_ci		IMaC	
	Média	σ	Média	σ	Média	σ	Média	σ
GSS	3,63	0,49a	6,18	0,66a	7,80	4,54a	15,46	0,41a
GI1%	7,22	2,62a	10,33	3,00a	6,65	1,41a	10,93	0,75b
GI5%	4,50	0,53a	7,22	0,89a	9,21	2,42a	8,89	0,15c
GFIT	5,28	1,84a	6,75	1,45a	4,31	0,45a	12,74	0,33d

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

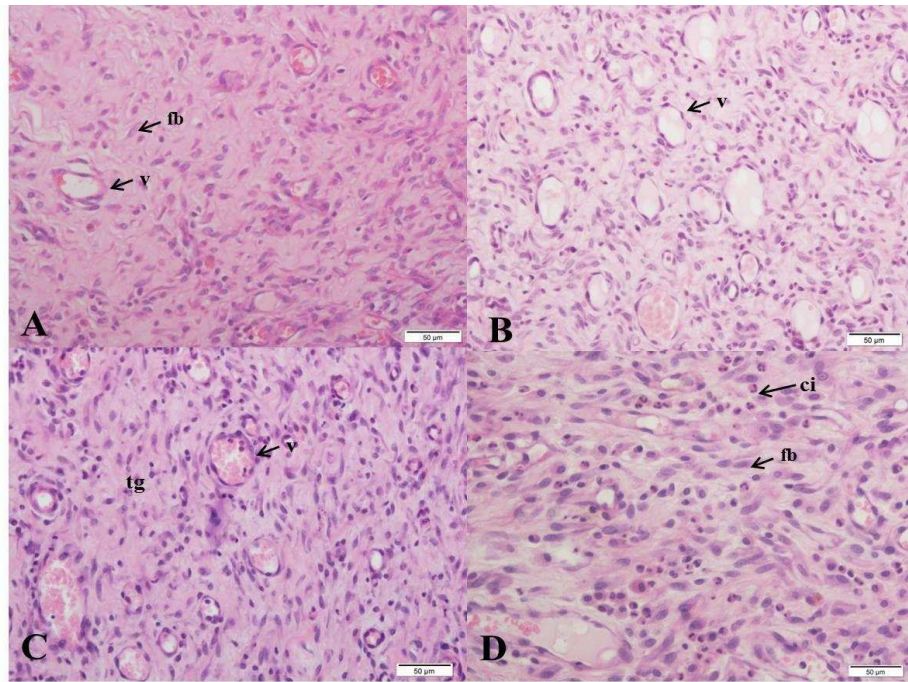


Figura 23: Fotomicrografia de cortes transversais do tecido cicatricial de queimadura coelhos no 14º dia de tratamento. As setas indicam a presença de vasos (v), tecido de granulação (tg), células inflamatórias (ci) e fibroblastos (fb). (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de ingá 1%, (C) tratado com extrato de ingá 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 200X.

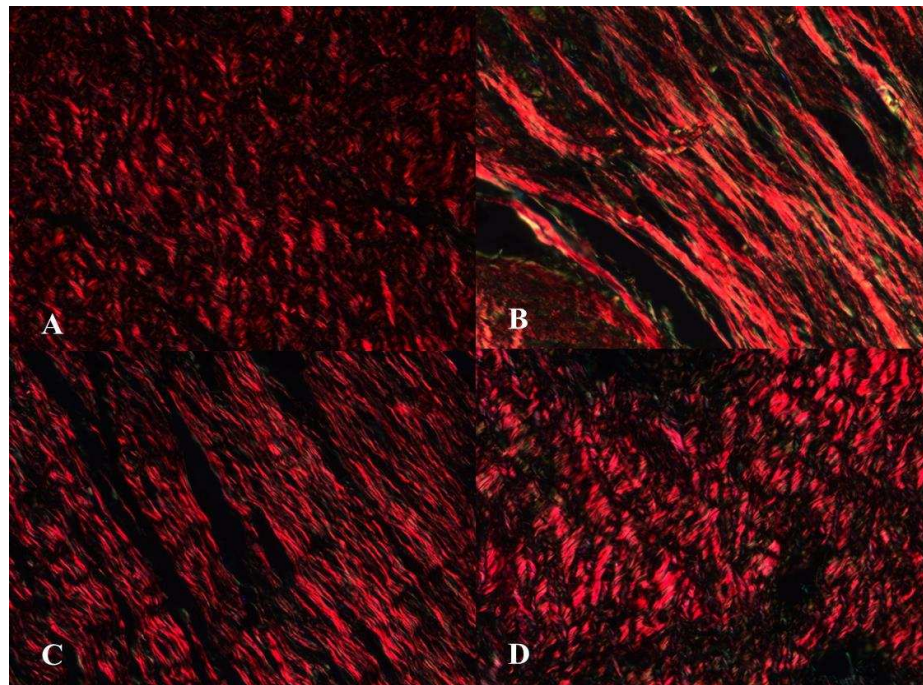


Figura 24: Fotomicrografia obtida sob microscopia de polarização com distribuição das fibras de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde) de queimaduras em coelhos após quatorze dias de tratamento. (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de ingá 1%, (C) tratado com extrato de ingá 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Picosirius. Aumento: 200X

5.4 Análise dos resultados de feridas e queimaduras tratadas com extrato de *Pseudopiptadenia contorta*

5.4.1 Parâmetros hematológicos

A tabela 21 apresenta os valores hematológicos de referência para coelhos e a tabela 22 apresenta os resultados hematológicos deste estudo. Os resultados mostram que todos os parâmetros mantiveram-se dentro dos padrões de normalidade conforme dados da literatura.

Tabela 21: Valores hematológicos de referência para coelhos machos adultos, encontrados na literatura.

Referência	ERT	HCT	HGB	VCM	HCM	CHCM	PLT	LEU	LINF	MON	GRA
	$10^6/\text{mm}^3$	%	g/dL	fL	Pg	g/dL	$10^3/\text{mm}^3$	$10^3/\text{mm}^3$	%	%	%
Brito et al.		33,0 a	10,0 a	57,8 a	17,1 a	29,0 a	250,0 a	5,2 a	30,0 a	1,0 a	20,0 a
2004	5,1 a 7,9	55	17,4	70,4	23,5	37,0	650,0	12,5	85,0	4,0	75,0
Campbell		36,6 a	5,2 a				250,0 a	6,0 a			
2006	5,0 a 6,8	47,4	6,8	-	-	-	610,0	10,0	-	-	-
Paiva et al.									20,0 a	6,0 a	30,0 a
2005	4,5 a 7,0	41,5	13,6	-	-	-	-	9,0	90,0	30,0	50,0
Quesenberry											
1994	6,4	45,5	11,1		17,3	-	310,0	13,0	53	4,8	39,0
Silva et al.		39,0 a	11,4 a	70,8				8,0 a	36,0 a	2,0 a	28,0 a
2008	4,9 a 5,6	41	12,5	70,0 a	-	31,3 a	-	8,8	41,0	4,0	31,0
Trindade				73,7		33,4		5,9 a			
1954	5,2	-			-	-	-	14,5	50,0	6,5	40,0

Legenda: Contagem total de eritrócitos (ERT), hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina globular média (HCM), concentração hemoglobínica globular média (CHCM), contagem de plaquetas (PLT), contagem total de leucócitos (LEU), monócitos (MON) e granulócitos (GRA). Fonte: CARVALHO, 2010.

Tabela 22: Média dos valores hematológicos grupos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e Fitoscar® (GFIT) aos 14 dias de tratamento.

Grupos	ERT	HCT	HGB	VCM	HCM	CHCM	PLT	LEU	LINF	MON	GRA
	$10^6/\text{mm}^3$	%	g/dL	fL	Pg	g/dL	$10^3/\text{mm}^3$	$10^3/\text{mm}^3$	%	%	%
GSS	5,60a	37,5a	12,0a	67,0a	21,6a	32,25a	262,3b	9,68a	46,2b	7,28a	46,5a
GA1%	5,58	35,7a	11,6a	64,2a	20,8a	30,27a	333,8a,b	6,65b	44,6b	8,02a	47,3a
GA5%	5,82a	37,1a	11,0a	63,8a	19,3a	32,72a	479,3a	6,36b	60,4a	6,45a	33,1b
GFIT	5,58a	35,8a	11,7a	64,3a	21,1a	32,72a	428,2a,b	6,44b	44,9b	6,38a	48,7a

Legenda: Contagem total de eritrócitos (ERT), hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina globular média (HCM), concentração hemoglobínica globular média (CHCM), contagem de plaquetas (PLT), contagem total de leucócitos (LEU), monócitos (MON) e granulócitos (GRA). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Os resultados da Tabela 22 mostram que houve diferença entre os grupos para os parâmetros plaquetas, leucócitos, linfócitos e granulócitos. Em relação às plaquetas, grupos GA5% e GFIT apresentaram os maiores valores médios, sendo 82,7% e 63,2%, respectivamente superiores ao grupo GSS.

Todos os grupos apresentaram redução na contagem de leucócitos em relação ao grupo tratado com solução salina, que foi superior 32% em média em relação aos outros grupos. Este resultado sugere uma pequena inflamação nos grupos tratados com angico e Fitoscar[®]. Apesar da solução salina não possuir atividade antisséptica, o fato de promover a limpeza diária das feridas, protegeu contra o excesso de inflamação (ATIYEH et al., 2009).

Em relação aos linfócitos, o grupo GA5% apresentou os maiores valores médios, estando 30,7% acima do valor encontrado para o grupo GSS. Os outros grupos apresentaram resultados semelhantes ao grupo GSS. Os valores de normalidade encontrados na literatura para porcentagem de monócitos são diferentes e contraditórios. Confrontando os resultados obtidos com os valores da literatura, observa-se que os grupos GSS e GA1% apresentaram aumento de monócitos, exceto para PAIVA et al. (2005), que consideram valores normais de 6 a 30% de monócitos no sangue de coelhos. Esta elevação no número de monócitos pode ser consequência do processo inflamatório. Eles possuem a função de fagocitar partículas mais volumosas, e transformam-se em macrófagos nos tecidos. Monócitos e macrófagos estão envolvidos nas respostas inflamatória e imunológica (MARCONCIN, 2008).

Os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação e presume-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento (TODD et al., 1991). Quando a ferida completou o seu fechamento e os microrganismos foram eliminados, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante em feridas humanas (ENGELHARD et al., 1998). Os linfócitos não somente são efetores imunes, mas também, produtores de fatores de crescimento. De forma notável, nesta etapa, eles são atraídos para a região da ferida em igual número que os monócitos e, a partir do décimo quarto dia, são os leucócitos que predominam na região (BLOTNIK et al., 1994).

5.4.2 Parâmetros bioquímicos

A tabela 23 apresenta os resultados de proteínas totais e albumina. Os resultados mostram que houve diferença significativa entre os grupos para o parâmetro proteínas

totais ($p < 0,05$). Entretanto, as porcentagens de variação dos grupos em relação ao grupo GSS foram pequenas. Os grupos GFIT e GA5% reduziram 10% e 9,7%, respectivamente, em relação ao GSS. Os resultados de albumina mostram que os grupos GSS e GA1% apresentaram os maiores valores médios, com 4,37 g/L e 4,17 g/L. Não houve diferença entre os grupos em relação aos valores encontrados para albumina.

Os resultados encontrados foram semelhantes aos de RIBEIRO et al. (2006) que avaliou parâmetros sanguíneos de coelhos hígidos e tratados com flavonoides. Os níveis normais de proteínas plasmáticas encontradas em coelhos hígidos foi em torno de 50 a 53 mg/dL e, de albumina foi da ordem de 4,0 a 4,5 mg/dL.

Tabela 23: Valores médios de proteínas e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e pomada Fitoscar® (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.

Grupos	Proteínas totais (g/L)			Albumina (g/L)		
	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var
GSS	60,15	2,63a		4,37	0,28a	
GA1%	56,47	3,05a,b	-6,1	4,17	0,22a	-4,6
GA5%	54,33	2,63a,b	-9,7	3,99	0,27a	-8,7
GFIT	54,15	1,85b	-10,0	3,99	0,19a	-8,7

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Mais de 7% do plasma sanguíneo consiste de proteínas como albumina e globulinas. A albumina plasmática, o fibrinogênio, parte das globulinas e a protrombina são formados no fígado. A albumina é a mais importante proteína plasmática e corresponde a cerca de 60% das proteínas plasmáticas totais, sendo que, por volta de 40% está presente no plasma e 60% no espaço extracelular. Entre as funções importantes da albumina está a capacidade de se ligar a várias substâncias, que incluem hormônios esteróides, bilirrubina e triptofano do plasma. Uma variedade de drogas, incluindo sulfonamidas, penicilina G e aspirina, ligase à albumina, o que tem implicações farmacológicas. A síntese de proteínas plasmáticas é reduzida significativamente nas lesões hepáticas graves ou deficiências prolongadas de proteínas na dieta. Isso pode reduzir o fibrinogênio plasmático, resultando em aumento do tempo de protrombina e retardando o tempo de coagulação do sangue nos capilares (SWENSON, 1988; MURRAY et al., 1994).

Pelos resultados encontrados neste estudo para proteínas e albumina podemos sugerir que o tratamento tópico de extrato de angico não afetou a capacidade hepática de

sintetizar e secretar proteínas plasmáticas, assim como também não afetaram o catabolismo protéico (LIMA et al., 1985).

A tabela 24 apresenta os valores médios dos parâmetros cálcio e zinco. O grupo GFIT apresentou maior valor de cálcio (7,59 mg/dL) e o grupo GA5%, o menor (5,76 mg/dL). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey.

O grupo GSS apresentou maior valor de zinco (0,46 mg/dL), seguido pelo GA1% (0,45 mg/dL). O valor de zinco encontrado em todos os tratamentos foi menor ao se comparar com solução salina, sendo que o grupo GEA4% e GFIT apresentaram as maiores reduções, 19,57% e 13,04%.

Tabela 24: Valores médios de cálcio e zinco em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.

Grupos	Ca (mg/dL)			Zn (mg/dL)		
	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var
GSS	7,47	2,35a		0,46	0,12a	
GA1%	7,01	0,82a	-6,16	0,45	0,08a	-2,17
GA5%	5,76	2,89a	-22,89	0,37	0,05a	-19,57
GFIT	7,59	1,16a	1,61	0,4	0,05a	-13,04

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey

Ação de collagenases nos processos de degradação e remodelação do colágeno depende do nutriente cálcio. Sua deficiência pode acarretar prejuízo na síntese de collagenase. Estudos realizados por BOGGIO et al. (2009) avaliaram a ação do verapamil, um bloqueador de canal de cálcio em culturas in vitro de fibroblastos. Verapamil tem sido sugerido no tratamento dos distúrbios fibroproliferativos dérmicos humanos. Os autores concluíram que o verapamil, ao bloquear o influxo de cálcio nos fibroblastos, altera o padrão de organização dos filamentos de actina e, conseqüentemente, a morfologia dos fibroblastos, exercendo, assim, importante influência sobre as relações das células com o substrato e sobre a síntese de MMP-I. O verapamil, ao controlar a biossíntese e a contração da MEC, demonstra grande potencial na prevenção e no tratamento dos quelóides e das cicatrizes hipertróficas.

A síntese de colágeno é dependente da oxigenação das células, da hidroxilação da prolina e lisina, reação essa mediada por uma enzima produzida pelo próprio fibroblasto, em presença de co-enzimas (vitaminas A, C e E), ferro, testosterona,

tiroxina, proteínas e zinco (TAZIMA et al., 2008). O zinco atua como cofator em mais de 100 diferentes sistemas enzimáticos relacionados à síntese proteica, regulação celular e formação de colágeno. São exemplos destas enzimas a DNA e RNA polimerase, anidrase carbônica e proteases (ROJAS & PHILLIPS, 1999). A deficiência deste elemento traço retarda o processo de cicatrização, leva à perda da força tensil da cicatriz e supressão da resposta inflamatória (RACKETT, 1993).

O zinco age estimulando a mitose celular e a proliferação dos fibroblastos. A deficiência deste elemento traço retarda o processo da cicatrização, levando à perda de força tensil da cicatriz e supressão da resposta inflamatória. A dose diária recomendada de zinco em pacientes queimados adultos é de 220 mg (SORIANO et al., 2004). Está comprovado que a maioria dos idosos com lesões ulcerativas crônicas apresentam baixos níveis plasmáticos de zinco, vitamina A, vitamina E e carotenóides (THOMPSON & FUHRMAN, 2005).

A tabela 25 apresenta os valores médios de cobre e fósforo. Os resultados mostram que houve diferença significativa entre os grupos para o parâmetro micronutriente cobre pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todos os grupos apresentaram valores superiores ao grupo tratado com solução salina, sendo os maiores aumentos encontrados nos grupos GEA5% e GFIT, ambos com 54,17% de aumento.

Os resultados mostram que houve diferença entre os grupos para o parâmetro fósforo. Todos os grupos apresentam valores menores de fósforo em relação ao grupo tratado com solução salina, sendo as maiores reduções encontradas nos grupos GFIT (23,37%) e GEA5% (20,83%). Os valores encontrados por ALVARENGA (2008) para coelhos Nova Zelândia hígidos foram superiores e variou entre 5,64 a 8,30 mg/dL. Neste trabalho, os valores encontrados variaram entre 4,23 a 5,52 mg/dL.

Tabela 25: Valores médios de cobre e fósforo em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.

Grupos	Cu (mg/dL)			P (mg/dL)		
	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var
GSS	0,24	0,06b		5,52	1,17a	
GA1%	0,32	0,05a,b	33,33	4,52	0,73a,b	-18,12
GA5%	0,37	0,05a	54,17	4,37	0,53a,b	-20,83
GFIT	0,37	0,07a	54,17	4,23	0,52b	-23,37

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

O cobre participa das reações de cross-linking na síntese de colágeno e elastina e também da eliminação de radicais livres. O cobre promove a maturação do colágeno e síntese de elastina, através da enzima lisil-oxilase. Já a enzima superóxido dismutase necessita de dois átomos de cobre por molécula, e tem por função proteger os componentes intracelulares dos danos oxidativos (ROJAS & PHILLIPS, 1999).

A hiperfosfatemia ocorre pela hipervitaminose de vitamina B, irradiação excessiva de ultravioleta, insuficiência renal crônica, hipoparatiroidismo, distúrbios do metabolismo ósseo, pela administração de heparina, na hemodiálise, na anemia falciforme e na acidose láctica (LIMA et al., 2005). O aumento de fósforo também pode ser observado em traumas e queimaduras (MOTA, 2003). Pelos resultados apresentados neste trabalho podemos sugerir que as lesões cirúrgicas induzidas nos coelhos não potencializaram o catabolismo e nem o dano celular, pois os níveis de fósforo se encontram baixos.

A Tabela 26 apresenta os resultados das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase ALT e gama-glutamil transferase (γ -GT). Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) para os parâmetros AST, ALT e avaliados.

Tabela 26: Valores médios de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transpeptidase (γ -GT) em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.

Grupos	AST (U/L)			ALT (U/L)			γ -GT (U/L)		
	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var
GSS	49,83	19,56a		61,00	36,92a		11,17	4,12a	
GA1%	28,67	8,45a	-42,5	59,17	15,04a	-3,0	10,50	2,43a	-6,0
GA5%	46,83	24,67a	-6,0	60,17	24,91a	-1,4	10,67	1,03a	-4,5
GFIT	32,67	6,98a	-34,4	64,67	31,66a	6,0	12,83	4,79a	14,9

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Em relação ao AST, observa-se que as médias dos grupos encontram-se dentro dos valores de referência da literatura, ou seja, entre 40-53 U/L (THRALL, 2006) ou entre 14 a 113UI/L (KANEKO et al., 2008). Entretanto, ao se comparar os com o grupo GSS, verifica-se que todos os grupos tiveram valores abaixo do grupo tratado com

solução salina com as maiores reduções encontradas nos grupos GA1% (42,5%) e GFIT (34,4%). Os valores médios encontrados nos grupos para o parâmetro ALT estão dentro dos valores de referência dados pela literatura, ou seja, entre 48 a 80UI/L (MADER, 1997).

Diversos parâmetros sanguíneos estão envolvidos nos processos inflamatórios, podendo-se destacar cálcio, proteínas, principalmente albumina, aminotransferases (AST e ALT) e gama-glutamil-transpeptidase (γ -GT). Os níveis plasmáticos de AST aumentam na queimadura grave (LIMA et al.; 1985) estando amplamente distribuída no fígado, coração, músculo cardíaco, músculo estriado, rim e pâncreas. Os resultados aqui apresentados evidenciam que as substâncias-teste não ocasionaram alterações significativas na atividade da AST e ALT, levando a crer que também não causaram danos relacionados ao aumento da atividade dessa enzima nos animais utilizados neste modelo experimental.

Os valores obtidos para gama-glutamil-transferase mostram que não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste de Tukey ($p>0,05$). Os valores encontrados para γ -GT foram semelhantes aos ALVARENGA (2008). Os resultados aqui obtidos indicam que as substâncias-teste não interferiram significativamente na atividade de γ -GT.

O aumento de γ -GT sérico está associado à doença hepatobiliar, especificamente a colestase intra e extra-hepática (CENTER 1988; DIAL, 1995) ou indução por drogas como corticóides e anticonvulsivantes (DIAL, 1995). No diagnóstico da doença hepática, a γ -GT tem baixa sensibilidade.

A tabela 27 apresenta os valores médios de bilirrubina total e fosfatase alcalina de coelhos tratados com extrato de angico e controles.

Tabela 27: Valores médios de bilirrubina total e fosfatase alcalina em soro sanguíneo de coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.

Grupos	Bilirrubina total (mcg/dL)			Fosfatase alcalina (U/L)		
	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var
GSS	20,07	3,91a		59,00	15,27a	
GA1%	16,46	9,72a,b	-18,0	43,50	16,08a	-26,3
GA5%	8,23	2,02b	-59,0	41,33	16,78a	-29,9
GFIT	14,39	6,69a,b	-28,3	58,17	44,40a	-1,4

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Os resultados mostram que houve diferença significativa entre os valores médios de bilirrubina total entre os grupos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A quantidade de bilirrubina total foi 59% menor no grupo GA5% quando comparado ao grupo GSS. Não houve diferença significativa entre os grupos para fosfatase alcalina. A atividade desta enzima foi 29,9% e 26,3 % menor nos grupos tratados com angico 5% e 1%, respectivamente, quando comparado ao grupo GSS. Em queimados, a quantidade de fosfatase alcalina aumenta devido ao dano celular.

Embora os tratamentos utilizados sejam de aplicação tópica, os constituintes da formulação medicamentosa são absorvidos pela via sistêmica e metabolizados. É importante avaliar sua interferência principalmente em relação a um possível dano hepático e renal. Desta forma, medidas de AST, ALT, bilirrubina e fosfatase alcalina são necessárias nesta avaliação. Pelos resultados obtidos, podemos concluir que o extrato hidroalcoólico das cascas de *Pseudopiptadenia contorta* na formulação creme não ocasionou dano hepático nos animais avaliados, podendo ser utilizado de forma tópica para o processo de cicatrização.

A tabela 28 apresenta os valores médios de glicose, triacilglicerol e colesterol. Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ($p > 0,05$) para os três parâmetros avaliados.

Tabela 28: Valores médios de glicose, triacilglicerol e colesterol em soro sanguíneo de coelhos e feridas tratadas com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%) e 5% (GA5%) e pomada Fitoscar® (GFIT) após 14 dias de tratamento. % Variação comparada ao grupo solução salina.

Grupos	Glicose (mg/dL)			Triacilglicerol (mg/dL)			Colesterol (mg/dL)		
	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var	Média	σ	%Var
GSS	113,0	9,03a		71,80	49,17a		54,52	13,01a	
GA1%	107,5	21,4a	-4,9	62,00	50,44a	-13,6	60,45	30,93a	10,9
GA5%	115,2	8,47a	1,9	37,40	7,11a	-47,9	44,98	9,85a	-17,5
GFIT	109,5	8,02a	3,1	35,20	17,89a	-51,0	68,67	37,62a	25,9

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Para coelhos da raça albino nova Zelândia considera-se estado de hiperglicemia valores acima de 180 mg/dL. Observa-se pelos resultados que todos os coelhos apresentam-se normoglicêmicos. Além disso, há pouca diferença entre os valores

encontrados, o que permite dizer que os tratamentos e o ato cirúrgico não interferiram no metabolismo de carboidratos.

Em pacientes normoglicêmicos, o VEGF produzido pelos macrófagos, fibroblastos e células epiteliais induz a fosforilação e ativação do óxido nítrico endotelial (eNOS) que é capaz de ativar a mobilização de Derivados Endoteliais de Células Progenitoras da Medula Óssea (EPCs) para o leito da ferida. A quimiocina do fator derivado de células estromais (SDF-1 α) promove a orientação destas EPCs para o local da lesão, onde participam da neovasculogênese. No estado diabético o excesso de ROS prejudica a ativação de eNOS, limitando, desta forma a cicatrização das feridas (GALLAGHER et al., 2007).

Em relação às concentrações de triacilgliceróis, os resultados mostram que houve uma redução em todos os grupos quando comparado ao grupo solução salina, embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey. O grupo GFIT% apresentou uma redução de 51%, enquanto que no GA5% e GA1% apresentaram reduções de 47,9% e 13,6%, respectivamente, quando comparado ao GSS.

A análise do colesterol mostrou que os grupos GA1% e GFIT foram 10,9% e 25,9% superiores quando comparado ao grupo GSS.

O organismo de queimados em grande extensão corporal responde ao trauma com o aumento das catecolaminas endógenas, cortisol e outros hormônios para fisiologicamente auxiliar o organismo na recuperação. Essas catecolaminas provocam a resposta hipermetabólica observada nesses indivíduos, o que acarreta no aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial, das proteínas plasmáticas, alterações do glucagon no fígado, redução do tempo de coagulação sanguínea, aumento da lipólise e termogênese e o relaxamento da musculatura lisa do trato gastrointestinal (CHAN & CHAN, 2009). O metabolismo da glicose é diminuído, há aceleração da gliconeogênese e da oxidação da glicose, resultando na degradação do músculo esquelético, produção de substrato de aminoácidos para a gliconeogênese hepática (TREDGET, 1992). O metabolismo das gorduras também se altera com o aumento da lipólise.

Pelos resultados encontrados neste trabalho, podemos sugerir que o procedimento de queimadura causado não foi capaz de induzir resposta hipermetabólica nos animais.

5.4.3 Avaliação clínica dos animais e feridas

Os episódios desencadeados durante a evolução do processo de cicatrização são identificados em todas as espécies animais, sendo um processo até certo ponto padrão, independente de ordem taxonômica. Estudos sobre cicatrização, frequentemente, se limitam a utilizar um número restrito de espécies animais como modelos experimentais, sendo os coelhos, ratos e camundongos os mais comumente utilizados (BOHLING et al., 2004).

Os coelhos, em especial, são apontados em grande diversidade de ensaios, sendo que as duas espécies mais frequentemente utilizadas em investigação experimental são os coelhos das raças Nova Zelândia e Holandesa (TEMPLETON, 1996). O coelho foi escolhido devido ao seu pequeno porte, porque permitem que as lesões cutâneas sejam confeccionadas facilmente, e o fácil manejo desses animais contribui para um acompanhamento mais sistemático da evolução do processo de cicatrização (GOTTRUP et al., 2000; SALGADO et al., 2007). Além disso, foram utilizados coelhos machos, pois, variações dos ciclos hormonais das fêmeas podem interferir no mecanismo de reparação tecidual, por exemplo, a redução do estrogênio reduz a produção de colágeno (TEVES et al., 1986).

O peso dos animais de todos os grupos aumentou, em média, 450 g durante o experimento. Redução de peso pode estar relacionada com o processo catabólico da cirurgia, com o processo inflamatório ou ainda com a dificuldade de movimentação dos animais após cirurgia. Durante este experimento, os coelhos não apresentaram dificuldade de movimentação, o que permitiu que estes animais tivessem acesso à ração e se alimentassem sem dificuldades. Em todos os grupos, as feridas não apresentaram sinais macroscópicos de infecção. A partir do segundo dia de tratamento, houve formação de uma crosta em todos os grupos avaliados. O ressecamento da crosta superficial, devido a sua desidratação, provoca a redução do tamanho da crosta, arrastando o tecido a ela aderido e auxiliando no processo de contração da ferida.

A tabela 29 apresenta os resultados do índice de contração da ferida em coelhos tratados com extrato de *Pseudopiptadenia contorta* (angico), solução salina e Fitoscar[®]. A Figura 25 apresenta uma visão geral dos aspectos macroscópicos das feridas (F1) e queimaduras (F2) induzidas experimentalmente nos coelhos e tratadas com extrato de angico e controles.

Tabela 29: Percentual médio de contração em relação ao tamanho original das feridas dos grupos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) no 7º, 10º e 14º dia pós-operatório.

Grupos	Índice de Contração da Ferida (%)					
	7º dia		10º dia		14º dia	
	Média	σ	Média	σ	Média	σ
GSS	13,29	9,91a,b	40,33	24,1a	79,97	7,74a
GA1%	24,58	10,57b,c	57,49	16,1a	79,09	13,02a
GA5%	2,74	14,68a	64,39	14,67a	72,34	11,5a
GFIT	41,42	16,74c	48,46	19,94a	65,51	10,75a
Valor de p	0,000		0,176		0,11	

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

No 7º dia, os grupos tratados com Fitoscar[®] e extrato de angico 1% apresentaram as maiores porcentagens de contração da ferida, reduzindo a área da ferida em 41,4% e 24,5%, respectivamente. Neste período o extrato de angico 1% foi capaz de promover uma contração 84% maior quando comparado à aplicação de solução salina (Tabela 29).

No 10º dia, as maiores porcentagens de contração da ferida foram obtidas nos grupos tratados com angico 5% (64,39%), seguida pelos grupos GA1% (57,49%), GFIT(48,46%) e GSS (40,33%). Ao se comparar cada grupo com o grupo tratado com solução salina, verifica-se que o grupo tratado com angico 5% foi o que apresentou maior porcentagem de contração (60%), seguida pelos grupos GA1% (43%) e GFIT (20%).

No 14º dia, o grupo tratado com solução salina apresentou a maior porcentagem de contração (79,79%), seguida pelos grupos GA1% (79,09%) e GA5% (72,34%). Não houve completo fechamento das feridas no tempo avaliado.

A tabela 30 apresenta o índice de contração em relação aos seguintes intervalos de medida: entre o 1º e 7º dia de tratamento; entre o 7º e 10º dia; entre o 10º e 14º dia; e entre o 7º e 14º dia, e também, a taxa de contração diária (IC/dia) em cada período de observação descrito acima. O objetivo desta análise separada entre os dias foi avaliar o comportamento de cada tratamento nas fases de inflamação e proliferativa da cicatrização.

Tabela 30: Percentual médio de contração da ferida em relação a intervalos de tempo e a respectiva taxa de contração diária (IC/Dia) dos grupos tratados com solução salina, extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar® (GFIT).

Grupos	Índice de Contração da Ferida por período (%)				
	1º-7º dia	7º-10º	10º-14º	7º-14º	1º-14º
		Média	Média	Média	Média
GSS	13,29	27,04	39,64	66,68	79,97
GA1%	24,58	32,91	21,6	54,51	79,09
GA5%	2,74	61,65	7,95	69,6	72,34
GFIT	41,42	7,04	17,05	24,05	65,51
	Taxa de Contração Diária da Ferida (%)				
	IC/Dia	IC/Dia	IC/Dia	IC/Dia	IC/dia
GSS	1,89	9,01	9,91	9,52	5,71
GA1%	3,51	10,97	5,4	7,79	5,65
GA5%	0,39	20,55	1,99	9,94	5,17
GFIT	5,91	2,35	4,26	3,44	4,68

Ao analisar os resultados baseado nas fases de cicatrização, podemos observar que durante a fase inflamatória (período entre o 1º e 7º dia), Fitoscar® apresentou melhores resultados de contração, atingindo 41% de fechamento da ferida. Entretanto, durante a fase proliferativa (a partir do 7º dia) extrato de a 1% e 5% mostrou-se mais eficiente, contraindo a ferida em 69,56% e 54,51% respectivamente. Já o fitoterápico comercial Fitoscar®, na fase proliferativa, apresentou redução de apenas 24,09% (Tabela 30). O comportamento de fechamento da ferida do extrato de angico 1% e 5% foram semelhantes aos estudos realizados com mel e açúcar mascavo em feridas cutâneas em ratos que demonstraram diferentes velocidades de cicatrização (SANTOS et al., 2012). As feridas tratadas com mel apresentaram ligeira diminuição do seu diâmetro inicial nos quatro primeiros dias de tratamento. A partir do sétimo dia, registrou-se uma diminuição acentuada do diâmetro da ferida que se manteve até ao 19º dia de tratamento, tempo de oclusão total da ferida.

Ao analisar a taxa de contração diária (IC/dia), observa-se uma dinâmica dos resultados e dos tratamentos aplicados, o que podemos sugerir uma “rota” adequada para melhor cicatrização para este estudo (Tabela 30). O medicamento Fitoscar® é claramente melhor no processo cicatricial na primeira etapa da cicatrização, com índice de contração diária de 5,91%, ou seja, a cada dia a área da ferida reduz em 5,9%. Posteriormente a esta fase, percebe-se pelos valores diários de contração que o seu efeito não é mais expressivo. Na fase proliferativa há uma mudança de comportamento entre os tratamentos. O extrato de angico na concentração de 5% foi capaz de atingir

uma taxa de contração diária de 20,55% entre o período do 7º ao 10º dia. Este valor é quase dez vezes superior do que obtido pelo Fitoscar® (2,38%). Já entre o 10º e 14º dia, solução salina atinge uma taxa de contração diária de 9,91%. Observando a tabela 30, podemos sugerir para o modelo deste estudo, que a melhor sequência de tratamento para cicatrização da ferida seria: iniciar com Fitoscar®, e a partir do sétimo dia trocar Fitoscar® por extrato de angico 5% até o final da cicatrização, sendo que solução salina seria aplicada todos os dias nas feridas com objetivo de mantê-las limpas e úmidas.

O processo de reparação tecidual é dividido em fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação e os medicamentos atuam primariamente em alguma destas fases. A terapia tópica de feridas tem como propósitos: remover tecido necrótico e corpo estranho do leito da ferida; eliminar processo infeccioso; absorver o excesso de exsudato; manter o leito da ferida úmida; promover isolamento térmico e/ou proteger a ferida de traumas e invasão bacteriana, tendo como objetivo final oferecer condições locais para viabilizar e acelerar o processo fisiológico da cicatrização.

O uso tópico de extrato de angico 1% e 5% proporcionaram condições bioquímicas e fisiológicas para acelerar a contração da ferida na fase proliferativa. Os resultados podem estar relacionados com a presença de flavonóides, taninos e saponinas detectados nos testes de identificação de classe de metabólitos secundários.

A eficácia do processo de cicatrização dos fitoterápicos está relacionada à ação de flavonóides (PERUCHI et al., 2001; PÉREZ-CARREÓN et al., 2002; SIMÕES et al., 2010), taninos (LAKS, 1991; KHANNA et al., 2002) e as saponinas (SIMÕES et al., 2010).

Vários autores já avaliaram o emprego tópico de inúmeros fitoterápicos com o objetivo de influenciar o processo cicatricial, com resultados variados. COELHO et al. (2010) estudaram a ação de pomadas preparadas a partir de extrato bruto aquoso de ipê roxo e barbatimão em feridas cutâneas de ratos. Os extratos favoreceram o processo de cicatrização das feridas cutâneas. O extrato das folhas de babosa, Aloe vera, foi testado em feridas cutâneas de ratos. Os dados obtidos evidenciaram que o processo de cicatrização foi facilitado pela utilização do fitoterápico na forma de extrato glicólico, uma vez que este proporcionou maior contração das feridas experimentais (FALEIRO et al., 2009). Um outro estudo avaliou o efeito do flavonóide epicatequina galato na cicatrização de feridas em ratos. Os resultados mostraram que este flavonóide melhorou a qualidade da cicatrização, devido ao aumento do fator de crescimento endotelial vascular, acelerando a formação de vasos (KAPOOR et al., 2004).

Na medicina natural pouco se sabe sobre a importância curativa da maior parte das espécies pertencentes ao gênero *Pseudopiptadenia*. Neste trabalho, os resultados mostram que o índice de contração apresentado nos grupos tratados com extrato de angico 1% e 5% foram satisfatórios e semelhantes a outros estudos que utilizaram extratos bruto de plantas (COELHO et al., 2010; DORVIGNY et al., 2011). Estudos realizados com o extrato hidroalcoólico de *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc (*Polygonaceae*) incorporado em placebo em uma concentração de 10% obteve índice de contração de ferida de 88% aos 14 dias (WU et al., 2012). Neste trabalho, extrato bruto angico de apenas 1% obteve uma contração de 79% no mesmo período de tempo avaliado.

Os resultados encontrados para solução salina podem ser explicados pelo teor de água maior que ela apresentava em relação aos outros produtos testados. O teor de água no leito da ferida aparentemente facilita a migração epitelial, pois feridas com tecidos adequadamente úmidos curam mais rapidamente do que feridas ressecadas (HANKS & SPODNICK, 2005).

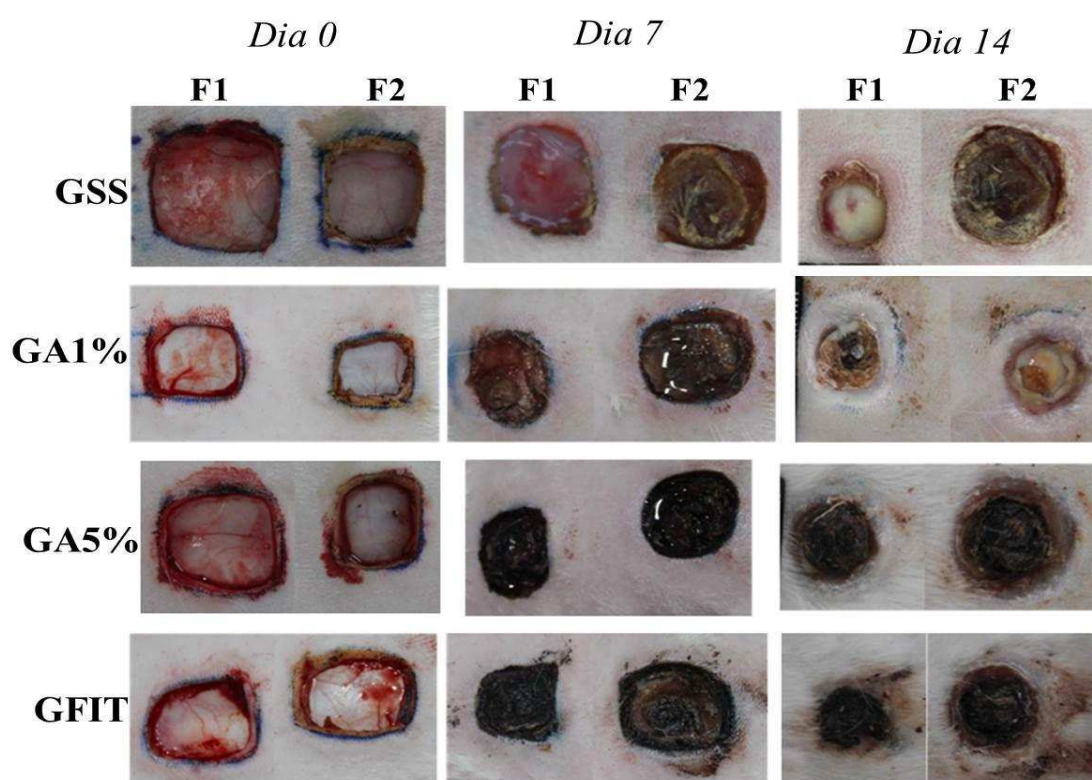


Figura 25: Aspectos macroscópicos das lesões. Grupo tratado com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar® (GFIT). F1 = ferida; F2 = queimadura.

A tabela 31 apresenta os resultados dos parâmetros estereológicos. As figuras 26 apresenta o tecido cicatricial das feridas, mostrando o tecido de granulação, vasos neoformados, fibroblastos e células inflamatórias. A Figura 27 apresenta as fibras colágenas do tecido cicatricial das feridas, em destaque para fibras colágenas tipo I (vermelha) e tipo III (verde).

Tabela 31: Resultados estereológicos de densidade volumétrica (Vv) para vasos, fibroblastos, células inflamatória (ci) e índice de maturação do colágeno (IMaC) para feridas em coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento.

Grupos	Estereologia da Ferida (%)							
	Vv_vasos		Vv_fibroblastos		Vv_ci		IMaC	
	Média	σ	Média	σ	Média	σ	Média	σ
GSS	4,24	2,21a	11,61	3,95a	6,07	1,36a	12,61	1,31a
GA1%	7,10	4,57a	12,33	1,67a	9,99	4,79a	12,84	3,34a
GA5%	4,35	2,47a	11,40	2,31a	14,10	3,68a	15,85	1,58a
GFIT	3,53	0,78a	9,95	2,56a	10,54	5,65a	12,15	1,91a

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Os resultados mostram que não diferença significativa entre os grupos para os parâmetros densidade de vasos (Vv_vasos), densidade de fibroblastos (Vv_fibroblastos), densidade de células inflamatórias (Vv_ci) e índice de maturação do colágeno (IMaC) pelo teste de Tukey.

Embora não tenham apresentado diferença significativa, os resultados estereológicos mostram que extrato de angico 1% apresentou maiores valores de densidade de vasos (7,10%) e fibroblastos (12,33%). Grupo tratado com extrato de angico 5% apresentou maior porcentagem do índice de maturação do colágeno (15,85%). Para avaliar o índice de maturação do colágeno é necessário que se colete amostras da ferida antes da sua completa cicatrização, pois nesta condição há apenas presença do colágeno tipo I. Além disso, estudos afirmam que os fibroblastos atingem seu maior número no 7º dia, e que o colágeno, proteína mais abundante do tecido conectivo, é sintetizado pelos fibroblastos (SILVA & PENNA, 2012). Esta é uma informação que permite decidir em qual momento iniciar a análise da maturação do colágeno, sendo ideal o período entre o sétimo dia e antes da completa oclusão da ferida.

O desafio da estereologia é interpretar o arranjo tridimensional estrutural interno com base na análise de cortes da estrutura que mostram apenas uma informação bidimensional. A estereologia, ao contrário da morfometria utiliza de um sistema-teste composto por teste de pontos ou linha de teste sobre uma área de teste. Morfometria determina comprimento, área e perímetro. Já a estereologia estima densidades. As mais utilizadas são densidade de volume (V_v), densidade de comprimento (L_v), densidade de superfície (S_v) e densidade numérica (N_v) (MANDARIM-LACERDA, 2003).

Embora estudos estereológicos sejam cada vez mais frequentes na literatura, particularmente no desenvolvimento / evolução de patologia da área das neurociências, ainda são escassos os trabalhos de cicatrização cutânea que utilizaram esta técnica como método quantitativo. Resultados semelhantes de análise estereológica foram encontrados em estudos realizados com extrato glicólico 10% de *Brassica oleracea* var. capitata L. (Brassicaceae), que promoveu 90% de contração da ferida em 16 dias de tratamento e estimulou maior maturação do colágeno (GONÇALVES et al., 2013). Neste estudo, extrato de angico 1% e 5% promoveu a contração em quase 80%, com os maiores valores de fibroblastos e colágeno tipo I, no período de 14 dias de tratamento. Estes resultados sugerem dizer que extrato de angico estimulou a formação de fibroblastos e maturação do colágeno.

Na análise estereológica, verificou-se a presença de reação inflamatória, com presença de células inflamatórias em todos os grupos, com maior porcentagem de células inflamatórias (V_v_{ci}) no grupo GA5% (14,10%), seguido do grupo GFIT (10,54%). Já o grupo GSS apresentou menor valor de células inflamatórias (6,07%). Estes achados podem estar relacionados com uma possível contaminação microbiana que tenha se instalado na ferida logo abaixo da crosta formada.

Sabe-se que solução salina (0,9%) é uma solução isotônica que não interfere com o processo de cicatrização normal, não causa dano tecidual, não causa sensibilização ou alergias ou altera a flora bacteriana normal da pele, não irrita e nem retarda a cicatrização e pode ser utilizada em todas as feridas limpas (ATIYEH et al., 2009). Contudo, o uso diário de solução salina tenha proporcionado a limpeza da área da ferida, além da manutenção da umidade, o que possivelmente impediu aumento da inflamação e justificaria a menor porcentagem de células inflamatórias. Porém, outros estudos indicam que a solução salina possui atividade antisséptica e ação benéfica na cicatrização, estimulando o desbridamento autolítico e favorecendo a formação de tecido de granulação (VIEIRA et al., 2008).

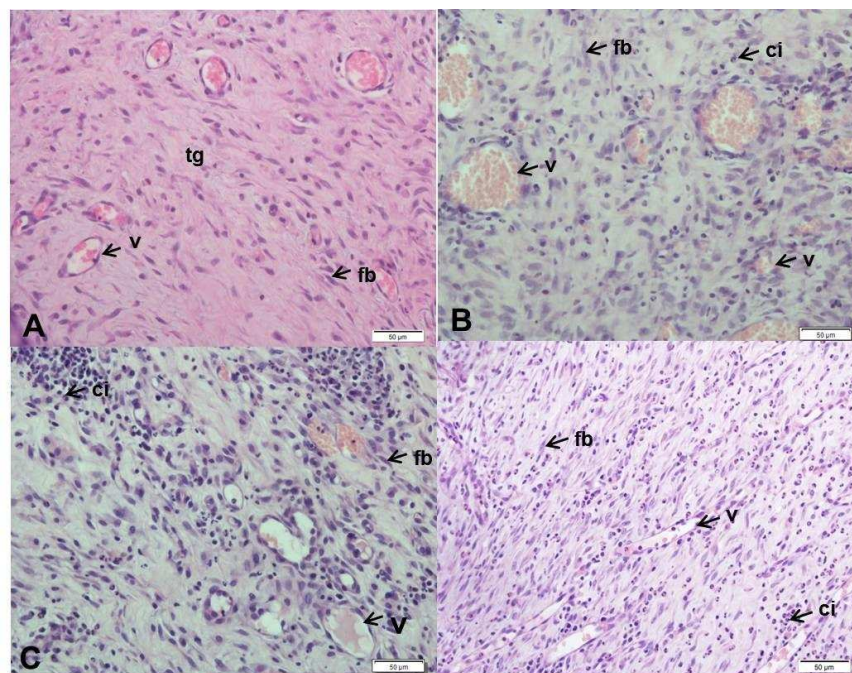


Figura 26: Fotomicrografia de cortes transversais do tecido cicatricial de ferida em coelhos no 14º dia de tratamento. As setas indicam a presença de vasos (v), tecido de granulação (tg), células inflamatórias (ci) e fibroblastos (fb). (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de angico 1%, (C) tratado com extrato de angico 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 200X

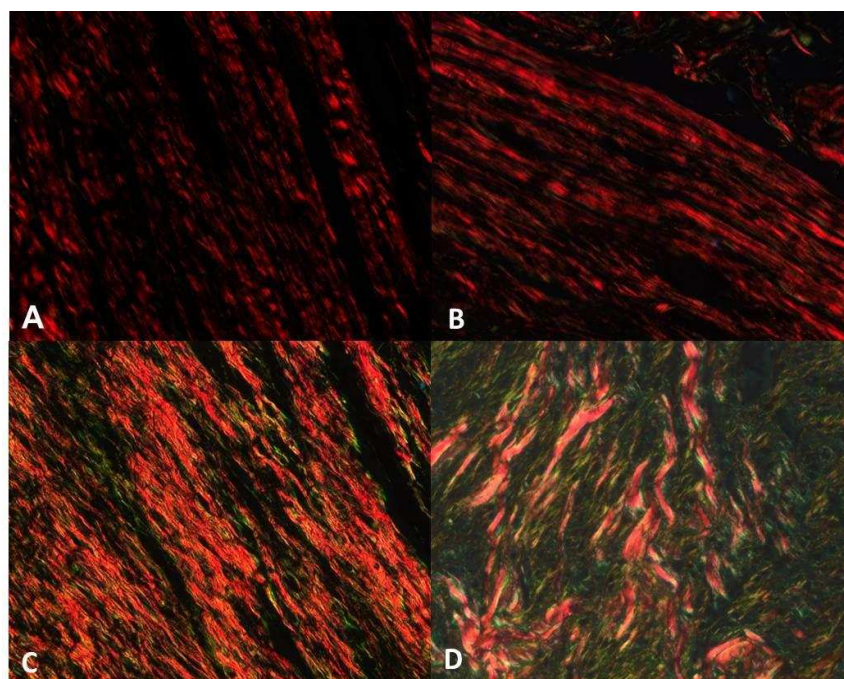


Figura 27: Fotomicrografia obtida sob microscopia de polarização com distribuição das fibras de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde) de feridas em coelhos após quatorze dias de tratamento. (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de angico 1%, (C) tratado com extrato de angico 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Picrosirius. Aumento: 200X.

A tabela 32 apresenta o índice de contração da queimadura em coelhos tratados com extrato de angico 1% e 5%, solução salina e Fitoscar[®].

Tabela 32: Percentual médio de contração em relação ao tamanho original das queimaduras dos grupos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) nos 7º, 10º e 14º dia pós-operatório.

Grupos	Índice de Contração da Queimadura (%)					
	7º dia		10º dia		14º dia	
	Média	σ	Média	σ	Média	σ
GSS	5,46	15,38a	29,02	23,6a	64,67	19,10a
GA1%	1,43	07,61a	40,43	20,53a	60,15	19,06a
GA5%	3,31	13,98a	49,74	21,02a	55,09	24,08a
GFIT	14,25	16,39a	31,08	30,79a	44,41	28,28a
Valor de p	0,406		0,450		0,476	

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

No 7º dia, o grupo tratado com Fitoscar[®] apresentou maior porcentagem de contração da área da queimadura (14,25%), seguida pelo grupo tratado com solução salina (5,46%). Em todos os grupos houve uma expansão da área da ferida nos três primeiros dias de avaliação. O baixo índice de contração em todos os grupos pode ser justificado por esta expansão inicial das queimaduras.

No 10º dia, os maiores índices de contração foram obtidos pelo grupo GA5% (49,74%), seguido pelo grupo GA1% (40,43%). Neste período, o extrato de angico 5% foi capaz de promover uma contração 71% maior quando comparado à aplicação de solução salina (Tabela 32).

No 14º dia, o maior índice de contração foi obtida pelo grupo GSS (64,67%), seguida pelos grupos GA1% (60,15%), GA5% (55,09%) e Fitoscar[®] (44,41%), não havendo diferença significativa entre os grupos.

Os resultados de contração final da queimadura foram inferiores aos encontrados para contração final da ferida. Entretanto, percebe-se um padrão nos dois tipos de feridas tratadas com extrato de angico. Fitoscar[®] é melhor nos primeiros dias da cicatrização, seguido pelo extrato angico e solução salina a partir do 7º dia de avaliação.

A ausência de diferença entre os grupos pode estar relacionada pelo fato dos animais serem adultos, jovens, machos e aparentemente hígidos, o que contribuiu para uma boa resposta no processo de cicatrização. Sabe-se que a cicatrização ocorre

naturalmente em indivíduos saudáveis e alguns fatores relacionados ao paciente podem dificultar o processo cicatricial, como por exemplo: idade, nutrição, doenças crônicas como diabetes mellitus e insuficiências vasculares (PINTO et al., 2009).

A tabela 33 apresenta o índice de contração em relação aos seguintes intervalos de medida: entre o 1º e 7º dia de tratamento; entre o 7º e 10º dia; entre o 10º e 14º dia; e entre o 7º e 14º dia, e também, a taxa de contração diária (IC/dia) em cada período de observação descrito acima.

Tabela 33: Percentual médio de contração da queimadura em relação a intervalos de tempo e a respectiva taxa de contração diária (IC/Dia) dos grupos tratados com solução salina, extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar® (GFIT).

Grupos	Índice de Contração da Ferida da Queimadura (%)				
	1º-7º dia	7º-10º	10º-14º	7º-14º	1º-14º
		Média	Média	Média	Média
GSS	5,46	23,56	35,65	59,21	64,67
GA1%	1,43	39,00	19,72	58,72	60,15
GA5%	3,31	46,43	5,35	51,78	55,09
GFIT	14,25	16,83	13,33	30,16	44,41
	Taxa de Contração Diária da Queimadura (%)				
	IC/Dia	IC/Dia	IC/Dia	IC/Dia	IC/dia
GSS	0,78	7,85	8,91	8,46	4,62
GA1%	0,20	13,00	4,93	8,39	4,30
GA5%	0,47	15,48	1,34	7,40	3,94
GFIT	2,04	5,61	3,33	4,31	3,17

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Ao analisar o índice de contração pelas fases de cicatrização, conclui-se que Fitoscar® apresentou os melhores resultados na fase inflamatória, obtendo 14,25% de fechamento da área queimada. Extrato de angico 1% e 5% no período entre o 7º e 10º dia, contraiu a área da queimadura em 39% e 46%, respectivamente. Neste mesmo período, Fitoscar® contraiu a ferida em apenas 16,83%. Entretanto, entre o 10º e 14º dia solução salina apresentou melhor resultado, contraindo a queimadura em 35,65%, contra 5,35% do extrato de angico 1%. A análise da fase proliferativa, período entre 7º e 14º dia analisado neste experimento, mostrou que solução salina e extrato de angico 1% foram melhores.

Ao analisar a taxa de contração diária (IC/dia), observa-se uma dinâmica dos resultados e dos tratamentos aplicados, o que podemos sugerir uma “rota” adequada

para melhor cicatrização para este estudo (Tabela 33). O medicamento Fitoscar[®] é superior na primeira etapa da cicatrização, com índice de contração diária de 2,04%. Na fase proliferativa há uma mudança de comportamento entre os tratamentos. Entre o 7º e 10º, extrato de angico na concentração de 5% e 1% foi capaz de atingir uma taxa de contração diária de 15,48% e 13,0%, respectivamente. Já entre o 10º e 14º dia, solução salina atinge uma taxa de contração diária de 8,91%. Observando a tabela 30, podemos sugerir para o modelo deste estudo, que a melhor sequência de tratamento para cicatrização da queimadura seria: iniciar com Fitoscar[®], e a partir do sétimo dia trocar Fitoscar[®] por extrato de angico 5% ou 1% até o final da cicatrização, sendo que solução salina seria aplicada todos os dias nas queimaduras com objetivo de mantê-las limpas e úmidas.

Estima-se que cerca de um milhão de pessoas por ano sofra algum grau de queimadura no Brasil, sendo que destes, cerca de dois mil morrem decorrente de complicações das lesões (LOPES et al., 2004). A prioridade no tratamento de queimaduras é minimizar a perda tecidual e evitar o choque. Para isso, a área deve ser lavada com água fria e aplicada compressas frias no ferimento. Monitorar os sinais vitais, estado mental do paciente, hematócrito, proteínas totais, produção urinária, pressão venosa central, eletrólitos, gases sanguíneos e o peso corporal diário são essenciais para se tratar o choque. Também se devem administrar analgésicos para aliviar a dor. Além disso, o tratamento das feridas é importante, pois complicações como infecção e septicemia podem aumentar a morbidade do paciente (FOSSUM, 2005).

Lesões por queimaduras requerem tratamento conforme a severidade da queimadura. Queimaduras menores geralmente são tratadas com tópicos e queimaduras severas necessitam de atenção médica e internação hospitalar. Tratamento com antimicrobianos, como por exemplo, sulfatiazina de prata, nitrato de prata e bacitracina são utilizados no controle da infecção em queimaduras. No entanto, a aplicação tópica destes antimicrobianos tem efeito parcial sobre a cicatrização de feridas. Portanto, há uma necessidade de buscar novas drogas para o tratamento de queimaduras.

Um estudo realizado com extratos hexânico, etílico, metanólico e aquoso da planta *Centella asiatica* em queimaduras induzidas com placa quente em ratos, mostrou índice de contração após 14 dias de tratamento de 53,87%, 57,53%, 60,31% e 59,82% respectivamente para os extratos citados. Neste estudo, o extrato hidroalcoólico de angico 1% e 5% reduziu a área da queimadura em 60,15% e 55,09%, respectivamente,

em 14 dias de tratamento (SOMBOONWONG et al., 2012). Os resultados encontrados para tratamento de queimaduras de extrato de angico 1% (*Pseudopiptadenia contorta*) foi melhor que todos os extratos de *Centella asiatica*. Entretanto, estudo realizado com extrato etanólico das flores de *Tecoma stans* na concentração de 10% em queimaduras induzidas em ácido sulfúrico em ratos, mostrou completo fechamento da ferida aos 14 dias de tratamento. Os autores atribuíram o efeito cicatrizante do extrato de *Tecoma stans* aos seus constituintes bioativos, como os taninos (KAMESHWARAN et al., 2014).

Na prospecção fitoquímica do extrato de *Pseudopiptadenia contorta* foi detectada presença de flavonóides, taninos e saponinas. Também foi verificado que extrato de angico possui atividade antioxidante pelo teste de DPPH. Sabe-se que antioxidantes podem controlar o estresse oxidativo das feridas e acelerar a cicatrização (ANAND et al., 2010). Os flavonóides presentes no extrato de angico podem ter exercido um papel importante como anti-oxidantes, auxiliando na cicatrização. O efeito antioxidante dos flavonóides parece estar relacionado com sua ação antitrombótica. A ação antitrombótica e vasoprotetora de quercetina, rutina e outros flavonóides tem sido atribuída à sua habilidade de ligar-se á membrana de plaquetas e eliminar radicais livres. Por sua ação antioxidante, os flavonoides restabelecem a biossíntese e ação de prostaciclina endotelial e fator de relaxamento derivado do endotélio, os quais são inibidos pelos radicais livres (LALE & HERBERT, 1996).

Taninos são capazes de precipitar proteínas, propiciando um efeito anitmicrobiano e antifúngico. O complexo tanino-proteína e/ou tanino-polissacarídeo forma uma camada protetora sobre tecidos epiteliais lesionados, podendo, logo abaixo dessa camada, o processo curativo ocorrer naturalmente (MELLO et al., 2001). Os taninos presentes no extrato de angico auxiliaram na cicatrização.

A tabela 33 apresenta os resultados dos parâmetros estereológicos. A figura 28 apresenta o tecido cicatricial das queimaduras, mostrando o tecido de granulação, vasos neoformados, fibroblastos e células inflamatórias. A Figura 29 apresenta as fibras colágenas do tipo I (vermelha) e tipo III (verde).

Tabela 34: Resultados estereológicos de densidade volumétrica (Vv) para vasos, fibroblastos, células inflamatória (ci) e índice de maturação do colágeno (IMaC) para queimaduras em coelhos tratados com solução salina (GSS), extrato de angico 1% (GA1%), extrato de angico 5% (GA5%) e pomada Fitoscar[®] (GFIT) após 14 dias de tratamento.

Grupos	Estereologia da Queimadura (%)							
	Vv_vasos		Vv_fibroblastos		Vv_ci		IMaC	
	Média	σ	Média	σ	Média	σ	Média	σ
GSS	3,63	0,49a	6,18	0,66a	7,80	4,54a	15,46	0,41a
GA1%	2,99	1,48a	7,02	0,01a	8,26	5,28a	11,40	3,3b
GA5%	3,15	1,64a	7,54	0,6a	8,54	3,06a	10,21	3,83b
GFIT	5,28	1,84a	6,75	1,45a	4,31	0,45a	12,74	0,33b

Legenda: Dados expressos em média e desvio-padrão (σ). As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos para densidade de vasos, fibroblastos e células inflamatórias pelo teste de Tukey. A maior porcentagem de vasos foi encontrada no grupo tratado com Fitoscar[®] (5,28%). Extrato de angico 1% e 5% apresentaram as maiores porcentagens de fibroblastos, 7,02% e 7,54%, respectivamente e, também maior porcentagem de células inflamatórias. Os resultados para IMaC mostram que houve diferença significativa entre os grupos, sendo a maior porcentagem encontrada no grupo tratado com solução salina (15,46%).

O tratamento de queimaduras sempre foi um desafio, tanto pela sua gravidade, como pela multiplicidade de complicações que normalmente ocorrem. As falhas mais importantes do reparo ocorrem em estágios iniciais, levando à diminuição dos elementos celulares e alterações na síntese de colágeno. Diversos fatores locais e sistêmicos interferem e retardam a cicatrização e, por isso, a reparação tecidual tem merecido atenção em vários estudos, em busca de métodos terapêuticos que possam solucionar ou minimizar as falhas no processo (CARVALHO et al., 2003). Podemos observar neste trabalho que a queimadura apresentou menores índices de contração em todos os períodos avaliados quando comparado aos índices de contração da ferida cirúrgica (Tabelas 29 e 32). Além disso, os dados histológicos mostram que apresentaram em média maior porcentagem de fibroblastos e vasos sanguíneos. Estes dados estão de acordo com a literatura que relata que queimaduras são mais difíceis de serem cicatrizadas.

A utilização da coloração de Picrossirius examinada sob luz polarizada apresenta marcante sensibilidade e especificidade para localizar as fibras colágenas (FONSECA,

2003). Podem-se distinguir diferentes tipos de colágenos por meio de padrões de cores, diferenças de diâmetro e arranjo estrutural das fibras (HIRSHBERG et al., 1996; HIRSHBERG et al, 1999). Colágeno tipo III (verde) é inicialmente produzido por fibroblastos, a fim de orientar a proliferação e migração de mais fibroblastos e de células endoteliais durante a formação do tecido de granulação (RAMOS & MIRANDA, 2007; FLEISCHMAJER et al., 1990). Em seguida, colágeno tipo III é substituído por colágeno do tipo I para fornecer força de tração e estabilidade mecânica do tecido dérmico fibroso conectivo fibroso (FRIEDMAN et al., 1993).

Os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes aos de DE ALMEIDA (2013) que avaliou o processo de colagenização em queimaduras induzidas em coelhos Nova Zelândia. Eles observaram um predomínio de colágeno tipo I em relação ao tipo III aos 14 dias de tratamento.

Nos resultados apresentados na tabela 34, a colagenização apresenta mais avançada no grupo tratado com solução salina (15,46%). Contraditoriamente, este grupo apresenta a menor densidade de fibroblastos. Pelos resultados de fibroblastos e dados da literatura sobre a produção de colágeno, esperava-se que o grupo tratado com angico 5% apresentasse o maior IMaC.

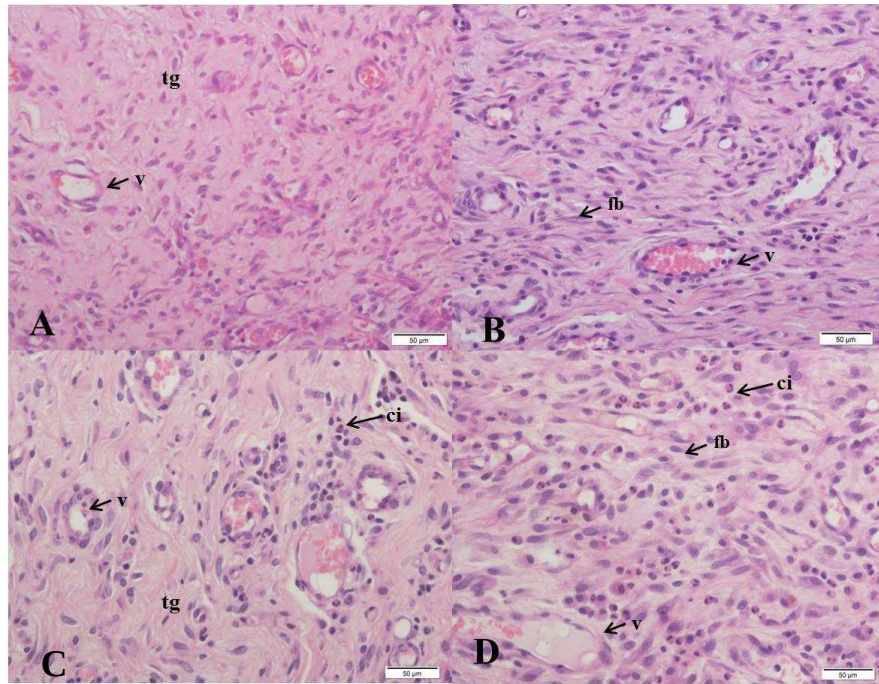


Figura 28: Fotomicrografia de cortes transversais do tecido cicatricial de queimadura em coelhos no 14º dia de tratamento. As setas indicam a presença de vasos (v), tecido de granulação (tg), células inflamatórias (ci) e fibroblastos (fb). (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de angico 1%, (C) tratado com extrato de angico 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 200X.

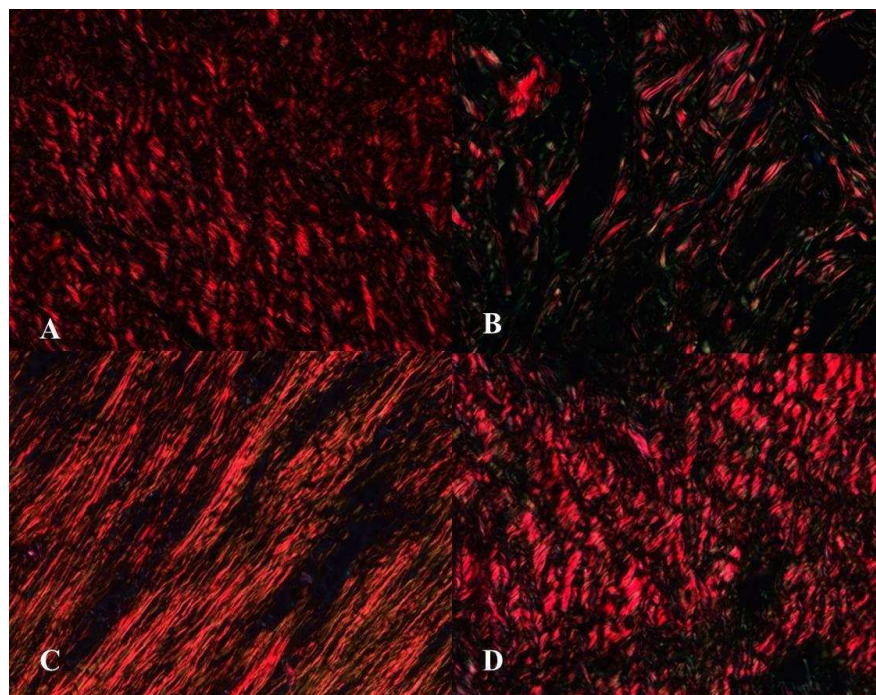


Figura 29: Fotomicrografia obtida sob microscopia de polarização com distribuição das fibras de colágeno tipo I (vermelho) e III (verde) de queimaduras em coelhos após quatorze dias de tratamento. (A) grupo tratado com solução salina 0,9%; (B) tratado com extrato de angico 1%, (C) tratado com extrato de angico 5% e, (D) tratado com pomada Fitoscar®. Coloração: Picrosirius. Aumento: 200X

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

a) Em relação à avaliação clínica dos animais:

- ✓ Os extratos de ingá e angico aplicados em forma de creme via tópica não provocaram alterações hematológicas nos coelhos e não apresentaram infecção sistêmica.
- ✓ Em relação aos parâmetros bioquímicos podemos concluir que tanto extrato de ingá quanto angico não apresentaram toxicidade hepática e renal e também não influenciaram no metabolismo energético dos animais.
- ✓ Em relação aos micronutrientes cálcio, zinco, fósforo e cálcio, extratos de ingá e angico não provocaram alterações significativas;

b) Em relação à cicatrização:

- ✓ O processo de cicatrização é substancialmente diferente entre ferida e queimadura, sendo o tempo de cicatrização da queimadura mais lento no modelo apresentado.
- ✓ Tanto extrato de ingá quanto de angico promoveram a cicatrização da ferida e queimadura.
- ✓ Extratos de ingá e angico foram eficazes na fase proliferativa da cicatrização, apresentando melhor índice de contração.
- ✓ Os parâmetros estereológicos indicam que os extratos de ingá e angico contribuíram para a promoção da fibroplasia, angiogênese e maturação do colágeno, tanto na ferida quanto na queimadura.
- ✓ Sugere-se que a presença de compostos bioativos presentes nos extratos, como flavonoides e taninos, sejam os responsáveis pela atividade antioxidante e pela aceleração da cicatrização na fase proliferativa. Entretanto, mais estudos na prospecção e identificação fitoquímica devem ser realizados.

- a) A aplicação tópica do extrato de *Inga subnuda* e *Pseudopiptadenia contorta* não induziu toxicidade nos animais avaliados pelos parâmetros bioquímicos, hematológicos e comportamentais avaliados;
- b) Os extratos de *Inga subnuda* e *Pseudopiptadenia contorta* auxiliou a cicatrização de feridas e queimaduras por meio do:
 - aumento da fibroplasia, angiogênese e maturação de colágeno.
 - aumento da velocidade de fechamento de ferida e da queimadura na fase proliferativa da cicatrização.
- c) O efeito antioxidante parece contribuir para o potencial cicatrizante do extrato de *Inga subnuda* e *Pseudopiptadenia contorta*;

7. BIBLIOGRAFIA

ACKERMAN, M.R. Acute inflammation. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. Pathologic basis veterinary disease. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2007. cap.3-4, p.101-191.

AGREN, M.S.; MERTZ, P.M.; FRANZIN, L. A comparative study of three occlusive dressing in the treatment of full-thickness wounds in pigs. **J Am Acad Derm.**, v.36, n.1, p. 53-58, 1997.

ALVARENGA, L.F. Estudo da Hovenia dulcis na diabetes e na cicatrização de feridas em coelhos. 2008, 219f. Dissertação (Mestrado) – Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

ALVES, D.F.S.; JÚNIOR-CABRAL, F.C.; CABRAL, P.P.A.C.; JÚNIOR-OLIVEIRA, R.M.; REGO, A.C.M.; MEDEIROS, A.C. Efeitos da aplicação tópica do mel de Melipona subnitida em feridas infectadas de ratos. **Rev Col Bras Cir.**, v.35, n.3, p.188-93, 2008.

ALIASL, J.; BARIKBIN, B.; KHOSHABAN, F.; NASERI, M.; SEDAGHAT, R.; KAMALINEJAD, M.; TALEI, D.; EMADI, F.; AKBARI, Z.; ALIASL, F.; JALALY, N.Y.; MOHSENI-MOGHADDAM, P. Effect of Arnebia euchroma ointment on post-laser wound healing in rats. **J Cosmet Laser Ther**, v.17, n.1, p.41-5, 2015.

AMALSADVALA, T.; SWAIN, S.F. Management of hard-to-heal wounds. **Veterinary Clinics Animal Practice**, v.36, n.4, p.693-711, 2006.

AMERICANA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 9., 2009, Rio de Janeiro. Anais eletrônicos [CD-ROM], Rio de Janeiro, 2009b.

ANAND, T.; NAIKA, M.; KUMAR, P.G.; KHANUM, F. Antioxidant and DNA damage preventive properties of Centella asiatica (L). **Pharmacognosy Journal**, v.2, n.17, p.53-8, 2010.

ARAÚJO, G.L. **Estudo de formulações de fitoderivados e flavonóides na Inflamação e cicatrização de feridas em coelhos.** 2010, 114f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ARNOLD, F.; WEST, D.C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol. Ther.**, v.52, n.3, p.407-422, 1991.

ARTZ, C.P.; MONCRIEF, J.A.; PRUITT, B.A. **Burns: a team approach.** Philadelphia: WB Saunders; 1979. p.583.

ASADI, S.Y.; Parsaei, P.; Karimi, M.; Ezzati, S.; Zamiri, A.; Mohammadizadeh, F.; Rafieian-Kopaei, M. Effect of green tea (Camellia sinensis) extract on healing process surgical wounds in rat. **International Journal of Surgery**, n.11, n.4, p.332-337, 2013.

ASHKANI-ESFAHANI¹, S.; IMANIEH, M.H.; KHOSHNEVISZADEH, M.; MESHKSAR, A.; NOORAFSHAN, A.; GERAMIZADEH, B.; EBRAHIMI, S.; HANDJANI, F.; TANIDEH, N. The Healing Effect of *Arnebia Euchroma* in Second Degree Burn Wounds in Rat as an Animal Model. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v.14, n.2, p.70-74, 2012.

ATIYEH, B.S.; DIBO, S.A., HAYEK, S.N. Wound cleansing, topical antiseptics and wound healing. **International Wound Journal**, v.6, n.6, p.420-429, 2009.

BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J.T. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potencial bacterial agent. **Journal Clinical Investigation**, v.52, n.3, p.741-744, 1973.

BAFFA, L.P.; GARCIA, R.L.S.; CAMPOS, A.D.; ROCHA, J.J.R.; FERES, O. Efeito da Anemia Aguda na Cicatrização de Anastomoses Colônicas. Estudo Experimental em Ratos. **Rev bras Coloproct**, 2005;25(1):24-30.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BARBOSA, E.; MOREIRA, E.A.; FAINTUCH, J.; PEREIRA, M.J.L Suplementação de antioxidantes: enfoque em queimados. **Revista de Nutrição**, v.20, n.6, p.693-702, 2007.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F. & LIMA, H.C. **Leguminosae**. In: Sistemática de Angiospermas do Brasil. Viçosa:Universidade Federal de Viçosa, v.2, p. 15-100, 1984.

BEHEREGARAY, W.K.; GIANOTTI, G.C.; LEAL, J.S.; GARCEZ, T.; CONTESINI, E.A. Eletroestimulação na cicatrização de feridas cutâneas experimentais em coelhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.5, p.878-883, 2014.

BERETTA, D.C.; EURIDES, D.; MORAES, J.R.E.; GUIMARÃES, E.C.; OLIVEIRA, W.S.; BELETTI, M.E. Efeitos da estimulação elétrica na cicatrização do tendão do músculo gastrocnêmio em coelhos (*Oryctolagus cunicullus*). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.10, n.3, p.879-86, 2009.

BIESALSKI, H.K. Polyphenols and inflammation: basic interactions. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.**, v.10, n.6, p.724-728, 2007.

BISINOTTO, F.M.B.; ABUD, T.M.; NETO, J.A.; SOUSA, M.C.Q. Queimadura Provocada por Bisturi Elétrico Associado ao Oxímetro de Pulso. Relato de Caso. **Rev Bras Anesthesiol**, v.46, n.2, p.133-135, 1996.

BLANES, L. **Tratamento de feridas**: Cirurgia vascular, guia ilustrado. São Paulo: 2004.

BLOTNIK, S.; PEOPLES, G. E.; FREEMAN, M. R. E.; EBERLEIN, T. J.; KLAGSBRUN, M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblast differential production and release by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **Proc. Natl. Acad. SCI. USA.**, v.91, n.8, p.2890-2894, 1994.

BOGGIO, R.F.; FREITAS, V.M.; PAGGIARO, A.O; HERSON, M.R; FERREIRA, M.C.; MACHADO-SANTELLI, G.M. Estudo in vitro dos efeitos do bloqueador do canal de cálcio (verapamil) sobre a biossíntese e contração da matriz extracelular. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.24, n.1, p.91-95, 2009.

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

BOLGIANI, A.N.; SERRA, M.C.V.F. Atualização no tratamento local das queimaduras. **Rev. Bras. Queimaduras**, Florianópolis, v.9, n.2, p.38-44, 2010.

BOOTS, A.W.; HAENEN, G.R.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **Eur J Pharmacol.**, v.585, n.2/3, p.325-337, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 60 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 92 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS – Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC Nº 10 de 09 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

BRASIL. Resolução RDC nº 10, 9 de março de 2010. Disponível em: <http://www.fitoterapia.com.br/portal/pdf/rdc10.pdf> [Acesso em 24 out 2014].

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf [Acesso em 24 out 2014].

BRASILEIRO FILHO, G. **BOGLIOLO – Patologia**. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 1492 p.

BREM, H.; TOMIC-CANIC, M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. **J. Clin Invest**, v.117, n.5, 1219-22, 2007.

BRITO, M.T.V.; MARQUES, M.C.; CORREIA, J.H.D.; SILVA-CARVALHO, L. Caracterização de um modelo experimental de hipertensão portal. **Rev. Portuguesa de Ciênc. Vet.**, v.99, n.552, p.199-205, 2004.

BRITO, N.M.B.; SILVA, P.R.F.; SILVA, G.C.F.; CASELHA, S.F.M.; SAMPAIO, A.R.S.; CARVALHO, R.A. Avaliação macroscópica de feridas cutâneas abertas, em ratos, tratadas com óleo de andiroba. **Rev. Med.**, v.15, n.2, p.17-22, 2001.

BRODERICK, N. Understanding chronic wound healing. **The Nurse Practitioner**, v.34, n.10, p.17-22, 2009.

BURD, C.; OLSON, B.; LANGEMO, D.; HUNTER, S.; HANSON, D.; OSOWSKI, K.F.; SAUVAGE, T. Skin care strategies: In a skilled nursing home. **Journal Gerontology Nursing**, v. 20, n.11, p.28- 34, 1994.

CAMPBELL, T.W. **Bioquímica clínica de mamíferos: animais de laboratórios e espécies variadas**. In.:THRALL, M.A. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Roca 2006, p.433-447.

CANDIDO, L. C.. **Feridólogo: tratamento clínico-cirurgico de feridas cutâneas agudas e crônicas**. São Paulo, dez, 2006.

CARVALHO, G.D. Efeito da ingestão de água-de-coco e água magnetizada na reparação de feridas experimentais em coelhos. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa para obtenção do título de Doctor Scientiae. 2012.

CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini Rev Med Chem.**, v.8, n.13, p.1429-40, 2008.

CENTER, S.A. Avaliação bioquímica da função hepática no cão e gato. In: KIRK, R.W. **Atualização terapêutica veterinária**. São Paulo: Manole, 1988. v.2.

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação. **Manual de utilização de animais/FIOCRUZ**. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: http://www.comissoes.propp.ufu.br/sites/comissoes.propp.ufu.br/files/Anexos/Bookpage/Manual_procedimentos_FIOCRUZ.pdf. Acesso: maio de 2013.

CHAN, M.M.; CHAN, G.M. Nutritional therapy for burns in children and adults. **Nutrition**,v.25, n.3, p.261-9, 2009.

CHEN, H.; ZHANG, M.; XIE, B. Components and antioxidant activity of polysaccharide conjugate from green tea. **Food Chemistry, Londres**, v. 90, n. 1-2, p. 17- 21, 2005.

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

COELHO-LEMOES, I.C.M.; CAMPOS, A.C.; DE ALMEIDA, M.; SCHÜLER, S.L.; GURMINI, J.; MALAFAIA, O.; ANDRADE, D.F. In-Utero Malnutrition Influences Wound Healing of Newborn Rats as Measured by Tensile Strength and Collagen Deposition. **J. Parent Ent Nut**, v.28, n.4, p.241-244, 2004.

COELHO, J.M.; ANTONIOLLI, A.B.; SILVA, D.N.; CARVALHO, T.M.M.B.; PONTES, E.R.J.C.; DASHIRO, A.N. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v.37, n.1, p.045-051, 2010.

COLTRO, O.S.; FERREIRA, M.C.; BATISTA, B.P.S.N.; NAKAMOTO, H.A.; MILCHESKI, D.A.; TUMA, J.R.P. Atuação da cirurgia plástica no tratamento de feridas complexas. **Rev Col Bras Cir**, v. 38, n.6, p.381-6, 2011.

CORREA, A. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro. **Ministério da Agricultura**, v. 4, p.270-301, 1969.

CORREA, S.M.V.C.; CONSERVA, L.M.; MAIA, J.G.S. Constituents of roots of *Inga edulis* var. *Parviflora*. **Fitoterapia**, Milano, v.66, p.379, 1995.

CORRÊA, C. Radicais livres. **Revista de Ciência Elementar**, v.20, n.1, P.1-2, 2014.

COSTA, J.G.M.; LEITE, O.; DUBOIS, A.F.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; CAMPOS, A.R.; DA ROCHA, J.B. Antioxidant effect of *Stryphnodendron rotundifolium* Martius extracts from Cariri-Ceará State (Brazil): potential involvement in its therapeutic use. **Molecules**, Basel, v. 17, n.1, p.934-950, 2012.

COSTA, J.G.M.; LEITE, G.O.; DUBOIS, A.F.; SEEGER, R.L.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; CAMPOS, A.R.; DA ROCHA, J.B.T. Antioxidant effect of *Stryphnodendron rotundifolium* Martius extracts from Cariri-Ceará State (Brazil): potential involvement in its therapeutic use. **Molecules**, v.17, n.1, p. 934-950, 2011.

COTELLE, N. Role of flavonoids in oxidative stress. **Curr. Top. Med. Chem.**, v.1, n.6, p.569-590, 2001.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, n.1, v.3, p.241-256, 2009.

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

DANTAS, S. R. P. E.; JORGE, S. A. **Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

DE ALMEIDA, E.B.; CORDEIRO J.C.; KARLA DE LIMA, A., DE OLIVEIRA N.L.; DE PONTES-FILHO, N.T.; OLIVEIRA S.L.; LEAL I.C.S, DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **J Ethnopharmacol.**, v.147, n.2, p. 419-25, 2013.

DEALEY, C. **Cuidando de Feridas: um guia prático para enfermeiras**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1992, p.96-102.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras**. São Paulo: Atheneu, 2001.

DIAL, S.M. Clinicopathologic evaluation of the liver. **The Veterinary Clinics of North America**, v. 25,n.2, p.257-273, 1995.

DORVIGNY, B.M.; PERERA, L.M.S.; AGUIRRE, S.D.; GOUCOHEA, C.B.; REGALADO, A.I.; MEDINA, A.E.; MACHADO, E.C. Efecto cicatrizante de la pasta de clorofila-caroteno de *Pinus caribaea* var. *caribaea* sobre heridas abiertas assépticas. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.16, n.1, p.24-33, 2011.

DOS SANTOS, F.M.; SIMÕES, J.C.; SILVA, J.R.A.; BARTHUS, R.C.; POPPI, R. J.; AMARAL, A.C.F. Otimização das condições de extração de saponinas em *Ampelozizyphus amazonicus* usando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. **Química Nova**, v.34, n.9, p.1629-1633, 2011.

DOS SANTOS, I.F.C.; GROSSO, S.L.S.; BAMBO, O.B.; NHAMBIRRE, A.P.; CARDOSO, J.M.M.; SCHMIDT, E.M.S; MARUJO, R.B. Mel e açúcar mascavo na cicatrização de feridas. **Ciência Rural**, v.42, n.12, p.2219-2224, 2012.

DUCKE, A. Plantes nouvelles ou peu connues de la région amazonienne. II. **Arquivo do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v.4, p.47-175, 1925.

DYSON, M. Advances in wound healing physiology: the comparative perspective. **Veterinary Dermatology**, v.8, n.4, p.227-233, 1997.

EDEOGA, H.O.; OKWU, D.E.; MBAEBIE, B.O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.7, p.685-688, 2005.

ENGELHARD, E.; TOKSOY, A.; GOOBELER, M.; DEBUS, S.; BRÜCKER, E. B.; GILLITZER, R. Chemokines IL-8, Groa, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leucocyte subsets in human wound healing. **Am. J.Pathol.**, v.153, n.6, p.1849-1860, 1998.

ESPIN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHES, H.J.; GARCIA-VIGUEIRA, C. Anthocyanin-based natural colorant: a new source of antiradical activity for foodstuff. **J Agric Food Chem**, v.48, n.5, p.1588-92, 2000.

ETHRIDGE, R.T.; LEONG, M.; PHILLIPS, M.T. Cicatrização de feridas. In: TOWNSEND, C.M. **Tratado de cirurgia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

FAHIE, M.A.; SHETTKO, D. Evidence-based wound management: a systematic review of therapeutic agents to enhance granulation and epithelization. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.37, n.3, p.559-577, 2007.

FALEIRO, C.C.; ELIAS, S.T.H.; CAVALCANTI, L.C.; CAVALCANTI, A.S.S. O extrato das folhas de babosa, *Aloe vera* na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. **Natureza on line**, v.7, n.2, p.56-60, 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Generalidades e métodos**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988, Parte I.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FERNANDES JUNIOR, A.; LOPES, M. M. R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência rural**, v.36, n.1, p.294-297, 2006.

FERREIRA, M.C.; CARVALHO, V.F. Tratamento de feridas. In: UTIYAMA, E.M. et al.(Coord). **Propedêutica cirúrgica**. 2.ed. Barueri, SP: Manole, 2007. p.420-436.

FERREIRA, S.B.; SOUZA, J.H.; ALMEIDA, J.M.; FIGUEIREDO, M.C.P.; PEQUENO, A.S.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato hidroalcoólico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n.1, p.27-31, 2010.

FLEISCHMAJER, R.; PERLISH, J.S.; BURGESSON, R.E.; SHAIKH-BAHAI, F.; TIMPL, R. Type I and type III interactions during fibrillogenesis. **Am NY Acad Sci.**, v.580, p.161-175, 1990.

FONSECA, V.R.C.D. Quantificação da deposição de colágeno de submucosa de pregas vocais suínas após exerece de fragmento de mucosa a frio e uso de Mitomicina-C tópica. Dissertação (Mestrado), IPEM, Curitiba, 2003.

FOO, L.Y.; LU, Y.; HOWELL, A.B.; VORSA, N. The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. **Phytochemistry**, v.54, n.2, p.173-81, 2000.

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2ª ed. Roca, São Paulo, 1390p.

FRANCIS, G; KEREM, Z; MAKKAR, H.P.S; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v.88, n.6, p.587-605, 2002.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L.F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.35, n.3, p.203-206, 2008.

FREITAS, R.P.A.; BARCELOS, A.P.M.; NÓBREGA, B.M.; MACEDO, A.B.; OLIVEIRA, A.R.; RAMOS, A.M.O.; VIEIRA, W.H.B. Laserterapia e microcorrente na cicatrização de queimadura em ratos. Terapias associadas ou isoladas? **Fisioter Pesq.**, v.20, n.1, p.24-30, 2013.

FRIEDMAN, D.W.; BOYD, C.; MACKENZIE, J.W.; NORTON, P.; OSLON, R.M.; BEAK, S.M. Regulation of Collagen Gene Expression in Keloids and Hypertrophic Scars. **J Surg Res.**,v.55, n.2, p.214-222, 1993.

FUNARI, C.S.; FERRO, O.V. Análise de Própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **Am J Pathol**, v.200, n.3, p.500-503, 2003.

GAHARY, A.; SHEN, Y.J.; NEDELEC, B.; SCOTT, P.G.; TREDGET, E.E. Enhanced expression of RNAi for insulin like growth factor-1 in post-burn hypertrophic scar tissue and its fibrogenic role by dermal fibroblasts. **Mol. Cell. Biochem**, v.148, n.1, p.25-32, 1995.

GALLAGHER, K.A.; LIU, Z.J.; XIAO, M.; CHEN, H.; GOLDSTEIN, L.J.; BUERK, D.G.; NEDEAU, A.; THOM, S.R.; VELAZQUEZ, O.C. Diabetic impairments in NO-mediate endothelial progenitor cell mobilization and homing are reversed by hyperoxia and SDF-1 α . **J.Clin.Invest.**, v.117, n.5, p.1249-1259, 2007.

GARCIA, V.G.; LIMA, M.A.; OKAMOTO, T.; MILANEZI, L.A.; FERNANDES, L.A.; ALMEIDA, J.M.; THEODORO, L.H. Effect of photodynamic therapy on the healing of cutaneous third-degree-burn: histological study in rats. **Lasers in Medical Science**, v.25, n.2, p.221-28, 2010.

GARCIA, F.C.P. Relações Sistemáticas e fitogeográficas do Gênero Inga Miller (Leguminosae. Mimosoideae. Ingeae) nas Florestas da Costa Sul e Sudeste do Brasil. 248f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP. 1998.

GAW, A.; COWAN, R.A.; O'REILLY, D.S.J.; STEWART, M.J.; SHEPHERD, J. **Bioquímica clínica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001.

GILL, S.E.; PARKS, W.C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. **In J Biochem Cell Biol.**, v.40, n.6/7, p.1334-1347, 2008.

GODOY, J.M.P.; PRADO, P.A. Ácidos gordos essenciais enriquecidos com vitamina A, E e ácido linoléico como pensos em feridas crônicas. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v.21, n.2, p.193-5, 2005.

GOMATHI, K.; GOPINATH, D.; AHMED, M.; JAYAKUMAR, R. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. **Biomaterials**, v.24, n.16, p.2767-72, 2003.

GOMES, D.R.; SERRA, M.C.V.F.; PELLON, M.A. **Queimaduras**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1995.

GOMES, D.R. Fisiopatologia In: GUIMARÃES JÚNIOR, L.M. **Queimaduras Tratamento Clínico e Cirúrgico**. Rio de Janeiro: Rubio, 2006.

GONÇALVES, R.V.; SARANDY, M.M.; MATTA, S.L.P.; NOVAES, R.D.; PINTO, M.V.M. Comparative study of the effects of laser photobiomodulation and extract of Brassica oleracea on skin wounds in wistar rats: A histomorphometric study. **Pathology – Research and Practice**, v.209, n.10, p.648-543, 2013.

GONÇALVES, R.V.; NOVAES, R.D.; CUPERTINO, M.C.; MORAES, B.; LEITE, J.P.V.; PELUZIO, M.C.G.; PINTO, M.V.M.; DA MATTA, S.L.P. Time-dependent effects of low-level laser therapy on the morphology and oxidative response in the skin wound healing in rats. **Lasers Med Sci**. v.28, n.2, p.383-390, 2013.

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

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue II: ultrastructural aspects. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v.6, 66-71, 1992.

GURTNER, G.C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M.T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v.15, n.453, p.314-21, 2008.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3th ed. New York: Oxford Science Publications, 2000. 936p.

HASLAM, E. **Plant Polyphenols, Vegetable Tannins Revisited**. Cambridge University Press, Cambridge, 1989.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, n.2, p.205-215, 1996.

HANKS, J.; SPODNICK, G. Wound healing in veterinary rehabilitation patient. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.35, n.6, p.1453-1471, 2005.

HARARI, J. **Cirurgia de pequenos animais**. 1ªed. Porto Alegre: Artmed, 1999.

HENDLUND, C.S. Surgery of the Intergumentary System. In: FOSSUM, T.W. Small animal surgery. 3ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2007. Cap. 15, p.161-259.

HEIL, M.; DELSINNE, T.; HILPERT, A.; SCHÜRKENS, S.; ANDARY, C.; LINSINMAIR, E. K.; SOUSA, M.; MCKEY, D.; Reduced chemical defence in antplants? A critical re-evaluation of a widely accepted hypothesis. **Oikos**, v.99, n.3, p.457-468, 2002.

HERNANDES, L.; PEREIRA, L.M.S.; PALLAZO, F.; MELLO, J.C.P. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.3, p.431-436, 2010.

HERSON, M.R.; TEIXEIRA-NETO, N., PAGGIARO, A.O.; CARVALHO, V.F.; MACHADO, L.C.C.; UEDA, T. Estudo epidemiológico das sequelas de queimaduras: 12 anos de experiência da Unidade de Queimaduras da Divisão de Cirurgia Plástica Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. **Rev. Bras. Queimaduras**, v.8, n.3, p.82-86, 2009.

HIRSHBERG, A.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Collagen fibbers in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picrosirius red and polarizing microscopy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.28, n.9, p.410-412, 1999.

HIRSHBERG, A.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. The central odontogenic fibroma and the hyper plastic dental follicle: study with Picrosirius red and polarization microscopy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.25, n.3, p.125-127, 1996.

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

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

ISHIDA, K.; DE MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; FILHO, B.P.D.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, n.5, p.942-949, 2006.

JOHNSTON, D. E. Wound healing in skin. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v.20, n.1, p.1-25, 1990.

JOHNSON, R.M.; RICHARD, R. Partial-thickness burn: identification and management. **Adv Skin Wound Care**, v.16, n.4, p.178-87, 2003.

KAMESHWARAN, S.; SENTHILKUMAR, R.; THENMOZHI, S.; DHANALAKSHMI, M. Wound healing potential of ethanolic extract of *Tecoma stans* flowers in rats. **Pharmacologia**, v.5, n.6, p.215-221, 2014.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Blood analyte reference values in some laboratory animals**. In: Clinical biochemistry of domestic animal. 5.ed. Philadelphia: Academic, 2008. Appendix IX, p. 881-887.

KASSUYA, C.A.C.; SILVESTRE, A.; MENEZES-DE-LIMA, O. JR.; MAROTTA, D.M.; REHDER, V.L.G.; CALIXTO, J.B. Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan nirathin isolated from *Phyllanthus amarus*. Evidence for interaction with platelet activating factor receptor. **Eur J Pharmacol.**, v.546, n1-3, p.182-188, 2006.

KARABALIEV, M.; KOCHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. **Sens. Actuat. B: Chemical**, v.88, n.1, p.101-105, 2003.

KERR, M.G. Exames laboratoriais em Medicina Veterinária: **Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2 ed. São Paulo: Roca, parte II, p.81-163, 2003.

KHANBABAEI, K.; VAN REE, T. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product. Reports**, Londres, v.18, n.6, p.641-649, 2001.

KHANNA, S.; VENOJARVI, M.; ROY, S.; SHARMA, N.; TRIKHA, P.; BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; SEN, C. K. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. **Free Radical Biology and Medicine**, v.33, n.8, p.1089-1096, 2002.

KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J Pharmacol Sci.**, v.96, n.3, p.229-245, 2004.

KRAHWINKEL, D.J.; BOOTHE, H.W. Topical and systemic medications for wounds. **Vet. Clin. Small.Anim**, v.36, n.4, p.739-757, 2006.

KRAHWINKEL, D.J.; BOOTHE, H.W. Topical and systemic medications for wounds. **Vet. Clin. Small.Anim**, v.36, n.4, p.739-757, 2006.

LAKS, P.E. Chemistry of bark. In: **Wood and Cellulosic Chemistry**, Hon, D.N.S., Shiraishi, N., New York: Marcel Dekker Inc., 1991. cap. 7, p. 257-330.

LALE, A.; HERBERT, J.M.; AUGEREAU, J.M.; BILLON, M.; LECONTE, M.; GLEYE, J. Ability of different flavonoids to inhibit the procoagulant activity of adherent human mono cytes. **J Nat Prod**, v.59, n.3, p.273-276, 1996.

LAWALL, H. Treatment of chronic wounds. **Vasa**, v.41, n.6, p.396-409, 2012.

LEE, W.R.; PARK, J.H.; KIM, K.H.; KIM, S.J.; PARK, D.W. CHAE, M.H.; SUCH, S.H.; JEONG, S.W.; PARK, K.K. The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.17, n.4, p.505-10, 2009.

LÉON, J. Central American and West Indian species of Inga (Leguminosae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.53, n.3, p.265-359, 1966.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the World. **The Royal Botanic Gardens**, Kew, 577p. 2005.

LEWIS, G.P.; LIMA, M.P.M. Pseudopiptadenia Rauschert no Brasil (Leguminosae-Mimosoidae). **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v.30, n.43, p.68, 1990.

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

LIMA, L.C.P.; GARCIA, F.C.P.; SARTORI, A.L.B. As Leguminosae arbóreas das florestas estacionais do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v.61, n.3, p.441-466, 2010.

LIMA, L.R.P. OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.16, n.3, p.305-314, 2003.

LIMA, O. A., SOARES; J.B., GRECO, J.B.; GALIZZI, J. CANÇADO, J.R. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. Técnica e Interpretação. Editora Guanabara Koogan, sexta edição, 1985.

LIMA, L.R.P. OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Rev. Nutr.**, Campinas, v.16, n.3, p.305-314, 2003.

LINDE, L.G. Reabilitação de crianças com queimaduras. In: Tecklin JP, ed. **Fisioterapia pediátrica**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2002. p.384-422.

LIPTAK, J.M. An overview of the topical management of wounds. **Australian Veterinary Journal**, v.75, n.6, p.408-413, 1997.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZELI, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p 366-370, 2005.

LOPES, L.G.F.; MENDES, J.E.C.S.; SANCHES, J.A.; VIDAL, M.A.; BUSSOLARO, R.A.; ROCHA, A.B. Epidemiologia do grande queimado de 2001 a 2003 atendidos na U.T.Q. da Faculdade de Medicina de Catanduva-SP. **Revista Klinikos**, v.19, p.83-88, 2004.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A.C.; SUÁREZ, M.D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochem Pharmacol.**, v.15, n.4, p.495-506, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 111 p.

LYRA, M.C.; JÚNIOR-LEÃO, H.; NETO, S.P.; ORGAES, F.A.F.S.; GONELLA, H.A. Tratamento de queimaduras de carboxiterapia em modelo experimental. **Rev. Bras. Queimaduras**, v.11, n.1, p.2-5, 2012.

MADER, D.R. Rabbits: basic approach to veterinary care. In: HILLYER, E.V.; QUESENBERRY, K.E. (Eds.). **Ferrets, rabbits, and rodents: clinical medicine and surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. p.160-168.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Stereological tools in biomedical research. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.75, n.4, p.469–486, 2003.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I. **An Bras Dermatol**, v.78, n.4, p.393-410, 2003.

MARCONCINI, S. A. Respostas fisiológicas em cães suplementados com lecitina de soja e lecipalm®: estudo sobre os parâmetros metabólicos, bioquímicos e hematológicos. 2008, 121p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ª ed Fortaleza (Ceará): Universidade Federal do Ceará; 1997; 1-14.

MATTOS, F.J.A. **O Formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha:** informações sobre o emprego na medicina caseira, de plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 2. Ed. Fortaleza: EUFC, 1997.

MATTOS, J.R. **Espécies florestais do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Instituto de Pesquisas de Recursos Naturais Renováveis, n.13, 1983. 44p.

McDERMOTT-SCALES, L.; COWMAN, S.; GETHIN, G. Prevalence of wounds in a community care setting in Ireland. **J Wound Care**, v.18, n.10, p.405-17, 2009.

McDOWELL, L.R. **Minerals in animal and human nutrition.** San Diego: Academic Press, 1992. 524p.

McFARLIN, K.; XIAOHUA, G.; LIU, Y.B.; DULCHAVSKY, D.S.; KWON, D.; ARBAB, A.S.; BANSAL, M.; LI, Y.; CHOPP, M.; DULCHAVSKY, S.A. GAUTAM, S.C. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. **Wound Repair and Regeneration**, v.14, n.4, p.471-478, 2006.

MEHRABANI, D.; FARJAM, M.; GERAMIZADEH, B.; TANIDEH, N.; AMINI, M.; PANJEHSHAHIN, M.R. The healing effect of Curcumin on burn wounds in rat. **World J Plast Surg**, v.4, n.1, p.29-35, 2015.

MÉLEGA, J.M. **Cirurgia plástica - fundamentos e arte: princípios gerais.** Rio de Janeiro, 1 ed. Médisi, 2002.

MELO, M.S.; ALVES, L. P.; CARVALHO, H.C.; LIMA, C.J.; MUNIN, E.; VILELA-GOULART, M.G.; GOMES, M.F.; SALGADO, M.A.C.; ZÂNGARO, R.A. Ozonioterapia em queimaduras induzidas por laser de CO₂ em pele de ratos. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB 2014.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.

MELLO, J.P.C.; SANTOS, S.C. **Farmacognosia: da planta ao medicamento;** Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.

MENDONÇA-FILHO, C. V. 1996. Braúna, angico, jacarandá e outras leguminosas de Mata Atlântica: Estação Biológica de Caratinga, Minas Gerais. Fundação Botânica Margaret Mee; Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, 100p.

MENEGHIN, P.; VATTIMO, M.F.F. Fisiopatologia do processo cicatricial. In: JORGE, A.S.; DANTAS, S.R.P.E. **Abordagem multiprofissional do tratamento das Feridas.** São Paulo. Atheneu, 2003.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.

MOCK, C.; PECK, M.; PEDEN, M.; KRUG, E. **A WHO plan for burn prevention and care**. Geneva: World Health Organization, 2008.

MONTOVANI, M.; FONTELLES, M.I. Feridas traumáticas. In: JORGE, A.S.; DANTAS, S.R.P.E. **Abordagem multiprofissional do tratamento das Feridas**. São Paulo. Atheneu, 2003.

MOREIRA, D.L.; ENGELHARDT, R.L.; REIS, A.S.; SANCHES, E.M.; SUZANA GUIMARÃES LEITÃO, S.G.; LEITÃO, G.G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de Pseudopiptadenia contorta (Leguminosae-Mimosoideae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.12, supl., p.124-125, 2002.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para laboratório** – princípios e interpretações. 5.ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica para o laboratório**. Princípios e Interpretações. Editora Médica Missau, 4.ed. 2003.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. **Harper: bioquímica**. 7.ed. São Paulo: Atheneu, 1994. 763p.

NIJVELDT, R.J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.; BOELEN, P.G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr.**, n.74, n.4, p.418-425, 2001.

OLIVEIRA, D.M.T.; BELTRATI, C.M. Morfologia e desenvolvimento das plântulas de *Inga fagifolia* e *I. uruguensis*. **Turrialba**, v.42, p.306-313, 1992.

OLIVEIRA, J.E.D.; MARCHINI, J.S. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998.

OLIVEIRA, S.T.; LEME, M.C.; PIPPI, N.L.; RAISER, A.G.; MANFRON, M.P. Formulações de confrei na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Rev FZVA**, v.7/8, n.1, p.6474, 2000.

PAGGIARO, A.O.; NETO, N.T.; FERREIRA, M.C. Princípios gerais do tratamento de feridas. **Rev. Med.**, v.89, n.3/4, p.132-6, 2010.

PAGNANO, L.O.; BARALDI-ARTONI, S.M.; PACHECO, M.R.; DOS SANTOS, E.; OLIVEIRA, D.; LUI, J.F. Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com calêndula. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.6, p.1662-1666, 2008.

PAIVA, F.P.; MAFFILI, V.V.; SANTOS, A.C.S. **Curso de manipulação de animais de laboratório**. Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. Salvador: FIOCRUZ. 2005.

PALLETIC, M.M. **Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery**. 3ªed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010.

- PANIZZA, S.; ROCHA, A.B.; GECCHI, R.; SOUZA, E.; SILVA, R.A.P. *Strypnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: teor de taninos na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.10, p.101-106, 1988.
- PASCHOALINI, M.A.; RASCHOCOWETZKI, A.M.; PEREIRA, I.S.; NOBRE, J.Q.S.; MARQUES, L.B.; SILVA, T. **Regulação do peso corporal**. In: Seminário de interação sobre os aspectos morfofuncionais orais de clínica médica e de saúde pública. Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, p. 76, 2005.
- PAVLETIC, M.M. **Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery**. 3. Ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010.
- PECK, M. D. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. **Burns**, Guildford, v. 7, n.7, p.1087-1100, 2011.
- PEERSCHKE, E.I.; YIN, W.; GHEBREHIWET, B. Platelet mediated complement activation. **Adv. Exper. Med. Biol.**, v.632, n.1, p.81-91, 2008.
- PENNINGTON, T.D. The genus *Inga*. Kew Inglaterra: Royal Botanic Gardens. 1997.844p.
- PEREIRA, F.E.L. Inflamações. In.: BOGLIOLO, L. **Patologia**.8ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2012, cap.7, p. 183-217.
- PÉREZ-CARREÓN, J.I.; CRUZ-JIMENEZ, G.; LICEA-VEGA, J.A.; POPOCA, E.A.; FAZENDA, S.F.; VILLA-TREVINO, S. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with Diethylnitrosamine. **Toxicology in Vitro**, v.16, n.3, p.253-8. 2002.
- PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v.18, n.12, 1995-2018, 1998.
- PERUCHI, C.M.S.; SILVA, E.B.; ANDRADE, R.A.; FRANCO, S.L.; RAMALHO, L. Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico. **Revista da Faculdade Odontología da Universidade do Chile**, v.19; n.2; p.23-34, 2001.
- PIRIZ, M.A.; LIMA, C.A.B.; JARDIM, V.M.R.; MESQUITA, M.K.; SOUZA, A.D.Z.; HECK, R.M. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.16, n.3, p.628-636, 2014.
- PITTIER, H. The Middle American species of the genus *Inga*. **Jornal do Departamento de Agricultura de Porto Rico**, v.13, n.4, p.117-177, 1929.
- PRANCE, G. T.; SILVA, M.F. **Árvores de Manaus**: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. 312 p. 1975.

PUKALSKAS, A.; VAN BEEK, T.A.; VENSKUTONIS, R.P.; LINSSEN, J.P.H.; VAN VELDHUIZEN A.; DE GROOT, A. Identification of radical scavengers in sweet grass (*Hierochloa odorata*). **J Agric Food Chem**, v.8, n.10, p.2914-19, 2002.

QUESENBERRY, K.E. Rabbits. In: **Saunders Manual of Small Animal Practice**. BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. (Eds.). Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. 1346p.

RAMOS, A.F.N.; MIRANDA, J.L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v.13, n.4, p.697-710, 2007.

RIBEIRO, S.N.; ATALLAH, F.A.; TAFFAREL, M.O.; SALGADO, A.E.P.; FILHO, E.V.M.; BELETTI, M.E.; FREITAS, P.M.C.; OLIVEIRA, A.L.A. Plasma rico em plaquetas como curativo em queimaduras de espessura total em coelhos. **Rev. Bras. Med. Vet.**, n.35, v.1, p.79-83, 2013.

ROJAS, A.I.; PHILLIPS, T.J. Patients with chronic leg ulcers show diminished levels of vitaminis A and E, carotenes, and Zinc. **Dermatol Surg**, v.25, n.8, p.601-04, 1999.
RACKETT S.C.; ROTHE, M.J.; GRANT-KELS, J.M. Diet and dermatology. **J Am Acad Dermatol.**, v.29, n.3, p.447-61, 1993.

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

SAMUELSEN, A.B. The tradicional uses, chemical constituents and biological activities of plantago major 1. A review. **J. Ethnopharmacol.**, v.71, n.1, p.1-21, 2010.

SANCHOTENE, M. C. C. **Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana**. Porto Alegre: Sagra, 1989. 304p.

SANTOS, J.B. **Avaliação e tratamento de feridas: orientações aos profissionais de saúde**. Porto Alegre: Hospital das Clínicas de Porto Alegre, 2011.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Editora Universidade, UFRGS, p.403, 2003.

SARDINHA, T.C.; NOGUERAS, J.J.; XIONG, H.; WEISS, E.G.; WEXNER, S.D.; ABRAMSON, S. Membrane-Type 1 matrix metalloproteinase mRNA expression in colorectal cancer. **Dis Colon Rectum**, v.43, n.3, p.389-95, 2000.

SCHREMI, S.; SZEIMIES, R-M.; KARRER, S.; HEINLIN, J.; LANDTHALER, M.; BABILAS, P. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.24, n.4, p.373-378, 2010.

SENTHIL, P.; ASHOK KUMAR, A.; MANASA, M.; ANIL KUMAR, K.; , SRAVANTHI, K. DEEPA, D. Wound healing activity of alcoholic extract of “guazuma ulmifolia” leaves on albino wistar rats. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.2, n.4, p.34-38, 2011.

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. Cicatrização de feridas com a utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. **ConScientiae Saúde**, v. 10, n.3, p.441-448, 2011.

SHERIDAN, R. Evaluation and management of the thermally injured patient. In: **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 6th ed. New York: McGraw-Hill; p.1220-9, 2003.

SHUKLA, A.; PATNAIK, G.K. 1998. Wound healing: molecular mechanism. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, India LXVIII, 1–13.

SILVA, D.M.; MOCELIN, K.R. O cuidado de enfermagem ao cliente portador de feridas sob a ótica do cuidado transcultural. **Nursing**, v.9, n.105, p.8188, 2007.

SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade microbiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. Em amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Farmacogn**, v.17, n.4, p.572-577, 2007.

SILVA, A.S.; COSTA, M.M.; LOPES, S.T.A.; MONTEIRO, S.G. Alterações hematológicas em coelhos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma evansi*. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.538-542, 2008.

SILVA, T.F.; PENNA, A.L.B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.3, p.530-9, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. 9ed. Porto Alegre/Florianópolis Ed.Universiade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999.

SIMÕES, C.M.O.; FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Editora Universidade, UFRGS, p.229, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ed. Porto Alegre, Florianópolis: Editora UFRGS, UFSC; 2010.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous Wound Healing. **The New England Journal of Medicine**, v.341, n.10, p.738-746, 1999.

SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2 ed. v.1. São Paulo: Manole, 1998.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. Cap.13, p. 289-326.

SOMBOONWONG, J.; KANKAISRE, M.; TANTISIRA, B.; TANTISIRA, M.H. Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, n.103, p.1-7, 2012.

SORIANO, F.L.; LAGE, M.A.V.; PEREZ-PORTABELLA, C.M.; XANDRI, J.M.G.; WESSELING-WOUTERS, W.; WAGENAAR, L. The effectiveness of oral nutritional supplementation in the healing of pressure ulcers. **Journal of Wound Care**, v.13, n.8, p.319-22, 2004.

SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; SILVA, M.N.; ARRUDA, M.S.R.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidante activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society (online)**, Campinas, v.18, n.6, p.1276-1280, 2007.

SOUZA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de ***Stryphnodendron adstringens*** (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n.1, p.71-75, 2007a.

STANLEY, M.J.; RICHARD, R.L. Queimaduras. In: O'SULLIVAN, S.B.; SCHMITZ, T.J. **Fisioterapia: avaliação e tratamento**. São Paulo: Manole, p.845-871, 2004.

STAMOULIS, I.; KOURAKLIS, G.; THEOCHARIS, S. Zinc and the liver: an active interaction. **Digestive Diseases and Sciences**, v.52, p.1595-612, 2007.

STEED, D.L. Debridement. **The American Journal of Surgery**, v.187, n.5, p.71-74, 2004.

SUMITRA, M.; MANIKANDAN, P.; SUGUNA, L. Efficacy of *Butea monosperma* on dermal wound healing in rats. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, n.3, p.566-573, 2005.

SUNAMI, E.; TSUNO, N.; OSADA, T.; SAITO, S.; KITAYAMA, J.; TOMOZAWA, S. MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. **Oncologist**, v.5, n.2, p.108-114, 2000.

SWENSON, M.J. Dukes – **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 799p.

TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.A.M.V.A.; MORLYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina**, Ribeirão Preto, Simpósio, v.41, n.3, p.259-64, 2008.

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

TEVES, D.C.; CABRAL, A.C.V.; SIMÕES, M.J.; KULAY, J.R.L. Biologia das reparações teciduais. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.50, n.5, p.39-44, 1986.

THAKUR, R.; JAIN, N.; PATHAK, R.; SANDHU, S.S. Practices in Wound Healing Studies of Plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2011, article ID 438056, p.1-17, 2011.

THOMPSON, M.M.; LOFTUS, I.M. The role Of Matrix Metalloproteinases in Vascular Disease. **Vascular Medicine**, v.7, p.117-133, 2002.

THOMPSON, C.; FUHRMAN, M.P. Nutrients and wound healing: still searching for the magic bullet. **Nutr Clin Pract**, v.20, n.3, p.331-47, 2005.

THRALL, M.A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca 2006, p.433-447.

TODD, R.; DONOFF, B.R.; CHIANG, T.; CHOU, M.Y.; ELOVIC, A.; GALLAGHER, G.T.; WONG, D.T. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. **Am. J. Pathol.**, v.138, n.6, p.1307-1313, 1991.

TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONIER, C.; BROWN, R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.3, n.5, p.349-63, 2002.

TREDGET, E.E.; YU, Y.M. The metabolic effects of thermal injury. **World J Surg**, v.16, n.1, p.68-79, 1992.

TRENGOVE, N.J.; STACEY, M.C.; MACAULEY, S.; BENNETT, N.; GIBSON, J.; BURSLEM, F. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. **Wound Repair Regen**, v.7, n.6, p. 442-52, 1999.

TRESVENZOL, L.M.F.; PARENTE, L.M.L.; LINO-JÚNIOR, R.S.; FIUZA, T.S.; BARA, M.T.F.; CUNHA, L.C.; LAXOR, L.P.; MIGUEL, M.P.; PAULA, J.R. Avaliação da toxicidade aguda e da atividade cicatrizante dos extratos etanólicos das folhas e raízes da *Memora nodosa* (Silva Manso) Miers (Bignoniaceae). **Rev. Bras. Pl. Med**, v.15, n.3, p.423-430, 2013.

TRINDADE, M.R.M.; GRAZZIONTI, R.U.; GRAZZIOTIN, R.U. Eletrocirurgia: sistemas mono e bipolar em cirurgia videolaparoscópica. **Acta Cir. Bras**, v.13, n.3, 1998.

TRINDADE, A.E. Hemograma do Coelho. Mem. Inst. **Oswaldo Cruz**, v.52, n.2, p.397-403, 1954.

TROPICOS. Disponível em: <http://www.tropicos.org/>. Acesso em: janeiro de 2014.

VASCONCELOS, T.H.C.; MODESTO-FILHO, J.M.; DINIZ, M.F.F.M.; SANTOS, H.B.; AGUIAR, F.B.; MOREIRA, P.V.L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o

extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, n.4, p.583-91, 2007.

VIEIRA, A.P.; DOS SANTOS, N.R.; BORGES, J.H.S.; VINCENZI, M.P.A.; SCHMITZ, W.O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n.1, p.65-74, 2008.

VEITCH, N.C.; GRAYER, R.J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. **Nat Prod Rep.**, v.25, n.3, p.555-611, 2008.

WU, X.B.; LUO, X.Q.; GU, S.Y.; XU, J.H. The effects of *Polygonum cuspidatum* extract on wound healing in rats. **J Ethnopharmacol**, v.141, n.3, p.934-37, 2012.

Anexo A

CERTIFICADO

A Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA)/UFV certifica que o processo nº64/2012, intitulado “*Avaliação da atividade cicatrizante de Inga subnuda (Ingá) e Anadenanthera macrocarpa (Angico vermelho) em coelhos diabéticos aloxano induzidos*”, coordenado pela Professora Tânia Toledo de Oliveira do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular está de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (COBEA/SBCAL) e com a legislação vigente, tendo sido aprovado por esta Comissão em 06/03/13, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 64/2012, named “*Evaluation of the healing activity of Inga subnuda (Inga) and Anadenanthera macrocarpa (Angico red) in alloxan induced diabetics rabbits*” is in agreement with the Medical Veterinary Professional Ethics Code, with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA/SBCAL) and with actual Brazilian legislation. This Institutional Commission on March, 06, 2013 approved this process. This certificate expires in 12 months.



Viçosa, 06 de março de 2013

Prof. Cláudio César Fonseca
Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV