

OTÁVIO JOSÉ SÍRIO



VERIFICAÇÃO DA POTENCIALIZAÇÃO
DO EFEITO CICATRIZANTE DO
MUCO DE CARACÓIS DO GÊNERO
Achatina PROMOVIDA POR DIETA
À BASE DE CONFREI (*Symphytum officinale*)

Pirassununga, 2005

OTÁVIO JOSÉ SÍRIO

Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de Confrei (*Symphytum officinale*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof^a Dr^a Maria de Fátima Martins

Pirassununga
2005

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1609
FMVZ

Sírio, Otávio José

Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de Confrei (*Symphytum officinale*) / Otávio José Sírio. - Pirassununga : O. J. Sírio, 2005.

87 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, 2005.

Programa de Pós-graduação: Nutrição Animal.

Área de concentração: Nutrição Animal.

Orientador: Profa. Dra. Maria de Fátima Martins.

1. Caracóis terrestres. 2. Comundongos. 3. Muco. 4. Cicatrização.
5. Confrei. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

P A R E C E R

Interessado: Otávio José Sírio

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 684/2005, intitulado: "Verificação de potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de confrei (*Simphytum officinale*)", no qual foram utilizados 75 camundongos, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria de Fátima Martins, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 18 de outubro de 2005.


Prof. Dra. Julia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SÍRIO, OTÁVIO JOSÉ

Título: Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de Confrei (*Symphytum officinale*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que ele se realizasse.

Em especial, dedico à minha família, Célia Ribeiro Dias Sírío, Kodhai José Sírío, Carolina Dias Sírío, Lucas Sírío Tenório e Daniel Sírío Tenório, sempre demonstrando carinho, apoio, incentivo e amor incondicional.

Dedico também à minha namorada Gísele Fernanda Greggi e toda sua família. Todo o acolhimento, carinho e amor foram fundamentais.

Dedico ainda aos meus amigos, que em nenhum momento de minha vida, rindo ou chorando, deixaram de estar ao meu lado.

Agradecimentos

À Deus, que nunca abandona seus filhos, pelo dom da vida, pela sabedoria, proteção, paciência, determinação, e todas as virtudes que me capacitaram chegar até aqui.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Martins, que me designou o desafio deste trabalho, acreditando que poderíamos atingir os objetivos juntos. Agradeço por sua orientação, não só científica, mas também profissional e pessoal. Obrigado pela dedicação, amizade, carinho, confiança, que contribuíram de maneira imensurável para meu amadurecimento em todos os sentidos.

Aos meus pais, Kodhai José Sírio e Célia Ribeiro Dias Sírio, à minha irmã Carolina Dias Sírio e meus sobrinhos, Lucas Sírio Tenório e Daniel Sírio Tenório, pela constante presença em minha vida, por todas as oportunidades que me foram dadas, carinho e amor.

À namorada Gisele Fernanda Gregghi e sua família, pelo acolhimento, amor e todo suporte emocional que me proporcionam.

À Prof.^a Dr.^a Mamie Mizusaki Iyomasa, pela grande orientação e colaboração nesta dissertação, por abrir as portas de seu laboratório e acreditar no potencial do trabalho, por disponibilizar todos os equipamentos e materiais, e principalmente seu tempo.

A toda equipe da Dr. Mamie: Nilce de Oliveira Wolga, Patrícia e Natália, Dimitrius Leonardo Pitol, Renata e Daniela e todos aqueles que dispenderam seu tempo para de alguma forma poder contribuir com esta pesquisa.

À Cristina Ioshie Mizusaki (*in memoriam*), por toda sua prestatividade e contribuição para realização desta pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Carem Gledes Vargas Rechia, pela coordenação das análises laboratoriais, pela dedicação a esta linha de pesquisa, por ter oportunizado a utilização do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

A toda equipe da Dr. Carem, em especial, Ieda Maria Ranzaboni Prado e Larissa Deadame de Figueiredo, pela contribuição intensa nas análises laboratoriais.

À todos funcionários e estagiários do Helicário Experimental Prof.^a Dr.^a Lor Cury, principalmente Dr. Pedro Pacheco pela co-orientação, correções, apoio e incentivo. Também à Adriana Tarla Lorenzi, pela amizade, prestatividade e colaborações no decorrer do experimento.

Ao Prof. Dr. Júlio Balieiro, Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani e Rodrigo Bertazzo pelas orientações e análises estatísticas.

À D. Kelma De Bem, pelas correções ortográficas.

Aos professores do Departamento de Produção e Nutrição Animal da FMVZ-USP, pela oportunidade de ingressar no curso de Mestrado e pela formação intelectual disponibilizada durante todo o curso.

À todos os amigos, pela amizade incondicional, que a cada dia tem acrescentado muito em minha vida.

Ao amigo Rodrigo Augusto Bonzam Pion, por toda sua criatividade expressa neste trabalho através de seu layout.

À FMVZ-USP pela oportunidade de estudo, aprendizado, infra-estrutura física e pelos profissionais altamente qualificados.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

RESUMO

SÍRIO, O.J. **Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de Confrei (*Symphytum officinale*)** [Investigation on the scar potential effect of mucus in the land snail *Achatina* fed with a diet based on Comfrey (*Symphytum officinale*)]. 2005. 87f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Os caracóis terrestres são animais capazes de produzir através de glândulas localizadas em toda superfície do seu corpo, uma secreção glicoproteica denominada muco, que dentre outras funções, apresenta poder antibacteriano, que pode auxiliar nos processos de reparação de feridas de origens diversas. Desta forma, o objetivo da presente pesquisa foi o de avaliar macroscópica e histologicamente, os efeitos reparadores do muco dos escargots *Achatina fulica* e *Achatina achatina monochromatica*, em lesões provocadas na pele de camundongos da linhagem "hairless"; verificar sua potencialização após a ingestão de uma ração contendo em sua formulação uma planta com propriedades cicatrizantes comprovadas, o Confrei (*Symphytum officinale*); e analisar bioquimicamente a composição do muco destes caracóis. Foram selecionados caracóis das espécies *Achatina fulica* (n=30) e *Achatina monochromatica monochromatica* (n=30), retirado seu muco através de estimulação manual da glândula podal e verificação de seu efeito reparador. Utilizaram-se camundongos da linhagem "hairless" (n=75), submetidos à intervenção cirúrgica e tratados com muco de ambas as espécies de caracóis. As características macroscópicas da lesão foram registradas em protocolo e avaliadas. Fragmentos de pele foram submetidos à biópsia aos 3, 5 e 7 dias de experimento, fixados em Paraformoldeído, processados e incluídos em parafina. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Mason. Macroscopicamente, os animais tratados mostraram edemas menores, maior

presença de crosta e maior contração das bordas das feridas ao final do experimento, quando comparados ao grupo controle. Histologicamente, os grupos tratados também revelaram melhor reparação da lesão, apresentando edemas menos intensos, grandes quantidades de tecido de granulação e infiltrados inflamatórios. O grupo tratado com muco de caracóis alimentados com ração contendo *Symphytum officinale* foi o que apresentou melhores resultados.

Palavras-chave: Caracóis terrestres, camundongos, muco, cicatrização, Confrei.

ABSTRACT

SÍRIO, O.J. **Investigation on the scar potential effect of mucus in the land snail *Achatina* fed with a diet based on Comfrey (*Symphytum officinale*)**. [Verificação da potencialização do efeito cicatrizante do muco de caracóis do gênero *Achatina* promovida por dieta à base de Confrei (*Symphytum officinale*)] 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Land snails are animals able to produce through glands located all over their body surface, a glycoprotein secretion called mucus. This mucus, within other roles, shows an antibacterial power that can help in the healing processes of wounds from several sources. Therefore, the aim of this study was to evaluate through macroscopic and histological techniques the repairing effects of the mucus in the snails *Achatina fulica* and *Achatina achatina monochromatica* in lesions intentionally caused to hairless lineage mice skin; to investigate mucus potential effect after snails have been fed with a diet formulation containing a plant with proved scar properties, the Comfrey (*Symphytum officinale*); and to study the biochemical composition of mucus from these snails. Snails of *Achatina fulica* (n=30) and *Achatina monochromatica monochromatica* (n=30) species were sorted, the mucus extracted through manual stimulation of the podal gland and the repairing effect studied. Hairless lineage mice (n=75) used in this study went through surgery and then treated with mucus from both species of snails. The macroscopic characteristics of the lesion were recorded and assessed. Fragments of skin were taken to biopsy at 3, 5 and 7 days of trial, fixed in paraformaldehyde, processed and embedded in wax. Sections were stained with Hematoxilin-Eosin and Tricromio of Mason. Macroscopically, treated mice showed minor swelling, higher presence of scabs and higher contraction of wound edges at the end of the trial, when compared with control. Histologically, groups that received treatment also showed better lesion repair, presenting less intense

swellings, large amount of scar tissue and inflammatory infiltrates. The group treated with mucus from snails that received a diet containing *Symphytum officinale* presented the best results.

Key-words: Land snails, mice, mucus, scar, Comfrey.

Lista de Figuras

Figura 1 - Caracóis das espécies <i>Achatina monochromatica monochromatica</i> (a) e <i>Achatina fulica</i> (b).....	36
Figura 2 - Extração do muco de um caracol <i>A. monochromatica monochromatica</i> , através da estimulação manual de sua glândula podal.	37
Figura 3 - Camundongo “Hairless”, linhagem HRS/J, utilizado nos ensaios biológicos.	41
Figura 4 - Método de contenção e anestesia para a realização da cirurgia.	43
Figura 5 - Ferida cirúrgica realizada com auxílio de tesoura e pinça.....	43
Figura 6 - Início da biópsia realizada com o animal anestesiado.	45
Figura 7 - Fragmento da pele do dorso do animal sendo retirada para posterior processamento.....	45
Figura 8 - Fragmento de pele sendo esticado por alfinetes com a finalidade de proteger a lesão.	45
Figura 9 - Fragmento já esticado na placa de cera e fixado em solução de paraformoldeído.....	45
Figura 10 - Contração média das bordas das feridas dos grupos pesquisas aos três dias de experimento.	50
Figura 11 - Contração das bordas das feridas dos grupos experimentais aos cinco dias de experimento.....	52
Figura 12 - Contração das bordas das feridas dos grupos experimentais aos sete dias de experimento.....	54
Figura 13 – Fotomicrografias das feridas dos camundongos aos 3 dias de experimento.....	56
Figura 14 - Fotomicrografias das feridas dos camundongos aos 5 dias de experimento.....	58
Figura 15 - Fotomicrografias das feridas dos camundongos aos 7 dias de experimento.....	60

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Consumo de ração oferecida aos caracóis durante o período experimental	48
Tabela 2 - Composição da fração solúvel do muco das espécies <i>A. fulica</i> (FSF) e <i>A. monochromatica monochromatica</i> (FSM).....	49
Tabela 3 - Avaliação macroscópica das variáveis edema e crosta, para camundongos aos 3 dias de experimento.....	51
Tabela 4 - Avaliação macroscópica das variáveis edema e crosta, para camundongos aos 5 dias de experimento.....	53
Tabela 5 - Avaliação macroscópica das variáveis edema e crosta, para camundongos aos 7 dias de experimento.....	55

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 Caracóis terrestres.....	22
2.2 A secreção mucoglicoproteica dos caracóis terrestres.....	24
2.3 Atividade antimicrobiana do muco dos caracóis.....	25
2.4 Capacidade cicatrizante do muco de caracóis terrestres.....	28
2.5 Plantas Medicinais: Confrei (<i>Symphytum officinale</i>).....	30
2.6 Cicatrização de tecidos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODO.....	36
3.1 Caracóis terrestres selecionados para o estudo.....	36
3.2 Retirada do muco dos caracóis terrestres.....	37
3.3 Análise Bioquímica do muco.....	38
3.3.1 Dosagem de Açúcar total.....	38
3.3.2 Dosagem de açúcar redutor.....	39
3.3.3 Dosagem de proteína.....	39
3.3.4 Dosagem de mucoproteínas.....	39
3.3.5 Dosagem de lipídeos.....	40
3.3.6 Determinação da composição da Fração Solúvel do muco das espécies <i>A. fulica</i> e <i>A. monochromatica</i>	40
3.4 Análise da propriedade do muco dos caracóis terrestres no reparo de lesões de pele.....	41
3.4.1 Ensaio Biológico.....	41
3.4.2 Indução da lesão.....	42
3.4.3 Análise macroscópica.....	43
3.4.4 Obtenção das amostras para estudo ao microscópio de luz.....	44
3.5 Análise estatística.....	46
4. RESULTADOS.....	48
4.1 Dietas as quais foram submetidos os caracóis terrestres para a retirada de muco.....	48
4.2 Retirada do muco dos caracóis terrestres.....	48
4.3 Análise bioquímica do muco.....	49
4.4 Análise macroscópica das lesões de pele provocadas em camundongos.....	49

4.4.1 Aos 3 dias de experimento.....	49
4.4.2 Aos 5 dias de experimento.....	51
4.4.3 Aos 7 dias de experimento.....	53
4.5 Análise histológica das lesões de pele provocadas em camundongos.....	55
4.5.1 Aos 3 dias de experimento.....	55
4.5.2 Aos 5 dias de experimento.....	57
4.5.3 Aos 7 dias de experimento.....	59
5. DISCUSSÃO.....	62
5.1 Dietas as quais foram submetidos os caracóis terrestres para a retirada do muco.....	62
5.2 Retirada do muco dos caracóis terrestres.....	62
5.3 Análise bioquímica do muco.....	63
5.4 Análise macroscópica das lesões de pele provocadas em camundongos..	63
5.5 Análise histológica das lesões de pele provocadas em camundongos.....	65
6. CONCLUSÕES.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
8. ANEXOS.....	85



introdução

1 Introdução

Os caracóis terrestres pertencem ao Filo Mollusca. São gastrópodes pulmonados que apresentam concha espiralada, cabeça distinta com tentáculos e olhos, pé desenvolvido e massa visceral com giro de 180°. (RUPPERT; BARNES 1996).

Liberam por secreção apócrina (OLSEN; LUCHTEL, 1998), uma secreção cutânea composta por uma mistura de materiais provenientes de várias glândulas e exudato geral das células epiteliais (SIMKISS; WILBUR, 1977). As principais glândulas produtoras desta secreção são encontradas na forma de glândulas podais anteriores e posteriores (FRETER, 1941).

Esta secreção é comumente denominada muco e o conhecimento de suas aplicações terapêuticas e cosméticas remontam aos primórdios da humanidade. Nos países europeus, por exemplo, são produzidos xaropes expectorantes e diversos cosméticos produzidos com o muco dos caracóis, baseados em receituário milenar (CHERNOVIZ, 1890). Na região do Pantanal Mato-grossense, o pantaneiro faz uso de emplastos do muco de caracóis terrestres para a cura de ferida de eqüinos (FUNCIA, 2003), o que vem ao encontro com uma realidade deparada em clínicas veterinárias, principalmente de animais de grande porte que se defrontam com práticas leigas, medicando ferimentos de animais com diferentes substâncias, nem sempre com ação comprovada.

A principal finalidade desta secreção, encontrada na pele dos caracóis, é a proteção do corpo do animal contra desidratação. No entanto, a sua viscosidade auxilia em diversas funções, tais como locomoção, captura de alimentos, reprodução, entre outros, além de ser relatado que os caracóis terrestres são resistentes a infecções por microorganismos, devido à presença de um fator

antimicrobiano (IGUCHI, *et al.* 1982). Este poder antimicrobiano pode auxiliar nos processos de reparação de feridas, pois a infecção constitui a única causa mais importante de retardo da cicatrização. (COTRAN *et al.*, 2000)

Em estudos anteriores, MARTINS, *et al.* (2003), constataram o alto poder cicatrizante do muco dos caracóis *Achatina fulica*, em experimentos de cicatrização de feridas em coelhos, utilizando variados veículos desta secreção mucosa, avaliando a reparação local e a evolução das feridas cirúrgicas provocadas.

A cicatrização é um processo natural de reorganização dos tecidos orgânicos no qual origina outro novo, de mesma natureza embriológica promovendo a reconstituição na área da ferida (ALFONSO, 1976). O reparo das lesões de tecidos, em vertebrados, requer a ação conjunta de um sistema molecular e celular, ocorrendo em três etapas distintas, porém interrelacionadas: a inflamação, a migração e proliferação de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, e a deposição de uma nova matriz de tecido conjuntivo (ANDRIESSEN *et al.*, 1997; GROTENDORST *et al.*, 1984; RUNNELS *et al.* 1976).

Segundo GROTENDORST *et al.* (1984), estes estágios ocorrem seqüencialmente em todas as feridas e parecem ser interligados por uma via específica de sinais moleculares. Se a proporção em cada um destes processos é alterada, implica que a capacidade de reparação se altera, acelerando ou retardando o processo cicatrizante.

No tratamento de feridas, tem-se intensificado a pesquisa de produtos naturais para auxiliar a cicatrização, como o óleo de copaíba (CORRÊA, 1984; EURIDES; MAZZANTI, 1995), açúcar (PRATA *et al.*, 1988), vitamina A (BONDI, 1989), colágeno (ABRAMO, 1990) e papaína (SANCHEZ NETO *et al.*, 1993). Dentre

os produtos de origem animal de importância terapêutica, merece destaque a secreção mucoglicoprotéica do caracol terrestre.

É fortemente publicado na literatura, acerca da zootecnia dos caracóis, que sua dieta pode influenciar o sabor de sua carne, sendo, possível aromatizá-la ainda em vida, ou seja, incorporar as propriedades do vegetal que consome (GALO, 1984; CUELAR et al., 1986).

GOMOT (1997), em seus ensaios com caracóis da espécie *Helix aspersa aspersa*, demonstrou que estes animais podem ser usados como indicadores biológicos, uma vez que retiveram em seus corpos, partículas de metais pesados após a ingestão de diferentes amostras de solo contaminado. Isto indica que o que é consumido pelo caracol, acaba retido em seu corpo.

Partindo de informações empíricas e dados baseados na literatura existente, esta pesquisa teve por objetivos estudar e avaliar o efeito do muco dos caracóis *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica monochromatica*, alimentados com duas rações diferentes contendo ou não, em sua formulação, uma planta com propriedades cicatrizantes comprovadas (POZETTI, 1988; THOMSON, 1981) o confrei (*Symphytum officinale*), na cicatrização de lesões provocadas na pele de camundongos hairless; analisar bioquimicamente o muco dos caracóis, quantificando os componentes bioquímicos encontrados nesta secreção; avaliar macroscopicamente as alterações fenotípicas ocorridas durante o processo de reparo e avaliar microscopicamente as alterações celulares ocorridas no processo de reparo da lesão provocada.



revisão de literatura

2 Revisão da Literatura

2.1 Caracóis terrestres

Os caracóis terrestres pertencem ao Filo dos Moluscos, Classe dos Gastrópodes e mais especificamente à Ordem dos Pulmonados, sendo considerados animais de excelente potencial adaptativo, confirmado pelo elevado número de espécies encontradas (STORER et al., 1991).

Como Pulmonados, são caracterizados, principalmente, pela conversão da cavidade do manto em um pulmão respiratório, com uma abertura contrátil, o pneumostoma. A maioria se alimenta de plantas terrestres, e todos eliminaram o estágio larval, desenvolvendo-se diretamente em caracóis jovens (STORER et al. 2000).

É característico dos moluscos apresentarem-se em grande diversidade e adaptação a diferentes condições ambientais; o solo, onde sobrevivem, é o local em que ocorrem as maiores mudanças ambientais. Encontramos formas terrestres somente nas espécies Gastrópodes e principalmente nos Pulmonados, como as espécies *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica monochromatica* (COOPER; KNOWLER, 1991).

Os caracóis terrestres consumidos pela população são conhecidos como escargots, sendo os mais consumidos pela população mundial, os pertencentes às famílias *Achatinidae* (África) e *Helicidae* (Europa).

A espécie mais conhecida de escargot Gigante Africano é a *Achatina fulica*, sendo a mais recomendada para as regiões tropicais e subtropicais, devido a sua alta capacidade de adaptação a esses climas (PACHECO et al. 1999). Outra espécie

da família *Achatinidae* criada e estudada por pesquisadores é a *Achatina monochromatica monochromatica*, caracterizada por apresentar coloração da concha e parte muscular mais claras que de *Achatina fulica*.

A família *Achatinidae*, conhecida por sua rusticidade e adaptação, tem origem centro-africana. Encontra-se dispersa em regiões tropicais úmidas e apresenta ampla distribuição tanto na África como na Ásia, mostrando-se extremamente adaptada a regiões tropicais, preferindo temperaturas acima de 23°C. A família *Helicidae*, de ocorrência natural no continente europeu, tem como faixa de conforto térmico 18°C a 20°C. (PACHECO et al. 1998)

Os caracóis terrestres são importantes fontes de pesquisa na área biológica e veterinária principalmente, pois ocupam diferentes ecossistemas, servindo de alimento para várias espécies. Possuem um papel importante na agricultura, pois são considerados um armazém de nutrientes em toda a parte do mundo (COOPER; KNOWLER, 1991). Podem também ser mantidos em grande número, constituindo excelente material para pesquisa laboratorial e, em última instância, para Zooterapia, como catalizadores do ensino e da terapêutica (MARTINS, 2005).

O consumo desses caracóis como proteína animal é muito antigo, remontando ao período pré-histórico, sendo muito consumido pelos gregos e romanos, constatando-se que, no exército romano, era alimento exclusivo dos oficiais. Na Europa, há muito tempo, representa alimento típico dos camponeses, tradicionalmente de algumas cidades e festas, tendo seu uso generalizado (PACHECO et al., 1998).

Nos tempos atuais, onde há um crescente interesse por produtos medicinais naturais, a necessidade de conhecer e estudar criações zootécnicas alternativas e

seus produtos e subprodutos, coloca a Helicicultura como uma área promissora de pesquisa (COOPER; KNOWLER, 1991).

2.2 A secreção mucoglicoproteica dos caracóis terrestres

Os moluscos possuem uma imunidade natural, formada pelas barreiras de proteção anatômica e química que previnem danos aos tecidos básicos, perda de fluido corporal e infecções por microorganismos patógenos e parasitas. A principal barreira física é a concha e uma secreção mucoglicoproteica que envolve todo o corpo do animal. A integridade do corpo é suportada pela coagulação sangüínea e cicatrização do ferimento (OLSEN; LUCHELT, 1998).

Esta secreção mucoglicoproteica é comumente denominada muco e reveste o corpo dos caracóis apresentando várias funções já identificadas, como a facilitação de seus movimentos, auxiliando a sua locomoção, a prevenção da sua dessecação, captura de alimentos, reprodução, entre outras (IGUCHI et al., 1982).

A liberação do muco na superfície externa do animal é feita por glândula podal de muco envolvido por membranas que se rompem devido a vários sinais, incluindo forças de caráter mecânico. O muco também pode expressar informações sobre o estado sexual dos animais, a direção e situação de estresse e predadores (SIMKISS; WILBUR, 1977).

No escargot *Hélix aspersa*, oito tipos de glândulas foram identificadas sendo que quatro destas produzem vários tipos de muco, secretam proteínas, outra grânulos de carbonato de cálcio; outra, de glóbulos de gordura e outra, secreção pigmentada (SIMKISS; WILBUR, 1977).

A habilidade de secretar um muco através da epiderme consiste numa propriedade muito distinta dos escargots. O muco é produzido em algumas regiões e é freqüentemente misturado a materiais oriundos de glândulas juntamente com o exudato geral das células epiteliais (SIMKISS; WILBUR, 1977).

Pouco é conhecido sobre os mecanismos de controle da descarga destas glândulas epiteliais (OLSEN; LUCHEL, 1998). A hemocele ao redor da base das glândulas de muco tem sugerido que, mudanças na pressão sangüínea causam a liberação do muco durante a locomoção (MACHIN, 1964).

Considera-se ainda que, primeiramente, a superfície ciliada é caracteristicamente coberta pelo muco, o que atua como um veículo para o movimento das partículas através do epitélio e, em seqüência, a função de locomoção, propriamente dita do molusco. Sugere-se também que, a alta viscosidade do muco é produzida pelas glândulas suprapedais enquanto que a baixa viscosidade viria do enchimento das cavidades inferiores dos “pés”, causadas pela oscilação dos músculos. (SIMKISS; WILBUR, 1977).

O muco coletado da superfície desses animais é viscoso, apresenta-se com uma ligeira turbidez e é fracamente colorido em amarelo ou marrom. A fração do muco solúvel em água apresenta uma faixa de pH de 8,5 à 8,75 e favorece testes positivos para reações de biuretos e ácidos sulfuro-antrônicos (IGUCHI et al, 1982).

2.3 Atividade antimicrobiana do muco dos caracóis

Segundo IGUCHI et al. (1982), os invertebrados não possuem mecanismos imuno-específicos como os encontrados nos vertebrados. Esses invertebrados

possuem fatores de defesa que impedem a entrada de materiais estranhos. Para tal, o muco dos moluscos possui fatores antibacterianos que exibem atividade contra microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

KUBOTA et al. (1985), estudando o fator antibacteriano dos escargots, demonstrou grande atividade inibitória de crescimento tanto para bactérias gram-positivas quanto bactérias gram-negativas, ainda que as estruturas da parede celulares destas bactérias fossem diferentes. Isso sugere que cada célula bacteriana é atacada por um fator antibacteriano que pode não estar localizado na parede celular, mas em algum outro local.

Em moluscos, os fatores de defesa são principalmente as reações de defesa celular e os fatores de defesa humoral. As reações de defesa celular envolvem fagocitose e encapsulamento de partículas estranhas. Os fatores de defesa humoral envolvem: lisozimas, lecitinas, fatores antibacterianos ou antivirais e opsonização (FUCHINO et al. 1992).

Estes animais são resistentes às infecções por microorganismos, devido a presença de uma glicoproteína, encontrada no muco, que possui efeito bactericida (FUCHINO et al., 1992).

Essa glicoproteína apresenta alto peso molecular e possui subunidades (diferentemente dos insetos e vertebrados, onde quase todos esses fatores são pequenos polipeptídeos). Além disso, estes estão sempre sendo secretados pelos moluscos, mesmo sem sofrerem estimulação (OBARA et al. 1992).

EHARA et al. (2002), purificaram esta glicoproteína antibacteriana a partir do muco do caracol gigante africano *Achatina fulica* e a denominaram de “**Achacin**”. Esta é secretada sempre, independente do animal sofrer ou não estímulos.

Recentes análises seqüenciais revelaram que Achacin pertence à família das Amino oxidases que são flavoenzimas.

O peso molecular do fator antibacteriano encontrado na superfície corporal do caracol gigante africano *Achatina fulica* mostrou-se elevado, sendo determinado como aproximadamente 160.000 na filtração em gel, e entre 70.000 e 80.000 na eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (KUBOTA et al. 1985).

Segundo FUCHINO et al. (1993), como a massa molecular relativa ao Achacin apresenta-se bastante alta, pareceria ser muito difícil atravessar a membrana mais externa ou a parede da célula, como a Penicilina faz (por possuir peso molecular significativamente inferior, e igual a 334); mas, todos os resultados de sua publicação indicam claramente que o local atacado pelo Achacin é a membrana citoplasmática da célula.

Segundo EHARA et al. (2002), Achacin reconhece e se liga preferencialmente a bactérias em fase de crescimento. Além disso, essa toxicidade seletiva sugere que o Achacin pode ser útil como um agente quimioterápico muito funcional, por ser mais tóxico para a proliferação de patógenos do que para células do hospedeiro ou da flora normal, que apresenta atividade de crescimento mais lenta. Achacin, adicionado a células em repouso e em crescimento, age como bactericida (e não como bacteriostático) somente contra bactérias em crescimento. Essa ação é semelhante àquela de antibióticos pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos, que inibem a síntese de peptidoglicano na superfície celular, como as Penicilinas (FUCHINO, et al. 1991).

Há algumas substâncias antibacterianas que são derivadas de invertebrados, mas poucas delas apresentam alto peso molecular. Achacin por ser uma glicoproteína com massa molecular relativamente muito alta e, por mostrar atividade

antibacteriana tanto contra bactérias Gram-positivas como contra bactérias Gram-negativas, é rara e pouco conhecida cientificamente (FUCHINO et al. 1991).

A ação do Achacin é similar à da Penicilina ou da Sarcotoxina II-A, já que atuam expandindo o corpo da bactéria. No entanto, Achacin não estoura células e nem promove protuberâncias nas mesmas. Nas secções de células tratadas com Achacin, algumas células foram observadas como sendo maiores que as células não tratadas. Sua parede celular e membrana citoplasmática foram claramente observadas, não apresentando qualquer injúria (FUCHINO et al., 1992).

O fato de o muco possuir esta propriedade antibacteriana é extremamente importante no auxílio de processos de reparação de feridas de origens diversas, pois quanto menor a infecção mais rápida será a cicatrização (COTRAN et al., 2000).

2.4 Capacidade cicatrizante do muco de caracóis terrestres

A heliocultura (criação de caracóis comestíveis), no Brasil, tem despertado grande interesse em criadores e pesquisadores pelas suas características nutricionais e farmacêuticas, principalmente a partir dos anos 80. Porém, a heliocultura brasileira ainda carece de pesquisas que visem estudo e aplicabilidade do muco do caracol com finalidades farmacêuticas.

FERRAZ, (1999) relata que desde a antiguidade o caracol era recomendado como remédio, sendo seu muco empregado para a cicatrização de todos os tipos de feridas e para tratamentos de hérnia, problemas de vista e hemorrágicos. E na França, este muco é considerado um dos melhores cosméticos para a conservação da pele feminina.

Nos países europeus são produzidos xaropes expectorantes com o muco do caracol, sendo que CHERNOVIZ (1890) em seu famoso receituário, preconiza a utilização deste muco como produto medicamentoso utilizado sob a forma de xarope ou pasta nas moléstias do peito, na rouquidão, catarros agudos ou crônicos, na coqueluche, nas constipações e em todas as irritações do peito. Estes resultados também são confirmados por GALO (1984), que lista uma série de aplicações farmacológicas utilizando produtos à base de muco dos caracóis.

No exterior, países como o Japão, Itália e França, estudam a aplicabilidade do muco dos caracóis terrestres com finalidades farmacêuticas e cosmetológicas, inclusive produtos comercializados como xaropes e cremes para pele (GALO, 1984).

PONS, et al. (1998), demonstraram em seus estudos, que *Helicidine*, um extrato biológico preparado a partir do muco do caracol *Helix pomatia*, é utilizado como agente anti-tussivo, estando seu efeito relacionado à propriedade relaxante das vias respiratórias.

Trabalhos mais recentes mostraram o efeito cicatrizante do muco da espécie do caracol gigante *Achatina fulica* testados em feridas provocadas cirurgicamente em camundongos e coelhos (MARTINS et al, 1996; 2003; CAETANO, 2000) e, um estudo realizado por IYOMASA et al. (2002) revelou histologicamente uma diferença na maturação do epitélio, em favor da aplicação da secreção mucosa de caracóis sobre a área lesada quando comparada ao controle. SÍRIO et al. (2005) obtiveram resultados semelhantes.

2.5 Plantas Medicinais: Confrei (*Symphytum officinali*)

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se interessados pelo fato de produtos encontrados na natureza revelarem uma gama de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (GUERRA; NODARI, 2001).

O Confrei (*Symphytum officinale*) é uma planta nativa da Europa e Ásia, embora, hoje, seja comum em todas as partes do mundo. No Brasil, é cultivada em todo o país (CARRICONDE, 1997). Pertencente à família Borraginácea, possui em sua composição química alcalóides pirrolizidínicos, além da alantoína, tanino e esteróides. Estes elementos em união conferem à planta propriedades curativas como emoliente, calmante e consolidação de fraturas ósseas (SOUZA, 1991; VANNIER, 1989; THOMSOM, 1981).

As atividades biológicas da alantoína foram comprovadas através de ensaios clínicos e verificou-se que esta substância atua como cicatrizante, anti-irritante, hidratante e removedora de tecidos necrosados (POZETTI, 1988; THOMSON, 1981).

O confrei teve seu uso medicinal restringido em razão da presença, em suas partes vegetativas e reprodutivas, de alcalóides pirrolizidínicos, entre os quais a acetilechmidina, 7-acetilicopramina, 7-angelil-retronecina-viridiflorato, consolidina, consolicina, achnatina, achimidina, heliosupina, lasiocarpina, sinffitina, sinfitocinoglossina e viridiflorina (SAITO, 1984).

Devido à presença de alcalóides pirrolizidínicos, que são altamente hepatotóxicos, a literatura homeopática, mesmo a mais atual, registra patogenesia restrita deste medicamento, como específico para casos de traumatologia óssea, retardo na consolidação de fraturas e dores periosteas, sendo considerado medicamento de ação limitada (POZETTI, 1993).

2.6 Cicatrização de tecidos

A capacidade do corpo de substituir células lesadas ou mortas e de proceder ao reparo dos tecidos após inflamação é crítica para a sobrevivência (COTRAN et al., 2000).

A cicatrização é um processo natural de reorganização dos tecidos orgânicos no qual origina outro novo, de mesma natureza embriológica promovendo a reconstituição na área da ferida (ALFONSO, 1976). O reparo das lesões de tecidos em vertebrados requer a ação conjunta de um sistema molecular e celular (MONTENEGRO; FRANCO, 2003).

Existem autores que consideram três estágios no processo de cicatrização: inicialmente um estágio inflamatório, seguido por um de proliferação e finalizando com o reparo em um estágio de remodelação (RUNNELS et al. 1976; GROTENDORST, et al., 1984; ANDRIESSEN et al., 1997). Outros autores classificam, de uma forma mais completa, dividindo o processo em cinco fases principais: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação (FAZIO, 2000).

Segundo GROTENDORST, et al. (1984), estes estágios ocorrem seqüencialmente em todas as feridas e parecem estar interligados por uma via

específica de sinais moleculares; se a proporção em cada um destes processos é alterada, implica que a capacidade de reparação se altera acelerando ou retardando o processo cicatrizante.

A coagulação tem seu início imediato após o surgimento da ferida. O espaço da lesão é imediatamente preenchido por sangue coagulado, que contém fibrina e células sangüíneas (COTRAN et al., 2000).

Intimamente ligada à fase anterior, a inflamação depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos (MANDELBAUM et al., 2003).

Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a aparecer, mas na ausência de infecção e restos celulares, diminuem rapidamente em número (RAHAL et al., 2001). O exudato fibrinoso na superfície, em contato com o ar, fica ressecado, formando uma crosta. Esta, útil, pois auxilia a conter a hemorragia e a proteger o ferimento de contaminações externas (MONTENEGRO; FRANCO, 2003).

Este processo inflamatório é mediado por uma série de compostos endógenos, incluindo fatores imunológicos e quimiotáticos, proteínas do sistema complemento, histamina, serotonina, bradicinina, leucotrienos e prostaglandinas. Tanto os leucotrienos quanto as prostaglandinas contribuem para os sintomas da inflamação, sendo que as prostaglandinas E_2 e I_2 promovem o edema e a infiltração de leucócitos, além de exacerbarem as propriedades de dor da bradicinina. (BRODY et al., 1997).

Com relação ao sistema complemento, este é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos. Está constituído por um conjunto de proteínas, tanto solúveis no plasma como expressas na membrana celular, e é ativado por diversos mecanismos, através de duas vias, a clássica e a alternativa

(FRANK, 1987). O sistema complemento participa dos seguintes processos biológicos: fagocitose, opsonização, quimiotaxia de leucócitos, liberação de histamina dos mastócitos e basófilos e de espécies reativas de oxigênio pelos leucócitos, vasoconstrição, contração da musculatura lisa, aumento da permeabilidade dos vasos, agregação plaquetária e citólise (FRANK et al. 1991).

Os neutrófilos e macrófagos são as células encontradas na região do processo de cicatrização, em resposta à invasão bacteriana (RUNNELS et al., 1976), digerindo ou removendo-as, como passo essencial para o crescimento do tecido reparador (MONTENEGRO; FRANCO, 2003). Ao fagocitarem as bactérias, estas células se degeneram, formando o pus com os tecidos necróticos (GUYTON, 1991).

Nesta fase, projeções de células epiteliais das bordas migram e crescem ao longo das margens da derme, produzindo assim, uma camada epitelial contínua, porém, fina (COTRAN et al., 2000).

Os macrófagos irão mediar a transição da fase inflamatória para a proliferativa, sendo importantes para o debridamento e recrutamento de fibroblastos. Uma das principais funções dos fibroblastos é a síntese de colágeno, sendo que a resistência da cicatriz é determinada pela velocidade, quantidade e qualidade da deposição do mesmo (RAHAL et al., 2001). As fileiras de colágeno ficam mais abundantes e a proliferação de células epiteliais prossegue, recuperando sua espessura normal (COTRAN et al., 2000).

A última fase da proliferação é a angiogênese, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização. Inicialmente as células endoteliais migram para a área ferida; a seguir ocorre proliferação das células endoteliais (MANDELBAUM, 2003).

A presença de miofibroblastos resulta na diferenciação nos tecidos e estabelece junções entre si, formando um eficiente arcabouço contrátil, promovendo desta maneira, a contração do tamanho do ferimento (MONTENEGRO; FRANCO, 2003).

A remodelação da ferida, etapa final de um processo de cicatrização é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas, reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura. A neovasculatura diminui e, tardiamente, a cicatriz é considerada avascular (MANDELBAUM, 2003).

Na prática médica e também na veterinária, a homeopatia está sendo bastante difundida e o uso de medicamentos que possuem capacidade específica de promover a cicatrização e a recuperação tecidual estão sendo alvo de estudo de cicatrização.

material e método



3 Material e Método

3.1 Caracóis terrestres selecionados para o estudo

Foram utilizados neste estudo sessenta exemplares adultos de caracóis *Achatina fulica* (n=30) e *Achatina monochromatica monochromatica* (n=30), com peso médio entre 120 a 180 gramas, para a coleta do muco (**FIGURA 1**).

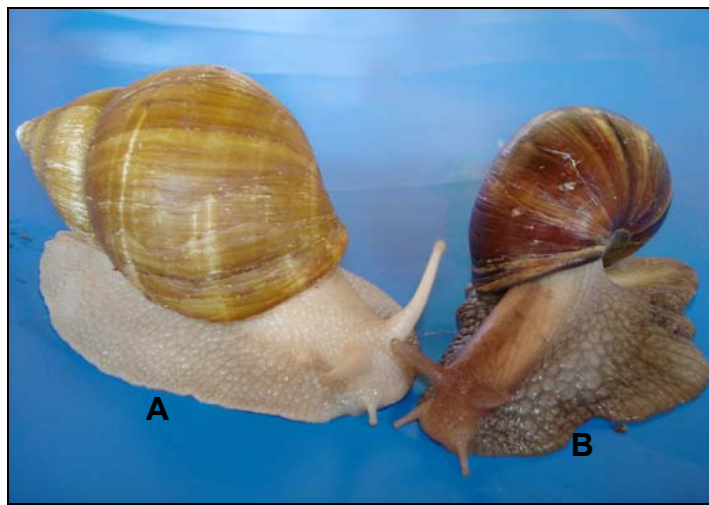


Figura 1 - Caracóis das espécies *Achatina monochromatica monochromatica* (a) e *Achatina fulica* (b).

Os animais foram separados por espécie e mantidos em caixas de madeira de dimensões 65x40x30cm, com densidade populacional de 15 animais cada, sendo metade alimentados a cada 2 dias com uma ração base desenvolvida a partir dos trabalhos de FLAUZINO et al., 1997; PACHECO; MARTINS, 1998, PACHECO et al. 1998a, PACHECO et al. 1998b; PACHECO, 1999, e a outra metade alimentados com esta ração base acrescida de Confrei (*Symphytum officinale*). Esta foi, primeiramente, seca em câmara desumidificadora, triturada e adicionada em detrimento ao suplemento mineral da ração base, ou seja, 1% dos ingredientes, sendo fornecida aos caracóis durante o período experimental (Anexo 1).

A determinação da massa corpórea e a avaliação do programa de seleção foram feitos através da pesagem dos animais em balança analítica de precisão Marte[®], modelo A5 nº 227619 e, com o auxílio de um paquímetro digital, foram mensurados o comprimento e a largura. O comprimento é medido do ápice à margem anterior da concha e a largura, no ponto médio desta.

3.2 Retirada do muco dos caracóis terrestres

Os moluscos foram separados e colocados em caixas plásticas de dimensões 75x40x30cm sem fundo de terra e mantidos em jejum por 3 dias antecedentes à coleta do muco. Este procedimento é realizado com a finalidade de não contaminar o material biológico a ser extraído.

A coleta foi realizada através de estimulação manual da superfície corporal dos caracóis, mais especificamente da sua glândula podal, não havendo sacrifício dos animais doadores de muco (**FIGURA 2**).



Figura 2 - Extração do muco de um caracol *A. monochromatica monochromatica*, através da estimulação manual de sua glândula podal.

3.3 Análise Bioquímica do muco

A análise bioquímica da secreção foi realizada através de dosagens de açúcares totais e redutores, proteínas, mucoproteínas e lipídeos do muco dos moluscos terrestres.

O muco de cada espécie foi solubilizado e depois diluído com 2 volumes de água Milli-Q, em béquer de 500 mL, deixado sob agitação constante por 24 horas, a uma temperatura de 4°C. Após este período, o material foi centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm. Separou-se o sobrenadante do precipitado. Esta Fração Solúvel foi liofilizada, fechada hermeticamente, envolta em papel alumínio e estocada a -20°C, enquanto a Fração Precipitada não sofreu nenhum outro processo e foi diretamente estocada a -20°C, para posterior análise.

3.3.1 Dosagem de Açúcar total

A dosagem de açúcar total foi realizada pelo método Fenol-sulfúrico, (DUBOIS et al, 1956) utilizando-se como padrão, a glucose, nas concentrações de 20, 40 e 100 µg/ml, para construção da curva padrão. As leituras foram feitas a 490 nm em espectrofotômetro DU-70.

Método: 0,5 ml de amostra + 0,5 ml de solução de fenol 0,5% + 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, resfria-se e lê-se.

3.3.2 Dosagem de açúcar redutor

Esta dosagem foi feita pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945) utilizando-se padrão de glucose de 20, 40 e 100 $\mu\text{g/ml}$ e leitura a 540 nm.

Método: 1 ml de amostra + 1 ml de reativo de Somogyi , banho-maria a 100°C por 10 min. Resfria-se. Acrescenta-se 1 ml de reativo de Nelson, completa-se o volume para 10 ml com água destilada e procede-se a leitura.

3.3.3 Dosagem de proteína

Os teores de proteína foram quantificados pelo método de Lowry modificado (HARTREE, 1972), utilizando-se padrão de albumina de soro bovino (10, 20, 40 e 80 $\mu\text{g/ml}$, leitura a 650 nm).

Método: 0,5 ml de amostra + 0,5 ml de solução A, aquece-se 10 min a 50°C. Resfria-se e acrescenta-se 0,1 ml de solução B diluída 1:2 em água, espera-se 10 min e acrescenta-se 1,5 ml de reagente de Folin (diluído 1mL/ 15 ml de água), sob agitação. Aquece-se 50 °C por 10 min, resfria-se e lê-se a 650 nm.

3.3.4 Dosagem de mucoproteínas

Foi realizada através de “kit” da Labteste Diagnóstica – catálogo 20, que se utiliza de dosagem colorimétrica pelo reagente de Folin-Ciocalteau e, como padrão, tirosina em diferentes concentrações (1 a 20mg/dL).

3.3.5 Dosagem de lipídeos

A dosagem de lipídeos foi realizada segundo RADIN (1969), seguindo o protocolo abaixo:

À 250mg da amostra foram acrescentados 5 mL de solução clorofórmio: metanol (2:1 v/v) sendo a mistura centrifugada a 2000g por 5 min.

O sobrenadante foi coletado para um tubo limpo e o precipitado foi novamente suspenso em mais 5 mL da solução clorofórmio:metanol. Após a segunda centrifugação, os sobrenadantes foram colocados no mesmo tubo e acrescentados de igual volume de solução de KCl 2M. Após a separação das fases, a fase orgânica foi colocada em um béquer pré-pesado.

À fase inorgânica foi novamente acrescentada 10mL de solução clorofórmio: metanol e centrifugada nas condições anteriormente descritas. A fase orgânica foi removida e colocada no mesmo béquer pré-pesado. O solvente evaporou em temperatura ambiente sendo o béquer novamente pesado para comparação das diferenças de massas.

3.3.6 Determinação da composição da Fração Solúvel do muco das espécies *A. fulica* e *A. monochromatica*:

Soluções feitas a partir da Fração Solúvel do muco de cada espécie foram preparadas pesando-se 2 g do líofilo e redissolvendo-os em 200 mL de água Milli-Q. Após o preparo das soluções, ambas foram submetidas aos métodos gerais, descritos no item 3.3.

3.4 Análise da propriedade do muco dos caracóis terrestres no reparo de lesões de pele

3.4.1 Ensaio Biológico

Foram utilizados 75 camundongos “Hairless” (*Mus musculus*, Linhagem HRS/J), machos, com peso médio de 35g, procedentes do biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP-USP) (FIGURA 3).



Figura 3 - Camundongo “Hairless”, linhagem HRS/J, utilizado nos ensaios biológicos.

Estes animais possuem um gene recessivo autossômico situado no cromossomo 14 e são produzidos em laboratório, resultantes do acasalamento entre machos (Hr) e fêmeas (Hr^+). O animal tem como característica fenotípica ausência de pêlos e não apresenta deficiências imunológicas severas como as encontradas no camundongo comum.

Foram mantidos em temperatura ambiente controlada entre 22 à 24°C, com “timer” programado para 12 horas de iluminação diária. Os animais foram alimentados com ração especial para camundongos Nuvilab[®] e água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em grupos de acordo com o tratamento a ser recebido:

- 1) C – grupo sem tratamento (controle);
- 2) F – grupo tratado com o muco do escargots *Achatina fulica* alimentados apenas com a ração base;
- 3) M - grupo tratado com o muco do escargots *Achatina mochromatica monochromatica* alimentados apenas com a ração base;
- 4) Fc - grupo tratado com o muco dos escargots *Achatina fulica* alimentados com a ração base acrescida da planta medicinal, *Symphytum officinale* (confrei);
- 5) Mc - grupo tratado com o muco dos escargots *Achatina monochromatica monochromatica* alimentados com a ração base acrescida da planta medicinal *Symphytum officinale* (confrei).

Cada grupo de camundongos (15 do grupo C, 15 do grupo F, 15 do grupo M, 15 do grupo Fc e 15 do grupo Mc) foi subdividido em:

- 1) Subgrupo de 3 dias
- 2) Subgrupo de 5 dias
- 3) Subgrupo de 7 dias

3.4.2 Indução da lesão

Os camundongos foram anestesiados com 0,25g/Kg de tribromoetanol 2,5% administrados via intraperitoneal. Após assepsia e anti-sepsia do local cirúrgico, uma lesão circular foi realizada na pele do dorso do animal, com auxílio de “punch” de

0,5mm de diâmetro, tesoura pequena e pinça (**FIGURAS 4 e 5**). Após a lesão, os animais foram separados aleatoriamente de acordo com os tratamentos. O muco foi aplicado com auxílio de conta-gotas sobre a área da lesão de cada camundongo pesquisado.



Figura 4 - Método de contenção e anestesia para a realização da cirurgia.

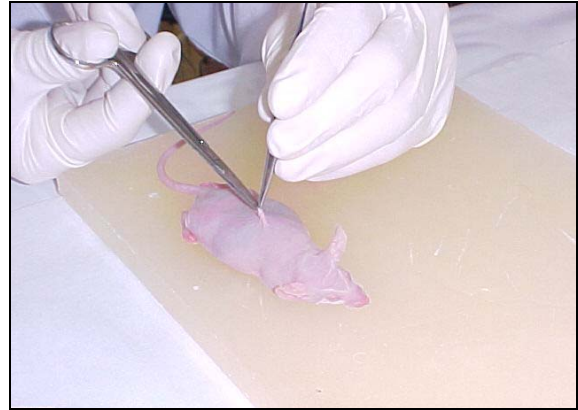


Figura 5 - Ferida cirúrgica realizada com auxílio de tesoura e pinça

Os animais foram mantidos individualmente nas gaiolas com a finalidade de proteger a lesão contra a mordida ou lambida dos outros animais em tratamento.

Os camundongos eram pesados diariamente, todos mantidos em unidades experimentais sob condições controladas de ambiente, sanidade e alimentação (ração e água) *ad libitum*.

3.4.3 Análise Macroscópica

Para este estudo, os animais foram acompanhados diariamente através de observações clínicas do reparo da lesão, as quais foram registradas conforme protocolo (Anexo 2) e documentadas através de fotografias.

3.4.4 Obtenção das amostras para estudo microscópico de luz

Para a realização dos exames histológicos, os animais foram submetidos à eutanásia pelo anestésico Ketamina , de acordo com os dias de tratamento (3, 5 ou 7 dias) e realizadas biópsias de fragmentos de pele do dorso dos camundongos.

Cada fragmento da lesão foi removido com margem de segurança, fixado sobre a placa de cera com auxílio de alfinetes para manter-se estirado (**FIGURAS 6, 7, 8 e 9**) e imerso em paraformaldeído a 4% tamponado por 24 horas. Após esse período, os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram, então, processados cortes de 6µm de espessura e corados em Hematoxilina-Eosina e Tricrômio de Masson. A leitura foi feita em microscópio óptico e as tomadas fotográficas feitas em fotomicroscópio, visando observar o processo inflamatório e cicatricial.

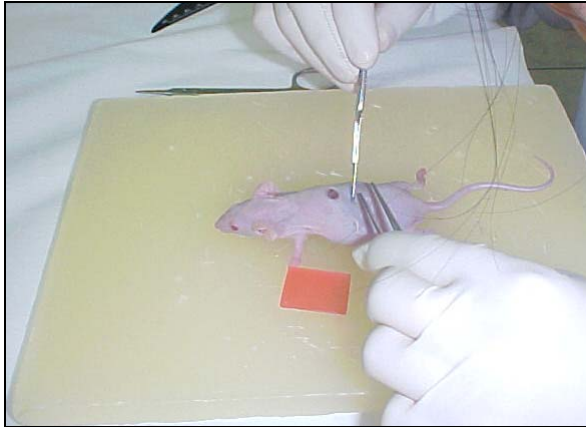


Figura 6 - Início da biópsia realizada com o animal anestesiado.

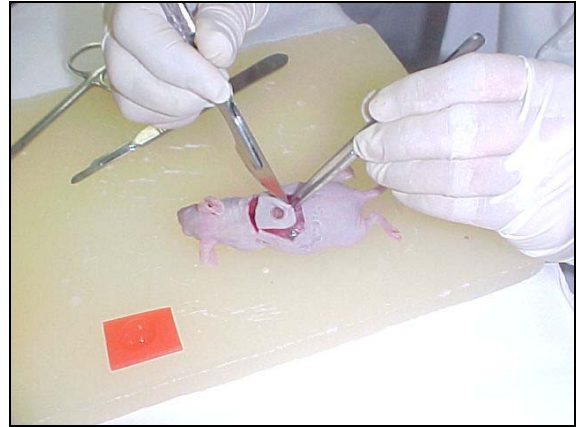


Figura 7 - Fragmento da pele do dorso do animal sendo retirada para posterior processamento.

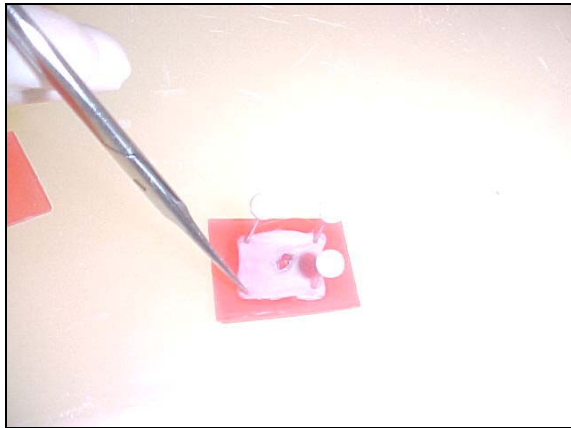


Figura 8 - Fragmento de pele sendo esticado por alfinetes com a finalidade de proteger a lesão.



Figura 9 - Fragmento já esticado na placa de cera e fixado em solução de paraformoldeído.

A análise histológica do processo de reparo foi realizada através da observação de 10 imagens de cada corte histológico, no aumento de 100 vezes. As imagens captadas em fotomicroscópio, através do programa Leica IM50 instalado em computador, conectado à Câmera Leica DC 300F e adaptada ao microscópio Leica DMLB2, foram analisadas partindo-se da periferia da lesão até o centro da mesma.

Os achados foram registrados em protocolo (Anexo 3) e graduados de acordo com sua presença e intensidade.

3.5 Análise Estatística

A análise estatística dos dados bioquímicos foi realizada através do teste de Mann-Whitney, indicado para amostras não paramétricas (SIEGEL, 1956).

resultados



4 Resultados

4.1 Dietas as quais foram submetidos os caracóis terrestres para a retirada de muco

Foram ofertados, durante o período experimental, 225g de ração (ração base e ração base acrescida de *Symphytum officinale*, confrei) para os caracóis de ambas as espécies. Os dados de consumo das diferentes rações ofertadas aos caracóis durante o período experimental encontram-se na **TABELA 1**.

Tabela 1 - Consumo de ração oferecida aos caracóis durante o período experimental

Espécies	Ração base (g)	Ração base + <i>Symphytum officinale</i> (g)
<i>A. fulica</i>	150,77	129,81
<i>A. monochromatica</i>	203,51	196,98

4.2 Retirada do muco dos caracóis terrestres

A quantidade total de muco bruto coletado, a partir de 10 animais de cada espécie, foram de 63,96g e 57,46g para as espécies *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica monochromatica*, respectivamente. Para os animais alimentados com a ração acrescida de *Symphytum officinale* (confrei), a quantidade foi de 65,04g para *A. fulica* e de 58,73g para *A. monochromatica monochromatica*.

Biologicamente, a coloração do muco de *A. fulica* diferiu de *A. monochromatica monochromatica*, mostrando-se mais esverdeada e mais azulada respectivamente. Após a ingestão da ração contendo *Symphytum officinale* (confrei),

a coloração de ambas as secreções se alterou, apresentando tons mais esverdeados para ambas as espécies.

4.3 Análise bioquímica do muco

Realizadas as dosagens de cada fração solúvel do muco dos caracóis, obtiveram-se os seguintes resultados expressos na **TABELA 2**:

Tabela 2 - Composição da fração solúvel do muco das espécies *A. fulica* (FSF) e *A. monochromatica monochromatica* (FSM).

Amostra	Açúcar Total (g%)	Açúcar Redutor (g%)	Proteínas (g%)	Lipídeos (g%)	Mucoproteína (g%)
FSF	3,67	0,70	78,76	7,18	0,25
FSM	5,35	0,77	90,21	2,48	0,19

4.4 Análise macroscópica das lesões de pele provocadas em camundongos

4.4.1 Aos 3 dias de experimento

Aos três dias de experimento, observou-se melhor reparação tecidual dos camundongos tratados quando comparados àqueles que não receberam qualquer tipo de tratamento. Analisando a regressão das bordas das feridas referentes aos diferentes tratamentos utilizados, constatou-se que os animais tratados com muco de caracóis da espécie *A. monochromatica monochromatica* alimentados com *Symphytum officinale* (confrei) apresentaram melhor resultado (1,8 mm de contração da ferida) (**FIGURA 10**).

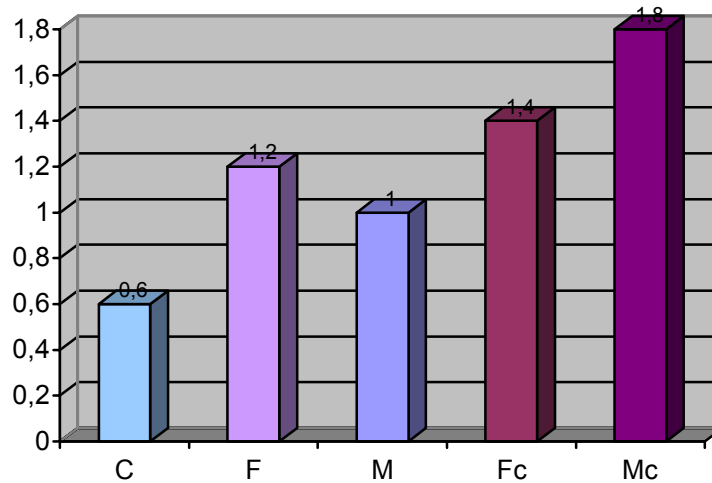


Figura 10 - Contração média das bordas das feridas dos grupos pesquisados aos três dias de experimento.

A coloração da ferida dos camundongos em todos os tratamentos e grupo controle, apresentou-se normal, variando apenas de clara à escura, ou amarelada, de acordo com sua presença ou não e o tipo de crosta (hemática ou melicérica).

Nenhum animal apresentou exudato aos três dias de tratamento.

Os resultados referentes às observações das variáveis edema e crosta estão apresentados na **TABELA 3**.

Tabela 3 - Avaliação macroscópica das variáveis edema e crosta, para camundongos aos 3 dias de experimento.

Tratamentos	Variáveis	
	Edema	Crosta
Controle	4 animais apresentaram edema de 6,25mm em média.	4 animais apresentaram uma fina crosta sobre a lesão.
F	Apenas 2 animais apresentaram edema de 1mm cada.	Todos os animais apresentaram crosta. 4 deles, uma fina crosta em volta da lesão e 1 deles, crosta mais espessa.
Fc	Apenas 2 animais apresentaram edema de 1,5mm em média.	Todos os animais apresentaram crosta. 3 deles uma crosta fina e 2 deles crosta mais espessa.
M	3 animais apresentaram edema de 1,0mm em média.	Todos os animais apresentaram crosta. 3 deles uma fina crosta, 1 deles crosta mais espessa e outro, crosta bastante espessa.
Mc	3 animais apresentaram edema de 1mm cada.	Todos os animais apresentaram crosta. 3 deles uma fina crosta e 1 deles crosta mais espessa.

4.4.2 Aos 5 dias de experimento

Aos cinco dias de experimento, também se observou melhor reparação tecidual dos camundongos tratados quando comparados aos que não receberam qualquer tipo de tratamento. Analisando a regressão dos bordos da ferida dos animais que receberam muco, constatou-se que aqueles tratados com muco de caracóis da espécie *A. monochromatica monochromatica*, alimentados ou não com *Symphytum officinale* (confrei), apresentaram melhores resultados (2,0mm de contração da ferida para ambos os tratamentos) (**FIGURA 11**).

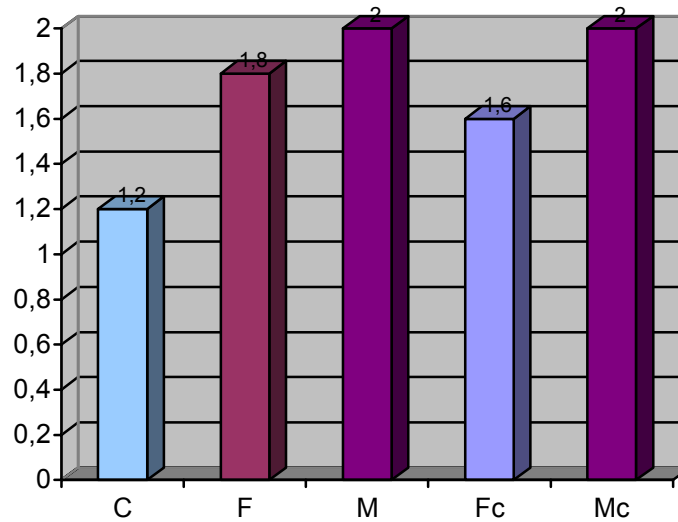


Figura 11 - Contração das bordas das feridas dos grupos experimentais aos cinco dias de experimento.

A coloração da ferida, dos camundongos aos cinco dias de tratamento, variou de maneira similar aos resultados encontrados aos três dias, ou seja, em todos os tratamentos e grupo controle, apresentou-se normal, variando apenas de clara à escura, ou amarelada, de acordo com a presença ou não e o tipo de crosta (hemática ou melicérica). Aos cinco dias, nenhum animal apresentou exudato durante o período experimental.

Os resultados referentes às observações das variáveis edema e crosta estão apresentados na **TABELA 4**.

Tabela 4 - Avaliação macroscópica das variáveis edema e crosta, para camundongos aos 5 dias de experimento.

Tratamentos	Variáveis	
	Edema	Crosta
Controle	Todos os animais apresentaram edema de 2,7mm em média.	Todos os animais apresentaram crosta espessa no centro da lesão.
F	4 animais apresentaram edema de 1,4mm em média.	3 animais apresentaram crostas pontuais nos bordos da lesão.
Fc	Apenas 1 animal apresentou edema de 1mm.	Todos os animais apresentaram crosta. 2 deles apresentaram uma crosta fina e 3 deles, uma crosta mais espessa.
M	3 animais apresentaram edemas de 1mm cada.	2 animais apresentaram crostas pontuais nos bordos da lesão.
Mc	Nenhum animal apresentou edema durante o experimento.	3 animais apresentaram fina crosta e 2 deles, uma crosta mais espessa.

4.4.3 Aos 7 dias de experimento

Aos sete dias de experimento, observou-se melhor reparação tecidual dos camundongos tratados quando comparados àqueles que não receberam qualquer tipo de tratamento. Analisando a regressão da ferida dos camundongos tratados, constatou-se ainda que aqueles que receberam o muco de caracóis da espécie *A. monochromatica monochromatica*, alimentados com *Symphytum officinale* apresentaram melhor resultado (3,6mm de contração da ferida) (**FIGURA 12**).

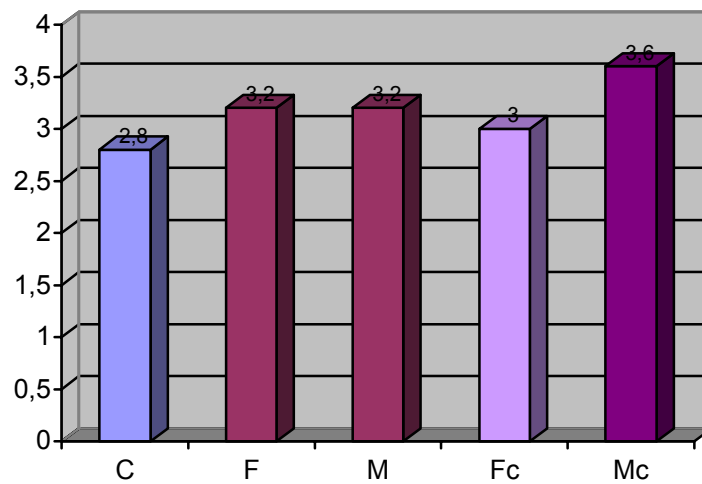


Figura 12 - Contração das bordas das feridas dos grupos experimentais aos sete dias de experimento.

Não foi encontrada diferença em relação aos resultados referentes à coloração da ferida dos camundongos aos sete dias de tratamento, variando de maneira similar àqueles encontrados aos três e aos cinco dias. Após sete dias de experimento, nenhum animal apresentou exudato.

Os resultados referentes às observações das variáveis edema e crosta estão apresentados na **TABELA 5**.

Tabela 5 - Avaliação macroscópica das variáveis edema e crosta, para camundongos aos 7 dias de experimento.

Tratamentos	Variáveis	
	Edema	Crosta
Controle	Todos os animais apresentaram edema de 2,3mm em média.	Todos os animais apresentaram fina crosta na lesão durante o experimento.
F	Todos os animais apresentaram edema de 1mm cada.	Todos os animais apresentaram crosta. 3 deles, uma crosta fina e superficial, 2 deles uma crosta mais espessa.
Fc	3 animais apresentaram edema de 1,3mm em média.	4 animais apresentaram crosta. 3 deles uma crosta fina e 1 deles uma crosta mais espessa.
M	4 animais apresentaram edema de 1,3mm em média.	4 animais apresentaram crosta. 2 deles apresentaram uma crosta mais fina e superficial, os outros 2, uma crosta mais espessa no centro da lesão.
Mc	Nenhum animal apresentou edema durante o experimento.	Todos os animais apresentaram crosta. 1 deles apresentou crosta fina, 2 deles uma crosta mais espessa e outros 2 uma crosta bastante espessa.

4.5 Análise histológica das lesões de pele provocadas em camundongos

4.5.1 Aos 3 dias de experimento

Analisadas as imagens dos cortes histológicos de cada camundongo, obtiveram-se os seguintes resultados para cada grupo experimental:

A crosta esteve presente em quantidade variável em toda a área lesada de todas as feridas analisadas. O epitélio também se apresentou de maneira semelhante em todos os grupos experimentais observados, demonstrando-se espesso na margem da lesão, situado sob a crosta e classificado como epitélio estratificado pavimentoso.

Os dados referentes ao tecido conjuntivo, são apresentados na **FIGURA 13**.

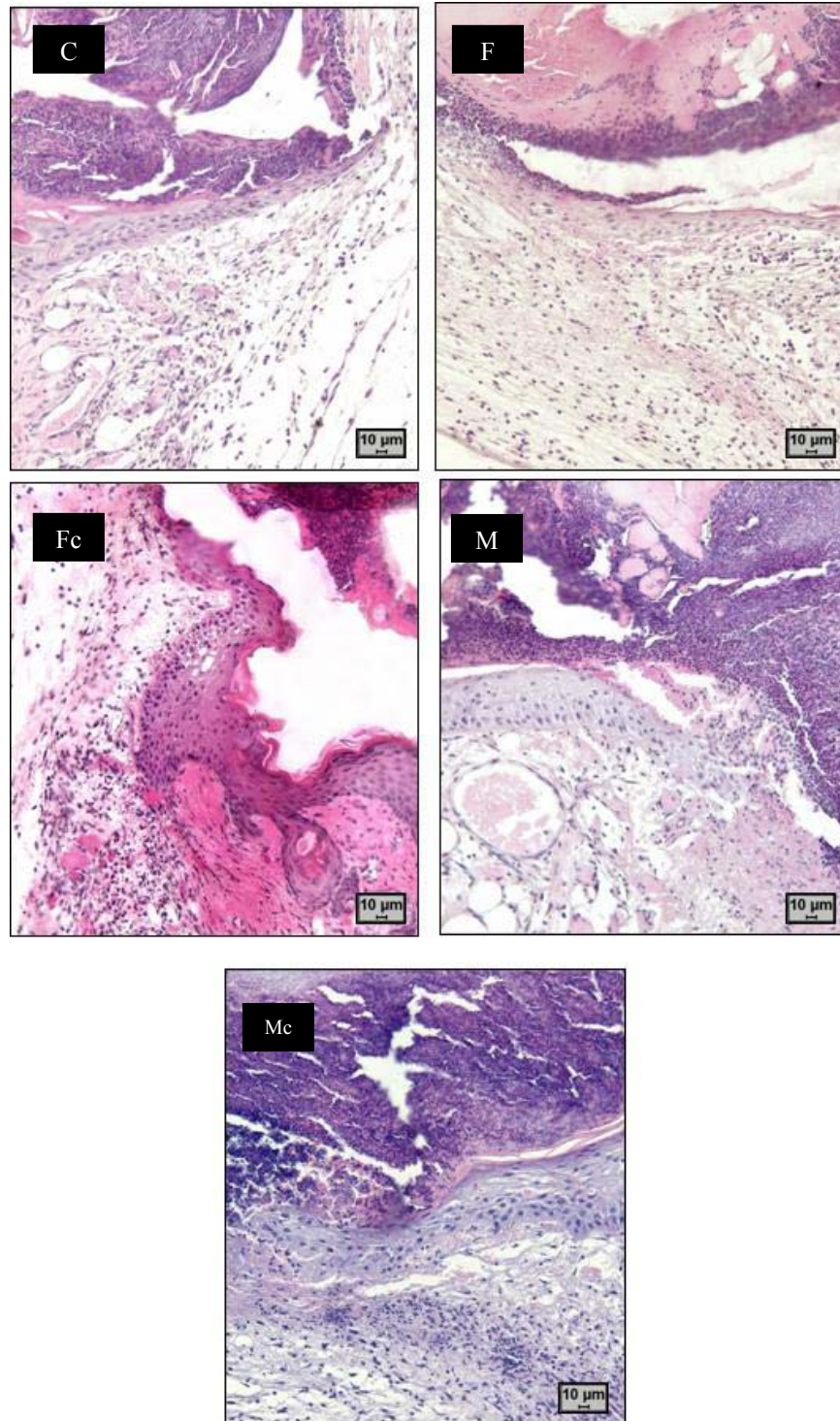


Figura 13 – Fotomicrografias das feridas dos camundongos aos 3 dias de experimento. **(C)** Pouco tecido de granulação e infiltrado inflamatório (com neutrófilos); a presença de edema foi intensa. **(F)** Tecido de granulação e infiltrado inflamatório (células mononucleares) com presença de moderada à intensa; o edema foi mínimo. **(Fc)** Intensa presença de tecido de granulação e moderada à intensa presença de fibrina. Infiltrado inflamatório apresentou-se de maneira moderada e edema não foi observado. **(M)** Apresentou-se com tecido de granulação e infiltrado inflamatório moderados; fibrinas e edema foram mínimos. **(Mc)** Tecido de granulação e fibrinas apresentara-se de maneira moderada à intensa. Fibrinas e edema estavam presentes em quantidades mínimas.

4.5.2 Aos 5 dias de experimento

A crosta esteve presente em todos os grupos experimentais recobrimdo grande parte da lesão, com exceção de pequena área periférica da mesma. O epitélio também se apresentou de maneira semelhante em todos os grupos observados. Na periferia da lesão, demonstrou-se estratificado e pavimentoso, com a camada granulosa e queratina diferenciadas, sem a proteção da crosta. No centro da ferida, o epitélio mostrou-se delgado, com poucas camadas de células e se estendendo para o centro da lesão.

Os dados referentes ao tecido conjuntivo, são apresentados na **FIGURA 14**.

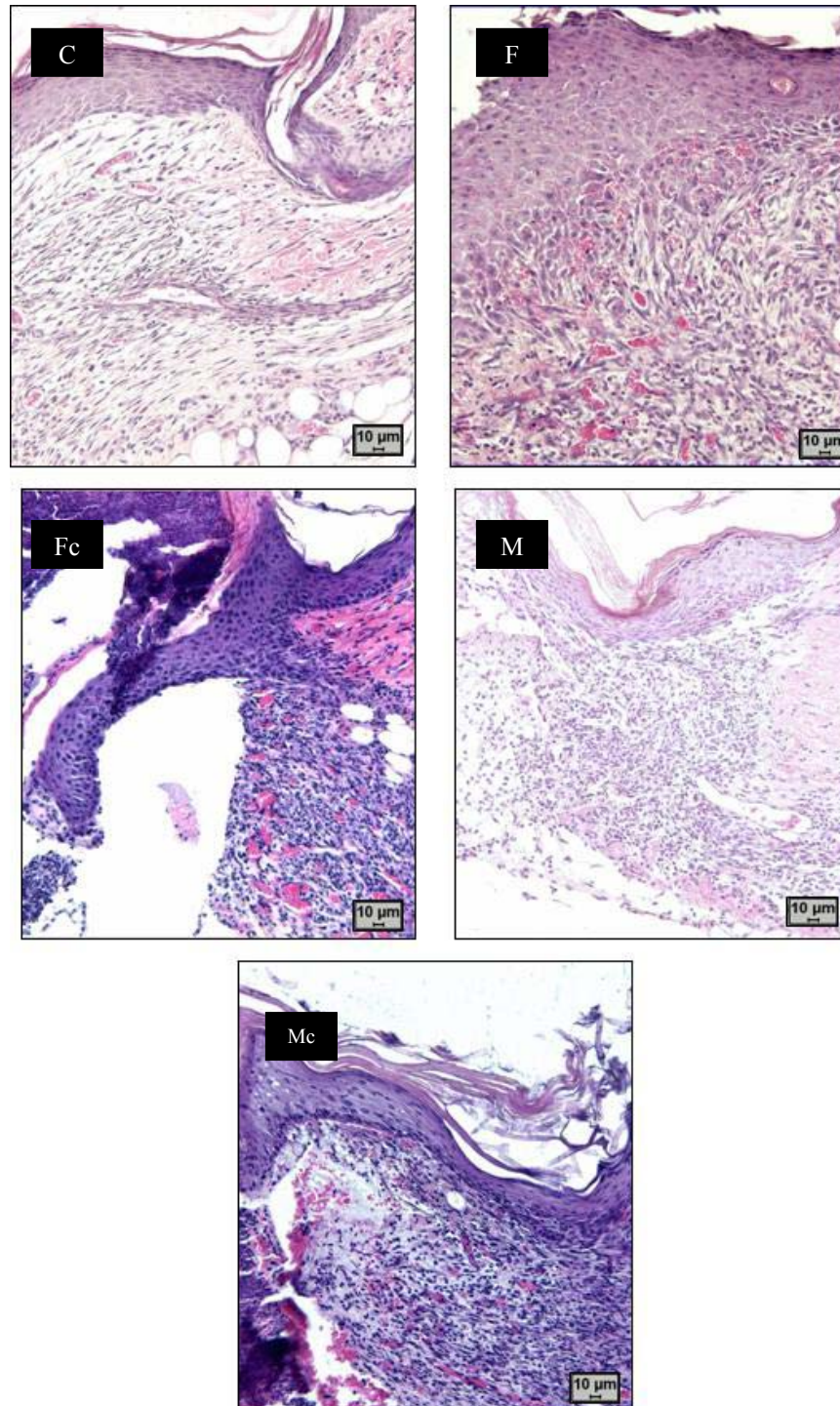


Figura 14 - Fotomicrografias das feridas dos camundongos aos 5 dias de experimento. **(C)** Tecido de granulação e edema moderados; infiltrado inflamatório (com neutrófilos) e fibrinas mínimas. **(F)** Presença de tecido de granulação e infiltrado inflamatório (células mononucleares) de moderada à intensa; apresentou-se com fibrinas mínimas e edema moderado. **(Fc)** Intensa presença de tecido de granulação e moderadas presenças de fibrina e infiltrado inflamatório; edema não foi observado. **(M)** Tecido de granulação moderado à intenso e infiltrado inflamatório moderado; presença mínima de edema **(Mc)** Tecido de granulação intenso; as fibrinas estavam presentes em quantidades mínimas e edema não foi observado.

4.5.3 Aos 7 dias de experimento

A crosta esteve presente apenas na região central da lesão dos grupos experimentais. O epitélio também se apresentou de maneira semelhante em todos os grupos observados. Na periferia da lesão, demonstrou-se estratificado e pavimentoso, cobrindo grande parte da lesão, com a camada granulosa e queratina diferenciadas. No centro da ferida, o epitélio mostrou-se delgado, com poucas camadas de células.

Os dados referentes ao tecido conjuntivo, são apresentados na **FIGURA 15**.

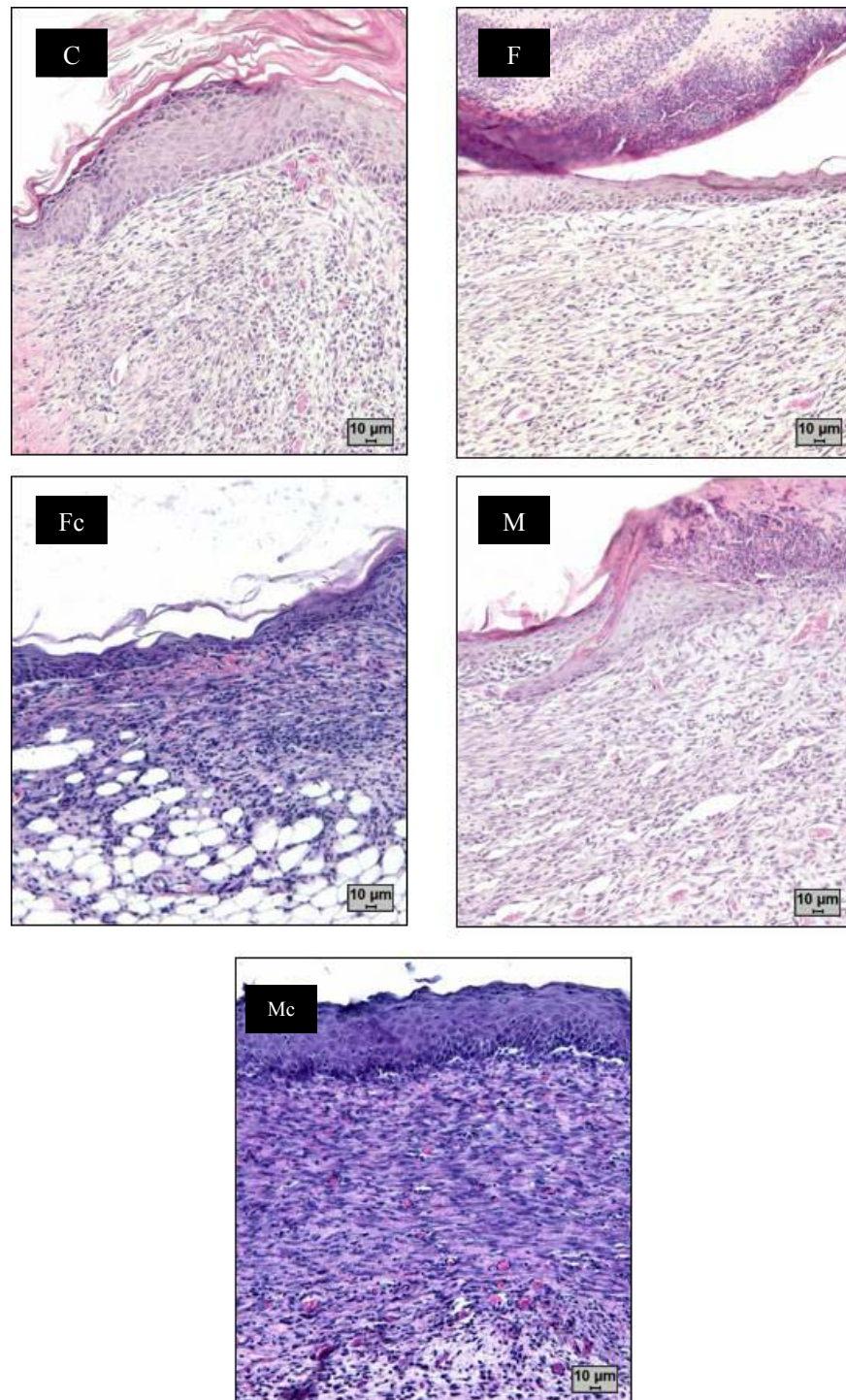


Figura 15 - Fotomicrografias das feridas dos camundongos aos 7 dias de experimento. **(C)** Tecido de granulação e infiltrado inflamatório mínimos; fibrinas moderadas e presença intensa de edema. **(F)** Presença de tecido de granulação de moderada à intensa; infiltrado inflamatório, fibrinas edema com presenças moderadas. **(Fc)** Intensa presença de tecido de granulação e moderada presença de fibrina e infiltrado inflamatório; edema não foi observado. **(M)** Apresentou-se com tecido de granulação moderado à intenso e infiltrado inflamatório moderado; as fibrinas mostraram-se mínimas; não foi observada a presença de edema. **(Mc)** O tecido de granulação apresentou-se intenso. Infiltrado inflamatório apresentou-se de maneira moderada à intensa, enquanto que fibrinas revelaram-se mínimas; não foi observado edema.



discușăo

5 Discussão

5.1 Dietas as quais foram submetidos os caracóis terrestres para a retirada de muco

Os dados de consumo apresentados na tabela 1, mostraram que não houve rejeição em relação às rações fornecidas aos caracóis durante o período experimental, tanto para a ração base, quanto para a ração acrescida da planta cicatrizante *Symphytum officinale* (confrei).

Não podemos afirmar se houve preferência alimentar por uma ou outra ração, apesar do consumo de ração base ter sido maior do que a que continha *Symphytum officinale* (confrei) para ambas as espécies de caracóis estudados.

5.2 Retirada do muco dos caracóis terrestres

O método utilizado para a extração de muco dos caracóis terrestres visou o bem estar animal, uma vez que utilizou a estimulação manual das glândulas podais, não trazendo dano algum ao animal, podendo este, retornar à criação zootécnica. Isto diverge dos métodos utilizados por outros pesquisadores como IGUCHI (1982), KUBOTA (1985) e FUCHINO (1992), que utilizam estímulos elétricos na superfície podal do animal para a retirada do muco, podendo ocasionar estresse ou até mesmo mortalidade.

A observação da diferença de coloração entre os mucos das espécies *A. fulica* e *A. monochromatica monochromatica* pode ser explicada pela diferença

bioquímica dos mucos encontrada na **TABELA 2**, principalmente para proteínas, lipídios e açúcar total.

A mudança de coloração ocorrida no muco de ambas as espécies, após a ingestão da ração da ração contendo *Symphytum officinale* (confrei), indica a absorção de elementos da planta cicatrizante, o que vem ao encontro dos dados sobre a capacidade de absorção de substâncias registrada por GOMOT (1997), CUELAR et al. (1986) e GALO (1984).

5.3 Análise bioquímica do muco

Observaram-se diferenças significativas, entre as composições do muco das espécies *A. fulica* e *A. monochromatica monochromatica*, principalmente as dosagens de açúcar total, proteínas e lipídios.

Essas diferenças poderiam explicar a divergência de resultados encontrados entre os grupos de camundongos tratados com os mucos de ambas as espécies de caracóis, haja visto que se supõe que o princípio ativo desta secreção pertença ao grupo das proteínas, presente em maior quantidade percentual (90,21%) no muco dos caracóis da espécie *A. monochromatica monochromatica*, como observado na **TABELA 2**.

5.4 Análise macroscópica das lesões de pele provocadas em camundongos

No decorrer do experimento, observou-se que nos camundongos submetidos à cirurgia, o efeito do muco dos caracóis *A. fulica* e *A. monochromatica monochromatica*, alimentados com ração base ou ração contendo *Symphytum*

officinale (confrei), proporcionou maior contração da área da ferida quando comparados ao tratamento controle.

Os melhores resultados encontrados, para a variável diâmetro da lesão, foram os relacionados ao tratamento que fez uso do muco da espécie *A. monochromatica monochromatica* alimentados com ração contendo *Symphytum officinale* (confrei). As **FIGURAS 10, 11 e 12**, demonstraram que estes resultados predominaram durante todo o período experimental.

Uma observação interessante, é que aos primeiros dias de tratamento (3 dias), os camundongos que receberam muco, apresentaram diferenças mais significativas quanto à contração das bordas das feridas quando comparados àqueles do grupo controle. Ao final dos sete dias experimentais, essas diferenças diminuíram, indicando que o muco deve atuar como um indutor inicial do processo de cicatrização.

Em relação à presença de edemas encontrados ao redor das feridas dos camundongos, estes foram observados menos intensos e em menor proporção nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle. Estes dados foram confirmados pelos achados histológicos. Os tratamentos que apresentaram melhores resultados foram aqueles aos quais foram aplicados muco de animais alimentados com *Symphytum officinale* (confrei), sendo que, o grupo tratado com muco da espécie *A. monochromatica monochromatica* alimentados com a planta cicatrizante demonstrou resultados mais eficientes. No decorrer do experimento, constatou-se a regressão do edema para os grupos tratados com os diferentes tipos de muco.

A coloração da ferida dos camundongos de todos os grupos pesquisados variou de maneira similar durante todo o período experimental, apresentando-se

normal, variando apenas de clara à escura, ou amarelada e o tipo de crosta formada (hemática ou melicérica).

5.5 Análise histológica das lesões de pele provocadas em camundongos

A análise histológica do tecido conjuntivo revelou aos três, cinco e sete dias de experimento, uma melhor combinação de variáveis dos grupos tratados com o muco dos caracóis quando comparados ao grupo controle, indicando um melhor arranjo celular (presença de tecido de granulação, infiltrado inflamatório, fibrinas, fibroblastos, fibrilas colágenas) para o processo de reparo da ferida.

Os resultados macroscópicos evidenciaram que os grupos tratados com o muco de caracóis apresentaram crostas mais intensas em relação ao grupo controle durante todo o período experimental. Porém, histologicamente não foram observadas diferenças quanto à presença de crosta e sua intensidade. A crosta é um coágulo sanguíneo desidratado formado pelo rompimento de vasos em uma lesão (COTRAN, 2000) e favorece o processo de cicatrização em feridas não exudativas (OLIVEIRA, 1992). Nossos dados revelam ausência de exudato nas feridas durante todo o período experimental, inclusive nos camundongos do grupo controle, o que pode ser um indicativo de bom manejo durante a pesquisa.

Foram observados infiltrados inflamatórios mais intensos aos três, cinco e sete dias nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle. Apesar de não ter havido diferenças significativas entre os grupos tratados, observou-se um maior número deste conjunto de células nos animais tratados com muco da espécie *A. monochromatica monochromatica* alimentados com *Symphytum officinale* (confrei). O processo inflamatório é a reação local dos tecidos à agressão local. Ela ocorre

como resposta inespecífica caracterizada por uma série de alterações que tende a limitar os efeitos da agressão. (MONTENEGRO; FRANCO, 2003). A resposta inflamatória está estreitamente interligada ao processo de cicatrização. O processo inflamatório põe em movimento uma série de eventos que, tanto quanto possível, cicatrizam e reconstituem o tecido lesado (COTRAN, 2000). Provavelmente o muco dos caracóis atuou como agente hiperimizante desencadeando maior resposta inflamatória que as feridas dos animais do grupo controle.

Nesta pesquisa, observou-se tecido de granulação mais desenvolvido nas feridas dos animais tratados quando comparados ao grupo controle, em todos os dias de experimentação. A presença de tecido de granulação é o fator mais característico do processo de cicatrização, representando o novo tecido que cresce para preencher aquele lesado. (MONTENEGRO; FRANCO, 2003). O tecido de granulação é formado por um processo denominado angiogênese, em que vasos preexistentes emitem botões capilares, produzindo novos vasos (COTRAN, 2000). A angiogênese é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização (MANDELBAUM, 2003). Nas feridas abertas o tecido de granulação favorece a migração epitelial sobre si e ao se contrair, retrai as bordas da ferida de pele permitindo que a área a ser reepitelizada se torne menor (OLIVEIRA, 1992). O grupo que apresentou maior quantidade de tecido de granulação foi o tratado com muco da espécie *A. monochromatica monochromatica* alimentados com *Symphytum officinale* (confrei).

Em relação ao epitélio, este se manifestou de maneira similar em todos os grupos da pesquisa, iniciando-se mais espesso e sob a crosta nas margens da lesão e, ao final, cobrindo grande parte da mesma, porém com poucas camadas de células. Estes dados estão vêm ao encontro dos achados de MONTENEGRO;

FRANCO (2003), que relatam o epitélio, em processos de reparo de lesões, crescendo das bordas para o centro e, ao se encontrarem após fechar a lesão, cessa de crescer.

A presença de fibroblastos, fibrinas e fibrilas colágenas, em todos os dias do experimento, mostrou-se variável, não apresentando diferenças entre os grupos tratados e grupo controle. A presença de fibroblastos, em fases relativamente precoces de uma ferida, indica o início da produção de fibras colágenas e prossegue por vários dias, dependendo do processo reacional de cada animal testado. Os colágenos fibrilares formam uma importante parte do tecido conjuntivo nos sítio de reparo e são importantes no desenvolvimento da resistência da cicatrização de feridas (COTRAN, 2000). Inicialmente, estas fibras são dispostas em várias orientações, formando um arcabouço de padrão frouxo. Este padrão é gradualmente substituído por um padrão denso, quando as fibras colágenas são compactadas em feixes paralelos e bem orientados (MONTENEGRO; FRANCO, 2003).

conclusões



6 Conclusões

1. As feridas dos camundongos tratadas com muco de caracóis alimentados com ração base e com ração contendo *Symphytum officinale* (confrei), apresentaram uma recuperação da ferida tanto clinicamente (contração das bordas da ferida e edema) quanto histologicamente (tecido de granulação, infiltrado inflamatório, edema, crosta) quando comparados ao grupo controle.

2. O muco de caracóis da espécie *A. monochromatica monochromatica* alimentados com *Symphytum officinale* foi o que melhor auxiliou no processo de reparo de feridas em camundongos da linhagem hairless, tanto clinicamente quanto histologicamente.

3. A análise bioquímica evidenciou que o muco do caracol *A. monochromatica monochromatica* apresenta diferenças bastante significativas quando comparado ao muco da espécie *A. fulica*, principalmente para lipídios, proteínas e açúcares redutores.

4. Os resultados obtidos procuraram fornecer subsídios para a elaboração de fármacos cicatrizantes, oferecendo continuidade e abrindo novas perspectivas a esta linha de pesquisa que vem sendo realizada pelo Helicíario Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, criando desta forma, novos nichos de pesquisa, principalmente que visem obter produtos com finalidades farmacêuticas, zooterápicas e cosméticas procedentes da helicicultura.

5. Aliado a estes resultados, o conhecimento das características bioquímicas do muco também poderá vir a fornecer o desenvolvimento de outros produtos oriundos desta secreção, tendo por base que a cicatrização de feridas é um processo complexo e os insucessos relacionados ao tratamento continuam sendo um problema clínico importante, principalmente para a Medicina Veterinária de pequenos e grandes animais.



referências bibliográficas

7 Referências Bibliográficas

1. ABRAMO, A. C. **Análise biológica da atuação da lâmina esponjosa de colágeno heterólogo sobre o tecido de granulação.** 1990. 130p. **Tese (Doutorado em Cirurgia Plástica)** - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1990.
2. ALFONSO, C.G. **Patologia quirurgica de los animales domesticos.** 7^a ed. Barcelona: Editorial Científico Médico. 1976. 901p.
3. ANDO, K.; NATORI, S. Inhibitory effect of Sarcotoxin II, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*. **The Journal of Biochemistry.** n.103, p. 735-739, 1988.
4. ANDRIESSEN, M.P.; NIESSEN, F.B.; KERHOF, P.C.V.; SCHALK, V. Hypertrophic scarring is associated with epidermal abnormalities in an immunohistochemical study. **American Journal of Pathology.** v. 186, p. 192-200. 1998.
5. BARBUDO, G.R.; BELETTI, M.E.; EURIDES, D.; SELMI, A.L. Reparação de feridas cutâneas de roedores da espécie *Calomys callosus*, tratadas com hidrocarboneto alifático: aspectos morfométricos, morfológicos e histológicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.2, p.62-68, 2001.

6. BARNES, R.S.K.; CALOW, P. & OLIVE, O. J.W. **Os invertebrados: uma nova síntese**. São Paulo: Atheneu. 1995. p. 425-429.
7. BONDI, F. E. Topical tretinoin therapy. **American Family Physician**, v. 39, n. 1, p. 269-272, 1989.
8. BRODY, T. M. LARNER, J. MINNEMAN K.P. NEU H. C. **Farmacologia Humana da Molecular à Clínica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 346 p.
9. CAETANO, F.A.M. **Utilização da secreção do escargot *Achatina fulica* no processo cicatrizacional**. 1998. Trabalho (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária – Fundação Educacional Octávio Bastos, São João da Boa Vista, 1998.
10. CARRICONDE, C. Confrei, *Symphytum officinale* L. **De Volta às Raízes**, v. 12, n. 63, p. 1-8, 1997.
11. CHERNOVIZ, P.L.N. **Dicionário de Medicina Popular**. 6.ed. Paris: A. Roger & F. Chernoviz, 1890.
12. COOPER, J.E.; KNOWLEE, C. Snails and snail farming: an introduction for the veterinary profession. **Veterinary Record**, n. 129, p. 541-549, 1991.

13. CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. 3, p. 267-269.
14. COTRAN, R. S. KUMAR, V. ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. 1231p.
15. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia Funcional e Estrutural**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1252 p.
16. CUELAR, R.C.; CARRASCO, L.C.; GARCIA, T.P. **Helicicultura: cria moderna de caracoles**. Madri: Ediciones Mundi-prensa. 1986. 135p.
17. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, p. 350-356, 1956.
18. EHARA, T.; KITAJIMA, S.; KANZAWA, N.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. **FEBS Letters** **531**, p. 509-512, 2002.
19. EURIDES, D.; MAZZANTI, A. Aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii*). **Estudo Experimental**. 1995. 11f. Trabalho (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1995.

20. FAZIO MJ, ZITELLI JA, GOSLEN JB. Cicatrização de feridas. In: COLEMAN III WP, HANKE CW, ALT TH, ASKEN S. **Cirurgia Cosmética - Princípios e Técnicas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000, p. 23-28.
21. FERRAZ, J. **O escargot: criação e comercialização**. São Paulo: Ícone Editora Ltda, 1999, 176p.
22. FLAUZINO, F.; MARTINS, M.F.; PACHECO, P.; SPERS, A. Estudo nutricional e reprodutivo de matrizes do *escargot Achatina fulica*-Resultados preliminares. In: ENCONTRO DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 1997, Pirassununga. **Resumos...** Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, 1997, p.62.
23. FRANK, M.M. Complement in the pathophysiology of human disease. **New England Journal of Medicine**. n.316, p. 1525-1550, 1987.
24. FRANK, M.M.; FRIES L.F. The role of complement in inflammation and phagocytosis, **Immunology Today**. n.12, p. 322-326, 1991.
25. FRETER, V. The genital ducts of some British stenoglossan prosobranchs. **Journal of Marine Biology Association U.K.** v.25, p. 173-211, 1941.
26. FUCHINO, H. O.; WATANABE, Y.; HIRAKAWA, C.; TAKEDA, J.; TAMIYA, T.; MATSUMOTO, J. J.; TSUCHIYA, T. Morphological aspects of achacin-treated

- bacteria. **Comparative Biochemical Physiology.** n.104C, v.1, p. 37-42, 1993.
- 27.FUCHINO, H. O.; WATANABE, Y.; HIRAKAWA, C.; TAMIYA, T.; MATSUMOTO, J. J.; TSUCHIYA, T. Bactericidal action of a glycoprotein from the body surface mucus of giant african snail. **Comparative Biochemical Physiology.** v. 101C, n. 3, p. 607-613, 1992.
- 28.GALO, G. **El caracol: cria y explotacion.** 2a. ed. Madrid: Ediciones Mundi-prensa. 1984. 179p.
- 29.GOMOT, A. Effets de méteaux lourds sur le development des escargots. Utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution per les métaux lourds pour la preservation de la santé de l'homme. **Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine.** v.181, n. 1, p. 59-75, 1997.
- 30.GROTENDORST, G. Can collagen metabolism be controled. **Journal of Traumatology.** v.24, n.9, p. 40-54, 1984.
- 31.GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3.ed. Santa Catarina: Editora da Universidade, 2001. p. 13-26.

32. GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 864p.
33. HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.
34. IGUCHI, S. M. M. AIKAWA, T. MATSUMOTO, J. J. Antibacterial activity of snail mucus mucin. . **Comparative Biochemical Physiology**. v. 72A, n.3, p. 571-574, 1982.
35. IYOMASA, M.; MARTINS, M.F.; PACHECO, P.; MIZUSAKI, C.I.; FIGUEIREDO, L.D.; SIRIO, O.J.; CAETANO, F.A.M. Evaluation of the *Achatina fulica* snail glycoproteic mucus in surgical injury of rabbits. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 18, n. 2, p. 149, 2002.
36. KUBOTA, Y.; WATANABE, Y.; OTSUCA, H.; TAMAYA, T.; TSUCHITA, T. & MATSUMOTO, J.J. Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus. **Comparative Biochemical Physiology**. v.82c, n. 2, p. 345-348, 1985.
37. MACHIN, J. The evaporation of water from *Helix aspersa*: the nature of the evaporating surface. **Journal of Experimental Biology**. v.41, p. 759-769

38. MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 78, n. 4, p.393-408, jul./ago. 2003.
39. MARTINS, M.F.; SÍRIO, O.J.; MAGANHA, L. Trabalhando animais no ciclo I do ensino fundamental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXXII, 2005, Uberlândia. **Resumos...**Uberlândia: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2005, p. 266.
40. MARTINS, M.F.; CAETANO, F.A.M.; SIRIO, SÍRIO, O.J.; YIOMASA, M.M.; MIZUSAKI, C.I.; FIGUEIREDO, L.D.; PACHECO, P. Avaliação macro e microscópica da cicatrização de lesões experimentalmente provocadas em pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina fulica*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v.40, p.213-218, 2003. (Suplemento 3).
41. MARTINS, M.F. TASSONI, P. PACHECO, P. & SPEARS, A. Efeito da secreção mucoglicoproteica do escargot gigante africano *Achatina fulica* sobre a cicatrização em ratos. In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, XV, 1996, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: XV PANCET, 1996.
42. MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia**: processos gerais. 4.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. 320 p.

43. NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method from the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**. v. 153, p. 375-380, 1944.
44. OBARA, K.; FUCHINO, H. O.; SATTAYASAI, N.; NONOMURA, Y.; TSUCHIYA, T.; TAMIYA, T. Molecular cloning of the antibacterial protein of the giant African snail, *Achatina fulica* Férussac. **European Journal of Biochemistry**. v. 209, p. 1-6, 1992.
45. OKADA, M.; NATORI, S. Mode of action of a bactericidal protein induced in the haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. **Biochemistry Journal**. v. 222, p. 119-124, 1984.
46. OLIVEIRA, H. P. Traumatismos nos animais domésticos. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**. v. 1, n. 7, p. 01-57, 1992.
47. OLSEN, D.; LUCHETEL, D.L. Secretion of mucus granules and others membrane bond structures: a look beyond exocytosis. **International Review of Cytology**. v. 183, p. 95-141, 1998.
48. PACHECO, P.; MARTINS, M. F. O escargot. **Higiene Alimentar**. v. 12, n. 55, p.19-20, maio/junho, 1998.
49. PACHECO, P.; MARTINS, M. F.; BATTEMARQUE, V.; RODRIGUEZ, P. H. M.; GHION, E.; SPERS, A. Diferentes fontes de cálcio na dieta do escargot

- gigante africano (*Achatina fulica*) e seu efeito no crescimento e rendimento de carcaça. **Higiene Alimentar**. v. 12, n 55, p. 43-46 maio/junho, 1998a.
50. PACHECO, P.; MARTINS, M. F.; LUCHESI, M.; RIBEIRO, S. A., SPERS, A.; RODRIGUES, P. H. M. Estudo do desempenho do escargot *Achatina fulica* em diferentes tipos de solo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 65 , n. 2, p. 9-14, jul/dez., 1998b.
51. PACHECO, P.; MARTINS, M. F.; HERBETA, C., LIMA, C. G. Efeitos do farelo de arroz no desempenho ponderal do escargot *Achatina fulica*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 66, p. 1-4, 1999. (Suplemento)
52. PONS, F.; KOENIG, M.; MICHELOT, R.; MAYER, M.; FROSSARD, N. The bronchorelaxant effect of Helicidine, a *Helix pomatia* L. extract, involves prostaglandin E2 release. **Pharmaceutical Biology**. v. 36, n. 1, p. 13-19, 1998.
53. POZETTI, G. L. **Medicamentos homeopáticos**: algumas monografias. Ribeirão Preto: Instituto François Lamasson, 1988. 100 p.
54. POZETTI, G. L. *Symphytum officinale*, sua toxicologia e a respectiva patogenia registrada na literatura homeopática. [S.l.] **Infarma**, v. 3, p. 18-19, 1993.

55. PRATA, M. G.; HADDAD, C. M.; GOLDEMBERG, G. S. Uso tópico do açúcar em feridas cutâneas. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 43-48, 1988.
56. RADIN, N.S. **Preparation of Lipid Extracts**. New York: Academic Methods in Enzymology, 1969, p. 245-454.
57. RAHAL, S.C.; ROCHA, N.S.; BLESSA, E.P. IWABE, S.; CROCCI, A.J. Pomada orgânica natural ou solução salina isotônica no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Ciência Rural**. v.31, n.6, p.1007-1011, nov./dez. 2001.
58. RUNNELS, A.R.; MONLUX V.S.; MONLUX A W. **Princípios de patologia veterinária; anatomia patológica**. Ciudad del Mexico: Editora Continental, 1976, p. 723-724.
59. RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6.ed. São Paulo: Roca, 1996. p. 332-352.
60. SAITO, M. L. **Farmacognosia de *Cordia ecalyculata* Vell. (*Boraginaceae*)**. 1984. 154 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1984.

61. SANCHEZ NETO, R.; BARONE, B.; TEVES, D. C. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 8, n. 1, p. 18-23, 1993.
62. SIEGEL, S. **Nonparametric statistics for the behavioral Sciences**. New York: McGrae-Hill, Inc., 1956.
63. SIMKISS, K.; WILBUR, K.M. The molluscan epidermis and its secretions. **Symposia of the Zoological Society of London**. v. 39, p. 35-76, 1977.
64. SÍRIO, O.J.; MARTINS, M.F. MAGANHA, L.; LORENZI, A.T. Avaliação da atividade cicatrizante dos escargots *Achatina sp.* In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, XXXII, 2005, Uberlândia. **Resumos...**Uberlândia: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2005, p. 268
65. SOMOGY, M.A. New reagent for determination of sugars. **Journal of Biological. Chemistry**. v. 160, p. 61-68, 1945.
66. SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: UFC/ Laboratório de Produtos Naturais, 1991. p. 237-241.

67. STORER, T.I. **Zoologia Geral**. 6. Ed. São Paulo: Companhia Editorial Nacional. 1991. p. 416-443.
68. STORER, T.I.; USINGER, R.L.; STEBBINS, R.C.; NYBAKKEN, J.W. **Zoologia Geral**. 6.ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. Série 3. p. 143-147.
69. THOMSON, W. A. R. **Guia practica ilustrada de las plantas medicinales**. Barcelona : Blume, 1981. 103 p.
70. VANNIER, L.; POIRIER, J. **Tratado de matéria homeopática**. 9 ed. [S.l]: Organização Andrei, 1987. 89 p.

anexos
anexos
anexos



Anexos

Anexo 1: Composição das rações oferecidas aos caracóis durante o experimento.

a) Ração base

Ingrediente	Porcentagem	Quantidade para 10kg
Fubá de Milho	56%	5,6 Kg
Farelo de Soja	10%	1Kg
Farelo de Trigo	13%	1,3Kg
Suplemento Mineral	1%	0,1Kg
Cálcio	20%	20Kg

b) Ração base + Confrei

Ingrediente	Porcentagem	Quantidade para 10kg
Fubá de Milho	56%	5,6 Kg
Farelo de Soja	10%	1Kg
Farelo de Trigo	13%	1,3Kg
Farelo de Confrei	1%	0,1Kg
Cálcio	20%	20Kg

Anexo 2: Protocolo referente às alterações fenotípicas decorrente das respostas aos diferentes tratamentos.

Dia de tratamento	Variáveis					
	Edema	Crosta	Exudato	Coloração da ferida	Diâmetro da lesão	Peso do animal
Primeiro						
Segundo						
Terceiro						
Quarto						
Quinto						
Sexto						
Sétimo						

0 = ausente; 1+ = mínimo; 2++ = moderado; 3+++ = intenso.

Anexo 3: Protocolo referente às alterações histológicas decorrente das respostas aos diferentes tratamentos.

Tratamento	Variáveis		
	Crosta	Epitélio	Conjuntivo <ul style="list-style-type: none"> • Tecido de Granulação • Infiltrado inflamatório • Fibroblastos • Fibrinas • Fibrilas colágenas
Controle			
F			
Fc			
M			
Mc			

0 = ausente; 1+ = mínimo; 2++ = moderado; 3+++ = moderado à intenso; 4++++ intenso.