

Emprego de membrana de quitosana em feridas cutâneas induzidas experimentalmente em equinos

Chitosan film in horses with experimentally induced skin wound

Edivaldo Aparecido Nunes Martins^{I*} Mariana Sachi Invernizzi^I
Maria Gabriela Nogueira Campos^{II} Piter Aparecido Teodoro^{III}
Marcelo Bittencourt Contieri^{III} Luís Claudio Lopes Correia da Silva^{IV}

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da membrana (filme) de quitosana no processo de reparação de feridas cutâneas distais em equinos. Foram induzidas feridas cutâneas nas regiões metacarpianas e metatarsianas de quatro equinos adultos. No grupo tratado, oito feridas foram recobertas com membrana de quitosana e, no grupo controle, apenas higienização com solução de cloreto de sódio 0,9%. No período experimental, foram avaliados o diâmetro da ferida, formação de tecido de granulação exuberante, tipo de exsudato que a recobria, análise histológica, bem como as características da membrana de quitosana (plasticidade durante manipulação e presença ou ausência da membrana a cada troca). A membrana de quitosana não interferiu no tempo de cicatrização, podendo servir como material de recobrimento de feridas cutâneas, potencialmente com vantagens, se for empregada como meio condutor de substâncias que interfiram positivamente no processo cicatricial, abrindo campo para novos estudos.

Palavras-chave: equino, biomateriais, quitosana.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of chitosan film on wound repair in horse distal limb. Skin wounds were induced on metacarpus and metatarsus region of four adults horses. On treat group, eight wounds were covered with chitosan film and on control group sodium chlorid 0.9% was used. During the experimental period, it was evaluated the wound diameter, exuberant granulation tissue formation, kind of exudat, histological analyzes, and some characteristics of the chitosan film (plasticity during handling and presence or absence of film on each change). The chitosan film had not interfered on healing time, might serving to cover skin wounds, with potential advantages, if it is used as a

conductive of substances that interfere positively in the healing process, opening a field to news studies.

Key words: equine, biomaterials, chitosan.

INTRODUÇÃO

Os equinos apresentam complicações na cicatrização de feridas em regiões distais de membros, quando comparadas às feridas de tronco, e isso se deve a uma longa fase reparatória, caracterizada por grande retração da ferida, baixas taxas de epitelização e cessação precoce da contração da ferida (JACOBS et al., 1984; WILMINK et al., 1999). Os equinos possuem precursores dermais e subcutâneos próprios que predis põem a formação de tecido de granulação exuberante (CHVAPIL et al., 1979), atrasando a cicatrização por inibição da contração da ferida e subsequente epitelização, podendo resultar em grandes áreas ulceradas (JACOBS et al., 1984).

Uma alternativa ao uso de preparações tópicas para tratamento das feridas que requerem utilização diária é o recobrimento da ferida com membranas, buscando substituir a função da pele perdida, proteger a ferida da perda de fluidos e proteínas, prevenir a invasão de bactérias e reduzir o stress mecânico, melhorando e estimulando a cicatrização (CAMPOS, 2007). A quitosana nas suas diferentes formas vem sendo estudada como uma opção de baixo custo para recobrimento de

^ICurso de Medicina Veterinária, Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto, Av. Dr. Oscar de Moura Lacerda, 1520, 14076-510, Ribeirão Preto, SP, Brasil. E-mail: eanunes@terra.com.br. *Autor para correspondência.

^{II}Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL), Poços de Caldas, MG, Brasil.

^{III}Curso de Medicina Veterinária, Anhanguera Educacional, Leme, SP, Brasil.

^{IV}Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.

feridas. É derivada da quitina, o segundo biomaterial mais abundante na natureza e encontrada principalmente no exoesqueleto de insetos e nas carapaças de crustáceos (fontes naturais renováveis) (CAMPOS, 2007). Além de recobrir e proteger a ferida dos agentes externos, a quitosana também pode ser utilizada como suporte para liberação controlada de fármacos (LOKE et al., 2000).

Devido às particularidades da cicatrização em partes distais de membros de equinos e à escassez de informações referentes ao uso de biomateriais na reparação de feridas nessa espécie, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da membrana de quitosana no processo de reparação de feridas cutâneas em membros locomotores de equinos. Dessa forma, será possível vislumbrar seu emprego futuro, associado a outras substâncias que promovam a cicatrização em menor tempo com melhor qualidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro equinos, com peso médio de 330kg, idade entre cinco e oito anos, sem raça definida. Os animais hípidos foram incluídos no experimento, permanecendo em piquetes, livres para movimentação, durante todo o período experimental.

As membranas de quitosana de alto peso molecular (M_w 100.000), com grau de desacetilação superior a 75%^a, foram preparadas pela técnica de evaporação de solvente, usando uma solução aquosa de ácido acético glacial^b (1,0% w/w) como solvente (CAMPOS, 2007).

Os animais permaneceram em posição quadrupedal durante a realização do procedimento de criação das feridas. A sedação foi obtida com a utilização do cloridrato de detomidina^c (20mcg kg⁻¹), por via intravenosa (IV). Após 10 minutos, foi realizado o bloqueio anestésico local com cloridrato de lidocaína 2%^d, aplicado no tecido subcutâneo de modo a formar um quadrado de 3 cm em cada lado (9cm²), circundando o local de formação da ferida.

Antes do procedimento, foi realizada tricotomia das regiões metacarpianas e metatarsianas dos quatro membros locomotores e anti-sepsia com pvpí degermante. Com auxílio de bisturi e um molde circular de 20mm de diâmetro, fez-se incisão cutânea, gerando uma ferida em forma circular de 20mm de diâmetro. O mesmo procedimento foi realizado na área dorsal dos quatro membros.

Ao término do procedimento, todas as feridas foram recobertas com gaze hidrofílica e envoltas com bandagem, composta por filme de pvc, algodão ortopédico, atadura de crepon e esparadrapo para fixação. Todos os animais receberam uma

aplicação de fenilbutazona^e como terapia anti-inflamatória e analgésica, na dose de 2,2mg kg⁻¹, IV. No período pós-operatório, as bandagens foram retiradas e as feridas limpas com gaze hidrofílica e solução salina a 0,9%.

As feridas de um membro torácico e de um membro pélvico foram recobertas com a membrana de quitosana (membro tratado). As outras feridas, ou seja, de um membro torácico e de um membro pélvico não receberam a membrana (membro controle). A escolha pelo membro tratado e pelo controle foi feita aleatoriamente, através de sorteio.

A limpeza das feridas, a substituição das membranas e as trocas das bandagens, ocorreram no dia três do pós-operatório e a cada sete dias até total cicatrização das feridas.

Durante o período experimental, foram avaliadas as seguintes características das feridas: mensuração do diâmetro; formação de tecido de granulação exuberante; tipo de exsudato que a recobria e histologia. Também foram avaliadas as características da membrana de quitosana, como plasticidade durante manipulação e presença ou ausência da membrana a cada troca.

Para a mensuração das feridas, foi utilizado um paquímetro e as medidas foram obtidas em três direções para cálculo e obtenção do tempo médio de cicatrização. A formação do tecido de granulação exuberante foi classificada em ausente ou presente (presente = quando ultrapassava o nível da superfície da pele adjacente à ferida). O tipo de exsudato que recobria a ferida foi classificado em ausente ou presente (presente = seroso ou fibrinoso). A histologia da área de transição entre a pele/epitélio com o tecido de granulação foi avaliada após biópsias do tecido da margem da ferida. Ao término do período experimental, as amostras foram processadas e coradas por hematoxilina & eosina, e Verhoeff.

As avaliações referentes às características físicas de todas as feridas e da membrana de quitosana foram realizadas no dia três do período pós-operatório e a cada sete dias até total cicatrização. As biópsias para avaliação da morfologia microscópica foram obtidas apenas das feridas do metacarpo, possibilitando a avaliação física das feridas do metatarso, sem interferência das biópsias. As biópsias foram realizadas nos dias 3, 30 e ao término da cicatrização de cada ferida.

Foi utilizado o teste de Tukey com um nível de significância de 5% ($P < 0,05$) para comparação das médias do diâmetro da ferida nos diferentes momentos de avaliação, no mesmo grupo e para comparação entre grupos em cada momento de avaliação.

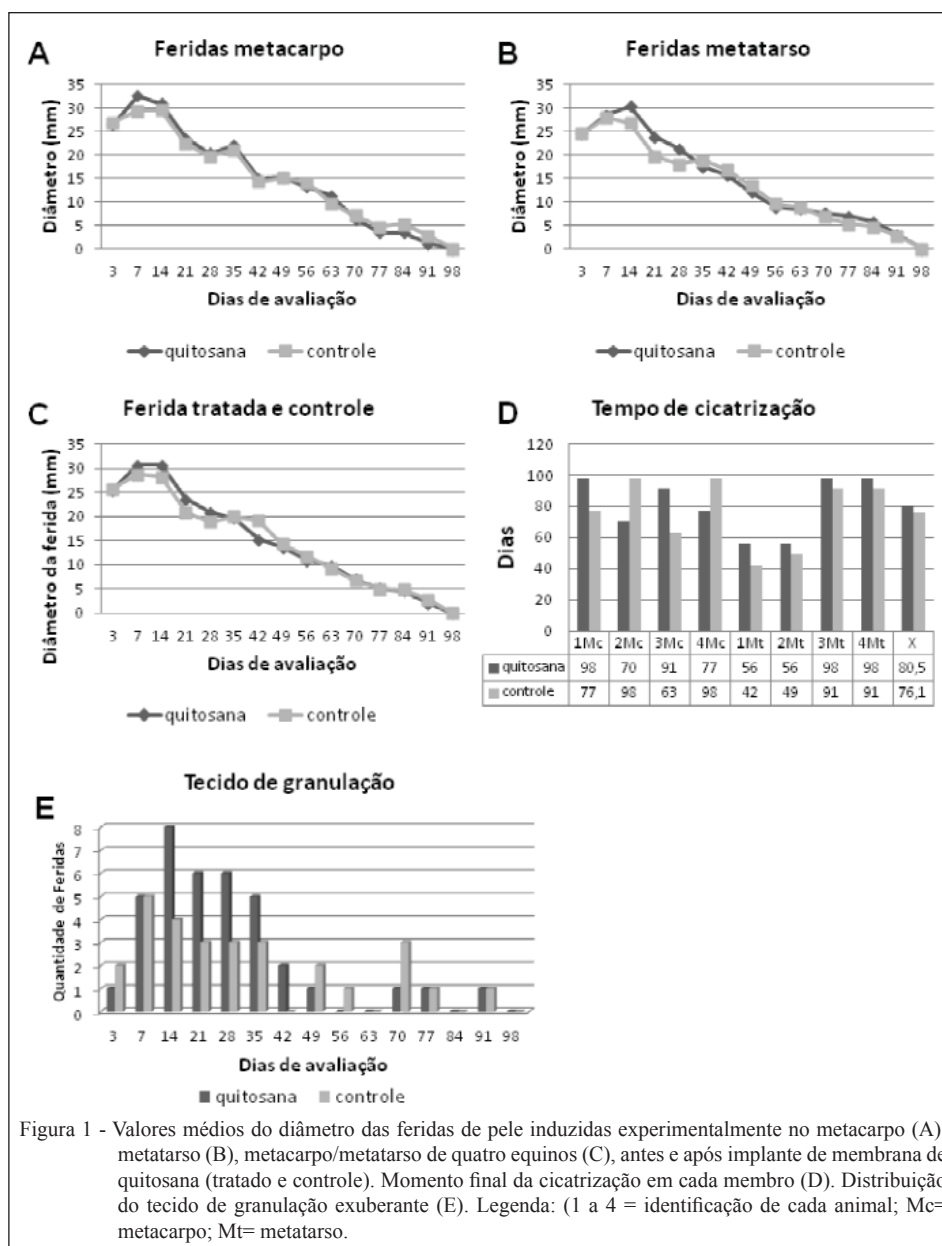
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mensuração das feridas e formação de tecido de granulação: não houve diferença significativa quanto ao tempo de cicatrização das feridas dos membros torácicos e pélvicos, corroborando as observações de GOMEZ et al. (2004), quando compararam feridas induzidas em metacarpo e metatarso de equinos.

Quando se comparou o diâmetro das feridas nos diferentes momentos de avaliação em cada grupo, foi observada semelhança nos resultados, tanto para o grupo tratado como para o controle (Figuras 1A, 1B,

1C). O período médio de cicatrização para as feridas do grupo controle foi de 76,1 dias (mínimo=42; máximo=98) e, para as feridas do grupo tratado, foi de 80,5 dias (mínimo=56; máximo=98) (Figura 1D).

O formato circular e o diâmetro escolhido para criação da ferida no membro dos cavalos deste experimento permitiu a avaliação por um período suficiente para verificar a interferência da membrana de quitosana no processo cicatricial. Segundo MADISON & GRONWALL (1992), para os cavalos, o formato da ferida não interfere no tempo de cicatrização. Já para os humanos, há evidências que o tamanho, forma e profundidade da ferida afetam a



taxa de contração, observando-se que feridas lineares fecham mais rapidamente, seguidas das retangulares e circulares.

Foi observado aumento do diâmetro da ferida até o dia 14 do período pós-operatório e o retorno ao tamanho inicial ocorreu aproximadamente no dia 28 do período pós-operatório. Segundo WILMINK et al. (1999), em pôneis, também há um aumento do tamanho da ferida, entretanto, a sua contração é mais rápida, quando comparada aos equinos, devido a um influxo rápido de polimorfonucleares na ferida e produção elevada de TNF α , IL-1, quimioatrativos, TGF β , e espécies reativas de oxigênio, que são essenciais para reforço da resposta inflamatória, para indução do tecido de granulação e contração da ferida. Nos equinos, a resposta inflamatória inicial é lenta e perdura por maior tempo.

A partir do dia 28 do pós-operatório, houve diminuição gradativa do diâmetro das feridas e a cicatrização por completo ocorreu no dia 98 do pós-operatório, sendo considerado um período prolongado, quando comparado ao trabalho de SOUZA et al. (2006). Esses autores obtiveram cicatrização completa de feridas metacarpianas de dois cm de diâmetro após 32 dias da indução e tratamento com creme a base de *Triticum vulgare*, e após 41 dias em feridas tratadas com solução fisiológica.

Esse período prolongado de cicatrização pode ser atribuído à formação de tecido de granulação exuberante, que ocorreu em ambos os grupos, com uma tendência maior entre os dias 14 e 42 nas feridas recobertas com a membrana de quitosana (Figura 1E). Essa característica de indução de formação de tecido de granulação pela quitosana foi referida no trabalho de BURKATOVSKAYA et al. (2006), os quais atribuíram como um dos efeitos benéficos na reparação, além de induzir angiogenese e a produção de interleucinas, responsáveis pela migração e proliferação de fibroblastos e queratinócitos. Entretanto, esses autores realizaram os trabalhos em cobaias, nas quais não se observa produção excessiva de tecido de granulação. Em membros distais de equinos, o tecido de granulação torna-se prejudicial à reparação tecidual quando excede a superfície da ferida (HANSON, 2008). Em contrapartida, a maior indução à formação de tecido de granulação é benéfica nas feridas profundas que necessitam de rápida granulação.

O longo intervalo de tempo entre as trocas dos curativos (sete dias) e a retenção de exsudato sobre a ferida pode ter induzido maior angiogênese. GOMEZ et al. (2004) obtiveram cicatrização das feridas em aproximadamente 35 a 38 dias, quando utilizaram três tipos de membranas biológicas em

feridas de três cm de diâmetro, induzidas no metacarpo e metatarso, sem a presença de tecido de granulação exuberante. Segundo os autores, os curativos diários e as trocas das bandagens diminuem as possibilidades de formação de tecido de granulação exuberante, pois removem os microorganismos e exsudatos que mantêm citocinas e fatores de crescimento. No trabalho de BERRY & SULLINS (2003), com feridas induzidas de 2,5cm² em metacarpo/metatarso, para avaliação de seis tratamentos com antimicrobianos, em quatro grupos, a bandagem recobria as feridas, mas em dois grupos não havia bandagem. Entre todos os tratamentos, observou-se um período médio de cicatrização de 95 dias, período maior em relação a este trabalho. As trocas das bandagens ocorreram todos os dias até o dia 17, passando para cada três dias até total cicatrização e, quando presente, o tecido de granulação foi excisado cirurgicamente. Nas feridas tratadas sem bandagem, não houve formação de tecido de granulação.

A partir do dia 49 até o dia 91, a formação do tecido de granulação ocorreu para ambos os grupos de forma semelhante. Outros estudos são necessários para verificar os efeitos da troca da membrana de quitosana sobre a formação de tecido de granulação em diferentes intervalos de tempo.

Outro fator que deve ser considerado quanto ao tempo prolongado de cicatrização das feridas neste experimento é a manutenção dos animais em condições de campo, que possibilitou a deambulação espontânea e provavelmente a abrasão excessiva da região da ferida. Também pode ter influenciado o intervalo de tempo entre as trocas de curativos, que ocorreram semanalmente, diferentemente dos curativos diários utilizados no trabalho de SOUZA et al. (2006); além da bandagem oclusiva e não aderente, que é benéfica até a formação do tecido de granulação e nivelamento do leito à pele ao redor (HENDRICKSON, 2005). Neste experimento, a bandagem foi mantida por uma semana para evitar o contato com sujidades do ambiente e como forma de manter a membrana aderida à ferida, possibilitando, dessa forma, verificar o efeito do longo período entre as trocas de curativos. Entretanto, apesar do tempo prolongado de cicatrização, o protocolo experimental utilizado neste trabalho não influenciou negativamente na cicatrização das feridas.

Tipo de exsudato: o exsudato seroso foi observado no dia três na maioria das feridas do grupo tratado e controle, e se deve à resposta à lesão tecidual, decorrente do trauma cirúrgico para iniciar o processo de reparação. Segundo KATZ et al. (1991), o exsudato de feridas agudas é benéfico por conter

nutrientes e fatores de crescimento que estimulam o desenvolvimento de células endoteliais e fibroblastos dermais. Do dia sete ao dia 63, houve predomínio de secreção fibrinosa sobre a ferida, diminuindo gradativamente até o dia 91. Talvez, a presença de microorganismos nas feridas deste experimento possam também ter incitado um aumento do tempo de cicatrização por estímulo à formação de tecido de granulação. A presença de exsudato nas feridas do grupo tratado foi semelhante às do grupo controle, portanto, não houve influência da membrana de quitosana na presença ou ausência de exsudato.

Histologia: as amostras obtidas no dia 03, após indução da ferida, tanto para o grupo tratado como para o controle, serviram apenas para descrever as características do processo inicial de reparação,

pois a membrana de quitosana ainda não havia sido implantada. Foi observado predomínio de pequenos vasos sanguíneos (setas), macrófagos, neutrófilos e hemácias (Figuras 2A e 2C). Nos bordos, foi observado desarranjo da estrutura tecidual e diminuição de fibras colagênicas, desencadeada pela presença de neutrófilos e pelo derrame plasmático intersticial (Figura 2B). Em regiões sem comprometimento tecidual, foram observadas estruturas tissulares íntegras e organização randômica de fibroblastos (Figura 2D).

Segundo THEORET (2005), os leucócitos são atraídos e estimulados à migração pelas citocinas (IL-1 β e TNF α) liberadas das plaquetas e por fatores de crescimento (PDGF, TGF α , TGF β , EGF e IGFs), havendo destruição dos debris e bactérias por meio da fagocitose e subsequente degradação, além de

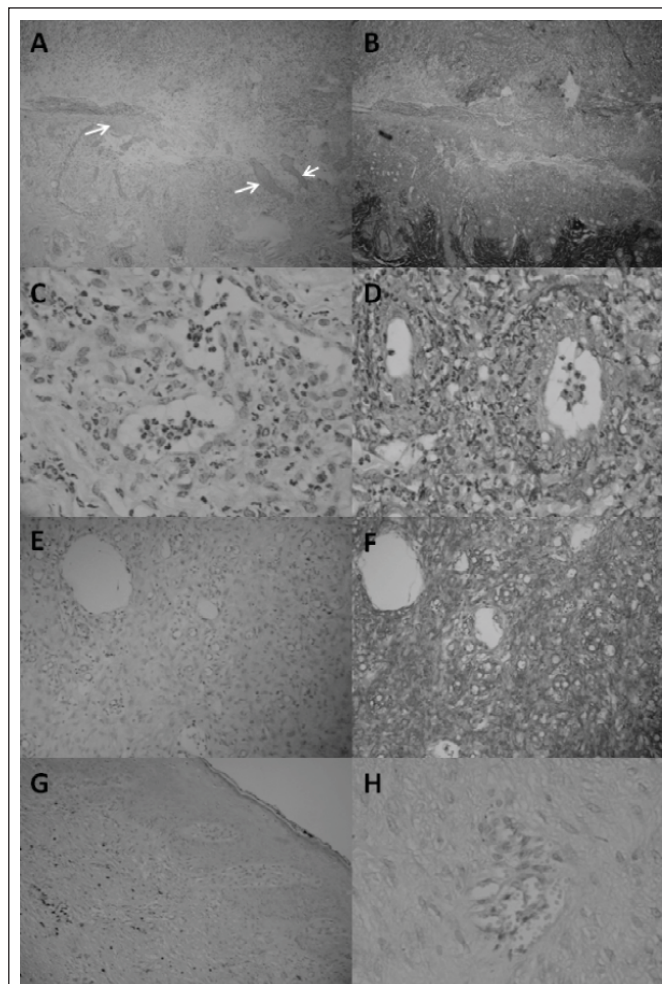


Figura 2 - Cortes histológicas obtidos de feridas cutâneas de equinos, corados por HE (A,C,E,G) e Verhoeff (B,D,F,H). Figura 2A e 2B (40X); 2C e 2D (400 X) – Amostras obtidas no dia 3, após a indução da ferida. Figura 2E e 2F (100X) – Amostras obtidas no dia 30, após a indução da ferida. Figura 2G (40X) e 2H (400X) – Amostras obtidas no dia 98, após a indução da ferida.

coordenar as fases tardias da reparação. Nas amostras obtidas no dia 30, após indução da ferida, para ambos os grupos, havia característica homogênea, tecido epitelial proliferando no sentido da área ulcerada com discreta a moderada hiperplasia, presença de moderada neovascularização em tecido conjuntivo, presença de infiltrado inflamatório misto com predominância de neutrófilos e fibras colagênicas em quantidade discreta (Figuras 2E e 2F), caracterizando a fase de proliferação celular, conforme descrição de THEORET (2005). No dia 98, a epiderme apresentava-se íntegra com todas as suas camadas. O tecido conjuntivo reposto apresentou disposição de fibroblastos em sentido paralelo à epiderme, dando um aspecto de camadas (Figura 2G). Os fibrócitos apresentaram pouca produção de fibras colágenas, conforme constatado pela coloração Verhoeff (Figura 2H). Não foram observadas variações significativas entre os grupos nas amostras analisadas.

A evidente demarcação do tecido reposto era característica de tecido fibroso, menos elástico, possivelmente devido às forças constantes impostas sobre o leito da ferida, impedindo a deposição de colágeno.

Membrana de quitosana: a membrana de quitosana utilizada apresentou espessura fina, pouca flexibilidade e quebradiça durante sua manipulação. Nas feridas que se apresentavam úmidas, mostraram-se com aderência imediata após serem posicionadas sobre elas. Na fase mais adiantada de epitelização, apresentaram-se menos aderentes. A cada troca dos curativos, foi possível observar a presença da membrana ainda recobrendo todas as feridas. Apresentavam-se friáveis e com retenção de exsudato nas feridas úmidas, e secas na fase mais adiantada da cicatrização.

As características observadas durante a manipulação da membrana de quitosana, associada ao ácido acético (solvente), podem ser melhoradas com a adição de agentes plastificantes, tais como o glicerol, ácido oleico e linoleico e, em diferentes proporções, conforme utilizado no trabalho de CARDENAS et al. (2008). Vale ressaltar que o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos apenas da quitosana e do ácido acético (solvente) sobre a cicatrização da ferida cutânea, de modo a evitar a presença de outras substâncias que interferissem nessa avaliação. Especula-se que o ácido acético possa ter sido o agente irritante que acarretou a formação de tecido de granulação exuberante, tendo em vista que foi observado no trabalho de CAMPOS et al. (2006) citotoxicidade direta por essa substância. Talvez, esse efeito indesejável pudesse ser minimizado com a lavagem da membrana com solução fisiológica antes da aplicação.

A permanência da membrana de quitosana por sete dias sobre a ferida possibilitou verificar a manutenção da sua integridade frente a um longo período na presença de exsudato, indicando a possibilidade de realização de estudos futuros com a associação de antibióticos para liberação controlada em feridas, inclusive as exsudativas. Resultados semelhantes foram demonstrados no trabalho de BURKATOVSKAYA et al. (2006), no qual testaram o efeito do momento da retirada do curativo de quitosana sobre a ferida de cobaias. No período entre uma hora a três dias, os curativos estavam muito aderidos e sua remoção foi possível após irrigação com água em temperatura de 40°C. Nos dias seguintes, as bandagens foram removidas facilmente. Entre os dias sete e nove, em algumas cobaias, os curativos não foram identificados.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a membrana de quitosana, na forma que foi elaborada e nas condições experimentais deste estudo, intensificou a formação do tecido de granulação, destacando potencial efeito reparador. Contudo, não houve interferência no tempo de cicatrização das feridas cutâneas de equinos, possibilitando a condução de novos estudos para verificar os seus efeitos nas diferentes fases da cicatrização ou como biomaterial, associada a fármacos para liberação controlada, fatores de crescimento e terapia celular.

COMITÊ DE ÉTICA

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO) (processo n. 2304-2524/08).

FONTES DE AQUISIÇÃO

- a - Aldrich (USA)
- b - Synth (Brasil)
- c - Dormium V® - Agener União – Embu Guaçu - SP
- d - Hipolabor® – Sabará – MG
- e - Equipalazone® - Marcolab – Rio de Janeiro – RJ

REFERÊNCIAS

- BERRY, D.B.; SULLINS, K.E. Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses. *Am J Vet Res.*, v.64, n.1, p.88-92, 2003. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/loi/ajvr>>. Acesso em: 07 mar.2013. doi: 10.2460/ajvr.2003.64.88.
- BURKATOVSKAYA, M. et al. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in

- mice. **Biomaterials**, v.22, p.4157-4164, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2935802/>>. Acesso em: 07 mar.2013. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.03.028.
- CAMPOS, M.G.N. et al. Evaluation of *in vitro* cytotoxicity of chitosan membranes for wound dressing. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓRGÃOS ARTIFICIAIS E BIOMATERIAIS, 4., 2006, Caxambú. **Anais...** Caxambú: IV COLAQB, 2006. 1 CD.
- CAMPOS, M.G.N. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de quitosana para recobrimento de feridas e liberação controlada de fármacos**. 2007. 96f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, SP.
- CARDENAS, G. et al. Chitosan composite films. Biomedical applications. **J Mater Sci Mater Med**, v.19, n.6, p.2397-2405, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/3q66472p2032w4r4/fulltext.pdf>>. Acesso em: 07 mar.2013. doi: 10.1007/s10856-007-3275-3.
- CHVAPIL, M. et al. Dynamics of healing of skin wounds in the horse as compared with the rat. **Exp Mol Pathol**, v.30, n.3, p.349-359, 1979. Disponível em: <http://journals.ohiolink.edu/ejc/article.cgi?issn=00144800&issue=v30i0003&article=349_dothoshacwtr>. Acesso em: 07 mar.2013. doi: 10.1016/0014-4800(79)90089-3.
- GOMEZ, J.H. et al. Effects of 3 biologic dressings on healing of cutaneous wounds on the limbs of horses. **Can J Vet Res**, v.68, p.49-55, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1142129/>>. Acesso em: 07 mar.2013.
- HANSON, R.R. Complications of equine wound management and dermatologic surgery. **Vet Clin Equine**, v.24, p.663-696, 2008. Disponível em: <[http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739\(08\)00060-6/abstract](http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739(08)00060-6/abstract)>. Acesso em: 07 mar.2013. doi: 10.1016/j.cveq.2008.10.005.
- HENDRICKSON, D.; VIRGIN, J. Factors that affect equine wound repair. **Vet Clin Equine**, v.21, p.33-44, 2005. Disponível em: <[http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739\(04\)00083-5/fulltext](http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739(04)00083-5/fulltext)>. Acesso em: 07 mar.2013. doi:10.1016/j.cveq.2004.11.002.
- JACOBS, K.A. et al. Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body of horses. **Vet Surg**, v.13, n.2, p.83-90, 1984. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vsu.1984.13.issue-2/issuetoc>>. Acesso em: 07 mar.2013. doi: 10.1111/j.1532-950X.1984.tb00765.x.
- KATZ, M.H. et al. Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth. **J Am Acad Dermatol**, v.25, n.6, p.1054-1058, 1991. Disponível em: <[http://www.jaad.org/article/0190-9622\(91\)70306-M/abstract](http://www.jaad.org/article/0190-9622(91)70306-M/abstract)>. Acesso em: 07 mar.2013.
- LOKE, W-K. et al. Wound dressing with sustained anti-microbial capability. **J Biomater Res**, v.53, p.8-17, 2000. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(2000\)53:1%3C%3E1.0.CO;2-I/issuetoc](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-4636(2000)53:1%3C%3E1.0.CO;2-I/issuetoc)>. Acesso em: 07 mar.2013. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(2000)53:1<8::AID-JBM2>3.0.CO;2-3.
- MADISON, J.B.; GRONWALL, R.R. Influence of wound shape on wound contraction in horses. **Am J Vet Res**, v.53, n.9, p.1575-1578, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1416358>>. Acesso em: 07 mar.2013.
- SOUZA, D.W. et al. Ensaio da aplicação de creme à base de *Triticum vulgare* na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em equinos. **Rev Bras Plantas Med**, v.8, p.9-13, 2006.
- THEORET, C. The pathophysiology of wound repair. **Vet Clin Equine**, v.21, p.1-13, 2005. Disponível em: <[http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739\(04\)00082-3/fulltext](http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739(04)00082-3/fulltext)>. Acesso em: 07 mar.2013. doi:10.1016/j.cveq.2004.11.001.
- WILMINK, J.M. et al. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopical aspects. **Equine Vet J**, v.31, p.53-60, 1999. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/evj.1999.31.issue-1/issuetoc>>. Acesso em: 07 mar.2013. doi: 10.1111/j.2042-3306.1999.tb03791.x.