

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

MARIA SONIA FELÍCIO MAGALHÃES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DERSANI® E DA ÁGUA DE COCO LIOFILIZADA NO
MODELO CUTÂNEO DE CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO EM
RATOS WISTAR**

**FORTALEZA
2007**

MARIA SONIA FELÍCIO MAGALHÃES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DERSANI® E DA ÁGUA DE COCO LIOFILIZADA NO
MODELO CUTÂNEO DE CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO EM
RATOS WISTAR**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia, do Departamento de Cirurgia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

**FORTALEZA
2007**

M167a Magalhães, Maria Sonia Felício

Avaliação do efeito do Dersani® e da Água de
Coco liofilizada no modelo cutâneo de cicatrização por
segunda intenção em ratos Wistar/ Maria Sonia Felício
Magalhães. 2007.

178 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes
Filho

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2007.

1. Cicatrização de Feridas. 2. Água de Coco. 3.
Triglicerídeos. 4. Ácido Linoléico. 5. Ácido Ascórbico. 6.
Vitamina A 7. Vitamina E. 8. *Software*. 9. Ratos. I.
Moraes Filho, Manoel Odorico de (Orient.). II. Título.

CDD 617.1

MARIA SONIA FELÍCIO MAGALHÃES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DERSANI® E DA ÁGUA DE COCO LIOFILIZADA NO
MODELO CUTÂNEO DE CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO EM
RATOS WISTAR**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia, do Departamento de Cirurgia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Cirurgia.

Aprovada em 21/12/2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Aprígio Mendes Filho
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Antonio Ribeiro da Silva Filho
Faculdade Christus

Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine Jamaru
Unidade de Farmacologia Clínica - UFC

Prof. Dr. Sylvania Maria Mendes de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará - UFC

**Agradeço a Deus pela minha existência e
pelas bênçãos em minhas conquistas.**

**Aos meus pais, Expedito e Maria,
pelo zelo com que me geraram.**

**A minha filha Ana Eugênia, meu genro Henrique e
meus netos Henry e Anna Lara,
pela compreensão da minha ausência em momentos
importantíssimos do nosso convívio familiar.**

**Prof. Dr. Aprígio Mendes Filho,
pela introdução e ensinamentos
no mundo científico.**

Ao Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes, de forma muito especial, pela dedicação, pela condução e apoio incondicional, no processo de orientação.

Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamaru,
pela dedicação e criação dos *softwares* que
nortearam este estudo.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Doutores, Aprígio Mendes Filho da Universidade Federal do Ceará, José Ribeiro da Silva Filho da Faculdade Christus, Sylvania Maria Mendes de Vasconcelos da Universidade Federal do Ceará, pela honrosa participação na Banca de Defesa desta Tese.

Aos Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães e Prof. Dr. Lúcio Flávio Gonzaga Silva, pelas oportunas contribuições a este estudo, na participação da Banca de Qualificação.

Aos Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos e Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues, pela forma atenciosa e cordial, com que me receberam e me conduziram durante todo o período, como pós-graduanda no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia.

Ao Prof. Dr. Dalgimar Beserra de Menezes, pela forma atenciosa e prestesa com que realizou a versão em inglês do resumo desta tese.

A bibliotecária Rosane Maria Costa, pela atenção na elaboração da ficha catalográfica.

As secretárias Ma. Luciene Vieira de Oliveira e Magda Fontenele de Sousa pela cordialidade e atenção.

Aos graduandos: Cecília Carvalho Oliveira, Diego Levi Silveira Monteiro e Rafael Nogueira de Macedo, pela dedicação com que participaram deste estudo nas atividades no LABCEX.

Ao Sr. Bento Francisco Oliveira pela atenção e cuidado com que tratava os meus animais no Biotério do LABCEX.

A Doutoranda Conceição Aparecida Dornelas pela amizade e companherismo durante as disciplinas.

Ao Prof. José Antonio Carlos Otaviano David Morano pela amizade, companherismo e apoio nos momentos em que recorri à sua ajuda.

Aos técnicos de laboratório Clécia Cristina Barbosa Guimarães e Sr. Ozéas Ribeiro de Queiroz pela competência com que desenvolveram suas funções.

No Departamento de Fisiologia e Farmacologia:

As Profas. Dras. Helena Serra Azul Monteiro, Gisela Costa Camarão e Francisca Cléa Florenço de Sousa pela atenção durante as disciplinas.

No Laboratório de Farmacologia e Inflamação do Câncer:

Profa. Gerly Anne de Castro Brito, Ma. Silvandira França Pinheiro (Vanda), Doutorandas Antonielli Souza Gomes e Rosemary Souza Freire pela atenção.

Unidade de Farmacologia Clínica:

Profa. Dra. Maria Elizabete Amaral de Moraes, de forma especial pela atenção sempre que lhe solicitei ajuda .

Aos funcionários Flávia Ma. Martins Aguiar, Fábيا Beserra Lima, Francisco Evanir Gonçalves de Lima, Paulo Sérgio Castro de Oliveira, Francisco Arnaldo Viana Lima, Carlos Alberto Rodrigues dos Santos pela forma como sempre atenderam às minhas solicitações.

Na Escola de Saúde Pública:

Aos Doutores Mário Mamede Filho (superintendente), Sílvia Mamede Studart Soares, Nádia Ma. Girão Saraiva de Almeida, Elsie Sobreira Kubrusly, José Osmar Vasconcelos Filho, com os quais divido meu cotidiano de trabalho, pelos momentos em que precisei me ausentar para o desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Paulo César Almeida pelas primeiras orientações estatísticas.

No Centro de Saúde Escola Meireles:

As Dras. Ma. Helena Eloy A. de Oliveira e Lúcia Pamplona E. de Souza, as Enfas. Kílvia Ma. Barbosa Mesquita e Lúcia Caminha, e ainda as auxiliares de enfermagem, Ma. Almira Fontenele Nogueira e Ma. Zuila Castro Nogueira, pela autorização, presteza e assiduidade, com que mantiveram todo meu material cirúrgico e demais outros que foram necessários, sempre esterilizado.

Ao Instituto Claude Bernard pelo apoio logístico de laboratório.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão de metade do valor de uma bolsa, no período de maio de 2006 a fevereiro de 2007.

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos apenas começando;

A certeza de que é preciso continuar;

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar;

Fazer da interrupção um caminho novo;

Da queda um passo novo de dança;

Do medo, uma escada;

Do sonho uma ponte;

Da procura, um encontro.

O homem é do tamanho do seu sonho.

Fernando Pessoa.

*A mente que se abre para uma nova idéia,
jamais volta ao seu tamanho natural.*

Albert Einstein.

RESUMO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DERSANI® E DA ÁGUA DE COCO LIOFILIZADA NO MODELO CUTÂNEO DE CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA INTENÇÃO EM RATOS WISTAR. MARIA SONIA FELÍCIO MAGALHÃES. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia. Universidade Federal do Ceará. Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

A cicatrização de feridas é uma cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido. Neste estudo avaliou-se o efeito de um composto de triglicérides de cadeia média, ácido linoléico, lecitina de soja e vitaminas A e E (Dersani®), e também da água de coco liofilizada, nas formas aquosa e gel, no processo de cicatrização de úlceras cutâneas experimentais. Utilizaram-se 105 ratos, machos, da linhagem Wistar, nos quais foi removido um segmento cutâneo de espessura total com 4 cm² de área. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos constituídos de 15 ratos compreendendo três experimentos constituídos dos grupos Controle e Referência e dos grupos Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa (Experimento 1), Amorfa-gel e Cristalina-gel (Experimento 2) e Triglicérido (Experimento 3). Tais grupos foram tratados por via tópica, respectivamente, com solução salina 0,9%, clostebol + sulfato de neomicina, água de coco amorfa e cristalina-aquosa, água de coco amorfa e cristalina-gel e Dersani®. As áreas das feridas foram mensuradas por planimetria digital nos dias zero, 3, 7 e 12 de pós-operatório, a partir das quais foram calculados o grau e a taxa média de reparação. Além disso, o processo de cicatrização foi avaliado através dos critérios de Myers e da quantificação de colágeno e angiogênese utilizando método histoquímico. No 3º dia observou-se uma expansão da área da ferida no grupo referência e uma leve contração nos grupos controle e testes. Nos dias subsequentes o processo de reparação, medido pela variável grau de reparação, evoluiu de forma linear, de modo que, no 12º dia, a área reparada alcançou 77,95% da região ulcerada inicial no grupo Controle, 78,40% no Referência, 82,24% no Amorfa-aquosa, 84,12% no Cristalina-aquosa 84,12% (experimento 1), 85,09% no grupo Amorfa-gel, 84,20% no Cristalina-gel (experimento 2) e 83,49% no Triglicérido (experimento 3), não sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos experimentos. Igualmente semelhantes foram os valores da taxa média de reparação referente aos 12 dias de tratamento: 25,79 mm²/dia no grupo Controle, 25,42 mm²/dia no Referência, 26,48 mm²/dia no Amorfa-aquosa, 27,89 mm²/dia no Cristalina-aquosa, 26,47 mm²/dia no Amorfa-gel, 27,04 mm²/dia no Cristalina-gel e 27,38 mm²/dia no Triglicérido. Entretanto, nos grupos Amorfa-aquosa (P<0,01), Amorfa-gel (P<0,05), Cristalina-gel (P<0,05) e Triglicérido (P<0,01) a densidade de colágeno foi significativamente maior do que a verificada no grupo Controle. Apenas no grupo Triglicérido a densidade vascular, a deposição de colágeno e de tecido de granulação foram significativamente maior que nos grupos Controle e Referência (P<0,01). Estes achados permitem concluir que o tratamento com o Dersani® é um potencializador do processo de reparo tecidual.

PALAVRAS-CHAVE: Cicatrização de Feridas. Água de Coco. Triglicérides. Ácido Linoléico. Ácido Ascórbico. Vitamina A. Vitamina E. *Software*. Ratos.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECTS OF DERSANI[®] AND OF LIOPHYLIZED COCONUT WATER ON THE CUTANEOUS MODEL OF SECOND-INTENTION WOUND HEALING IN WISTER RATS. MARIA SONIA FELÍCIO MAGALHÃES. Strictu sensu Post-Graduation Program in Surgery. PhD Thesis; Federal University of Ceara, Brazil. Advisor; Prof Dr Manoel Odorico de Moraes Filho.

Healing of wounds is a cascade of cellular and molecular events which interact with one another ensuing tissue reconstruction. This study assessed the effect of a compound medium-chain triglycerides, linoleic acid, soy lecithins and vitamins A and E (Dersani) and also lyophilized coconut water in the aqueous and gel forms in the process of healing of experimental cutaneous ulcers. 105 male Wistar rats were employed in which a 4cm² full thickness skin segment was removed. The animals were randomly distributed into groups constituted of 15 rats comprising three experiments consisting of Control and Reference groups, as well as Amorphous-Aqueous and Crystalline-Aqueous groups (Experiment 1), Amorphous-gel and Crystalline-gel groups (Experiment 2) and Triglycerides (Experiment 3). Such groups were treated via topic, respectively with 0.9% saline, clostebol+neomycin sulphate, amorphous and crystalline coconut water, amorphous and crystalline-gel coconut water and Dersani. The wound areas were measured by digital planimetry at post-operative days zero, 3, 7 and 12; from them the degree and average rate of repair were calculated. Moreover, the healing process was assessed through the criteria of Meyers and the amount of collagen and angiogenesis by means of histochemical methods. At day 3, an expansion of the wound area in the Reference Group and a slight contraction of Control Groups and tests were noted. On the subsequent days the process of repair, measured through the variable degree of healing evolved in a linear form, so that on the twelfth day, the repaired area achieved 77.95% of the initial ulcerated region in the Control Group, 78.40% in the Reference Group, 82.24%, in the Amorphous-Aqueous one, 84.12% in the Crystalline-Aqueous (Experiment 1), 85.09% in the Amorphus-gel Group, 84.20% in the Crystalline-gel Group (Experiment 2) and 83.49% in that of Triglyceride (Experiment 3); no statistically significant differences were found in the experiments. Equally similar were the values for the average rate of repair in regard to the 12 days of treatment: 25,79mm²/day in the Control Group, 25,42mm²/day in the Reference Group, 26.48mm²/day in the Amorphous-Aqueous one, 27.89mm²/day in the Crystalline-Aqueous Group, 26,47mm²/day in the Amorphous-gel Group, 27.04mm²/day in the Crystalline-gel and 27.38mm²/day in the Triglyceride Group. However, as to the Groups Amorphous-aqueous (P<0,01), Amorphous-gel (P<0.05), Crystalline Gel (P<0,05) and Triglycerides (P<0,01), the density of collagen was significantly higher than that observed in the Control Group. Only the Group of Triglycerides showed significantly higher vascular density, deposition of collagen and the granulation tissue than Control and Reference groups (P<0, 01). These findings allow the conclusion that Dersani[®] have potential to the process of tissue repair.

KEY WORDS: Wound Healing. Coconut Water. Triglycerides. Linoleic Acid. Ascorbic Acid. Vitamin A. Vitamin E. Software. Rats.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	– Fases do processo de cicatrização.....	25
FIGURA 2	– Desncadeamento de eventos pós lesão.....	26
FIGURA 3	– Mediadores do processo de cicatrização.....	34
FIGURA 4	– Coqueiro e fruto	58
FIGURA 5	– Infusão venosa de água de coco	60
FIGURA 6	– Água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa.....	68
FIGURA 7	– Água de coco Amorfa e Cristalina-gel.....	68
FIGURA 8	– Dersani [®]	69
FIGURA 9	– Demarcação e realização da ferida.....	72
FIGURA 10	– Realização do tratamento.....	73
FIGURA 11	– Captura da imagem digital.....	74
FIGURA 12	– Delimitação da área da úlcera através do software.....	75
FIGURA 13	– Quantificação da área ulcerada através do software....	75
FIGURA 14	– Delimitação densidade colágeno através do software..	79
FIGURA 15	– Quantificação densidade colágeno através software...	79
FIGURA 16	– Delimitação densidade angiogênese através software.	80
FIGURA 17	– Quantificação densidade angiogênese pelo software..	80
FIGURA 18	– Visualização de mastócitos através do software.....	78
FIGURA 19	– Quantificação de mastócitos através do software.....	81
FIGURA 20	– Aspecto das úlceras Amorfa e Cristalina-aquosa.....	84
FIGURA 21	– Aspecto das úlceras Amorfa e Cristalina-gel.....	84
FIGURA 22	– Aspecto das úlceras Triglicerídeo.....	85
FIGURA 23	– Evolução temporal Amorfa e Cristalina-aquosa.....	86
FIGURA 24	– Taxa média reparação Amorfa e Cristalina-aquosa.....	87
FIGURA 25	– Taxa média reparação Amorfa e Cristalina-aquosa.....	88
FIGURA 26	– Eficácia de tratamento Amorfa e Cristalina-aquosa.....	88
FIGURA 27	– Evolução temporal Amorfa e Cristalina-gel.....	89
FIGURA 28	– Taxa média reparação Amorfa e Cristalina-gel.....	91
FIGURA 29	– Taxa média reparação Amorfa e Cristalina-gel.....	91
FIGURA 30	– Eficácia de tratamento Amorfa e Cristalina-gel.....	92
FIGURA 31	– Evolução temporal Triglicerídeo.....	93
FIGURA 32	– Taxa média reparação Triglicerídeo.....	94
FIGURA 33	– Taxa média reparação Triglicerídeo.....	95

FIGURA 34	– Eficácia de tratamento Triglicerídeo.....	95
FIGURA 35	– Número de mastócitos Amorfa e Cristalina-aquosa.....	96
FIGURA 36	– Número de mastócitos Amorfa e Cristalina-gel.....	96
FIGURA 37	– Número de mastócitos Triglicerídeo.....	97
FIGURA 38	– Quantificação colágeno Amorfa e Cristalina-aquosa...	97
FIGURA 39	– Quantificação colágeno Amorfa e Cristalina-gel.....	98
FIGURA 40	– Quantificação de colágeno Triglicerídeo.....	98
FIGURA 41	– Densidade vascular Amorfa e Cristalina-aquosa.....	99
FIGURA 42	– Densidade vascular Amorfa e Cristalina-gel.....	99
FIGURA 43	– Densidade vascular Triglicerídeo.....	100
FIGURA 44	– Avaliação grau cicatrização Amorfa Cristalina-aquosa.	100
FIGURA 45	– Avaliação grau cicatrização Amorfa Cristalina-gel.....	101
FIGURA 46	– Avaliação grau cicatrização Triglicerídeo.....	101
FIGURA 47	– Quantificação neutrófilos Amorfa e Cristalina-aquosa..	102
FIGURA 48	– Quantificação neutrófilos Amorfa e Cristalina-gel.....	102
FIGURA 49	– Quantificação neutrófilos Triglicerídeo.....	103
FIGURA 50	– Avaliação formação crosta Amorfa e Cristalina-aquosa	103
FIGURA 51	– Avaliação formação crosta Amorfa e Cristalina-gel.....	104
FIGURA 52	– Avaliação formação crosta Triglicerídeo.....	104
FIGURA 53	– Inflamação aguda Amorfa e Cristalina-aquosa.....	105
FIGURA 54	– Inflamação aguda Amorfa e Cristalina-gel.....	105
FIGURA 55	– Inflamação aguda Triglicerídeo.....	106
FIGURA 56	– Inflamação crônica Amorfa e Cristalina-aquosa.....	106
FIGURA 57	– Inflamação crônica Amorfa e Cristalina-gel.....	107
FIGURA 58	– Inflamação crônica Triglicerídeo.....	107
FIGURA 59	– Regeneração epitelial Amorfa e Cristalina-aquosa.....	108
FIGURA 60	– Regeneração epitelial Amorfa e Cristalina-gel.....	108
FIGURA 61	– Regeneração epitelial Triglicerídeo.....	109
FIGURA 62	– Quantificação fibroblastos Amorfa e Cristalina-aquosa	109
FIGURA 63	– Quantificação fibroblastos Amorfa e Cristalina-gel.....	110
FIGURA 64	– Quantificação fibroblastos Triglicerídeo.....	110
FIGURA 65	– Tecido de granulação Amorfa e Cristalina-aquosa.....	111
FIGURA 66	– Tecido de granulação Amorfa e Cristalina-gel.....	111
FIGURA 67	– Tecido de granulação Triglicerídeo.....	112
FIGURA 68	– Quantificação eosinófilos Amorfa e Cristalina-aquosa..	112

FIGURA 69 –	Quantificação eosinófilos Amorfa e Cristalina-gel.....	113
FIGURA 70 –	Quantificação eosinófilos Triglicerídeo.....	113

LISTA DE QUADRO

QUADRO 1 – Quadro de Myers.....	77
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP – Trifosfato de adenosina
BMP – Proteína morfogenética do tecido conjuntivo 6
CCL – Ligante CC1, 2, 3, 4, 5
CTAP – III – Tecido conectivo quimioquina peptídeo III ativado
CTGF – Fator de crescimento tecido conjuntivo
CXCL – CXC quimioquina ligante 2, 3, 9, 10
CXCR2 – Receptor quimioquina 1, 2
CYR – Cisteína Rich 61
DNA – Ácido desoxiribonucléico
E – Eficácia
EGF – Fator de crescimento epidérmico
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ENA – 78 – Neutrófilo peptídeo 78 ativado
FGF – Fator de crescimento de fibroblastos β_1 , 1, 2, 4, 7, 10
GM-CSF – Fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos
GP IIb/IIIa – Glicoproteína
GR – Grau de reparação
GRO- α – Crescimento relacionado ao oncogen α, β, γ
H.E. – Hematoxilina e Eosina
HB – EGF – Fator de crescimento epidérmico combinado com heparina
HGF – Fator de crescimento de hepatócitos
IGF – Fator de crescimento com insulina I
IL – 1 – Interleucina 1, 6, 8, 10
IP – 10 – Proteína induzida por interferon 10
KGF – Fator de crescimento de queratinócitos
LABCEX – Laboratório de Cirurgia Experimental
MCP – Proteínas quimioatraente para monócito 1, 3
MHC – Complexo maior de histocompatibilidade
MIP – Proteínas inflamatórias para macrófagos 1 α , 1 β , 2
NAP – 2 – Neutrófilo peptídeo 2 ativado
NGF – Fator de crescimento de nervos

NO – Óxido nítrico

NOV – Super expressão nefroblastoma

PAF – Fator de ativação plaquetário

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PLGF – Fator de crescimento de placenta

PUFAs – Ácidos graxos poliinsaturados

PVPI – Polivinilpirrolidone

RANTES – Expressão e secreção regulada da ativação normal de célula T

RGB – Red (vermelho) Green (verde) Blue (azul)

RNA – Ácido Ribonucléico

RNA_m – Ácido Ribonucléico mensageiro

SAMM – Sistema de Análise Morfométrica

TCM – Triglicerídeos de cadeia média

TGF – β – Fator de crescimento transformador $\beta_{1, 2, 3, s, \alpha}$

TNF α – Fator de necrose tumoral α

TR_m – Taxa de reparação média

TxA₂ – Tromboxane A₂

UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância

VEGF – Fator de crescimento de endotélio vascular A, B, C, D, E

WHO/OMS – Organização Mundial de Saúde

WISP – Indução de proteína secretada Wnt 1, 2, 3

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE QUADRO... ..	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	20
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Fases do processo de reparo.....	27
1.2 Método de medição.....	53
1.3 Abordagem terapêutica.....	55
1.4 Relevância e Justificativa.....	63
2 OBJETIVOS	65
2.1 Geral	65
2.2 Específicos	65
3 MÉTODO	66
3.1 Animais.....	66
3.2 Substâncias estudadas.....	67
3.3 Desenho do estudo.....	69
3.4 Procedimento cirúrgico.....	71
3.5 Tratamento pós-procedimento cirúrgico.....	72
3.6 Eutanásia.....	73
3.7 Avaliação macroscópica.....	73
3.8 Estudo histológico.....	76
3.9 Aquisição e processamento das imagens histológicas.....	78
3.10 Análise estatística.....	82
4 RESULTADOS	83
4.1 Avaliação macroscópica.....	83
4.2 Avaliação microscópica.....	95
5 DISCUSSÃO	114
6 CONCLUSÃO	137
7 REFERÊNCIAS.....	138
APÊNDICES.....	158
ANEXOS.....	170

1 INTRODUÇÃO

A palavra cicatrização é utilizada para definir um processo em que um tecido lesado é substituído por um tecido conjuntivo vascularizado. Este processo envolve componentes da matriz extracelular, células residentes, ou seja, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e células nervosas. Há também a participação de leucócitos (neutrófilos, macrófagos/monócitos e linfócitos), bem como de mediadores lipídicos como prostaglandinas, leucotrienos e fator de agregação plaquetária e de mediadores protéicos como citocinas e fatores de crescimento (HATANAKA; CURI, 2007).

Desde a antiguidade existem tentativas humanas de intervir no processo de cicatrização de feridas, acidentais ou provocadas intencionalmente, como forma de realizar procedimentos para proteção ou reparo de lesão. Os registros mais antigos falam sobre manuscritos egípcios que datam de 3000-2500 a. C, onde curativos eram realizados utilizando mel, graxa, fios de linho e diversos tipos de excrementos como parte dos princípios da farmacopéia egípcia (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

Hipócrates foi quem lançou as bases da medicina científica, criou os conceitos de cicatrização por primeira ou segunda intenção e recomendava que as feridas fossem mantidas limpas e secas e preconizava sua limpeza com água morna, vinho e vinagre (DEALEY, 2001).

Durante a guerra da Criméia (século XIX) foram criados diversos tipos de curativos, à base de fibras de linho, que eram reutilizados várias vezes para se tornarem macios, mas permaneciam pouco absorventes.

Gamgee em 1860 descobriu o processo de remoção do óleo de algodão, tornando-o absorvível e criou o chumaço de algodão envolvido em gaze, que é utilizado até os dias de hoje.

Entre 1840 e a Segunda Guerra Mundial o foco para tratamento e cicatrização de feridas foi a utilização de anti-sépticos e agentes com ação antimicrobiana, com proteção de coberturas secas, como consequência às descobertas de Pasteur sobre a "Teoria dos Germes". É o período áureo da utilização de substâncias como o líquido de Dakin, Eusol, derivados de iodo, mercúrio e alumínio. Ao final desta guerra permanecia a crença de que o ambiente seco utilizando agentes tópicos que provocassem dessecação do leito da ferida

com cobertura de gaze seca fixada com espessa camada de fita adesiva é que proporcionava melhores condições de cicatrização (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

Em 1945, surge o primeiro relato realizado por Bloom sobre a utilização de um filme transparente, permeável ao vapor, em 55 pacientes com queimaduras, com descrição de efeitos benéficos na cicatrização. Depois, em 1950, Schilling apresenta estudos novos sobre a utilização desse tipo de filme, envolto em moldura adesiva de polivinil, que serviu de base para o desenvolvimento de novos recursos (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

Embora desde o início da década de 1960 já se aceitasse o pressuposto da criação de ambiente úmido na ferida, para efeitos benéficos no processo cicatricial, que reduzia a dor, por proteger as terminações nervosas contra o dessecamento. Mas somente em 1962, após Winter e Roove demonstrarem que a taxa de epitelização era 50% mais rápida em ambiente úmido e que a formação de crosta tornava-se menor. Surgiu então o interesse de desenvolver pesquisas, produção e comercialização desses recursos, resultando em uma verdadeira “revolução no conceito de curativos” (WINTER, 1962; MANDELBAUM *et al.*, 2003).

A partir de 1970, nos Estados Unidos e Europa, registrou-se uma avalanche de utilização de novos recursos, surgindo à necessidade de conhecer os reais benefícios de cada um. Esta preocupação fez com que os diversos órgãos e agências passassem a coordenar estudos, que pudessem estabelecer critérios para avaliar e indicar parâmetros, que direcionassem uma adequada seleção para tratamento de feridas (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

Os parâmetros, critérios e escalas de avaliação para o reparo de tecidos continuam sendo exaustivamente estudados e foi com a intenção de contribuir com evidências, materiais, recursos, procedimentos e tecnologia que este estudo foi realizado.

Neste estudo considerou-se em três fases o processo de cicatrização: inflamação, formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e remodelação da ferida (Figura 01). São eventos celulares, tissulares e bioquímicos que ocorrem em seqüência orquestrada para restabelecer o tecido após o trauma (SINGER; CLARK, 1999; SCHULTZ *et al.*, 2003; WERNER; GROSE, 2003; EFRON; MOLDAWER, 2004; PARK; BARBUL, 2004; HATANAKA; CURI, 2007) e que segue descrita em uma revisão que não se tornou esgotada.

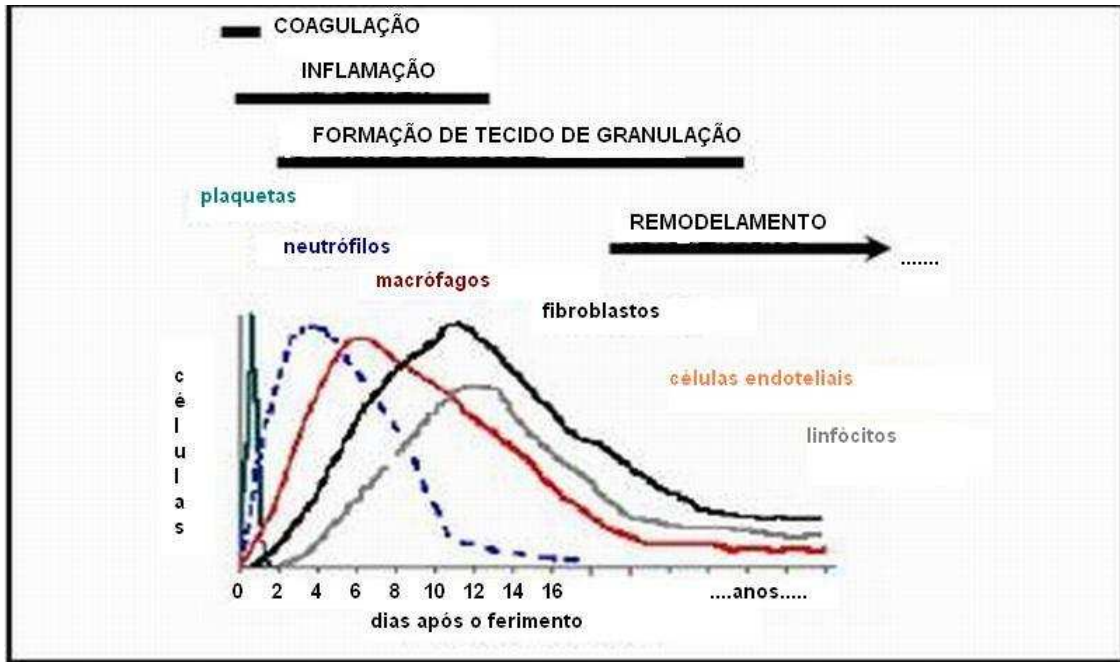


Figura 01 – Fases do processo de cicatrização (HATANAKA; CURI, 2007).

Nos animais vivos a capacidade auto-regenerativa é um fenômeno universal. Nos unicelulares fica restrita a presença das enzimas que são responsáveis pela recuperação estrutural (constituintes do cito-esqueleto, membranas e paredes celulares) e de moléculas de alta complexidade (proteínas de elevada complexidade estrutural, ácido ribonucléico (RNAs) e o ácido desoxiribonucléico (DNA). Nos organismos superiores o reparo pode se dá de duas formas: pela regeneração através da recomposição da atividade funcional do tecido ou pela cicatrização, onde ocorre o restabelecimento da homeostasia do tecido que teve perda de atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica (BALBINO *et al.*, 2005).

Danos tissulares de natureza física, química ou biológica desencadeiam de imediato uma série de eventos traduzidos simplisticamente como calor, rubor, tumor e dor. Sinais que resultam da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias gerados por estímulos físicos ou por sinalização química realizada por estruturas das células rompidas, formadas por porções da membrana celular e organelas e também fragmentos dos elementos inertes dos tecidos como colágeno, elastina, fibronectinas e outros, como também proteínas séricas que extravasam de vasos rompidos e pela ação de mediadores inflamatórios pré-formados que são liberados principalmente dos grânulos das plaquetas, mastócitos e

terminações nervosas periféricas, ou ainda neo-sintetizados, como eicosanóides e fator de ativação plaquetária (CONTRAN *et al.*, 2001). Quando essas moléculas se ligam a receptores localizados na superfície da membrana das células locais, induzem profundas modificações no seu metabolismo, na expressão genética e conseqüentemente em seu fenótipo. Em resposta, ocorre produção de uma segunda seqüência de mediadores de natureza lipídica, os eicosanóides e uma peptídica, as citocinas, os fatores de crescimento e os neuropeptídeos, seguida de externalização de proteínas de adesão para leucócitos, nas células endoteliais na superfície da membrana voltada para a luz dos vasos (Figura 02). Ainda, como decorrência do trauma ou da ativação celular, o micro-ambiente sofre alteração em sua composição físico-química ocorrendo baixa tensão de O₂, diminuição de pH, presença de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, sendo esta uma outra forma de sinalização que ativa as células envolvidas no reparo tissular (BALBINO *et al.*, 2005).

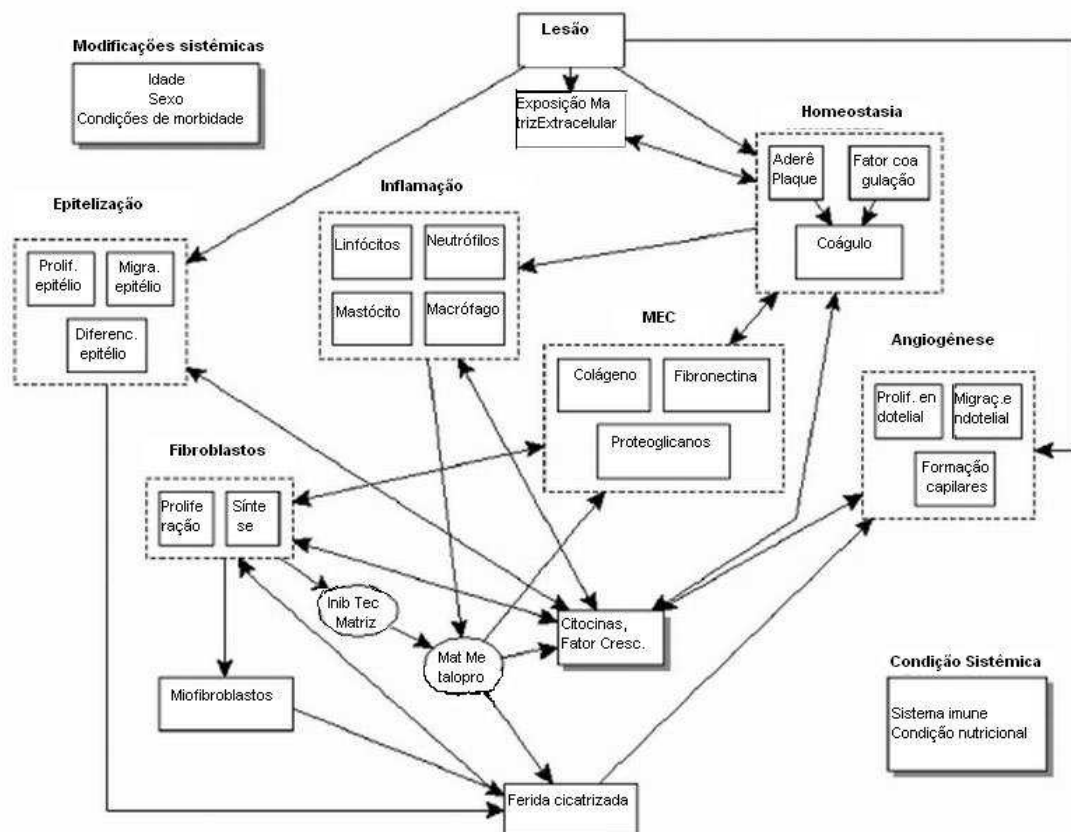


Figura 02 – Desencadeamento de eventos pós lesão (MENKE *et al.* 2007).

O processo continua, ocorrendo no tecido lesado infiltração de células circulantes, como os neutrófilos e os monócitos, e a migração de células adjacentes tipo células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos. Estes, em cooperação com

células locais, já ativadas, serão protagonistas da fibroplasia, que é a produção de colágeno pelos fibroblastos e deposição de matriz extracelular, angiogênese, cicatrização e reepitelização da região ferida. (SINGER; CLARK, 1999; MORI *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2004; SHIRAKATA *et al.*, 2005 ; HATANAKA; CURI, 2007).

Para Cardoso *et al.* (2004) o óxido nítrico tem um papel importante no processo de cicatrização de feridas. Ele influencia a função de macrófagos, fibroblastos e queratinócitos durante o processo cicatricial contribuindo para a reepitelização.

Para este autor a lesão ativa uma cascata local e sistêmica de respostas imune e o processo de cicatrização começam com a reação inflamatória, que requer uma complexa interação entre vários tipos de células. Polimorfonucleares, leucócitos e linfócitos são atraídos por mediadores que facilitam adesão e transmigração celular. A proliferação de miofibroblastos, síntese de colágeno e atividade de contração influenciam a formação de cicatriz no estágio final do processo de cicatrização, porque miofibroblastos e fibroblastos compõem a matriz extracelular.

Desde 1993, Clark considerou a reparação tecidual dividindo-a em três fases: a inflamação, a formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e a remodelação do tecido. Segundo ele estas fases não são mutuamente excludentes, mas se sobrepõem no tempo. O reparo tecidual completo resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas tendo leucócitos como principais protagonistas. Estas células têm atividades e estão de forma íntima envolvidas com reações catabólicas de degradação de tecidos através da produção de proteases e de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como também com as reações anabólicas para formação de tecidos através da produção de fatores de crescimento (RICHES, 1996). Estes fatores são responsáveis pela recomposição da celularidade da região ou pelo restabelecimento da homeostasia com formação de cicatriz.

1.1 FASES DO PROCESSO DE REPARO

O processo de reparo é dividido em três fases priorizando-se os aspectos macroscópicos e histopatológicos em: inflamatória, fibroblástica e de deposição de matriz extracelular e de remodelação.

Inflamatória

As diversas formas de lesão no organismo levam a alteração nas junções e nas células endoteliais ocorrendo às vezes ruptura de vasos sanguíneos e extravasamento de seus constituintes. Nos primeiros momentos do processo de reparo ocorre tamponamento desses vasos. Concomitantemente ao estímulo lesivo ocorre vasoconstrição devido a descargas adrenérgicas e a ação de mediadores oriundos de desgranulação de mastócitos. Uma seqüência de eventos acontece após o sofrimento da injúria caracterizada por deposição de plaquetas, sua ativação e recrutamento de novas plaquetas dando resultado à formação de trombo rico em plaquetas que tampona a lesão no endotélio. (COLLER, 1992; LEFKOVITS *et al.*, 1995; MANDELBAUM *et al.*, 2003). O trombo rico em plaquetas (trombo branco) de imediato é infiltrado pela fibrina e transforma-se em trombo fibrinoso. Depois, eritrócitos são capturados por essa rede fibrinosa formando-se então o trombo vermelho que é o principal responsável pela oclusão do vaso rompido (DAVIES, 1990). Assim, além de limitar a perda de constituintes circulatórios para os interstícios celulares, proporciona uma matriz preliminar, que dará alicerce a migração das células responsáveis para desencadear o processo de reparo. Inicialmente a adesão das plaquetas à superfície lesada se dará pelas proteínas de adesão presentes na sua membrana. As principais são os receptores de glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). Esse receptor tem sítios de ligação para o fibrinogênio, fator de von Willebrand, vitronectina, fibronectina e trombospondina. Mesmo sendo membro da família de receptores das integrinas (respondem pela interação e adesão célula-célula), a GP IIb/IIIa possui uma distribuição restrita que é encontrada somente nas plaquetas e em outras células de linhagem megacariocítica. Representa a proteína mais abundante da superfície plaquetária com aproximadamente 80.000 cópias por plaqueta (WAGNER *et al.*, 1996), resultando 1 a 2 % de todas as proteínas plaquetárias (JENNINGS; PHILLIPS, 1982). A seguir, as plaquetas são ativadas por grande número de substâncias agonistas presentes na matriz subendotelial e na corrente sanguínea. O colágeno subendotelial que ficou exposto por ocasião da ruptura do vaso e a trombina gerada pelos processos de coagulação é forte agonista da ativação e agregação plaquetárias (DAVIES, 1990; LEFKOVITS *et al.*, 1995; AMBROSE, 1996; AMOS, 1996; De NARDI *et al.*, 2004). Sendo assim, quando a plaqueta é ativada aumenta a

ação da protrombinase, que por sua vez promove maior produção de trombina, a partir da protrombina, proporcionando assim condições para a amplificação da adesão plaquetária. O difosfato de adenosina liberado das hemácias e grânulos densos das próprias plaquetas constitui outro elemento amplificador da agregação das plaquetas, que induz nelas a exposição do receptor GP IIb/IIIa ao fibrinogênio e fator de von WILLEBRAND (LEFKOVITS *et al.*, 1995; WILLERSON, 1995; COELHO, 1998). O ácido araquidônico da membrana das plaquetas em processo de agregação, também contribui para a agregação plaquetária, pois é convertido em tromboxane A₂ (TxA₂) pelas enzimas ciclooxigenase e tromboxane sintetase. O TxA₂ é um potente vasoconstritor, forte agonista de agregação plaquetária, e também indutor da exposição dos sítios de ligação da GP IIb/IIIa ao fibrinogênio e fator de von WILLEBRAND. A forma como ocorre sua ação na indução da exposição dos sítios de ligação da GP IIb/IIIa, é diferente da dos mediadores anteriores, pois se dá por mecanismo dependente da mobilização do cálcio intracelular. O fator de agregação plaquetária, que é liberado por macrófagos e mastócitos, plaquetas e outras células ativadas é outro importante derivado do araquidonato. Este fator é um importante ativador de plaquetas e indutor de sua agregação. A noradrenalina e a serotonina também podem ser citadas como agonistas da agregação plaquetária (COLLER, 1992; LEFKOVITS *et al.*, 1995; De NARDI *et al.*, 2004). As diferentes cascatas de ativação plaquetária são estimuladas por esses mediadores, mas a via final comum a todos é a ativação do receptor GP IIb/IIIa que através da interação com o fator de von WILLEBRAND e o fibrinogênio é o verdadeiro efetor da agregação e ativação plaquetárias.

Assim que ativadas, as plaquetas liberam fatores de crescimento como Fator de crescimento transformador β (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), quimiocinas como ativação de tecido conectivo quimiocina peptídeo II (CTAP-III) e outras proteínas como fibrinogênio, fibronectina e tromboplastina, encontradas em seus grânulos. As proteínas dos grânulos plaquetários em interação com proteínas da matriz extracelular somados à massa de corpos plaquetários agregados, estabilizam-se e formam uma matriz provisória, que se torna mais consistente à proporção que a fibrina é polimerizada por vias intrínseca ou extrínseca da coagulação.

As plaquetas ativadas liberam mediadores como TGF- β , PDGF (WERNER; GROSE, 2003; BALBINO *et al.*, 2005; HATANAKA; CURI, 2007),

troboxanos e fator de ativação plaquetário (PAF) são difundidos através da matriz provisória resultando em um gradiente quimiotático que orienta a migração das células existentes na circulação e regiões adjacentes envolvidas na resposta inflamatória.

Os neutrófilos, como células mais abundantes no sangue, migram para a superfície da ferida com a finalidade de formar uma barreira contra a invasão de microorganismos, promovendo o recrutamento dinâmico de mais neutrófilos de vasos adjacentes não lesados (FOXMAN *et al.*, 1997; ENGELHARD *et al.*, 1998; MANDELBAUM *et al.*, 2003; HATANAKA; CURI, 2007). Estas células constituirão 50% das migradas ao local no final do primeiro dia após a lesão (ENGELHARD, 1998; MORI *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2004).

O recrutamento de mais neutrófilos sofre influência também por quimiocinas produzidas pelos neutrófilos que foram coletados pelo trombo provisório. No interior dos neutrófilos, o tecido conectivo quimiocina peptídeo III ativado (CTAP-III) é proteoliticamente convertido em neutrófilo peptídeo 2 ativado (NAP-2) que, após essa conversão é exportado para o microambiente (BRANDT *et al.*, 2000; MORI *et al.*, 2004). Localmente, por influência dos mediadores liberados, as células associadas aos vasos, as endoteliais e os periócitos são ativados e passam a secretar o Crescimento relacionado ao oncogen α (GRO- α) entre outros mediadores, que é um promotor de diapedese de neutrófilos (GOEBELER *et al.*, 1998). Nos primeiros momentos a quimiotaxia de neutrófilos é também sustentada pelo Ativação neutrófilo peptídeo 78 (ENA-78) que é expresso nas células mononucleares encontradas na matriz provisória. O reconhecimento dessas três quimiocinas, NAP-2, GRO- α e ENA-78, pelos neutrófilos ocorre através da CXCR 2 presente na membrana celular (BRANDT *et al.*, 2000; MURDOCH; FINN, 2000; ROSSI; ZLOTINK, 2000).

O gradiente quimiotático tem origem de proteínas plasmáticas como o Fator de Hageman e o cininogênio de alto peso molecular. A interação destas duas moléculas gera a bradicinina que além de propriedades vasoativas e nociceptivas, também induz o metabolismo do ácido araquidônico para eicosanóides. Esta família de moléculas possui importância em vários fenômenos inflamatórios como a atividade quimiotática. A C5a (oriunda da circulação) é a principal fração livre do complemento que participa da formação do gradiente. Esta molécula tem ação quimiotática direta e sua ligação a receptores da superfície dos mastócitos ativa a

produção de eicosanóides e libera o conteúdo de seus grânulos que é composto por moléculas com atividades pró-inflamatórias. A contribuição final na formação de gradiente quimiotático nos momentos iniciais da resposta inflamatória são os produtos da fibrinólise. Para o processo de formação do trombo definitivo ocorre proteólise da rede de fibrina. A sua degradação produz fortes agentes quimiotáticos para leucócitos (HUYBRECHTS-GODIN *et al.*, 1979; CARDOSO *et al.*, 2004). O gradiente é retroalimentado de forma positiva à proporção que ocorrem as primeiras migrações de células inflamatórias para o local da lesão. Os neutrófilos, monócitos e fibroblastos são células que migram em resposta ao gradiente químico e em sua maioria produzem substâncias quimiotáticas com destaque para os eicosanóides e as quimiocinas.

A produção e liberação destes mediadores de forma isolada são insuficientes para o recrutamento de neutrófilos a partir da circulação. Em decorrência da ação dos eicosanóides (leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas), de citocinas (principalmente a Interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF α), produzidos por macrófagos, mastócitos e células estromais. Entre outros mediadores, as células endoteliais dos vasos não lesados induzem a expressão em sua membrana, de proteínas de adesão para leucócitos (GERSZTEN *et al.*, 1999; HATANAKA; CURI, 2007). A expressão de integrinas acontece por externalização destas, via corpúsculo de Weibel-Pelade como também pela síntese de novas moléculas de integrinas, especialmente na presença de IL-1 e TNF α , que em situações normais encontram-se internalizadas e só depois da influência destes mediadores são expressas na região voltada para o leito vascular. Os capilares de vasos não lesados também se dilatam através da ação desses mediadores inflamatórios. A circulação sanguínea torna-se lenta diminuindo sua força de arraste, o que permite a marginação dos leucócitos e ligação às moléculas de adesão expressas nas células endoteliais. De acordo com o estímulo, outros tipos celulares podem predominar, desde eosinófilos, responsáveis pelas reações de hipersensibilidade, até macrófagos.

Os neutrófilos provenientes da circulação são as primeiras células a atingirem a região inflamada, sendo predominantes entre o primeiro e o segundo dias. Sua principal função é fagocitar microorganismos.

A saturação de mediadores quimiotáticos é dirigida a um mesmo receptor tornando a célula em migração irresponsiva a este e levando à regulação negativa

de sua expressão na membrana (MURDOCH; FINN, 2000), os neutrófilos provenientes da circulação, após a diapedese, param a migração residindo difusamente no coágulo. Esta ocorrência se deve porque até este momento, as concentrações de NAP-2, GRO- α e ENA-78 (que são ligantes do receptor quimiocina 2 - CXCR2) são muito superiores à concentração dos outros quimioatraentes. A ocorrência de irresponsividade temporária de neutrófilos pelo receptor CXCR2 é provavelmente superada pela expressiva e seletiva produção de IL-8 sob a superfície da ferida. Em virtude da IL-8 também proporcionar estímulo ao receptor CXCR1 além do CXCR2 dos neutrófilos, que a torna capaz de desencadear uma segunda resposta migratória com direção à profundidade da ferida (MURDOCH; FINN, 2000). É importante ressaltar que a explosão respiratória está diretamente relacionada com a interação da IL-8 exclusivamente com o CXCR1 em detrimento ao CXCR2 (JONES *et al.*, 1996). Esta fase é também modulada por quimiocinas, como as proteínas inflamatórias para macrófagos (MIPs; MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2), a proteína quimioatraente de macrófagos-1 (MCP-1), Rantes e a IL-8 (EFRON; MOLDAWER, 2004). Os macrófagos derivados de monócitos são as próximas células a surgirem na região, por volta do segundo ao quinto dia, que ao invés do papel desenvolvido pelos neutrófilos é considerado o elemento mais crítico na indução do processo de reparo (DI PIETRO, 1995). São os macrófagos que além de auxiliar os neutrófilos na eliminação dos microorganismos através da fagocitose, depois de fagocitá-los e processá-los nos fagossomas apresentam seus peptídeos pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) às células T auxiliares (DI PIETRO, 1995; RICHES, 1996). Sendo assim, a fagocitose destas células atua como elo de ligação entre o sistema imune inato e o adaptativo. Some-se a isso o fato de ser a célula mais eficiente na eliminação dos fragmentos de tecidos removendo inclusive os neutrófilos que perderam função através da fagocitose (NEWMAN *et al.*, 1992). Por influência dos ligantes aos seus receptores de membrana, os macrófagos ainda produzem e exportam mediadores lipídicos, os eicosanóides peptídicos, as citocinas e os fatores de crescimento, as outras proteínas como as frações do complemento e os fatores de coagulação, e as enzimas relacionadas ao reparo, como as collagenases e metaloproteases da matriz. Os macrófagos além de ativados por ligantes, podem ser também ativados por alterações físico-químicas do microambiente. Os vasos ao se romperem nas regiões distais comprometem o aporte de oxigênio em função da formação de trombo. O influxo de neutrófilos e

macrófagos ativados no sentido desta região aumentam a demanda de oxigênio que consequentemente eleva a concentração de ácido lático e provoca queda de pH. A combinação hipóxia, pH baixo e elevada concentração de ácido lático faz ativar o macrófago para produzir fatores de crescimento (BALBINO *et al.*, 2005).

Um fenômeno precoce no processo de reparo é a transmigração de neutrófilos para o local dos tecidos lesados que ocorre quase imediatamente após a sinalização dos mesmos retidos pelo coágulo, macrófagos resistentes e células estromais. As citocinas, em especial IL-1 e TNF- α , atuam sobre os receptores das células do endotélio induzindo a produção de óxido nítrico (NO) assim como a expressão de moléculas de adesão para neutrófilos. Neste momento, a expressão de proteínas de adesão é o elemento fundamental para a migração de neutrófilos. Mesmo com a formação de gradiente químico de moléculas quimioatraentes, se estas não forem expressas na membrana das células do endotélio, a força de arraste da circulação, não vão permitir a adesão e a transmigração de leucócitos para o exterior do vaso (BALBINO *et al.*, 2005).

Em relação às substâncias quimioatraentes para os neutrófilos foi demonstrado que o PDGF foi o primeiro fator de crescimento com propriedade quimiotática sobre os macrófagos, os neutrófilos e os fibroblastos. Trata-se de uma família de moléculas formada por homo ou heterodímeros, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD (HELDIN *et al.*, 2002). Tem liberação imediata após a lesão, em grandes quantidades e a partir da desgranulação das plaquetas (MATSUOKA; GROTENDORST, 1989; SOMA *et al.*, 1992; MARIKOVSKY *et al.*, 1993; HARRIS *et al.*, 1995; ONO *et al.*, 1995; BREUING *et al.*, 1997; VOGT *et al.*, 1998; TRENGOVE *et al.*, 2000;) com sua forma de expressão e de seus receptores sugerindo uma forma parácrina de ação (ASHCROFT *et al.*, 1997; BEER *et al.*, 1997; BEER *et al.*, 2000).

Os tipos celulares e os principais mediadores envolvidos no processo de cicatrização fica esquematizado de forma resumida à seguir (Figura 03).

Tipos celulares e principais mediadores envolvidos no processo de cicatrização

Tipos celulares presentes no ferimento	Principais mediadores liberados	Principais efeitos desencadeados
Plaquetas	TGF- β . PDGF(PDGF-AA. PDGF-AB. PDGF-BB. PDGFCC. PDGF-DD). PAF. Fibrinogênio. Fibronectina. Tromboplastina.	Formação de trombo plaquetário que tampona a lesão e recrutamento de neutrófilos/monócitos
Neutrófilos	L-8. IL-8. IL-1. TNF- α . CTAP-III. TGF- β . HGF. MIP. HLE.	Recrutamento de monócitos/macrófagos
Monócitos/macrófagos	TGF- α . TGF- β . VEGF-A. IL-6. IL-8. IL-1. TNF- α . RANTES. MIP-1 α . MIP-1 β . MCP-1. HB-EGF. HGF. MIP. MSP.	Quimiotaxia de monócitos e fibroblastos. Proliferação de fibroblastos. Angiogênese e síntese de colágeno.
Células residentes (a) Fibroblastos (b) Queratinócitos (c) Células endoteliais	(a) FGF1. FGF2. FGF4. FGF7. FGF10. IP-10. MCAF. IL-8. eotaxina. PLGF. TGF- β . Cyr81. (b) MCP-1. FGF1. FGF2. TGF- β . MIP-2. MSP. (c) MCP-1.	Maturação e remodelamento da matriz extracelular. Angiogênese.

Figura 03 – Mediadores do processo de cicatrização (HATANAKA; CURI, 2007).

Deste processo participam também ativamente as moléculas da superfamília TGF- β , que compreendem: TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3 e ainda, proteína morfogenética do tecido conjuntivo 6 (BMP), inibinas e ativinas (BALBINO *et al.*, 2005). Nos mamíferos existem três isoformas de TGF- β : TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3 que são sintetizadas como precursores latentes, comumente são secretadas como um complexo ligado à TGF- β -binding protein (proteína de ligação) que sofre extracelularmente clivagem proteolítica (ROBERTS, 1998). O TGF- β_1 é o membro importante desta família para a infiltração de neutrófilos que é liberado das plaquetas em grandes quantidades logo após a lesão (ASSOCIAN *et al.*, 1983; HATANAKA; CURI, 2007). O TGF- β_1 tem função quimioatraente para neutrófilos, macrófagos e fibroblastos induzindo também vários tipos celulares a produzirem mais TGF- β_1 , elevando sua concentração no foco inflamatório.

A família de quimiocinas que são as citocinas com atividade quimioatraente sobre leucócitos, tem composição de cerca de 50 membros que são subdivididos em quatro famílias. Mesmo sendo a ação das quimiocinas mais evidentes na quimiotaxia de macrófagos e linfócitos, alguns membros desta família de moléculas como a MCP-1 e o GRO- α ou MIP-2 exercem também função sobre os

neutrófilos (CHRISTTOPHERSON; HROMAS, 2001). Segundo este mesmo autor o GRO- α e seu provável homólogo murino MIP-2 constituem importantes reguladores da quimiotaxia de neutrófilos. Nas feridas por incisão em humanos, o RNAm de GRO- α foi encontrado um dia após a lesão em altos níveis de concentração (ENGELHARD *et al.*, 1998). A IL-8 é um outro membro da família das quimiocinas também participante na orientação de neutrófilos para o foco da lesão (RENNEKAMPFF *et al.*, 2000).

Nas diversas etapas da inflamação a IL-6 é considerada como mediador fundamental (GALLUCCI *et al.*, 2000). Vários efeitos pró-inflamatórios lhe são atribuídos, entre eles estão intimamente relacionados ao processo de reparo em etapa mais tardia, a indução mitótica de queratinócitos e, em fase precoce, os efeitos quimioatrativos sobre neutrófilos (SATO *et al.*, 1999).

O reparo tissular em um processo de forma simplista pode ser feito pela indução de células lábeis (os fibroblastos, as células do endotélio e os queratinócitos) para mitose e pela mudança de seus fenótipos de células fixas para migratórias. Além dessas, nos fibroblastos também ocorrem mudança de fenótipo para células contráteis e secretórias de acordo com a etapa. A mitose e a migração só ocorrem se houver a existência de um substrato sólido que sirva de base de sustentação para as células e a construção deste substrato se realiza através da lise de constituintes inertes como, colágeno, integrinas, actina e fibronectina, da matriz extracelular após sua reposição com novas características. Havendo algum descontrole no processo lítico, em vez de benefícios pode haver prejuízo à evolução do reparo. Some-se a isso o fato de que as células inflamatórias ativadas tornam-se produtoras de outras substâncias como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que têm um conhecido potencial lítico sobre as membranas celulares. Além dessas duas formas de riscos em potencial à integridade tissular, existem mediadores inflamatórios como os TNFs e TGF- β que podem induzir apoptose de células via receptores de morte. No processo de evolução do reparo existe alternância harmônica e sincronizada em que ocorrem momentos de predominância de lise sobre reposição celular e vice-versa. Ocorre também o mesmo processo com apoptose e a indução mitótica. Faz-se necessário assim a retroalimentação negativa ao processo, sendo a IL-10 um dos mais conhecidos sinalizadores negativos da inflamação. Acredita-se que, por ter um papel limitador e finalizador da resposta inflamatória seja o mais importante mediador. Some-se a isso, o fato de que ela não

só regula crescimento ou diferenciação de várias células do sistema imune como também de queratinócitos e células do endotélio (MOORE *et al.*, 2001).

Ohsima e Sato (1998), encontraram picos na presença de seu RNAm 60 minutos após a ocorrência da lesão e Sato *et al.* (1999) encontraram dois picos de IL-10 no decorrer da evolução do reparo, sendo o primeiro três horas após a ferida e o segundo três dias após. Este mesmo autor identificou como principais fontes de RNAm de IL-10 os queratinócitos e o infiltrado mononuclear. Permanecem por serem desvendados o papel exato da presença de seu RNAm nos primeiros momentos da lesão e do segundo pico após três dias. Sendo assim, nestas etapas, os efeitos até aqui conhecidos da IL-10 sobre os leucócitos sugerem a necessidade de modulação negativa da inflamação. A inibição da infiltração de neutrófilos e macrófagos nos sítios de sofrimento tissular é uma das suas formas de atuação (SATO *et al.*, 1999).

Entre o segundo e quinto dias após a lesão, os macrófagos derivados de monócitos acumulam-se no local tendo como funções primárias auxiliar os neutrófilos na fagocitose de microorganismos, debris de tecidos e remoção de neutrófilos senis. Porém, a maior relevância de sua participação na inflamação e no reparo tissular são a produção e a liberação no local da ferida de fatores de crescimento e citocinas, essenciais na maturação da reação inflamatória e no início do processo de cura da ferida.

Após o início do processo inflamatório ocorre a sinalização de moléculas do microambiente sobre as células do endotélio fazendo com que ela mude a expressão de moléculas da superfície voltada para o leito vascular facilitando a adesão de monócitos circulantes em vez dos neutrófilos. Em processo igual ao dos neutrófilos, os monócitos quando transmigram pelas frestas entre as células do endotélio que são ativados assumindo fenótipo de macrófagos, derivados de monócitos. Quando fora do leito capilar, estas células também são conduzidas para o local da lesão orientadas por um dos gradientes de mediadores químicos cuja ação é quimioatraente. As moléculas das superfamílias do TGF- β (ASSOIAN *et al.*, 1983) e das PDGF (HELDIN *et al.*, 2002) são agentes quimiotáticos para neutrófilos e macrófagos. Enquanto isso, na família das quimiocinas, somente as proteínas quimioatraente para monócito 1 (MCP-1) partilha esta propriedade para as duas células (CHRISTOPHERSON; HROMAS, 2001). A migração de macrófagos é influenciada pelos seguintes membros: o MIP1- α /CCL3 (DI PIETRO *et al.*, 1998; HATANAKA; CURI, 2007), RANTE (CCL5), MIP1- β /CCL4, I309/CCL1, MCP-1 e

MCP-3, IL-1, IL-6, IL-8 e o TNF- α . A IL-10 possui efeitos inibitórios sobre a quimiotaxia de macrófagos de forma idêntica que para os neutrófilos (SATO *et al.*, 1999; HATANAKA; CURI, 2007).

Fibroblástica e de Deposição da Matriz Extracelular

A migração e a ativação de fibroblastos ficam intensificadas, a partir da presença no local dos macrófagos derivados dos monócitos e da produção e liberação de mediadores químicos produzidos por eles. Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação e com a influência dos fatores de crescimento e dos demais mediadores derivados dos macrófagos são ativados e migram das bordas para o centro da ferida. Isto ocorre através da matriz provisória formada do gradiente químico de substâncias quimioatraentes. Através do aumento de fibroblastos ativados para produzir colágeno no local, a matriz extracelular passa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais denso e elástico, denominado de fibroplasia que para ser eficiente, necessita de ocorrência paralela de neovascularização na região. A indução de angiogênese, além da ação direta de fatores de crescimento sobre as células da vasculatura é de certa forma, creditada à baixa tensão de oxigênio que ocorre no centro da ferida (KNIGHTON *et al.*, 1981; MORI *et al.*, 2004).

A fibroplasia e formação da matriz que é extremamente importante para a formação de tecido de granulação, em torno do quarto dia (GUIDUGLI-NETO, 1987; MANDELBAUM *et al.*, 2003) é constituída por macrófagos, fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, que estão amparados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas e colágeno tipos I e II (GUIDUGLI-NETO, 1992; MANDELBAUM *et al.*, 2003). A formação do tecido de granulação depende do fibroblasto, célula crítica na formação da matriz. Distante de ser apenas um produtor de colágeno, o fibroblasto produz elastina, fibronectina, glicosaminaglicana e proteases, que são responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (MANDELBAUM *et al.*, 2003). O tecido apresenta edema e é caracterizado por muitos espaços vazios que são exudativos e sangram com facilidade. A neovascularização é muito importante neste estágio por permitir a troca de gases, suprimento de oxigênio e nutrientes para as células metabolicamente ativas (ECKERSLEY; DUDLEY, 1988; MANDELBAUM *et al.*,

2003). As células endoteliais do interior de capilares, intactos nas bordas da ferida, sob estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores, passam a secretar colagenase e ativador de plasminogênio. Essas substâncias são responsáveis por aberturas na membrana basal permitindo a migração de células endoteliais que, atravessam a parede do vaso utilizando como substrato a matriz extracelular produzida provisoriamente e seguem em direção à lesão. Ao chegarem à região externa do vaso passam por um processo de diferenciação para aquisição de capacidade de formação de novos capilares. As células endoteliais migratórias formam na parte exterior do vaso um broto capilar que logo a seguir se une ao capilar originário para restabelecer o fluxo sanguíneo (RUDOLPH; BALLANTYNE, 1990).

Quando ocorre um processo lesivo há perda de massa de tecido. Para preencher um leito de ferida aberta duas estratégias precisam ser desencadeadas. Na primeira, a própria natureza anatômica da ferida se encarrega de proporcionar um estímulo para migração e proliferação de células como fibroblastos, células epiteliais e queratinócitos, a partir de suas bordas. Montesano e Orci (1988) denominaram este fenômeno de “efeitos de vizinhança livre”, as células basais que ficam próximas à região da ferida, que quando perdem a interação com as células adjacentes são ativadas, adquirindo propriedades mitóticas e proliferando na direção do centro da lesão. Na segunda, embora o espaço da lesão esteja preenchido por tecido de granulação, as bordas se deslocam em direção uma da outra, como se estivesse presente uma força de tração invisível (PEACOCK, 1984; MANDELBAUM *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2004; MORI *et al.*, 2004). Essa ocorrência é devida à diferenciação de alguns fibroblastos das bordas da ferida para miofibroblastos (fibroblastos com capacidade contrátil).

O processo evolui e a matriz extracelular que inicialmente era formada essencialmente por proteínas derivadas de plaquetas e de plasma tem sua composição modificada. Ocorrem migração e ativação de macrófagos e fibroblastos para o local, que acrescidos da presença de neovasos permitem que componentes da nova matriz extracelular sejam localmente produzidos por estas células. Sendo assim, os fibroblastos começam a depositar grandes quantidades de fibronectina que, mesmo sendo um substrato que desenvolve outras funções, serve basicamente para fixação da própria célula. Neste segundo momento há produção também de grande quantidade de ácido hialurônico, um polissacarídeo glicosaminoglicano não

sulfatado que facilmente se liga à água, auxiliando na resistência do tecido à compressão. São duas substâncias predominantes na matriz no momento em que ocorrem as primeiras fases do reparo do tecido, pois é uma combinação que propicia um microambiente favorável e eficiente para que ocorra movimentação de células, necessárias nesta fase. À proporção que o processo de maturação da ferida avança, ocorrem diminuição de concentração de ácido hialurônico e aumento da síntese de proteoglicanos ou glicosaminoglicanos sulfatados. A composição da matriz extracelular se modifica favorecendo a fixação e imobilidade das células, contribuindo para sua diferenciação para fenótipos mais maduros. As células endoteliais dos neovasos se diversificam em células de revestimento e os neovasos ganham características funcionais de capilares. As células que passam por mudanças fenotípicas mais acentuadas são os fibroblastos, que de fenótipo de células imaturas migratórias e replicativas inicialmente, passam a fenótipo característico de células ativas engajadas na síntese protéica, onde seu citoplasma torna-se volumoso, apresentando um retículo endoplasmático rugoso abundante. Desta forma, passam a secretar grandes quantidades de colágeno, que aos poucos substitui os proteoglicanos e a fibronectina, tornando-se o principal componente da cicatriz em formação (BALBINO *et al.*, 2005).

No processo de reparo a tensão de oxigênio constitui um importante mecanismo de regulação. Em seu início, a baixa tensão contribuía como estímulo ao macrófago para a produção de fatores de crescimento, migração e proliferação centrípeta de células das bordas da ferida e indução de angiogênese. Neste momento, faz-se necessária uma alta tensão de oxigênio para hidroxilação de resíduos de prolina e lisina nas cadeias polipeptídicas de colágeno, encontradas no citoplasma dos fibroblastos, proporcionada pela rede de neocapilares (BALBINO *et al.*, 2005).

Por ocasião da fixação de fibroblastos e amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno, evolui um processo máximo de contração da ferida, explicado pela mudança de fenótipo dos fibroblastos das bordas da ferida para miofibroblastos. Gabbiani *et al.*, (1970) e Cardoso *et al.*, (2004) descreveram inicialmente como um processo em que os fibroblastos das bordas começam a exibir características funcionais semelhantes às células do músculo liso. Segundo Majno e Joris (1996) e Cardoso *et al.*, (2004), os miofibroblastos são células intermediárias entre musculares lisas e fibroblastos, que são encontradas alinhadas ao redor de

depósitos da nova matriz extracelular, unindo célula a célula e criando força tensil. O ressecamento da crosta superficial, também auxilia no processo de contração da ferida, que durante a desidratação diminui de tamanho e leva o tecido a ela aderido.

Após a lesão inicia-se imediatamente o processo de reepitelização da ferida através do mecanismo de “efeitos de vizinhança livre”. Na camada basal do tecido da epiderme as células primitivas possuem potencial mitótico latente, que em tecidos normais encontra-se inibido pelo contato que existe entre as células através da “inibição de contato”. Quando ocorre uma lesão, este mecanismo de inibição desaparece e as células começam imediatamente um processo mitótico. Em virtude de uma ineficiência e dificuldade de constatação de um processo mitótico por parte destas células em etapas iniciais são devidas pela inexistência de um substrato específico na região da ferida. Isto só ocorre quando o tecido de granulação alcança o nível da epiderme. O fator de desenvolvimento da epiderme contribui para o processo de reepitelização. As células da epiderme quando ativadas retraem os tonofilamentos intracelulares, ocorrendo também dissolução de desmossomas intercelulares e formam-se filamentos de actina na periferia do interior da célula. Desta forma, estas alterações as liberam da membrana basal e das células epiteliais adjacentes, o que permite uma movimentação em direção ao centro da ferida. As células deslocam-se sobre a matriz celular provisória e, em sua trajetória continuam colocando grande quantidade de fibronectina. Uma ferida com superfície úmida e oxigenada acelera o processo de migração. Se estas células encontram crosta recobrimo uma região lesada, elas promovem dissecação de velocidade de migração. À proporção que a região lesada recebe cobertura de células da epiderme o mecanismo de “inibição de contato” é acionado. As células reaperentam o fenótipo original, a membrana basal torna-se refeita, os hemidesmossomos e desmossomos são reconstituídos (BALBINO *et al.*, 2005).

A matriz extracelular passa a ser substituída por tecido conjuntivo mais denso e mais elástico a partir da ativação de macrófagos na região da lesão e da produção de fatores de crescimento específicos.

A fibroplasia é iniciada pela formação de tecido de granulação no local do ferimento que é formado por uma matriz frouxa de colágenos tipo I e II, fibronectina, ácido hialurônico contendo macrófagos, fibroblastos, vasos recém formados e exudatos (GUIDUGLI-NETO, 1992). Este fato ocorre em torno do quarto dia após a lesão, observando-se novos fibroblastos, que se acumulam misturando-se a

capilares neoformados (GUIDUGLI-NETO, 1987; HATANAKA; CURI, 2007). Aqui, a sinalização entre as células é realizada por um maior número de mediadores, envolvendo além da atenção das células que produzem mediadores, a migração e indução de mitose de células estromais.

Os membros da superfamília do TGF- β possuem papel importante na fibroplasia além de possuírem atividades quimioatraentes.

Já foi demonstrado que, *in vitro*, os TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3 são mitogênicos para fibroblastos, embora inibidores da proliferação de várias outras células incluindo-se os queratinócitos. Ressalte-se que sua ação sobre os queratinócitos é paradoxal, considerando-se que de um lado exercem atividade antiproliferativa *in vivo* e *in vitro* (COFFEY *et al.*, 1988; SELLHEYER *et al.*, 1993), enquanto do outro lado induz a expressão de integrinas necessárias à migração pela matriz extracelular provisória rica em fibronectina (GAILIT *et al.*, 1994; ZAMBRUNO *et al.*, 1995). Some-se a isso o fato das três isoformas serem potentes estimuladores da expressão de proteínas da matriz extracelular além das integrinas (MASSGUÉ, 1990, 1998; ROBERTS; SPORN, 1996). Os TGF- β além de efeitos sobre a proliferação de fibroblastos, da ação sobre os queratinócitos e da deposição de matriz extracelular, participam ainda da diferenciação de miofibroblastos e do processo de angiogênese (ROBERTS *et al.*, 1986; DESMOULIERE *et al.*, 1993; ROBERTS; SPORN, 1996; CARDOSO *et al.*, 2004).

À superfamília de TGF- β pertencem também as ativinas, que são moléculas que regulam vários aspectos do crescimento e de diferenciação celulares em muitos órgãos e tecidos. Encontradas como proteínas diméricas elas consistem de duas subunidades β_A (ativina A), duas subunidades β_B (ativina B) ou subunidades β_A e β_B (ativina AB) (MASSAGUÉ, 1990). A partir de estudos realizados por Hübner *et al.* (1996) surgiu a primeira evidência da participação das ativinas no processo de cicatrização. Foi demonstrado um considerável aumento na expressão de ativina A e de seus respectivos receptores no decorrer do processo de reparo de feridas no dorso de camundongos. Na realização de estudos de hibridização *in situ* demonstraram que a expressão do RNAm de ativina β_A foi predominante no tecido de granulação vizinho ao epitélio hiperproliferativo sob a crosta, enquanto altos níveis de RNAm de ativina B, foram encontrados na região suprabasal dos queratinócitos nas bordas da lesão (HUBNER *et al.*, 1996). Provavelmente as ativinas induzem em fibroblastos a expressão do Fator de crescimento epidérmico

(EGF), mas já se sabe que elas inibem a proliferação de queratinócitos. Sendo assim, há um aumento considerável de tecido de granulação (SHIMIZU *et al.*, 1998; SEISHIMA *et al.*, 1999). Tem atuação ainda na estimulação da deposição de tecido de granulação, embora de forma mais seletiva que os TGF- β . Estes promovem uma deposição de forma geral, enquanto as ativinas induzem de forma mais rica a deposição de fibronectina e tenascina-C (ROBERTS *et al.*, 1986; HATANAKA; CURI, 2007).

O MCP-1 possui além de propriedades quimioatraentes sobre os monócitos/macrófagos, os neutrófilos e células T (BAGGIOLINI, 2001; CHRISTOPHERSON; HROMAS, 2001), influencia também a expressão de fatores de crescimento em macrófagos murinos (LOW *et al.*, 2001) e a sua ação sobre os fibroblastos induz a síntese de colágeno e ainda aumenta a expressão de TGF- β (DEVALARAJA *et al.*, 2000; WERNER; GROSE, 2003) e de metaloproteinase da matriz – 1 (DI PIETRO *et al.* 1998).

Também já ficou comprovada a participação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) neste momento do processo de reparo. Há contribuição deste fator na estimulação de fibroblastos para produzir matriz extracelular, estimular sua proliferação e induzir nestas células sua mudança de fenótipo para miofibroblastos (CLARK, 1993; CHOI *et al.*, 1996; HELDIN; WESTERMARK, 1999; WERNER; GROSE, 2003).

Existem membros da família CNN como cisteína Rich 61 (CYR 61), fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) e super expressão de nefroblastoma (NOV), que também participam da fibroplasia e deposição da matriz extracelular. É uma família composta por seis membros diferentes: CTGF, CYR 61, NOV, indução de proteína secretada Wnt 1 (WISP-1), WISP-2 e WISP-3. São proteínas que secretadas contém 38 resíduos de cisteínas conservados e organizados de quatro formas distintas de forma estrutural, que apesar de serem mais envolvidas com desenvolvimento e diferenciação embrionária, são também encontradas em alguns processos patológicos (BRIGSTOCK, 1999). Estudos de Igarashi *et al.*, (1993), mostraram as primeiras evidências de participação do CTGF no processo de reparo que já se tinha conhecimento de sua expressão em muitos tecidos e órgãos. De acordo com Bragham *et al.*, (1991), ele estimula diretamente a proliferação e a quimiotaxia de fibroblastos no processo de reparo. Torna-se ainda um potente indutor de ligação das proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo I e fibronectina)

a seus receptores de integrina (FRAZIER *et al.*, 1996) agindo desta forma como um modulador do TGF- β_1 neste processo (KOTHAPALLI *et al.*, 1997). Estudo de Brigstock (1999) sugeriu que o CTGF possui importante papel na patogênese de processos fibróticos. A CYR 61, da família CNN, também teve papel atribuído no processo de reparo e também é promotor de quimiotaxia de fibroblastos e aumenta o efeito mitogênico de fatores de crescimento sobre estas células (KIREEVA *et al.*, 1996). Chen *et al.* (2001), demonstrou que a CYR 61 além de regular a inflamação e a angiogênese, regula também a interação célula – matriz extracelular e o remodelamento da matriz após injúria na pele.

Existem evidências que o fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), além de efeitos sobre a proliferação de granulócitos e macrófagos possui papel importante no processo de reparo (BREUHAN *et al.*, 2000; MANN *et al.*, 2001). Estudo com camundongos transgênicos demonstrou que o GM-CSF proporciona melhora substancial de neovascularização e formação de tecido de granulação que resulta em aceleração do processo de reepitelização. Esses estudos demonstram que este fator, além de afetar diretamente sobre as células locais, também atua indiretamente aumentando de forma secundária o conteúdo de citocinas e de TGF- β_1 na região lesada (MANN *et al.*, 2001).

De acordo com Ornitz e Itoh (2001), a família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) é composta por 22 membros estruturalmente relacionados. Esta família possui a característica de interação com heparina e proteoglicanos que os estabiliza de desnaturação térmica e proteolítica e limita sua difusibilidade, sendo esta interação essencial para sinalização de seus receptores (ORNITZ, 2000). Os membros desta família em sua maioria possuem um amplo espectro de ação mitogênica que estimulam a proliferação de células de origem mesodermal, ectodermal e endodermal. Neste aspecto, a única exceção é o fator de crescimento de queratinócitos 7 (FGF 7) que parece ser específica para células epiteliais e em organismos adultos, de menor efeito (WERNER, 1998). *In vivo*, os efeitos demonstrados são sugestivos de envolvimento destes fatores de crescimento com o processo de reparo, particularmente os FGF 1 e FGF 2 (BABIC *et al.*, 1998). Os integrantes da família FGF são mitogênicos para vários tipos celulares existentes no tecido lesado, entre eles fibroblastos e queratinócitos (ABRAHAM; KLAGSBRUN, 1996). Os FGF 1, FGF 2, FGF 4, FGF 7 e o FGF 10 vem demonstrando maior potencialidade de participação no processo de reparo entre todos os FGF

(ABRAHAM; KLAGSBRUN, 1996; WERNER, 1998). Foi detectada imunoreatividade na regeneração da epiderme para o FGF 2 (em lesão causada por queimadura em ratos), acompanhada de melhor regeneração, formação de tecido de granulação e renovação capilar (KIBE *et al.*, 2000). Gibran *et al.* (1994) também detectaram este mesmo fator nas margens de queimaduras em humanos. A participação do FGF 7 no processo de reparo foi demonstrada por Guo *et al.* (1996). Werner *et al.* (1992); Marchese *et al.* (1995), verificaram posteriormente que seu RNAm era predominantemente detectado em fibroblastos da derme e também em tecido de granulação de humanos e de camundongos.

Clemmons (1997); O`dell e Day (1998) consideraram os fatores de crescimento com insulina (IGFs) potentes estimuladores da mitogênese e sobrevivência de muitos tipos celulares, exercendo suas funções de forma autócrina, parácrina e endócrina. Seus efeitos são mediados por ligação a receptores tirosina quinase com semelhanças aos receptores de insulina. O efeito benéfico da administração exógena de IGF-I no reparo de tecidos, em particular, quando associada a outros fatores de crescimento foi observado por Lynch *et al.* (1989). Em ferimentos de diversas espécies há efetivamente expressão de IGF-I e IGF-II (STEENFOS; JANSSON, 1992; MARIKOVSKY *et al.*, 1996; ROBERTSON *et al.*, 1999). Um número mínimo de células expressa receptores para IGFs. Mas, todas as células da epiderme e ainda macrófagos e outras células inflamatórias começam a expressá-los entre o primeiro e o terceiro dia após a lesão (JENNISCHE *et al.*, 1987; GARTNER *et al.*, 1992). Ghahary *et al.* (1995) demonstrou que o IGF-I aumenta a expressão da cadeia pró-alfa 1 (I) e da pró-alfa 1 (III) do procolágeno em cultura de fibroblastos da derma.

Harsum *et al.* (2001) demonstraram que a inervação é essencial para a cicatrização de feridas. De acordo com Lewin e Mendell (1993); Reynolds *et al.* (1997), o fator de crescimento de nervos (NGF) é um polipeptídeo protótipo da família das neurotrofinas consideradas essenciais para desenvolvimento e sobrevivência dos neurônios sensoriais simpáticos no sistema nervoso central e periférico. Some-se a isso o fato de possuírem funções importantes na iniciação e manutenção de inflamação em diferentes órgãos, além da ação sobre o crescimento de nervos (HUTSON *et al.*, 1979). Estudos comprovaram que a administração de NGF acelerou a cicatrização de feridas em camundongos diabéticos (LI *et al.*, 1980; MATSUDA *et al.*, 1998) e a cicatrização de úlceras de pressão em humanos

(BERNABEI *et al.*, 1999). Constantinou *et al.* (1994) encontraram evidência em seus experimentos de efeito do NGF sobre a cicatrização de feridas. Hasan *et al.* (2000) constataram uma elevação na expressão de NGF em miofibroblastos do tecido de granulação de feridas de ratos. Este polipeptídeo estimula também a proliferação e inibe a apoptose de queratinócitos (PINCELLI, 2000) e aumenta a proliferação e a expressão de moléculas de adesão de células endoteliais da microvasculatura (RAYCHAUDHURI *et al.*, 2001). Além de ser também um potente estimulador da migração de fibroblastos, aumenta a expressão de α -actina e a contração do gel de colágeno destas células (MICERA *et al.*, 2001).

Com a conclusão desta etapa, o leito da ferida apresenta-se completamente preenchido pelo tecido de granulação, a neovascularização restabelece a circulação e a rede linfática passa por regeneração. O tecido de granulação lentamente fica enriquecido por mais fibras colágenas, dando à região da lesão a aparência de cicatriz pelo acúmulo de massa fibrosa (GUIDUGLI-NETO, 1987; MANDELBAUM *et al.*, 2003; HATANAKA; CURI, 2007).

Mediadores envolvidos na fibroplasia como MCP-1, IL-8, CTGF, CYR 61, GM-CSF, FGFs e NGF possuem também atividade angiogênica. O MCP-1 tem papel na angiogênese demonstrado por Low *et al.* (2001) em estudos com camundongos knock-out para esta proteína. Estudos demonstraram que CTGF promove *in vitro* a proliferação, migração e sobrevivência de células endoteliais e que *in vivo* induz angiogênese (HUTSON *et al.*, 1979; BABIC *et al.*, 1999), em conjunto com a CYR 61 (BABIC *et al.*, 1998). Bussolino *et al.* (1989) estudaram o papel do GM-CSF sobre a migração e proliferação de células endoteliais e Risau (1990) demonstrou que FGF 1 e FGF 2 estimulam a angiogênese em vários modelos de ensaios.

A família fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o PLGF, que são outros sinalizadores que contribuem para a formação de neovasos. Galé e Yancopoulos (1999), Hatanaka e Curi (2007) identificaram o VEGF-A como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento. De acordo com Brown *et al.* (1992); Frank *et al.* (1995), os macrófagos e os queratinócitos da região que se encontra em reparo aumentam de forma pronunciada a expressão gênica de VEGF-A e os seus receptores ficam aumentados nos vasos sanguíneos do tecido de granulação (PETERS *et al.*, 1993; LAUER *et al.*, 2000). A associação destes fatos dá indicativos de sua participação na angiogênese. Howdieshell *et al.* (2001) reforçaram

esta hipótese pela demonstração de que sua neutralização por anticorpos reduz a angiogênese, a formação de tecido de granulação e o acúmulo de fluidos em regiões que sofreram lesão.

O fator de crescimento de placenta (PLGF), outro membro da família do VEGF, assumiu importância por sua participação na angiogênese. Células endoteliais dos capilares adjacentes à ferida expressam PLGF (FAILLA *et al.*, 2000) e o aumento de sua expressão indica importância funcional. Em camundongos knock-out para esta proteína concluiu-se que a angiogênese é defeituosa e neste mesmo estudo detectou-se um sinergismo entre VEGF-A e PLGF (CARMELIET *et al.*, 2001).

O crescimento relacionado ao oncogen α (GRO- α) possui ação indutora e a proteína induzida por interferon 10 (IP-10) com ação inibidora são moléculas da família das quimiocinas com influência sobre a angiogênese. Na fase inicial da inflamação são encontradas altas concentrações de GRO- α , onde além da ação quimioatratante apresenta também papel na migração de queratinócitos e na neovascularização (ENGELHARDT *et al.*, 1998). O efeito da IP-10/ CXC quimiocina ligante 10 (CXCL 10) na resposta inflamatória *in vivo* foi determinada por Luster *et al.* (1988), que projetaram um camundongo que constitutivamente a expressava em queratinócitos. A seguir a lesão, estes camundongos apresentaram inflamação mais intensa que o controle, retardo na reepitelização e tiveram uma fase de granulação desorganizada, demonstrando ao final seu efeito inibitório sobre a angiogênese (BELPERIO *et al.*, 2000). Desta forma, o IP/CXCL provavelmente inibe o reparo de ferida por interferência no desenvolvimento de granulação de tecidos normais. Para Shiraha *et al.* (1999), é um efeito que de forma parcial pode resultar de uma ação inibitória sobre a motilidade de fibroblastos após serem ativados por EGF.

Posteriormente, Strieter *et al.* (1995) demonstraram que outras quimiocinas como CXC, além de GRO- α , possuem também papel na angiogênese. Observaram ainda que quimiocinas que contêm os sítios Glu-Leu-Arg (ELR) adjacentes ao primeiro aminoácido cisteína na região NH₂ terminal representam potentes promotores de angiogênese. GRO- β (CXCL 2), GRO- γ (CXCL3), CTAP-III, β -tromboglobulina e o NAP-2 são quimiocinas que possuem sítio ELR além de GRO- α (STRIETER *et al.*, 1995; BELPERIO *et al.*, 2000).

Remodelação Tecidual

De acordo com Guidugli-Neto, (1987); Mandelbaum *et al.* (2003); Hatanaka e Curi, (2007), o leito da ferida fica totalmente preenchido pelo tecido de granulação em torno do décimo dia da ocorrência da lesão, com presença de rede capilar e a rede linfática em plena regeneração, em virtude de sua reconstrução ser iniciada após a da vasculatura. O tecido de granulação passa a ser enriquecido por mais fibras de colágeno e desta forma vai adquirindo aparência de massa fibrótica característica da cicatriz. Agora, surgem as primeiras fibras de colágeno tipo I (BALBINO *et al.*, 2005). O processo vai evoluindo e a deposição de colágeno é acentuada, observando-se apoptose de fibroblastos e de células endoteliais, formando-se assim a cicatriz. A resolução completa da ferida somente acontece após a maturação e remodelagem da matriz extracelular, que às vezes ocorre lentamente durante meses e até anos para que a cicatriz cutânea fique completamente madura com apenas 70% da resistência da pele normal.

Nas últimas fases da reparação surgem os eosinófilos que segundo Todd *et al.* (1991); Mandelbaum *et al.* (2003); Hatanaka; Curi, (2007) podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento. Após o fechamento da ferida e eliminação dos microorganismos, os linfócitos compõem o subsistema leucocitário mais abundante em feridas humanas (ENGELHARD *et al.*, 1998; MANDELBAUM *et al.*, 2003; CARDOSO *et al.*, 2004). Estas células são efetores imunes como também produtoras de fatores de crescimento. Ainda nesta etapa, os linfócitos são atraídos para a ferida em igual número que os monócitos, mas são os leucócitos que a partir do décimo quarto dia predominam na região (BLOTNIK *et al.*, 1994; CARDOSO *et al.*, 2004; HATANAKA; CURI, 2007).

A resistência de uma cicatriz está diretamente relacionada com a quantidade de colágeno depositada e de acordo com a forma com que as fibras estão organizadas. A resistência da cicatriz é maior quanto maior for o número de ligações covalentes transversais. Em sendo secretado na forma de tropocolágeno, as ligações transversais das fibras ocorrem por pontes de hidrogênio. Quando acontece o processo de amadurecimento da fibra, as lisinas, as hidroxilisinas e as lisinas glicosiladas que constituem a molécula de tropocolágeno são oxidadas até aldeídos pela enzima lisiloxidase, que depois de oxidação ligam-se covalentemente

a outros grupos aldeídos ou a lisinas não oxidadas, aumentando a resistência da fibra (BALBINO *et al.*, 2005).

Todo o processo de remodelagem da cicatriz compreende etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno na ferida é realizada de início de forma aleatória sendo orientada pela organização de fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Fibras estas subsequentemente digeridas pela colagenase, ressintetizadas, rearranjadas conforme a organização das fibras de tecido conjuntivo adjacente e ligadas lateralmente por ligações covalentes. Ligações essas formadas entre moléculas de tropocolágeno no âmbito e entre as próprias fibrilas. Aí então ocorrem sucessivas repetições de lise, ressíntese, redirecionamento e religação que formam fibras maiores de colágeno resultando em uma configuração mais regular da cicatriz. O resultado é o aumento de sua resistência devido à organização das fibras que acompanham as forças mecânicas às quais o tecido está condicionado durante uma atividade maior (CLARK, 1985; BALBINO *et al.*, 2005; HATANAKA; CURI, 2007).

Encerrando esta etapa, os anexos da pele (folículos pilosos e glândulas) ganham regeneração limitada e a coloração da cicatriz continua pálida, porque a regeneração de melanócitos é deficiente (JOHNSTON, 1990; HATANAKA; CURI, 2007) e as cicatrizes são hipo-vascularizadas considerando o desaparecimento de neocapilares.

A evolução do processo de reparo garante uma sucessão de eventos como a infiltração de neutrófilos, de macrófagos, fibroplasia e deposição de matriz extracelular, angiogênese, cicatrização e reepitelização. Embora estejam distribuídos nas três fases já descritas possuem peculiaridades que merecem destaque. Para regulação destes eventos existe envolvimento de mediadores derivados da circulação (as frações livres do complemento, os fatores de coagulação, as moléculas do sistema fibrinolítico e os hormônios como os esteroidais, os tireoidianos e a insulina). Há envolvimento também das cininas (histamina, bradicinina e serotonina), os mediadores peptídicos (citocinas, fatores de crescimento, neuropeptídicos e estruturas da matriz extracelular) e os mediadores lipídicos (eicosanóides e fator de agregação plaquetária). A elevada concentração de alguns mediadores, bem como redundância de efeitos e até ausência destes

demonstra que, da fase de inflamação até a remodelação da ferida existe interdependência entre eles para um mesmo efeito (BALBINO *et al.*, 2005).

A maturação e a remodelagem da matriz extracelular consistem a fase final da cura de uma ferida, em que a cicatriz adquire a máxima resistência tênsil. Esta fase de reparo tem como característica marcante a acelerada deposição de colágeno na região da ferida. Desta forma, os sinalizadores de importância exercem influência sobre os fibroblastos ou sobre células produtoras de sinalizadores que as influenciam. IGF-I é um desses sinalizadores, tendo seu efeito conhecido pelo aumento da expressão da cadeia pró-alfa 1 (I) e pró-alfa 1 (III) do procolágeno em cultura de fibroblastos da derme (GHAHARY *et al.*, 1995).

Outro sinalizador com participação importante nessa fase é o TGF- β , que é um mitógeno importante de fibroblastos, embora exercendo efeitos inibitórios sobre a proliferação dos queratinócitos, é considerado um potente estimulador da expressão de proteínas da matriz extracelular e de integrinas (MASSAGUÉ, 1990, 1998; ROBERTS; SPORN, 1996). Experimentos com feridas tratadas com anticorpos neutralizantes de TGF- β_1 ou combinações TGF- β_1 e TGF- β_2 , Shah *et al.* (1994) observaram que este tratamento provoca redução significativa na deposição de matriz extracelular e subsequente cicatrização (SHAH *et al.*, 1994, 1995). Choi *et al.* (1996), observaram redução na cicatrização de feridas em camundongos tratados topicamente com oligonucleotídeos antisense de TGF- β_1 . Em outro estudo Huang *et al.* (2002), fizeram uso de antagonistas sintéticos de TGF- β_1 e reduziram a cicatrização de queimaduras em porcos e a cicatriz incisional em coelhos. Com a isoforma TGF- β_3 os estudos apresentaram resultados contraditórios. Embora Balbino *et al.* (2005) tenham demonstrado aumento na deposição da nova matriz pela aplicação de TGF- β_3 exógena, Cribbs *et al.* (2002) e Ring *et al.* (2000), constataram que com aplicação de TGF- β_3 recombinante inibe a cicatrização sugerindo que este tipo de TGF- β antagoniza os efeitos das duas outras isoformas (SHAH *et al.*, 1995).

Vinte quatro horas após a lesão, a expressão de ativina β_A e em menor concentração da ativina β_B aumenta de forma considerável, permanecendo em concentrações elevadas até finalizar o processo de reparo (HUBNER *et al.*, 1996; WANKELL *et al.*, 2001). Embora haja inibição da proliferação de queratinócitos, induzem em fibroblastos a expressão de EGF aumentando de forma considerável o tecido de granulação (SHIMIZU *et al.*, 1998; SEISHIMA *et al.*, 1999). As ativinas induzem de forma mais acentuada a deposição de fibronectina e tenascina-C,

enquanto os TGF- β_s promovem deposição de tecido de granulação e de matriz extracelular de forma geral (ROBERTS *et al.*, 1986).

Kothapalli *et al.* (1997) encontraram após um dia de lesão o RNAm do CTGF e Igarashi *et al.* (1993), nove dias após a lesão. Estudo de Bradham *et al.* (1991) mostraram que este mediador, além de possuir propriedades quimiotáticas sobre os fibroblastos, modula o conteúdo de TGF- β_1 nas regiões das feridas (KOTHAPALLI *et al.*, 1997). Posteriormente, (BABIC *et al.*, 1999; SHIMO *et al.*, 1999) demonstraram seus efeitos sobre a proliferação, migração, sobrevivência e adesão *in vitro* de células endoteliais, sugerindo também sua participação na angiogênese. Com as características descritas e sua detecção nas diversas etapas do reparo, torna-se provável que este fator de crescimento seja fundamental na formação do tecido cicatricial.

Os efeitos antiinflamatórios já conhecidos e seu efeito regulador da IL-10 sobre o crescimento e diferenciação de inúmeras células do sistema imune, queratinócitos e células endoteliais (MOORE *et al.*, 2001) mostram que sua participação no reparo não fica restrita à regulação negativa da inflamação. Como os queratinócitos e o infiltrado mononuclear são as principais fontes de RNAm de IL-10 (SATO *et al.*, 1999) encontraram ser possível que este exerce funções mais diretas sobre a cicatrização e reepitelização. Ao identificar-se um pico de RNAm de IL-10 nos instantes iniciais da lesão e também de um segundo pico após três dias ficam reforçados indicativos desta participação.

Quanto à modelagem da matriz extracelular, quimiocinas como IL-8, expressão e secreção regulada da ativação normal de célula T (RANTES), proteínas inflamatórias para macrófagos (MIP-1 α , MIP-1 β) e MCP-1, além das ações quimioatraentes sobre neutrófilos e macrófagos derivados de monócitos, há indução de expressão de metaloproteinasas em diversos tipos de leucócitos (DI PIETRO *et al.*, 1995, 2001; D'SOUZA *et al.*, 2001; EFRON; MOLDAWER, 2004). O VEGF-A e o PLGF são exemplos de mediadores com relação à angiogênese e influência direta sobre células de revestimento. Sua expressão também se apresenta aumentada durante a migração de queratinócitos (FAILLA *et al.*, 2000). O fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e o GRO- α são outros dois mediadores que também participam da reconstrução epitelial além de suas funções angiogênicas. No início, o HGF foi tido como um poderoso mitógeno de hepatócitos. É um fator que auxilia na recomposição celular e estimula a dissociação de células epiteliais (COMOGLIO;

BOCCACCIO, 2001). O GRO- α apresentou intensa atividade mitogênica para queratinócitos em experimentos *in vitro*, o que sugere seu envolvimento na reepitelização. Mas, Rennekampff *et al.* (1997), acompanhando este efeito do GRO- α observaram significativa redução na contração da ferida. Na reepitelização o efeito do TGF- β_1 parece ser paradoxal. De uma forma, tanto *in vivo* como *in vitro* inibe a proliferação de queratinócitos, sugerindo ser um regulador negativo da reepitelização e de outra forma induz expressão de integrina que é fundamental para que haja migração destas células para a matriz provisória que é rica em fibronectina (GAILIT *et al.*, 1994; ZAMBRUNO *et al.*, 1995).

As ativinas e as BMPs são outros membros da família do TGF- β que participam da reepitelização. As BMPs tem papel contrário aos da ativina na reepitelização, pois ativinas podem estimular fibroblastos para expressão de fatores de crescimento, que de forma parácrina estimulam a proliferação de queratinócitos. Depois que a ferida se fecha a BMP-6 se acumula em toda camada suprabasal da nova epiderme (KAISER *et al.*, 1998). Com esta localização pode haver participação na diferenciação de queratinócitos o que cessaria sua atividade mitótica. Suposição reforçada em virtude da BMP-6 induzir diferenciação de queratinócitos *in vitro* (D'SOUZA *et al.*, 2001; Mc DONNEL *et al.*, 2001). Inibir a proliferação de queratinócitos pode ser necessário para restabelecimento e diferenciação da epiderme.

O mesmo efeito da BMP-6 foi também atribuído ao TNF. Mori *et al.* (2004) avaliaram seu papel no reparo utilizando camundongos deficientes de seu receptor, onde as feridas dos animais demonstraram aumento da angiogênese, reepitelização e do conteúdo do colágeno. Quando acompanharam as diferenças histológicas perceberam aumento na expressão de TGF- β_1 , CTGF, VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2. A ausência do receptor TNF em camundongos facilita a evolução da angiogênese e reepitelização, sendo provável que em situações normais este possua ações inibitórias sobre estes processos.

No processo de reparo as ações da IL-6 não ficam restritas ao seu efeito quimioatrante sobre os neutrófilos na fase inflamatória. As diversas células que expressam IL-6 no centro da lesão e seu receptor adicionado a sua presença durante toda evolução da inflamação sugerem uma participação muito importante desta citocina no reparo. A administração tópica de IL-6 exógena reverteu o processo e restabeleceu a reepitelização. Isto foi demonstrado por Sato *et al.* (1999)

em que a IL-6 exerceu efeitos mitogênicos sobre os queratinócitos e Gallucci *et al.* (2000) quando demonstraram que em camundongos knockout para IL-6 o processo de reparo evoluiu lentamente.

Os membros da família FGFs em sua maioria, possuem amplo espectro de ação mitogênica. Eles estimulam a proliferação de células de origem mesodermal, ectodermal e endodermal, além de vários tipos de células presentes no tecido lesado, como fibroblastos e queratinócitos (ABRAHAM; KLAGSBRUN, 1996).

O único membro dessa família que parece ser específico para células epiteliais e de menor potência nos organismos adultos é o FGF 7 (WERNER, 1998). Enquanto seu receptor de alta afinidade (FGFR2IIIb) é superexpresso em queratinócitos de feridas de humanos e porcos (DANILENKO *et al.*, 1995; MARCHESE *et al.*, 1995). Kurita *et al.* (1992) encontraram o FGF 2 em queratinócitos basais na epiderme de feridas hiperproliferativa e normal. Depois, Antoniades *et al.* (1993) encontraram relação positiva de FGF 1 e FGF 2 em queratinócitos na epiderme de feridas de porcos. Com estes resultados fica demonstrado que os membros da família dos fatores de crescimento derivados de fibroblastos têm participação nas diversas etapas do processo de reparo, possuindo também papel importante na reepitelização.

Os efeitos das moléculas da família EGF sobre a reepitelização são mais estudados. Ela é composta pelo próprio EGF e também pelo TGF- α , HB-EGF, *amphiregulin*, *epiregulin*, *betacellulin*, *epigen* e pelas proteínas codificadas pelo vírus *Vaccinia* e outras poxviroses (TZA HAR *et al.*, 1998; STRACHAN *et al.*, 2001; YARDEN, 2001; SHIRAKATA *et al.*, 2005).

Grotendorst *et al.* (1989) foram os que primeiro obtiveram evidência de que o receptor de EGF influenciava o reparo. Posteriormente, uma série de estudos clínicos e experimentais demonstrou o efeito positivo do EGF, TGF- α e HB-EGF no reparo de feridas, sugerindo que de forma endógena estes fatores têm envolvimento com o processo de cura das feridas (SCHULTZ *et al.*, 1987; GREENHALGH, 1996; STEED, 1998). Shirakta *et al.* (2005) obtiveram resultados experimentais que sugerem que de forma endógena HB-EGF é um importante fator de crescimento de endotélio na cicatrização de feridas. Marikovsky, (1993); Shirakata *et al.* (2005), demonstraram o efeito do HB-EGF sobre a proliferação de fibroblastos e queratinócitos. Marikovsky *et al.* (1996) demonstraram além desta ação, um sinergismo entre o HB-EGF e o IGF I na proliferação de queratinócitos *in vitro*. E

Shirakata *et al.* (2005) conseguiram resultados com experimento em ratos que indicaram que a expressão de HB-EGF para queratinócitos é importante para a cicatrização de feridas *in vivo*. Rappolee *et al.* (1988) constataram a presença de RNAm do TGF- α em macrófagos isolados de feridas. Utilizando um modelo de hibridização *in situ*, este fator de crescimento foi encontrado por imunohistoquímica em eosinófilos de feridas de coelhos e de hamsters (TODD *et al.*, 1991; WONG *et al.*, 1993). Em queimaduras de ratos, também foi encontrado o TGF- α , principalmente na fase de proliferação de queratinócitos (CRIBBS *et al.*, 2002). Resultados assim demonstraram a importância da participação deste fator de crescimento (HB-EGF) na reepitelização de lesões cutâneas, agindo principalmente na estimulação de migração, proliferação de queratinócitos (SHIRAKATA *et al.*, 2005).

1.2 Método de medição

Neste estudo sentiu-se a necessidade de utilizar um método com mais acurácia, pois sabe-se que o homem desde a antiguidade desenvolve a capacidade de efetuar medidas relativamente seguras. As populações humanas primitivas realizaram medições astronômicas com finalidades religiosas e agrônômicas, para construções de templos religiosos, palácios e habitações domiciliares. Na Revolução Industrial ocorreu a padronização dos pesos e medidas com a introdução na França do sistema métrico decimal.

A palavra morfometria é formada pelo radical grego morphé, que significa a forma, associada ao radical grego metrikós, ou em latim metricu, significa o ato de medir ou o processo de estabelecer dimensões (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Este termo tem ampla aplicação na ciência, mas em biomedicina, seu sentido é “atividade de medir estruturas anatômicas”. É um método com função de tornar mais objetiva e precisa a coleta, apresentação e análise dos resultados obtidos em pesquisas e em rotinas de laboratório, permitindo assim que se relacionem as diferentes estruturas anatômicas com as funções. Algumas medidas morfométricas são áreas (superfícies), pesos, volumes, comprimentos, ângulos, diâmetros e perímetros. São medidas que podem ser determinadas em estruturas microscópicas, mesoscópicas e macroscópicas (MANDARIN, 2003; MARQUES *et al.*, 2004).

A mensuração de áreas pode ser realizada com acurácia utilizando-se diferentes métodos planimétricos, entre os quais: planimetria tradicional, por integração linear e por contagem de pontos. Essas técnicas são aplicáveis apenas a imagens planas (MANDARIN, 2003).

O advento dos sistemas computacionais para o processamento de imagens digitais possibilitou a realização de medidas planimétricas mais objetiva, rápida e acurada (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Optou-se então pela utilização de captura de imagens digitais para processamento em *software* específico no estudo aqui realizado.

1.3 Abordagem terapêutica

Os profissionais de saúde a partir da década de 1990 começam a se preocupar com o impacto social e econômico, do aspecto de reparo ou da cronificação de feridas e possíveis conseqüências, considerando o aparecimento de infecção local ou sistêmica, na utilização de anti-sépticos e vários tipos de agentes antimicrobianos (RIBEIRO, 2003).

Para Mandelbaum *et al.* (2003), o complexo processo de cicatrização encontra muitos fatores que interferem de forma geral e local.

Nos fatores gerais pode-se incluir a idade, o estado nutricional, a existência de doenças de base, tais como diabetes, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, a aterosclerose, a disfunção renal, quadros infecciosos sistêmicos e o uso de drogas sistêmicas (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

Nos fatores locais considera-se a técnica cirúrgica, a formação de hematomas, o aparecimento de infecção, a reação de corpo estranho, o ressecamento da ferida e o uso de agentes tópicos (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

Neste estudo foram utilizadas substâncias de uso tópico descritas a seguir, como forma de contribuir para uma nova abordagem terapêutica no tratamento de feridas.

Dersani[®]

Um dos compostos utilizados neste estudo, o Dersani[®], tem sua composição básica de triglicerídeos de cadeia média (ácido caprílico, ácido cáprico,

ácido caprótico e ácido láurico) e ácido linoléico (ácido graxo essencial), lecitina de soja e vitaminas A e E.

Os TCM (triglicerídeos de cadeia média) contêm em suas estruturas predominantemente ácidos graxos saturados com oito carbonos (caprílico), dez carbonos (cáprico), seis carbonos (caprótico) e doze carbonos (láurico). Os triacilgliceróis dos ácidos cáprico e caprílico merecem especial atenção como opção de ésteres. Ao serem classificados como TCM têm utilização como fonte nutricional, solvente, veículo e estabilizante de produtos a serem administrados por via oral, tópica e parenteral. Podem ter uso no tratamento e prevenção de dermatite amoniacal e de úlceras de decúbito, por formarem uma barreira protetora para a pele, impedindo a maceração, além de importante ação nos processos de inflamação celular, proporcionando alívio após a primeira aplicação, nutrição celular local, além de possuir grande capacidade de regenerar tecido. Também são interessantes como lubrificantes, apresentam fator de espalhamento, índice de viscosidade emoliente (D'AGOSTINI, 2001).

Os ácidos graxos de cadeia média, como os monoacilgliceróis de cadeia média, tiveram ação antimicrobiana elevada (80%) na redução de formação de cáries dentárias em estudo realizado em animais de laboratório (D'AGOSTINI, 2001).

Os ácidos graxos contêm uma classe de compostos formados por uma longa cadeia hidro-carbonada e um grupo carboxila terminal. Tem três funções principais: são componentes estruturais das membranas biológicas, atuam como precursores de mensageiros intracelulares e são oxidados gerando ATP (trifosfato de adenosina) (HATANAKA; CURI, 2007).

Desde o início dos anos 70 tem-se estudado os efeitos dos ácidos graxos na resposta imune. Tem-se conhecimento que estes metabólitos interferem nos diversos eventos do processo inflamatório como contração vascular, quimiotaxia, adesão, diapedese, ativação e morte celular, sendo que a maioria destes acontece via derivados do ácido araquidônico como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e lipoxinas (HATANAKA; CURI, 2007).

Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) merecem destaque dentre os diversos ácidos graxos presentes no plasma e em leucócitos. Além de sua função estrutural podem modular interações célula-célula e sinalização intracelular. Sendo assim, a alteração da composição de ácidos graxos de fosfolipídeos da membrana

pode proporcionar fluidez, mudando a ligação de citocinas aos seus receptores (HATANAKA; CURI, 2007).

Estudos demonstraram que o uso tópico de ácidos graxos insaturados contribuía para a eliminação de bactérias na pele intacta (KODICEK, 1956).

Para Cardoso *et al.* (2004) ácidos graxos na forma de fosfolipídios são constituintes fundamentais da membrana plasmática. Eles são particularmente importantes para os leucócitos por sua influência na resposta imune. Além dos ácidos graxos presentes na membrana plasmática, os ácidos graxos polinsaturados também exercem papel estrutural podendo modular a interação célula-célula e a transdução do sinal. O ácido linolenico e o ácido linoléico estimulam a proliferação de célula epitelial *in vitro*, um papel fundamental na cicatrização. PUFAs são também mediadores lipídicos com função crucial no processo inflamatório, contração vascular, quimiotaxia, adesão, ativação e transmigração celular. O ácido araquidônico, o ácido linoleico são mediadores de uma série de eventos durante a cicatrização como crescimento celular, angiogênese e síntese da matriz extracelular.

A vitamina E além das funções antioxidantes, desempenha função específica estrutural. Controla a peroxidação lipídica em células imunológicas, modula a produção de eicosanóides, estimula produção de IL-2, estimula proliferação de linfócitos e protege os receptores dos macrófagos (TRABER; PACKER, 1998).

A vitamina A (ácido retinóico) interfere na cicatrização provocando lise das membranas lisissômicas e é caracterizada como estimuladora das etapas de fibroplasia colágena e epitelização (KODICEK, 1956; EHRLICH; HUNT, 1968; HATANAKA; CURI, 2007).

Estudos mostraram que além dos ácidos graxos essenciais, a lecitina de soja e as vitaminas A e E também contribuíram para o processo de reparo de tecido (EHRLICH; HUNT, 1968).

A lecitina de soja, além de proteção, proporciona a manutenção da hidratação dos tecidos e auxilia no processo de cicatrização da pele (DE NARDI *et al.*, 2004).

O ácido linoléico é um ácido graxo essencial de 18 carbonos. Por um processo de dessaturação dá origem ao ácido araquidônico (20 carbonos), precursor de prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e lipoxinas, que por sua vez atuam

como mediadores da função plaquetária, processos inflamatórios, vasculares, motores, sensoriais, entre outros (GOMES, 1978; HATANAKA; CURI, 2007).

Foi observado que o ácido linoléico é capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* através de alterações na sua síntese protéica, na parede celular, nos ácidos nucléicos e na membrana celular bacteriana em divisão (GREENWAY; DYKE, 1979). Verificou-se que os produtos do metabolismo do ácido linoléico estão envolvidos na transdução do sinal mitogênico do EGF (fator de crescimento epidérmico) para o núcleo do fibroblasto, responsável pela formação de prostaglandinas (DERVICHIAN, In: HOLMAN, 1954).

Verificou-se que o ácido linoléico também participa do processo inflamatório, proliferação e modulação do crescimento celular, bem como atua como mediador de leucócitos sendo, portanto quimiotático e estimulador de neutrófilos (MOCH *et al.*, 1990).

Água de Coco

A outra substância utilizada neste estudo foi água de coco liofilizada, encaminhada para manipulação em farmácia com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), nas formas amorfa e cristalina, na apresentação cápsula, que era diluída em água destilada tornando-se aquosa e na apresentação gel.

O coco é o fruto do coqueiro, que é considerado a árvore da vida, por constituir-se um dos principais recursos vegetais da humanidade (VIGLIAR *et al.*, 2006), principalmente em países como Indonésia, Nova Zelândia, Malásia, sul da Tailândia, Filipinas, Sri Lanka, Polinésia, nos Estados Unidos somente no Havaí, Califórnia e na Flórida e principalmente no Brasil (COCONUT PALM, 2007).

A origem dessa planta é objeto de controvérsia, pois autoridades indicam o sul da Ásia, outros no noroeste da América do Sul, mas foram encontrados fósseis na Índia e ainda fósseis de 15 milhões de anos na Nova Zelândia (COCONUT PALM, 2007).

Cocos nucifera L é uma palmeira tropical (Figura 04) de onde se aproveita raiz, caule, folha, inflorescência e fruto.



FIGURA 04 – Coqueiro e fruto.

Nativos aproveitam essa planta na culinária obtendo o óleo, margarina, leite, no preparo de drinks, confeccionam cordas, chapéus, cestos, mantas, tapetes, recheio de estofados (BRITANNICA CONCISE ENCYCLOPEDIA).

O coqueiro chegou ao Brasil aportando na Bahia em 1533, em embarcações portuguesas oriundas das ilhas de Cabo Verde. Provavelmente por dispersão natural ou através de correntes marítimas atingiu a costa brasileira (VIGLIAR *et al.*, 2006), necessitando para se desenvolver que o plantio seja realizado em regiões com precipitação média/ano em torno de 1300 mm³, temperatura variando de 24° a 27°C, umidade relativa do ar entre 80% a 90% e luminosidade superior a 2000 horas de luz/ano (VIGLIAR *et al.*, 2006; COCONUT PALM, 2007).

No Brasil, de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), existem três variedades de coqueiros sendo cultivadas: a gigante (coqueiro de praia), a anão e a híbrido (anão gigante).

Os frutos do coqueiro anão, principalmente o verde, têm o fluido usado para consumo, enquanto do coqueiro gigante e do híbrido é o albúmen, que pode ter uso “in natura” ou beneficiado, na forma de leite e coco ralado (VIGLIAR *et al.*, 2006).

A água de coco encontrada em sua cavidade é o líquido do endosperma, que começa a se formar no 2º. mês após abertura natural da inflorescência e começa a atingir seu volume máximo a partir do 6º. mês. Pesquisas indicam que a água de coco corresponde a 25% do peso do fruto, tendo sua composição básica formada de 95,5% de água, 4% de carboidratos, 0,1% de gordura, 0,02% de cálcio, 0,01% de fósforo, 0,5% de ferro, além de glicose, potássio, fibra, magnésio, zinco, lipídios totais (destacando os ácidos capríco, caprílico, cáprico, láurico, oléico e linoléico), aminoácidos, vitamina C, vitaminas do complexo B, sais minerais, proteínas (CAMPBELL-FALCK *et al.*, 2000; MAGALHÃES *et al.*, 2005; VIGLIAR *et al.*, 2006).

Picado, chefe do Laboratório do Hospital San José, na Costa Rica relatou em uma Oficina Sanitária Panamericana, realizada em outubro de 1942, seu conhecimento sobre a composição da água de coco e seus benefícios, considerando a situação de guerra que privava laboratórios de pequenos países da América Latina, comunicou sua experiência em utilizá-la como meio de cultura de várias bactérias.

Durante a II Guerra Mundial a água de coco “in natura” foi considerada estéril e foi utilizada em infusão venosa em soldados feridos em combate na Ásia, durante a invasão japonesa. A infusão foi realizada utilizando equipo com filtro (próprios para infundir sangue e derivados) para reter os grumos e os resíduos naturais da água quando dentro do coco, como cuidado para prevenir a introdução de trombo, evidenciado na Figura 05. Seu uso foi justificado pela sua composição eletrolítica, rica em glicose, frutose, aminoácidos essenciais, conter alta concentração de potássio, magnésio e cálcio (BRITISH MEDICAL JOURNAL, 1965; CAMPBELL-FALCK *et al.*, 2000; PETROIANU *et al.*, 2004; VIGLIAR *et al.*, 2006;).

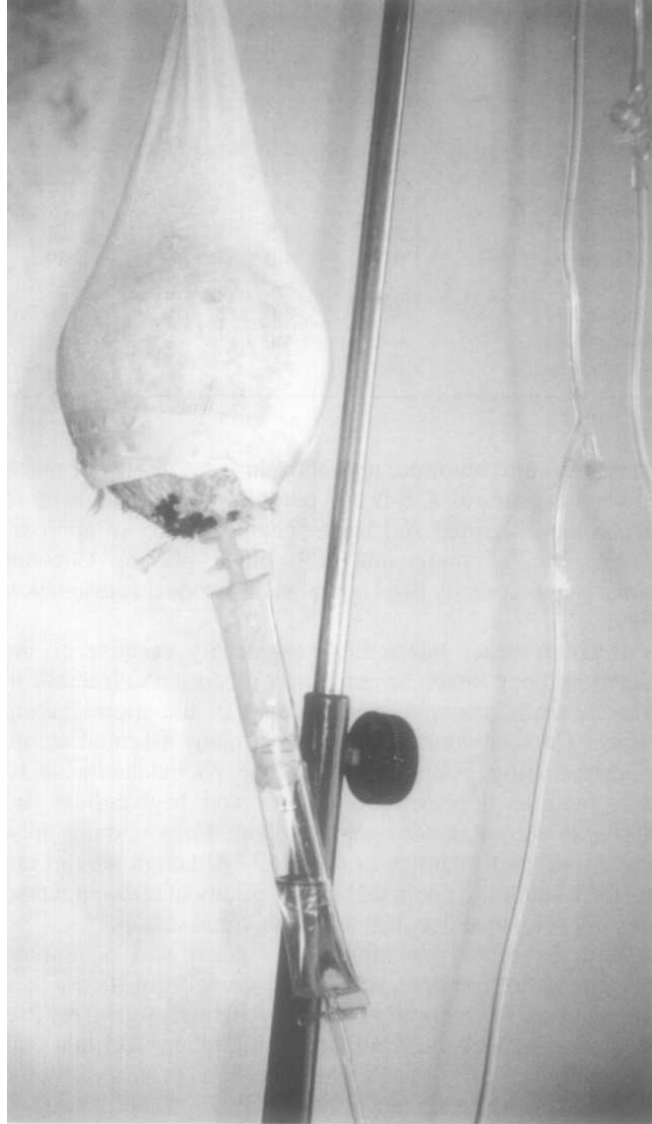


FIGURA 05 – Água de coco em infusão venosa. Campbell-Falck *et al.* 2000.

Pradera *et al.* (1942) realizaram uma pesquisa científica da composição da água de coco para utilização na prática médica em Havana-Cuba, enfatizando a alimentação infantil. Administraram a água de coco filtrada em 12 crianças por via endovenosa, sem efeitos adversos. A infusão teve gotejamento de 30 a 40 gotas/minuto, por 24 horas, em um volume de 1000 a 1870 mL.

Eiseman em 1954 utilizou a água de coco filtrada em 21 pacientes por via endovenosa na Tailândia e em St. Louis, sem reações adversas, infundindo de 200 a 500 mL por um período de 25 a 180 minutos.

Campbell-falck *et al.* (2000), relataram que a água de coco filtrada foi infundida pela equipe do Dr. Rajasuriya em 26 pacientes ceiloneses e que entre 1965 e 1976, a mesma equipe realizou outros estudos infundindo em outros

pacientes com sucesso. Posteriormente a água de coco passou a ser estudada apenas para reidratação oral.

Em 1979, Kuberski *et al.* decidiram estudar a composição da água de coco, após a utilização desta, em uma epidemia de cólera em uma das ilhas da Nova Zelândia, como reidratante. Em 1980, Kuberski recomendou sua utilização como reidratante oral para regiões onde o coco era nativo, pela sua composição, baixo custo, ser estéril, não necessitar de preparo e apresentar sabor agradável ao paladar das crianças.

Bhattacharya (2000) constatou que na Índia as mães eram orientadas a oferecerem água de coco, solução de água e açúcar e chá para prevenção de desidratação em seus filhos.

Chavalittamrong *et al.* (1982), estudaram água de coco de diferentes espécies de coqueiros da Tailândia, fazendo comparação com refrigerantes com gás (Pepsi-cola[®], Coca-cola[®], Sprite[®], Seven-Up[®]) e refrigerantes sem gás (Bireley[®], Green-Spot[®]). Concluíram que na água de coco existia significativamente mais sódio, cloro, cálcio e magnésio, que nos refrigerantes estudados, e ainda, significativamente menos açúcar e calorias e menor osmolaridade e acidez.

Collares e Souza (1985), visando analisar preparações que pudessem apresentar condições de utilização como reidratantes orais, no tratamento e prevenção de desidratação por diarreia aguda, decidiram analisar a composição de açúcares, o pH, a osmolaridade e as concentrações de sódio, potássio e cloro de refrigerantes, chás e água de coco verde e maduro. Concluíram que os refrigerantes não têm valor como reidratantes para uso oral e que os chás, bem como a água de coco poderiam ter utilidade como fonte de potássio na fase de convalescença de diarreia.

Campbell-falck *et al.* em 2000, administraram água de coco jovem de cocos plantados na Ilha de Salomão, por via endovenosa em pacientes que necessitavam de reidratação. Não foi considerada a solução ideal, mas segundo os autores, em regiões distantes, sem recursos, onde o fruto é nativo e barato resulta na única alternativa terapêutica de reposição de perdas hidro-eletrolíticas. Não houve registro de efeitos adversos aos pacientes, mas recomendaram a utilização de pequenos volumes, por curto período de tempo e em situações de emergência para elevar o nível de eletrólitos que contêm em sua composição.

Pummer *et al.* (2001) investigaram a influência da água de coco na coagulação do plasma *in vitro*. Utilizou água de coco *versus* solução salina adicionada de soro do plasma de 8 voluntários, resultando em 39% e 32% respectivamente não sendo, porém estatisticamente significativa.

Saat *et al.* (2002) realizaram um estudo na Malásia, com um grupo de voluntários utilizando água, água de coco verde e bebida isotônica, para reidratação oral pós-exercício por duas horas. O estudo analisou a composição química da água, da água de coco, da bebida isotônica, sangue e urina dos voluntários. As amostras de sangue e urina foram colhidas a cada 30 minutos. Quando compararam os grupos, verificaram que a concentração plasmática de glicose foi significativamente mais alta nos grupos que ingeriram água de coco e bebida isotônica. A concentração de sódio, potássio, cloro e a osmolaridade no soro, não apresentou diferença entre os grupos. Verificaram também que por ser a água de coco significativamente mais doce, ter causado menos náuseas, não ter provocado indisposição estomacal e ter seu custo menor que a bebida isotônica, poderia ser usada como solução para hidratação oral após desidratação por exercício físico.

Petroianu *et al.* (2004) constataram que a água de coco verde é estéril e pode ser usada em regiões longínquas, durante conflito armado, por curto espaço de tempo, para hidratação venosa, porém não a recomendam para nutrição parenteral pelo risco de fácil contaminação.

A água de coco tem ampla utilização em áreas geográficas em que ocupa vasta extensão de plantação, não apenas na preparação de bebidas em consumo diário, pois faz parte de hábitos alimentares dessas populações, mas também para hidratação oral, como remédio caseiro tradicional para diarreia aguda.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) reconhecem a importância da composição química da água de coco para reidratação oral, principalmente nas regiões pobres existentes no mundo.

Campbell-Falck *et al.* (2000) recomendam o monitoramento de pacientes com comprometimento de funções cardíacas e renais e contra-indicam o uso da água de coco em pacientes com grande área do corpo queimada.

Mais recentemente a água de coco foi incluída em um protocolo de nutrição para pacientes de cirurgia bariátrica, sugerindo a ingestão em pequenos

goles, de um volume de 500mL durante o dia, o que garante que o consumo energético mínimo do paciente seja de 240 kcal/dia (CRUZ; MORIMOTO, 2004).

A revisão de literatura médica nas bases de dados da Medline e Lilacs, não identificou trabalho clínico ou experimental, que tenha avaliado a água de coco no processo de cicatrização de feridas. Portanto, a proposta foi ousar com a realização de um estudo experimental com este fim.

1.4 Relevância e Justificativa

A relevância de estudo experimental com este fruto deve ser considerada, por tratar-se de uma planta facilmente encontrada no litoral do país e que, o manuseio de sua água através de manipulação em farmácias do gênero, tornará seu custo acessível à população. Desta forma, poderá resultar em opções de tratamento, competindo com produtos existentes de alto custo, significando opção menos onerosa para instituições e pessoas conseguirem tratamento para cicatrização de suas feridas.

O Dersani[®] tem sido utilizado amplamente em instituições públicas e privadas em vários estados do país, tem registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para uso como dermoprotetor de ação profunda, em adultos e crianças. Mas, observou-se ao longo do tempo, de forma empírica utilizado clinicamente em hospitais, uma ação cicatrizante, quando usado em pacientes com úlceras de decúbito e em feridas limpas, mas sem comprovação científica. Acreditou-se que este estudo experimental também pudesse contribuir para esta finalidade.

Por fim, tentou-se aqui contribuir com um estudo que possa apresentar mais duas opções de tratamento de feridas, em um país onde existem milhares de pessoas que vivem abaixo da linha da pobreza. Onde a crescente onda de violência, em que ferir e matar tornou-se banal, bem como a ocorrência de acidentes de carros e motos, tanto na zona urbano como rural. Ainda considerando a superlotação das emergências, a falta de leitos, de recursos financeiros para equipar e adquirir mais medicamentos, para as instituições hospitalares, a deficiência de políticas públicas que contemple recursos de forma mais abrangente para a área de saúde.

Não se pretende aqui esgotar o assunto, porque certamente outros estudos surgirão até com propostas quem sabe mais simples do que o que aqui foi apresentado.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito do Dersani[®] e da água de coco liofilizada em solução aquosa e gel no modelo cutâneo de cicatrização por segunda intenção em ratos Wistar.

2.2 ESPECÍFICOS

- Mensurar o grau de reparação da lesão em cicatrização;
- Avaliar a presença de mastócitos no processo de hipersensibilidade;
- Mensurar a densidade do colágeno gerado durante o processo cicatricial;
- Verificar o efeito das substâncias estudadas sobre a angiogênese na cicatrização;
- Avaliar as diferenças na atividade cicatrizante do Dersani[®] e da água de coco liofilizada em solução aquosa e gel.

3 MÉTODO

3.1 Animais

Foram utilizados 105 ratos jovens (idade: 30-40 dias), machos (*Rattus norvegicus: var. albinus, Rodentia, Mammalia*), pesando de 106 a 171g, com peso corporal médio de 132,276 g, desvio padrão 12,908 g, da linhagem Wistar, procedentes do berçário do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, previamente observados quanto às condições gerais de saúde, recebendo ração e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos e mantidos em gaiolas individuais de polipropileno, com tampa de grade metálica de aço inoxidável (onde ficavam a ração e a água), sem serragem, para que a mesma não aderisse às feridas, alojados nas dependências do biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental (LABCEX), do Departamento de Cirurgia da mesma Universidade, onde o macro ambiente era semi-controlado, com refrigeração de 25°C, observando-se a alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. A iluminação, a intensidade de ruído e a umidade relativa do ar eram as do ambiente. Além da oferta de água e ração, as gaiolas (forradas com papel) foram higienizadas diariamente pelo técnico responsável e foram colocadas lado a lado em prateleiras de ferro.

Os ratos foram observados todo o período, quando a manutenção de saúde e aquisição de peso, até atingirem a idade de 30 a 40 dias, para serem submetidos ao procedimento cirúrgico, em ambiente refrigerado nas dependências do LABCEX.

Seguiu-se a norma da Nomenclatura Anatômica Veterinária (1983) e os Princípios Éticos de Experimentação Animal do *International Council for Laboratory Animal Science*, aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), da Universidade Federal do Ceará, protocolo no. 31/05 (Anexo A), em reunião realizada em 15/12/2005, que considerou o estudo de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 Substâncias estudadas

O material básico (água de coco liofilizada) foi encaminhado para a Farmácia de Manipulação (Magistral[®]) registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para manipulação nas formas Amorfa e Cristalina, nas apresentações em cápsula, que foi diluída em água destilada em que se tornava aquosa (Figura 06) e na forma Amorfa e Cristalina gel (Figura 07).

Na apresentação **solução Amorfa aquosa** cada cápsula de 1,0 g continha:

- 5 mg de sulfato de neomicina;
- 10 mg de xilocaína;
- 10 mg de estearato de magnésio (antiumectante);
- 975 mg de água de coco em pó amorfa.

Na apresentação **solução Cristalina aquosa** cada cápsula de 1,0 g continha:

- 5 mg de sulfato de neomicina;
- 10 mg de xilocaína;
- 10mg de estearato de magnésio (antiumectante);
- 975 mg de água de coco em pó cristalina.

A apresentação **água de coco Amorfa gel** continha em 10 g:

- 62,5% de princípio ativo = 6,25 g;
- 37,5% de excipiente = 3,75 g.

Em 6,25 g de princípio ativo continha:

- 6,09 de água de coco amorfa;
- 31,25 mg de sulfato de neomicina;
- 62,5 mg de xilocaína;
- 62,5 mg de estereato de magnésio.

A apresentação **água de coco Cristalina gel** continha em 10 g:

- 62,5% de princípio ativo = 6,25 g;
- 37,5% de excipiente = 3,75 g.

Em 6,25 g de princípio ativo continha:

- 6,09 de água de coco cristalina;
- 31,25 mg de sulfato de neomicina;
- 62,5 mg de xilocaína;
- 62,5 mg de estereato de magnésio.

A solução de água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa era obtida após diluição do conteúdo de três cápsulas em um mL de água destilada, em tubo de ensaio autoclavado e aplicada diretamente sobre a ferida, em cinco gotas, por contagota de vidro, lavado com água destilada e também autoclavado.



Figura 06 – Água de coco liofilizada Amorfa e Cristalina-aquosa.



Figura 07 – Água de coco liofilizada Amorfa e Cristalina-gel.

O Dersani[®] é um triglicerídeo de cadeia média contendo os ácidos caprílico, cáprico, capróico e láurico e o ácido linoléico que é um ácido graxo essencial, a lecitina de soja e as vitaminas A e E (Figura 08).



Figura 08 – Dersani[®] Triglicerídeo de cadeia média (ácidos caprílico, capríco, capróico e láurico), ácido graxo essencial (ácido linoléico), lecitina de soja e vitaminas A e E (Saniplan).

3.3 Desenho do estudo

O estudo foi constituído pelos grupos Controle, composto por 15 animais, Referência, com 15 animais e cinco grupos Testes (Amorfa e Cristalina-aquosa, com 15 animais, Amorfa e Cristalina-gel, com 15 animais e Dersani[®], também composto por 15 animais, sendo que, este último grupo a partir de agora ficará descrito apenas como Triglicerídeo). Salienta-se que os grupos Controle e Referência foram considerados para todos os grupos Testes, levando-se em conta o cuidado de utilização do menor número possível de animais, de acordo com orientação da Comissão de Ética em Pesquisa Animal.

Experimento 01 – Grupo Controle: somente limpeza com solução de 0,1361 g de NaCl a 0,9%;

Grupo Referência: limpeza com solução de NaCl a 0,9% e aplicação tópica de 0,5232 g de acetato de clostebol + sulfato de neomicina

Grupo Amorfa-aquosa: limpeza com solução de NaCl a 0,9% e aplicação tópica de 0,3691 g de água de coco na apresentação aquosa amorfa

Grupo Cristalina-aquosa: limpeza com solução de NaCl a 0,9% e aplicação tópica de 0,4735 g de água de coco na apresentação aquosa cristalina (Figura 03).

Experimento 02 – Grupo Controle: somente limpeza com solução de 0,1361 g de NaCl a 0,9%;

Grupo Referência: limpeza com solução de NaCl a 0,9% e aplicação tópica de 0,5232 g de acetato de clostebol + sulfato de neomicina

Grupo Amorfa-aquosa: limpeza com solução de NaCl a 0,9% e aplicação tópica de 0,7992 g de água de coco na apresentação amorfa gel

Grupo Cristalina-aquosa: limpeza com solução de NaCl a 0,9% e aplicação tópica de 0,7318 g de água de coco na apresentação cristalina gel (Figura 04).

Experimento 03 – Grupo Controle: somente limpeza com solução de 0,1361 g de NaCl a 0,9%;

Grupo Referência: limpeza com solução de NaCl a 0,9% e aplicação tópica de 0,5232 g de acetato de clostebol + sulfato de neomicina

Grupo Triglicérido: limpeza com solução de NaCl a 0,9% e aplicação tópica de 0,1435 g da composição de triglicérido de cadeia média (ácido caprílico, ácido cáprico, ácido capróico e ácido láurico) e ácido linoléico (ácido graxo essencial), lecitina de soja, vitaminas A e E (Figura 05).

Os grupos de 15 animais cada foram tratados de acordo com o esquema terapêutico acima estabelecido.

As quantidades das substâncias utilizadas foram pesadas em balança digital Sartorius BL 210 S (máx. 210 g, d = 0,1 mg).

Os animais foram observados quanto às condições de saúde, desde o momento em que foram recebidos do Biotério Central (recém nascidos) até o final de cada experimento.

3.4 Procedimento cirúrgico

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos foram confeccionados campos cirúrgicos fenestrados de tamanho pequeno e todo instrumental cirúrgico, as compressas de gaze, as espátulas de madeira foram esterilizados à autoclave. As seringas, agulhas, luvas e lâminas de bisturi foram de uso descartável e todas as técnicas de anti-sepsia e assepsia foram observadas durante os procedimentos de confecção da ferida e durante os tratamentos.

As intervenções foram realizadas no Laboratório de Cirurgia Experimental do Curso de Pós Graduação em Cirurgia do Departamento de Cirurgia e a análise histológica no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia, ambos da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará.

Todos os animais foram pesados no dia anterior ao procedimento para cálculo de anestésicos e no dia foram anestesiados por via intra-peritoneal com Cetamina (90 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg). Em seguida, foram imobilizados em decúbito ventral e, após a epilação do dorso com tricotomizador elétrico, em uma área de aproximadamente 16,0cm² (4,0cm X 4,0cm), realizou-se a demarcação da área na região do dorso-costalis do rato com caneta de tinta permanente de um quadrado de 2,0 x 2,0cm, utilizando-se um gabarito confeccionado de filme de celulose. Então, procedeu-se à incisão e retirada de um segmento cutâneo de espessura total do dorso do animal produzindo-se uma ferida quadrada aberta, medindo 2,0 x 2,0 cm, no centro da área epilada, até a exposição da fáscia muscular dorsal (Figura 09). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram numerados em suas caudas de acordo com seus respectivos grupos de tratamento e mantidos nas gaiolas individuais forradas com papel, observando-se suas condições de retorno pós-anestésico, a uma temperatura média de 25°C, com água e alimento *ad libitum*.

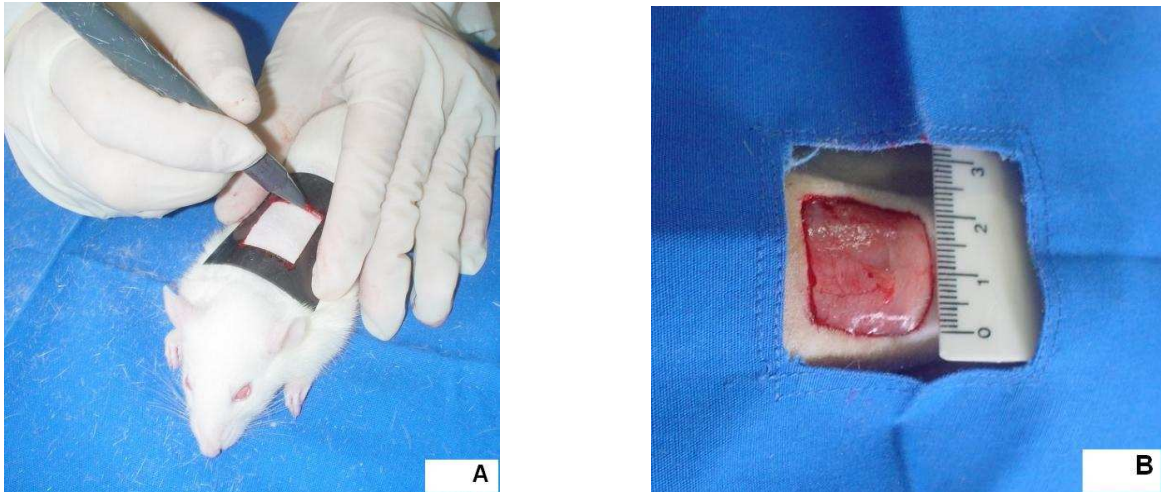


FIGURA 09 – Demarcação com molde de celulose (A) e ferida realizada (B).

3.5 Tratamento pós-procedimento cirúrgico

A partir do primeiro dia pós-procedimento cirúrgico realizou-se por uma vez diariamente a limpeza das feridas com solução salina isotônica, no grupo Controle, e com solução salina isotônica seguida nos grupos Testes, de aplicação tópica de uma camada das respectivas substâncias, suficiente para cobrir as áreas das feridas por completo.

As cápsulas de água de coco Amorfa e Cristalina eram abertas e o conteúdo de cada apresentação era diluído em água destilada, dentro de tubos de ensaio, ficando na formulação aquosa, para aplicação com conta gotas de vidro, sendo ambos utilizados individualmente e autoclavados diariamente.

A aplicação gel de água de coco Amorfa e Cristalina, bem como da formulação de acetato de clostebol + sulfato de neomicina creme, era igualmente realizada sobre a ferida utilizando-se espátulas individuais de madeira, também autoclavadas e descartadas após o uso.

A composição de Triglicerídeo era aplicada diretamente em cinco gotas, não necessitando de conta gota de vidro por sua embalagem original já dispor do mesmo (Figura 10).

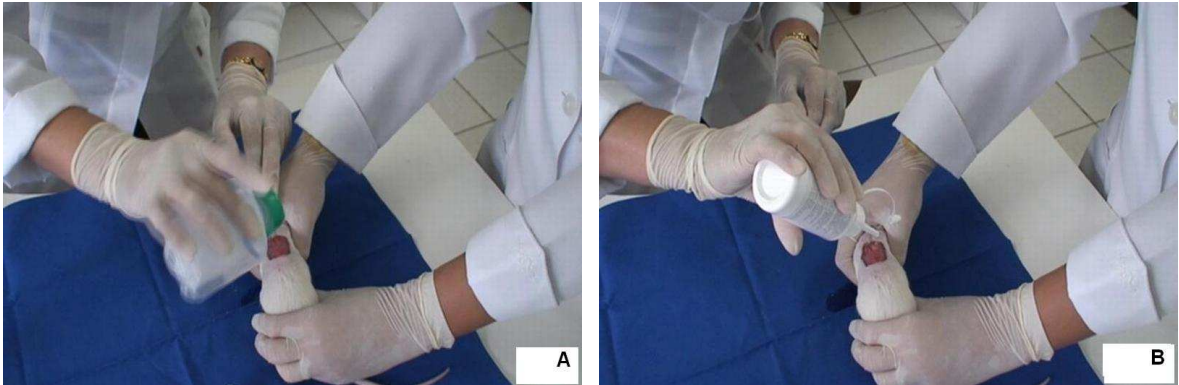


FIGURA 10 – Realização do tratamento com aplicação de soro (A) e posteriormente aplicação do composto teste (B).

3.6 Eutanásia

Os animais foram sacrificados no 12^o dias de pós-procedimento cirúrgico, por injeção intra-peritoneal em superdosagem de anestésico utilizada para o procedimento inicial.

Após o sacrifício, a ferida foi excisada com margem de 0,5 mm de pele íntegra em torno da lesão, em profundidade até a fáscia muscular, em condições assépticas, realizando-se corte mediano, tendo sido a peça fixada em formol a 10%.

3.7 Avaliação macroscópica

As imagens digitais das úlceras foram obtidas, *in vivo*, de forma padronizada, imediatamente após o procedimento cirúrgico (dia zero) e nos dias 3, 7 e 12 do pós-operatório. Para tanto, utilizou-se uma câmera de vídeo analógica (Hitachi VCC-151, Japan) acoplada a um microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcellos M90, D.F. Vasconcellos S.A., São Paulo, Brasil), cujo sinal era enviado a uma placa de captura de vídeo (PixelView PV-TV304P, Prolink Microsystems Corp., Taiwan) instalada num microcomputador. O eixo do microscópio foi fixado perpendicularmente ao plano horizontal, mantendo-se a sua objetiva a uma distância de 33 cm desse plano. Esta distância propiciava uma focalização ótima da úlcera, com uma magnificação de 6 vezes, quando o animal era posicionado em decúbito ventral, no plano horizontal, com o centro da úlcera coincidindo com o centro do campo microscópico (Figura 11). As imagens digitalizadas foram armazenadas no formato Windows Bitmap (BMP), com as dimensões de 320x240 *pixels*, cada *pixel*

correspondendo a 24 *bits*, de acordo com o modelo de cores RGB (*Red, Green, Blue*).



FIGURA 11 – Captura da imagem digital.

Um programa de computador foi desenvolvido especificamente para a mensuração da área da úlcera em imagens digitais. Para tanto, realizou-se inicialmente a delimitação das bordas da úlcera com o *mouse* (Figura 12). Em seguida, o *software* recortava automaticamente a região demarcada e calculava o valor da sua área (A) em mm^2 , conforme o fator de escala (relação número de *pixels/mm* referente à magnificação e a dimensão utilizadas) previamente determinado.

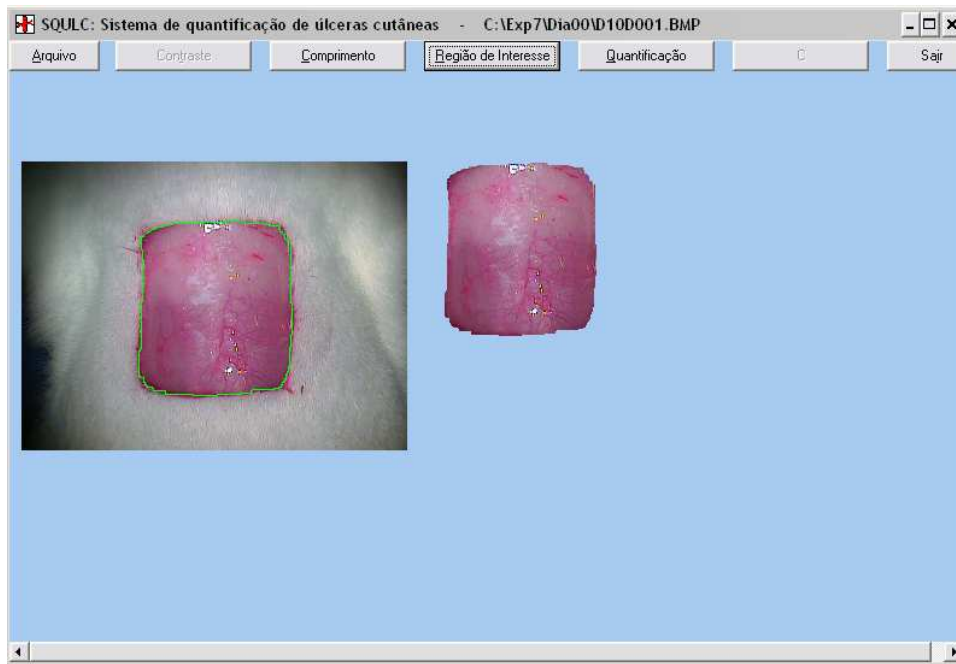


FIGURA 12 – Delimitação da área da úlcera.

Na seqüência, a região da úlcera era reinserida na imagem original, na cor azul, para que fosse possível avaliar se a delimitação havia sido realizada adequadamente (Figura 13).



FIGURA 13 – Quantificação da área da úlcera.

O grau de reparação das úlceras foi avaliado nos dias 3, 7 e 12, sendo calculado em função da área inicial (medida no dia zero) e expressa em termos percentuais, de acordo com a seguinte expressão (MARQUES *et al.* 2004; MARTINS *et al.* 2006).

$$GR_i = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \cdot 100$$

onde GR_i denota o grau de reparação referente ao dia i e A_0 e A_i correspondem à área da úlcera nos dias zero e i , respectivamente.

Calculou-se ainda a taxa média de reparação da úlcera (TRm), que denota quantos mm^2 a área da úlcera diminuiu num dado intervalo de tempo t_1 a t_2 , sendo expressa em mm^2/dia e definida pelo quociente:

$$TRm = -\frac{A(t_2) - A(t_1)}{t_2 - t_1}$$

onde $A(t_1)$ e $A(t_2)$ são as áreas da úlcera nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente, sendo $t_2 > t_1$.

A eficácia (E) de um dado tratamento foi calculada no dia 12, sendo definida em função do grupo Controle e expressa em termos percentuais conforme a seguinte expressão:

$$E = \frac{GR_{12}(T) - GR_{12}(C)}{GR_{12}(C)} \cdot 100$$

onde $GR_{12}(C)$ e $GR_{12}(T)$ correspondem à média do grau de reparação verificada no dia 12 nos grupos controle e tratados.

3.8 Estudo histológico

Todos os fragmentos das lesões cutâneas obtidas receberam corte mediano que foram fixados metade em formol tamponado a 10% (pH 7) por período mínimo de 24 horas. Após a fixação, os fragmentos foram desidratados gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), diafanizados em xilol, embebidos e incluídos em parafina, conforme métodos histológicos em que foram coradas. Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados utilizando-se micrótomo. Foram utilizados cortes de $5\mu\text{m}$ da região mediana da lesão para contagem da microcirculação em uma área de $1,0 \text{ cm}^2$. Os cortes histológicos foram mantidos em estufa para secagem, e posteriormente submetidos

à coloração por hematoxilina e eosina, pelo azul de toluidina (pH4 em concentração de 0,025% de acordo com a técnica de Lison) e pelo tricrômico de Masson, para análise histológica ao microscópio NIKON Alphaphot – 2 YS 2. Lente ocular 10x, lente objetiva 10x e 40x para contagem de células, sendo os dados histológicos transformados em escores e quantificados de acordo com o quadro de Myers (Quadro 1), em que se substituiu “abscesso” pela contagem de neutrófilos e acrescentou-se os itens de contagem de eosinófilos e neovascularização, por se julgar necessário neste estudo, a inclusão dos mesmos (MYERS *et al.* 1961).

Variáveis	0 ausente	+1 leve	+2 moderado	+3 marcante	+4 maciço	Fator	Total
Neutrófilos						-10	
Crosta						-1	
Inflamação aguda						-4	
Inflamação crônica						+2	
Regeneração epitelial						+5	
Fibroblastos						+5	
Tecido granulação						+5	
Colágeno						+10	
Eosinófilos						- 4	
Neovascularização						+5	
ESCORE TOTAL							

QUADRO 1 – Quadro para cálculo dos escores das feridas em cicatrização. As intensidades das variáveis (0 a 4) foram multiplicadas por fatores + ou - baseados na sua importância para a cicatrização. A soma destes produtos corresponde ao escore total para cada animal. Adaptada de Myers *et al.* (1961).

A análise dos preparados histológicos obtidos pela técnica H.E. foi classificada de acordo com a intensidade em que foi encontrado e transformados em variáveis quantitativas de acordo com a atribuição de índice para achado histológico, como demonstrado no quadro acima.

A intensidade dos achados de H.E. foi analisada de acordo com os critérios: neutrófilos, crosta, inflamação aguda, inflamação crônica, regeneração epitelial, fibroblastos, tecido de granulação, eosinófilos, com variáveis de: ausente, quando não eram visualizadas no campo óptico; leve, quando evidenciadas de forma isolada; moderada, quando apareciam em maior frequência e dispersas no campo óptico; marcante, quando apareciam com maior frequência, constituindo

agregados densos, mas possibilitando visualizar áreas livres de infiltrado; maciça, quando houve evidência com grande frequência, constituindo agregados densos e justapostos, sem áreas livres de infiltrados.

A quantificação de colágeno e neovascularização foram consideradas pelo *software*.

3.9 Aquisição e processamento das imagens histológicas

As imagens digitais das peças histológicas foram obtidas de forma padronizada mediante o uso de um microscópio óptico (Primo Star, Carl Zeiss MicroImaging Inc., Göttingen, Germany) equipado com uma câmera digital (PixeLINK Megapixel Firewire Câmera PL-A662, PixeLINK, Ottawa, Canada), cujo sinal era enviado a um microcomputador, onde estava instalado o sistema de captura de imagens (PixeLINK Capture, PixeLINK, Ottawa, Canada). Para evitar variações decorrentes do processo de captura das imagens, fixaram-se as configurações do *software* de aquisição, assim como a intensidade da iluminação. O campo estudado correspondeu à fronteira de crescimento de pele nova. As imagens digitais dessa região foram capturadas com uma magnificação de 100 vezes e armazenadas no formato Windows[®] Bitmap (BMP), com as dimensões de 640 x 480 *pixels*, cada *pixel* correspondendo a 24 *bits*, de acordo com o modelo de cores RGB (*Red, Green, Blue*).

As imagens foram analisadas pelo Sistema de Análise Morfométrica (SAMM), um programa de computador desenvolvido especificamente para tal finalidade (FECHINE-JAMACARU, 2006). Para a quantificação do colágeno e angiogênese, o sistema foi previamente calibrado para reconhecer o espectro de cores relativo às estruturas de interesse (fibras colágenas e vasos), de acordo com a técnica histológica empregada (trícromico de Masson). Este procedimento habilitava o *software* a identificar e segmentar automaticamente (separar as fibras de colágeno e de neovasos de interesse dos demais componentes do preparado) as estruturas histológicas de interesse (Figuras 14 e 15). Todavia, uma segmentação interativa era também disponibilizada, possibilitando, assim, que fosse possível definir novos parâmetros de segmentação, caso o pesquisador julgasse como inadequado o resultado do procedimento automático. Concluída a segmentação, o *software* realizava a quantificação de cada estrutura de interesse em toda a imagem. Para

tanto, determinava a densidade de área, que era definida pelo quociente entre a área ocupada pela estrutura de interesse e a área total do campo estudado, sendo expressa em termos percentuais (Figuras 16 e 17).

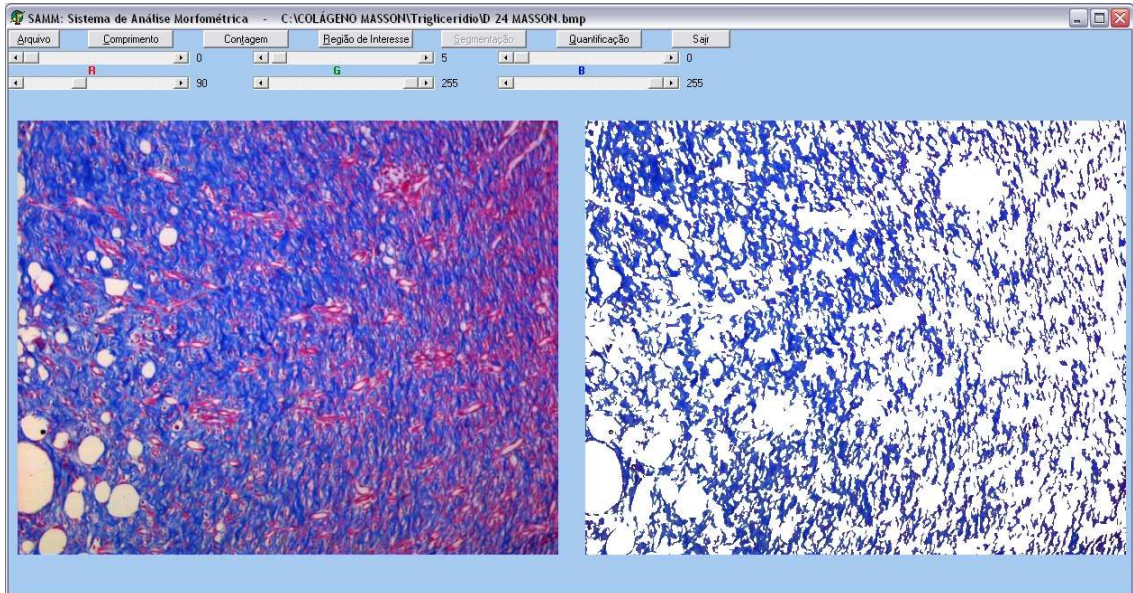


FIGURA 14 – Delimitação da densidade de colágeno.

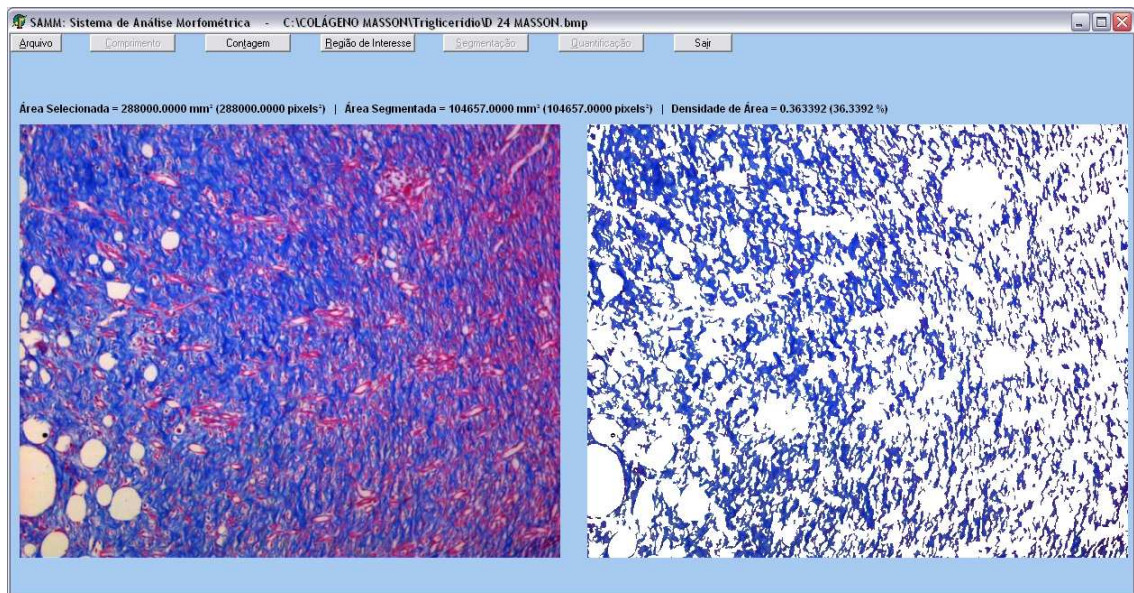


FIGURA 15 – Quantificação da densidade de colágeno.

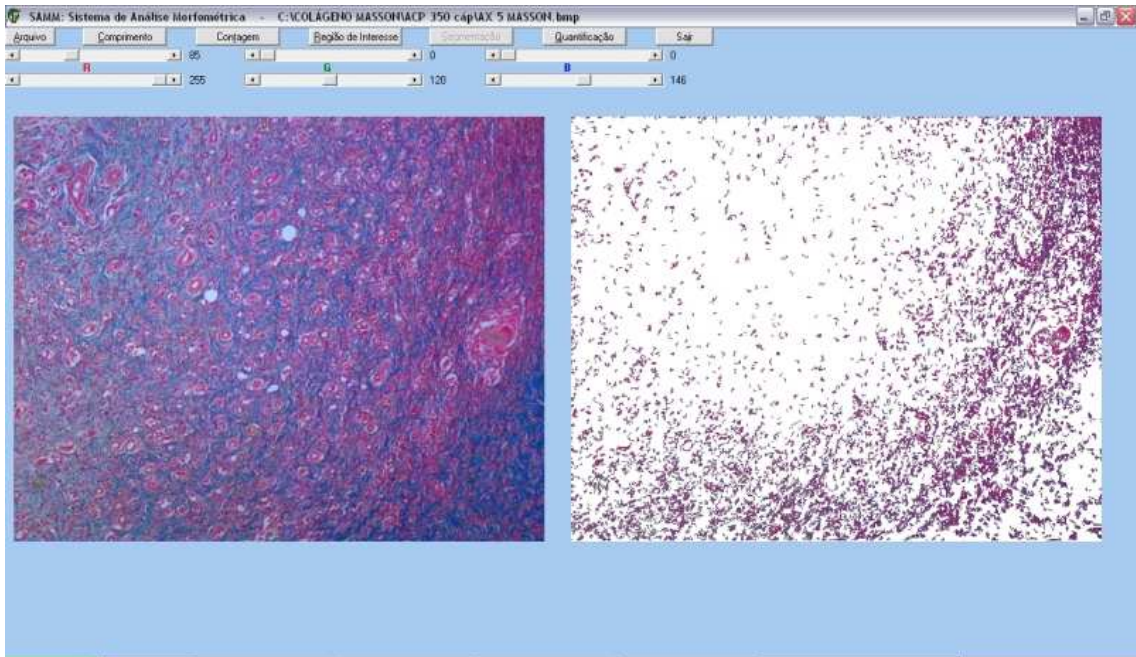


FIGURA 16 – Delimitação da densidade de angiogênese.

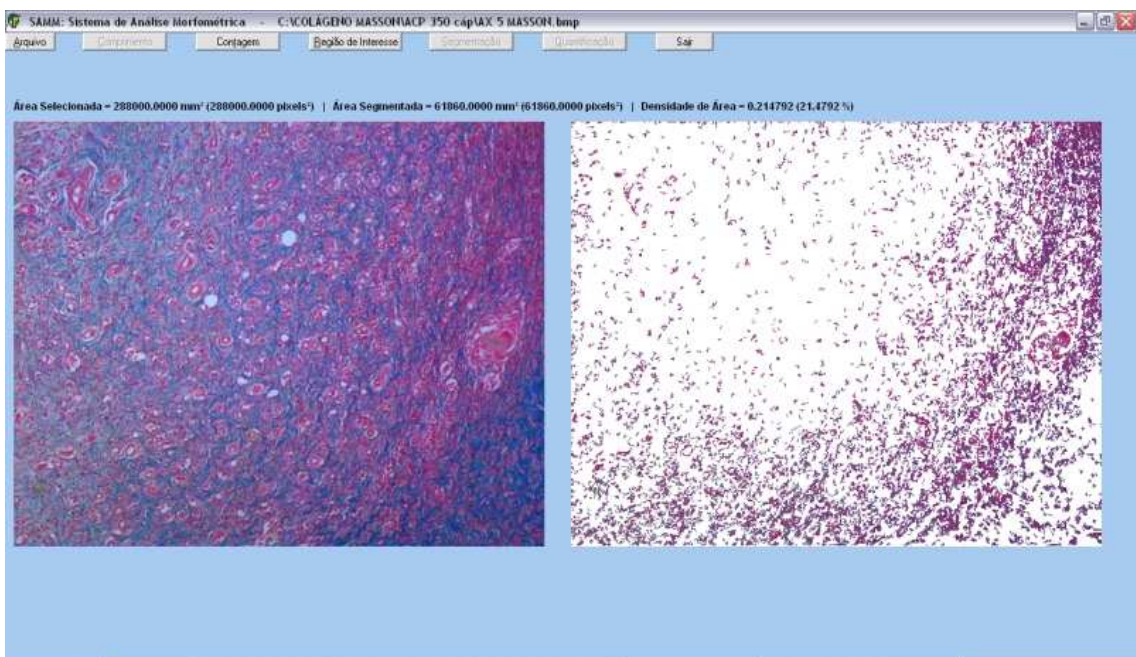


FIGURA 17 – Quantificação da densidade de angiogênese.

A quantificação dos mastócitos com a técnica histológica de azul de toluidina envolveu o uso da ferramenta para contagem digital. Assim, identificaram-se os pontos metacromáticos, onde clicou-se com o *mouse* correspondendo a cada mastócito que eram então marcados automaticamente pelo *software* para evitar contagem repetida. Ao final do processo, o sistema determinava o número total de mastócitos existentes no campo estudado (Figuras 18 e 19).

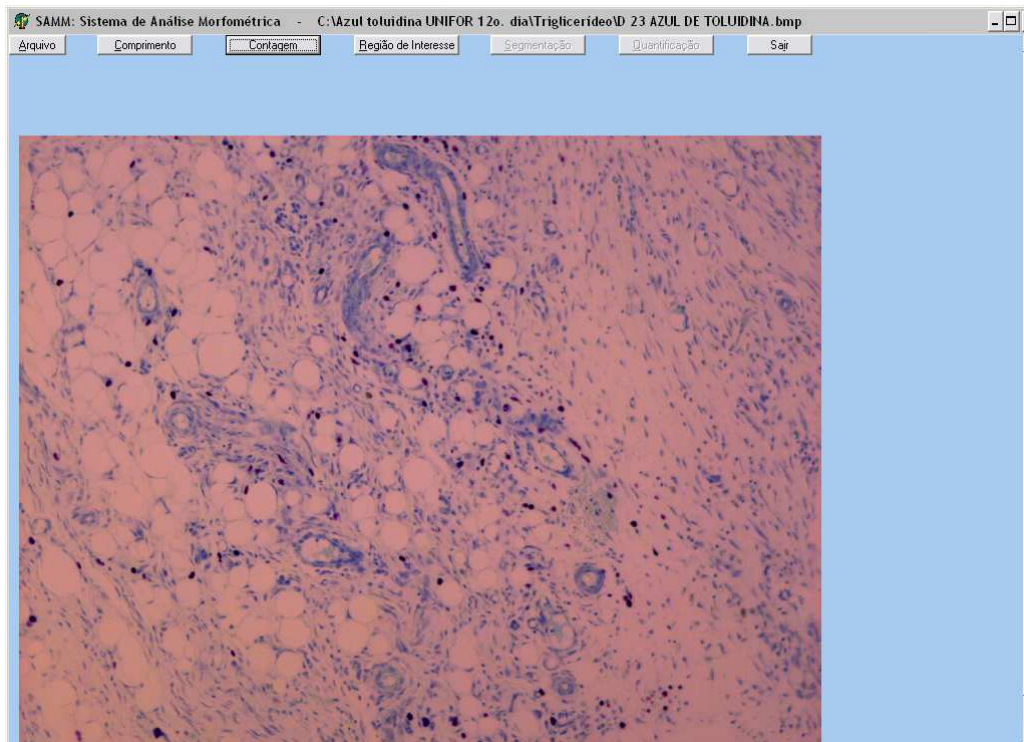


FIGURA 18 – Visualização de mastócitos.

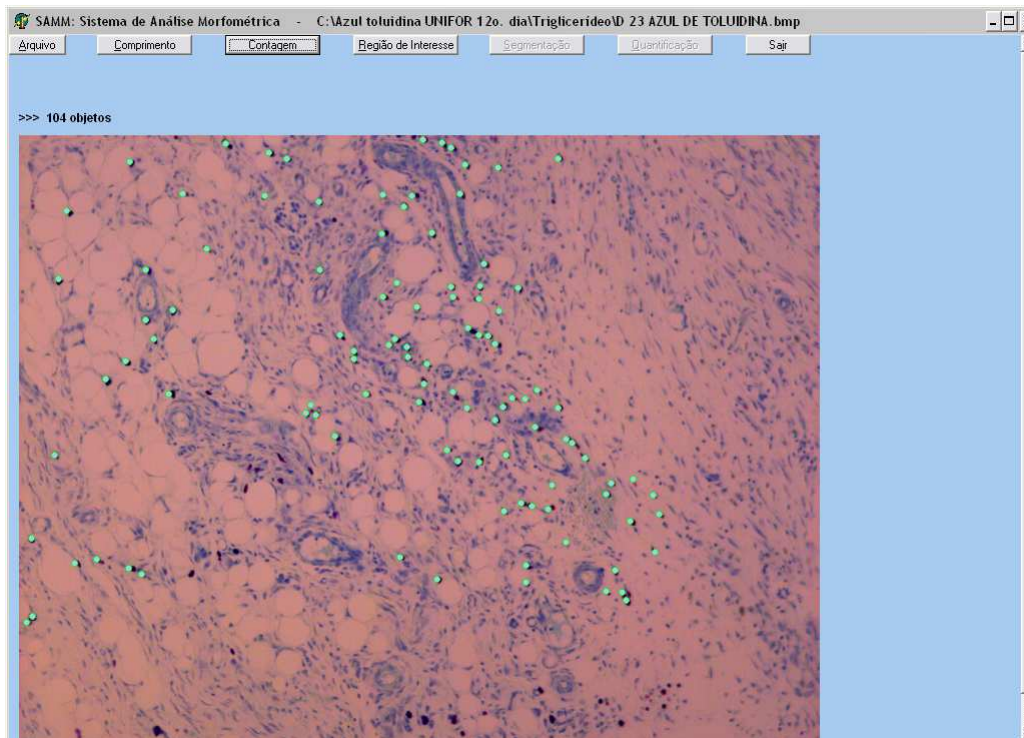


FIGURA 19– Quantificação de mastócitos.

3.10 Análise estatística

As variáveis quantitativas, contínuas e discretas, foram, inicialmente, analisadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição. Considerando que a normalidade foi observada para todas as variáveis, então, para a estatística descritiva, calcularam-se a média e desvio padrão, como também, para a análise dos dados, empregaram-se testes paramétricos. A homogeneidade da variância ou homocedasticidade, por sua vez, foi verificada pelo teste de Bartlett. Comparações entre os grupos de tratamento foram realizadas mediante o uso da análise de variância (ANOVA) baseada em um fator (*one-way analysis of variance*), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois (ARMITAGE, BERRY, 1994; MOTULSKY, 1995).

Para as variáveis ordinais, a estatística descritiva envolveu a determinação da mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo, representados graficamente como *box and whiskers plot*. Para comparar os diversos grupos de tratamento, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de comparações múltiplas de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois (ARMITAGE, BERRY, 1994; MOTULSKY, 1995).

Em todas as análises, estabeleceu-se em 0,05 (5%) a probabilidade α do erro tipo I (nível de significância), considerando como estatisticamente significativo um valor P bicaudal menor 0,05.

O software GraphPad Prism[®] versão 5.00 para Windows[®] (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação macroscópica

A progressão temporal do ponto de vista macroscópico, sob avaliação da reparação tecidual observou-se que, nos primeiros dias houve uma expansão da área ulcerada do grupo Referência com presença de fibrina, que também está presente nos grupos Amorfa e Cristalina-gel, nestes com leve retração (Figura 18).

Os grupos Controle, Amorfa-aquosa retraíram e a Cristalina-aquosa apresentou um pouco mais de retração (Figura 20) bem como o grupo Triglicerídeo (Figura 21).

As feridas dos grupos Amorfa e Cristalina-aquosa permaneceram úmidas e com início de crosta e de tecido de granulação. O grupo Controle teve maior retração.

Do 3^o ao 7^o dia no grupo Referência observou-se ainda a presença de fibrina, o Controle iniciou formação de crosta e Amorfa e Cristalina-gel permaneceram úmidas e com tecido de granulação, com crosta no grupo Cristalina-gel. O grupo Triglicerídeo permaneceu úmido e com tecido de granulação.

No intervalo do 7^o ao 12^o dia a reparação foi mais evidenciada nos grupos Controle e Amorfa e Cristalina-aquosa, com presença de tecido de granulação, com menor tamanho nos grupos Amorfa e Cristalina-aquosa, enquanto o grupo Referência continuou com presença de fibrina, e área ainda aumentada em relação aos demais.

Os grupos Amorfa e Cristalina-gel apresentaram presença de fibrina. A reparação foi mais evidenciada nos grupos Controle e Triglicerídeo com presença de crosta (Figura 22).

A evidência macroscópica de maior reparação só foi observada do 7^o ao 12^o dia, quando ocorreu a queda da crosta dos grupos Controle, Amorfa-aquosa (Figura 20) e também dos grupos Amorfa e Cristalina-gel (Figura 21), enquanto o Referência continuou com presença de fibrina e área maior que os demais.

No 12^o dia embora não tenha sido constatada a reparação completa das feridas em nenhum dos grupos, observou-se que as menores úlceras estavam presentes nos grupos Amorfa e Cristalina-aquosa (Figura 20) e no grupo Amorfa gel (Figura 21) e também no grupo Triglicerídeo (Figura 22).



FIGURA 20 – Aspecto da úlcera nos dias 0, 3, 7 e 12 de tratamento nos grupos Controle, Referência e Amorfa aquosa e Cristalina aquosa. Magnificação de 6 vezes.



FIGURA 21 – Aspecto da úlcera nos dias 0, 3, 7 e 12 de tratamento nos grupos Controle, Referência e Amorfa gel e Cristalina gel. Magnificação de 6 vezes.

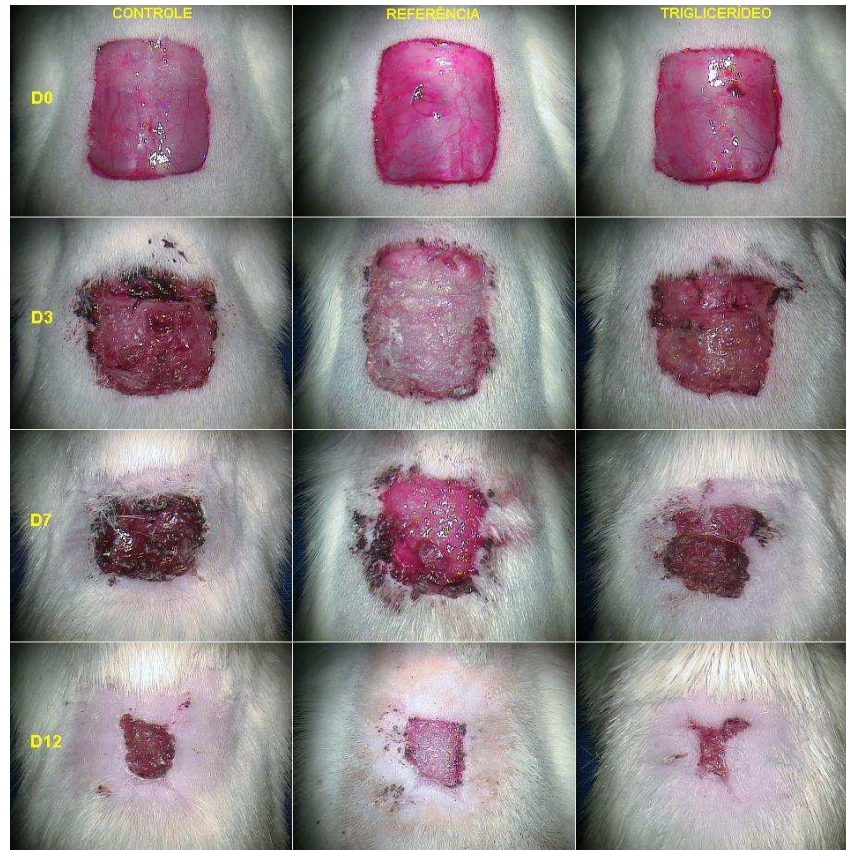


Figura 22 – Aspecto da úlcera nos dias 0, 3, 7 e 12 de tratamento nos grupos Controle, Referência e Triglicéridos. Magnificação de 6 vezes.

No experimento Amorfa e Cristalina aquosa a evolução temporal do processo de cicatrização segundo a variável grau de reparação (*GR*) é ilustrada na Figura 23. No 3^o dia constatou-se diferença significativa $P < 0,05$: Cristalina-aquosa ($20,4 \pm 6,83\%$) maior que Controle ($10,3 \pm 6,97\%$) e Amorfa-aquosa ($9,38 \pm 6,97\%$). Contrariamente, no grupo Referência, houve um aumento da área ulcerada, denotado pelo valor negativo de *GR* ($-11,31 \pm 9,22\%$) que foi significativamente menor ($P < 0,001$) que os observados nos grupos Controle, Amorfa e Cristalina-aquosa.

No 7^o dia, o aumento abrupto dos valores de *GR* nos quatro grupos (Controle: $48,66 \pm 5,90\%$; Cristalina-aquosa: $49,18 \pm 9,77\%$); Amorfa-aquosa ($36,89 \pm 13,79$), com diferença significativa $P < 0,05$; Referência: ($30,18 \pm 16,20\%$) que evidencia importante redução das úlceras. Porém, os valores de *GR* referentes aos grupos Referência ($P < 0,001$) permaneceram ainda significante menores que os relativos aos grupos Controle e Cristalina-aquosa.

No 12^o dia, no entanto, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativa entre os grupos. De fato, observou-se discreta diminuição da inclinação da curva de *GR* nos grupos Controle ($77,95 \pm 10,71\%$), Amorfa-aquosa ($82,24 \pm 6,23\%$) e Cristalina-aquosa ($84,12 \pm 8,80\%$), indicando que, em relação ao dia 7, a área da úlcera regrediu com menor intensidade.

Contrariamente no grupo Amorfa-aquosa ($82,24 \pm 6,23\%$) observou-se leve aumento da inclinação da curva de *GR* significando maior intensidade de regressão da úlcera. Por outro lado, no grupo Referência, o processo de reparação das úlceras evoluiu com a mesma intensidade ($78,40 \pm 11,57\%$), como mostra o comportamento linear de *GR* no período entre os dias 3 e 12.

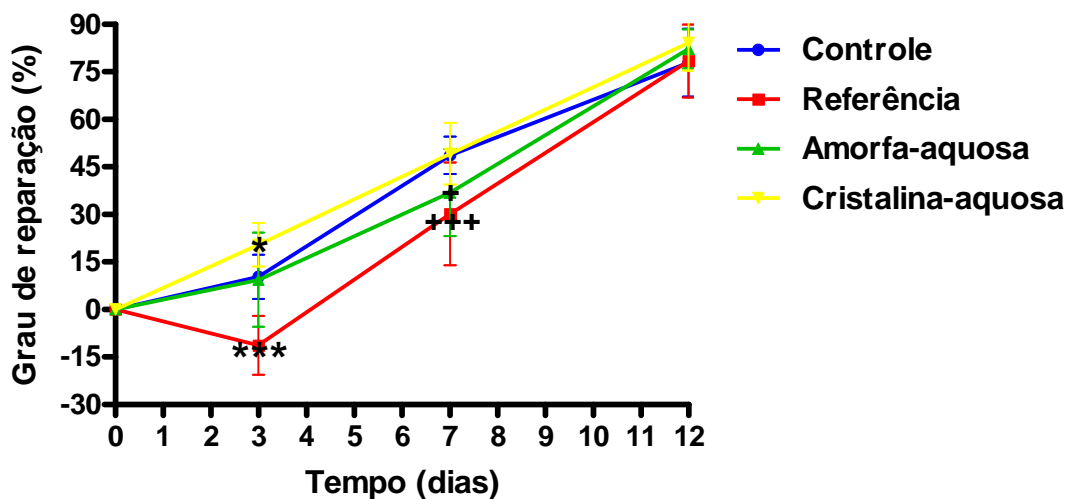


FIGURA 23 – Evolução temporal do grau de reparação das feridas (*GR*) nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 15 animais de cada grupo. A análise de variância foi usada para comparar os diversos grupos num mesmo dia, associada ao teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. *** $P < 0,001$: Referência menor que Controle, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa; * $P < 0,05$: Cristalina-aquosa maior que Controle e Amorfa-aquosa; +++ $P < 0,001$: Referência menor que Controle e Cristalina-aquosa; + $P < 0,05$: Amorfa-aquosa menor que Controle e Cristalina-aquosa (teste de Tukey).

A cinética do processo de reparo das úlceras pode ser melhor compreendida pela análise da variável taxa média de reparação (*TRm*), que representa a velocidade média de fechamento da úlcera (Figura 24). No período entre os dias 0 e 3, em decorrência da expansão da área ulcerada, a *TRm* relativa ao grupo Referência foi negativa ($-14,7 \pm 12,59 \text{ mm}^2/\text{dia}$) e significativamente menor ($P < 0,001$) que a referente aos grupos Controle ($13,72 \pm 9,58 \text{ mm}^2/\text{dia}$), Amorfa-aquosa ($12,0 \pm 19,13 \text{ mm}^2/\text{dia}$) e Cristalina aquosa ($27,06 \pm 9,49 \text{ mm}^2/\text{dia}$) que foi significativamente maior ($P < 0,05$) que os grupos Controle e Amorfa-aquosa.

No intervalo entre os dias 3 e 7, a *TRm* do grupo Referência aumentou de forma marcante ($40,61 \pm 17,52$ mm²/dia) alcançando valores maiores que o grupo Controle ($38,10 \pm 8,68$ mm²/dia). Por outro lado Amorfa-aquosa ($26,67 \pm 9,26$ mm²/dia) menor que Controle ($38,10 \pm 8,68$ mm²/dia), $P < 0,05$. Enquanto Cristalina-aquosa ($28,46 \pm 6,87$ mm²/dia) foi menor que Referência.

No período entre os dias 7 e 12, houve uma importante desaceleração do reparo das úlceras no grupo Controle ($23,18 \pm 8,04$ mm²/dia) que foi significativamente menor que Referência ($37,37 \pm 6,15$ mm²/dia) e Amorfa-aquosa ($35,00 \pm 7,86$ mm²/dia), $P < 0,001$. No grupo Cristalina-aquosa ($27,94 \pm 9,28$ mm²/dia) a *TRm* permaneceu praticamente constante, porém significativamente menor que Referência, $P < 0,01$. Contrariamente observou-se no grupo Amorfa-aquosa um aumento da *TRm* denotando uma maior velocidade de fechamento da úlcera.

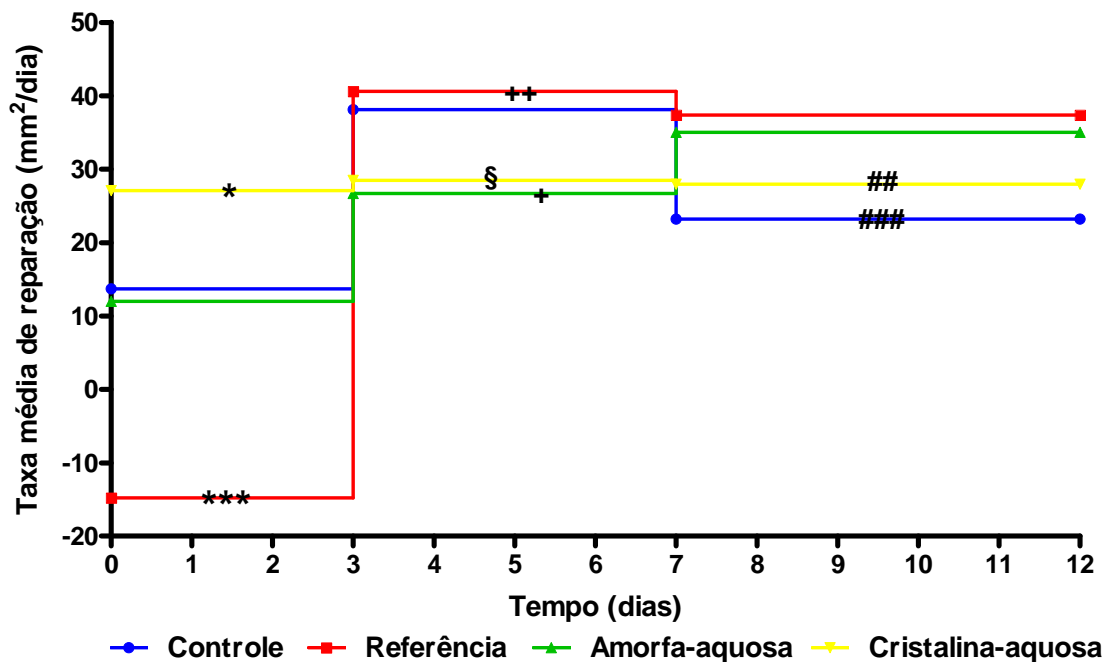


FIGURA 24 – Taxa média de reparação das feridas (*TRm*) mensurada nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa, referente aos intervalos entre os dias 0 e 3, 3 e 7, 7 e 12. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 15 animais de cada grupo. A análise de variância foi usada para comparar os diversos grupos num dado intervalo, complementada pelo teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. *** $P < 0,001$: Referência menor que Controle, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa; * $P < 0,05$: Cristalina-aquosa maior que Controle e Amorfa-aquosa; ++ $P < 0,01$: Referência > Amorfa-aquosa; + $P < 0,05$: Amorfa-aquosa < Controle; § $P < 0,05$: Cristalina-aquosa < Referência; ### $P < 0,001$: Controle menor que Referência e Amorfa-aquosa; ## $P < 0,01$: Cristalina-aquosa < Referência (teste de Tukey).

Analizando a *TRm* global referente ao período entre os dias 0 e 12 (Figura 25) verificaram-se valores semelhantes nos quatro grupos, não sendo constatadas

diferenças estatisticamente significantes, embora com discreto aumento para Cristalina-aquosa ($27,89 \pm 3,54 \text{ mm}^2/\text{dia}$) em relação aos grupos Controle ($25,79 \pm 3,78 \text{ mm}^2/\text{dia}$), Referência ($25,42 \pm 4,76 \text{ mm}^2/\text{dia}$).

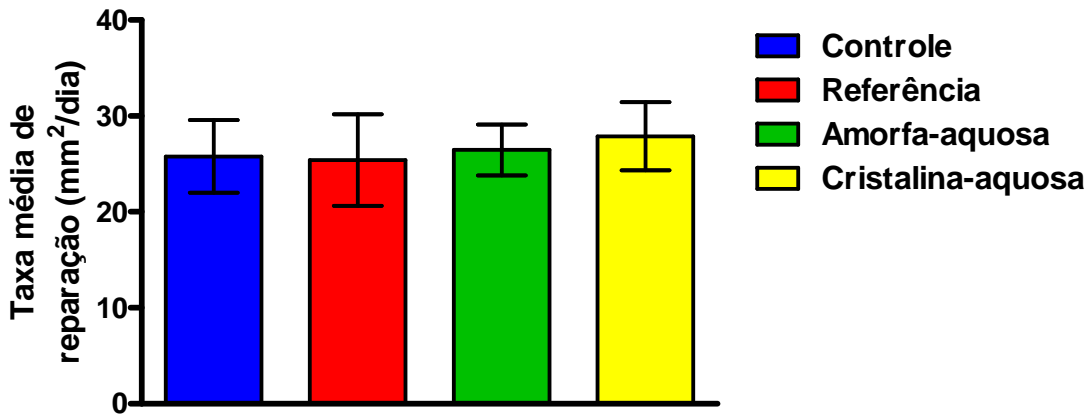


FIGURA 25 – Taxa média de reparação das feridas (TRm) mensurada nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa, referente ao intervalo entre os dias 0 e 12. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 15 animais de cada grupo. A análise de variância foi usada para comparar os diversos grupos, complementada pelo teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (ANOVA: $F = 1,2650$; $P = 0,2953$).

A eficácia dos tratamentos foi calculada em função do controle e tomou-se como base a média de GR referente ao dia 12. No grupo Referência foi igual a 0,5775%, enquanto no grupo Amorfa-aquosa foi 5,4987% e no grupo Cristalina-aquosa foi 7,9104%. Esses percentuais mostram que o efeito dos tratamentos Amorfa e Cristalina-aquosa foi ligeiramente superior ao grupo Referência (Figura 26).

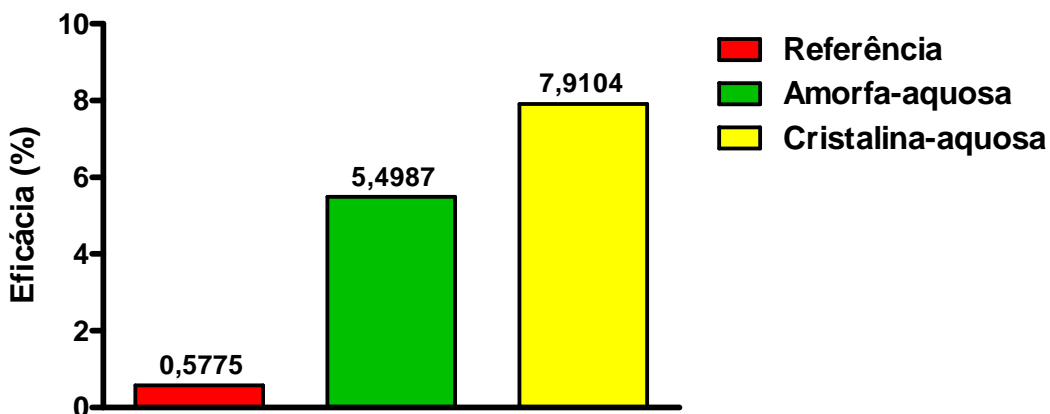


FIGURA 26 – Eficácia do tratamento com solução aquosa de água de coco amorfa (Amorfa-aquosa) e cristalina (Cristalina-aquosa) calculada em função do Controle no 12º dia.

No experimento Amorfa e Cristalina-aquosa a evolução temporal do processo de cicatrização segundo a variável grau de reparação (*GR*) é mostrada na Figura 27.

No 3^o dia constatou-se uma pequena diminuição da área da úlcera, em relação aos valores iniciais nos grupos Controle ($10,32 \pm 6,97\%$), Amorfa-gel ($2,01 \pm 11,59\%$) e Cristalina-gel ($6,65 \pm 9,30\%$). Ao contrário, no grupo Referência, houve um aumento da área ulcerada, com valor negativo de *GR* ($-11,31 \pm 9,22\%$) que foi significativamente menor ($P < 0,001$) que os observados nos grupos Controle e Testes (Amorfa e Cristalina-gel) e $P < 0,01$ em relação a Amorfa-gel.

No 7^o dia houve aumento abrupto dos valores de *GR* nos quatro grupos (Controle: $48,66 \pm 5,90\%$; Referência: $30,18 \pm 16,21\%$; Amorfa-gel: $43,67 \pm 11,93\%$ e Cristalina-gel: $42,78 \pm 10,25\%$) evidenciando uma importante redução das áreas das úlceras. Mas, o valor de *GR* referente ao grupo Referência ainda permaneceu menor ($P < 0,001$) em relação ao controle e $P < 0,05$ em relação a Amorfa e Cristalina-gel.

No 12^o dia observou-se uma diminuição da inclinação da curva de *GR* nos grupos Amorfa-gel ($85,09 \pm 8,64\%$) e Cristalina-gel ($84,20 \pm 5,94\%$), seguidos dos grupos Controle ($77,95 \pm 10,71\%$) e Referência ($78,40 \pm 11,57\%$), mostrando que as áreas das úlceras regrediram com maior intensidade, mas não constatou-se diferenças estatisticamente significantes.

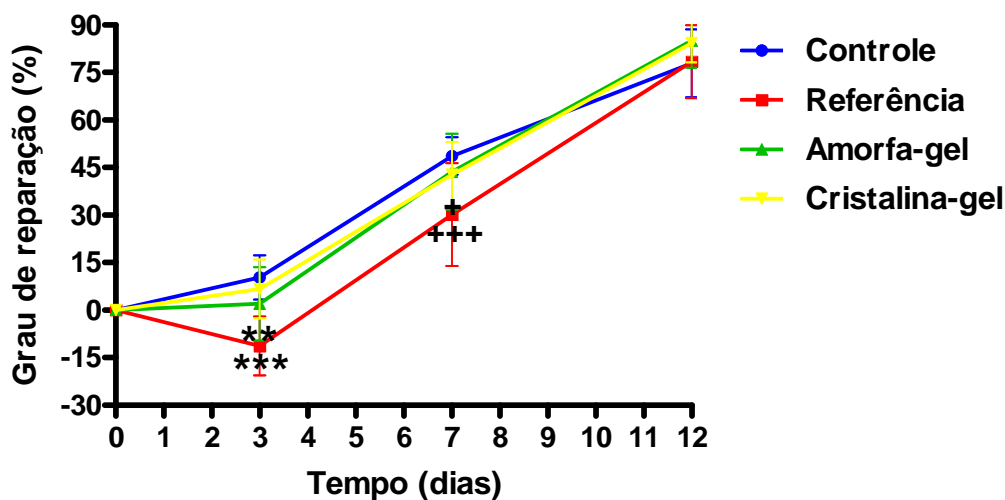


FIGURA 27 – Evolução temporal do grau de reparação das feridas (*GR*) nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 15 animais de cada grupo. A análise de variância foi usada para comparar os diversos grupos num mesmo dia, associada ao teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a

dois. *** $P < 0,001$: Referência menor que Controle e Cristalina-gel; ** $P < 0,01$: Referência < Amorfa-gel; +++ $P < 0,001$: Referência < Controle; + $P < 0,05$: Referência menor que Amorfa-gel e Cristalina-gel (teste de Tukey).

A cinética do processo de reparo das úlceras que pode ser melhor compreendida pela análise da variável da taxa média de reparação (*TRm*) que representa a velocidade média de fechamento da úlcera (Figura 28).

No período entre os dias 0 e 3 devido a expansão da área ulcerada, a *TRm* relativa ao grupo Referência foi negativa ($-14,77 \pm 12,59$ mm²/dia) e significativamente menor ($P < 0,001$) que a referente aos grupos Controle ($13,72 \pm 9,57$ mm²/dia) e Cristalina-gel; Amorfa-gel ($2,02 \pm 13,69$ mm²/dia) e Cristalina-gel ($8,94 \pm 12,52$ mm²/dia) forma menor que Controle ($13,72 \pm 9,57$ mm²/dia).

No intervalo dos dias 3 e 7, porém, a *TRm* do grupo Referência aumentou de forma marcante ($40,61 \pm 17,52$ mm²/dia), superando os valores observados nos grupos Amorfa-gel ($39,04 \pm 15,52$ mm²/dia); Controle ($38,10 \pm 8,68$ mm²/dia) e Cristalina-gel ($34,54 \pm 9,55$ mm²/dia), mas não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes. Esse foi o intervalo em que os quatro grupos atingiram os valores máximos de *TRm*, caracterizando a fase de maior intensidade do processo de reparo.

Entre os dias 7 e 12 houve uma desaceleração do grupo Controle ($23,18 \pm 8,04$ mm²/dia) no reparo das úlceras, enquanto os grupos Amorfa-gel ($31,09 \pm 8,95$ mm²/dia), sendo ($P < 0,05$) maior que Controle; Cristalina-gel ($31,89 \pm 5,22$ mm²/dia) sendo ($P < 0,01$) maior que Controle e o grupo Referência ($37,37 \pm 6,15$ mm²/dia) sendo ($P < 0,001$) maior que Controle. Nesse intervalo de dias houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Controle.

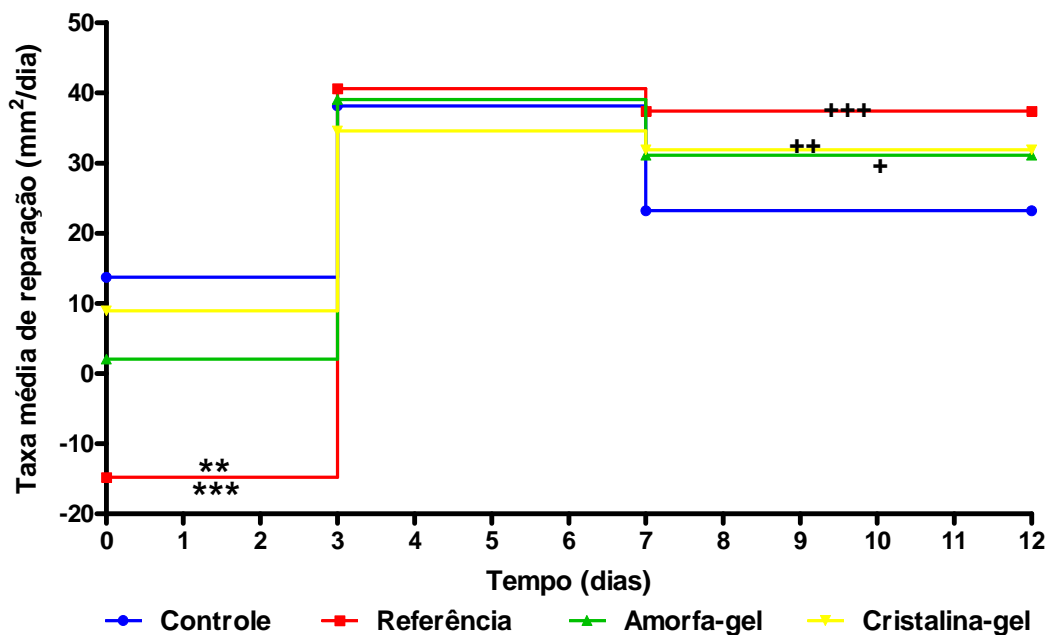


FIGURA 28 – Taxa média de reparação das feridas (*TRm*) mensurada nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel, referente aos intervalos entre os dias 0 e 3, 3 e 7, 7 e 12. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 15 animais de cada grupo. A análise de variância foi usada para comparar os diversos grupos num dado intervalo, complementada pelo teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. * $P < 0,001$: Referência menor que Controle e Cristalina-gel; ** $P < 0,01$: Referência < Amorfa-gel; +++ $P < 0,001$: Referência > Controle; ++ $P < 0,01$: Cristalina-gel > Controle; + $P < 0,05$: Amorfa-gel > Controle (teste de Tukey).**

A *TRm* por intervalos revelou diferenças importantes entre os grupos, mas a *TRm* global, ou seja, aquela referente ao período entre os dias 0 e 12 (Figura 29) foi semelhante nos quatro grupos: Controle ($25,79 \pm 3,78$ mm²/dia), Referência ($25,42 \pm 4,76$ mm²/dia), Amorfa-gel ($26,47 \pm 3,61$ mm²/dia) e Cristalina-gel ($27,04 \pm 2,93$ mm²/dia), portanto não constatou diferenças estatisticamente significantes.

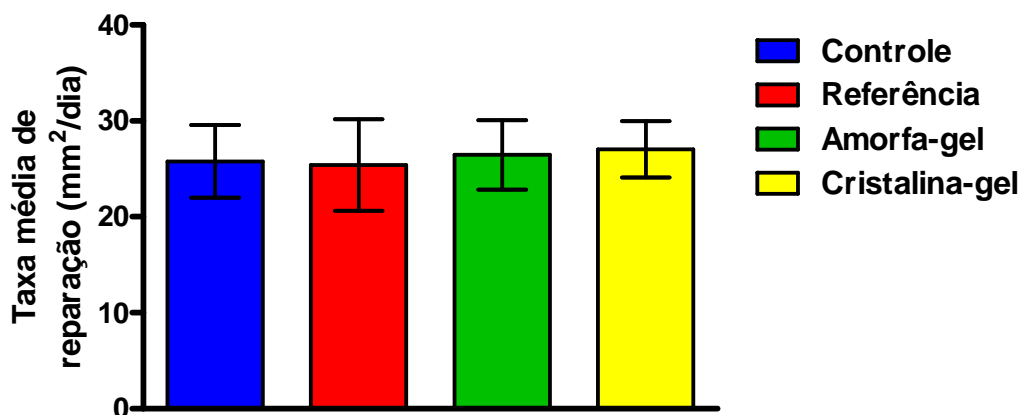


FIGURA 29 – Taxa média de reparação das feridas (*TRm*) mensurada nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel, referente ao intervalo entre os dias 0 e 12. Dados expressos

como média e desvio padrão das medições efetuadas em 15 animais de cada grupo. A análise de variância foi usada para comparar os diversos grupos, complementada pelo teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (ANOVA: $F = 0,5309$; $P = 0,6629$).

A eficácia dos tratamentos, calculada em função do Controle, tomando-se como base a média de *GR* referente ao 12^o dia (Figura 30). No grupo Referência foi igual a 0,5775%, enquanto no grupo Amorfa-gel foi 9,1539% e no grupo Cristalina-gel foi 8,0184%. Esses percentuais no efeito dos tratamentos denotam ligeira superioridade dos tratamentos testes (Amorfa e Cristalina-gel).

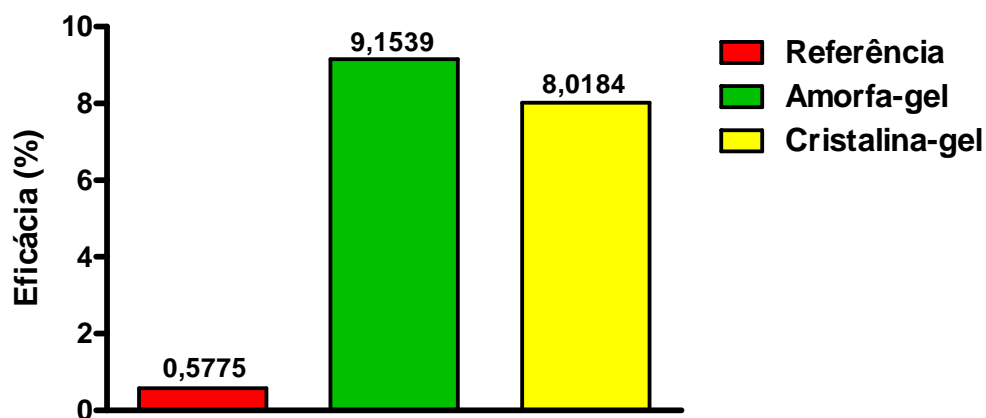


FIGURA 30 – Eficácia do tratamento com gel de água de coco amorfa (Amorfa-gel) e cristalina (Cristalina-gel) calculada em função do Controle no 12^o dia.

No experimento Triglicerídeo a evolução temporal do processo de cicatrização segundo a variável grau de reparação (*GR*) ilustrada na Figura 31.

No 3^o dia, constatou-se uma pequena diminuição da área da úlcera, em relação aos valores iniciais, nos grupos Controle ($10,2 \pm 6,97\%$) e Triglicerídeo ($8,45 \pm 6,20\%$). Contrariamente, no grupo Referência, houve um aumento da área ulcerada, denotado pelo valor negativo de *GR* ($-11,31 \pm 9,22\%$), que foi significativamente menor ($P < 0,001$) que os observados nos grupos Controle e Triglicerídeo.

No 7^o dia, o aumento abrupto dos valores de *GR* nos três grupos (Controle: $48,66 \pm 5,90\%$; Referência: $30,18 \pm 16,21\%$; Triglicerídeo: $53,06 \pm 7,81\%$) evidencia uma importante redução da área das úlceras. Todavia, o valor de *GR* referente ao grupo Referência permaneceu ainda significativamente menor ($P < 0,001$) que os relativos aos grupos Controle e Triglicerídeo.

No 12^o dia, no entanto, não foram constatadas diferenças estatisticamente significante entre os grupos. De fato, observou-se uma diminuição da inclinação da curva de *GR* nos grupos Controle ($77,95 \pm 10,71\%$) e Triglicerídeo ($83,49 \pm 3,50\%$), indicando que, em relação ao dia 7, a área da úlcera regrediu com menor intensidade. Por outro lado, no grupo Referência, o processo de reparação das úlceras evoluiu com a mesma intensidade ($78,40 \pm 11,57\%$), conforme mostra o comportamento linear de *GR* no período entre os dias 3 e 12.

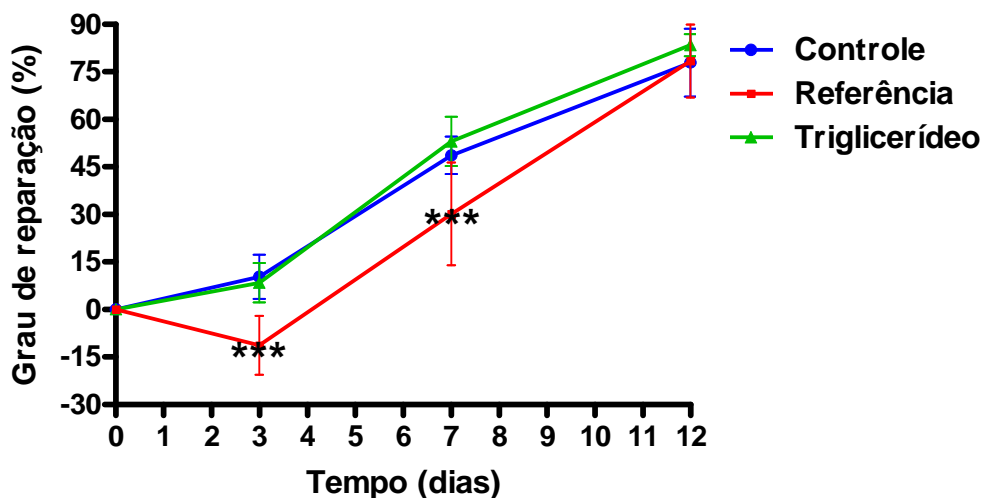


FIGURA 31 – Evolução temporal do grau de reparação das feridas (*GR*) nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 15 animais de cada grupo. A análise de variância foi usada para comparar os diversos grupos num mesmo dia, associada ao teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. *** $P < 0,001$: Referência menor que Controle e Triglicerídeo (teste de Tukey).

A cinética do processo de reparação das úlceras pode ser melhor compreendida pela análise da variável taxa média de reparação (*TRm*), que representa a velocidade média de fechamento da úlcera (Figura 32).

No período entre os dias 0 e 3, em decorrência da expansão da área ulcerada, a *TRm* relativa ao grupo Referência foi negativa ($-14,77 \pm 12,59 \text{ mm}^2/\text{dia}$) e significativamente menor ($P < 0,001$) que a referente aos grupos Controle ($13,72 \pm 9,57 \text{ mm}^2/\text{dia}$) e Triglicerídeo ($11,33 \pm 8,29 \text{ mm}^2/\text{dia}$).

No intervalo entre os dias 3 e 7, todavia, a *TRm* do grupo Referência aumentou de forma marcante ($40,61 \pm 17,52 \text{ mm}^2/\text{dia}$), alcançando valores similares aos observados nos grupos Controle ($38,10 \pm 8,68 \text{ mm}^2/\text{dia}$) e Triglicerídeo ($43,86 \pm 6,89 \text{ mm}^2/\text{dia}$), de modo que não foram verificadas diferenças estatisticamente

significantes. Nesse intervalo, nos três grupos, a *TRm* atingiu os seus valores máximos, caracterizando a fase de maior intensidade do processo de reparação.

No período entre os dias 7 e 12, por outro lado, verificou-se uma desaceleração da reparação das úlceras nos grupos Controle ($23,18 \pm 8,04 \text{ mm}^2/\text{dia}$) e Triglicerídeo ($23,83 \pm 4,38 \text{ mm}^2/\text{dia}$), denotada pela diminuição nos valores da *TRm*. Contrariamente, no grupo Referência, a *TRm* manteve-se praticamente constante ($37,37 \pm 6,15 \text{ mm}^2/\text{dia}$), de modo que foi significativamente maior que a dos demais grupos ($P < 0,001$).

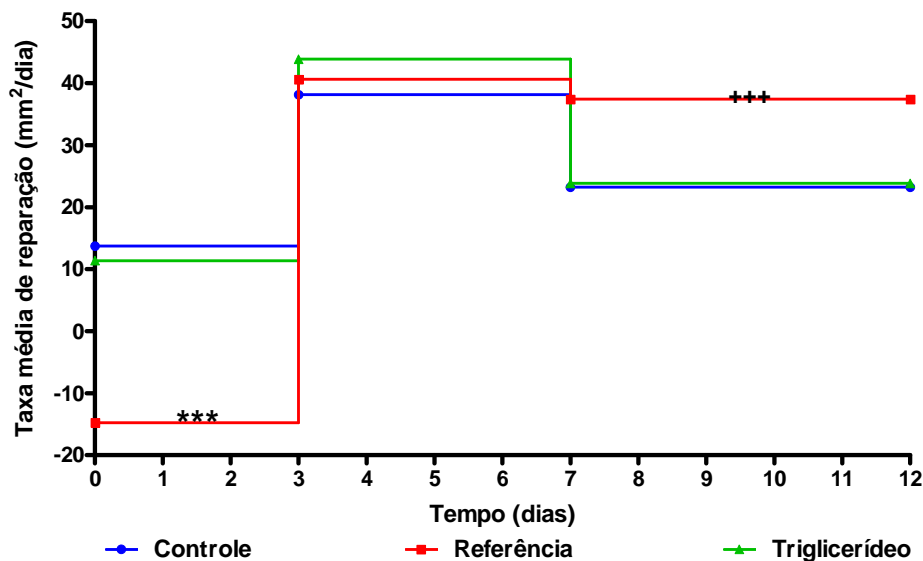


FIGURA 32 – Taxa média de reparação das feridas (*TRm*) mensurada nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo, referente aos intervalos entre os dias 0 e 3, 3 e 7, 7 e 12. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 15 animais de cada grupo. A análise de variância foi usada para comparar os diversos grupos num dado intervalo, complementada pelo teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. * $P < 0,001$: Referência menor que Controle e Triglicerídeo; +++ $P < 0,001$: Referência maior que Controle e Triglicerídeo (teste de Tukey).**

Embora a *TRm* por intervalos tenha revelado diferenças entre os grupos, a *TRm* global, ou seja, aquela referente ao período entre os dias 0 e 12 (Figura 33), foi semelhante nos três grupos: Controle ($25,79 \pm 3,78 \text{ mm}^2/\text{dia}$), Referência ($25,42 \pm 4,76 \text{ mm}^2/\text{dia}$), Triglicerídeo ($27,38 \pm 1,95 \text{ mm}^2/\text{dia}$). Dessa forma, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (Figura 33).

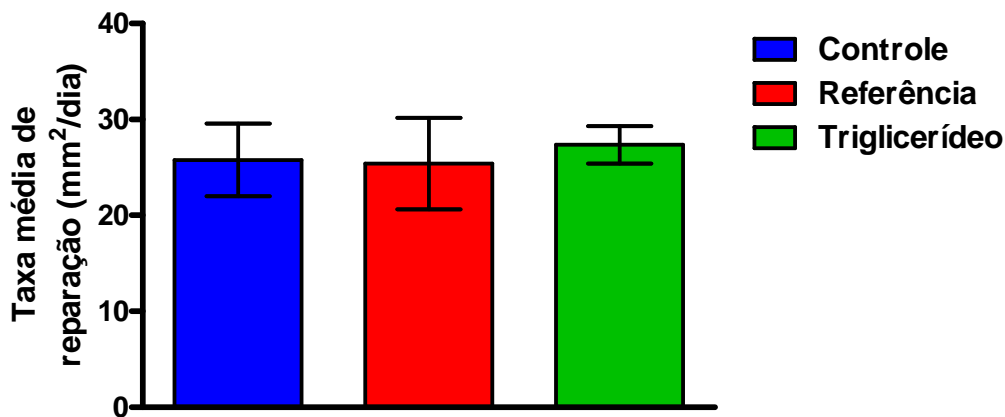


FIGURA 33 – Taxa média de reparação das feridas (*TRm*) mensurada nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo, referente ao intervalo entre os dias 0 e 12. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 15 animais de cada grupo. A análise de variância foi usada para comparar os diversos grupos, complementada pelo teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (ANOVA: $F = 1,1980$; $P = 0,3119$).

A eficácia dos tratamentos foi calculada em função do controle, tomando-se como base a média de *GR* referente ao dia 12 (Figura 34). No grupo Referência foi igual a 0,5775%, enquanto no grupo Triglicerídeo foi 7,0977%. Tais percentuais denotam que o efeito dos tratamentos foi semelhante ao do controle, embora com uma ligeira superioridade do tratamento em teste.

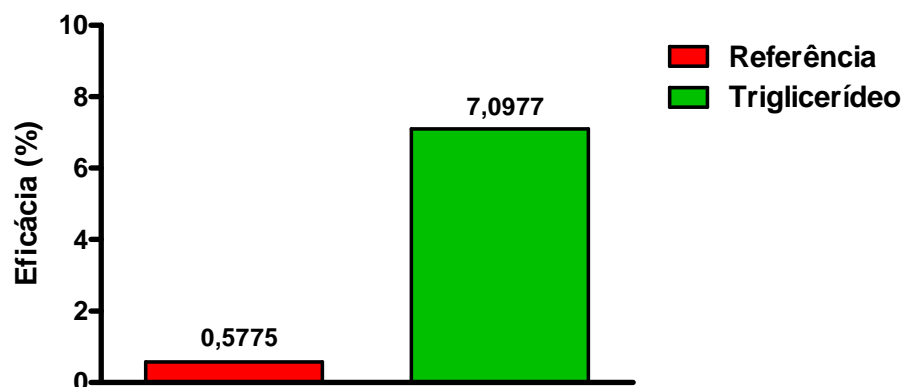


FIGURA 34 – Eficácia do tratamento com a associação de triglicerídeo de cadeia média, ácido linoléico, lecitina de soja e vitaminas A e E calculada em função do Controle no 12^o dia.

4.2 Avaliação microscópica

Os cortes histológicos para contagem de **mastócitos** deste estudo foram corados pelo azul de toluidina e quantificados em software específico. Os resultados estatisticamente não significantes (Figuras 35, 36 e 37) mostraram que os

tratamentos com água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa, Amorfa e Cristalina-gel e Triglicerídeo, aqui realizados, não induziram hipersensibilidade nos três experimentos.

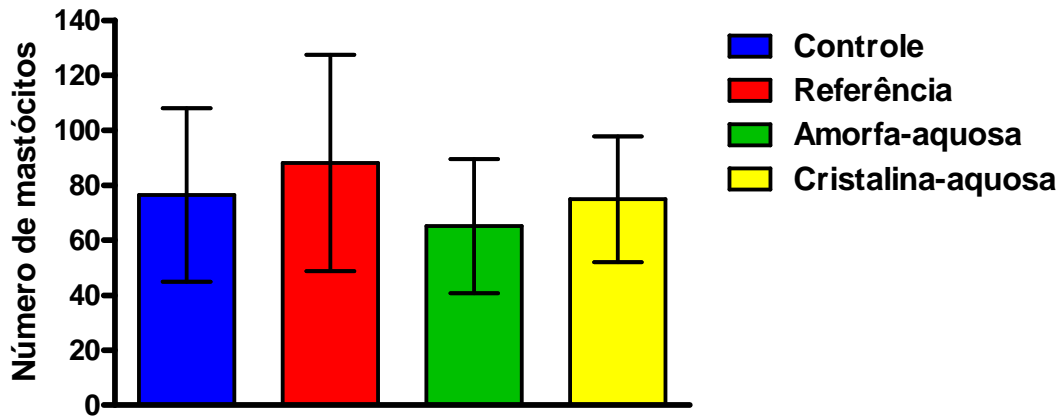


FIGURA 35 – Número de mastócitos mensurado nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa no 12^o dia do experimento. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso da análise de variância, associada ao teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (ANOVA: $F = 1,1560$; $P = 0,3372$).

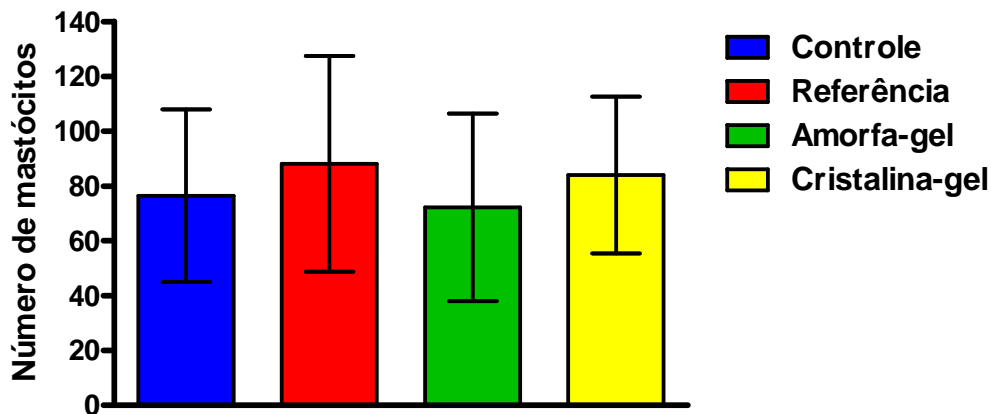


FIGURA 36 – Número de mastócitos mensurado nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel no 12^o dia do experimento. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso da análise de variância, associada ao teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (ANOVA: $F = 0,5417$; $P = 0,6563$).

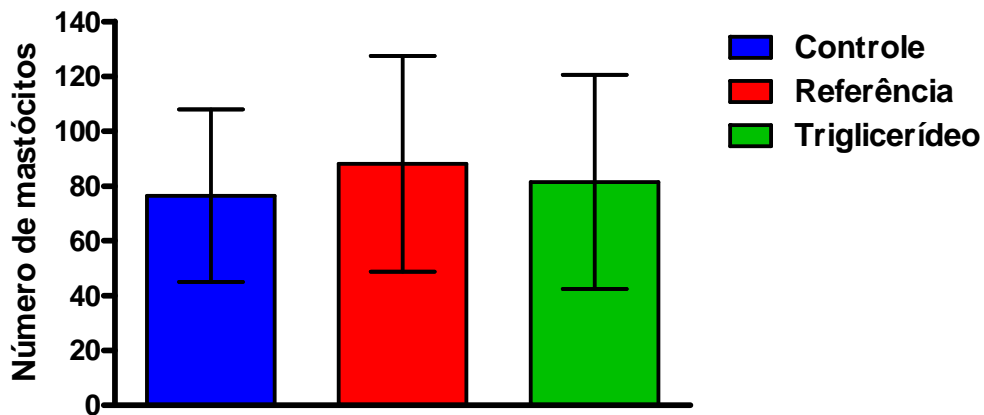


FIGURA 37 – Número de mastócitos mensurado nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo no 12^o dia do experimento. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 preparados histológicos dos grupos Controle e Referência e 8 preparados histológicos do grupo Triglicerídeo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso da análise de variância, associada ao teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (ANOVA: $F = 0,3034$; $P = 0,7406$).

Na quantificação de **colágeno** deste estudo, o experimento com água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa apresentou diferença estatisticamente significativa para Amorfa-aquosa (Figura 38) em relação ao Controle ($P < 0,001$).

No experimento com água de coco Amorfa e Cristalina-gel houve diferença estatisticamente significativa para os dois tratamentos (Figura 39) em relação ao Controle ($P < 0,05$).

No experimento com Triglicerídeo houve diferença estatisticamente significativa (Figura 40) em relação ao Controle ($P < 0,01$).

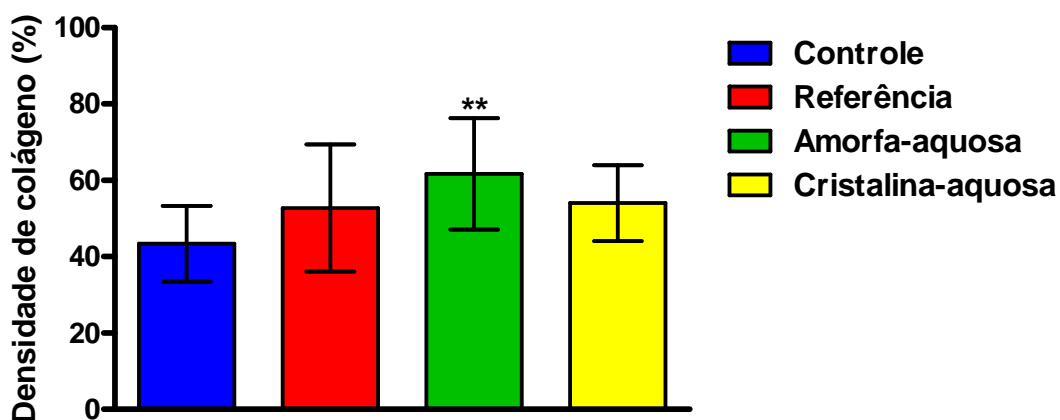


FIGURA 38 – Quantificação de colágeno nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso da análise de variância, associada ao teste de

Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. ** P < 0,01: Amorfa-aquosa > Controle (teste de Tukey).

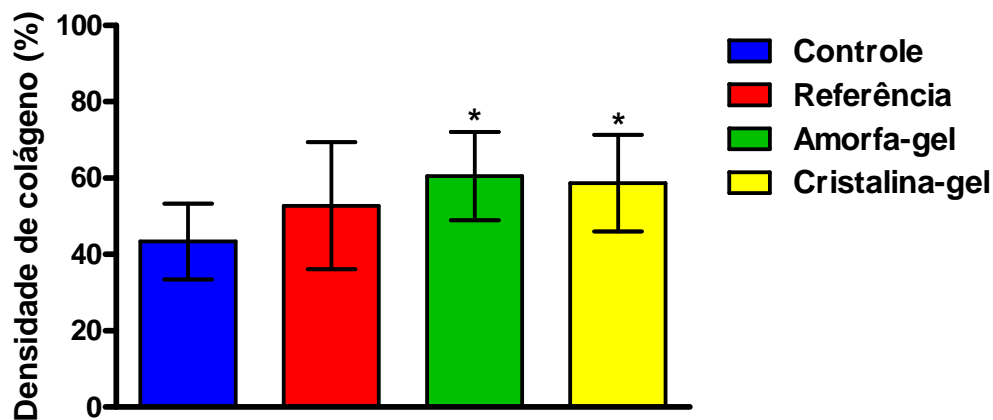


FIGURA 39 – Quantificação de colágeno nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso da análise de variância, associada ao teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. * P < 0,05: Controle menor que Amorfa-gel e Cristalina-gel (teste de Tukey).

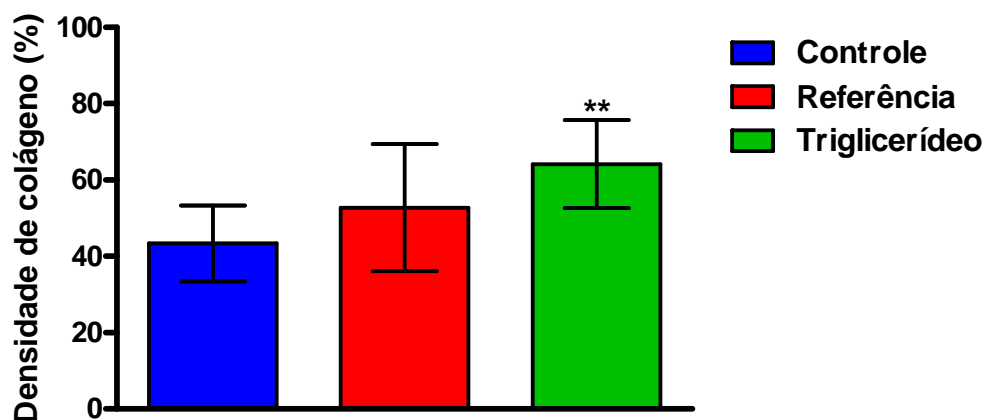


FIGURA 40 – Quantificação de colágeno nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 preparados histológicos dos grupos Controle e Referência e 8 preparados histológicos do grupo Triglicerídeo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso da análise de variância, associada ao teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. ** P < 0,01: Triglicerídeo > Controle (teste de Tukey).

A mensuração da **densidade vascular** realizada com os cortes histológicos corados pelo tricrômico de Masson e quantificados por *software* específico, para os três experimentos, no 12^o dia de tratamento (Figuras 41, 42 e 43), mostrou diferença estatisticamente significativa somente no grupo tratado com Triglicerídeo (Figura 40) com P<0,01.

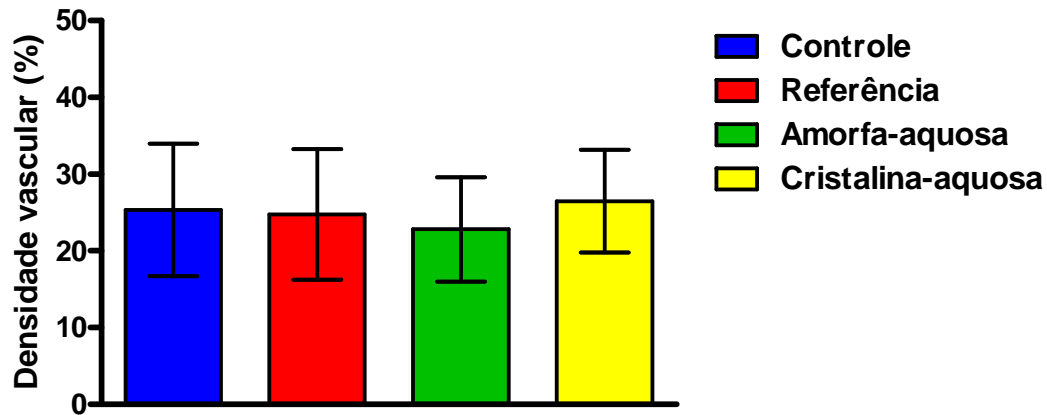


FIGURA 41 – Densidade vascular mensurada nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa no 12^o dia do experimento. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso da análise de variância, associada ao teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (ANOVA: $F = 0,4768$; $P = 0,7001$).

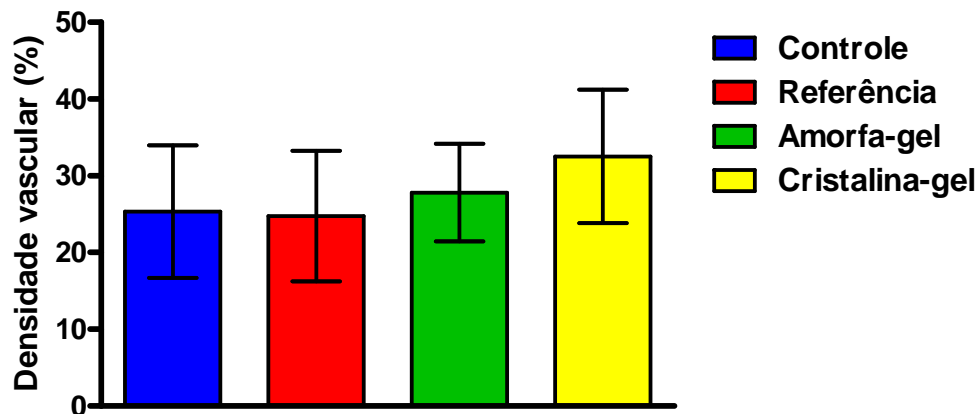


FIGURA 42 – Densidade vascular mensurada nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel no 12^o dia do experimento. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso da análise de variância, associada ao teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (ANOVA: $F = 2,2820$; $P = 0,0923$).

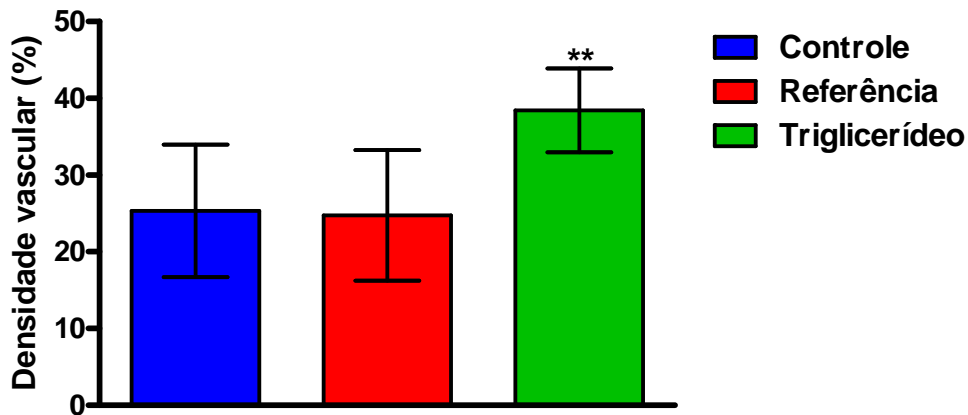


FIGURA 43 – Densidade vascular mensurada nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo no 12^o dia do experimento. Dados expressos como média e desvio padrão das medições efetuadas em 12 preparados histológicos dos grupos Controle e Referência e 8 preparados histológicos do grupo Triglicerídeo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso da análise de variância, associada ao teste de Tukey, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. ** P < 0,01: Triglicerídeo maior que Controle e Referência (teste de Tukey).

A avaliação no 12^o dia de tratamento realizada para contagem de células, com quantificação histológica de **grau de cicatrização**, (Figuras 44, 45, 46) **neutrófilos**, **crosta**, **inflamação aguda e crônica**, **regeneração epitelial**, **fibroblastos**, **tecido de granulação**, **colágeno**, **eosinófilos** e **neovascularização** foi realizada através de escores do quadro de Myers (1961).

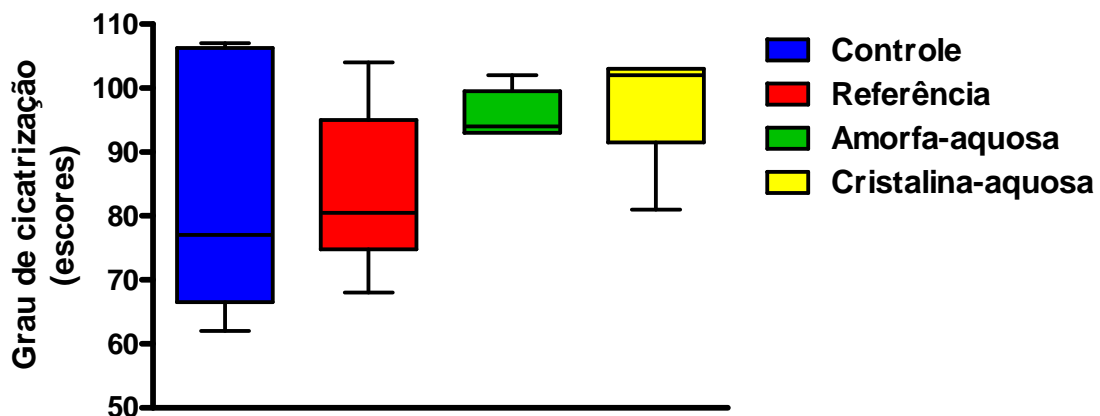


FIGURA 44 – Avaliação do grau de cicatrização nos grupos Controle, Referência, Amórfa-aquosa e Cristalina-aquosa no 12^o dia do experimento, de acordo com o método histológico de Myers. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos dos grupos Controle e Referência e 5 preparados histológicos dos grupos Amórfa-aquosa e Cristalina-aquosa. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (P = 0,2913).

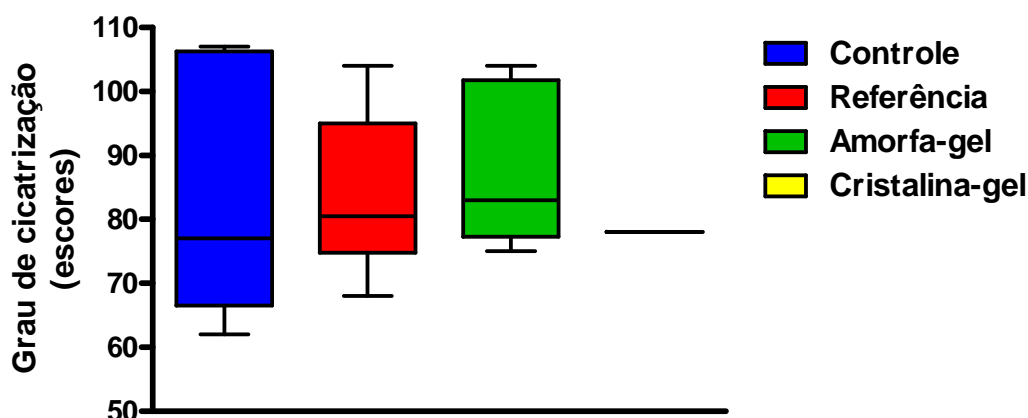


FIGURA 45 – Avaliação do grau de cicatrização nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel no 12^o dia do experimento, de acordo com o método histológico de Myers. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,7613$).

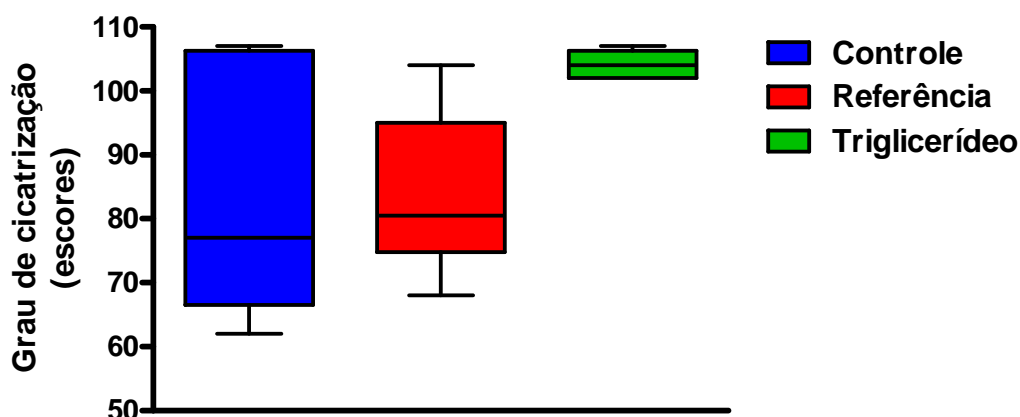


FIGURA 46 – Avaliação do grau de cicatrização nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo no 12^o dia do experimento, de acordo com o método histológico de Myers. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes ($P = 0,0958$).

Neste estudo, realizado com os tratamentos com água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa, Amorfa e Cristalina-gel e Triglicerídeo, não houve indicação estatisticamente significativa da presença de **neutrófilos** no 12^o dia. Este dado pôde ser observado macroscopicamente e pela quantificação ao microscópio, com a coloração H.E. utilizando-se o quadro de Myers (1961) mostrados nas Figuras 44, 45 e 46.

Este achado indicou que ao 12^o dia, não houve diferença significativa, de **neutrófilos** nos preparados histológicos dos tratamentos entre os grupos estudados (Figuras 47, 48, 49).

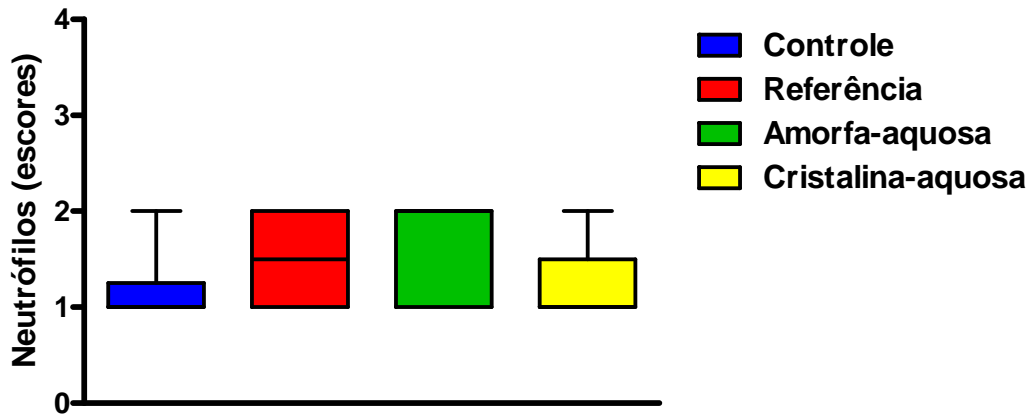


FIGURA 47 – Quantificação de neutrófilos, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos dos grupos Controle e Referência e 5 preparados histológicos dos grupos Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,3728$).

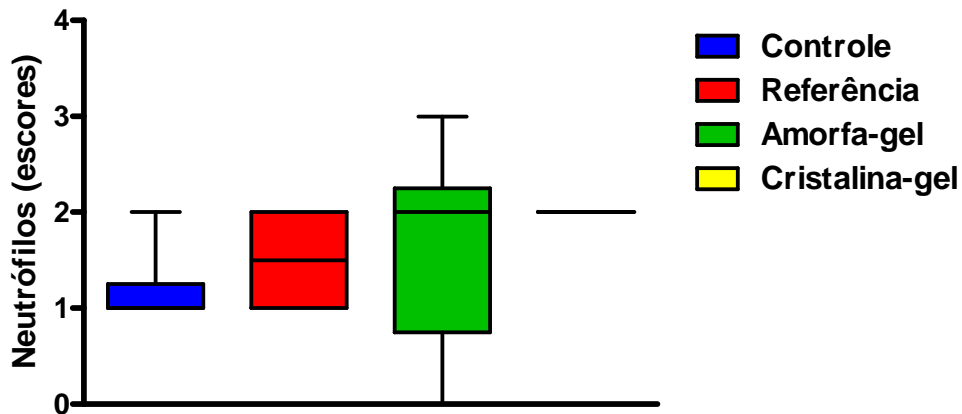


FIGURA 48 – Quantificação de neutrófilos, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,0804$).

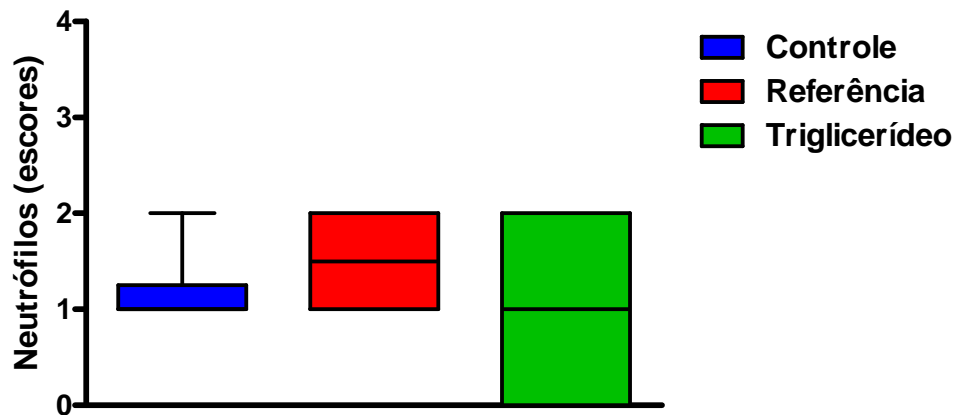


FIGURA 49 – Quantificação de neutrófilos, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,4376$).

A observação da formação de **crosta** em uma ferida cutânea, favorece o processo de reparo. Neste estudo, embora em alguns intervalos de dias tenha havido uma discreta presença das mesmas nos três experimentos, não houve diferença estatisticamente significante (Figuras 50, 51 e 52).

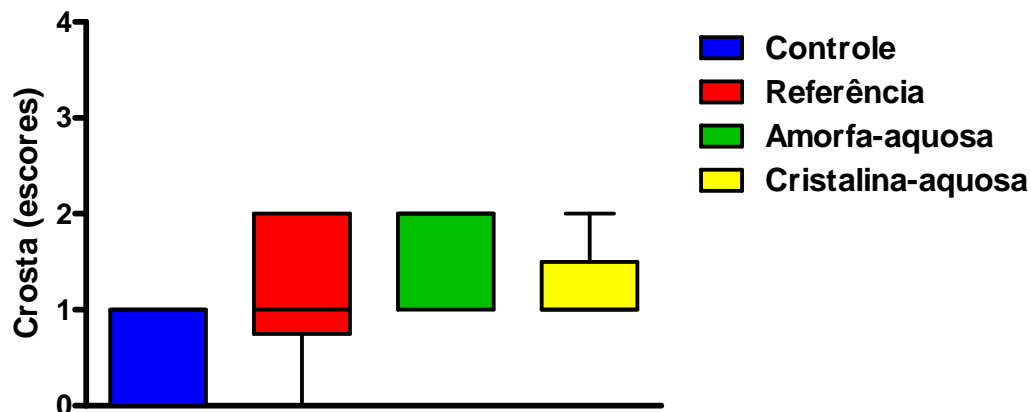


FIGURA 50 – Avaliação da formação da crosta, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos dos grupos Controle e Referência e 5 preparados histológicos dos grupos Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,1140$).

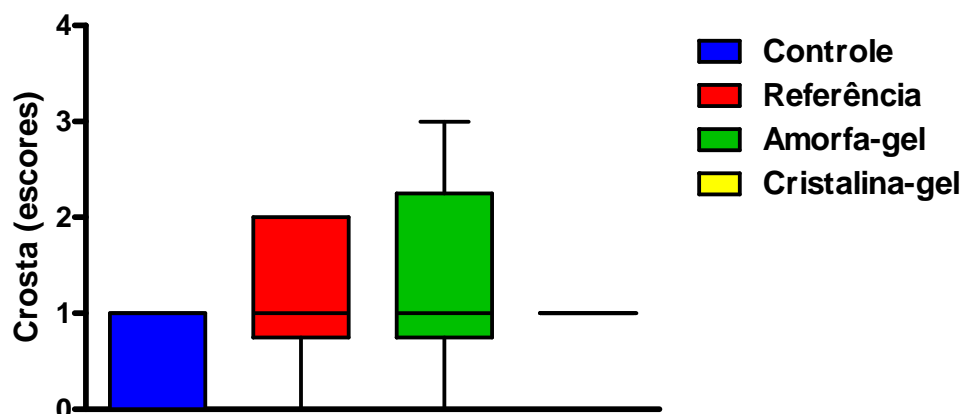


FIGURA 51 – Avaliação da formação da crosta, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,4115$).

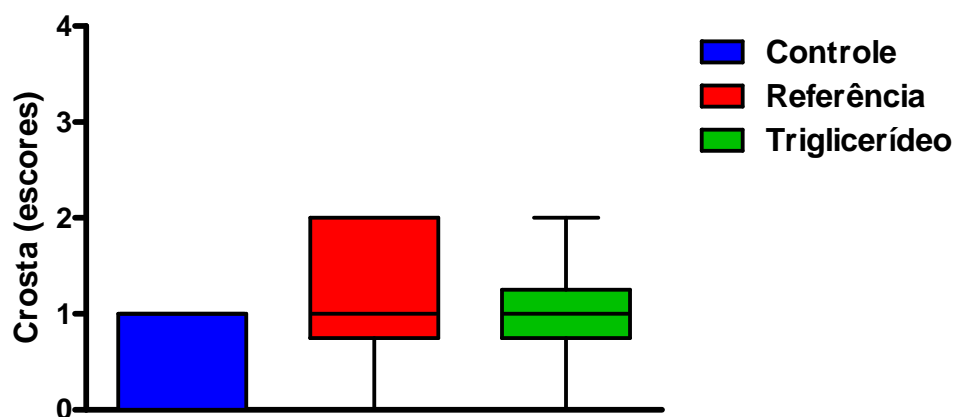


FIGURA 52 – Avaliação da formação da crosta, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,3957$).

Neste estudo observou-se em alguns intervalos de tempo nos três tratamentos, a presença de **fibrina** e de **sinais flogísticos de inflamação aguda** do ponto de vista macroscópico. Quanto a observação ao microscópio visualizou-se **hemorragia**, **neutrófilos**, **macrófagos**, **basófilos**, mas não houve dados estatisticamente significantes (Figuras 53, 54 e 55).

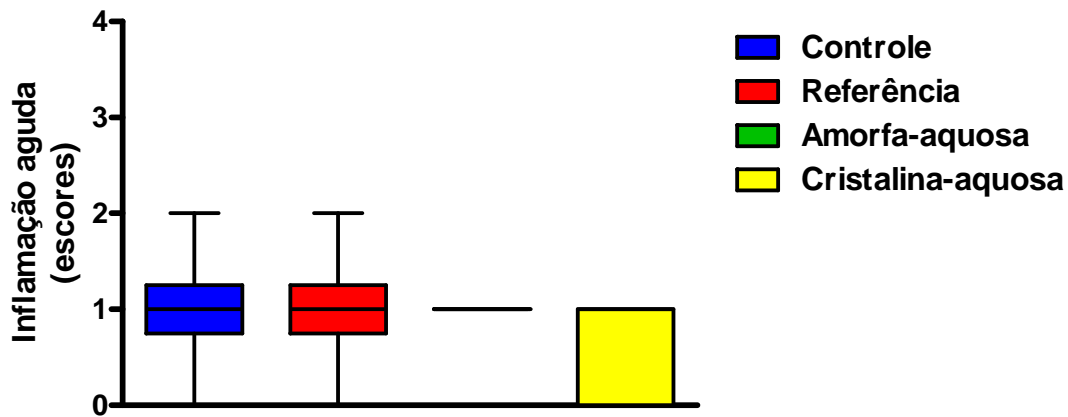


FIGURA 53 – Avaliação da inflamação aguda, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos dos grupos Controle e Referência e 5 preparados histológicos dos grupos Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,5186$).

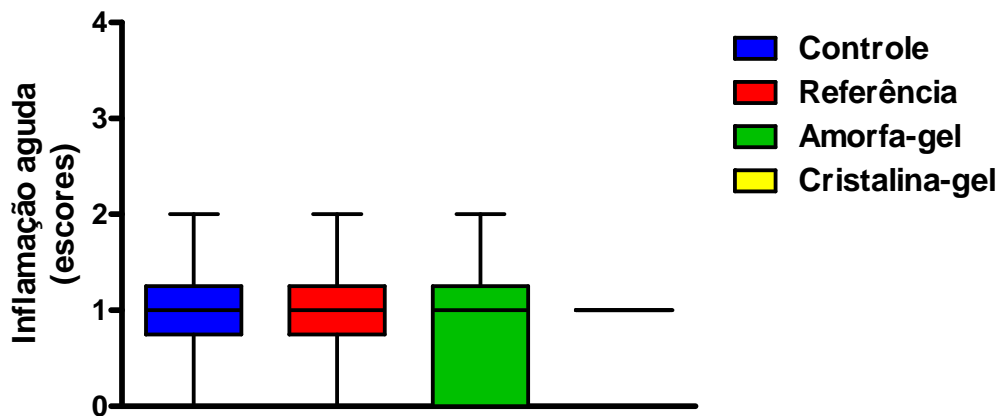


FIGURA 54 – Avaliação da inflamação aguda, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,9306$).

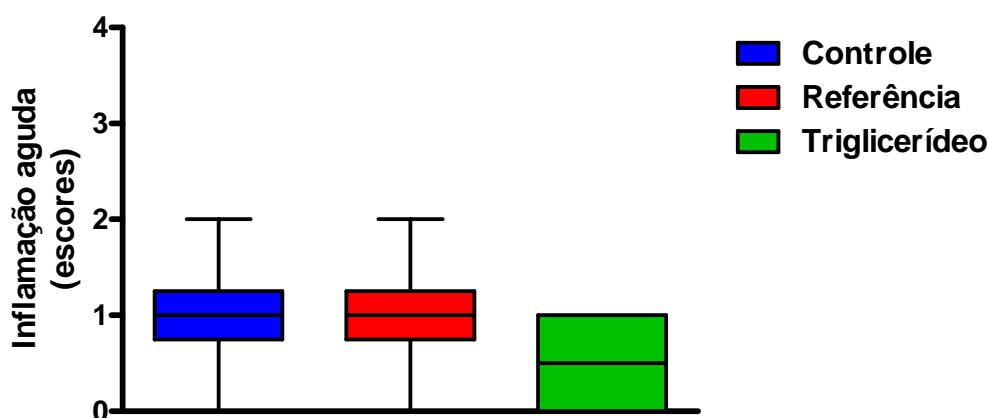


FIGURA 55 – Avaliação da inflamação aguda, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,2689$).

Quanto à **inflamação crônica**, caracterizada já pela presença de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, a quantificação ao microscópio dos três tratamentos aqui realizados, não demonstrou diferenças estatisticamente significantes (Figuras 56, 57 e 58).

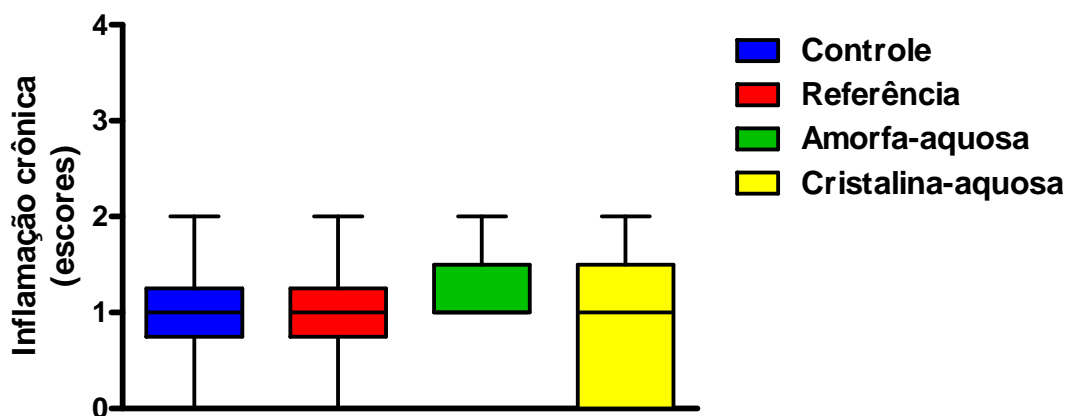


FIGURA 56 – Avaliação da inflamação crônica, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos dos grupos Controle e Referência e 5 preparados histológicos dos grupos Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,7892$).

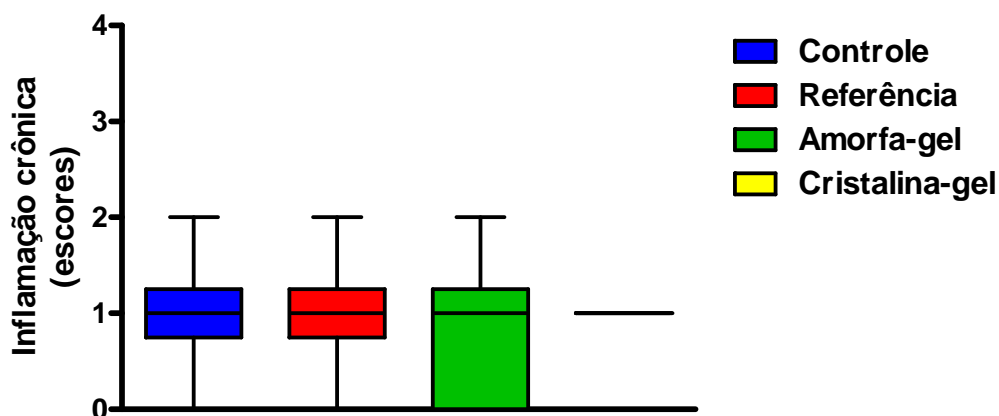


FIGURA 57 – Avaliação da inflamação crônica, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,9306$).

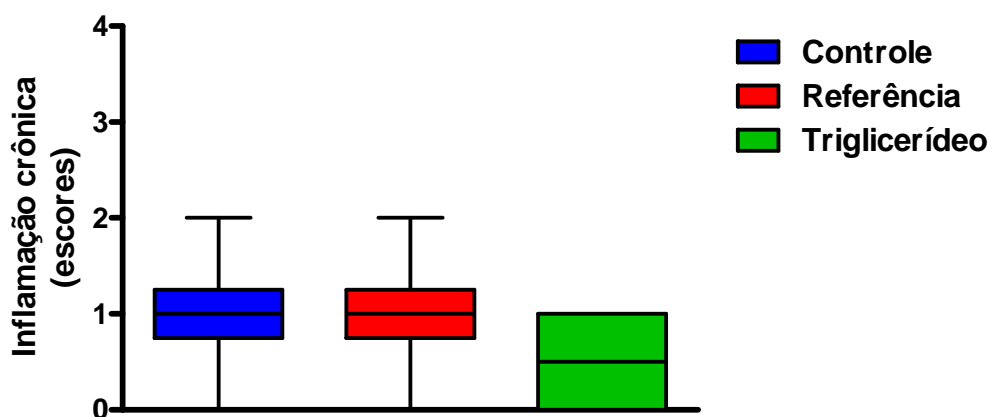


FIGURA 58 – Avaliação da inflamação crônica, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,2689$).

A avaliação da **regeneração epitelial**, de acordo com critérios histológicos do quadro de Myers (1961), contados ao microscópio com coloração em H.E., (Figuras 59, 60 e 61) não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum dos três experimentos.

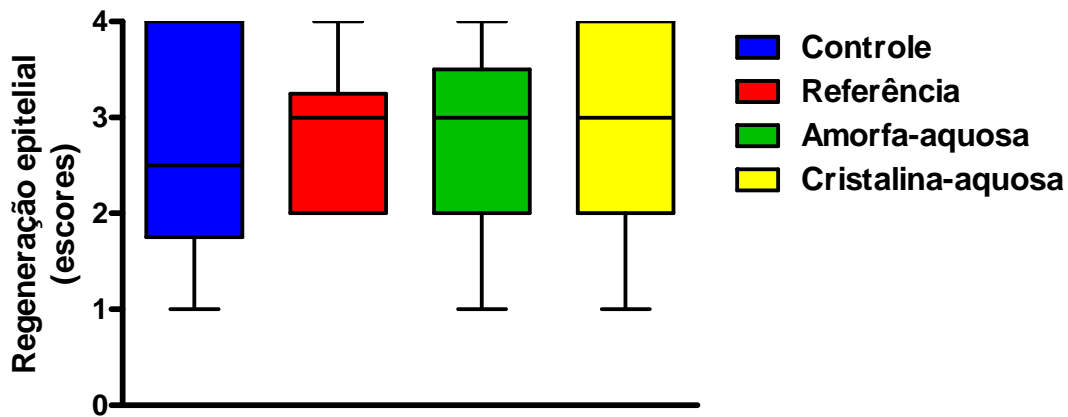


FIGURA 59 – Avaliação da regeneração epitelial, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos dos grupos Controle e Referência e 5 preparados histológicos dos grupos Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,9337$).

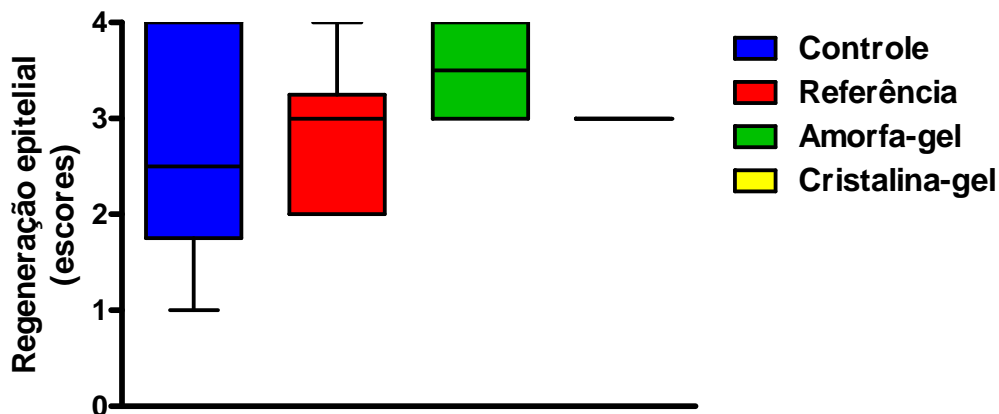


FIGURA 60 – Avaliação da regeneração epitelial, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,2953$).

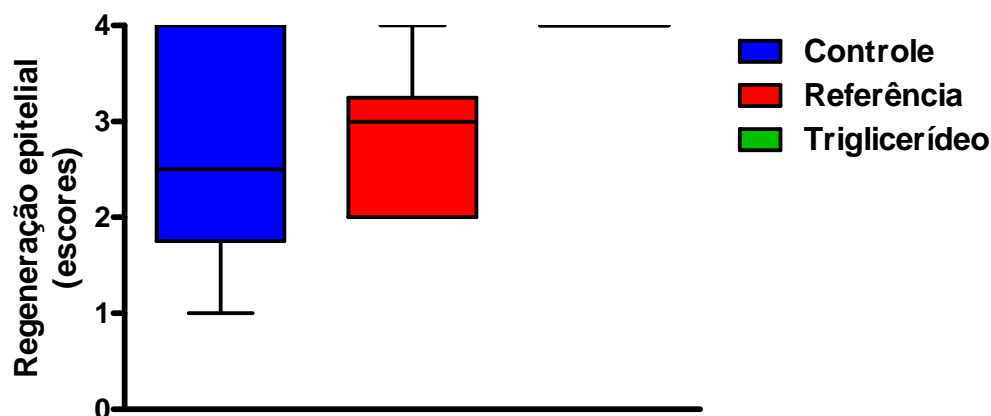


FIGURA 61 – Avaliação da regeneração epitelial, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Embora o teste de Kruskal-Wallis tenha evidenciado diferença estatisticamente significativa entre as medianas dos três grupos ($P = 0,0238$), o teste de Dunn não revelou diferenças entre os grupos dois a dois ($P > 0,05$).

A contagem de **fibroblastos** neste estudo foi realizada ao microscópio, pela coloração H.E. e a quantificação pelo quadro de Myers (1961), não evidenciando dados estatisticamente significantes, nos grupos tratados com água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa, Amorfa e Cristalina-gel e Triglicerídeo aqui testadas (Figuras 62, 63 e 64).

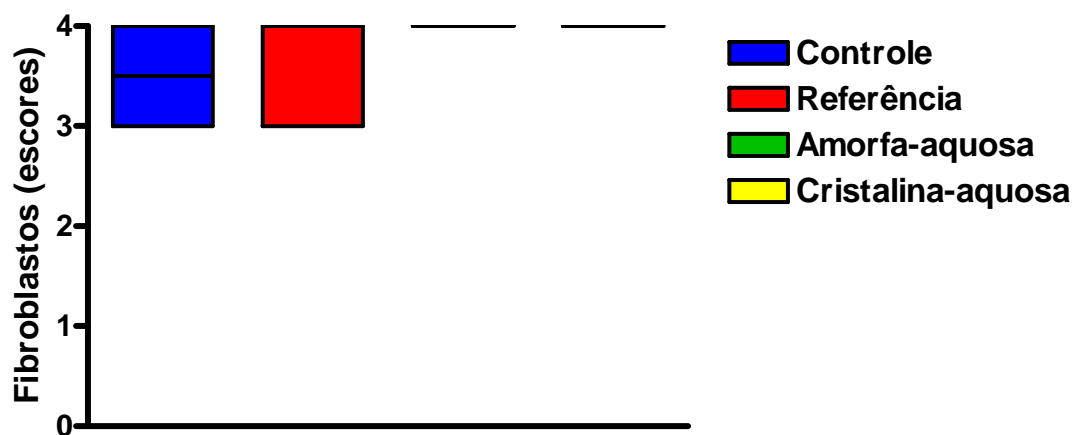


FIGURA 62 – Quantificação de fibroblastos, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos dos grupos Controle e Referência e 5 preparados histológicos dos grupos Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,1328$).

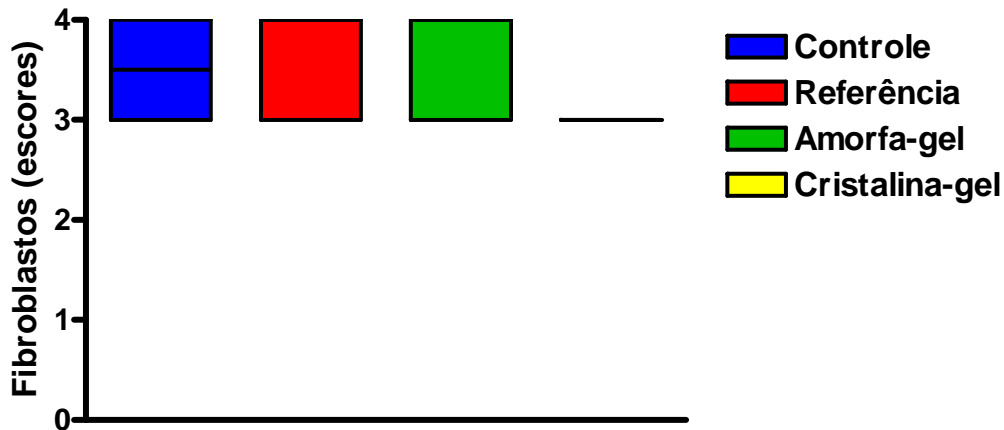


FIGURA 63 – Quantificação de fibroblastos, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,0746$).

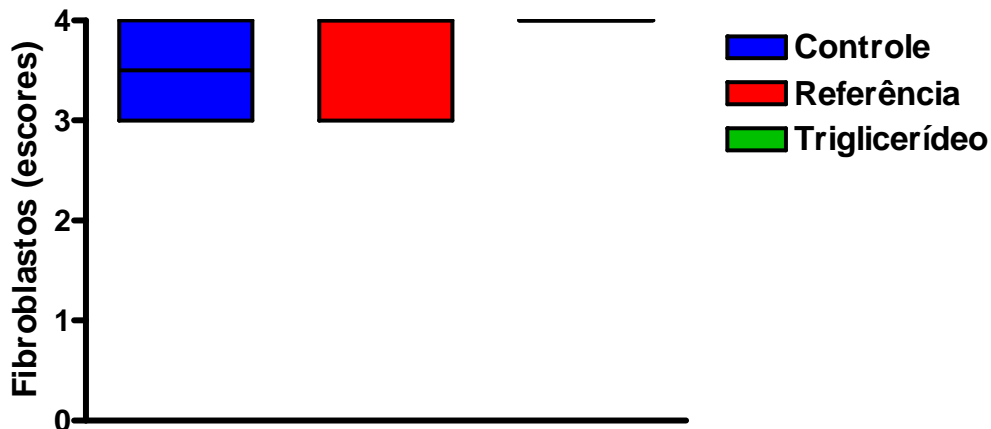


FIGURA 64 – Quantificação de fibroblastos, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,1603$).

Quanto à avaliação de **tecido de granulação** (Figuras 65, 66 e 67) por escores histológicos no 12^o dia, houve diferença estatisticamente significativa no grupo tratado com água de coco Cristalina-aquosa (Figura 65) sendo $P < 0,05$ em relação ao grupo Referência e também no grupo Triglicerídeo (Figura 67) com $P < 0,05$ em relação ao grupo Referência.

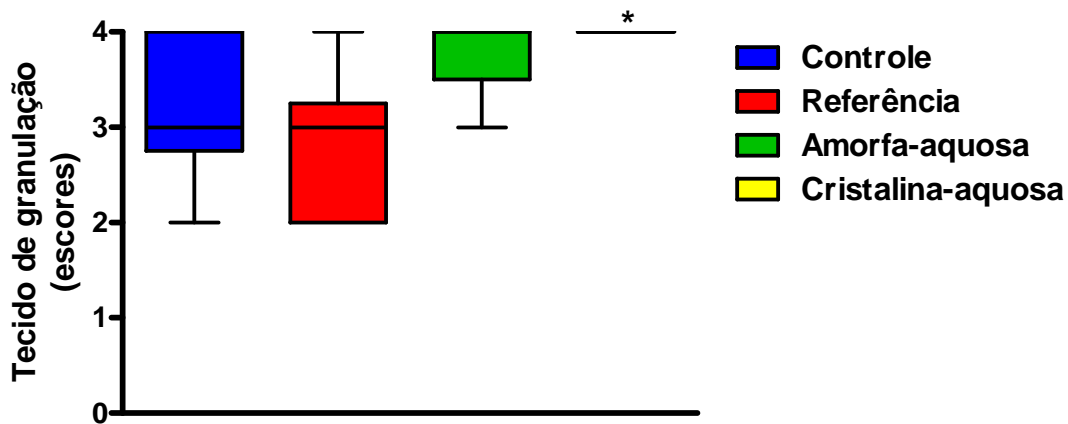


FIGURA 65 – Avaliação do tecido de granulação, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos dos grupos Controle e Referência e 5 preparados histológicos dos grupos Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. * $P < 0,05$: Cristalina-aquosa > Referência (teste de Dunn).

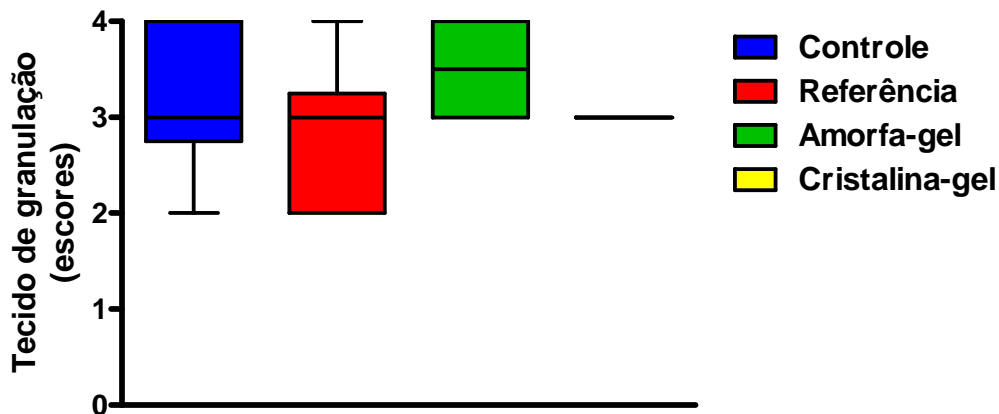


FIGURA 66 – Avaliação do tecido de granulação, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,2709$).

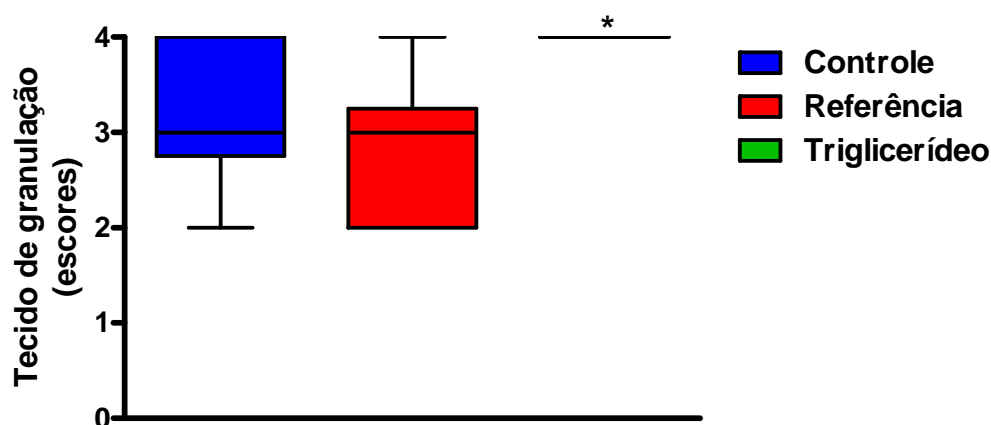


FIGURA 67 – Avaliação do tecido de granulação, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência e Triglicerídeo, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. * $P < 0,05$: Triglicerídeo > Referência (teste de Dunn).

A contagem de **eosinófilos** foi realizada ao microscópio, pela coloração H.E. e a quantificação pelo quadro de Myers (1961). Não houve resultado estatisticamente significativo nos três tratamentos Testes, água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa, Amorfa e Cristalina-gel e Triglicerídeo aqui utilizados (Figuras 68, 69 e 70).

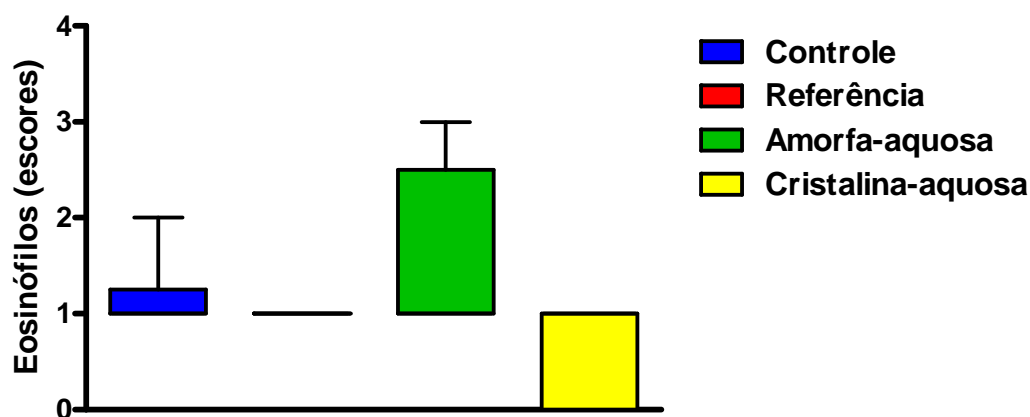


FIGURA 68 – Quantificação de eosinófilos, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos dos grupos Controle e Referência e 5 preparados histológicos dos grupos Amorfa-aquosa e Cristalina-aquosa. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,0627$).

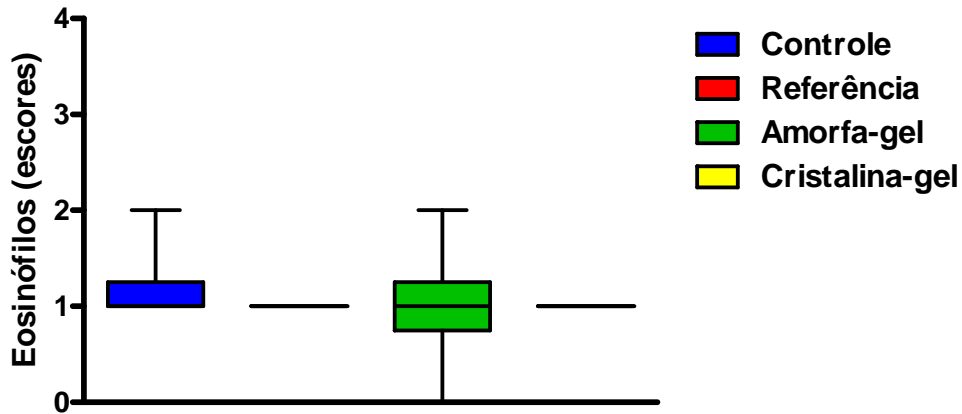


FIGURA 69 – Quantificação de eosinófilos, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência, Amorfa-gel e Cristalina-gel, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,8074$).

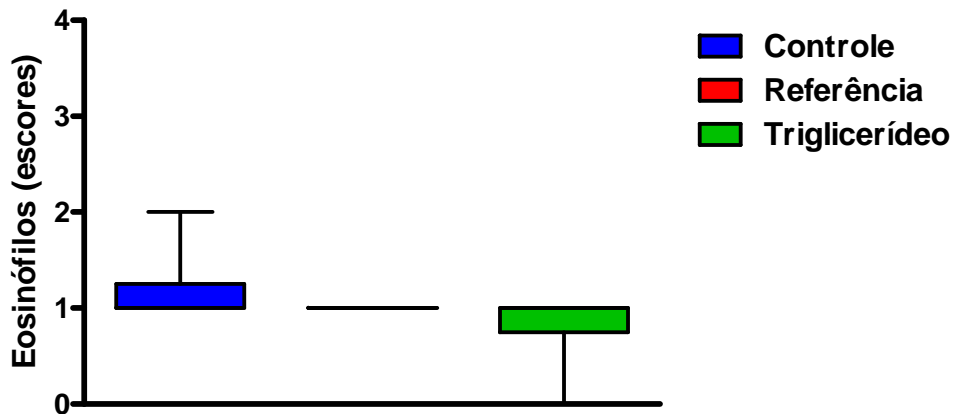


FIGURA 70 – Quantificação de eosinófilos, conforme critérios histológicos, nos grupos Controle, Referência e Triglicérido, realizada no 12^o dia do experimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas em 6 preparados histológicos de cada grupo. Comparações entre os diversos grupos foram realizadas mediante o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, associado ao teste de Dunn, para verificar diferenças entre os grupos dois a dois. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes (teste de Kruskal-Wallis: $P = 0,2425$).

5 DISCUSSÃO

A revisão de literatura médica nas bases de dados da Medline e Lilacs, não identificou trabalho clínico ou experimental, que tenha avaliado a ação farmacológica da água de coco liofilizada, no processo de cicatrização de ferida aberta no dorso de ratos.

Quanto ao Dersani[®] (utilizado em instituições públicas e privadas, tanto em adultos como em crianças como dermoprotetor), não se identificou estudo experimental com esta finalidade. Sendo assim tornou-se justificável a realização deste experimento, que aqui denominou-se Triglicerídeo por serem estes predominantes em sua composição.

O animal escolhido foi o rato da linhagem Wistar, por possuir cicatrização conhecidamente mais rápida em relação aos humanos, serem animais amplamente utilizados em estudos experimentais (AUERSVALD, 2001), serem de fácil manuseio e acomodação, apresentarem resistência à manipulação, agressões cirúrgicas e a processos infecciosos (MODULIN *et al.*, 1985; MARTINS *et al.*, 2006). Foram todos machos e adultos jovens, com o propósito de evitar a interferência de variações hormonais do ciclo estral das fêmeas, que pudessem interferir no mecanismo de cicatrização (MARTINS *et al.*, 2006).

A pele do rato apresenta diferença importante em relação à humana que é a ausência de um limite definido entre a derme papilar e a derme reticular (SANTOS *et al.*, 2006). Mc Farlane *et al.* (1965), referem que, embora os achados histológicos sejam diferentes da pele humana (a derme do rato é mais espessa e não apresenta tecido gorduroso subcutâneo nem tela muscular subcutânea), os vasos sanguíneos responsáveis pela irrigação cutânea são subdérmicos em ambos e apresentam as mesmas alterações de perfusão de macro e microvascularização.

O modelo de ferida aberta na forma de quadrado 2cmx2cm, com cicatrização por segunda intenção tornou-se viável, pois segundo Cohen e Mast, (1990), estas feridas podem ser avaliadas quando se quer saber a influência de substâncias de ação tópica, quanto à quantificação do processo do tecido cicatricial, em relação a células inflamatórias, grau de reparação, tecido de granulação e estudo de colágeno.

Neste estudo, o processo de reparação tecidual de feridas cutâneas experimentalmente induzidas em ratos foi avaliado *in vivo* do ponto de vista da cinética de regressão da área ulcerada ao longo do tempo. Sendo assim, foram

analisadas variáveis que mediram o grau de reparação, que denota a contração temporal da ferida em relação à área inicial, e a taxa média de reparação, ou seja, quantos mm² a região ulcerada regrediu a cada dia.

Para determinar estes parâmetros foi necessário calcular a área das feridas usando técnica planimétrica. A planimetria convencional consiste em desenhar o contorno do objeto de interesse em papel milimetrado e, subseqüentemente, contar o número de mm² dentro da região demarcada (MARQUES *et al.*, 2004). Desta forma, optou-se pela planimetria digital, visto se tratar de um método objetivo, rápido e acurado, cujo uso tem se tornado corriqueiro (MANDARIN-de-LACERDA, 2003; MORI *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2007). Além disso, as imagens digitais constituem uma documentação definitiva da reparação tecidual, de modo que podem ser utilizadas em revisões posteriores ou em estudos adicionais.

Um programa de computador foi desenvolvido especificamente para realizar a planimetria em estruturas anatômicas. O propósito foi implementar um *software* de fácil manuseio que constituísse uma alternativa aos complexos sistemas analisadores de imagens de uso geral. A determinação prévia do fator de escala facilitou bastante a operação do *software*, uma vez que dispensou a solicitação de uma medida real da região ulcerada, como, por exemplo, a delimitação de um segmento numa régua fotografada ao lado da ferida ou de um dos eixos da úlcera, cujo comprimento tivesse sido preliminarmente mensurado no próprio animal¹⁶.

O monitoramento do processo de cicatrização *in vivo* requer medições sucessivas numa mesma unidade experimental. Dessa forma, padronizou-se o procedimento de aquisição das imagens digitais (Figura 11), de maneira a permitir que, em diferentes momentos, a captura das imagens das feridas fosse realizada dentro do mesmo enquadramento. Esta estratégia possibilitou a detecção, pelo *software* de quantificação, de variações temporais na área da úlcera, ainda que mínimas.

O conjunto formado pelo procedimento de aquisição das imagens e pelo *software* de quantificação constituiu um método planimétrico acurado, que propiciou o monitoramento espacial e temporal da reparação tecidual *in vivo*. Esta abordagem deve ser estimulada, pois dispensou o sacrifício dos animais, requerendo, por conseguinte, um número menor de unidades experimentais para a realização dos ensaios.

Na literatura foram encontrados estudos realizados experimentalmente, para análise dos períodos de cicatrização de feridas em que utilizaram desenhos que variaram de 3 a 30 dias.

De acordo com essa variedade de períodos, considerou-se que não existe um protocolo oficial de tratamento para cicatrização de feridas.

Desta forma, resolveu-se adotar neste estudo os dias zero, 3, 7 e 12 para análise dos parâmetros macroscópicos de grau de contração e de epitelização e o dia 12 para os microscópicos, considerando-se a experiência empírica de profissionais de saúde, com o uso do Dersani[®] em pacientes com feridas limpas. Enquanto o experimento com a água de coco liofilizada ainda não teve utilização com este fim.

Para a avaliação histológica nos dias 3 e 7 teríamos a necessidade da utilização de um número maior de animais (para eutanásia), tendo em vista a representatividade estatística para cada grupo de tratamento, além da exigência do mesmo momento de experimentação no LABCEX, para avaliação e comparação histológica.

Os cortes histológicos foram submetidos à coloração por hematoxilina e eosina, para análise de parâmetros histológicos ao microscópio NIKON Alphaphot – 2 YS 2. Lente ocular 10x, lente objetiva 10x e 40x para contagem de células, sendo os dados histológicos transformados em escores e quantificados de acordo com o quadro de Myers (1961), detalhado nesta discussão.

Os cortes histológicos corados pelo azul de toluidina e pelo tricrômico de Masson foram quantificados para colágeno e angiogênese através do *software* específico (FECHINE-JAMACARU, 2006).

A avaliação macroscópica deste estudo foi realizada utilizando-se um *software* específico, para mensuração do reparo tecidual da lesão das feridas.

Este processo experimentalmente induzido em ratos foi avaliado *in vivo* do ponto de vista da cinética de regressão da área ulcerada ao longo do tempo. Para tanto, neste estudo foram analisadas variáveis que mediram o grau de reparação, que denota a contração temporal da ferida em relação à área inicial, e a taxa média de reparação, ou seja, quantos mm² a região ulcerada regredia a cada dia.

Kietzmann (1999) estudou por 10 dias o avanço e o retardo de cicatrização de feridas em ratos imunossuprimidos pelo uso de injeção subcutânea

de 1mg/kg de dexametasona. Utilizou os agentes farmacológicos povidine iodado, pomada de óxido de zinco, óleo de fígado de bacalhau e bandagem de hidrogel. As pomadas com óxido de zinco e azeite de fígado de bacalhau aceleraram o processo de reparo.

Medeiros *et al.* (2003) estudaram por 7 dias a possibilidade de efeito das vitaminas A e C reverterem os efeitos deletérios do corticosteróide na cicatrização de anastomoses do intestino delgado em ratos. Após 7 dias de observação foi determinada a pressão de ruptura das anastomoses, que foram em seguida ressecadas, fixadas em formol a 10%, processadas com técnica padrão para histologia com coloração H.E. e tricrômico de Masson. Concluíram que a metilprednisolona exerce efeito deletério sobre a cicatrização de anastomoses intestinais em ratos e que as vitaminas A e C, quando usadas associadas, contribuíram para reverter esse efeito.

Neste estudo não houve utilização de corticosteróide, mas nas substâncias aqui testadas as vitaminas A e C estavam presentes em suas composições.

Rodrigues *et al.* (2004) estudaram por 7 dias as propriedades antimicrobianas e cicatrizantes do óleo de semente de girassol (contém o ácido linoléico) em ratos, comparando com grupo tratado com clostebol+neomicina. No dia da incisão das feridas, os ratos foram inoculados com 0,1mL de *Staphylococcus aureus* e 24 horas depois começaram a ser tratados por via tópica com as substâncias. Avaliaram a atividade de reparo e aspectos histológicos incluindo inflamação, necrose, tecido de granulação, neovascularização e concluíram que o óleo de semente de girassol tem ação anti-inflamatória e de cicatrização.

Este estudo contém nas substâncias testadas o ácido linoléico, que provavelmente também exerceu influência antimicrobiana durante a realização dos tratamentos.

Rodrigues *et al.* (2005) trataram por 7 dias ratos com uma mistura de ácido láctico bacteriano e leveduras, comparando com grupo tratado com clostebol+neomicina. Os animais também tiveram inoculação de *Staphylococcus aureus*. Analisaram o processo de reparo e aspectos histológicos e concluíram que houve efetivo desenvolvimento de tecido de cicatrização.

O estudo aqui apresentado não utilizou nenhuma substância para infectar as feridas. Contrariamente, observaram-se técnicas antissépticas e assépticas para manter o leito das feridas sem qualquer contaminação.

Fukai *et al.* (2005) realizaram um experimento avaliando a velocidade de contração e de epitelização em ratos, considerando o 3^o, 7^o e 14^o dias, provocando duas feridas circulares (uma de cada lado) no dorso do animal em que em uma delas provocava a desnervação da área ferida. Utilizaram coloração H.E., capturaram imagens digitais e a análise morfológica e de mensuração da área foi realizada através de *software*. O percentual de contração foi computado em cada dia mensurado comparando com o diâmetro original da ferida. Para determinação de reepitelização os fragmentos corados em H.E. foram medidos e comparados pelas margens bilaterais da ferida. Tomaram como base a borda de tecido normal, observando a partir de que momento começava o tecido de granulação, determinando como limite o momento em que apareceram os folículos pilosos. No período de 3 a 7 dias os resultados não foram significantes. No 14^o dia a comparação foi significativa. Ao exame histológico no 3^o observaram insuficiente e dispersa formação de tecido de granulação nos ratos denervados. A reepitelização nos dois grupos foi de 5%. No 7^o dia o tecido de granulação começou a estar presente na pele denervada e o grau de reepitelização foi menor que 30% em ambos os grupos. Dos dias 3 a 7 não houve diferença significativa em ambos os grupos. No 14^o dia havia migração de células epiteliais das margens bilaterais, mas ainda havia inflamação, células invasivas e lento estágio de formação de tecido de granulação no grupo denervado.

Este estudo não encontrou dados estatisticamente significantes, em relação à regeneração epitelial nos três experimentos, quanto a quantificação dos preparados histológicos corados em H.E. e observados ao microscópio para contagem pelo quadro de Myers.

Martins *et al.* (2006) realizaram estudo controlado comparativo em ratos, da cicatrização de ferida de pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Seguiram protocolo de 7, 14 e 21 dias. Na análise morfométrica utilizaram lupa e paquímetro e constataram regressão positiva nos dias 7 e 14, com completa cicatrização no dia 21. Realizaram para análise histológica as colorações H.E. e tricrômico de Masson, para observarem proliferação vascular, células mononucleares e polimorfonucleares, proliferação fibroblástica, fibras

colágenas e reepitelização. Encontraram na avaliação microscópica no 7^o dia mononucleares, polifibroblastos, fibras colágenas e reepitelização tiveram efeitos significantes. No 14^o e 21^o dias foi significativa apenas a avaliação de mononucleares e fibras colágenas.

Estudos foram encontrados em que para determinar a regressão foi necessário calcular a área das feridas usando técnicas planimétricas. A planimetria convencional consiste em desenhar o contorno do objeto de interesse em papel milimetrado e, subseqüentemente, contar o número de mm² dentro da região demarcada (MARQUES *et al.*, 2004).

No estudo de Garros *et al.* (2006), avaliaram o extrato de *Passiflora edulis* (maracujá amarelo) na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos, com protocolo nos dias 7, 14 e 21 dias. A análise macroscópica da evolução do aspecto da lesão e medida da retração cicatricial da ferida foi realizada por planimetria digital. As lesões foram fotografadas por câmera digital e as imagens foram importadas para o *software* Auto Cad 14[®]. O contorno da ferida foi delimitado através do aplicativo POLILINE, que demarcou todos os pontos perimetrais do contorno da lesão. Não houve diferença estatisticamente significativa. Realizaram avaliação microscópica analisando de forma morfológica e histológica, com as colorações H.E. e tricrômico de Masson à proliferação vascular, as células mononucleares e polimorfonucleares, a proliferação fibroblástica, a colagenização e a reepitelização. O resultado estatisticamente significativo foi apenas para colagenização no 14^o dia, concordando com o estudo aqui realizado que encontrou resultados significantes no 12^o dia quanto à densidade de colágeno.

No estudo de Branco Neto *et al.* (2006), avaliou-se o extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius Raddi* (aroeira) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos, com protocolo de 7, 14 e 21 dias, usando as colorações H.E. e tricrômico de Masson, como também foram analisados aspectos macro e microscópicos e por planimetria digital. As lesões foram fotografadas por câmera digital e avaliadas por planimetria digital através do programa de computador Auto Cad 14[®], no qual delimitou a periferia da ferida (POLILINE). Não houve resultado estatisticamente significativo. Na avaliação microscópica de proliferação vascular, células polimorfonucleares e mononucleares, proliferação fibroblástica, fibras colágenas e reepitelização, não houve diferença estatisticamente significativa.

Concluíram que o extrato hidroalcoólico de aroeira retardou a reepitelização das feridas.

Chiquetti Júnior *et al.* (2007) realizaram um modelo experimental para estudo de efeitos de agentes imunossupressores sobre a cicatrização cutânea. Utilizaram protocolo 3^o, 7^o, 10^o, 14^o e 21^o dias. No estudo capturaram as imagens digitais vistas ao microscópio, tendo o campo de melhor qualidade selecionada para contagem no *software*. Utilizaram um programa que distinguia o tipo e o aspecto morfológico da célula (Image Pro Plus 4.5), o cálculo percentual foi realizado considerando a região de densidade pela área total da imagem. Realizaram nos intervalos de tempo pré-fixados, as avaliações histológicas quantitativas de células e fibras colágenas dos sítios operatórios, utilizando captura digital de imagens para um *software*. A administração dos agentes imunossupressores foi realizada diariamente por gavagem. Os fragmentos foram corados em H.E. e as imagens digitais vistas ao microscópio, tendo o campo de melhor qualidade selecionada para contagem no *software*. Os dados não foram estatisticamente significantes.

Neste estudo, um programa de computador foi desenvolvido especificamente para realizar planimetria em estruturas anatômicas. O propósito foi implementar um *software* de fácil manuseio que constituísse uma alternativa aos complexos sistemas analisadores de imagens de uso geral. A determinação prévia do fator de escala facilitou a operação do *software*, uma vez que dispensou a solicitação de uma medida real da região ulcerada. Desta forma, não foi preciso realizar a delimitação de um segmento numa régua fotografada ao lado da ferida ou de um dos eixos da úlcera, cujo comprimento tenha sido preliminarmente mensurado no próprio animal como no estudo de Martins *et al.* (2006).

O monitoramento do processo de cicatrização *in vivo* requer medições sucessivas numa mesma unidade experimental. Dessa forma, no estudo aqui realizado padronizou-se o procedimento de aquisição das imagens digitais, de maneira a permitir que, em diferentes momentos, a captura das imagens das feridas fosse realizada dentro do mesmo enquadramento. Esta estratégia possibilitou a detecção, pelo *software* de quantificação, de variações temporais na área da úlcera, ainda que mínimas (Figura 11).

O reparo do tecido envolve um complexo e coordenado número de eventos que inclui inflamação, proliferação celular, contração da ferida e remodelação. Concorde-se aqui com autores em que quando isto coincide e

acontece simultaneamente permite o sucesso do reparo (MANDELBAUM *et al.*, 2006). Quando se resolveu testar o composto de água de coco liofilizada (sem referência na literatura como cicatrizante) e de Triglicerídeo neste experimento, teve-se como base estudos anteriores existentes que comprovaram a eficácia do triglicerídeo na aceleração cicatricial em pacientes da espécie humana (De NARDI *et al.*, 2004). Aqui se faz necessário ressaltar a composição da água de coco, com a presença dos ácidos caprílico, cáprico, capróico, láurico e ainda do ácido linoléico, da vitamina A (como no Triglicerídeo) e da vitamina C, entre outros elementos (Anexo B).

Neste estudo, houve a retirada do segmento celular subcutâneo havendo a necessidade de formação de um novo tecido para reparo da lesão. O uso da associação de neomicina + clostebol como Referência foi para avaliar o reparo da lesão diferentemente de estudo realizado anteriormente que avaliou atividade antimicrobiana (RODRIGUES *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2005; SAKUMA *et al.*, 2003).

Durante o experimento o protocolo permitiu fotografar os animais no dia do procedimento cirúrgico (zero), 3^o, 7^o e 12^o dias de tratamento. Desta forma, além da quantificação objetiva foi possível também realizar uma avaliação clínica subjetiva macroscópica semelhante à descrita em outros estudos realizados com o mesmo composto triglicerídeo em cães (DE NARDI *et al.*, 2004) e com ácido linoléico em carneiros (MARQUES *et al.*, 2004).

No grupo tratado com água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa nos primeiros dias mostrou uma expansão da área ulcerada do grupo Referência com presença de fibrina enquanto os grupos Controle, Amorfa-aquosa retraíram e a Cristalina-aquosa apresentou um pouco mais de retração. Do 3^o ao 7^o dia no grupo Referência observou-se ainda a presença de fibrina, o Controle com formação de crosta. As feridas dos grupos Amorfa e Cristalina-aquosa permaneceram úmidas e com início de crosta e de tecido de granulação. No intervalo do 7^o ao 12^o dia a reparação foi mais evidenciada nos grupos Controle e Amorfa e Cristalina-aquosa com presença de tecido de granulação, com menor tamanho nos grupos Amorfa e Cristalina-aquosa, enquanto o grupo Referência continuou com presença de fibrina, e área ainda aumentada em relação aos demais.

No grupo tratado com água de coco liofilizada Amorfa e Cristalina-gel houve nos primeiros dias uma expansão da área ulcerada do grupo Referência, com

presença de fibrina, esta, também estava presente nos grupos Amorfa e Cristalina-gel que apresentaram leve retração. O grupo Controle porém, apresentou maior retração.

Do 3^o ao 7^o dia no grupo Referência observou-se ainda a presença de fibrina, o grupo Controle iniciou formação de crosta e no grupo Amorfa e Cristalina-gel as feridas permaneceram úmidas e com tecido de granulação, houve presença de crosta também no grupo Cristalina-gel.

No intervalo do 7^o ao 12^o dia a reparação foi mais evidenciada nos grupos Controle, Amorfa e Cristalina-gel com presença de fibrina. No grupo Referência, porém ainda apresentou sua área aumentada em relação aos demais.

O grupo tratado com Triglicerídeo apresentou nos primeiros dias uma expansão da área ulcerada do grupo Referência enquanto os grupos Controle e Triglicerídeo retraíram.

Do 3^o ao 7^o dia no grupo Referência observou-se a presença de fibrina, o grupo Controle iniciou formação de crosta e o grupo Triglicerídeo permaneceu úmido e com tecido de granulação.

No intervalo do 7^o ao 12^o dia a reparação foi mais evidenciada nos grupos Controle e Triglicerídeo com presença de crosta, enquanto o grupo Referência iniciou uma tênue crosta, porém com a área ainda aumentada em relação aos demais.

Até o 3^o dia, a observação subjetiva mostrou lenta retração das feridas com sinais flogísticos de inflamação. Em todos os grupos observou-se hiperemia e discreta formação de crosta nas bordas das lesões. Hiperemia, edema e formação de fibrina. Em outro estudo em que o autor utilizou ácidos graxos poliinsaturados foi observado que a combinação de contração da ferida e reepitelização, que reflete um avanço do epitélio sobre o tecido de granulação, houve diferença macroscópica no reparo da lesão nas primeiras 48 horas após o procedimento cirúrgico (CARDOSO *et al.*, 2004), o que não foi observado em nosso modelo.

Uma maior infiltração de células polimorfonucleares e macrófagos nos três primeiros dias podem corresponder à fase de exsudação e inflamação nas feridas tratadas com ácidos graxos essenciais e vitamina A, como evidenciou estudo realizado em cães (De NARDI *et al.*, 2004).

No mesmo período neste estudo, não se visualizou sinais de exsudato na observação macroscópica realizada nos três grupos de tratamentos (água de coco liofilizada Amorfa e Cristalina-aquosa, Amorfa e Cristalina-gel e Triglicérido).

Levenson (1994) relata também vários aspectos investigados dos efeitos de uma dieta suplementar com vitamina A na reação metabólica de uma ferida, durante o processo de cicatrização e de infecção. Anteriormente Levenson e Seifter (1983), já haviam realizado um experimento com base na hipótese de que sérios traumas necessitavam de maior aporte de vitamina A.

Ehrlick e Hunt (1968, 1969) obtiveram resultado diferente quando associaram a suplementação de vitamina A ao tratamento com cortisona, em cicatrização de ferida em seres humanos e ratos, em que verificaram efeitos adversos e não detectaram aceleração de cicatrização em ratos.

Há relato ainda, de estudo realizado por Demetriou *et al.* (1974) com suplemento de vitamina A em aderência pós-operatória de peritônio em rato com diminuição desta, tanto quanto o suplemento por vitamina E (KAGOMA *et al.*, 1985).

Em outro estudo, similarmente a vitamina A acumulou reparo de colágeno no sítio de anastomose aórtica em rato e adjacências sob a aorta, mantendo a atividade de colagenase, indicando que o efeito suplemental de vitamina A é significativo no reparo da síntese de colágeno (NUI *et al.*, 1987). A vitamina A também acelerou a diferenciação do conteúdo de cultura de fibroblastos e hidroxiprolina de uma monocamada de fibroblasto (LEVENSON, 1994).

Os fibroblastos representam a principal célula do tecido conjuntivo. Ativamente secretores, tem formato fusiforme ou têm largos prolongamentos citoplasmáticos. Estão ativamente engajados na síntese de proteínas, sendo responsáveis pela produção dos vários componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A contagem de colágeno ao 12^o dia do estudo mostrou que o processo de formação de fibras colágenas provavelmente se consolidava, pois a diminuição de fibroblastos neste momento garante a formação de tecido cicatricial sem defeito.

Para Menke *et al.* (2007), em condições normais a inflamação é um processo autolimitado, os neutrófilos inexistem após 72 horas. Na cicatrização normal metaloproteinase da matriz pode ser inibida por uma proteinase inibidora α 2-macroglobulina, e especificamente por um pequeno grupo de proteínas chamado “inibidores teciduais de metaloproteinases”.

Neste estudo do dia 3^o ao 7^o dia houve progresso no reparo da área das feridas o que denotou desenvolvimento de tecido de granulação concordando com a literatura (MANDELBAUM *et al.*, 2006).

De Nardi *et al.* (2004) realizaram experimento de cicatrização por segunda intenção em cães utilizando ácidos graxos essenciais, vitaminas A e E, lecitina de soja e iodo polivinilpirrolidona, avaliando as feridas nos dias 2, 7, 14 e 21 dias. Efetuaram medidas com régua milimetrada até a completa reepitelização.

É provável que neste estudo a ocorrência de sinais discretos compatíveis com sinais flogísticos (inflamação e edema), hiperemia após o terceiro dia possam estar associados à ação antioxidante da vitamina E, minimizando as lesões de reperfusão conseqüentes da liberação dos radicais livres tóxicos, concordando com estudo realizado em cães (DE NARDI *et al.*, 2004).

A ação da lecitina de soja proporciona a hidratação dos tecidos, constituindo um fator favorável à reparação da lesão. A manutenção da ferida hidratada favorece o desbridamento autolítico e contribui como estímulo à epitelização, à formação de tecido de granulação e à angiogênese. Para avaliar a evolução da cicatrização e o grau de contração das feridas, observaram que no 17^o dia as feridas apresentaram redução de 80% no tamanho e constataram a reepitelização completa no 23^o dia. Nos exames histopatológicos observaram no 3^o dia intensa infiltração por neutrófilos e macrófagos. Até 17^o dia, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno proeminente. Na seqüência houve redução da celularidade, ocorrendo formação de tecido conjuntivo e hiperplasia de células epiteliais (DE NARDI *et al.*, 2004).

Neste estudo a hidratação promovida pela lecitina de soja, complementada pela solução salina 0,9% dispensou a realização de desbridamento cirúrgico nas feridas do experimento com Triglicerídeo. Por outro lado, estudos anteriores demonstraram que feridas abertas e ressecadas reepitelizam mais lentamente (MANDELBAUM *et al.*, 2006).

Nos grupos tratados com água de coco liofilizada Amorfa e Cristalina-aquosa, Amorfa e Cristalina-gel também não houve necessidade de desbridamento cirúrgico.

Do 3^o ao 7^o dia ocorreu maior velocidade de reparo em todos os grupos. Os grupos água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa, Amorfa e Cristalina-gel e o composto Triglicerídeo mostraram evidente tecido de granulação e maior contração

tecidual de suas bordas, tornando-as irregulares. O grupo Controle mostrou resquícios da crosta que existia no 7^o dia e contração, deixando as bordas irregulares com presença de tecido de granulação. O grupo Referência permaneceu com maior área e com contorno das bordas irregulares o que também ocorreu com experimento em que os autores usaram ácido linoléico (MARQUES *et al.*, 2004).

Neste estudo, provavelmente ocorreu o mesmo que no estudo realizado por De Nardi *et al.* (2004), em que as citocinas por serem importantes mediadores de eventos de neoangiogênese, fibroplasia e maturação são liberadas por células como plaquetas, neutrófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos, tornando-se assim fácil entender a importância das propriedades quimiotáticas dos ácidos graxos essenciais e vitamina A no reparo das lesões.

Marques *et al.* (2004) realizaram estudo avaliando os efeitos da aplicação tópica de óleo de semente de girassol em feridas cutâneas em carneiros. Seguiram o protocolo de 7, 14 e 21 dias. Avaliaram a cicatrização mostrando que o ácido linoléico constituía um poderoso mediador pró-inflamatório, sendo essencial para regulação de eventos bioquímicos que precede a fibroplasia além de estimular fatores de crescimento e neovascularização. Constataram aceleração do processo de cicatrização nos dias 7 e 21, com redução da área e aumento da contração das feridas. O tecido de granulação se desenvolveu mais rapidamente e a epiderme foi completamente reconstituída.

Para Suárez-Mahecha *et al.* (2002), entre as principais funções dos ácidos graxos essenciais e aqui o destaque para n-6 (ácido linoléico) está o depósito de energia e a conformação das membranas celulares, sendo também precursores de substâncias, como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos.

É possível que neste estudo a presença de ácido linoléico nos grupos água de coco (Amorfa e Cristalina-aquosa, Amorfa e Cristalina-gel) e Triglicérido tenha tido desempenho similar, embora os dados não tenham sido estatisticamente significantes.

Para Suárez-Mahecha *et al.* (2002), os ácidos graxos polinsaturados (PUFAS) incorporados no interior da membrana celular, influem na permeabilidade da mesma, agindo nas funções de receptor, na atividade enzimática, citocinas e na produção de eicosanóides.

Quanto ao ácido araquidônico é obtido através de três fontes: os fosfolípidios de reserva do organismo, dieta e a partir do processo de alongamento e

desaturação do ácido linoléico, freqüente nos alimentos e oxidado na presença da enzima lipoxigenase ou cicloxigenase, convertendo-se em peróxidos lineais ou cíclicos. Um peróxido cíclico transforma-se nas plaquetas em tromboxano-TXA₂ e no endotélio dos vasos sanguíneos, em prostaciclina-PGI₂ e em diversas prostaglandinas (SUÁREZ-MAHECHA *et al.*, 2002).

Neste estudo no 12^o dia a observação clínica mostrou menor área, caracterizada pela aproximação das bordas (contração) com contornos irregulares e melhor presença de tecido de granulação como o que ocorreu no experimento com ácido linoléico em carneiros (MARQUES *et al.*, 2004).

O estudo realizado com ácidos graxos poliinsaturados mostrou tendência de diminuição da área nos primeiros dez dias de tratamento. Mostrou ao seu final que PUFAS podem ter um papel relevante na cicatrização de feridas (CARDOSO *et al.*, 2004).

A proliferação (fibroplasia e formação da matriz) foi demonstrada por estudiosos no passado como extremamente importante na formação do tecido de granulação. Este depende do fibroblasto, que produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases (MANDELBAUM *et al.*, 2006). Nesta fase a presença de vitamina A nos compostos teste, água de coco (Amorfa e Cristalina-aquosa, Amorfa e Cristalina-gel) e Triglicerídeo foi importante, pois autores encontraram usando a mesma vitamina, que ela atuou na estimulação dos fibroblastos, na deposição de colágeno e formação de tecido conjuntivo (De NARDI *et al.*, 2004).

O reparo das feridas por segunda intenção mostrou que a contração pode ter sido responsável pela redução da área nos três grupos de tratamentos, concordando com estudo em que, a contração pode reduzir 62% da área de superfície do defeito cutâneo (MANDELBAUM *et al.*, 2006).

No modelo aqui apresentado houve maior reparo do ponto de vista clínico macroscópico, contribuindo para que a área cicatrizada fosse menor no 12^o dia de tratamento. Entretanto, a eficácia dos compostos Testes foi de: Amorfa-aquosa 5,4987%, Cristalina-aquosa 7,9104%; Amorfa-gel 9,1539%, Cristalina-gel 8,0184% e de Triglicerídeo 7,0977%. Por outro lado, a eficácia do tratamento Referência foi menor ainda, apenas 0,5775%.

No início da fase inflamatória do processo de cicatrização pode ocorrer aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma, hemácias, monócitos e macrófagos (MARTINS *et al.*, 2006).

Na cascata de cicatrização existe a participação de células com papel fundamental, em que se resolveu destacar e quantificar neste estudo: os neutrófilos que são células polimorfonucleares, ou seja, possuem núcleo binobulado, trilobulado ou pentalobulado. São os neutrófilos os mais numerosos no sangue, fazendo parte de aproximadamente 65% dos leucócitos do sangue. São os principais fagócitos do sangue e participam da reação inflamatória, sendo sensíveis a agentes quimiotáticos liberados pelos mastócitos e basófilos. Agentes quimiotáticos são substâncias que atraem os neutrófilos até o local, ajudando no movimento em direção ao agente agressor. A leucocitose de neutrófilos pode indicar uma infecção bacteriana, pois estes leucócitos participam da fagocitose de bactérias (JUNQUEIRA, 2005).

Os neutrófilos por serem células piogênicas, dão o aspecto purulento nas inflamações, que nada mais é do que substâncias bacterianas, bactérias mortas, sangue, mas principalmente neutrófilos que morrem em combate (JUNQUEIRA, 2005).

No estudo aqui realizado com os três tratamentos não houve células piogênicas, o que sugere concluir que não houve infecção nas feridas.

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo, originados a partir de células mesenquimatosas, que são células bem diferenciadas ou indiferenciadas que dão origem as células do tecido conjuntivo. Possui citoplasma rico em grânulos que se coram fortemente pelos corantes histológicos de característica básica como o azul de toluidina (mostrando um aspecto característico de coloração, a metacromasia) que são os basófilos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; JUNQUEIRA, 2005).

A principal função dos mastócitos é armazenar potentes mediadores químicos da inflamação, como a histamina, heparina, fator quimiotático dos eosinófilos, SRS-A, que é a substância de reação lenta da anafilaxia, que tem como efeito produzir contração lenta da musculatura lisa, serotonina e fatores quimiotáticos dos neutrófilos. É uma célula própria do tecido conjuntivo, participa de reações de hipersensibilidade, na qual chama os leucócitos até o local e cria uma vasodilatação. É a principal célula responsável pelo choque anafilático (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; JUNQUEIRA, 2005).

Neste estudo os mastócitos foram corados pelo azul de toluidina e quantificados por *software* específico (FECHINE-JAMACARU, 2006). Não houve resultado estatisticamente significativo com as três substâncias teste: água de coco

nas formas Amorfa e cristalina-aquosa, Amorfa e cristalina-gel e com o composto Triglicerídeo. Sendo assim, pode-se considerar que, estas substâncias neste experimento, não induziram hipersensibilidade.

Os eosinófilos são leucócitos granulócitos encontrados em pequena quantidade, aproximadamente 3%, no sangue. É binucleado e seu citoplasma possui grânulos específicos que se coram pela eosina (acidófilos) que são lisossomas, que são ricos em fosfatases ácidas. As nucleases presentes são as ribonucleases e as desoxiribonucleases que dirigem o RNA e o DNA respectivamente. Tem função de fagocitar bactérias ou qualquer outro material estranho, mas sua principal função não é a fagocitose, mas sim a exocitose da proteína básica maior. Esta proteína é rica em arginina e contribui muito para a acidofilia dos grânulos desta célula. Ela é tóxica para parasitas de humanos e causam sua morte. Estão também presentes em reações de hipersensibilidade no organismo. O eosinófilo chega ao local da reação para inibi-la através da liberação de histaminase e aril sulfatase B que destroem a histamina e a substância de reação lenta da anafilaxia respectivamente, que são produtos inflamatórios liberados pelos mastócitos ou basófilos sensibilizados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; JUNQUEIRA, 2005).

Visto isso, este estudo não encontrou dados estatisticamente significantes quando avaliou eosinófilos nos preparados histológicos corados em H.E. e vistos ao microscópio, quantificados pelos escores de Myers (1961), demonstrando e reforçando que não houve hipersensibilização pelas substâncias nos tratamentos aqui realizados.

Na cicatrização de feridas, certos fatores de crescimento como o fator básico de fibroblastos, o fator de crescimento derivado de plaquetas, ligam-se a seus respectivos receptores na membrana celular do fibroblasto. Fibroblastos ativados que resultam da cascata de ativação decorrente mostram níveis aumentados de motilidade celular quimiotática, proliferação celular e síntese de colágeno. Os miofibroblastos (fibroblastos contráteis) são células envolvidas na contração das feridas.

Neste estudo denominou-se *GR* a contração e a reepitelização, como reparo da área da lesão, nos três tratamentos, tendo as feridas delimitadas e quantificadas por *software* específico (FECHINE-JAMACARU, 2006).

Schirato *et al.* (2006) realizou experimento com polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L (goma do cajueiro) e ácido ascórbico utilizando as

colorações H.E. e tricrômico de Masson, em que no 2^o dia evidenciaram-se presença de tecido de granulação vascular, presença de infiltrado de leucócitos polimorfonucleares, neovascularização e crosta. Entre o 3^o e o 5^o dias verificaram inúmeros fibroblastos na derme e presença de neovascularização. Encontraram características de tecido de granulação, o qual apresentava um padrão vascular nas feridas tratadas com vitamina C. No 12^o dia observaram a formação de tecido de granulação fibrovascular e presença de tecido fibroso com pobre organização de fibras colágenas no grupo tratado com ácido ascórbico.

No estudo aqui realizado somente o tratamento com a água de coco liofilizada continha em seus elementos o ácido ascórbico, foi também avaliado pela coloração do tricrômico de Masson para neovascularização e não apresentou achados estatisticamente significantes.

Estudo do ácido ascórbico em cicatrização de ferida comparando a deficiência do efeito deste, com a acumulação de reparo de colágeno em área vascular (parede abdominal) com uma área relativamente avascular (olho) no mesmo animal conseguiu melhor resultado na área vascularizada (GEEVER E LEVENSON, 1960; LEVENSON, 1994).

Este estudo utilizou dois *softwares* específicos, um para realizar a planimetria e outro para determinação de parâmetros histomorfométricos, como a presença de mastócitos, análise em percentual da densidade de colágeno e da densidade vascular.

Os cortes corados com Azul de Toluidina para quantificação de mastócitos no *software* específico as substâncias: água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa, Amorfa e Cristalina-gel e Triglicerídeo, não evidenciaram reação de hipersensibilidade, portanto não foram estatisticamente significantes.

O colágeno é a mais abundante proteína do tecido conjuntivo. Cada molécula possui três subunidades polipeptídicas, que são as cadeias α enoveladas juntas, na forma de uma tríplice hélice. Existem ligações cruzadas covalentes dentro e entre as cadeias α constituintes que conferem grande força tênsil à molécula. O colágeno tipo I é responsável por aproximadamente 90% do colágeno total do corpo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; JUNQUEIRA, 2005).

Neste estudo, os cortes foram corados com Tricrômico de Masson, para quantificação específica de percentual de colágeno, mas também foi utilizado aqui, para quantificação de percentual da densidade vascular. Avaliou colágeno através

de *software* específico (FECHINE-JAMACARU, 2006), que quantificou em pixels e em mm² no 12^o dia de tratamento, teve achados estatisticamente significantes assim descritos: no experimento Amorfa e Cristalina-aquosa, a quantificação de colágeno dos preparados histológicos Amorfa-aquosa (P < 0,01) em relação ao Controle. No experimento Amorfa e Cristalina-gel para quantificação de colágeno, as duas substâncias tiveram (P < 0,05) em relação ao Controle. Enquanto o grupo Triglicerídeo a quantidade de colágeno foi significativamente maior que a observada no grupo Controle (P < 0,01).

Quanto à quantificação de densidade vascular, ao 12^o no *software* específico, as substâncias dos grupos Amorfa e Cristalina-aquosa e Amorfa e Cristalina-gel não tiveram dados estatisticamente significantes. Enquanto o grupo Triglicerídeo teve achados estatisticamente significante (P < 0,01) em relação ao Controle.

Brito *et al.* (2003) avaliaram o efeito da aplicação tópica da fibronectina em feridas duodenais de ratos nos dias 5, 7 e 10 dias. Utilizaram as colorações H.E. e tricrômico de Masson nos cortes histológicos e através de imagens digitais, quantificaram em pixels em um *software*. O sistema quantificou colágeno, células inflamatórias, fibroblastos e área de necrose. Os dados foram significantes para o uso tópico de fibronectina em feridas duodenais suturadas, em que melhoraram a cicatrização mediante o incremento no aparecimento de fibroblastos, colágeno e tecido de granulação.

Vieira (2006) estudou o efeito do laser de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas experimentais usando um modelo de avaliação no 3^o, 7^o e 14^o dias de tratamento. Encontrou neutrófilos mais predominantes ao 3^o dia de tratamento, inflamação tecidual reduzida no 7^o dia, que desapareceu no 14^o dia e apresentou 100% de reepitelização. Quanto à avaliação de edema, formação de fibras colágenas e infiltrado inflamatório, não detectou diferenças significantes. As análises foram realizadas com o programa *GraphPad Prism 4.0*.

Neste estudo as análises também foram realizadas utilizando GraphPad Prism[®] versão 5.0 para Windows[®] e encontrou-se resultado estatisticamente significativo (P<0,01) para o composto Triglicerídeo em relação aos grupos Controle e Referência para quantificação de densidade vascular.

Santos *et al.* (2006) avaliaram em estudo experimental a cicatrização de feridas cutâneas em ratos, utilizando extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L (pião

roxo), com protocolo de 7, 14 e 21 dias. A análise macroscópica foi realizada por planigrafia digital e a análise histológica, tomando como parâmetro a proliferação vascular, células polimorfonucleares e mononucleares, proliferação fibroblástica, colagenização e reepitelização. Encontraram no 7^o dia, exudação plasmática com formação de crostas superficiais. Após, mais espessamento da crosta, no 14^o dia ela se destacou, evoluindo para tecido de granulação e epitelização completa. No 21^o dia houve surgimento de novos pêlos ao redor da lesão. A proliferação fibroblástica foi mais acentuada no 7^o dia. A colagenização foi maior no 7^o dia e 14^o dia. A reepitelização foi significativamente melhor ao 7^o dia. Embora mostrando melhora histológica com o uso da *Jatropha gossypifolia* L (pião roxo), não houve diferença significativa entre os grupos nas variáveis analisadas.

Neste estudo, na análise ao 12^o dia, dos preparados histológicos corados em H.E. e tricrômico de Masson dos três tratamentos aqui realizados, também foram evidenciadas a presença de folículos pilosos.

Martins *et al.* (2003) avaliaram lesões experimentais provocadas em pele de coelho, tratadas por 3 dias com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina fulica*. O experimento durou 3 dias e encontraram em seus cortes histológicos, corados pelo tricrômico de Masson, extensa área de proliferação vascular e muitas células inflamatórias. Observaram a presença de crosta, mas lembram que a formação desta em uma ferida cutânea, favorece o processo de reparo e que o exudato promove sua desagregação e desenvolvimento de microorganismos. Evidenciaram ainda muitos mastócitos, o que sugere reação alérgica. Revelaram a presença de fibras colágenas 72 horas após o tratamento, embora destaquem que segundo a literatura, a colagenização é demonstrada apenas ao final da primeira semana.

Neste estudo foi observada a presença de crostas nas feridas, mas de forma discreta nos três tratamentos e a contagem de mastócitos, não demonstrou reação de hipersensibilidade com as substâncias aqui testadas.

Martins (2003) realizaram estudo comparativo entre fitoterápicos *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão), *Canlendula officinalis* (calêndula) e *Symphytum officinale* (confrei) de uso tópico na cicatrização de pele de eqüinos, realizando a mensuração do halo da ferida a cada 3 dias até o 30^o dia, por meio da colocação de plástico transparente sobre a ferida e demarcação com caneta de retroprojektor. As mensurações foram avaliadas com planímetro para análise

estatística, que não apresentou resultado significativo. Realizaram a análise histopatológica e a retração centrípeta do halo da lesão nos primeiros 15 dias. Concluíram que o barbatimão revelou efeito benéfico (epitelização completa) no processo de cicatrização, seguido pela calêndula (epitelização parcial), enquanto o confrei mostrou a presença de microabcessos.

No modelo aqui desenvolvido em nenhum momento houve a presença de microabcessos com os tratamentos realizados com água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa, Amorfa e Cristalina-gel e com o composto Triglicerídeo e as mensurações do reparo das lesões foram realizadas através de *software* específico.

Santos *et al.* (2002) avaliaram o efeito da somatotropina sobre a cicatrização de feridas cutâneas em ratos utilizando modelo no 3^o, 7^o e 14^o dias para aferição. As substâncias controle e teste foram administradas por via subcutânea diariamente. Na análise microscópica avaliaram grau de epitelização, intensidade de reação inflamatória local (aguda, crônica, agudo-crônica), presença de tecido de granulação, neovascularização e fibrose. No 14^o dia não constataram epitelização com diferença significativa. A intensidade de reação inflamatória no 3^o dia foi considerada de intensidade moderada, no 7^o dia de 77,8% e no 14^o dia novamente de 77,8%, sem diferença significativa. O tipo de reação inflamatória no 3^o dia mostrou-se agudo-crônica em 88,9%. No 7^o dia agudo-crônica em 100% das feridas e no 14^o dia a reação inflamatória do tipo crônica aumentou para 33,3%, mas não demonstrou resultado significativo. A avaliação do tecido de granulação e neovascularização no 3^o dia foram de intensidade moderada em 55,6%. No 7^o dia evoluíram para acentuadas em 66,7%. No 14^o dia regrediram para escassas em 55,6% do tratamento, mas apesar disso não foram significantes.

Este estudo não encontrou resultados estatísticos significantes em relação à inflamação aguda e a crônica. Mas, em relação a tecido de granulação encontrou no experimento água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa resultado significativo para Cristalina-aquosa. E no experimento com o composto Triglicerídeo, este também foi estatisticamente significativo em relação ao Referência.

Medeiros *et al.* (1999) utilizaram o ácido hialurônico no tratamento tópico em queimaduras realizadas no dorso de ratos utilizando o protocolo de 3^o, 15^o e 30^o dias, utilizando o quadro de Myers (1961) para quantificação histológica e ao término da epitelização, para compararem as deformidades das tatuagens entre os grupos. Utilizaram para corar os cortes histológicos H.E. Conseguiram cicatrização no tempo

que variou de 28 a 32 dias e concluíram que o ácido hialurônico em uso tópico contribuiu para acelerar o tempo de cicatrização, melhorou a evolução histológica e o resultado estético, em queimaduras do dorso de ratos adultos.

O estudo aqui realizado não encontrou resultados estatisticamente significantes nos três tratamentos, quanto à regeneração epitelial, nos cortes histológicos corados em H.E. e quantificados por escores do quadro de Myers.

Cardoso *et al.* (2004) estudaram cicatrização de ferida cutânea com administração tópica de ácidos graxos essenciais (ácidos linolênico e linoleico) e não essencial (ácido oléico). As avaliações foram realizadas com 15 minutos, 3, 24 e 48 horas, 5, 10, 15 e 20 dias após a cirurgia. Avaliaram o processo por imunofluorescência, morfometria macroscópica e microscópica e detecção local de óxido nítrico. Encontraram alta produção de óxido nítrico aos 15 minutos com pico às 48 horas e menor edema até 48 horas. Tendência menor das áreas tratadas com o ácido linoleico nos 10 primeiros dias. Após 15 dias observaram completo fechamento da ferida. Além disso, mostraram que o ácido araquidônico e o ácido linoleico induzem menor produção de colágeno e ainda altos níveis de prostagladina E₂. Consideraram que PUFAs indicam um relevante papel na cicatrização de feridas, podendo serem incluídos na formulação de compostos para cicatrização.

Rahal *et al.* (2001) realizaram estudo tratando feridas induzidas em ratos, com pomada contendo óleo de fígado de bacalhau, extrato de confrei, extrato cítrico e óxido de zinco com protocolo de 3, 7, 14 e 21 dias processaram e coraram os fragmentos com H.E. e tricrômico de Masson, visando observar o processo inflamatório e cicatricial. Avaliaram no experimento neovasos, fibroblastos, neutrófilos, macrófagos, hemácias, fibras colágenas, fibrina e basófilos. No 3^o dia a avaliação mostrou intenso infiltrado inflamatório (neutrófilos, macrófagos, basófilos) associado à intensa hemorragia e presença de fibrina. No 7^o dia houve presença de fibroblastos e diminuição de neutrófilos. No 14^o dia, presença de neovasos, fibroblastos e fibras colágenas. No 21^o dia apresentou padrão cicatricial bem definido e epitelização completa da epiderme.

Neste estudo, também foram observados dados estatisticamente significantes para densidade de colágeno, nos três experimentos, que foram quantificados pelo *software* específico, mas nosso protocolo foi até o 12^o dia de tratamento.

Tuji *et al.* (2005) realizaram estudo avaliando o efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação tecidual em ratos. Utilizaram o protocolo de avaliação nos dias 4, 7, 13 e 21 dias. Coraram os fragmentos da ferida com H.E. e azul de toluidina, para análise morfológica e histoquímica observaram no 4^o dia crosta de material necrótico. No 7^o dia predominavam células inflamatórias entre a crosta e o tecido de granulação. No 13^o dia a ferida era mais extensa, ainda com tecido necrótico. O tecido de granulação encontrava-se menos fibroso, com maior quantidade de fibroblastos. No 21^o dia evidente atraso no processo de reparação tecidual. 48 horas pós cirurgia foi administrado intraperitonealmente o selenito de sódio nos animais, com a finalidade de ação radioprotetora no processo de reparação tecidual.

No estudo aqui realizado, em nenhum momento foi observada a presença de tecido necrótico nas feridas realizadas nos três experimentos com água de coco Amorfa e Cristalina-aquosa, Amorfa e Cristalina-gel e no composto Triglicérido.

Cruz *et al.* (2004) realizaram estudo comparativo entre os efeitos do ácido hialurônico e do galactano ácido purificado dos ovos do molusco *Pomacea sp* na cicatrização de feridas intestinais em ratos nos dias 5, 10 e 21 dias. Os cortes histológicos corados em H.E. e quantificados em escores pelo quadro de Myers (1961), para determinar níveis de necrose, abscesso, neutrófilos, monócitos, linfócitos, tecido de granulação e colágeno, com resultado estatisticamente significativo. A graduação histológica foi mais significativa para os grupos ácido hialurônico e galactano ácido. Este último estimulou o aparecimento de macrófagos, células gigantes e aumentou a concentração de colágeno na área de ferida quando comparado ao ácido hialurônico. Concluíram que o uso tópico de galactano ácido em feridas intestinais promoveu a antecipação de eventos importantes para cicatrização de feridas.

No estudo aqui apresentado a autora modificou o quadro de Myers (1961) retirando abscesso, monócitos, linfócitos e necrose, substituindo-os por neutrófilos, eosinófilos e neovascularização, por considerar mais pertinentes à realização deste estudo.

Tanaka *et al.* (2005) realizaram avaliação do efeito radioprotetor da carnosina (β -alanil-1-histidina) no processo de cicatrização em ratos, com protocolo de 4, 7, 14 e 21 dias de tratamento. Utilizaram as colorações de tricrômico de Mallory, Picrosirius e azul de toluidina encontrando no 4^o dia do experimento um

aumento da ferida, necrose, fibrina, coagulação. Infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e linfócitos. No 7^o dia redução da área da ferida, crosta, tecido de granulação, proliferação de fibroblastos e discreta formação capilar. No 14^o dia área coberta por epitélio, formação de queratina, demonstrando maturação de tecido epitelial, tecido de granulação, poucos fibroblastos, vasos capilares e fibrose. No 21^o dia, completa cicatrização das feridas. Concluíram que a carnosina é uma substância radioprotetora efetiva.

Neste estudo fez-se também a coloração dos cortes histológicos pelo tricrômico de Mallory, mas esta ficou tênue, não possibilitando a calibração do *software* para o que se pretendia quantificar. Então, resolveu-se realizar novos cortes histológicos e corá-los pelo tricrômico de Masson, com resultado para quantificação de colágeno e angiogênese.

Este estudo procurou mostrar em estudo experimental mais duas opções de tratamento para cicatrização de feridas cutâneas. Sabe-se que tratá-las consiste em busca permanente de produtos mais eficazes, com menor período de tempo e menor custo. As pesquisas são constantes e já existem trabalhos publicados com estudos de células tronco para cicatrização de feridas cutâneas (CHA *et al.*, 2007) e terapia gênica e cicatrização de ferida (EMING *et al.*, 2007).

Considerando que as publicações sobre cicatrização de feridas nas bases de dados da Medline e Lilacs cresceram vertiginosamente em vários países, no Brasil, somente a partir da década de 1990 com a chegada de curativos tidos como “modernos” fabricados em sua maioria por indústrias multinacionais à base de ácidos graxos, alginatos de cálcio, carvão ativado e prata, filmes semipermeáveis, colágeno biológico, fatores de crescimento, hidrogel, hidrocolóides, enzimas proteolíticas, sulfadiazina de prata, acetato de celulose permeável ao vapor, protetores cutâneos, membranas permeáveis ao vapor, biopolímeros e gases não aderentes impregnadas como: petrolato, polivinilpirrolidone (PVPI) A 10%, ácido graxo essencial e aloe vera, e as não aderentes não impregnadas é que este assunto passou a ser alvo de estudos e pesquisas.

As publicações de tecnologias e protocolos para o tratamento de feridas constituem relatos isolados sobre um ou outro tipo de produto ou cobertura para alguns tipos de feridas (limpas, infectadas, crônicas, queimaduras,...), não constituindo estudos com frequência, que proporcionem evidências precisas quanto

ao custo/benefício, conforto e bem estar do paciente, maior eficácia, além da adequação e acessibilidade à nossa população.

Sendo assim, este estudo propôs um experimento com um recurso natural, água de coco liofilizada nas formas Amorfa e Cristalina aquosa e gel, que favoreceram o desenvolvimento de fibras colágenas e outro com o Dersani[®] que de forma mais efetiva favoreceu o desenvolvimento de fibras colágenas, de densidade vascular e de tecido de granulação.

6 CONCLUSÃO

O Dersani[®] e a água de coco liofilizada, nas formas Amorfa e Critalina-aquosa e Amorfa e Critalina-gel, aumentaram significativamente a deposição de colágeno na cicatrização por segunda intenção. O Dersani[®] isoladamente, intensificou a neovascularização e, por conseguinte, o tecido de granulação. Portanto, podemos concluir que o Dersani[®] influenciou positivamente o processo cicatricial no modelo experimental utilizado neste estudo.

7 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J. A.; KLAGSBRUN, M. Modulation of wound repair by members of the fibroblast growth factor family. In: _____. **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. 2. ed. New York: Plenum, 1996. p. 195-248.

AMBROSE, J. A.; WEINRAUCH, M. Thrombosis in ischemic heart disease. **Arch. Intern. Méd.**, v. 156, p. 1382-1394, 1996.

AMOS, D. J.; TONKIN, A. M.; WHITE, H. D. New insights into the patogenesis, prevetion and management of acute coronary sindromys. **Aust. N. Z. J. Méd.**, v. 26, p. 344-348, 1996.

ANTONIADES, H. N. GALANOPOUOLOS, T.; NEVILLE-GOLDEN KIRITSY, C.P.; LYNCH, S.E. Expression of growth factor and receptor mRNAs in skin epithelial cells following acute cutaneous injury. **Am. J. Pathol.**, v. 142, p. 1099-1110, 1993.

ANY questions?: we publish below of questions and answers of general interest: coconut water as intravenous infusion. **Brit. Med. J.**, p. 525, 28 ago. 1965.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. 3. ed. Oxford: Blackwell, 1994. 620 p.

ASHCROFT, G. S.; HORAN, M. A.; FERGUNSON, N. W. The effects of ageing on wound healing: immunolocalisation of growth factors and their receptors in a murine incisional model. **J. Anat.**, v. 190, p. 351-365, 1997.

ASSOSIAN, R. K.; KOMORIYA, A.; MEYERS, C.A.; MILLER, D.M.; SPORN, M.B. Transforming growth fator-beta in human platelets: identification of a major storage site, purification, and characterization. **J. Biol. Chem.**, v. 158, p. 7155-7160, 1983.

AUERSVALD, A. **Estudo comparativo do efeito induzido pela aplicação do laser de CO₂ e do laser Erbium: Yttrium Aluminum Garnet, em pele de ratos**. 2001. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Médicas, Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, 2001.

BABIC, A. M.; CHEN, C. C.; LAU, L. F. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cells adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis *in vivo*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, p. 2958-2966, 1999.

BABIC, A. M. ; CHEN,C.C.; LAU,L.F. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA,v. 95, p. 6355-6360, 1998.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **J. Int. Med.**, v. 250, p. 91-104, 2001.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Braz. J. Pharmac. Sci.**, v. 41, n. 1, p. 1-25, jan./mar. 2005.

BEER, H. D.; FASSLER, R.; WENER, S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair. **Vitam. Horm.**, v. 59, p. 217-239, 2000.

BEER, H. D.; LONGAKER, M. T.; WENER, S. Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. **J. Invest. Dermatol.**, v. 109, p. 132-138, 1997.

BELPERIO, J. A. ; KEANE, M. P.; ARENBERG, D. A.; ADDISON, C. L.; EHLERT, J. E.; BURDICK, M. D.; STRIETER, R. M. CXC chemokines in angiogenesis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 68, p. 1-8, 2000.

BERNABEI, R.; LANDI, F.; BONINI, S.; ONDER, G.; LAMBIASE, A. POLA, R. ALOE, L. Effect of topical application of nerve growth-factor on pressure ulcers. **Lancet**, v. 354, p. 307, 1999.

BHATTACHARYA, S. K. Therapeutic methods for diarrhea in children. **World. J. Gastroentero.**, v. 6, n. 4, p. 497-500, 2000.

BLOTNIK, S. ; Peoples, G.E.; Freeman, M.R.E.; Eberlein, T.J.; Klagsbrun, M. 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, p. 2890-2894, 1994.

BRADHAM, D. M. ; IGARASHI, A.; POTTER, L.R.; GROTENDORST, G.R. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. **J. Cell. Biol.**, v. 114, p. 1285-1294, 1991.

BRANCO NETO, M.L.C.; RIBAS FILHO, J.M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M.A.; CZECZKO, N.G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V.R.; TEIXEIRA, H.M.; AGUIAR, L.R.F.. Evaluation of hydroalcoholic extract of Aroeira (*Shinus Terebinthifolius* Rddi) in the healing process of wound skin in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, p. 15-20, 2006. Suplemento 2.

BRANDT, E.; PETERSON, F.; LUDWIG, A.; EHLERT, J.E.; BOCK, J., FALD, H.D. The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, p. 471-478, 2000.

BREUHAN, K.; MANN, A.; MULLER, G.; WILHELMI, A.; SCHIRMARCHER, P.; ENK, A.; BLESSING, M. Epidermal overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces both keratinocyte proliferation and apoptosis. **Cell Grow. Different.**, v. 11, p. 111-121, 2000.

BREUING, K. ANDREE, C.; HELO, G.; SLAMA, J.; LIY, P.Y.; ERIKSSON, E. Growth factors in the repair of partial thickness porcine skin wounds. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 100, p. 657-664, 1997.

BRIGSTOCK, D. R. The connective tissue growth factor/cysteine-rich61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. **Endocr. Rev.**, v. 20, p. 189-206, 1999.

BRITANNICA CONCISE ENCYCLOPEDIA. **Coconut manufacturers**. Disponível em: <www.Alibaba.com>. Acesso em: 30 out. 2007.

BRITISH MEDICAL JOURNAL (ANY QUESTIONS? We publish below of questions and answers of general interest. Coconut Water as Intravenous Infusion), p.525, 28/08/1965).

BRITO, T. N. S.; ROCHA, I.R.M.; JATOBÁ, C.A.N.; SALES, M.P.; MEDEIROS, A.C.. Effect of topical application of fibronectin in duodenal wound healing in rats. **Acta Cir. Brás.**, v. 18, n. 2, p. 97-101, 2003.

BROWN, L. F. ; YEO,K.T.; BERSE,B.; YEO,T.K.; SENGER,D.R.; DVORAK,H.F.; VAN DE WATER,L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 1375-1379, 1992.

BUSSOLINO, F. Granulocyte and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. **Nature Med.**, v. 337, p. 461-463, 1989.

CAMPBELL-FALCK, D. T.; THOMAS, T.; FALCK, T.M.. The intravenous use of coconut water. **Amer. J. Emerg. Med.**, v. 18, n. 1, p. 108-111, 2000.

CARDOSO, C.R.B.; SOUZA, M.A.; FERRO,E.A.V.; FAVORETO Jr, S.; PENA, J.D.O.. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound Rep. Reg.**, v. 12, p. 235-243, 2004.

CARMELIET, P.; MOONS, L.; LUTTUN, A.; VINCENTI, V.; COMPERNOLLE, V.; DE MOL, M.; WU, Y.; BONO, F.; DEVY, L.; BECK, H.; SCHOLZ, D.; ACKER, T.; DIPALMA, T.; DEWERCHIN, M.; NOEL, A.; STALMANS, I.; BARRA, A.; BLACHER, S.; VENDENDRIESSCHE, T.; PONTEN, A.; ERIKSSON, U.; PLATE, K.H.; FOIDART, J.M.; SCHAPER, W.; CHARNOCK-JONES, S.; HICKLIN, D.J.; BERBERT, J.M.; COLLEN, D.; PERSICO, M.G. Synergism between vascular endothelial growth factors and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nature Med.**, v. 7, p. 575-583, 2001.

CHAVALITTAMRONG, B.; PIDATCHA, P.; THAVISRI, U. Electrolytes, sugar, calories, osmolarity and pH of beverages and coconut water. **Southesast. Asian J. Trop. Med. Pub. Health**, v. 13, p. 427-431, 1982.

CHA, J.; FALANGA, V. Stem cells in cutaneous wound healing. **Clin. Dermat.**, v. 25, p. 73-78, 2007.

CHEN, C. C.; MO, F. E.; LAU, L. F. The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 47329-46337, 2001.

CHIQUETTI JÚNIOR, A.; RODRIGUES, M. A. F.; DELFINO, V. D. A. An experimental model for the study of drug effects on cutaneous dealing. **Acta Cir. Brás.**, v. 22, n. 4, p. 317-321, 2007.

CHOI, B.M.; KWAK, H.J.; JUN, C.D.; PARK, S.D.; KIM, K.Y.; KIM, H.R.; CHUNG, H.T. Control of scarring in adult wounds using antisense transforming growth factor-beta 1 oligodeoxynucleotides. **Immunol. J. Cell Biol.**, v. 74, p. 144-150, 1996.

CHRISTOPHERSON, K.; HROMAS, R. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. **Stem Cells**., v. 19, p. 388-396, 2001.

CLARK, R. A. F. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations I. **J. Am. Acad. Derm.**, v. 13, p. 701-725, 1985.

CLARK, R. A. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. **Am. J. Med. Sci.**, v. 306, p. 42-48, 1993.

CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. **Cytok. Growth Fact. Rev.**, v. 8, p. 45-62, 1997.

COCONUT oil and weight loss. Disponível em: <<http://www.coconut-info.com/weight-loss.htm>>. Acesso em: 28 out. 2007.

COCONUT palm. Disponível em: <<http://www.answers.com/coconut+palm+?cat=technology>>. Acesso em: 29 out. 2007.

COELHO, O. R.; ALMEIDA, A; CIRILLO, W; UETI, O.M.Y. Glicoproteína IIb/IIIa em isquemia miocárdica. **Rev. Soc. Card. Est. S. P.**, v. 8, p. 338-343, 1998.

COFFEY, R. J. Jr.; BASCOM, C. C.; SIPES, N. J.; GRAVES-DEAL, R.; WEISSMAN, B. E.; MOSES, H. L. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor b. **Mol. Cell. Biol.**, v. 8, p. 3088-3093, 1988.

COHEN, K; MAST, B. A. Models of wound healing. **J. Trau.**, v. 30, n. 12, p. 149-155, 1990.

COLLER, B. S. Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. In: FOZZAR, H. A.; HABER, E.; JENNINGS, R.B.; KATEZ, A.M.; MORGAN, H.E. **The heart and cardiovascular system: scientific foundations**. 2. ed. New York: Haven, 1992. v. 1. p. 219-273.

COMOGLIO, P. M.; BOCCACCIO, C. Scatter factors and invasive growth. **Sem. Cancer Bio.**, v. 11, p. 153-165, 2001.

CONSTATINOU, J.; REYNOLDS, M.L.; WOOLF, C.J.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; FITZGERALD, M.. Nerve growth factor levels in developing rat skin: up regulation following skin wounding. **Neuroreport**, v. 5, p. 2281-2284, 1994.

CONTRAN, R. S; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 44-100.

COSTA, A. C. da; CHAVES, P. R. **Man. Téc. Hist.: trabalhos práticos**. 3. ed. Lisboa: Portugália, 1943. 544 p.

CRIBBS, R. K.; HARDING, P.A.; LUQUETTE, M.H.; BESNER, G.R. Endogenous production of heparin-binding EGF-like growth factor during murine partial-thickness burn wound healing. **J. Burn Care Rehab.**, v. 23, p. 116-125, 2002.

CRUZ, A.K.M.; PEREIRA, W.O.; SANTOS, E.A.; CARVALHO, M.G.F.; MEDEIROS, A.C.; OLIVEIRA, F.W.. Comparative study between the effects of hyaluronic acid and acid galactan purified from eggs of mollusk *Pomacea sp* in wound healing. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 1, p. 13-17, 2004.

CRUZ, M. R. R.; MORIMOTO, I. M. I. Nutritional intervention in the surgical treatment for morbid obesity: results of a differentiated protocol. **Ver. Nutr.**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 263-272, abr./jun. 2004.

D'AGOSTINI, D. **Obtenção de lipídios estruturados por intereterificação de triacilglicerois de cadeia média e longa**. 2001. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2001.

D'SOUZA, P. J.; PAJAK, A.; BALAZSI, K.; DAGNINO, L. Ca²⁺ and BMP-6 signaling regulate E2F during epidermal keratinocyte differentiation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 23531-23538, 2001.

DANILENKO, D.M.; RING, B.D.; TARPLEY, J.E.; MORRIS, B.; VAN, G.Y.; MORAWIECKI, A.; CALLAHAN, W.; GOLDENBER, G.M.; HERSHENSON, S.; PIERCE, G.F. Growth factors in porcine full and partial thickness burn repair: differing targets and effects of keratinocyte growth factor, platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, and neu differentiation factor. **Am. J. Pathol.**, v. 147, p. 1261-1277, 1995.

DAVIES, M. J. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. **Circulation**, v. 82, p. 38-46, 1990.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; BAUDI, D.L.K.; CASTRO, J.H.T. Secondary cicatrization in dermoepidermal wounds treated with essential fatty acids,

vitamins A and E, soy lecithin and polynylpyrrolidone-iodine in dogs. **Arch. Vet. Sci.**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2004.

DEMETRIOU, A. A.; SEIFTER, E.; LEVENSON, S. M. Effect of vitamin A and citral on peritoneal adhesion formation. **J. Surg. Res.**, v. 17, p. 325-329, 1974.

DERVICHIAN, D. G. The surface properties of fatty acid and allied substances. In: HOLMAN, R.T.; LUNDBERG, W.A.; MALKIN, T. **Chemistry of fats and other lipids**. London: Academic Press, 1954. v. 2. p.193-242.

DESMOULIERE, A.; GEINOZ,A.; GABBIANI,F.; GABBIANI, G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle action expression in granulation tissue myfibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. **J. Cell Biol.**, v. 122, p. 103-111, 1993.

DEVALARAJA, R. M.; NANNEY,L.B.; QIAN,Q.; DU, J.; YU, Y.; DEVALARAJA, M.N.; RICHMOND,A. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. **J. Invest. Dermat.**, v. 115, p. 234-244, 2000.

DI PIETRO, L. A. ; BURDICK,M., LOW,Q.E.; KUNKEL, S.L.; STRIETER,R.M. MIP 1 alpha as a critical macrophage chemo attractant in murine wound repair. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 1693-1698, 1998.

DI PIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. **Shock**, v. 4, p. 233-240, 1995.

ECKERSLEY, J. R. T.; DUDLEY, H. A. F. Wound and wound healing. **Brit. Med. Bull.**, v. 44, n. 2, p. 423-36, 1988.

EFRON, P. A.; MOLDAWER, L. L. Cytokines and wound healing:the role of cytokine and anticytokine therapy in the repair response. **J. Burn Care Rehab.**, v. 25, n. 2, p. 149-60, 2004.

EHRLIC, H. P.; HUNT, T. K. Effects of cortisone and vitamin A on wound healing. **Ann. Surg.**, v. 167, p. 324-328, 1968.

EISEMAN, B. Intraveous infusion of coconut water. **Arch. Surg.**, v. 68, p. 167-178, 1954.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Gene therapy and wound healing. **Clin. Dermat.**, v. 25, p. 79-92, 2007.

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, p. 1849-1860, 1998.

FAILLA, C. M.; ODORISTO, T.; CIANFARANI, F.; SCHIETROMA, C.; PUDDU, P.; ZAMBRUNO, G. Placenta growth factor is induced in human keratinocytes during wound healing. **J. Invest. Dermat.**, v. 115, p. 388-395, 2000.

FECHINE-JAMACARU, F. V. **Quantificação de angiogênese corneana *in vivo* através de processamento de imagens digitais**. 2006. 292 f. Doutorado (Cirurgia) - Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FOXMAN, E. F.; CAMPBELL, J. J.; BUTCCHER, E. Multistep navigation and combinatorial control of leukocyte chemotaxis. **J. Cell Biol.**, v. 139, p. 1349-1360, 1997.

FRANK, S.; HÜBNER,G.; BREIER,G.; LONGAKER,M.T.; GREENHALGH,D.G.; WERNER, S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 12607-12613, 1995.

FRAZIER, K. WILLIAMS, S.; KOTHAPALLI, D.; KLAPPER, H.; GROTENDORST, G. R. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. **J. Invest. Dermat.**, v. 107, p. 404-411, 1996.

GABBIANI, G.; RAYAN, G. B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and possible role in wound contraction. **Experientia**, v. 27, n. 5, p. 549-550, 1970.

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

GAILIT, J.; WELCH, M. P.; CARK, R. A. TGF-beta 1 stimulates expression on keratinocytes integrins during re-epithelialization of cutaneous wound. **J. Invest. Dermat.**, v. 103, p. 221-227, 1994.

GALE, N. W.; YANCOPOULOS, G. D. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins and ephrins in vascular development. **Genes Dev.**, v. 13, p. 1055-1066, 1999.

GALLUCCI, R. M.; SIMEONOVA,P.P.; MATHESON, J.M.; KOMMINENI,C.; GURIEL,J.L.; SUGAWARA,T.; LUSTER,M.I. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. **FASEB J.**, v. 14, p. 2525-2531, 2000.

GARROS, I. C.; CAMPOS, A.C.L.; TÂMBARA, E.M.; TENÓRIO, S.B.; TORRES, O.J.M.; AGULHAM, M.A.; ARAÚJO, A.C.F.; SANTIS-ISOLAN, P.M.B.; OLIVEIRA, R.M.; ARRUDA, E.C.M. Extract from *Passiflora edulis* on the healing of open wounds in rats: morfometric and histological etudy. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, p. 55-65, 2006. Supplement 3.

GARTNER, M. H.; BENSON, J. D.; CALDWELL, M. D. Insulin like growth factors I and II expression in the healing wound. **J. Surg. Res.**, v. 52, p. 389-394, 1992.

GERSZTEN, R. E.; GARCIA-ZEPEDA, E.A.; LIM, Y.C.; YOSHIDA, M.; DING, H.A.; GIMBRONE, M.A.; LUSTER, A.D.; LUSCINKAS, F.W.; ROSENZWEIG, A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v. 398, p. 718-723, 1999.

GIBRAN, N. S.; ISIK, F.F.; HEIMBACH, D.M.; GRODON, D. Basic fibroblast growth factor in the early human burn wound. **J. Surg. Res.**, v. 56, p. 226-234, 1994.

GOEBELER, M.; ISIK, F.F.; HEIMBACH, D.M.; GRODON, D. The chemokine repertoire of human dermal microvascular endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines. **J. Invest. Dermatol.**, v. 108, p. 445-451, 1998.

GOMES, O. M. **Cirurgia experimental**. São Paulo: Sarvier, 1978. Cap. 10, p. 93-97.

GREENHALGH, D.G. The role of growth factors in wound healing. **J. Trauma**, v. 41, p. 159-167, 1996.

GREENWAY, D. L. A.; DYKE, K. G. H. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 115, p. 233-245, 1979.

GREEVER, E. F.; LEVENSON, S. M. Pathogenesis of the collagen defect in experimental scurvy. **AMA Arch. Ophthalmol.**, v. 63, p. 813-820, 1960.

GROTENDORST, G. R.; SOMA, Y.; TAKEHARA, K.; CHARETTE, M. EGF and TGF- α are potent chemoattractants for endothelial cells and EGF-like peptides are present at sites of tissue regeneration. **J. Cell Physiol.**, v. 139, p. 617-623, 1989.

GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprouting superficial loops of granulation tissue I: quantitative study of the vascular volume. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v. 1, p. 6-8, 1987.

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

GUO, L.; DEGENSTEIN, L.; FUCHS, E. Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing. **Genes Dev.**, v. 10, p. 165-175, 1996.

HARRIS, I. R.; YEE, K.C.; WALTERS, C.E.; CUNLIFE, W.J.; KEARNEY, J.N.; WOOD, E.J.; INGHAM, E. Cytokine and protease levels in healing and non-healing chronic venous leg ulcers. **Exp. Dermatol.**, v. 4, p. 342-349, 1995.

HASAN, W.; ZHANG, R.; LU, M.; WARN, J.D.; SMITH, P.G. Coordinate expression of NGF and α -smooth muscle actin RNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. **Cell Tissue Res.**, v. 300, p. 97-109, 2000.

HARSUM, S.; CLARKE, J. D.; MARTIN, P. A reciprocal relationship between cutaneous nerves and repairing skin wounds in the developing chick embryo. **Dev. Biol.**, v. 238, p. 27-29, 2001.

HATANAKA, E.; CURI, R. Fatty acids and wound healing: a review. **Rev. Brás. Farm.**, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.

HELDIN, C. H.; ERIKSSON, U.; O STMAN, A. New emmbers of the plateled-derived growth factor family of mitogens. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 398, p. 284-290, 2002.

HELDIN, C. H.; WESTRMARK, B. Mechanism of action and in vivo role of plateled-derived growth facto. **Physiol. Rev.**, v. 79, p. 1283-1316, 1999.

HOWDIESHELL, T. R.; CALLAWAY,D.; WEBB,W.L.; GAINES,M.D.; PROCTER,C.D. Jr.; SATHYANARAYANA POLLOCK,J.S.; BROCK,T.L.; McNEIL,P.L. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. **J. Surg. Res.**, v. 96, p. 163-182, 2001.

HUANG, J. S.; WANG,Y.H.; LING,T.Y.; CHUANG,S.S.; JHNSON, F.E.; HUANG,S.S. Synthetic TGF-beta antagonist accelerates wound healing and reduces scarring. **FASEB J.**, v. 16, p. 1269-1270, 2002.

HUBNER, G.; HU, Q.; SMOLA,H.; WERNER, S. Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. **Dev. Biol.**, v. 173, p. 490-498, 1996.

<http://www.coconut-info.com/weight-loss.htm> Acesso em 28/10/2007

HUNT, T. K.; EHRLICH, H. P.; GARCIA, J. Effect of vitamin A on reversing the inhibitory effect of cortisone on healing of open wound, in animals and man. **Ann. Surg.**, v. 170, p. 633-641, 1969.

HUTSON, J. M.; NIALLM,M.; EVANS,D.; FOWLER,R. Effect of salivary glands on wound contraction in mice. **Nature**, v. 279, p. 793-795, 1979.

HUYBRECHTS-GODIN, G.; PEETER-JORIS, C.; VAES, G. Macrophage-fibroblast interaction in collagenase production and cartilage degration. **Biochem. J.**, v. 184, p. 643-650, 1979.

IGARASHI, A.; OKOCHI, H.; BRADHAM, D.M.; GROTENDORST, G.R. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblast and during wound repair. **Mol. Cell. Biol.**, v. 4, p. 637-645, 1993.

JENNISCHE, E.; SKOTTNER, A.; HANSSON, H. A. Dynamic changes in insulin like growth factor immunoreactivity correlate to repair events in rat ear after freeze-thaw injury. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 47, p. 193-201, 1987.

JENNINGS, L. K.; PHILLIPS, D. R. Purification of GP IIb/IIIa from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium – dependent GP IIb/IIIa complex. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 10456-10458, 1982.

JOHNSTON, D. E. Wound healing in skin. **Vet. Clin. North Am.: Small Animal Practica**, v. 20, n. 1, p. 1-25, 1990.

JONES, S. A.; WOLF, M.; QIN, S.; MACKAY, C.R.; BAGGIOLINI, M. Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 93, p. 6682-6686, 1996.

JUNQUEIRA, L. C. U.; MARTINS, E. O. **Atlas de Anatomia do Rato**. São Paulo: Tipografia Rossolillo, 1947. p. 106-8.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 92-112.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Biologia Estrutural dos Tecidos – Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 37-48.

KAGOMA, P.; BURGER, S.N.; SEIFTER, E.; LEVENSON, S.M.; DEMETRIOU, A..A. The effect of vitamin E on experimentally induced peritoneal adhesions in mice. **Arch. Surg.**, v. 120, p. 949-951, 1985.

KAISER, S.; SCHIRMACHER, P.; PHILIPP, A.; PROTSCHKA, M.; MOLL, I.; NICOL, K.; BLESSING, M. Induction of bone morphogenetic protein-6 in skin wounds: delayed reepithelialization and scar formation in BMP-6 overexpressing transgenic mice. **J. Invest. Dermat.**, v. 111, p. 1145-1152, 1998.

KIBE, Y.; TAKENAKA, H.; KISHIMOTO, S. Spatial and temporal expression of basic fibroblast growth factor protein during wound healing of rat skin. **British J. Dermatol.**, v. 143, p. 720-727, 2000.

KIETZMANN, M. Improvement and retardation of wound healing: effects of pharmacological agents in laboratory animal studies. **Vet. Dermat.**, v. 10, p. 83-88, 1999.

KIREEVA, M. L.; MO, F.E.; YANG, G.P.; LAU, L.F. Cyr61, a product of growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. **Mol. Cell. Biol.**, v. 16, p. 1326-1334, 1996.

KNIGHTON, D. R.; SILVER, I.; HUNT, T. K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surg.**, v. 90, p. 262-270, 1981.

KODICEK, E. The effect of unsaturated fatty acids, of vitamin D and other sterols on gram-positive bacteria. In: POPJAK, G. Le Breton E. **Biochem. Probl. lipids**. London: Butterworths; 1956. p. 401-6.

KOTHAPALLI, D.; FRAZIER, K.S.; WELPLY, A.; SEGARINI, P.R.; GROTENDORST, G.R. Transforming growth factor b induce anchorage-independent growth of NRK fibroblast via a connective tissue growth factor dependent signaling pathway. **Cell Growth Differ.**, v. 8, p. 61-68, 1997.

KUBERSKI, T. Appropriate technology: coconut water for the oral rehydration of childhood diarrheas. **N. Z. Med. J.**, v. 91, p. 390-392, 1980.

KUBERSKI, T.; ROBERTS, A.; LINEHAN, B.; BRYDEN, R.N.; TEBURAE, M.. Coconut water as a rehydration fluid. **N. Z. Med. J.**, v. 90, p. 90-98, 1979.

KURITA, Y.; TSUBOI, R.; UEKI, R.; RIFKIN, D.B.; OGAWA, H. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in wound healing sites of mouse skin. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 284, p. 193-197, 1992.

LAUER, G.; SOLLBERG,S.; COLE,M.; FLAMME,L.; STURZEBECKER,J.; MANN,K.; KRIEG,T.; EMING,S.A. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wound. **J. Invest. Dermatol.**, v. 115, p. 12-18, 2000.

LEFKOVITS, J.; PLOW, E. F.; TOPOL, E. J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 1553-1559, 1995.

LEVENSON, S. M. Wound healing: a personal odyssey. **Wound Rep. Reg.**, v. 2, p. 238-258, 1994.

LEVENSON, S. M.; SEIFTER, E. Influence of supplemental arginine and vitamin A on wound healing, the thymus and resistance to infection following injury. In: WINTERS, R. W.; GREENE, H. L. (Ed.). **Proceedings of First Annual Bristol-Myers Symposium on Nutritional Management of the Seriously Ill Patient: nutritional support of the seriously ill patient.** New York: Academic Press, 1983. V.1. Chap.5, p. 55-62.

LEWIN, G. R.; MENDELL, L. M. Nerve growth factor and nociception. **Trends Neurosci.**, v. 16, p. 353-359, 1993.

LI, A. K.; KOROLY,M.J.; SCHATTENERK,M.E.; MALT,R.A.; YOUNG,M. Nerve growth factor: acceleration of the rate of wound healing in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 4379-4381, 1980.

LISON, L. **Histochimie et citochimie animals: principes et méthodes.** Paris: Gauthier-Villais, 1960.

LOW, Q. E. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. **Am. J. Pathol.**, v. 159, p. 457-463, 2001.

LUSTER, A. D.; CARDIFF,R.D.; MACLEAN,J.A.; CROWE,K.; GRANSTEIN,R.D. Delayed wound healing and disorganized neovascularization in transgenic mice expressing the IP-19 chemokine. **Proc. Assoc. Am. Phys.**, v.110,p.183-196,1988.

LYNCH, S. E.; COLVIN, R. B.; ANTONIADES, H. N. Growth factors in wound healing: single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 640-646, 1989.

MAGALHÃES, M. P.; GOMES, F.S.; MODESTA, R.C.D.; MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 72-77, jan./mar. 2005.

MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, tissues and disease: principles of general pathology.** Cambridge: Blackwell Science, 1996. 974 p.

MANDARIN-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An. Acad. Brás. Cienc.**, v. 75, n. 4, p. 469-86, 2003.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. A. Cicatrization: current and auxiliary resources-Part 1. **An. Brás. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MANN, A.; BREUHANN, K.; SCHIRMACHER, P.; BLESSING, M. Keratinocyte derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation and vascularization. **J. Invest. Dermatol.**, v. 117, p. 1382-1390, 2001.

MARCHESE, C.; CHEDID, M.; DIRSCH, O.R.; CSAKY, K.G.; SANTANELLI, F.; LATINI, C.; LAROCHELLE, W.J.; TORRISI, M.R.; AARONSON, S.A. Modulation of keratinocyte growth factor and its receptor in re-epithelialising human skin. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 1369-1376, 1995.

MARIKOVSKY, M.; BREUING, K.; LIU, P.Y.; ERIKSSON, E.; HIGASHIYAMA, S.; FABER, P.; ABRAHAM, J.; KLAGSBRUN, M. Appearance of heparin-binding EGF-like growth factor in wound fluid as a response to injury. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 3889-3893, 1993.

MARIKOVSKY, M.; VOGT, P.; ERKSSON, E.; RUBIN, J.S.; TAYLOR, W.G.; JOACHIM, S.; KLAGSBRUN, M. Wound fluid-derived heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is synergistic with insulin-like growth factor-I for Balb/MK keratinocyte proliferation. **J. Invest. Dermatol.**, v. 106, p. 616-621, 1996.

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

MARTINS, M. F.; CAETANO, F.A.M.; SIRIO, O.J.; YIOMASA, M.M.; FIGUEIREDO, L.D.; PACHECO, P.. Evaluation of the *Achatina fulica*. **Braz. J. Vet. Res. An. Sci.**, v. 40, p. 213-218, 2003. Supplement.

MARTINS, N. L. P.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J.M.; HEIBEL, M.; BALDEZ, R.N.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, H.; MAZZA, M.; NASSIF, P.A.N.; WALLBACH, T.Z. Healing process in cutaneous surgical wounds in rats under the influence of *Orbignya phalerata* aqueous extract. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, p. 66-75, 2006. Supplement 3.

MARTINS, P. S. Comparison between phytotherapies on equine wound healing. **Arch. Vet. Sci.**, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2003.

MASSAGUÉ, J. TGF-beta signal transduction. **Annu. Review Biochem.**, v. 67, p. 753-791, 1998.

_____. The transforming growth factor-beta family. **Annu. Review Cell Biol.**, v. 6, p. 597-641, 1990.

MATSUDA, H.; KOYAMA, H.; SATO, H.; SAWADA, J.; ITAKURA, A.; TANAKA, A.; MATSUMOTO, M.; KONNO, K.; USHIO, H.; MATSUDA, K. Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 297-306, 1998.

MATSUOKA, J.; GROTENDORST, G. R. Two peptides related to platelet-derived growth factor are present in human wound fluid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 86, p. 4416-4420, 1989.

MCDONNELL, M. A.; LAW, B.K.; SERRA, R.; MOSES, H.L. Antagonistic effects of TGF-beta 1 and BMP-6 on skin keratinocyte differentiation. **Exp. Cell Res.**, v. 263, p. 265-273, 2001.

MCFARLANE, R. M.; DEYOUNG, G.; HENRY, R. A. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 35, p. 177-182, 1965.

MEDEIROS, A. C.; CHACON, D.A.; AIRES NETO, T.; LIMA, F.P.; AZEVÊDO, I.M.; TRINDADE, M.C. Effects of vitamins A and C on the healing of intestinal anastomosis of rats treated with corticosteroid. **Acta Cir. Brás.**, v. 18, p. 28-32, 2003. Supplement 1.

MEDEIROS, A. C.; RAMOS, A.M.O.; DANTAS FILHO, A.M.; AZEVEDO, R.C.F.; ARAÚJO, F.L.F.B. Topical treatment of rat burns with hyaluronic acid. **Acta Cir. Brás.**, v. 14, n. 4, Oct./Dec. 1999.

MENKE, N. B.; WARD, K.R.; WITTEN, T.M.; BONCHEV, D.G.; DIEGELMANN, R.F.. Impaired wound healing. **Clin. Dermatol.**, v. 25, p. 19-25, 2007.

MICERA, A.; VIGNETTI, E.; PICKHOLTZ, D.; REICH, R.; PAPPO, O.; BONINI, S.; MAQUART, F.X.; ALOE, L.; LEVI-SCHAFFER, F. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 98, p. 6162-6167, 2001.

MOCH, D.; SHEVA, T.; HEIHN, H.; SCHMIDT, D.; BUNTROC, P. The linoleic acid metabolite 2 Ds-hidroxi-10, 12 (E-Z) – octadecadienoic acid is a strong, proinflammatory mediator in an experimental wound healing model of the rat. **Biom. Biochem. Acta**, v. 49, p. 201-207, 1990.

MODULIN, M.; BEVILACQUA, R. G.; RUY, G. Cicatrização das feridas: síntese das aquisições recentes. **Rev. Brás. Clín. Terap.**, v. 14, n. 6, p. 208-213, 1985.

MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 85, p. 4894-4897, 1988.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MORI, R.; KONDO, T.; NISHIIE, T.; OHSHIMA, T.; ASANO, M.. Impairment of skin wound healing in β -1,4-galactosyltransferase-deficient mice with reduced leukocyte recruitment. **Am. J. Pathol.**, v. 164, n. 4, p. 1303-1314, 2004.

MOTULSKY, H. J. **Intuitive biostatistics**. Oxford: Oxford University Press, 1995. 386 p.

_____. **Prism 4 statistics guide**: statistical analysis for laboratory and clinical researchers. San Diego: Graphpad Software, 2003. 148 p.

MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v. 95, p. 3032-3043, 2000.

MYERS, A. H.; POSTLETHWAIT, R. W.; SMITH, A. G. Histologic grading of experimental healing wound. **Arch. Surg.**, v. 83, p. 147-50, 1961.

NEWMAN, S. L.; HENSON, J. E.; HENSON, P. M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 156, p. 430-442, 1992.

NIU, X. T.; CUSHIN, B.; REISNER, A.; LEVENSON, S.M.; DEMETRIOU, A.A.. Effect of dietary supplementation with vitamin A on arterial healing in rats. **J. Surg. Res.**, v. 42, p. 61-65, 1987.

O'DELL, S. D.; DAY, I. N. M. Molecules in focus: insulin-like growth factor II (IGF-II). **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 30, p. 767-771, 1998.

OHSHIMA, T.; SATO, Y. Time-dependent expression of interleukin-10 (IL-10) Mrna during the early phase of skin wound healing as a possible indicator of wound vitality. **Int. J. Legal Med.**, v. 111, p. 251-255, 1998.

ONO, I. Studies on cytokines related to wound healing in dono site wound fluid. **J. Dermatol. Sci.**, v. 10, p. 241-245, 1995.

ORNITZ, D. M. FGFs heparin sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. **Bioassays**, v. 22, p. 108-112, 2000.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol.**, v. 2, p. 1-12, 2001.

PARK, J. E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am. J. Surg.**, v. 187, n. 5, p. 11-16, 2004.

PEACOCK JUNIOR, E. E. **The wound repair**. Philadelphia: WB Saunders, 1984. p. 76-85.

- PETERS, K. G.; DEVRIES, C.; WILLIAMS, L. T. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 90, p. 8915-8919, 1993.
- PETROIANU, G. A.; KOSANOVIC, M.; SHEHATTA, I.S.; MAHGOUB, B.; SALEH, A.; MALECK, W.H.. Green coconut water for intravenous use: trace and minor element content. **J. Trace Elem. Exp. Med.**, v. 17, n. 4, p. 273-282, 2004.
- PICADO, T. C. El agua de coco como medio cultivo. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, p. 960-966, oct. 1942.
- PINCELLI, C. Nerve growth factor and keratinocytes: a role in psoriasis. **Eur. J. Dermat.**, v. 10, p. 85-90, 2000.
- PRADERA, E. S.; FERNANDEZ, E.; CALDERIN, O. Coconut water: a clinical and experimental study. **Am. J. Dis. Child.**, v. 64, p. 977-995, 1942.
- PUMMER, S.; HEIL, P.; MALECK, W.; PETROIANU, G.. Influence of coconut water on hemostasis. **Am. J. Emerg. Med.**, v. 19, n. 4, p. 287-289, Jul. 2001.
- RAHAL, S. C. Natural organic ointment or isotonic saline in the treatment of clean wounds induced in rats. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1007-1011, 2001.
- RAPPOLEE, D. A. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping. **Sci.**, v. 241, p. 708-712, 1988.
- RAYCHAUDHURI, S. K.; RAYCHAUDHURI, S.P.; WELTMAN, H.; FARBER, E.M. Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 293, p. 291-295, 2001.
- RENNEKAMPFF, H.O.; HANSBROUGH, J.F.; KIESSIG, V.; DORE, C.; STICHERLING, M.; SCHARODER, J.M. Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. **J. Surg. Res.**, v. 93, p. 41-54, 2000.
- RENNEKAPFF, H. O.; HANSBROUGH, J.F.; WOODSM, V. J.R.; DORE, C.; KIESSIG, V.; SCHRÖDER, J.M. Role of melanoma growth stimulatory activity (MGSA/gro) on keratinocyte function in wound healing. **Arch. Dermat. Res.**, v. 289, p. 204-212, 1997.
- REYNOLDS, M.; ALVARES, D.; MIDDLETON, J.; FITZGERALD, M. Neonatally wounded skin induces NGF-independent sensory neurite out-growth in vitro. **Brain Res.**, v. 102, p. 275-283, 1997.
- RIBEIRO, S.M.C.P. Soluções anti-sépticas em curativos. In: JORGE, S.A. **Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas.**, cap. 9. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 101-109.

RICHES, D. W. Macrophage involvement in repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R. A. F. (Ed.). **Mol. Cell. Boil. wound rep.** 2. ed. New York: Plenum, 1996. p. 143-168.

RING, B. D.; SCULLY, S.; DAVIS, C.R.; BAKER, M.B.; CULLEN, M.J.; PELLEYMOUNTER, M.A.; DANILENKO, D.M. Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice. **Endocrinology**, v. 141, p. 446-449, 2000.

RISAU, W. Angiogenic growth factors. **Progr. Growth Factor Res.**, v. 2, p. 71-79, 1990.

ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vivo. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 83, p. 4167-4171, 1986.

ROBERTS, A. B. Molecular and cell biology of TGF-beta. **Miner. Electrolyte Metab.**, v. 24, p. 111-119, 1998.

ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Transforming growth factor-b. In: _____. **Mol. Cell. Boil. Wound Rep.** 2. ed. New York: Plenum, 1996. p. 275-308.

ROBERTSON, J. G.; BELFORD, D. A.; BALLARD, F. J. Clearance of IGFs and insulin from wounds: effect of IGF-binding proteins interactions. **Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.**, v. 276, p. 663-671, 1999.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L.R.G.; CARVALHO, J.C.T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J.M.. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **Intern. J. Antim. Ag.**, v. 25, p. 404-408, 2005.

RODRIGUES, K. L.; CARDOSO, C.C; CAPUTO, L.R; CARVALHO, J.C.T; FIORINI, J.E.; SCHNEEDORF, J.M. Cicatrizing and antimicrobial properties of an ozonised oil from sunflower seeds. **Inflammopharmacology**, v. 12, n. 3, p. 261-270, 2004.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 217-242, 2000.

RUDOLPH, R.; BALLANTYNE JUNIOR, D. L. Skin grafts. In: MCCARTHY, J. G.; MAY JUNIOR., J. W.; LITTLER, J. W. **Plast. Surg.** Philadelphia: WB Saunders, 1990. V. 1. p. 221-267.

SAAT, M.; SINGH, R.; SIRISINGHE, R.G.; NAWAWI, M. Rehydration after exercise with fresh young coconut water, carbohydrate-electrolyte beverage and plain water. **J. Physiol. Anthropol. Appl. Human Sci.**, v. 21, p. 93-104, 2002.

SAKUMA, C. H; MATERA, J. M.; VALENTE, N. S. Clinical study of skin flap application during oncologic surgery in dog. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 40, p. 32-37, 2003. Supplement.

SANTOS, L. O. M.; SIMÕES, M.L.P.B.; MACHADO, A.P.B.; MATIOSKI FILHO, G.R.; ENDO, P.C.; GRUEN, G.R.; CIPRIANI, V.R.; MESQUITA, L.D.. Effect of somatotropin on skin wound healing in rats. **Acta Cir. Brás.**, v. 17, n. 4, p. 220-224, 2002.

SANTOS, M. F. S.; CZECZKO, N.G.; NASSIF, P.A.N.; RIBAS-FILHO, J.M.; ALENCAR, B.L.F.; MALAFAIA, O.; RIBAS, C.A.P.M.; TRAUNEIN, V.M.; HENRIQUES, G.S.; MAIA, J.M.A.; BITTENCOURT, R.C.A.. Evaluation of the use of raw extract of *Jatropha gossypii-folia* L. in the healing process of skin wounds in rats. **Acta Cir. Brás.**, v. 21, p. 2-7, 2006. Suplemento 3.

SATO, Y.; OHSHIMA, T.; KONTO, T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 256, p. 194-199, 1999.

SATO, M.; SAWAMURA, D.; INA, S.; YAGUCHI, T.; HANADA, K.; HASHIMOTO, I. *In vivo* introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocyte: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but, not by the alternatively spliced form. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 291, p. 400-404, 1999.

SCHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F.M.F.; SILVA, F.O.; LIMA FILHO, J.L.; LEÃO, A.M.A.C.; PORTO, A.L.F.. The polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. in the inflammatory phase of the cutaneous wound healing. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 149-154. jan./fev. 2006.

SCHULTZ, G.; SIBBALD, R.G.; FALANGA, V.; AYELLO, E.A.; DOWSETT, C.; HARDING, K.; ROMANELLI, M.; STACEY, M.; TEOT, L.; VANSCHIEDT, W. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. **Wound Rep. Reg.**, v. 11, p. 1-28, 2003.

SCHULTZ, G. S.; WHITE, M.; MITCHELL, R.; BROWN, G.; LYNCH, J.; TWARDZIK, D.R.; TODARO, G.J. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor-alpha and vaccinia growth factor. **Science**, v. 235, p. 350-352, 1987.

SEISHIMA, M.; NOJIRI, M.; ESAKI, C.; YONEDA, K.; ETO, Y.; KITAJIMA, Y. Activin A induces terminal differentiation of cultured human keratinocyte. **J. Invest. Dermatol.**, v. 112, p. 432-436, 1999.

SELLHEYER, K.; BICKNBACH, J.R.; ROTHNAGEL, J.A.; BUNDMAN, D.; LONGLEY, M.A.; KRIEG, T.; ROCHE, N.S.; ROBERTS, A.B.; ROOP, D.R. Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor b 1 in the epidermis of transgenic mice. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 90, p. 5237-5241, 1993.

SHAH, M.; FOREMAN, D. M.; FERGUSON, M. W. Neutralization of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. **J. Cell Sci.**, v. 108, p. 985-1002, 1995.

_____. Neutralizing antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. **J. Cell Sci.**, v. 107, p. 1137-1157, 1994.

SHIMIZU, A.; KATO, M.; NAKAO, A.; IMAMURA, T.; TEM DIJKE, P.; HELDIN, C.H.; KAWABATA, M. SHIMADA, S.; MIYAZONO, K. Identification of receptors and Smad proteins involved in activin signaling in a human epidermal keratinocyte cell line. **Genes Cells**, v. 3, p. 125-134, 1998.

SHIMO, T.; NAKANISHI, T.; NISHIDA, T.; ASANO, M.; KANYAMA, M.; KUBOKI, T.; TAMATANI, T.; TEZUKA, K.; TAKEMURA, M.; MATSUMURA, T.; TAKIGAWA, M. Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo. **J. Biochem.**, v. 126, p. 137-145, 1999.

SHIRAHA, H.; GLADING, A.; GUPTA, K.; WELLS, A. IP-10 inhibits epidermal growth factor-induced motility by decreasing epidermal growth factor receptor-mediated calpain activity. **J. Cell Biol.**, v. 146, p. 243-254, 1999.

SHIRAKATA Y.; KIMURA, R.; NANBA, D.; IWAMOTO, R.; TOKUMARU, S.; MORIMOTO, C.; YOKOTA, K.; NAKAMURA, M.; SAYAMA, K.; MEKADA, E.; HIGASHIYAMA, S.; HASHIMOTO, K. Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. **J. Cell Sci.**, v. 118, n. 11, p. 2363-2370, 2005.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Cutaneous wound healing. **New Engl. J. Med.**, v. 341, p. 738-746, 1999.

SOMA, Y.; DVONCH, V.; GROTENDORST, G. R. Platelet-derived growth factor AA homodimer is the predominant isoform in human platelets and acute human wound fluid. **FASEB J.**, v. 6, p. 2996-3001, 1992.

STEED, D. L. Modifying the wound healing response with exogenous growth factors. **Clin. Plast. Surg.**, v. 25, p. 397-405, 1998.

STEENFOS, H. H.; JANSSON, J. O. Gene expression of insulin-like growth factor-I and IGF-I receptor during wound healing in rats. **Eur. J. Surg.**, v. 158, p. 327-331, 1992.

STRACHAN, L.; MURISON, J.G.; PRESTIDGE, R.L.; SLEEMAN, M.A.; WATSON, J.D.; KUMBLE, K.D. Cloning and biological activity of epigen: a novel member of the epidermal growth factor superfamily. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 18265-18271, 2001.

STRIETER, R. M.; POLVERINI, P.J.; KUNKEL, S.L.; ARENBERG, D.A.; BURDICK, M.D.; KASPER, J.; WALZ, A.; MARRIOT, D.; CHAN, S.Y.; ROCZNIAK, S.; SHANAFELT, A.B. The functional role of the ELR motif in chemokine-mediated angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 27348-27357, 1995.

SUÁREZ-MAHECHA, H.; FRANCISCO, A.; BEIRÃO, L.H.; BLOCK, J.M.; SACCOL, A.; PARD-CARRASCO, S. Importance of polyunsaturated fatty acids present in pond-reared and wild fish for human nutrition. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 101-110, 2002.

TANAKA, R. A.; RAMOS, F.M.M.; ALMEIDA, S.M.; VIZIOLI, M.R.; BÓSCOLO, F.N. Evaluation of radioprotective effect of carnosine (β -alanil-1-histidine) on the wound healing in rats. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 13, n. 3, p. 253-258, 2005.

TEIXEIRA, V. P. A.; PEREIRA, S.A.L.; RODRIGUES, D.B.R.; LINO, R.S.J. **Princípios básicos e aplicações da morfometria**. Disponível em: <<http://www.uftm.edu.br/instpub/fmtm/patge/morfometria01.htm>>. Acesso em: 17 jul. 2007.

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

TRABER, M. G.; PACKER, L. Vitamin E: beyond antioxidant function. In: SIDEROVA, V. S.; CARPENTIER, Y. A. **Vitamina E em pacientes que recebem Nutrição Parenteral Total (NPT):** necessidade de um suplemento de alfa-tocoferol. [S.l.: s.n.], 1998. (Medicine in Focus, 3).

TRENGOVE, N. J.; BIELEFELDT-OHMSNN, H.; STACEY, M. C. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. **Wound Rep. Reg.**, v. 8, p. 13-25, 2000.

TUJI, F. M.; ALMEIDA, S.M.; BÓSCOLO, F.N.; MANZI, F.R.. Evaluation of the radioprotective effect of sodium selenite in the tissue repair process in rats. **Radiol. Bras.**, v. 38, n. 5, p. 359-364, 2005.

TZAHAR, E.; MOYER, J.D.; WATERMAN, H.; BARBACCI, E.G.; B.A.O.J.; LEVKOWITZ, G.; SHELLY, M.; STRANO, S.; PINKAS-KRAMARSKI, R.; PIERCE, J.H.; ANDREWS, G.C.; YARDEN, Y. Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. **EMBO. J.**, v. 17, p. 5948-5963, 1998.

VIEIRA, S. A. L. **Efeito do laser de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas experimentais**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Franca, Franca, 2006.

VIGLIAR, R.; SDEPANIAN, V. L.; FAGUNDES-NETO, U. Biochemical profile of coconut water from coconut palms planted in an inland region. **J. Ped.**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 308-312, 2006.

VOGT, P. M.; LEHNHARDT, M.; WAGNER, D.; JENSEN, V.; KRIEG, M.; STEINAU, H.U. Determination of endogenous growth factors in human wound fluid: temporal presence and profiles of secretion. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 102, p. 117-123, 1998.

WAGNER, C.L.; MASCELLI, M.A.; NEBLOCK, D.S.; WEISMAN, H.F.; COLLER, B.S.; JORDAN, R.E. Analysis of GP II b/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. **Blood**, v. 88, p. 907-14, 1996.

WANKELL, M.; KAESLER, S.; ZHANG, Y.Q.; FLORENCE, C.; WERNER, S.; DUAN, R. The activin binding proteins follistatin and follistatin-related protein are

differentially regulated in vitro and during cutaneous wound repair. **J. Endocrinol.**, v. 171, p. 385-395, 2001.

WENER, S.; PETERS, K.G.; LONGAKER, M.T.; FULLER-PACE, F.; BANDA, M.; WILLIAMS, L.T. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 89, p. 6896-6900, 1992.

WENER, S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair process. **Cytok. Growth Factor Rev.**, v. 2, p. 153-165, 1998.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.**, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.

WHO. Reduced Osmolarity Salts (ORS): formulation. New York: UNICEF, 2001. (WHO/FCH/CAH/0.1.22).

www.cnptia.embrapa.br/services/brasil-potassio/frutas.html Acesso: 29/10/2007.

www.irmaosbenassi.com.br/cat/coco.htm Acesso: 29/10/2007.

www.m-vance.com Acesso: 29/10/2007.

WILLERSON, J. T. Conversion from chronic to acute coronary heart disease syndromes: role of platelets and platelet products. **Tex. Heart Inst. J.**, v. 22, p. 13-19, 1995.

WINTER, G. D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. **Nature**, v. 193, p. 293, 1962.

WONG, D. T.; DONOFF, R.B.; YANG, J.; SONG, B.Z.; MATOSSIAN, K.; NAGURA, N.; ELOVIC, A.; MCBRIDE, J.; GALLAGHER, G.; TODD, R. Sequential expression of transforming growth factors alpha and beta 1 by eosinophils during cutaneous wound healing in the hamster. **Am. J. Pathol.**, v. 143, p. 130-142, 1993.

YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer, signaling mechanisms and therapeutic opportunities. **Eur. J. Cancer**, v. 37, p. 3-8, 2001.

ZAMBRUNO, G.; MARCHISIO, P.C.; MARCONI, A.; MELCHIORI, A.; GIANNETTI, A.; DE LUCA, M. Transforming growth factor-beta 1 modulates beta 1 and beta 5 integrin receptors and induces the de novo expression of the alpha v beta 6 heterodimer in normal human keratinocytes: implications for wound healing. **J. Cell Biol.**, v. 129, p. 853-865, 1995.

APÊNDICES

APÊNDICE A

QUADRO 01: Quadro para cálculo dos escores das feridas em cicatrização. Adaptado de Myers (1961).

Variáveis	0 ausente	+1 leve	+2 moderado	+3 marcante	+4 maciço	Fator	Total
Neutrófilos						-10	
Crosta						-1	
Inflamação aguda						-4	
Inflamação crônica						+2	
Regeneração epitelial						+5	
Fibroblastos						+5	
Tecido granulação						+5	
Colágeno						+10	
Eosinófilos						-4	
Neovascularização						+5	
ESCORE TOTAL							

*As intensidades das variáveis (0 a 4) foram multiplicadas por fatores + ou - baseados na sua importância para a cicatrização. A soma destes produtos correspondem ao escore total para cada animal.

APÊNDICE B – Dados brutos

Pesos dos animais nos diferentes grupos mensurados no dia que precedeu a realização do procedimento cirúrgico.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa- aquosa</i>	<i>Cristalina- aquosa</i>	<i>Amorfa- gel</i>	<i>Cristalina- gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
151	135	171	131	134	124	118
151	160	154	148	148	126	113
129	131	150	112	137	157	116
125	127	130	132	136	158	121
144	128	136	140	141	151	105
147	147	124	136	120	133	123
147	144	135	123	125	128	131
144	148	136	140	115	133	124
148	142	137	140	123	132	114
118	131	138	125	115	115	112
124	124	139	153	128	115	121
117	113	137	143	135	125	135
116	132	135	141	127	106	130
125	114	126	133	141	143	127
110	128	136	140	144	142	121

Grau de reparação das feridas (GR), em termos percentuais, calculado nos sete grupos de tratamento no 3º dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
21,0756	-22,2160	28,9675	28,2607	32,8718	-10,1816	4,6389
3,5102	-21,5686	14,7750	25,3525	-3,7872	8,0095	8,9278
-4,9618	-0,2428	25,0610	14,7282	0,0939	3,6003	3,7950
10,1451	-10,2097	23,3538	15,3913	21,5540	8,4242	11,5963
3,6477	-12,4481	19,1114	22,0087	-0,8750	19,7043	5,2783
16,4156	-6,7912	11,5629	17,2067	2,0499	-9,1354	17,6911
13,1256	1,8802	8,0136	20,0816	10,3409	8,7292	7,4482
8,6453	-12,1116	10,0705	17,4243	-0,3636	13,6695	18,0897
12,7160	-6,7357	9,7437	17,8542	-9,4612	6,6903	16,6963
5,2853	1,6893	0,0598	19,4562	-5,2163	12,8925	-2,5843
7,8662	-21,0388	-8,7412	6,5051	-9,2778	9,6687	4,8843
17,3887	-18,7562	16,6491	17,1627	-0,8862	10,7857	5,0331
20,1896	-8,6853	-29,9372	29,2185	-2,3121	20,7441	14,0575
11,7137	-4,9100	13,0486	34,5216	2,6660	-5,7545	1,0747
8,0045	-27,4330	-0,9962	20,9810	-7,2419	1,8894	10,0905

Grau de reparação das feridas (GR), em termos percentuais, calculado nos sete grupos de tratamento no 7º dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
45,8429	-0,8902	45,5572	68,8510	41,3241	27,4167	56,2686
53,8137	8,9347	29,0495	63,0834	32,4141	40,9681	54,2844
50,1422	28,9275	63,8752	48,5468	40,5343	31,4681	57,2115
46,8989	34,6391	50,3935	45,2684	49,9070	37,7029	52,6849
50,3612	17,7228	39,8937	40,5146	24,3362	31,3437	40,9746
55,2732	32,3885	43,7645	41,9975	45,1903	29,0162	59,3132
52,7151	40,4740	26,8235	57,4875	33,4984	39,5921	46,6770
49,8989	5,2289	43,5672	37,1370	60,8849	50,4394	62,7588
52,7128	37,2344	28,0145	46,5237	36,0884	46,0919	57,5453
36,3661	23,0907	24,2386	39,9783	52,5663	64,6346	41,0181
40,9133	47,9001	37,3320	35,8744	28,8988	45,1988	52,4846
45,5251	40,6467	46,4365	49,1891	61,3164	46,3484	38,2516
53,7940	46,6741	5,2172	60,0849	37,5777	51,2583	59,3347
55,5125	52,7516	40,3682	51,5390	49,5770	49,3012	61,7470
40,1668	36,9335	28,7853	51,6399	60,9272	50,9390	55,3443

Grau de reparação das feridas (*GR*), em termos percentuais, calculado nos sete grupos de tratamento no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa- aquosa</i>	<i>Cristalina- aquosa</i>	<i>Amorfa- gel</i>	<i>Cristalina- gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
87,1961	60,3606	82,4913	92,1799	84,2382	77,0294	82,7682
85,6532	59,8342	68,4927	93,2069	71,4939	82,2356	81,1366
83,1683	83,9202	93,8217	56,2135	89,6733	84,2522	85,2221
67,7207	80,1974	90,1400	79,5168	89,6418	75,3073	83,4549
62,5322	62,5231	81,7023	84,2064	74,6259	79,0401	77,0351
75,3740	82,2999	78,5202	89,5019	74,8623	74,3669	84,8029
86,2356	82,6333	80,8303	85,9619	67,5180	79,1992	83,3696
88,8628	60,5894	87,3694	79,3587	93,5979	85,7982	91,8303
76,8015	90,0497	81,0303	84,8520	94,0356	87,2668	86,4652
74,5752	78,7778	80,5145	88,8309	88,0329	92,0923	80,3795
65,3378	83,2903	82,9037	84,3532	87,8936	90,4893	87,4549
55,7370	81,9722	88,8252	84,9896	93,7289	90,7016	81,6494
85,4932	90,2676	74,2386	87,7853	89,5081	89,4137	83,5736
88,0363	90,6081	82,3292	89,9881	90,1666	87,6283	83,0146
86,5790	88,7321	80,4456	80,8498	87,3225	88,2413	80,1401

Taxa média de reparação das feridas (*TRm*), em mm²/dia, referente ao intervalo entre os dias 0 e 3, mensurada nos sete grupos de tratamento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
26,9524	-26,9932	37,5238	33,6803	36,9864	-11,9796	6,2449
4,5238	-29,0340	17,8707	31,5578	-4,9048	9,6463	12,3537
-6,8844	-0,2857	32,8367	18,3741	0,1224	4,4558	4,9456
12,4626	-13,5102	27,4558	18,1565	25,2109	9,8844	16,1157
4,8095	-14,6735	23,9660	28,9796	-0,9864	26,4762	7,0000
21,2721	-8,6054	15,2449	24,0612	2,2789	-12,1973	25,8639
18,4490	2,5578	10,7551	28,1429	13,4966	11,8503	9,7891
10,7619	-15,3471	13,7007	23,1020	-0,4014	18,5170	23,0612
16,4218	-9,1225	12,8027	25,3129	-11,9456	8,3674	20,4422
6,4966	2,1157	0,0748	24,3401	-6,7755	15,7823	-2,9184
11,5306	-25,4898	-11,8571	8,9456	-13,3877	12,9048	6,2585
23,6190	-23,1225	21,5170	23,1089	-1,1633	14,3061	6,3605
29,5578	-11,6803	-38,9184	39,8027	-2,8844	30,9524	18,9728
15,6190	-6,4762	18,2245	49,2109	3,5374	-7,1701	1,3265
10,1837	-41,9184	-1,1225	29,1565	-8,8095	2,2517	14,1157

Taxa média de reparação das feridas (*TRm*), em mm²/dia, referente ao intervalo entre os dias 3 e 7, mensurada nos sete grupos de tratamento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
23,7551	19,4337	16,1173	36,2806	7,1326	33,1786	52,1276
48,6225	30,7959	12,9490	35,2245	35,1633	29,7704	47,0714
57,3419	25,7398	38,1429	31,6429	39,5408	25,8674	52,2092
33,8623	44,5102	23,8418	26,4337	24,8725	25,7653	42,8265
46,1939	26,6735	19,5459	18,2755	21,3163	11,7296	35,5051
37,7653	37,2347	31,8418	26,0000	35,9694	38,2041	45,6378
41,7347	39,3776	18,9337	39,3163	22,6684	31,4235	38,6684
38,5153	16,4796	34,1786	19,6021	50,7143	37,3571	42,7092
38,7398	44,6633	18,0051	30,4847	43,1327	36,9592	37,5102
28,6531	20,1020	22,6837	19,2551	56,2908	47,5051	36,9286
36,3317	62,6429	46,8725	30,2908	41,3163	35,5663	45,7449
28,6633	54,9235	28,8725	32,3418	61,2347	35,3776	31,4847
36,8980	55,8367	34,2755	31,5357	37,3215	34,1480	45,8316
43,8010	57,0408	28,6174	18,1939	46,6837	51,4490	56,1684
30,6888	73,7653	25,1684	31,9541	62,1939	43,8418	47,4796

Taxa média de reparação das feridas (*TRm*), em mm²/dia, referente ao intervalo entre os dias 7 e 12, mensurada nos sete grupos de tratamento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
31,7306	44,6531	28,7061	16,6816	28,9714	35,0245	21,4041
24,6204	41,1102	28,6245	22,4980	30,3673	29,8204	22,2939
27,4939	38,8204	23,5429	5,7388	38,4367	39,1959	21,9020
15,3469	36,1714	28,0367	24,2408	27,8857	26,4735	25,6571
9,6286	31,6857	31,4571	34,5184	34,0163	38,4531	28,6939
15,6286	37,9469	27,4939	39,8571	19,7918	36,3306	22,3592
28,2694	34,4122	43,4898	23,9429	26,6408	32,2612	28,9347
29,1020	42,0898	35,7551	33,5878	21,6694	28,7388	22,2367
18,6653	42,9184	41,7959	32,6041	43,8980	30,8980	21,2449
28,1796	41,8449	42,2367	36,6694	27,6408	20,1674	26,6694
21,4816	25,7265	37,0898	40,0000	51,0775	36,2694	26,8857
8,3225	30,5673	32,8694	28,9224	25,5265	35,2980	32,9061
27,8449	35,1755	53,8367	22,6408	38,8694	34,1592	19,6286
26,0204	29,9592	35,1633	32,8857	32,3143	28,6531	15,7510
35,4286	47,4898	34,9265	24,3551	19,2653	26,6735	20,8123

Taxa média de reparação das feridas (*TRm*), em mm²/dia, referente ao intervalo entre os dias 0 e 12, mensurada nos sete grupos de tratamento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
27,8776	18,3350	26,7143	27,4643	23,6956	22,6582	27,8554
27,5969	20,1361	20,7109	29,0051	23,1480	24,7602	28,0680
28,8486	24,6837	30,7330	17,5323	29,2262	26,0680	27,7653
20,7976	26,5306	26,4932	23,4507	26,2126	22,0901	28,9949
20,6122	18,4252	25,6140	27,7194	21,0323	26,5510	25,5408
24,4184	26,0714	25,8810	31,2891	20,8061	24,8231	30,9949
30,3027	28,1037	27,1208	30,1174	22,0306	26,8793	27,3929
27,6548	19,1938	29,7160	26,3044	25,8333	29,0561	29,2670
24,7959	30,4898	26,6174	30,0748	29,6820	27,2857	26,4660
22,9167	24,6650	25,1786	27,7823	28,5867	28,1837	22,6922
23,9439	25,2279	28,1140	29,0000	31,7075	30,1939	28,0153
18,9269	25,2636	28,6990	28,6088	30,7568	30,0765	25,7959
31,2908	30,3486	24,1276	29,8963	27,9150	33,3537	28,1990
29,3469	29,8776	28,7466	32,0697	29,9099	27,2959	25,6173
27,5374	33,8963	22,6616	28,0884	26,5561	26,2908	28,0272

Número de mastócitos referente aos sete grupos de tratamento, mensurado nos preparados histológicos corados com azul de toluidina obtidos no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
66	105	52	62	97	84	104
59	61	52	65	31	71	99
150	119	70	77	50	77	82
101	104	75	129	87	93	156
59	45	47	58	126	66	79
66	65	65	69	31	93	50
70	129	39	85	123	142	36
50	61	72	57	34	120	46
53	170	100	92	50	83	
53	82	58	91	69	50	
123	85	34	75	70	35	
68	31	118	39	99	94	

Densidade de colágeno, expressa em termos percentuais, referente aos sete grupos de tratamento, mensurada nos preparados histológicos corados com tricrômio de Masson obtidos no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
36,9191	63,0983	39,7392	35,6462	52,1545	64,4229	62,4271
52,1507	53,4910	34,1632	59,8715	60,4573	52,4941	80,0868
49,9375	71,6448	45,5917	67,5701	55,4038	65,1854	60,1330
55,6278	37,6865	66,7205	54,2528	69,0656	65,2674	56,6368
51,4292	75,9226	71,7635	34,7014	63,6712	44,2410	75,4083
40,8573	69,3427	77,2597	53,3587	28,5882	51,4333	72,8576
39,7931	39,4448	76,6274	63,0007	58,8969	45,9823	61,3767
38,3663	50,4017	69,7497	57,9424	70,5924	62,6556	44,3205
58,0653	38,9649	71,6278	53,3587	67,0309	37,3424	
26,9368	65,1556	68,8917	51,9392	67,1424	63,7049	
39,3840	45,9642	56,1753	60,5128	66,7847	68,5344	
30,9226	21,7851	61,8240	56,5177	66,7608	82,8851	

Densidade vascular, expressa em termos percentuais, referente aos sete grupos de tratamento, mensurada nos preparados histológicos corados com tricrômio de Masson obtidos no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
21.0101	12,8497	25,7031	31,6788	31,2236	26,8733	41,5010
13.7344	22,0205	25,9278	29,1347	17,8903	27,8201	34,4448
25,9618	15,7115	23,2844	13,5681	31,6201	30,7316	32,5076
11,2771	20,1663	12,6319	21,4872	22,7240	19,5059	33,2819
17,1299	14,1104	28,6087	41,0635	30,6906	36,4563	37,0208
26,4920	24,0497	13,2802	26,2840	36,8361	38,5813	38,4281
30,6840	32,5056	21,4562	26,5024	29,6052	48,2455	48,9250
26,7608	26,0743	17,9135	29,1583	28,5125	37,4097	41,4153
24,0076	29,5271	21,6403	28,3733	36,0542	39,9549	
36,9729	26,7878	17,7281	26,9528	26,9403	37,3552	
29,8920	30,8153	29,8017	22,9934	25,2566	28,4507	
40,0142	42,2733	35,5854	20,6066	16,4333	18,8983	

Grau de cicatrização determinado nos sete grupos de tratamento, no 12^o dia do experimento, conforme o método histológico de Myers.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
107	78	93	81	104	78	102
77	68	94	103	75	78	102
77	83	97	103	78	78	106
62	92	93	102	101	78	103
68	77	102	102	78	78	107
106	104			88	78	105

Quantificação de neutrófilos, conforme critérios histológicos (escores de 0 a 4), realizada nos sete grupos de tratamento no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
1	2	2	2	1	2	0
2	2	2	1	3	2	0
1	1	1	1	2	2	2
1	1	2	1	0	2	2
1	2	1	1	2	2	1
1	1			2	2	1

Avaliação da formação da crosta, conforme critérios histológicos (escores de 0 a 4), realizada nos sete grupos de tratamento no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
1	1	2	2	1	1	0
1	1	2	1	3	1	1
1	2	1	1	2	1	2
1	1	2	1	0	1	1
0	2	1	1	1	1	1
0	0			1	1	1

Avaliação da inflamação aguda, conforme critérios histológicos (escores de 0 a 4), realizada nos sete grupos de tratamento no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
1	1	1	1	0	1	0
2	1	1	0	2	1	0
1	1	1	0	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1
0	2	1	1	1	1	0
1	0			1	1	1

Avaliação da inflamação crônica, conforme critérios histológicos (escores de 0 a 4), realizada nos sete grupos de tratamento no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
1	1	2	2	0	1	0
2	1	1	0	2	1	0
1	1	1	0	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1
0	2	1	1	1	1	1
1	0			1	1	0

Avaliação da regeneração epitelial, conforme critérios histológicos (escores de 0 a 4), realizada nos sete grupos de tratamento no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
4	3	1	1	4	3	4
3	2	3	4	3	3	4
2	3	3	4	3	3	4
1	3	3	3	4	3	4
2	2	4	3	3	3	4
4	4			4	3	4

Quantificação de fibroblastos, conforme critérios histológicos (escores de 0 a 4), realizada nos sete grupos de tratamento no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
4	3	4	4	4	3	4
3	3	4	4	4	3	4
4	4	4	4	3	3	4
3	4	4	4	4	3	4
3	4	4	4	3	3	4
4	4			4	3	4

Avaliação do tecido de granulação, conforme critérios histológicos (escores de 0 a 4), realizada nos sete grupos de tratamento no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
4	3	4	4	4	3	4
3	2	3	4	3	3	4
3	3	4	4	3	3	4
2	3	4	4	4	3	4
3	2	4	4	3	3	4
4	4			4	3	4

Quantificação de colágeno, conforme critérios histológicos (escores de 0 a 4), realizada nos sete grupos de tratamento no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
4	3	4	3	4	3	4
3	3	4	4	2	3	4
3	3	4	4	3	3	4
3	4	3	4	4	3	4
3	3	4	4	3	3	4
4	4			4	3	4

Quantificação de eosinófilos, conforme critérios histológicos (escores de 0 a 4), realizada nos sete grupos de tratamento no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
1	1	3	1	1	1	1
2	1	1	0	2	1	0
1	1	2	0	1	1	1
1	1	1	1	0	1	1
1	1	1	1	1	1	1
1	1			1	1	1

Quantificação da neovascularização, conforme critérios histológicos (escores de 0 a 4), realizada nos sete grupos de tratamento no 12^o dia do experimento.

<i>Controle</i>	<i>Referência</i>	<i>Amorfa-aquosa</i>	<i>Cristalina-aquosa</i>	<i>Amorfa-gel</i>	<i>Cristalina-gel</i>	<i>Triglicerídeo</i>
4	3	3	3	4	3	4
2	3	3	4	2	3	4
3	3	3	4	3	3	4
3	3	4	4	4	3	3
3	3	3	4	3	3	4
4	4			3	3	4

ANEXOS

Anexo A



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 4009-8338 Fax (85) 4009-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 31/05, sobre o projeto intitulado **“Estudo histopatológico, histoquímico e morfométrico comparativo da ação de cicatrizantes em ferida cirúrgica em ratos”**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA em reunião realizada em 15 de dezembro de 2005.

Fortaleza, 15 de dezembro de 2005

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gisela'.

Prof. Dra. Gisela Costa Camarão
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

Anexo B

COMPOSIÇÃO DA ÁGUA DE COCO

A tabela a seguir mostra a média e desvio padrão de parâmetros analisados de cocos de 6 meses de maturação da variedade anã verde.

Parâmetros	6 meses
Peso do coco (g)	1858,40 \pm 681,27
Altura do coco (cm)	17,2 \pm 1,0
Largura do coco (cm)	14,08 \pm 0,9
Diâmetro albúmen superior (mm)	0,6 \pm 0,8
Diâmetro albúmen inferior (mm)	2,9 \pm 1,8
Peso albúmen (g)	41,32 \pm 41,92
Volume (ml)	484,40 \pm 60,14
Ph	4,29 \pm 0,09
Brix	5,3 \pm 0,3
Condutividade elétrica (mV)	116 \pm 4,9
Osmolaridade (mOsm)	434,83 \pm 31,50

e) Composição média da água de coco:

Composição	100g
Calorias	19,0 (79,5 kJ)
Calorias provenientes de carboidratos	14,8 (62,1 kJ)
Calorias provenientes de lipídios	1,7 (7,0 kJ)
Calorias provenientes de proteínas	2,5 (10,5 kJ)
Água	95 g
Cinzas	0,4g
Carboidratos totais	3,7 g
Fibra	1,1 g
Lipídios totais	0,2 g

Lipídios saturados	0,2 g
Ácido capróico (6:0)	1,0 mg
Ácido caprílico (8:0)	14,0 mg
Ácido cáprico (10:0)	11,0 mg
Ácido láurico (12:0)	88,0 mg
Ácido mirístico (14:0)	35,0 mg
Ácido palmídico (16:0)	17,0 mg
Ácido esteárico (18:0)	10,0 mg
Ácido oléico (18:1)	8,0 mg
Ácido linoléico (18:2)	2,0 mg
Proteínas	0,7 g
Aminoácidos	
Ácido Aspártico	70 mg
Ácido Glutâmico	165 mg
Alanina	37 mg
Arginina	118 mg
Cistina	14 mg
Fenilalanina	37 mg
Glicina	34 mg
Histidina	17 mg
Hidroxiprolina	traços
Homoserina	traços
Isoleucina	28 mg
Leucina	53 mg
Lisina	32 mg
Metionina	13 mg
Prolina	30 mg
Serina	37 mg
Tirosina	22 mg
Treonina	26 mg
Triptofano	8 mg
Valina	44 mg
Vitaminas	

Ácido ascórbico	2,4 mg
Folatos	3,0 mcg
Niacina	0,1 mg
Riboflavina	0,1 mg
Tiamina	traços
Minerais	
Cálcio	24,0 mg
Cobre	Traços
Enxofre	24.0
Ferro	0,3 mg
Fósforo	20 mg
Manganês	0,1 mg
Magnésio	25 mg
Potássio	250 mg
Selênio	1,0 mcg
Sódio	105 mg
Zinco	0,1 mg

Anexo C

PROCESSAMENTO DA ÁGUA DE COCO

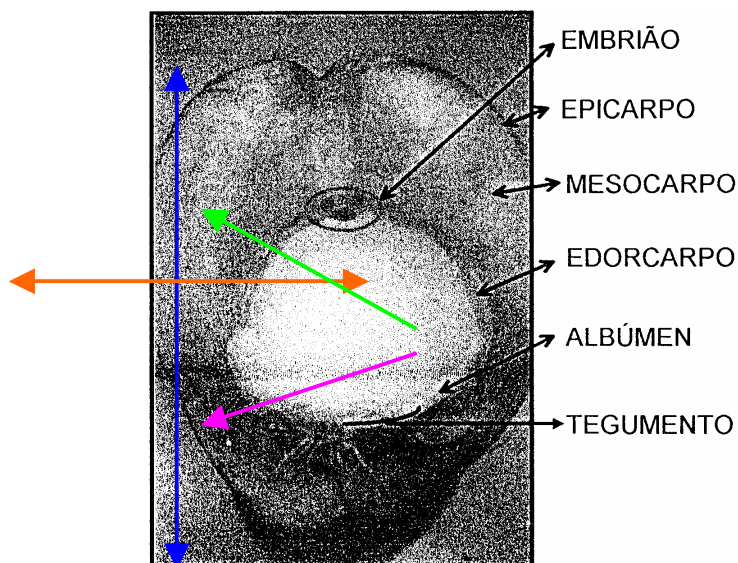
O coqueiro é uma planta monocotiledonea, da família Palmae, conhecido como *Cocos nucifera* L.

O fruto é a drupa com casca (epiderme) lisa, camada fibrosa (mesocarpo) e parte dura (endocarpo). Em sua parte interna encontra-se a amêndoa e a "água-de-coco". O fruto também é conhecido como noz-semente, semente.

A coleta da matéria-prima foi realizada diretamente das palmeiras (coqueiros), os frutos com 180 dias de frutificação da variedade anã verde foram identificados quanto ao cacho de que provinham. Foram coletados de uma fazenda certificada como orgânica pela Associação de Certificação Instituto Biodinâmico (IBD), no município de Trairi-CE, onde foram submetidos às mesmas condições climáticas, de adubação e irrigação por sistema de micro-aspersão, onde cada coqueiro, individualmente, recebia a mesma quantidade de água todos os dias, além de serem livres de pragas.

Após a identificação individual foram acondicionados em caixas plásticas, segundo o coqueiro de onde provinham e levados à sala de higienização dentro de um galpão localizado dentro da própria propriedade.

Os parâmetros analisados foram os seguintes:



→Peso do coco: mensurado em balança (0,01 a 2000g) e expresso em gramas.

→Altura do coco: mensurado através de régua milimetrada e expresso em centímetros (seta azul).

→Largura do coco: mensurado através de régua milimetrada e expresso em centímetros (seta laranja).

→Diâmetro do albúmen: considerado como o endosperma gelificado/solidificado do coco, popularmente conhecido como “laminha” do coco, tendo sido mensurado na parte superior do coco (seta verde) e na parte inferior do coco (seta rosa); expresso em milímetros e mensurado através de paquímetro.

→Peso do albúmen: uma vez aberto o coco, o albúmen foi retirado com o auxílio de colher e pesado em balança (0,01 a 2000g); expresso em gramas.

→Volume da água de coco: mensurado em proveta graduada e expresso em mililitros.

→pH da água de coco: mensurado através de pHmetro portátil previamente calibrado.

→Brix (sólidos totais): mensurado através de refratômetro previamente calibrado.

→Condutividade elétrica: mensurada através de pHmetro portátil previamente calibrado; expressa em mV.

→Osmolaridade: considerada como pressão osmótica, as amostras foram acondicionadas em Eppendorf de 1,5ml e congeladas, sendo posteriormente analisadas no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino da Universidade Estadual do Ceará, utilizando osmômetro previamente calibrado, expresso em miliosmoles por litro (mOsm/l).

f) Processamento tecnológico

Os cocos foram coletados na fazenda ao final do dia e transportados no dia seguinte no início da manhã para Fortaleza dentro de caixas de polipropileno, sendo entregues por volta das 8h da manhã.

Na recepção os cocos foram lavados em baldes contendo hipoclorito de sódio (água sanitária) na proporção de 1 colher de sopa para cada litro de água, permanecendo por 30 minutos, sendo então secos com papel toalha.

Abertura do fruto foi realizada através de abridor de cocos manual de alumínio, sendo lavado na solução acima descrita e enxaguado com água destilada a cada coco.

A filtração em papel filtro descartável e suporte de polipropileno, sendo lavado na solução acima descrita e enxaguado com água destilada a cada coco.

Após ser filtrada a água de coco foi adicionada de carreador (Maltodextrina, Corn Product Inc.), homogenizada com bastão de vidro até sua completa dissolução.

O processamento da água de coco na forma amorfa: o líquido foi bombeado de forma contínua para pulverização em equipamento Spray Dryer, modelo Yakamoto, em condições de gradiente de temperatura e de pressão rigorosamente controlados. As microgotas foram vaporizadas instantaneamente e transformadas em pó amorfo com menos de 3% de umidade e granulometria estimada de 100 meche. O pó foi armazenado em copo coletor e retirado da máquina após o término do processo. Daí foi armazenado em recipientes hermeticamente fechados para evitar a entrada de umidade e luz no produto. O produto foi desidratado continuamente.

O processamento na forma cristalina: através de processo de desidratação a alto vácuo (DAV), ou liofilização, onde a água foi do alimento sem aquecimento, por meio de sublimação, mantendo as características iniciais do produto.

As características e fundamentos físicos: o fundamento físico para a liofilização é a coexistência dos três estados da água (sólido, líquido e gasoso) em determinadas condições de pressão e temperatura. Assim, em temperaturas de aproximadamente 0°C e pressão de 2 mm de mercúrio, obtém-se o chamado ponto triplo da água, possibilitando sua passagem diretamente do estado sólido para o gasoso, sem passar pelo líquido, ou seja, por sublimação.

No processo de liofilização, a água após a etapa de pré-preparo acima descrita, foi congelada a temperatura de -17°C aproximadamente em 15 minutos, nas próprias câmaras de alto vácuo. Com o aumento progressivo da temperatura e a manutenção da condição de baixíssima pressão (vácuo), obteve-se a saída da água por sublimação. Dessa forma, não há exposição a altas temperaturas e o produto final apresenta características nutritivas e sensoriais semelhantes ao original, "in natura".

A manutenção do valor nutritivo garantiu as estruturas protéicas e o conteúdo de vitaminas, especialmente as termolábeis, mantidos no processo, já que o calor não foi aplicado a água de coco.

A manutenção das características sensoriais como o sabor, o odor e o aroma não foram alterados pela liofilização, pois os componentes que conferem tais características são termolábeis e, não havendo aplicação de calor, foram mantidos no processo.

Após ser retirada do liofilizador foi armazenada em embalagens de alumínio, sendo depois levadas à sala para ter sua granulometria homogenizada através de moinho específico.

g) Preparo das Formulações

O material básico (água de coco em pó) seja na forma amorfa ou cristalina, bem como na forma de cápsula ou gel foi encaminhado à Farmácia de Manipulação (Magistral) registrada na ANVISA, onde foram preparadas as formulações.

Na apresentação solução aquosa amorfa (SA) cada cápsula de 1,0 g continha: 5 mg de sulfato de neomicina; 10 mg de xilocaína; 10 mg de estearato de magnésio (antiumectante); 975 mg de água de coco em pó amorfa.

Na apresentação solução aquosa cristalina (SC) cada cápsula de 1,0 g continha: 5 mg de sulfato de neomicina; 10 mg de xilocaína; 10mg de estearato de magnésio (antiumectante); 975 mg de água de coco cristalina.

A apresentação gel de água de coco em pó amorfa (GA) continha em 10 g: 62,5% de princípio ativo = 6,25 g; 37,5% de excipiente = 3,75 g.

Em 6,25 g de princípio ativo continha: 6,09 de água de coco em pó amorfa; 31,25 mg de sulfato de neomicina; 62,5 mg de xilocaína; 62,5 mg de estereato de magnésio.

A apresentação gel de água de coco em pó cristalina (GC) continha em 10 g: 62,5% de princípio ativo = 6,25 g; 37,5% de excipiente = 3,75 g.

Em 6,25 g de princípio ativo continha: 6,09 de água de coco em pó amorfa; 31,25 mg de sulfato de neomicina; 62,5 mg de xilocaína; 62,5 mg de estereato de magnésio.