



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRO-REITORIA DE POS-GRADUACAO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINARIA
PROGRAMA DE POS-GRADUACAO EM CIENCIAS VETERINARIAS**

MARIA LIDUINA MAIA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DO OLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* Cham. E DO
OLEO FIXO DE *Caryocar coriaceum* Wittm. SOBRE A
INFLAMACAO TOPICA E A CICATRIZACAO DE FERIDAS
CUTANEAS**

**FORTALEZA-CE
2009**

MARIA LIDUINA MAIA DE OLIVEIRA

EFEITOS DO OLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* Cham. E DO
OLEO FIXO DE *Caryocar coriaceum* Wittm. SOBRE A INFLAMACAO
TOPICA E A CICATRIZACAO DE FERIDAS CUTANEAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.
Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientadora: Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro.

FORTALEZA-CE
2009

MARIA LIDUINA MAIA DE OLIVEIRA

EFEITOS DO OLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* Cham. E DO OLEO
FIXO DE *Caryocar coriaceum* Wittm. SOBRE A INFLAMACAO TOPICA
E A CICATRIZACAO DE FERIDAS CUTANEAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de
Veterinária da Universidade Estadual do Ceará,
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 01/12/2009

Nota: 10,0

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora

Profa. Dra. Adriana Rocha Tomé
Universidade Estadual do Ceará
Examinadora

Profa. Dra. Ana Karine Rocha de Melo Leite
Faculdades INTA
Examinadora

Aos meus pais,
meus pilares de sustentação e maiores
incentivadores de todas as minhas conquistas.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pai supremo e fidedigno, por ter me concedido o dom da vida e da sabedoria, me guiando e dando forças em mais esta etapa da minha vida.

A todos os animais, especialmente àqueles que doaram suas vidas em prol deste e de outros estudos científicos e ao meu cãozinho, Kiko, por ser o principal responsável pela minha dedicação aos estudos em Medicina Veterinária.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante os dois anos de Mestrado.

À Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, por sempre ter acreditado no meu potencial, por sua inestimável orientação, colaboração, compreensão, incentivo e acima de tudo amizade, meus sinceros agradecimentos.

À Profa. Dra. Érika Freitas Mota pela colaboração junto ao Laboratório de Bionergética e ao Laboratório de Microbiologia da UFC, permitindo a realização de etapas fundamentais na execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Selene Maia de Moraes, pela ajuda concedida e pelo espaço cedido no Laboratório de Produtos Naturais.

À Profa. Dra. Adriana Rocha Tomé e ao Prof. Dr. Cláudio Cabral Campello pelos ensinamentos e ajuda na realização deste trabalho, estando sempre dispostos a ajudar.

À Profa. Dra. Ana Karine Rocha de Melo Leite, pela valiosa participação na banca examinadora e amizade compartilhada ao longo da minha vida profissional.

Ao Prof. Ms. Francisco Geraldo de Melo Pinheiro, pela colaboração no desenvolvimento de uma metodologia essencial para este trabalho.

Ao Laboratório Carlos Chagas, na pessoa do Dr. Geraldo de Sousa Tomé, que possibilitou a realização do processamento e cortes histológicos.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia e Bioquímica de Animais (LIBA), em especial à Islene de Araújo Lima Verde e Jamille Cavalcante de Albuquerque, cujas ajudas foram de fundamental importância para a realização desse trabalho.

À Neusa Félix Gomes pela ajuda, presteza e atenção dispensadas no decorrer do período de Mestrado.

A todos os funcionários da Faculdade de Veterinária (FAVET), em especial aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UECE, pelos conhecimentos e experiências compartilhados, e às secretárias do PPGCV, Adriana Maria Sales Albuquerque e Ana Cristina Sabóia Nascimento, por estarem sempre empenhadas em auxiliar.

Aos meus pais, Francisco Gutemberg de Oliveira e Hélia Maria Maia de Oliveira, que são base da minha vida, por todo amor, carinho e dedicação, e por estarem sempre ao meu lado, me apoiando em qualquer situação.

Aos meus irmãos, Arquimedes Maia de Oliveira, pela amizade e pelos ensinamentos na parte química deste trabalho, e Catarina Áurea Maia de Oliveira (*in memorian*), que com certeza está sempre torcendo por mim.

Ao meu namorado, Carlos Alberto de Almeida da Costa Carneiro, por todo amor, carinho, compreensão e atenção dedicados a mim, sempre me incentivando em meu crescimento profissional.

Às minhas avós, Francisca Barreto de Oliveira e Salete Maria Maia, pelos exemplos de vida e dedicação, que me dão forças para nunca desistir diante das dificuldades. A vocês, todo meu amor e gratidão.

À minha grande amiga Walciany Barbosa Eleutério Andrade, que apesar da distância, continuamos unidas por fortes laços de amizade e fraternidade indescritíveis.

Aos amigos do “Buraco Negro”, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Às demais pessoas que não foram aqui mencionadas, mas que contribuíram direta ou indiretamente em mais uma etapa da minha realização profissional.

RESUMO

As lesões cutâneas que acometem os animais são frequentes na clínica veterinária. Plantas com atividades anti-inflamatória e cicatrizantes vêm sendo pesquisadas como uma alternativa para tratamento dessas lesões. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* e óleo fixo de *Caryocar coriaceum* sobre a inflamação tópica e a cicatrização cutânea em modelos experimentais *in vivo*. Os óleos vegetais foram adquiridos comercialmente em Fortaleza, Ceará, e analisados química e microbiologicamente. O efeito sobre a inflamação tópica foi avaliado pelo modelo de edema de orelha induzido por xileno em camundongos, utilizando aplicação tópica dos óleos vegetais como controles, e dexametasona e indometacina como drogas de referência. Para avaliar a cicatrização, utilizou-se o modelo de feridas por excisão cutânea em ratos e camundongos. Feridas experimentais foram induzidas no dorso dos animais e tratadas topicamente com ungentos contendo óleo essencial de *L. sidoides* e óleo fixo de *C. coriaceum* em suas formulações. As análises morfométricas das lesões foram realizadas por planimetria digital, e fragmentos de pele foram coletados para avaliações histológicas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21. O óleo essencial de *L. sidoides in natura*, rico em timol (70,97%), apresentou efeito edematogênico quando aplicado topicamente na orelha de camundongos, induzindo efeito similar ao xileno ($p > 0,05$), e mostrou efeito deletério sobre a fase inflamatória aguda do processo cicatricial. Por outro lado, o óleo fixo de *C. coriaceum* foi capaz de inibir o edema de orelha provocado pelo xileno em 38,01% e 39,20% após 15 min e 1 h da aplicação do agente flogístico, respectivamente ($p < 0,05$). Além disso, a aplicação tópica do unguento contendo óleo fixo de *C. coriaceum* a 12% acelerou o processo de cicatrização cutânea ($p < 0,05$), o qual foi confirmado pela análise histológica das lesões. Esses efeitos podem estar associados aos altos níveis do ácido graxo insaturado ômega-9 (57,15%) presentes nesse óleo. Conclui-se que o óleo essencial de *L. sidoides, in natura*, pode ser utilizado como agente flogístico em modelo de inflamação tópica. O óleo fixo de *C. coriaceum*, por sua vez, modula a resposta imune-inflamatória e o reparo cutâneo, sugerindo potencial terapêutico sobre o sistema imune da pele.

Palavras-chave: *Lippia sidoides*. *Caryocar coriaceum*. Inflamação tópica. Cicatrização. Sistema imune da pele.

ABSTRACT

The skin lesions that affect animals are common in veterinary practice. Plants with anti-inflammatory and wound healing activities are being researched as one alternative for treatment of these injuries. The aim of this study was to evaluate the effects of essential oil of *Lippia sidoides* and fixed oil of *Caryocar coriaceum* on topical inflammation and skin wound healing in experimental models *in vivo*. Vegetable oils were purchased commercially in Fortaleza, Ceará, and used for chemical and microbiological analysis. The effect on topical inflammation was evaluated by xylene-induced ear edema model in mice, using topical application of vegetable oils as controls, and dexamethasone and indomethacin as reference drug. To evaluate the wound healing, the excision wound model in rats and mice was used. Experimental wounds were created on the back of the animals and treated topically with ointments containing essential oil *L. sidoides* and fixed oil *C. coriaceum* in their formulations. The morphometric analyses of the lesions were performed by digital planimetry, and skin fragments were collected for histological evaluation on days 0, 3, 7, 14 and 21. Essential oil *L. sidoides in nature*, rich in thymol (70.97%), showed edematogenic effect when applied topically in ear of mice, causing effect similar to xylene ($p > 0.05$), and exhibited a deleterious effect on the acute inflammatory phase of wound healing process. On the other hand, fixed oil *C. coriaceum* was capable to inhibit the xylene-induced ear edema in 38.01% and 39.20% at times 15 min and 1 h after application phlogistic agent, respectively ($p < 0.05$). Furthermore, the topical administration of fixed oil *C. coriaceum* ointment 12% accelerated the skin wound healing process ($p < 0.05$), which was confirmed by histological analysis. These effects may be associated to high levels of unsaturated fatty acid omega-9 (57.15%) present in this oil. In conclusion, essential oil *L. sidoides, in nature*, can be used as phlogistic agent in topical inflammation model. On the other hand, fixed oil *C. coriaceum* modulates the immune-inflammatory response and cutaneous repair, suggesting a potential therapeutic implication on immune system skin.

Keywords: *Lippia sidoides*. *Caryocar coriaceum*. Topical inflammation. Wound healing. Skin immune system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático da estrutura da pele	18
Figura 2. Diagrama esquemático de uma secção transversal da epiderme e suas camadas	19
Figura 3. Componentes celulares do sistema imune da pele	23
Figura 4. Etapas do processo de recrutamento dos leucócitos durante a inflamação	27
Figura 5. Fases da cicatrização correlacionadas com a especificidade imune-celular	32
Figura 6. <i>Lippia sidoides</i> Cham.	50
Figura 7. <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm.	53
Figura 8. Fruto de <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm.	54

CAPÍTULO I

Figure 1. Microscopic view of hematoxylin and eosin stained sections of wound tissues on day 7. (I) Saline 0.9% (T5): (a) Epithelium; (b) Fibroblast; (c) New capillaries vessels; (d) hair follicle. (II) Solid ointment vehicle (T3): (a) Epithelium with keratin; (b) Mononuclear cells; (c) Formation hair follicle. (III) FOCC ointment 6% (T1): (a) Stratified epithelium with keratin; (b) Fibroblast; (c) New capillaries vessels. (IV) FOCC ointment 12% (T2): (a) Re-epitelized epidermis with keratin; (b) New capillaries vessels; (c) Re-organization hair follicle; (d) dermal papillae. Magnification 100×	77
Figure 2. Microscopic view of hematoxylin and eosin stained section of wound tissue on day 7 treated with reference ointment (T4). Arrows pointing several new capillaries vessels. Magnification 100×	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais tipos celulares e mediadores envolvidos na cicatrização	33
---	----

CAPÍTULO I

Table 1. Percentage composition of the fixed oil of <i>C. coriaceum</i> obtained by gas chromatography/mass spectrometry	73
---	----

Table 2. Topical anti-inflammatory activity of <i>C. coriaceum</i> fixed oil (FOCC) in xylene-induced ear edema in mice at 15 min or 1 h after induction of inflammation	74
---	----

Table 3. Effects of <i>C. coriaceum</i> fixed oil (FOCC) on wound contraction by excision wound model	75
--	----

Table 4. Histological evaluation of wound healing process in different groups of treatment per biopsy day	76
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de <i>L. sidoides</i>	86
---	----

Tabela 2. Efeito do óleo essencial de <i>L. sidoides</i> em modelo de inflamação tópica	87
--	----

Tabela 3. Efeito do óleo essencial de <i>L. sidoides</i> em modelo de cicatrização por excisão cutânea	88
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
A_f / W_a	Área da ferida / Wound área
A_c / K_a	Área conhecida / Known area
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora-1
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
B₂	Receptor da bradicinina tipo 2
BMP	Proteína morfogenética do tecido conjuntivo
°C	Graus Celsius
CCR7	Receptor de quimiocina tipo 7
CD	Grupamento de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>)
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
cm	Centímetro
COX	Cicloxigenase
DPPH	2,2-difenil-1-picril hidrazil
Ed	Edema
EGF	Fator de crescimento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
EPM/SEM	Erro padrão da média / Standard error of means
EPP	Fenilpropionato de etila
eV	Elétron-volt
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FOCC	Fixed oil of <i>Caryocar coriaceum</i>
FP	Fibroblast proliferation
g	Grama
GLM	Modelo linear geral (<i>General Linear Models</i>)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias para granulócitos e macrófagos
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
h	Hora

He	Gás hélio
HGF	Fator de crescimento dos hepatócitos
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IC₅₀	Concentração efetiva para inibir 50% de radicais DPPH
ID₅₀	Dose efetiva para inibir 50% do edema
IFN-γ	Interferon gama
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
K⁺	Potássio
KOH	Hidróxido de potássio
kg	Quilograma
L	Litro
LFA-1	Antígeno associado à função do leucócito-1
LL-37	Peptídeo catelicidina
m	Metro
mg	Miligrama
μg	Micrograma
min	Minuto
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mm	Milímetro
Mac-1	Receptor para integrinas CD11a/CD18 e CD11bCD18
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MIC	Concentração inibitória mínima
MIP	Proteína inflamatória para macrófagos
MCP-1	Proteína quimioatraente de macrófagos-1
MNC	Mononuclear cells
MPP	Metaloproteinases da matriz
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
N_c / N_k	Número de <i>pixels</i> dentro da área conhecida / Number of pixels inside know area
N_f / N_w	Número de <i>pixels</i> dentro da área da ferida / Number of pixels inside wound area
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa-B
NK	Célula exterminadora natural (<i>natural killer</i>)

nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico
NV	Neovascularization
OE / EO	Óleo essencial / Essential oil
PADETEC	Parque de Desenvolvimento Tecnológico
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAR	Receptor de proteinase ativada
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PG	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogeniônico
PIP₂	Fosfatidil inositol bifosfato
PK	Proteína quinase
PLGF	Fator de crescimento da placenta
PMA	Acetato de forbol mirístico
PMN	Polymorphonuclear cells
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
RANTES	Ligante de quimiocina tipo 5
RE	Re-epithelialization
RNase-7	Enzima que atua sobre RNA tipo 7
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAS	Programa de análise estatística (<i>Statistical Analysis Software</i>)
SNK	Student-Newman-Keuls
T CD4⁺	Linfócito T auxiliar
T CD8⁺	Linfócito T citotóxico
TGF	Fator de crescimento transformante
Th	Linfócito T auxiliar (<i>T helper</i>)
TLR	Receptor semelhante à toll (<i>toll like receptor</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TPA	13-acetato de 12-o-tetradecanoil-forbol
U	Ulceration
UFA	Unsaturated fatty acids
VCAM-1	Molécula de adesão à célula vascular-1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLA-4	Antígeno tardio-4 (<i>very late antigen-4</i>)
VR1	Receptor vanilóide tipo 1

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Pele	18
2.1.1 Estrutura da pele	18
2.1.2 A pele como barreira mecânica	20
2.1.3 Sistema imune da pele	22
2.2 Mecanismos envolvidos na inflamação	24
2.2.1 Eventos vasculares	25
2.2.2 Eventos celulares	26
2.2.3 Mediadores químicos	28
2.3 Mecanismos envolvidos na cicatrização	32
2.3.1 Fase inflamatória	33
2.3.2 Fase proliferativa	36
2.3.3 Fase de remodelagem	40
2.4 Plantas medicinais	42
2.4.1 Plantas medicinais com atividade anti-inflamatória tópica	43
2.4.2 Plantas medicinais com atividade sobre a cicatrização cutânea	46
2.5 <i>Lippia sidoides</i> Cham.	49
2.6 <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm.	53

3 JUSTIFICATIVA	58
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	59
5 OBJETIVOS	60
5.1 Objetivo geral	60
5.2 Objetivos específicos	60
6 CAPÍTULO I	61
Atividades anti-inflamatória tópica e cicatrizante do óleo fixo das sementes de <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm.	61
7 CAPÍTULO II	79
Inflamação induzida por óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i> Cham. (Verbenaceae): proposta de novo modelo experimental	79
8 CONCLUSÕES	93
9 PERSPECTIVAS	94
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXO	109

1 INTRODUÇÃO

A pele representa a principal barreira protetora do organismo, constituindo-se numa adequada superfície de contato com o meio ambiente e desempenhando a função de defesa contra agentes externos e nocivos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Qualquer interrupção na continuidade da pele representa uma ferida, que é acompanhada por processo inflamatório. Em geral, essa reação é autolimitante e sofre resolução, envolvendo remoção de células mortas, depuração de células de resposta aguda e regeneração da matriz extracelular, a qual culmina com a cicatrização tecidual (MURPHY; WARD, 2006).

Em Medicina Veterinária, é comum a ocorrência de diversos processos inflamatórios e feridas que acometem a pele dos animais, tais como lesões cutâneas ocasionadas por infecções bacterianas, virais e fúngicas, por ectoparasitas ou patologias sistêmicas (PEREIRA et al., 2002), além de acidentes traumáticos a campo causados por picadas de artrópodes, plantas cactáceas, estacas e cercas de arame farpado (SANTA ROSA, 1996). Nesse contexto, as plantas medicinais têm se mostrado como uma alternativa terapêutica valiosa para o tratamento dessas e de outras lesões, visando manter a saúde e bem-estar dos animais.

A vegetação da caatinga é um bioma altamente rico que cobre uma vasta área do Nordeste brasileiro, incluindo o semi-árido cearense. Muitas plantas dessa região são amplamente conhecidas e utilizadas na medicina popular e para industrialização e comercialização de produtos fitoterápicos. A grande biodiversidade da caatinga constitui uma de suas maiores riquezas e uma possível fonte para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica, sobretudo no tratamento farmacológico da inflamação associado ou não a cicatrização de feridas. No entanto, poucos estudos etnobotânicos e farmacológicos têm sido realizados nessa região (ALBUQUERQUE et al., 2007).

Algumas plantas são fontes de óleos essenciais e óleos fixos, importantes na farmacologia e cosmética. Dentre seus componentes, destacam-se os ácidos graxos insaturados como agentes importantes na modulação da resposta imune, participando como componentes estruturais das membranas biológicas, precursores de mensageiros intracelulares e fontes geradoras de ATP. Seus produtos atuam em diversas etapas do processo inflamatório como contração vascular, quimiotaxia, adesão, migração transendotelial, ativação e morte celular (CARDOSO et al., 2004).

O interesse pelo uso de preparações obtidas a partir de plantas medicinais disponíveis em raizeiros, mercados públicos e feiras, de fácil acesso à população, tem aumentado o interesse de etnofarmacologistas (farmacêuticos, médicos, biólogos e médicos veterinários) para validação científica das propriedades destas plantas, buscando evitar o uso inadequado e até mesmo prejudicial das mesmas.

Lippia sidoides (alecrim-pimenta) é uma planta medicinal, cujo óleo essencial tem amplo apoio experimental em termos de atividade antibacteriana, antifúngica e anti-helmíntica (MATOS, 2007), além de apresentar potencial gastroprotetor e anti-inflamatório tópico quando utilizado em diferentes concentrações (MONTEIRO et al., 2007). No entanto, não há estudos sobre atividade cicatrizante desse óleo.

Por outro lado, o óleo fixo de *Caryocar coriaceum* (pequi), ricos em ácidos graxos insaturados, tem sido utilizado na alimentação e indústria cosmética, sendo indicado na medicina popular por seus efeitos anti-inflamatório e cicatrizante, no tratamento de doenças respiratórias, úlceras gástricas, dores musculares e reumáticas (MATOS, 2007). Entretanto, esses efeitos ainda necessitam de validação científica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pele

2.1.1 Estrutura da pele

A pele é dividida, basicamente, em duas camadas principais, a derme e a epiderme, separadas por uma fina membrana basal. Esses compartimentos, por sua vez, são constituídos por vários tipos celulares e estruturas especializadas (STRID; TIGELAAR; HAYDAY, 2009), que se encontram esquematizadas na Figura 1.

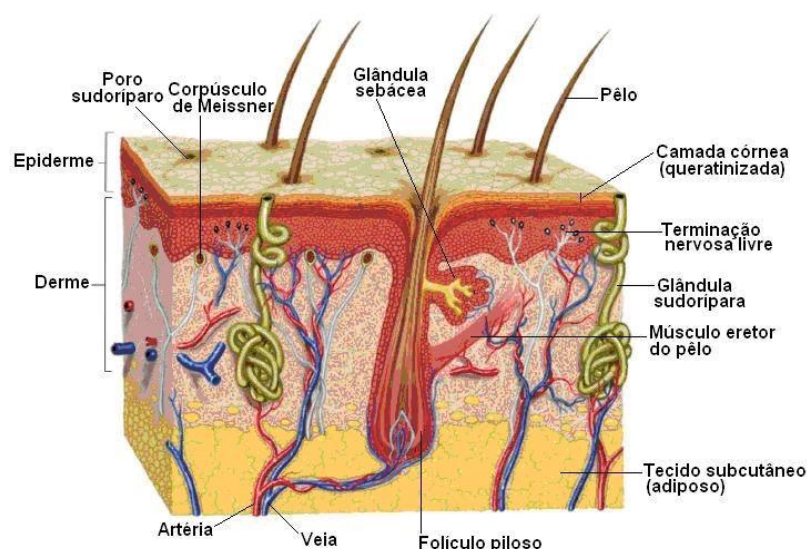


Figura 1. Diagrama esquemático da estrutura da pele.

Fonte: BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008.

A epiderme é classificada em quatro subcamadas principais (Figura 2), cada uma apresentando funções distintas: 1) estrato córneo, que atua como uma grande barreira à penetração de micro-organismos e toxinas, além de prevenir a perda de água; 2) estrato granuloso, no qual se inicia o processo de cornificação, onde as células sofrem apoptose diferenciando-se em corneócitos; 3) estrato espinhoso, onde os queratinócitos presentes nessa camada são responsáveis pela produção dos filamentos de queratina (queratinização) que interagem com os desmossomas, e síntese de agentes antioxidantes, como glutathione redutase, peroxidase e catalase, além de citocinas e quimiocinas, dentre outros; 4) estrato basal, camada mais profunda da epiderme responsável pela proliferação celular, sendo resistente ao processo apoptótico (FUCHS; RAGHAVAN, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

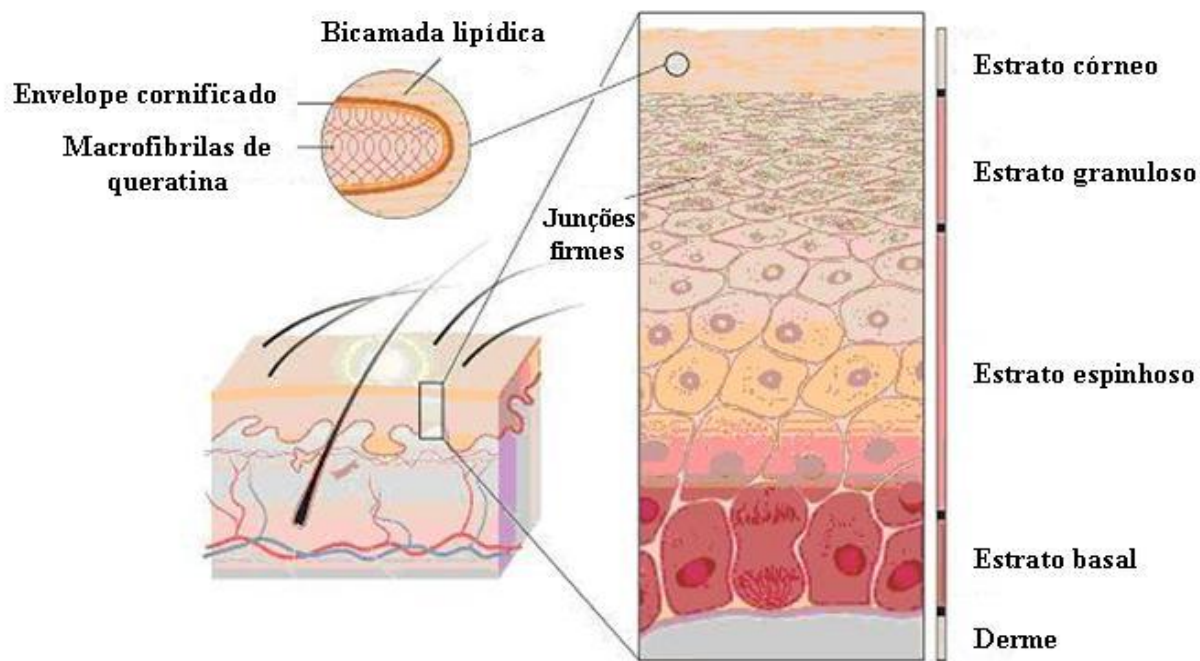


Figura 2. Diagrama esquemático de uma secção transversal da epiderme e suas camadas.

Fonte: SEGRE, 2006 (adaptado).

Histologicamente, a epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, no qual as células mais abundantes são os queratinócitos, apresentando também outros tipos celulares como os melanócitos, as células de Langerhans e as de Merkel. Esses tipos celulares epidérmicos apresentam funções pró-inflamatórias e imune-regulatórias. A camada mais profunda é a basal ou germinativa, com elevada atividade mitótica, rica em células-tronco que se dividem para produzir os queratinócitos da epiderme. Os queratinócitos basais estão ancorados à membrana basal, em parte, por hemidesmosmos, que ligam as proteínas da matriz extracelular a uma rede de filamentos intermediários intracelulares através de proteínas transmembranosas, como o colágeno XVII. As proteínas filamentosas incluem as queratinas, que são conectadas a outras proteínas estruturais, as filagrinas. Os queratinócitos basais iniciam a maturação e diferenciação bem regulada, deslocando-se para cima através das camadas suprabasal, espinhosa e granulosa da epiderme, formando, mais externamente, o estrato córneo recoberto por um envelope lipoprotéico. Este é constituído essencialmente por dois compartimentos altamente especializados provenientes, da exocitose do conteúdo lipídico dos corpos lamelares epidérmicos, e da diferenciação terminal dos queratinócitos em corneócitos, nos quais se observam ausência das funções nucleares e das organelas citoplasmáticas e presença de filamentos de queratina mais

espessos (ELIAS; MENON, 1991; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MATHERS; LARREGINA, 2006).

Separando a epiderme da derme subjacente encontra-se a membrana basal, estrutura altamente organizada constituída por uma malha de proteínas derivadas tanto dos queratinócitos epidérmicos quanto dos fibroblastos dérmicos, além de vários tipos de colágeno, lamininas, subunidades de integrinas e proteoglicanos. A derme contém uma malha de colágeno, embora menos compacta que a membrana basal, sendo composta por fibroblastos dérmicos, além de possuir a maior concentração de imunócitos da pele, particularmente visível dentro das áreas perivasculares. Células dendríticas dérmicas, mastócitos, monócitos, macrófagos, células T e células NK também podem estar presentes, bem como uma estrutura linfóide não-organizada que poderia assemelhar-se aos folículos linfóides ou placas de Peyer encontradas no intestino (SPELLBERG, 2000; STRID; TIGELAAR; HAYDAY, 2009).

2.1.2 A pele como barreira mecânica

A pele é a primeira linha inata de defesa contra muitos invasores microbianos. A epiderme compreende as barreiras: 1) físicas, que consiste principalmente do estrato córneo, junções intercelulares e proteínas do citoesqueleto; 2) químicas e bioquímicas, que compõem a função antimicrobiana através dos lipídios, ácidos, enzimas hidrolíticas, peptídeos antimicrobianos e células fagocíticas; 3) imune-adaptativas, que são constituídas pelos componentes humorais e celulares do sistema imune da pele (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

O estrato córneo constitui-se numa barreira de permeabilidade essencial, oferecendo resistência físico-química aos patógenos, agentes ambientais, produtos químicos e radiação ultravioleta. Sua integridade e coesão são dependentes da interligação dos corneócitos através de estruturas protéicas intercelulares especializadas, os corneodesmosomos, cuja principal proteína constituinte é a corneodesmosina, os quais estão embebidos em uma matriz extracelular rica em lipídios apolares organizados em bicamadas lamelares, constituídos principalmente por ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol (ELIAS; MENON, 1991; HARDING, 2004). As junções intercelulares são rompidas durante o processo de descamação, tendo sido demonstrado que o sulfato de colesterol inibe as proteases envolvidas nesse processo (SATO et al., 1998).

As múltiplas funções protetoras da barreira cutânea são amplamente mediadas pela epiderme, tanto pelos corneócitos como pela matriz extracelular. A localização e

organização dos lipídios hidrofóbicos secretados em bicamadas lamelares são críticas para as funções de barreira à permeabilidade e antimicrobiana através da manutenção da integridade do estrato córneo. Desta forma, a maioria das funções de defesa da epiderme localiza-se no estrato córneo, que limita a colonização por patógenos devido ao baixo teor de água, pH ácido, presença de microflora residente normal, bem como lipídios e peptídeos antimicrobianos de superfície. Além disso, o estrato córneo apresenta outras funções, tais como antioxidante, regulação da descamação, hidratação e ativação primária de citocinas, desencadeando o início da inflamação (ELIAS, 2007).

As funções protetoras da pele são frequentemente interligadas e até mesmo co-reguladas. Um aumento de pH no estrato córneo, resultante da ativação de proteases serina, ocasiona redução da função homeostática de barreira à permeabilidade e da integridade do estrato córneo, da barreira antimicrobiana por favorecer a colonização por espécies patogênicas, além do aumento da ativação de citocinas e da degradação de peptídeos antimicrobianos. Em condições de estresse elevado, através do aumento dos níveis de glicocorticóides, e de alterações na hidratação do estrato córneo, por exposição prolongada a ambientes de alta ou baixa umidade, também pode haver comprometimento das funções de barreira da epiderme (DENDA et al., 2000; HACHEM et al., 2003; ELIAS, 2007).

Injúrias externas à epiderme podem provocar inflamação por estimular a produção de citocinas pelos queratinócitos. Após ruptura aguda da barreira epidérmica, ocorre aumento na expressão de interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), os quais são potentes mitógenos epiteliais e estimuladores da síntese de lipídios. Essas citocinas parecem ser fundamentais para o reparo da barreira cutânea. No entanto, se a ruptura da barreira é prolongada com aumento crônico na produção de citocinas, poderá ocorrer um efeito prejudicial sobre a inflamação e a proliferação epidérmica (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008). O início da ativação de IL-1 α e IL-1 β ao nível do estrato córneo parece ocorrer através do aumento de pH induzido pela atividade de, no mínimo, uma protease serina, a calicreína-7, localizada primariamente dentro do estrato córneo (NYLANDER-LUNDQVIST; EGELRUD, 1997).

Estudos têm demonstrado que há um gradiente de íons cálcio na epiderme (LEE et al., 1992). As maiores concentrações de cálcio são encontradas na camada granulosa, enquanto no estrato córneo essas concentrações são mais baixas devido ao baixo teor de água e ao conteúdo lipídico extracelular, que não é capaz de dissolver os íons. Após ruptura da barreira, ocorre um influxo de água e o gradiente de cálcio é perdido. Essa

depleção de cálcio regula a exocitose dos corpos lamelares. Além disso, os íons cálcio são importantes para regulação da síntese de proteínas na epiderme, tais como a transglutaminase-1, bem como para as funções das adesões intercelulares e diferenciação celular epidérmica (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

Peptídeos antimicrobianos encontram-se em baixos níveis sob condições basais. Quando ocorre ruptura da barreira epidérmica, há aumento da expressão desses peptídeos, tais como LL-37 e RNase-7, que auxiliam na defesa e organização estrutural da matriz extracelular. Os lipídios de superfície, principalmente ácidos graxos livres e esfingosina, além da função estrutural, também apresentam potente atividade contra bactérias, vírus e fungos (BRAFF; DI NARDO; GALLO, 2005; ELIAS, 2007).

A presença de uma microflora residente no estrato córneo epidérmico possui papel essencial na defesa antimicrobiana do epitélio através da competição por nicho e nutrientes com patógenos invasores e da secreção de toxinas, tais como lisozimas e bacteriocinas. Seu crescimento é favorecido pelo pH ácido cutâneo e possui papel crítico na manutenção dessa acidez. Além disso, essa microbiota possui resistência aos peptídeos antimicrobianos do estrato córneo, bem como secreta produtos metabólicos inibidores, como os ácidos propiônico e acético, e substâncias antimicrobianas específicas, como penicilina e ácido azelaico, que limitam o crescimento de espécies patogênicas (SPELLBERG, 2000; ELIAS, 2007).

Outras formas de defesa antimicrobiana da pele incluem: atividade fagocítica dos queratinócitos; atividade dos receptores semelhantes a toll (TLR 2, 4 e 7), secreção de citocinas (IL-18, IFN- γ) e quimiocinas pelas células dendríticas epidérmicas; secreção de peptídeos antimicrobianos (LL-37) pelos mastócitos; produção de lisozimas e α -defensinas pelos neutrófilos, bem como indução de respostas Th1 pelas células T circulantes (ELIAS, 2007).

Além disso, na derme, há presença de glândulas sudoríparas que secretam ácido láctico e ácido úrico, e glândulas sebáceas, que produzem triglicerídeos e ácidos graxos, os quais são microbicidas (FORTE, 2007).

2.1.3 Sistema imune da pele

Além da barreira mecânica, a pele participa ativamente na defesa do hospedeiro por sua habilidade de gerar e manter reações imunológicas e inflamatórias locais. Muitos antígenos estranhos penetram no corpo através da pele e, assim, muitas respostas imunológicas são iniciadas nesse tecido (SPELLBERG, 2000).

A pele contém um sistema imune especializado constituído de linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APC). Os principais tipos celulares do sistema imune cutâneo localizados na epiderme são queratinócitos, células de Langerhans epidérmicas e células T intra-epiteliais. A derme, por sua vez, contém linfócitos T, em sua maioria perivascularares, células dendríticas dérmicas e macrófagos distribuídos difusamente. Isso é basicamente semelhante ao que ocorre no tecido conjuntivo de outros órgãos (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004) (Figura 3).

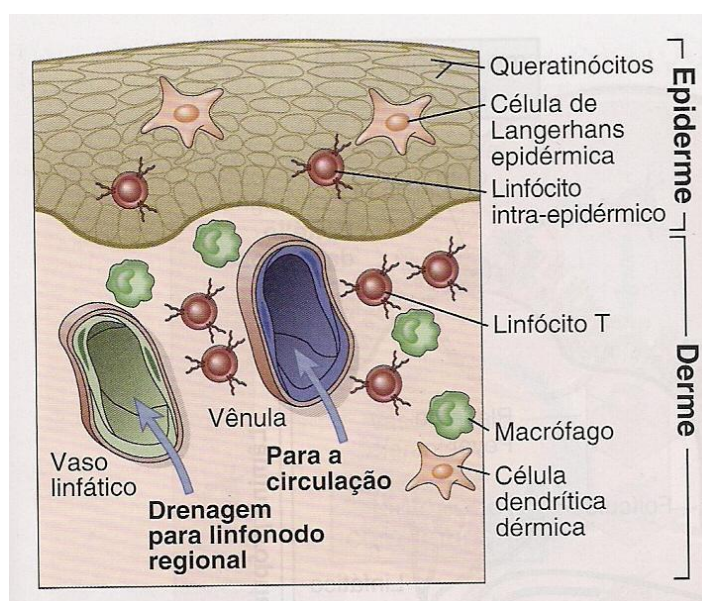


Figura 3. Componentes celulares do sistema imune da pele.

Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008.

Os queratinócitos, quando estimulados, são capazes de produzir e secretar uma ampla variedade de citocinas, incluindo interleucinas, fatores de crescimento, fatores estimuladores de colônias e quimiocinas, que contribuem para reações imunológicas naturais e inflamação cutânea (UCHI et al., 2000; TÜZÜN et al., 2007)

As células de Langerhans, localizadas na porção suprabasal da epiderme, são as células dendríticas imaturas do sistema imune cutâneo. Essas células formam uma rede praticamente contínua, permitindo-lhes capturar os antígenos que entram através da pele (BERGER et al., 2006). Quando as células de Langerhans encontram micro-organismos, elas são ativadas pela ligação aos receptores semelhantes a toll (TLR) (MILLER; MODLIN, 2007). As células perdem sua adesividade para epiderme, penetram nos vasos linfáticos, iniciam a expressão do receptor de quimiocina CCR7 e migram para as zonas de células T dos linfonodos de drenagem, em resposta a

quimiocinas produzidas nessa região (BERGER et al., 2006). As células de Langerhans também maturam para APC eficientes (MATHERS; LARREGINA, 2006).

Os linfócitos intra-epidérmicos constituem cerca de somente 2% dos linfócitos associados à pele e a maioria é composta de células T $CD8^+$. As células intra-epidérmicas podem expressar um conjunto mais restrito de receptores de antígenos que os linfócitos T da maioria dos tecidos extracutâneos. Em camundongos, muitos linfócitos intra-epidérmicos são células T que expressam um tipo incomum de receptor de antígeno formado por cadeias γ e δ , em vez das cadeias α e β , mais comuns nos receptores de antígenos das células T $CD4^+$ e $CD8^+$. Isso também ocorre com os linfócitos no intestino, sugerindo que as células T $\gamma\delta$, em algumas espécies, possam estar excepcionalmente comprometidas com o reconhecimento de micro-organismos comumente encontrados nas superfícies epiteliais. Entretanto, a especificidade e função dessa subpopulação de células T ainda não estão claramente definidas (GUY-GRAND; VASSALLI, 2002; STRID; TIGELAAR; HAYDAY, 2009).

As células dendríticas dérmicas expressam muito das mesmas moléculas expressas pelas células de Langerhans com notável exceção para caderina-E, langerina e grânulos de Birbeck, funcionando também como APC eficiente. Entretanto, apesar de muitos micro-organismos serem reconhecidos e internalizados pelas células dendríticas dérmicas e células de Langerhans, ainda é desconhecido quais desses tipos celulares são responsáveis por desencadear a resposta imune subsequente (VALLADEAU; SAELAND, 2005; MATHERS; LARREGINA, 2006).

Os linfócitos T localizados na derme (células $CD4^+$ e $CD8^+$), em geral, expressam marcadores fenotípicos característicos de células ativadas ou de memória. Não está claro se essas células ficam permanentemente na derme ou estão apenas transitando entre os capilares sanguíneos e linfáticos como parte da recirculação das células T de memória (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008)

2.2 Mecanismos envolvidos na inflamação

A inflamação, denominada *phlogosis* pelos gregos e *inflammatio* em latim, é um dos mecanismos mais primitivos de defesa do organismo animal a invasão por micro-organismos patogênicos. Os sinais cardinais da inflamação foram descritos na era clássica por Aulus Celsus: rubor (eritema), calor (temperatura elevada), tumor (edema) e dor. Um quinto sinal, perda da função foi acrescentado por Rudolf Virchow. No século XVIII, Jonh Hunter verificou a dilatação dos vasos sanguíneos e Julius Cohnhein

associou inflamação à emigração de leucócitos através das paredes da microvasculatura. No final do século XIX, Eli Metchnikoff enfatizou o papel da fagocitose no processo inflamatório, enquanto a importância dos mediadores químicos foi descrito posteriormente por Thomas Lewis em 1927 (MURPHY; WARD, 2006).

A inflamação consiste de um mecanismo de defesa inato, sendo definida como uma resposta biológica complexa dos tecidos vascularizados a diferentes estímulos, que auxilia na eliminação de agentes estranhos e dá início ao processo de reparo tecidual. Os tecidos inflamados podem responder a estímulos nocivos, tais como patógenos, células lesionadas e injúrias químicas, térmicas ou mecânicas, através da produção de diferentes mediadores bioativos, os quais interagem com diversos tipos celulares e moleculares para amplificar a reação flogística (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A resposta inflamatória caracteriza-se por eventos vasculares e celulares, e pode ser classificada em aguda ou crônica, dependendo da persistência da lesão e severidade dos sinais clínicos. A reação inflamatória aguda é caracterizada pela curta duração, aumento da permeabilidade vascular, exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Em geral, essa reação é autolimitante e sofre resolução, envolvendo remoção de células mortas, depuração das células de resposta aguda e regeneração da matriz extracelular. A resposta inflamatória crônica depende ou não da resolução do processo de fase aguda e, geralmente, possui longa duração. Caracteriza-se pela persistência de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese, proliferação de tecido conjuntivo e dano tissular frequentemente resultando em reparo excessivo (BAUHMANN; GAUDIE, 1994; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; SERHAN; SAVIL, 2005).

2.2.1 Eventos vasculares

Os eventos vasculares da resposta inflamatória ocorrem na microcirculação (BAUHMANN; GAUDIE, 1994). As alterações no fluxo e calibre vasculares têm início logo após a injúria e desenvolvem-se em velocidades variáveis, conforme a intensidade da lesão (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Essas alterações consistem em vasoconstrição arteriolar inicial, com duração de segundos, seguida por uma vasodilatação e por aumento da permeabilidade vascular, principalmente venular, a qual é produzida por diversos mediadores, tais como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas, que mediam a contração das células endoteliais, abrindo as junções

intercelulares (RANG et al., 2007). Em seguida, ocorre abertura dos esfíncteres pré-capilares, aumentando o fluxo sanguíneo local, que é causa do calor e eritema. Além disso, há saída de íons e pequenas moléculas, como água, seguida por moléculas maiores, como albumina e fibrinogênio. A passagem de proteínas para o meio extravascular associada ao aumento da pressão hidrostática local permitirá maior efluxo de líquido e seu acúmulo no tecido intersticial, resultando na formação do edema (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; MURPHY; WARD, 2006). O exsudato líquido contém uma variedade de substâncias e mediadores, o qual é drenado pelos vasos linfáticos e transportado até os linfonodos locais, onde produtos do micro-organismo invasor podem iniciar uma resposta imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

2.2.2 Eventos celulares

Uma das características essenciais da inflamação é o acúmulo de leucócitos, particularmente polimorfonucleares, nos tecidos afetados. Essas células fagocitam agentes nocivos, destroem bactérias e outros patógenos, degradam o tecido necrótico e antígenos estranhos. Além disso, podem prolongar a inflamação e induzir lesão tecidual por liberação de enzimas, mediadores químicos e radicais tóxicos de oxigênio (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998).

A saída de líquido para o espaço intersticial resulta na concentração de hemácias no leito vascular e aumento da viscosidade sanguínea, tornando o fluxo sanguíneo mais lento. Em consequência disso, há inversão na posição dos leucócitos em relação às hemácias na luz vascular, observando-se orientação periférica dos leucócitos, principalmente neutrófilos, ao longo do endotélio vascular. Esse processo é chamado marginação leucocitária (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Os neutrófilos e monócitos são recrutados do sangue para os locais de infecção por ligação a moléculas de adesão em células endoteliais e por fatores quimioatraentes produzidos em resposta à infecção (FUHLBRIGGE; WEISHAUPT, 2007). Esse recrutamento é um processo de múltiplas etapas, envolvendo fixação dos leucócitos circulantes à superfície luminal das células epiteliais das vênulas pós-capilares e a migração pela parede dos vasos, sendo cada etapa orquestrada por vários tipos diferentes de moléculas (MURPHY; WARD, 2006). Segundo ABBAS; LICHTMAN; PILLAI (2008), esse processo pode ser dividido em quatro etapas: rolagem, ativação de integrinas por quimiocinas, adesão estável e migração através do endotélio (Figura 4).

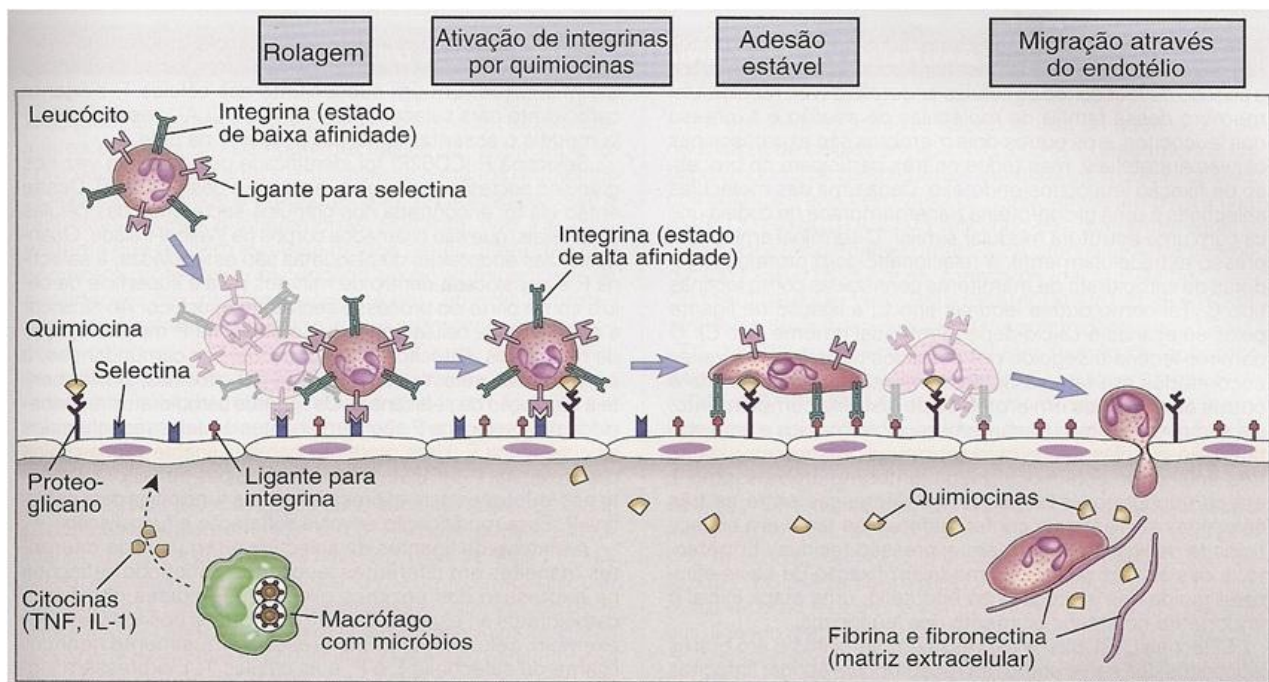


Figura 4. Etapas do processo de recrutamento dos leucócitos durante a inflamação.

Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008.

A rolagem dos leucócitos sobre o endotélio é mediada por selectinas. Em resposta aos patógenos e a citocinas produzidas pelos macrófagos ativados, principalmente $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 , há aumento da expressão das moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, as chamadas selectinas (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). As principais selectinas expressos pelas células endoteliais são a selectina P, que é armazenada em grânulos citoplasmáticos, sendo rapidamente redistribuída à superfície em resposta a produtos microbianos e citocinas, e a selectina E, que é sintetizada em resposta à IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$, sendo expressa na superfície celular dentro de uma a duas horas. Os leucócitos, por sua vez, expressam os ligantes carboidratos para selectinas P e E nas extremidades dos seus microvilos, facilitando interações com moléculas na superfície da célula endotelial (MURPHY; WARD, 2006; FUHLBRIGGE; WEISHAUPT, 2007). As interações selectina-ligante de selectina são de baixa afinidade, com uma taxa de afastamento rápida, e são facilmente rompidas pela força de cisalhamento do sangue fluente. Como resultado, os leucócitos repetitivamente destacam-se e ligam-se novamente e, assim, rolam ao longo da superfície endotelial (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O aumento na afinidade das integrinas, presentes na superfície dos leucócitos, é mediado por quimiocinas, que são citocinas produzidas em resposta a produtos

microbianos e IL-1 e TNF- α , cuja função é estimular a quimiotaxia de células. As quimiocinas produzidas no local de infecção são transportadas para a superfície luminal das células endoteliais, onde são ligadas por heparan sulfato glicosaminoglicanos, e são exibidas em altas concentrações. Assim, as quimiocinas ligam-se a receptores específicos na superfície dos leucócitos em rolagem. Os leucócitos expressam uma família de moléculas de adesão chamadas integrinas, as quais estão em estado de baixa afinidade nas células não-ativadas e são ineficazes para mediar interações de adesão. A sinalização dos receptores a quimiocinas promove aumento na afinidade das integrinas pelos seus ligantes e agregação dessas moléculas de adesão na membrana, resultando em maior ligação dos leucócitos à superfície endotelial (D'AMBROSIO; PANINA-BORDIGNON; SINIGAGLIA, 2003; TIZARD, 2008).

Sendo assim, a adesão estável dos leucócitos ao endotélio é mediada pelas integrinas. Paralelamente à ativação das integrinas e sua conversão ao estado de alta afinidade, TNF- α e IL-1 também promovem aumento da expressão endotelial de ligantes das integrinas, principalmente VCAM-1, ligante para integrina VLA-4, e ICAM-1, ligante para as integrinas LFA-1 e Mac-1 (SERHAN; SAVIL, 2005; FUHLBRIGGE; WEISHAUPT, 2007). As quimiocinas então atuam sobre os leucócitos aderentes e estimulam as células a migrar através dos espaços interendoteliais na direção do local de infecção, caracterizando a transmigração endotelial. Outras proteínas expressas nos leucócitos e nas células endoteliais, como CD31, desempenham papel importante nessa migração. Além disso, os leucócitos produzem enzimas que os capacitam a passar através da parede vascular, e acumulam-se no tecido extravascular em torno dos patógenos, onde realizam o processo de fagocitose (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

2.2.3 Mediadores químicos

Os mediadores químicos responsáveis pelos eventos inflamatórios podem originar-se do plasma, em formas precursoras que devem ser ativadas, e de células, onde podem estar armazenados nos grânulos intracelulares ou serem sintetizados originalmente em resposta a estímulos. Além disso, podem atuar em um ou vários tipos celulares, possuir alvos difusos, ou até mesmo apresentar efeitos diversos de acordo com os tipos de células e tecidos (MURPHY; WARD, 2006). Os principais mediadores envolvidos na inflamação incluem histamina, serotonina bradicinina, metabólitos do

ácido araquidônico (AA), citocinas, neuropeptídeos, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS), dentre outros (RANG et al., 2007).

A histamina e serotonina estão envolvidas na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular no local da inflamação. A histamina é encontrada em basófilos e plaquetas, mas sua principal fonte são os mastócitos, onde se encontra pré-formada nos grânulos mastocitários. A liberação desse mediador é desencadeada em resposta a vários estímulos tais como: lesão física como trauma, frio ou calor; reações imunes envolvendo a ligação de complexo antígeno-anticorpo aos mastócitos; fragmentos do complemento, como as anafilotoxinas C3a e C5a; neuropeptídeos, como a substância P; e citocinas como IL-1 e IL-8. A histamina atua em receptores específicos promovendo a constrição do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e prurido. A serotonina é um segundo mediador vasoativo pré-formado presente nas plaquetas com ações semelhantes à histamina (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; RANG et al., 2007).

A bradicinina, derivada de cininogênio plasmático vasoativo, é um mediador hiperalgésico capaz de ativar diretamente nociceptores, atuando nas respostas inflamatórias mediadas pela dor. Além disso, esse mediador apresenta efeitos sobre a permeabilidade vascular, com ação semelhante à histamina, extravasamento de plasma e ativação de células inflamatórias. O efeito hiperalgésico ocorre devido à liberação de prostanóides induzidos pela bradicinina, que amplifica o processo inflamatório. No entanto, sua ação é curta devido à rápida degradação enzimática (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; MURPHY; WARD, 2006).

As citocinas são mediadores polipeptídicos liberados por células do sistema imune como produtos finais da resposta celular a diferentes mensagens recebidas em sua superfície, que medeiam e regulam reações imunológicas e inflamatórias. Apresentam ação direta sobre os receptores celulares, mas também podem induzir a formação de outras citocinas, constituindo uma cascata de amplificação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Em relação ao processo inflamatório, pode-se mencionar as citocinas com ação pró ou anti-inflamatórias. As primeiras participam das reações inflamatórias agudas e crônicas, bem como do processo de reparo. São elas principalmente TNF- α e IL-1. As citocinas com ação anti-inflamatória inibem algumas fases da reação inflamatória, tais como inibição da produção de quimiocinas e da resposta das células Th1. Esta última inibição é importante para evitar ativação celular

inapropriada, característica de certas patologias auto-imunes. Como exemplo dessas citocinas, tem-se: TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13 (RANG et al., 2007).

A exposição celular às citocinas primárias (TNF- α e IL-1) resulta na ativação de algumas vias de sinalização, como das proteínas quinases (PKC, PKA) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que culmina na estimulação da atividade de alguns fatores de transcrição nuclear, como o fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1). Esses fatores de transcrição quando ativados induzem a transcrição gênica de diversas citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, TGF β 1), quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios secundários, tais como óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (BARNES; KARIN, 1997; DELHASE, 2003; PASCUAL; GLASS, 2006). Assim, a principal função do TNF- α e IL-1 é desencadear a resposta inflamatória inata e atuar como uma molécula co-estimulatória da resposta imune (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Dentre as citocinas secundárias, destaca-se IL-8, um potente agente quimiotático responsável pelo recrutamento de leucócitos, preferencialmente os neutrófilos. Essa quimiocina estimula o movimento dos leucócitos e regula a migração destes do sangue para a região extravascular (FUHLBRIGGE; WEISHAUP, 2007). Assim, a IL-8 coopera com a IL-1 e TNF- α no processo de infiltração leucocitária, considerando que a IL-1 e TNF- α induzem a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, necessárias à migração leucocitária ao local da lesão (TIZARD, 2008).

Os metabólitos do ácido araquidônico (AA) também desempenham um papel importante no processo inflamatório. A produção das prostaglandinas e dos leucotrienos é iniciada com a liberação do AA a partir dos fosfolipídios de membrana, uma reação catalisada pela fosfolipase A₂. Essa enzima é ativada em resposta a vários estímulos, tais como: ação da trombina nas plaquetas, do fator do complemento C5a nos neutrófilos, da bradicinina nos fibroblastos, das reações antígeno-anticorpo nos mastócitos e da lesão celular promovida por diversos agentes, como ROS. Uma vez liberado, AA serve de substrato para as duas isoformas da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), onde é convertido em prostaglandinas (PG) e tromboxanos, e também para a 5-lipoxigenase, sendo convertido em leucotrienos por essa via metabólica (RANG et al, 2007). Na pele normal, a COX-1 está distribuída em toda a epiderme, enquanto a COX-2 se localiza principalmente nos queratinócitos suprabasais, sendo essa isoforma prontamente induzida frente a um estímulo inflamatório (LEE et al., 2003).

PGE₂ é a principal prostaglandina presente no tecido cutâneo, modulando vários eventos inflamatórios, como o aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, contribuindo assim na formação do edema e na adesão e transmigração endotelial dos neutrófilos e monócitos. No entanto, o recrutamento dos linfócitos a partir do lúmen pós-capilar para o espaço intersticial é um processo mediado, em parte, pelo leucotrieno B₄ (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; LEE et al., 2003). Por outro lado, PGE₂ e PGD₂ induzem a transcrição de enzimas requeridas para a síntese de outra classe de eicosanóides envolvidas na resolução da fase inflamatória, como as lipoxinas (SERHAN; SAVIL, 2005). Além disso, PGE₂ torna a célula neural hipersensível a estímulos dolorosos e interage com citocinas na geração de febre durante processos infecciosos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

O óxido nítrico (NO) é um mediador inflamatório sintetizado e liberado por vários tipos celulares, sendo a enzima óxido nítrico sintase (NOS) fundamental para sua síntese. Existem três isoformas principais de NOS, sendo duas constitutivas, eNOS, presente no endotélio e nNOS, presente nos neurônios, e uma induzível (iNOS), expressa nos macrófagos, células de Kupfer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos, sendo a principal isoforma presente nas reações inflamatórias. NO possui ações principalmente pró-inflamatórias: promove relaxamento da musculatura lisa vascular, causando potente vasodilatação. Esse relaxamento é devido ao aumento do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) intracelular, induzido pelo NO, o que potencializa a vasodilatação. (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; RANG et al., 2007). Todavia, algumas de suas ações são anti-inflamatórias, observando-se efeito inibitório do NO na migração dos neutrófilos, com diminuição da rolagem e adesão dessas células sobre o endotélio e indução de apoptose nos neutrófilos que conseguem migrar (SECCO et al., 2004).

Os neurônios sensitivos contribuem para as reações inflamatórias através da liberação de neuropeptídeos. Os principais neuropeptídeos envolvidos com o processo inflamatório são: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), um potente vasodilatador; substância P, mediador essencialmente ativo na indução do extravasamento de proteínas plasmáticas; e neurocinina A, que atua na liberação de histamina pelos mastócitos, produzindo contração da musculatura lisa e secreção de muco. O processo inflamatório em que ocorre participação de neuropeptídeos é chamado de inflamação neurogênica e está implicada na patogênese de várias doenças (RICHARDSON; VASKO, 2002).

2.3 Mecanismos envolvidos na cicatrização

A cicatrização de feridas foi descrita no passado remoto. Os médicos no Egito antigo observaram a cicatrização em casos individuais, e cirurgiões em campos de batalha na Grécia relataram lesões produzidas por espadas e outras armas. A coagulação do sangue foi o primeiro evento reconhecido como necessário e o pus era visto como um sinal positivo no processo de cicatrização. Estudos posteriores sobre infecção de feridas levaram à descoberta de que as células inflamatórias eram os componentes primários do processo de reparação (SEPHEL; WOODWARD, 2006).

Atualmente, o estudo sobre cicatrização de feridas é um processo complexo que envolve a organização de células e sinais moleculares, englobando proteínas da matriz extracelular, fatores de crescimento, citocinas e outros mediadores, que regulam e modulam o processo de reparação (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

O processo de cicatrização é classicamente dividido em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelagem ou maturação. Essas fases não ocorrem isoladamente, elas se sobrepõem de forma contínua e temporal (Figura 5) (GHOSH; CLARK, 2007).

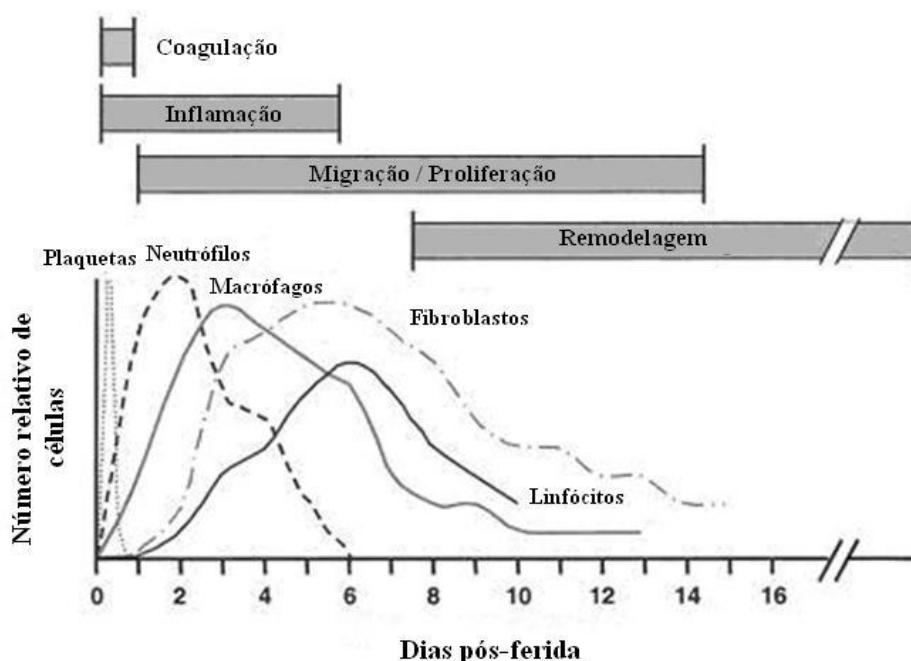


Figura 5. Fases da cicatrização correlacionadas com a especificidade imune-celular.

Fonte: PARK; BARBUL, 2004 (adaptado).

A cicatrização envolve uma sequência de eventos celulares e moleculares sincronizados para restabelecer o tecido após injúria (PARK; BARBUL, 2004). Os

principais tipos celulares e mediadores envolvidos nas fases do processo de cicatrização estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1. Principais tipos celulares e mediadores envolvidos na cicatrização.

Tipos celulares presentes no ferimento	Principais mediadores liberados	Principais efeitos desencadeados
Plaquetas	TGF- β , PDGF (PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD), PAF, fibrinogênio, fibronectina, tromboplastina	Formação de trombo plaquetário que tampona a lesão e recrutamento de neutrófilos/monócitos
Neutrófilos	IL-6, IL-8, IL-1, TNF- α , CTAP-III, TGF- β , HGF, MIP, HLE	Recrutamento de monócitos/macrófagos
Monócitos/ Macrófagos	TGF- α , TGF- β , VEGF-A, IL-6, IL-8, IL-1, TNF- α , RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, HB-EGF, HGF, MIP, MSP	Quimiotaxia de monócitos e fibroblastos, proliferação de fibroblastos, angiogênese e síntese de colágeno
Células residentes (a) Fibroblastos (b) Queratinócitos (c) Células endoteliais	(a) FGF1, FGF2, FGF4, FGF7, FGF10, IP-10, MCAF, IL-8, eotaxina, PLGF, TGF- β , Cyr61 (b) MCP-1, FGF1, FGF2, TGF- β , MIP-2, MSP (c) MCP-1	Maturação e remodelamento da matriz extracelular e angiogênese

Fonte: HATANAKA; CURI, 2007.

O reparo completo dos tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas, tendo os leucócitos como principais protagonistas. Essas células, além de suas atividades imunes, estão intimamente envolvidas com as reações catabólicas de degradação de tecidos pela produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e também com as reações anabólicas de formação de tecidos pela produção de fatores de crescimento. Esses fatores são responsáveis pela recomposição da celularidade da região, restabelecimento da homeostasia e formação da cicatriz (RICHERS, 1996).

2.3.1 Fase inflamatória

A cicatrização inicia-se com a hemostasia, que se prolonga por até 15 minutos (BAUM; ARPEY, 2005). Após a ocorrência da ferida, tem início o extravasamento sanguíneo, que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A resposta imediata é a vasoconstrição na área lesionada como tentativa de limitar a hemorragia. Posteriormente, observa-se uma vasodilatação,

que é acompanhada por aumento na permeabilidade capilar. A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea geram um tampão, rico em fibrina, que além de estabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra a invasão de micro-organismos, organiza matriz provisória necessária para a migração celular. Essa matriz servirá também, como fonte de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial (WERNER; GROSE, 2003; EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007).

O ácido araquidônico da membrana das plaquetas em processo de agregação, é convertido em tromboxano A₂, forte agonista da agregação plaquetária e potente vasoconstritor. Outro importante derivado do araquidonato, que é liberado por macrófagos e mastócitos, plaquetas e outras células ativadas, é o fator de agregação plaquetária (PAF). Este é um ativador importante de plaquetas e indutor da sua agregação. Como agonistas da agregação plaquetária, podem ser citadas também a noradrenalina e a serotonina (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; STOCUM, 2006).

As plaquetas, essenciais à formação do tampão hemostático, são ativadas e sofrem degranulação induzida pela trombina, secretando vários mediadores bioativos na área lesada. Dentre esses mediadores, podemos destacar o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformante β (TGF- β), o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), serotonina, bradicinina, prostaglandina e histamina, além de glicoproteínas adesivas como fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular provisória. A degranulação plaquetária também desencadeia a ativação da cascata do complemento com a formação de C3a e C5a, que promovem a liberação de histamina dos mastócitos e basófilos (THEORET, 2005; STOCUM, 2006; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). Os mediadores liberados pelas plaquetas ativadas se difundem pela matriz provisória formando um gradiente quimiotático que orienta o recrutamento e a migração das células envolvidas com a instalação da resposta inflamatória (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

PDGF apresenta propriedades quimiotáticas sobre neutrófilos, macrófagos e fibroblastos. As moléculas da superfamília do TGF- β também participam ativamente nessa fase do processo. O TGF- β 1 apresenta papel central para a infiltração de neutrófilos, sendo secretado por plaquetas, macrófagos e fibroblastos imediatamente após a lesão, além de induzir vários tipos celulares a produzirem mais TGF- β 1, elevando sua concentração no foco inflamatório (WERNER; GROSE, 2003).

Os neutrófilos provenientes da circulação são as primeiras células a atingirem a região inflamada, sendo predominantes entre o primeiro e segundo dias. Sua função principal é fagocitar micro-organismos. A atividade microbicida destas células é dependente da ativação do sistema NADPH oxidase, ou seja, da geração de espécies reativas de oxigênio (*burst* respiratório) e mobilização de cátions nos fagossomos, bem como da liberação de enzimas lisossomais, que auxiliam no combate à infecção (HATANAKA; CURI, 2007).

A transmigração dos neutrófilos para tecidos lesados é um fenômeno precoce do processo de reparo, que ocorre quase imediatamente após sinalização dos neutrófilos retidos pelo coágulo, macrófagos residentes e células estromais (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). A produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6 ocorre rapidamente após a lesão. TNF- α e IL-1 são os principais mediadores da resposta inflamatória aguda, exercendo papéis importantes na ativação de células endoteliais, induzindo a produção de óxido nítrico (NO), assim como aumento da expressão de moléculas de adesão, que contribuem para o recrutamento e acúmulo de mais fagócitos na área inflamada (TIZARD, 2008). Dentre os vários efeitos pró-inflamatórios atribuídos à IL-6, estão intimamente relacionados ao processo de reparo os efeitos quimioatrativos sobre neutrófilos na fase mais precoce e, numa etapa mais tardia, a indução mitótica de queratinócitos (SATO et al., 1999).

A fase inflamatória também é modulada por quimiocinas, como as proteínas inflamatórias para macrófagos (MIP), a proteína quimioatraente de macrófagos-1 (MCP-1), RANTES e a interleucina-8 (IL-8). MIP integram os eventos inflamatórios e de reparo tecidual, sendo responsáveis pelo acúmulo inicial de macrófagos no foco inflamatório (EFRON; MOLDAWER, 2004; EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007). DiPIETRO et al. (1998) demonstraram em modelo murínico, que a depleção de MIP-1 α no processo de cicatrização, reduz, de forma indireta, a atividade angiogênica por reduzir a chegada de macrófagos ao sítio de reparo.

Os macrófagos derivados dos monócitos são as próximas células a surgirem na área da lesão, por volta do segundo ao quinto dia, e ao contrário do papel desempenhado pelos neutrófilos, são considerados os elementos mais críticos na indução do processo de reparo (PARK; BARBUL, 2004). Além de auxiliar os neutrófilos na eliminação de micro-organismos pela fagocitose, os macrófagos após fagocitá-los e processá-los nos fagossomos, apresentam seus peptídeos pelo complexo histocompatibilidade maior às células T auxiliares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Além disso, atuam na

limpeza da ferida, degradando e eliminando componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanos, e neutrófilos que perderam sua função, bem como produzem e exportam mediadores lipídicos (eicosanóides) e enzimas relacionadas ao reparo, tais como collagenases e matriz de metaloproteases. Os macrófagos são fonte de citocinas e fatores de crescimento, tais como PDGF, TGF- β , VEGF e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que são as principais citocinas envolvidas na formação do tecido de granulação na fase subsequente do processo cicatricial (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). A fase inflamatória tem duração de 48 a 72 horas (HATANAKA; CURI, 2007).

2.3.2 Fase proliferativa

A fase proliferativa caracteriza-se pelos processos de fibroplasia, angiogênese, deposição de matriz extracelular e reepitelização. Nesta fase, ocorrem intensa migração e proliferação celular, principalmente de fibroblastos e queratinócitos (SEPHEL; WOODWARD, 2006).

Inicialmente, a migração e ativação de fibroblastos são intensificadas em decorrência da liberação de mediadores produzidos principalmente por macrófagos, destacando-se os fatores de crescimento como PDGF, TGF- β e VEGF. Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação e, após influência dos fatores de crescimento derivados dos macrófagos, são ativados e migram das bordas para o centro da ferida. Isto ocorre através da matriz provisória formada e do gradiente químico de substâncias quimioatraentes (THEORET, 2005; STOCUM, 2006; GHOSH; CLARK, 2007). Com o aumento do número de fibroblastos ativados para produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais denso e elástico. Esse processo é denominado de fibroplasia. Sua eficiência é dependente da ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, neovascularização da região (HARTLAPP et al., 2001). A indução da angiogênese ocorre pela ação direta de fatores de crescimento sobre as células endoteliais e, em parte, pela baixa tensão de oxigênio característica no centro da ferida, elevados níveis de ácido láctico e aminas bioativas (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). Embora essa função tenha sido atribuída, inicialmente, ao FGF-1 ou FGF-2, VEGF-A foi descrito, posteriormente, como principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento do tecido cicatricial (HOWDIESHELL et al., 2001).

Por volta do quarto dia, com a fibroplasia e a angiogênese, inicia-se a formação do tecido de granulação, o qual é constituído por macrófagos, fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares, os quais são sustentados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos e colágenos tipos I e II. Esse tecido é edematoso e caracteriza-se pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos, os quais são exsudativos e sangram com facilidade (BAUM; ARPEY, 2005; HATANAKA; CURI, 2007).

Nesta etapa, a neovascularização é essencial porque permite a troca de gases e a nutrição de células metabolicamente ativas (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Sob estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores, as células endoteliais do interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar collagenase e ativador do plasminogênio. Essas substâncias promovem aberturas na membrana basal e permitem a migração das células endoteliais que, atravessando a parede do vaso e utilizando como substrato a matriz extracelular provisoriamente produzida, seguem em direção à região lesionada. As células endoteliais migratórias diferenciam-se e formam, no exterior do vaso, um broto capilar que, em seguida, une-se ao capilar de onde eram originárias para o restabelecimento do fluxo sanguíneo (RISAU, 1990; WERNER; GROSE, 2003).

A matriz extracelular, que inicialmente era formada essencialmente por proteínas derivadas das plaquetas e plasma, tem sua composição modificada. Na fase inicial do reparo, os fibroblastos passam a depositar grandes quantidades de fibronectina e ácido hialurônico. Posteriormente, há aumento na produção de glicosaminoglicanos, que serão, em parte, substituídos por proteínas como colágeno, elastina, laminina e proteases responsáveis pelo remodelamento fisiológico (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Durante o amadurecimento fenotípico dos fibroblastos em células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança sua eficiência máxima. Isto ocorre devido à diferenciação de alguns fibroblastos das margens das feridas para miofibroblastos, células com características funcionais semelhante às células do músculo liso (THEORET, 2005; SEPHEL; WOODWARD, 2006).

Os queratinócitos tornam-se células hiperproliferativas e migratórias que produzem e secretam componentes da matriz extracelular e polipeptídeos sinalizadores, ao mesmo tempo em que seu citoesqueleto é alterado para a produção de queratina (SANTORO; GAUDINO, 2005). O processo de reepitelização inicia-se imediatamente após a lesão. Em tecidos normais, o potencial mitótico das células epidérmicas da camada basal encontra-se inibido pelo contato existente entre as células pela “inibição

por contato”. Com a ocorrência de uma lesão, o mecanismo inibitório desaparece e as células entram em mitose. Além disso, a ineficiência do processo mitótico destas células nas etapas iniciais é devido à inexistência de substrato adequado na região da ferida, que somente é fornecido quando o tecido de granulação alcança o nível da epiderme. A superfície úmida e oxigenada da ferida é um fator que acelera o processo de migração dos queratinócitos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Na fase proliferativa, a sinalização celular é feita por um número maior de mediadores, envolvendo ativação, migração e indução de mitose das células estromais. Além das atividades quimioatraentes dos membros da superfamília do TGF- β , esses exercem efeitos importantes sobre a fibroplasia, deposição de matriz extracelular e angiogênese (WERNER; GROSE, 2003). São mitogênicos para fibroblastos, mas inibidores da proliferação de várias células incluindo os queratinócitos. Além disso, são potentes estimuladores da expressão de proteínas da matriz extracelular, induzem a expressão de integrinas nos queratinócitos, necessárias a sua migração pela matriz extracelular provisória rica em fibronectina e participam da diferenciação de miofibroblastos e do processo de angiogênese (ROBERTS; SPORN, 1996). Da mesma forma, PDGF estimula a proliferação dos fibroblastos e produção de matriz extracelular, induzindo nestas células a mudança de fenótipo para miofibroblastos, enquanto MCP-1, além de induzir síntese de colágeno, aumenta a expressão de TGF- β e da matriz de metaloproteinases (WERNER; GROSE, 2003; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

O fator estimulador de colônias para granulócitos e macrófagos (GM-CSF) possui papel importante no processo de cicatrização. Em estudos realizados com camundongos transgênicos, demonstrou-se que GM-CSF proporciona melhora substancial na neovascularização e formação do tecido de granulação, acelerando o processo de reepitelização. Além disso, demonstrou-se que esse fator atua diretamente sobre as células locais, aumentando o conteúdo de citocinas e de TGF- β 1 na região da lesão (MANN et al., 2001).

Os membros da família do FGF são mitogênicos para vários tipos celulares presentes no tecido lesado, incluindo fibroblastos e queratinócitos. Dentre eles, aqueles que vêm demonstrando maior potencialidade de participação no processo de reparo são FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-7 e FGF-10 (ABRAHAM; KLAGSBRUN, 1996). Os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF) são potentes estimuladores da mitose e sobrevivência de diversos tipos celulares, exercendo suas funções através de ligação à receptores tirosina quinase que se assemelham aos receptores de insulina. Na pele normal,

um pequeno número de células expressa receptores para IGF, porém todas as células da epiderme, além de macrófagos e outras células inflamatórias, passam a expressá-los entre um e três dias após a lesão (GARTNER; BENSON; CALDWELL, 1992). IGF-I aumenta a expressão das cadeias pró-alfa 1 (I) e pró-alfa 1 (III) do procolágeno em cultura de fibroblastos da derme, tendo sido atribuída à sua superexpressão, a formação de cicatriz hipertrófica após queimaduras (GAHARY et al., 1995).

A maioria dos mediadores envolvidos na fibroplasia como MCP-1, IL-8, GM-CSF e FGF também possuem atividade angiogênica. Além desses, outros sinalizadores, principalmente membros da família do VEGF contribuem para formação de novos vasos. VEGF-A é identificado como principal regulador da angiogênese na cicatrização (HATANAKA; CURI, 2007). Os macrófagos e os queratinócitos da região em reparo aumentam de forma significativa a expressão gênica de VEGF-A e seus receptores estão aumentados nos vasos sanguíneos do tecido de granulação (LAUER et al., 2000). Além disso, a neutralização do VEGF-A por anticorpos reduziu a angiogênese, a formação de tecido de granulação e o acúmulo de fluidos em regiões que sofreram lesão (HOWDIESHELL et al., 2001). O fator de crescimento da placenta (PLGF), outro membro da família do VEGF, possui participação importante na angiogênese. As células endoteliais dos capilares adjacentes à ferida expressam PLGF e o aumento da sua expressão indica importância funcional. A expressão do VEGF-A e PLGF encontram-se aumentados durante a migração dos queratinócitos (FAILLA et al., 2000). O fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), além de suas ações angiogênicas, também participa da reepitelização (COWIN et al., 2001). Da mesma forma, GM-CSF estimula migração e proliferação das células endoteliais e possui ação mitogênica sobre queratinócitos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005), assim como IL-6 (SATO et al., 1999).

Membros da família do EGF compreendem moléculas, cujos efeitos sobre a reepitelização são os mais estudados e característicos. Dentre elas, destacam-se EGF e TGF- α . Esses fatores de crescimento endógenos, produzidos principalmente por macrófagos e eosinófilos, são considerados importantes reguladores da proliferação dos queratinócitos no sítio da lesão (SANTORO; GAUDINO, 2005).

As ativinas e as proteínas morfogenéticas do tecido conjuntivo (BMP) são membros da família do TGF- β que participam da reepitelização. A ativina pode estimular os fibroblastos para expressão de fatores de crescimento, que paracrinamente estimulam a proliferação dos queratinócitos. Por outro lado, após fechamento da ferida, BMP-6 acumula-se por toda a camada suprabasal da nova epiderme formada, sugerindo

participação na diferenciação de queratinócitos, levando-os a cessarem sua atividade mitótica (HUBNER et al., 1996; McDONNELL et al., 2001).

Os queratinócitos, assim como outros tipos celulares, podem expressar receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR), que são fatores de transcrição envolvidos na regulação de diversos aspectos metabólicos e funcionais de leucócitos, fibroblastos e queratinócitos. Esses receptores também estão envolvidos nas diferentes fases do processo de cicatrização, principalmente PPAR α e PPAR β , que estimulam a migração e a diferenciação de queratinócitos, protegendo-os da apoptose induzida por citocinas e sendo importantes para uma rápida reepitelização do tecido (FREEDBERG et al., 2001; WHAHLI, 2002).

Ao final desta etapa, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida pela neovascularização e a rede linfática passa por regeneração. Lentamente, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas, o que começa a dar à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa. A fase proliferativa tem duração de 12 a 14 dias (HATANAKA; CURI, 2007).

2.3.3 Fase de remodelagem

A fase de remodelagem é marcada por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo aumento na deposição e reorganização do colágeno e aumento da resistência da cicatriz, que adquire maior força tênsil. A maioria das células desaparece, observando-se apoptose de fibroblastos e células endoteliais (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; HATANAKA; CURI, 2007).

A resistência de uma cicatriz é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma com que as fibras estão organizadas. O remodelamento envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. Inicialmente, a deposição de colágeno é feita de maneira aleatória, tendo como orientação a organização da fibronectina, e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Subsequentemente, essas fibras são digeridas, resintetizadas, rearranjadas conforme organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A degradação do colágeno e de outras proteínas da matriz extracelular é efetuada por uma família de metaloproteínases da matriz (MPP), que dependem de íons zinco para sua atividade (SANTORO; GAUDINO, 2005). MPP consistem em collagenases

intersticiais, gelatinases, estromelinas e metaloproteinases da matriz ligadas à membrana. Essas enzimas são produzidas por vários tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e queratinócitos, e sua secreção é induzida por determinados estímulos, incluindo fatores de crescimento, como PDGF e FGF, e citocinas, como IL-1 e TNF- α . Por outro lado, é inibida pelo TGF- β e por esteróides (SEPHEL; WOODWARD, 2006; GILL; PARKS, 2008). A expressão e ativação de MMP promovem a liberação de fatores de crescimento ligados à matriz extracelular, mantendo constante o estímulo à proliferação e migração dos queratinócitos, acelerando o processo de reepitelização. Uma vez formadas, MMP ativadas são rapidamente inibidas por uma família de inibidores teciduais específicos das metaloproteinases, que são produzidos pela maioria das células mesenquimatosas, impedindo, assim, a ação descontrolada dessas proteinases (BAUM; ARPEY, 2005; GILL; PARKS, 2008).

TGF- β é um mediador com participação importante nesta fase da cicatrização. Embora exercendo efeitos inibitórios sobre a proliferação dos queratinócitos, é um potente estimulador da expressão de proteínas da matriz extracelular e de integrinas (ROBERTS; SPORN, 1996). A expressão de ativina β aumenta de forma considerável 24 horas após a lesão, permanecendo em concentrações elevadas até o final do processo de cicatrização (HUBNER et al., 1996). Apesar de inibirem a proliferação de queratinócitos, induzem a expressão do EGF em fibroblastos, aumentando de forma considerável o tecido de granulação. Em geral, enquanto o TGF- β promove deposição do tecido de granulação e matriz extracelular, as ativinas induzem de forma mais pronunciada a deposição de fibronectina e tenascina-C (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Nesta fase, os eosinófilos aparecem e podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento (HATANAKA; CURI, 2007). Após fechamento da ferida e eliminação dos micro-organismos, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário predominante na área da lesão. Além de efetores imunes, os linfócitos são fontes de fatores de crescimento. Eles são atraídos para a região da ferida em igual número aos monócitos e, a partir do décimo quarto dia, são os leucócitos que predominam na região (PARK; BARBUL, 2004).

Ao final desta etapa, os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sofrem regeneração limitada e a coloração da cicatriz permanece pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficiente e as cicatrizes são hipovascularizadas devido ao desaparecimento dos neocapilares. Esta fase ocorre lentamente, podendo durar de

meses a anos e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; HATANAKA; CURI, 2007).

2.4 Plantas medicinais

O uso de plantas como fonte de medicamentos foi uma das primeiras manifestações do homem em compreender e utilizar a natureza. As plantas medicinais são matérias-primas de origem vegetal utilizadas para aliviar, prevenir ou curar uma doença ou para alterar seu processo fisiológico e patológico tanto no homem como nos animais (RATES, 2001; McGAW; ELOFF, 2008). O conhecimento tradicional sobre sua utilização vem sendo adquirido pelas comunidades ao longo de muitos anos e transmitido verbalmente através das gerações (BARBOZA; SOUTO; MOURÃO, 2007).

Com o avanço da ciência, intensificaram-se os estudos sobre as plantas medicinais utilizadas popularmente, relacionando sua composição química com seus efeitos, sendo indispensável sua validação científica para aceitação de sua utilização (McGAW; ELOFF, 2008).

Atualmente, estima-se que 25 a 30% das drogas prescritas mundialmente são oriundas de plantas medicinais (RATES, 2001; CALIXTO, 2005). Neste contexto, o Brasil, particularmente a caatinga nordestina, ganha destaque, pois apresenta grande biodiversidade de espécies vegetais, o que constitui uma de suas maiores riquezas e uma possível fonte para obtenção de novas substâncias com finalidade terapêutica (ALBUQUERQUE et al., 2007). Entretanto, menos de 10% dessa biodiversidade foi avaliada em relação as suas características biológicas e pouco menos de 5% foi submetida à análise fitoquímica (LUNA et al., 2005).

As atividades biológicas das plantas medicinais são frequentemente atribuídas aos seus metabólitos secundários. Estes são produzidos através de rotas biossintéticas diversas, cujos compostos de partida são os metabólitos primários, os quais incluem os carboidratos, proteínas e lipídios, que são essenciais para as funções vitais da planta (VEERPORTE, 2000). Os metabólitos secundários, como moléculas biologicamente ativas, podem interferir em vários mecanismos ou mediadores envolvidos no processo inflamatório e cicatricial.

2.4.1 Plantas medicinais com atividade anti-inflamatória tópica

Inúmeras plantas utilizadas na medicina tradicional demonstraram promover a inibição da resposta inflamatória tópica *in vivo*, sendo que algumas delas já tiveram os compostos responsáveis por tal atividade isolados e caracterizados.

O óleo-resina de *Copaifera duckei* (copaíba), cuja composição terpenoidal é bem caracterizada, apresentou atividade anti-inflamatória quando aplicado topicamente em modelo de dermatite induzida por óleo de cróton, onde há participação de mediadores obtidos pela via das cicloxigenases. A redução do edema foi dose-dependente, com inibição de 52%, 58% e 62% nas doses utilizadas, sendo semelhante ao efeito produzido pela dexametasona (CARVALHO et al., 2005). Utilizando esse mesmo modelo, os óleos das sementes de *Helianthus annuus* (girassol) e *Vitis vinifera* (uva), ricos em ácidos graxos insaturados ômega-6 (linoléico), apresentaram efeito antiedematogênico tópico, sendo esse efeito potencializado quando se associou esses óleos vegetais aos triglicerídeos de cadeia curta, ácidos cáprico e caprílico (NABAS et al., 2009).

A aplicação tópica do extrato hidro-alcóolico e frações de *Serjania erecta* (cipó-cinco-folhas) revelaram atividade significativa sobre o processo inflamatório, causando uma redução dose-dependente do edema de orelha induzido por óleo de cróton. Além disso, houve diminuição da atividade da mieloperoxidase tissular, parâmetro indicativo do influxo de polimorfonucleares. As frações diclorometano, acetato de etila e hexânica demonstraram inibição máxima de 81%, 78% e 83% para o edema de orelha e 56%, 52% e 69% para atividade da mieloperoxidase, respectivamente (GOMIG et al., 2008).

O extrato acetato de etila obtido das folhas de *Memecylon edule*, apresentou maior estimulação da produção de IL-10 *in vitro*, e redução do edema de orelha induzido por EPP (fenilpropionato de etila) em camundongos, o qual foi dose-dependente. As concentrações de 1 mg/orelha (47,8%) e 2 mg/orelha (50,2%) promoveram inibição similar àquela produzida pela indometacina (62,4%) e dexametasona (70%) após 4 horas da aplicação dos extratos (NUALKAEW et al., 2009).

As propriedades anti-inflamatórias dos flavonóides obtidos do extrato butanólico de *Cayaponia tayuya* (taiuiá) foram avaliadas, utilizando-se modelo de edema de orelha induzido por dose única (inflamação aguda) ou múltiplas (inflamação subcrônica) de TPA (13-acetato de 12-o-tetradecanoil-forbol), com ênfase na indução de enzimas pró-inflamatórias e mediadores peptídicos. Os flavonóides dessa planta inibiram o edema agudo em 66%, enquanto no modelo subcrônico essa inibição foi de 37%. Em testes *in vitro* com macrófagos, a produção de óxido nítrico foi reduzida (42%), mas não houve

efeitos sobre a produção de TNF- α . Além disso, houve inibição da expressão de iNOS e COX-2 em 98% e 42%, respectivamente (AQUILA et al., 2009).

Dentre as frações do extrato etanólico de *Egiron multiradiatus*, que possui flavonóides como principais componentes, a fração butanólica mostrou ser mais efetiva contra o processo inflamatório. Essa fração quando administrada oralmente na dose de 400 mg/kg, em modelo de edema de orelha induzido por xileno em camundongos, produziu uma maior inibição da resposta inflamatória (52,94%) quando comparada à dexametasona (44,12%) (LUO et al., 2008).

Os efeitos anti-inflamatórios tópicos de *Heliopsis longipes* e seus principais constituintes bioativos foram avaliados pela primeira vez, utilizando-se modelos de inflamação de orelha induzido por ácido araquidônico (AA) ou acetato de forbol mirístico (PMA). O extrato etanólico da raiz dessa planta aplicado topicamente reduziu o edema de orelha de maneira dose-dependente, sendo o efeito anti-inflamatório máximo observado na concentração de 3 mg/orelha. Esta inibição foi de 91,3% e 80,3% nos modelos do AA e PMA, respectivamente. Resultados similares foram observados para os constituintes afinina e isobutil-decanamida (HERNÁNDEZ et al., 2009).

Os extratos éter de petróleo, clorofórmico e metanólico de *Acacia cornigera*, *Byrsonimia crassifolia*, *Sweetia panamensis* e *Sphagneticola trilobata* foram avaliados por suas propriedades anti-inflamatórias tópicas pelo modelo de dermatite auricular induzida por óleo de cróton. Todos os extratos inibiram o edema, sendo que o extrato clorofórmico mostrou maior atividade inibitória, com valores de ID₅₀ (dose em que há 50% de inibição do edema) variando de 112 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (*Byrsonimia crassifolia*) a 183 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (*Sphagneticola trilobata*), enquanto a ID₅₀ da indometacina foi de 93 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (MALDINI et al., 2009).

A atividade de *Chrysanthemum indicum* sobre a resposta inflamatória aguda e crônica foi avaliada em modelo de edema de orelha induzido por TPA. A aplicação tópica do extrato etanólico das flores dessa planta inibiu o edema através da redução da espessura e peso das orelhas tratadas, bem como do infiltrado inflamatório e outros indicadores histológicos, semelhante aos efeitos produzidos pela indometacina. Além disso, houve redução significativa dos níveis de IL-1 β e TNF- α , bem como da atividade da mieloperoxidase. Esses resultados sugerem *C. indicum* como agente anti-inflamatório em potencial (LEE et al., 2009).

O extrato etanólico de *Daphne retusa*, quando administrado oralmente na dosagem de 800 mg/kg, mostrou discreto efeito sobre a redução do edema de orelha

induzido por xileno, com inibição de 14,7%. No entanto, dosagem idêntica das frações acetato de etila e butanólica desse extrato mostraram efeitos anti-inflamatórios tópicos mais significativos com inibição de 43,9% e 36,5%, respectivamente. Esses efeitos também foram observados nas frações éter de petróleo e cloreto de metileno (100 mg/kg), mostrando inibições de 36,7% e 44,2%, respectivamente (HU et al., 2008). Utilizando esse mesmo modelo, verificou-se o potencial anti-inflamatório tópico de *Pterocephalus hookeri*. Os extratos aquoso (4 g/kg) e etanólico (1 g/kg) dessa planta administrados por via oral inibiram o edema em 93,77% e 76,47%, respectivamente (ZHANG et al., 2009). Da mesma forma, o extrato etanólico das folhas de *Aquilaria sinensis* demonstrou propriedades anti-inflamatórias ao inibir o edema induzido por xileno em camundongos, com taxa de inibição de 51% na dosagem de 848 mg/kg, sendo que essa inibição foi dose-dependente (ZHOU et al., 2008).

O efeito do extrato hidro-alcóolico obtido das partes aéreas *Solidago chilensis* sobre a inflamação aguda foram verificados através do edema de orelha induzido pela fração clorofórmica do extrato-látex de *Euphorbia milii* em ratos. A administração tópica ou intraperitoneal do extrato de *S. chilensis* reduziu a formação do edema, entretanto a via tópica foi mais efetiva, produzindo efeito similar à dexametasona. Por outro lado, as doses testadas (12,5-50 mg/kg) não inibiram a formação do edema quando o extrato foi administrado oralmente, sendo equivalente ao edema do grupo controle negativo tratado com salina. Sugeriu-se a inibição da interação leucócito-endotélio como importante mecanismo de ação do extrato (TAMURA et al., 2009).

O extrato aquoso da casca do caule de *Tabebuia avellanedae* (100mg/kg), administrado oralmente em camundongos, mostrou efeito anti-inflamatório tópico ao inibir o edema de orelha induzido por ácido araquidônico, mas não foi capaz de inibir o edema quando se utilizou óleo de crôton como agente flogístico. Esse extrato suprimiu a produção de PGE₂ e de NO, bloqueando a expressão das enzimas COX-2 e iNOS, em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo *in vitro* (BYEON et al., 2008).

A atividade inibitória do extrato acetato de etila de *Garcinia hanburyi* sobre a inflamação aguda foi verificada em modelo de edema de orelha induzido por EPP em ratos. A aplicação tópica de 1mg/orelha desse extrato inibiu o edema em 93% após 30 minutos da indução do processo. Sugeriu-se esse efeito à inibição da biossíntese das prostaglandinas (PANTHONG et al., 2007).

Estes resultados demonstram possibilidades da utilização de plantas medicinais e seus metabólitos secundários como agentes anti-inflamatórios tópicos.

2.4.2 Plantas medicinais com atividade sobre a cicatrização cutânea

Embora a maioria das propriedades terapêuticas de plantas medicinais seja baseada em relatos populares, muitos estudos científicos têm sido desenvolvidos no sentido de investigar e comprovar a atividade cicatrizante dessas plantas, validando-as.

Uma alternativa terapêutica na cicatrização cutânea é o uso tópico do óleo das sementes de *Helianthus annuus* (girassol). A aplicação desse óleo sobre feridas cutâneas em carneiros da raça Santa Inês acelerou o processo de cicatrização no 7º e 21º dia de tratamento, reduzindo a área não-cicatrizada e aumentando a contração das feridas. Além disso, o tecido de granulação desenvolveu-se mais rapidamente, assim como a reepitelização foi mais precoce nas feridas tratadas (MARQUES et al., 2004).

O óleo-resina de *Copaifera langsdorffi* (copaíba) aplicado topicamente na concentração de 4% acelerou a contração de feridas cutâneas em ratos. No dia 9, essa contração foi 84,05% quando comparado com o controle (51,29%). Além disso, a força de tensão nas feridas induzidas por incisão mostrou-se maior nos animais tratados (71,48 g/cm) no dia 5 do experimento. Esses resultados podem justificar o uso tradicional desse óleo no tratamento de feridas, indicando efeitos benéficos sobre a cicatrização (PAIVA et al., 2002). Entretanto, o tratamento tópico com óleo de *C. langsdorffi*, *in natura*, influenciou de forma negativa o processo de cicatrização cutânea de feridas cirúrgicas em camundongos na presença de corpo estranho, demonstrando retardo no processo de reepitelização, permanência de crostas e persistência das alterações vasculares e inflamatórias (VIEIRA et al., 2008).

As propriedades cicatrizantes de *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão), *Calendula officinalis* (calêndula) e *Symphytum officinale* (confrey) foram avaliadas macroscópica e histologicamente em modelo de cicatrização por segunda intenção em equinos. *S. barbatiman* revelou efeitos favoráveis sobre fibroplasia e retração das feridas, enquanto *C. officinalis* acelerou a fase inflamatória do processo cicatricial. Por outro lado, *S. officinale* apresentou resultados inferiores àqueles observados no grupo controle tratado com salina fisiológica (MARTINS et al., 2003). Outras espécies de barbatimão mostraram atividade sobre a reepitelização de feridas cutâneas em ratos. O extrato bruto liofilizado de *S. polyphyllum* aplicado topicamente revelou aumento da proliferação dos queratinócitos após 4 e 7 dias de tratamento, enquanto com *S. obovatum* essa proliferação foi observada nos dias 7 e 10 pós-tratamento (LOPES et al., 2005).

A aplicação tópica de unguentos contendo extratos das folhas de *Momordica charantia* (melão-de-são-caetano) sobre lesões cutâneas em coelhos, demonstrou que o

extrato hexânico foi mais eficaz, gerando uma rápida ativação do processo cicatricial, que foi avaliado macroscopicamente e pela quantificação de parâmetros, como área de retração das feridas, infiltrado de células mononucleares, fibroblastos e vasos sanguíneos, mostrando o potencial farmacológico dessa planta sobre a cicatrização cutânea (VASCONCELOS et al., 2007). Em contrapartida, um unguento à base do extrato etanólico de *Vernonia scorpioides* (erva-de-são-simão) aplicado sobre lesões cutâneas em camundongos intensificou a área de necrose na fase aguda da cicatrização. No entanto, não houve inibição do recrutamento e estimulação das células inflamatórias e do processo de reparo, havendo formação de tecido de granulação e reepitelização normais (DALAZEN et al., 2005).

O uso tópico do extrato dos frutos de *Passiflora edulis* (maracujá) não apresentou, macroscopicamente, efeito significativo sobre a cicatrização de feridas cutâneas em ratos quando comparadas ao controle. Entretanto, microscopicamente, observou-se aumento da proliferação fibroblástica no 7º dia e maior colagenização no 14º dia de tratamento (GARROS et al., 2006).

Extratos etanólicos e hexânicos de 12 plantas utilizadas na medicina tradicional da região sul brasileira como agentes cicatrizantes foram investigadas em vários ensaios biológicos, envolvendo ação de NF- κ B, MAPK, TNF- α , caspase-3, elastase, migração e proliferação de fibroblastos, além de testes de citotoxicidade. Dentre as plantas avaliadas, os extratos hidrofílicos de *Galinsoga parviflora* (picão branco), *Petiveria alliacea* (guiné), *Schinus molle* (aroeirinha), *Waltheria douradinha* (douradinha) e *Xanthium cavanillesii* (carrapicho), bem como o extrato lipofílico de *W. douradinha* mostraram-se mais ativos no processo de cicatrização (SCHMIDT et al., 2009).

A atividade cicatrizante da raiz de *Arnebia densiflora* foi avaliada em modelos de feridas por excisão e incisão. Vários extratos dessa planta foram testados na forma de ungentos tópicos. O extrato hexânico a 1% revelou efeito cicatrizante mais significativo, seguido pelo extrato clorofórmico. No dia 12, as feridas tratadas com esses extratos mostraram contração de 95,2% e 89,9%, respectivamente, enquanto a força de tensão foi de 47,5 % e 30% para os respectivos extratos (AKKOL et al., 2009).

O efeito do tratamento tópico com látex extraído dos frutos de *Carica papaya* (mamão), na forma de hidrogéis, sobre a cicatrização de feridas cutâneas induzidas em camundongos pelo modelo de queimadura demonstrou aumento significativo do teor de hidroxiprolina nas feridas quando comparado aos controles, inclusive com a droga de referência sulfadiazina de prata, além de acelerar a contração das feridas e reduzir o

tempo de reepitelização. Esses resultados podem sustentar o uso tradicional desse látex no tratamento de queimaduras (GURUNG; SKALKO-BASNET, 2009).

A eficácia do extrato aquoso obtido das folhas de *Lantana camara* (camará) sobre o processo cicatricial foi determinada através de parâmetros morfológicos e bioquímicos. O tratamento tópico de feridas cutâneas com esse extrato em ratos melhorou a taxa de contração das feridas (98%), aumentou a síntese de colágeno (50 mg/g de tecido) e reduziu o tempo médio de cicatrização (17 dias). Além disso, no dia 10, o estudo histológico revelou maior organização das fibras de colágeno e fibroblastos, mostrando poucas células inflamatórias, enquanto o controle apresentou fibras de colágeno desorganizadas e poucos fibroblastos (NAYAK et al., 2009).

O potencial cicatrizante dos extratos metanólicos de *Holoptelea integrifolia* foi avaliado através de dois modelos experimentais em ratos. No modelo de feridas por excisão, os extratos mostraram taxa de cicatrização superior a 90% no dia 14, enquanto no controle essa taxa foi 63%. No modelo por excisão, os extratos obtidos da casca do caule mostraram maiores força de tensão (4,94 g/mm²) e conteúdo de hidroxiprolina (72,22 mg/g), indicando maior deposição de colágeno. Histologicamente, houve redução da área da cicatriz, aumento da proliferação de fibroblastos, angiogênese, queratinização e reepitelização. Esses resultados foram atribuídos, em parte, aos efeitos sinérgicos das atividades antimicrobiana e antioxidantes dos extratos (REDDY et al., 2008).

Extrato etanólico de *Calotropis gigantea* acelerou o processo de cicatrização em ratos. Quando aplicado topicamente na forma de unguento a 5% em modelo de excisão, aumentou a contração das feridas (98,96%) e reduziu a área da cicatriz (40,87%) e o tempo de reepitelização (18 dias). Quando administrado oralmente nas doses de 100-400 mg/kg em modelos de incisão e espaço morto, aumentou as forças de tensão das feridas e o teor de hidroxiprolina, não havendo diferenças entre as dosagens e droga de referência à base de iodo-povidine aplicada topicamente (DESHMUKH et al., 2009).

O tratamento tópico de lesões cutâneas com extratos aquoso e metanólico de *Mimosa pudica*, na forma de ungentos a 2%, mostrou atividade significativa sobre a cicatrização em ratos. No dia 16, os animais tratados com extrato metanólico apresentaram 100% de contração das feridas e período de reepitelização de 19 dias, enquanto nos animais que receberam extrato aquoso, esses parâmetros foram de 97,34% e 22 dias, respectivamente. A força de tensão e teor de hidroxiprolina também foram superiores nesses grupos. Os resultados observados podem estar associados aos constituintes fenólicos identificados nos extratos (KOKANE et al., 2009).

O extrato etanólico das partes aéreas de *Dendrophthoe falcata* apresentou potente atividade sobre a cicatrização cutânea em ratos, o qual foi evidenciado através do aumento das forças de tensão e contração das feridas. Além disso, a expressão de hexosamina e hidroxiprolina no tecido de granulação também se mostraram bem correlacionadas ao padrão cicatricial observado (PATTANAYAK; SUNITA, 2008).

O extrato bruto de *Arrabidaea chica* (crajiuru) mostrou potencial cicatrizante através da estimulação do crescimento de fibroblastos de maneira dose-dependente, e aumento da produção de colágeno *in vitro* e *in vivo*. A aplicação tópica desse extrato em feridas cutâneas de ratos reduziu o tamanho da lesão em 96%, enquanto o controle salina mostrou taxa de cicatrização de apenas 36% (JORGE et al., 2008).

Os efeitos de *Aloe ferox* e *Aloe arborescens* foram avaliados sobre a cicatrização tópica em ratos e coelhos, utilizando-se sucos preparados a partir de suas folhas. Além disso, foram realizados testes de toxicidade cutânea em peles íntegra e lesionada. Os resultados indicaram propriedades terapêuticas das formulações em estudo, incluindo aceleração do processo cicatricial, inibição seletiva do crescimento de micro-organismos e ausência de efeitos irritantes sobre a pele (JIA; ZHAO; JIA, 2008).

Estes resultados demonstram o amplo potencial de plantas medicinais com atividade cicatrizante para o tratamento de lesões cutâneas.

2.5 *Lippia sidoides* Cham.

Lippia sidoides Cham. pertence à família Verbenaceae e é conhecida popularmente como alecrim-pimenta, alecrim-grande e estrepacavalo (Figura 7). É uma planta arbustiva, caducifolia, ereta, com caule quebradiço muito ramificado, própria da vegetação do semi-árido nordestino, comum na caatinga entre Mossoró-RN e Tabuleiro do Norte-CE. Apresenta folhas aromáticas e picantes, opostas, simples e pecioladas; flores muito pequenas, esbranquiçadas, reunidas em espigas de eixo curto; e frutos extremamente pequenos, produzindo sementes diminutas que raramente germinam (LORENZI; MATOS, 2002; MATOS, 2007).

L. sidoides é uma das plantas selecionadas pelo projeto Farmácias Vivas da Universidade Federal do Ceará (MATOS, 2002). Após sua introdução nos programas de fitoterapia social em atenção primária à saúde, passou a ser cultivada em vários estados do Brasil em escala industrial. Pode ser multiplicada por estaquia, usando-se os ramos mais finos. As mudas devem ser protegidas contra dessecação durante as primeiras

semanas e plantadas após um a dois meses com espaçamento de três a quatro metros, evitando excesso de água durante a rega (MATOS, 2007).



Figura 6. *Lippia sidoides* Cham.

Fonte: LORENZI; MATOS, 2002.

Na medicina popular, *L. sidoides* tem sido recomendada para uso externo, na forma de infusão alcoólica preparada por maceração das folhas em álcool. O chá ou tintura diluída em água, por ocasião do uso, tem aplicação local em gargarejos, limpeza de ferimentos, lavagens da pele, couro cabeludo, mucosas e também como desodorante dos pés e axilas, ativo contra vários tipos de agentes infecciosos. As folhas também podem ser usadas diretamente como se fossem pastilhas para tratamento de dores de garganta e inflamação das gengivas, e ainda para preparação de sabonete líquido (MATOS, 2002; MATOS et al., 2004). As mesmas preparações podem ser feitas com óleo essencial extraído de suas folhas por hidrodestilação (MATOS, 2002)

O óleo essencial de *L. sidoides*, com rendimento de até 6%, é constituído principalmente de timol, α -felandreno, β -cariofileno, p-cimeno, mirceno, carvacrol, acompanhados de outros constituintes minoritários. O timol, potente anti-séptico pertencente ao grupo fenol, é o constituinte mais abundante, podendo seu teor atingir 73,1%. Dentre os componentes fixos não-voláteis isolados dos extratos etanólicos do caule e folhas e que não são registradas para o óleo essencial, constam flavonóides, naftoquinóides (quinonas), lignanas e outros, que também contribuem para as atividades biológicas dessa planta (MATOS et al., 2004; GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005).

Os usos populares de *L. sidoides* têm amplo apoio experimental em termos de atividade antimicrobiana, sendo timol e carvacrol os principais responsáveis por essa atividade (GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005). Neste contexto, é relatada sua utilização como antibacteriano, antifúngico e anti-helmíntico (MATOS et al., 2004).

Ensaios *in vitro* com o óleo essencial de *L. sidoides* demonstraram um largo espectro de inibição, abrangendo bactérias Gram positivas e negativas, incluindo-se entre elas várias espécies como *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp (AGUIAR; MATOS; MOURA, 1984; BARA; VANETTI, 1998; BERTINI et al., 2005). Além disso, mostrou redução significativa do número de colônias de *Streptococcus mutans* presente na saliva de humanos (BOTELHO et al., 2009).

O potencial antifúngico do óleo essencial foi demonstrado para *Microsporium canis* e *Candida* spp., com concentração fungicida mínima variando de 9 a 150 mg/L e 1250 a 5000 mg/L, respectivamente. Em relação aos efeitos toxicológicos, verificou-se que a administração aguda do óleo essencial de *L. sidoides* até 3 g/kg, por via oral, em camundongos foi desprovida de toxicidade evidente, assim como a administração oral desse óleo (117,95 mg/kg/dia) em ratos por 30 dias não induziu alterações histológicas, hematológicas e bioquímica séricas significativas (FONTENELLE et al., 2007).

Os efeitos do óleo essencial de *L. sidoides* contra nematóides gastrointestinais de ovinos infectados naturalmente foram avaliados, *in vivo*, através da contagem de ovos por grama de fezes e pela identificação e contagem de parasitas adultos no abomaso e intestino dos animais. Sete dias após tratamento oral, o óleo essencial nas doses de 230 e 283 mg/kg e a droga de referência ivermectina mostraram eficácia de 38%, 45,9% e 40,2%, respectivamente. Quatorze dias após o tratamento, essa eficácia foi de 30%, 54% e 39,6%, respectivamente. À necropsia, o óleo essencial revelou-se eficaz contra *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008).

O óleo essencial de *L. sidoides* e seu hidrolato mostraram ação larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*, causando mortalidade quase instantânea das larvas. O timol foi identificado como o princípio ativo responsável por essa ação, causando 100% de mortalidade larval na menor concentração testada (0,017%) (CARVALHO et al., 2003).

A atividade contra protozoários do gênero *Leishmania* foi verificada em extratos de *L. sidoides*, observando-se efeito lítico superior a 90% em cultura de *L. braziliensis* em macrófagos peritoneais de camundongos. O efeito leishmanicida *in vitro* foi verificado para formas promastigotas e amastigotas do parasita (FAÇANHA et al., 1995).

O óleo essencial de *L. sidoides* (0,5%) associado com extrato de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão), na forma de gel, demonstrou atividade anti-inflamatória e antibacteriana em modelo experimental de periodontite. Esse tratamento reduziu a atividade da mieloperoxidase e inibiu a produção de TNF- α e IL-1 β no tecido gengival de ratos, bem como preveniu o crescimento de patógenos orais (BOTELHO et al., 2007). Colutórios preparados à base do óleo essencial de *L. sidoides* reduziu a placa bacteriana e gengivite em humanos, com resultados semelhantes à clorexidina (BOTELHO et al., 2009) e impediu a progressão da doença periodontal em cães, com redução significativa dos escores clínicos gengivais (GIRÃO et al., 2003).

O óleo essencial mostrou potencial gastroprotetor e anti-inflamatório tópico quando utilizado em diferentes concentrações, provavelmente devido à sua atividade antioxidante (MONTEIRO et al., 2007), além de propriedades imunomoduladoras, suprimindo as respostas imunes humoral e celular (LEITE, 2003).

Os efeitos citotóxicos de componentes isolados de *L. sidoides* revelaram eficácia dessa planta em estudos antitumorais, *in vitro*, contra células leucêmicas humanas (NASCIMENTO et al., 2000). Uma amostra do óleo essencial de *L. sidoides*, contendo predominantemente carvacrol e p-cimeno, apresentou atividade antiespasmódica, além de propriedades miorelaxantes e cardio-estimulantes (GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005). Ressalta-se ainda uma discreta atividade virucida, *in vitro*, observada em óleos essenciais de outras espécies do gênero *Lippia* (GARCÍA et al., 2003).

Apesar de diversas propriedades terapêuticas comprovadas, não foram verificados na literatura relatos que comprovem o efeito cicatrizante do óleo essencial de *L. sidoides*. Por outro lado, estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram propriedades irritantes desse óleo quando utilizado *in natura*.

2.6 *Caryocar coriaceum* Wittm.

Caryocar coriaceum Wittm. é uma espécie arbórea, pertencente à família Caryocaraceae, conhecida popularmente por pequizeiro, e seu fruto, pequi (Figura 8). Apresenta tronco grosso com até dois metros de circunferência e 12 a 15 metros de altura, revestido de casca escura, com galhos grossos, compridos e inclinados. Tem folhas opostas com folíolos ovais, verde-luzentes. As flores com coloração amarelo intenso e estames vermelhos são grandes e estão reunidas em cachos terminais. O fruto (pequi) é globoso, do tipo drupóide, formado por um epicarpo (casca) verde-amarelado, que recobre de um a quatro pirênios, conhecidos como caroços; o mesocarpo oleaginoso divide-se em externo (coriáceo carnoso) e interno (parte comestível amarelo-carnoso ou polpa), envolvendo o endocarpo lenhoso com espinhos delgados e agudos, sob o qual está a amêndoa branca ou semente, carnosa e também oleaginosa (Figura 9). O conjunto mesocarpo interno, endocarpo espinhoso e semente constituem o pirênio (SILVA; MEDEIROS-FILHO, 2006; MATOS, 2007).



Figura 7. *Caryocar coriaceum* Wittm.

Fonte: OLIVEIRA et al., 2008.



Figura 8. Fruto de *Caryocar coriaceum* Wittm.

Fonte: OLIVEIRA et al., 2008.

A área de ocorrência desta espécie compreende os cerrados do Ceará, Piauí, Tocantins, sul do Maranhão e norte da Bahia. Outras espécies que ocorrem no Brasil e têm os mesmos usos desta espécie são *Caryocar brasiliensis* Camb., em Goiás e Minas Gerais, *Caryocar villosum* Pers., o pequiá, e *Caryocar glabrum*, a equirana, própria da Amazônia (MATOS, 2007). A maioria das informações disponíveis na literatura refere-se à espécie *C. brasiliensis*, as quais auxiliam na compreensão das características e propriedades de *C. coriaceum*, em virtude da proximidade genética entre essas duas espécies (OLIVEIRA et al., 2008).

C. coriaceum exerce importante papel sócio-econômico na Chapada do Araripe e sertões vizinhos do Ceará, Pernambuco e Piauí. A polpa e amêndoa do pequi são altamente nutritivas e constitui-se em valioso recurso alimentar para a população dessas regiões. A principal utilização do fruto é o consumo direto do “caroço” em forma de “pequizada”, em cozidos de carne bovina e frango, no feijão e arroz. A polpa é utilizada na produção de geléias, doces e ração para animais. Da polpa fermentada, é produzido

um tipo de licor bastante apreciado em algumas regiões do país (OLIVEIRA et al., 2008). A amêndoa é utilizada como ingrediente de farofas e paçocas, além de ser consumida salgada como petisco (De LIMA et al., 2007).

No período da safra, que ocorre entre dezembro e abril, no Ceará, famílias inteiras da região do Cariri deixam suas casas e sobem à Chapada do Araripe para o trabalho de coleta dos frutos e extração, por fervura em água, do óleo de pequi, obtido da polpa do fruto, para comercialização ou para própria alimentação. O óleo é negociado nas feiras e casas de comércio da região, sendo adquirido geralmente para fins medicinais e culinários. Ao fim da safra, grande quantidade de amêndoas (sementes) é deixada no local ou também submetida à extração de óleo (MATOS, 2007).

Relata-se a utilização do óleo do pequi na indústria de cosméticos, para formulações de cremes (PIANOVSKI et al., 2008), na produção de sabões, além de potencial na produção de combustíveis (biodiesel) e lubrificantes (OLIVEIRA et al., 2008). Por suas características e aroma especial, o óleo do pequi despertou interesse de indústrias estrangeiras de chocolates finos, uma das quais mantém área preservada no Piauí para obtenção da matéria-prima (MATOS, 2007). No entanto, não existe cultivo comercial de pequizeiro, e a sua exploração é, ainda, puramente extrativista. Sua madeira, de cor castanho-amarelada, também tem sido empregada para diversos usos, como berço de moendas, além de aplicações na construção civil e naval, em virtude de sua resistência. A casca, por meio de maceração, produz uma tintura castanho-escura, que é utilizada no tingimento artesanal (OLIVEIRA et al., 2008).

A análise da composição química de *C. brasiliensis* revelou que a polpa apresenta alto teor de umidade (41,50%), além de lipídios (33,4%), carboidratos (11,45%), fibras (10,0%) e proteínas (3,0%). A amêndoa, por sua vez é rica em lipídios (51,51%), apresentando em sua composição proteínas (25,27%), carboidratos (8,33%), fibra alimentar (2,2%) e baixo teor de umidade (8,68%) e elevado teor elevado de minerais representado pelas cinzas (4,0%) (De LIMA et al., 2007). A polpa e semente do pequi representam apenas 25% do fruto. Embora o epicarpo (casca) represente a maior parte do pequi (75%), há poucos estudos sobre esta parte do fruto, provavelmente por ser um resíduo rejeitado pela população (ROESLER et al., 2007).

O fruto do pequizeiro apresenta alto teor de carotenóides (AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004), sendo que seu aroma mostrou-se constituído, quase exclusivamente, pelo éster hexanoato de etila (MATOS, 2007). A polpa do pequi contém cerca de 62% de óleo comestível com alto teor de vitaminas A e

C, enquanto a amêndoa fornece, por extração com solvente, 42% de óleo fixo (MATOS, 2007). Na composição dos óleos da polpa e amêndoa do pequi, verifica-se a presença de ácidos graxos saturados e insaturados, como o palmítico, oléico, mirístico, palmitoléico, esteárico, linoléico, linolênico, dentre outros (MARX; ANDRADE; MAIA, 1997; SEGALL et al., 2006; De LIMA et al., 2007).

C. brasiliensis possui alto conteúdo de fenóis totais (209 g equivalentes de ácido gálico/kg) e atividade de varredura contra o radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) com IC₅₀ de 9,44 µg/mL e 17,98 µg/mL para o extrato aquoso e etanólico da casca do fruto, respectivamente, demonstrando, assim, excelente atividade antioxidante (ROESLER et al., 2007). A caracterização dos componentes bioativos responsáveis por essa atividade revelou a presença de potentes antioxidantes, tais como ácido gálico, ácido quínico, quercetina e quercetina-3-O-arabinose (ROESLER et al., 2008).

O óleo extraído da polpa e da amêndoa do pequi é utilizado na medicina popular como anti-inflamatório, no tratamento de gripes, bronquites e infecções bronco-pulmonares, tornando-se deste modo de grande importância na farmacopéia popular. Refere-se também ao emprego externo do óleo em curativos de pequenos ferimentos e, na forma de compressas e massagens, nos casos de dores musculares e reumáticas, contusões e em massagens fisioterápicas (SILVA; MEDEIROS-FILHO, 2006; MATOS, 2007; OLIVEIRA; CARTAXO; SILVA, 2007).

Os efeitos gastroprotetores do óleo da polpa de *C. coriaceum*, avaliados em modelos de úlcera gástrica induzida por etanol em camundongos, nas doses de 200 e 400 mg/kg demonstraram inibição da lesão em 60,5% e 57,0%, respectivamente (LEITE et al., 2009). Em modelo de úlcera induzida por aspirina, esse óleo mostrou inibição das lesões gástricas em 69,3% e 50,5%, nas respectivas concentrações. O efeito gastroprotetor do óleo de *C. coriaceum* ocorre, em partes, através de mecanismos que envolvem α_2 -receptores, prostaglandinas endógenas, óxido nítrico e canais K⁺ ATP. O pré-tratamento dos camundongos com indometacina suprimiu esse efeito (da SILVA QUIRINO et al., 2009).

C. brasiliensis tem sido relatada por possuir atividade antifúngica. Os óleos fixos da semente e da amêndoa dessa planta mostraram bioatividade elevada em testes de susceptibilidade *in vitro* sobre isolados de *Cryptococcus neoformans* (PASSOS et al., 2002). O óleo essencial obtido das sementes, por sua vez, além de inibir 24% das cepas

de *C. neoformans* (MIC $\leq$ 250 μ g/mL), apresentou atividade inibitória contra cepas patogênicas de *Paracoccidioides brasiliensis* (MIC: 500 μ g/mL) (PASSOS et al., 2003).

Ensaio *in vitro* com extrato hidroetanólico das folhas de *C. brasiliensis* demonstraram atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Além disso, o extrato apresentou efeito leishmanicida, inibindo a proliferação de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* de maneira dose-tempo-dependentes, sendo esse efeito superior àquele da droga de referência glucantime. Ressaltou-se, ainda, potencial antioxidante do extrato, com atividades similares à vitamina C e rutina (PAULA-JUNIOR et al., 2006).

O extrato etanólico obtido das folhas e casca do caule de *C. brasiliensis* mostrou atividades moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário esquistossomose (BEZERRA et al., 2002) e tripanocida *in vivo*, reduzindo a parasitemia do *Trypanosoma cruzi* em camundongos infectados por via intraperitoneal (HERZOG-SOARES et al., 2002). O extrato aquoso, por sua vez, apresentou efeito protetor sobre a clastogenicidade induzida por ciclofosfamida, provavelmente, devido às propriedades antioxidantes dessa planta (KHOURI et al., 2007).

Apesar do amplo e bem conceituado uso popular, são escassos na literatura dados sobre as atividades biológicas do pequizeiro, sobretudo da espécie nordestina *C. coriaceum*, incluindo seu potencial anti-inflamatório e cicatrizante.

3 JUSTIFICATIVA

A utilização de substâncias que promovam efeitos anti-inflamatórios e a cicatrização de feridas, ocasionadas por doenças cutâneas, traumas ou mecanicamente induzidas, são essenciais para manutenção da saúde e bem-estar animal. Esses efeitos são promovidos basicamente pelo uso de drogas anti-inflamatórias esteróides e não-esteróides, que podem causar vários efeitos colaterais, ou pelo uso de formulações tópicas como pomadas e cremes antibacterianos e reepitelizantes, que algumas vezes são pouco eficazes.

A utilização de plantas medicinais e seus subprodutos na medicina popular com essas potencialidades terapêuticas tem despertado interesse junto à vários pesquisadores. A variedade de preparações fitoterápicas disponíveis comercialmente é relativamente grande, sendo necessária a validação científica dessas preparações para evitar o uso indevido de determinados produtos, que possam ser prejudiciais aos mecanismos de defesa, por serem irritativos ou estimularem a formação de tecido de granulação exuberante.

Apesar de diversas atividades terapêuticas comprovadas, são necessárias pesquisas que validem os efeitos do óleo essencial de *L. sidoides* e óleo fixo de *C. coriaceum* sobre a inflamação tópica e cicatrização, verificando-se a ausência de efeitos colaterais e, assim, seja possível indicar seus usos para posteriores ensaios clínicos em Medicina Veterinária.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. e o óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm. possuem atividades anti-inflamatória tópica e cicatrizante.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* e do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* sobre a inflamação tópica e a cicatrização cutânea em modelos experimentais *in vivo*.

5.2 Objetivos específicos

Analisar microbiologicamente e determinar a composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides* e do óleo fixo de *Caryocar coriaceum*;

Avaliar, *in vivo*, os efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* e do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* sobre a inflamação tópica através do modelo de edema de orelha induzido por xileno em camundongos;

Verificar, *in vivo*, os efeitos do óleo essencial de *Lippia sidoides* e do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* sobre a cicatrização através do modelo de feridas por excisão em ratos e camundongos, utilizando parâmetros morfométricos e histológicos.

6 CAPÍTULO I

ARTIGO

IN VIVO TOPICAL ANTI-INFLAMMATORY AND WOUND HEALING ACTIVITIES OF THE FIXED OIL OF *Caryocar coriaceum* Wittm. SEEDS.

(Atividades anti-inflamatória tópica e cicatrizante do óleo fixo das sementes de
Caryocar coriaceum Wittm.)

Artigo submetido ao periódico: Journal of Ethnopharmacology

Maria Liduína M. de Oliveira^a; Diana C. S. Nunes-Pinheiro^{a*}; Adriana R. Tomé^b; Érika
F. Mota^c; Islene A. Lima-Verde^a; Francisco G. M. Pinheiro^d; Cláudio C. Campello^a;
Selene M. de Moraes^{a,e}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Brazil

^bFaculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Brazil

^cDepartamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Brazil

^dDepartamento de Física, Universidade Estadual do Ceará, Brazil

^eLaboratório de Química de Produtos Naturais, Universidade Estadual do Ceará, Brazil

*Corresponding author: Tel: +55 85 32270804; Fax: + 55 85 31019860.

E-mail address: diana@uece.br (D.C.S. Nunes-Pinheiro).

IN VIVO TOPICAL ANTI-INFLAMMATORY AND WOUND HEALING ACTIVITIES OF THE FIXED OIL OF *Caryocar coriaceum* Wittm. SEEDS.

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae), popularly known as pequi, is important source of food and used in the folk medicine as wound healing, anti-inflammatory and for the treatment of diseases of the respiratory tract, rheumatic and muscular pains and gastric ulcer.

Aim of the study: To evaluate the effects of fixed oil of *C. coriaceum* (FOCC) on the topical inflammation and cutaneous wound healing.

Materials and methods: FOCC was purchased commercially and used in nature on model of ear edema induced by xylene and ointments formulations at 6 and 12% on wound excision model in mice. Skin lesions were evaluated by planimetry and histological analysis.

Results: FOCC inhibited the ear edema in 38.01 and 39.20% at time 15 min and 1 hour, respectively, after induction of inflammation, when compared to the positive control. The topical administration of FOCC ointment 12% showed a significantly reduction of unhealed wound area, with increased percentage of wound contraction (96.54%) on day 7 when compared to the others groups. The results of histological evaluation supported the outcome of excision wound model.

Conclusion: *C. coriaceum* inhibits the topical inflammation and accelerate cutaneous wound repair.

Keywords: *Caryocar coriaceum*, pequi, fatty acids, wound healing, topical inflammation.

1. Introduction

The genus *Caryocar* L. comprises 16 species and belongs the Caryocaraceae, a small family with occurrence in Central and South America. *Caryocar coriaceum* Wittm. grows naturally in dry plains areas of Northeastern Region of Brazil as Araripe Region, Ceará State. It is a tree, which has a thick trunk about 2 m of diameter and 12 to

15 m high, popularly known as pequi, an indigenous word that means your endocarp is covered by numerous slender thorns (Matos, 2007).

Together with other species, such as *C. villosum* and *C. brasiliensis*, *C. coriaceum* is economically exploited by the regional population as an oil source. The oil content of the pulp and seeds of pequi fruit furnish edible fats of potential commercial value for cooking, substitute for butter, cosmetics industry (Pianovski et al., 2008) and as home-made soaps for washing clothes. In the folk medicine, the fruit pulp and seed oils of *C. coriaceum* have been used as wound healing, anti-inflammatory, for the treatment of diseases of the respiratory tract, including cough, bronchial affections and asthma (Matos, 2007) and gastric lesions induced experimentally (Leite et al., 2009; da Silva Quirino et al., 2009). It also refers to use of oil, in the form of compresses and massage, for treatment of rheumatic and muscular pains (Matos, 2007). Moreover, the seed and leaf essential oils of the species *C. brasiliensis* were previously reported to have antifungal activity against *Cryptococcus neoformans* and *Paracoccidioides brasiliensis* (Passos et al., 2003) and contains many compounds with antioxidant properties (Roesler et al., 2008).

The pulp plus seed represents just 25% of the fruit, while the epicarp (peel) represents resting 75% (da Silva Quirino et al., 2009). The pulp of the pequi fruit has approximately 41% of humidity, 33% of lipids, 3% of proteins, 10% of alimentary fiber and 11% of carbohydrates. On the other hand, the endocarp (seed) is rich in lipids (51.51%) and has 25.27% of proteins, 8.33% of carbohydrates, and 2.2% of fiber, with low moisture content (8.68%). Both in the pulp and seeds of pequi, may be verified a predominance of unsaturated fatty acids (UFA), as oleic acid, which is present in higher concentration (de Lima et al., 2007).

Wound healing can be modulated by UFAs, which exert major functions on inflammatory responses (Cardoso et al., 2004). Wound repair is the process that follows injury to the skin, which is initiated by an inflammatory response and the cells below the dermis begin to increase collagen production. Later, the epithelial tissue is regenerated (Wilgus, 2008).

In order to evaluate the action spectrum of *Caryocar coriaceum* and validate its widespread use, pharmacological studies were performed regarding topical inflammation and skin wound healing in mice, using the seed fixed oil of pequi fruit.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The fixed oil from the seeds of *C. coriaceum* (FOCC) was purchased commercially in September 2008, from St. Sebastian Market, a local market in Fortaleza, Ceará State, Brazil.

2.2. Analysis of fixed oil *C. coriaceum*

The FOCC was used for transesterification reactions according to methodology described by Lima et al. (2007). The vegetable oil (25 g) was transesterified in the presence of methanol (7 mL) using KOH (0.25 g) as catalyst. The reaction mixtures were kept under magnetic stirring for 40 min. After separation of glycerol in a separatory funnel, the top esters layer was washed six times with distilled water to remove the impurities and then was heated at 110 °C for drying of esters.

The recovered methyl esters were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry, using a Shimadzu 5050 GCMS-QP instrument under the following conditions-column: W Scientific DB-5MS fused silica capillary column (50 m x 0.25 mm); carrier gas: He (1 mL/min); injector temperature: 250 °C; detector temperature: 200 °C; column temperature: 35–180 °C at 4 °C/min and then 250 °C/15 min; mass spectrum: electronic impact 70 eV. The identification of the constituents was performed by a computer-based library search, retention indices and visual interpretation of the mass spectra (Alencar et al., 1984; Adams, 1989).

FOCC microbiological analysis was performed to verify a possible contamination of this oil. FOCC (0.1 mL) was cultured in Nutritive Broth for bacteria 48 h at 35 °C and Potato Dextrose Broth for fungi 72 h at 30 °C. A part of each suspension (0.1 mL) was spread on Nutritive Agar and Potato Dextrose Agar medium for bacteria and fungi, respectively, and incubated under the same initial conditions (Downes and Ito, 2001).

2.3. Animals

Male Swiss albino mice, weighing 25-30 g, were used for the experiment. They were individually housed in clean polyethylene cages under standard experimental conditions of humidity (40-45%), temperature (23-25 °C), 12 h light/dark cycle and fed on normal pellet diet and water *ad libitum*. The experimental protocol was approved by

Ethics Committee for Use of Animals of the State University of Ceará (protocol no. 08475595-4).

2.4. Topical anti-inflammatory activity

2.4.1. Topical inflammation induced by xylene

The inflammatory activity was evaluated by using model of xylene-induced ear edema in mice according to Kou et al. (2005) with some modifications. The animals were randomly allocated to groups G1 to G5, each group consisting of five animals, as follows: G1 received only xylene (positive control); G2 received only FOCC (50 μ L) in nature (negative control); G3 received FOCC in nature (50 μ L) applied topically immediately after xylene; G4 and G5 received dexamethasone (2.5 mg/kg) and indomethacin (5 mg/kg) orally for 3 days, respectively. One hour after last oral treatment of mice, xylene was applied. The edema was induced by topical application of xylene (50 μ L) on the inner and outer surfaces of the right ear lobe. The left ear was considered as control. Fifteen minutes or one hour after induction of inflammation, the mice were euthanized by overdose of ether anesthesia and both ears were removed. Circular sections were taken, using a cork borer with a diameter of 5 mm, and weighed. The edematous response was measured as the weight difference between the right and left ears. The anti-inflammatory activity was expressed as a percentage of the inhibition of edema in treated mice in comparison to positive control mice (Luo et al., 2008).

2.5. Wound healing activity

2.5.1. Excision wound model

Mice were randomly divided into five groups (T1 to T5) of six animals each group. T1 and T2 were treated with FOCC ointment 6% (v/w) and 12% (v/w), respectively. T3 was the control group which received solid ointment vehicle (vaseline and lanolin - 1:2) (Dalazen et al., 2005). T4 was treated with reference drug (5% w/w clostebol acetate and neomycin sulphate cream) for positive control, and T5 received 0.9% saline for negative control.

Mice were anesthetized by the open mask method with diethyl ether and their dorsal surface was shaved with a sterile blade (Gurung and Skalko-Basnet, 2009). Shaved area was disinfected with povidone-iodine. Four similar circular wounds were created by excising the skin with a 5 mm punch biopsy instrument on the dorsal region

of each mouse at a distance of about 2.5 cm among wounds (Tramontina et al., 2002). The wounds were left undressed to the open environment and observed daily. The treatments were applied topically once a day, starting from the wound induction until complete healing in enough quantity to cover all wounds.

2.5.2. Planimetry

Planimetry was performed on days 0, 3, 7 and 14 on anaesthetized animals (Dalazen et al., 2005). The anesthesia protocol used to create the wounds was repeated. Contractions, which contribute for wound closure, were studied by tracing the raw wound. The wound area on each evaluation day was obtained by tracing the perimeter of the wound onto a sterile piece of clear acetate film with a special marking pen. The wound and one piece of millimeter paper with known area (1 cm^2) were digitalized using a scanner. The measuring area was obtained comparing the amount of pixels inside perimeter and inside the known area using the mathematic expression: $W_a = (K_a * N_w) / N_k$, where W_a = wound area, K_a = known area, N_w = number of pixels inside wound area and N_k = number of pixels inside know area. Thus, the unhealed wound area and the percentage of wound contraction were calculated (Gul et al., 2008) and used for statistical analysis.

2.5.3. Histological evaluation

Skin specimens from different wounds of each mouse were collected on days 3, 7 and 14 immediately after the planimetry was performed. The specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin, processed and blocked with paraffin. Five-micrometre sections were cut and stained with haematoxylin-eosin. In every skin section, an area just beneath the epidermis or crust formation was randomly selected. Thereafter, three consecutive areas moving towards the deep dermis were selected. The tissues were qualitatively assessed under the light microscope at $\times 400$ magnification and graded as absent (-), mild (+), moderate (++) and severe (+++) for epidermal or dermal re-modeling. Re-epithelization, ulceration and necrosis in epidermis; congestion, edema, fibroblast proliferation, mononuclear and polymorphonuclear cells and neovascularization in dermis were analyzed to score the epidermal or dermal re-modeling (Akkol et al., 2009). All histological sections were blindly evaluated by the same investigator.

2.6. Statistical analysis

Data were initially submitted to Shapiro-Wilk and Bartlett tests to confirm normal distribution and homogeneity of variance, respectively. Inhibition of edema (%), unhealed wound area and wound contraction presented both requirements for ANOVA, which was carried out using GLM procedure of SAS (1999), followed by SNK test for comparison of means. Ear weight differences between treated and non-treated groups at different times (topical inflammation test) did not show homocedasticity and then were compared by nonparametric Kruskal-Wallis test. Differences were considered to be significant when $P < 0.05$ and results were expressed mean $\pm$ standard error of means (S.E.M).

3. Results

Chemical analysis of FOCC is displayed in Table 1. The main constituents were methyl oleate (57.15%) and methyl hexadecanoate (35.53%), which are fatty acid methyl esters of oleic acid and palmitic acid, respectively.

In relation to the microbiological analysis of FOCC, there was no growth for bacteria and fungi, confirming the good quality of oil.

The results of the acute model of inflammation, presented in Table 2, showed that the FOCC significantly inhibited the ear edema. FOCC at times 15 min or 1 h after induction of inflammation reduced the edema in 38.01 and 39.20%, respectively, when compared to the positive control. Dexamethasone and indomethacin, the reference drugs, showed a 94.57 and 90.95% of inhibitory effect at time 15 min and inhibition of edema of 92.0 and 86.40% at time 1 h after induction of inflammation, respectively.

In the model of healing, wounds appeared clean and free of exudate throughout the study in all groups. The granulation tissue formation, in all groups, was easily noticeable at wound edges on day 3. All wounds reduced in size in parallel to wound healing. The effect of the FOCC on the wound healing in mice is shown in Table 3. On day 3, the smallest unhealed area was verified in the groups T2 and T5 with percentage of wound contraction of 48.63% and 52.33%, respectively. On day 7, the percentage of wound contraction was significantly higher in the group T2 (96.54%) when compared to others groups that showed similar results. On day 14, all wounds were closed and completely re-epithelialized.

Following histological examination, evaluated and scored results were summarized and presented in Table 4. For demonstrating of wound healing process,

illustrative figures (Figs. 1-2) were also added. On day 3, the groups T2 and T4 showed a higher re-epithelialization capacity when compared to the other groups. On day 7, although wound still no were completely healed, it was verified presence of re-epithelialization and ausence of ulceration in all groups. Generally, the main activity verified was the proliferation of fibroblasts on day 7, while the angiogenesis was intense in all groups, except to group T5 (negative control), on day 14. It was observed that neither the treatments induced congestion and necrosis on the wound areas during period of the study.

4. Discussion and conclusion

The fatty acids composition of FOCC indicated the presence of oleic (57.15%), palmitic (35.53%), stearic (4.0%) and linoleic (2.38%) acids. In other studies, the main components of *C. villosum* oil were oleic (29.5%) and palmitic (33.5%) acids (Marx et al., 1997) and *C. brasiliensis* oil were oleic (51.7%), palmitic (44.2%) and linoleic (4.43%) acids (Segall et al., 2006). The fatty acid composition is important in terms of both the functional and nutritional characteristics of the oils.

Fatty acids have important roles in immune and inflammatory responses (Cabral, 2005). They are fuels for generation of energy; components of cell membrane phospholipids; covalent modifiers of protein structure; regulators of gene expression; precursors for synthesis of bioactive lipid mediators such a source of second messenger molecules and substrates for the synthesis of molecules as prostaglandins, thomboxanes, leukotrienes and lipoxins (Calder, 2007).

The topical application of FOCC was capable of reducing inflammation in xylene-induced ear acute edema (Table 2). The xylene is a flogistic agent, promoter neurogenic inflammation that act on target cells in the periphery such as mast cells, immune cells, and vascular smooth muscle producing inflammation, which is characterized by redness and warmth, swelling, and hypersensitivity. The inflammatory symptoms result from the release of substances from primary sensory nerve terminals (Richardson and Vasko, 2002). In others models of topical inflammation, the pulp and seed fixed oils of *C. coriaceum* presented significant inhibitory activity of ear edema induced by croton oil (Saraiva et al., 2008) and arachidonic acid (Saraiva et al., 2009). This results may be attributed the presence of UFAs in this oil.

In this present study, we evaluated the effect of FOCC on cutaneous wound healing. The topical administration of FOCC ointment 12% accelerate the wound repair,

which was confirmed by histological analysis (Table 3 and 4). On the other hand, the ointment vehicle presented similar activity in relation to reference drug treatment. Lanolin has been related exert a positive effect on wound healing process (Martins et al., 2005). Our results suggest that the effect of FOCC on the wound healing should be associated to high levels of n-9 UFA in this oil, which may be either due to their individual or additive effects to others UFAs present in it. Recently, da Silva Quirino et al. (2009) showed that pulp oil of *C. coriaceum* increased contraction of wound when compared with the control group.

Wound repair is a complex, integrated series of biochemical, cellular and physiological process. There are three stages this process: inflammation, proliferation and remodeling. In the inflammatory phase, polymorphonuclear leukocytes and lymphocytes are attracted by soluble mediators that will facilitate adhesion to the endothelium and transmigration and play a key role by secreting cytokines and a great variety of growth factors. The proliferative phase is characterized by angiogenesis, collagen deposition, epithelialization and wound contraction, while the remodeling phase is characterized by remodel of collagen and others extracellular matrix proteins to form mature scar tissue (Wilgus, 2008).

Monounsaturated and polyunsaturated fatty acids are present in plasma membranes, which are capable of stimulating cellular proliferation and angiogenesis, thus exert an important role in the process of healing. Cardoso et al. (2004) observed that the topical administration of linolenic (n-3) and linoleic (n-6) acids essential and oleic (n-9) acid nonessential fatty acids modulate the closure of surgically induced skin wounds. It was observed that n-9 fatty acids induced faster wound closure when compared to n-3, n-6 and control. However, the use of n-3 (McDaniel et al., 2008) and n-6 (Pereira et al., 2008) fatty acid may increase pro-inflammatory cytokines production in wounds sites, stimulating the cutaneous wound healing process.

In conclusion, fixed oil *C. coriaceum* inhibit the topical inflammation and accelerate cutaneous wound repair. These data validate its widespread use and suggest a potential therapeutic implication on immune system skin.

Acknowledgements

We thank the technological development park (PADETEC) for chemical analysis of *Caryocar coriaceum* fixed oil, the Carlos Chagas Laboratory for histological processing and CAPES for financial support.

References

- Adams, R.P. (Ed.), 1989. Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy: Academic Press, London, 456pp.
- Akkol, E.K., Koca, U., Pesin, I., Yilmazer, D., Toker, G., Yesilada, E., 2009. Exploring the wound healing activity of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. by *in vivo* models. Journal of Ethnopharmacology 124, 137-141.
- Alencar, W.J., Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., 1984. Kovats indices as preselection routine in mass spectra library search of volatiles. Journal of Natural Products 47, 890-892.
- Cabral, G.A., 2005. Lipids as bioeffectors in the immune system. Life Sciences 77, 1699-1710.
- Calder, P., 2007. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 77, 327-335.
- Cardoso, C.R., Souza, M.A., Ferro, E.A., Favoreto S., Pena, J.D., 2004. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. Wound Repair and Regeneration 12, 235-243.
- Dalazen, P., Molon, A., Biavatti, M.W., Kreuger, M.R.O., 2005. Effects of the topical application of the extract of *Vernonia scorpioides* on excisional wounds in mice. Brazilian Journal of Pharmacognosy 15, 82-87.
- da Silva Quirino, G., Leite, G.O., Rebelo, L.M., Tomé, A.R., Costa, J.G.M., Cardoso, A.H., Campos, A.R., 2009. Healing potential of pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. Phytochemistry Letters 2, 179-183.
- de Lima, A., Silva, A.M.O., Trindade, R.A., Torres, R.P., Mancini-Filho, J., 2007. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). Revista Brasileira de Fruticultura 29, 695-698.
- Downes, F.P., Ito, K. (Ed.), 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th edition. American Public Health Association, Washington, 676pp.
- Gul, N.Y., Topal, A., Cangul, T., Yanik, K., 2008. The effects of topical tripeptide copper complex and helium-neon laser on wound healing in rabbits. Veterinary Dermatology 19, 7-14.

- Gurung, S., Skalko-Basnet, N., 2009. Wound healing properties of *Carica papaya* latex: *In vivo* evaluation in mice burn model. *Journal of Ethnopharmacology* 121, 338-341.
- Kou, J., Sun, Y., Lin, Y., Chen, Z., Zheng, W., Yu, B., Xu, Q., 2005. Anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Radix Ophiopogon japonicas* and its two constituents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28, 1234-1238.
- Leite, G.O., Penha, A.R.S., da Silva Quirino, G., Colares, A.V., Rodrigues, F.F.G., Costa, J.G.M., Cardoso, A.L.H., Campos, A.R., 2009. Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. *Journal of Young Pharmacists* 1, 54-56.
- Lima, J.R.O., Silva, R.B., Silva, C.C.M., Santos, L.S.S., Santos-Júnior, J.R., Moura, E.M., Moura, C.V.R., 2007. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. *Química Nova* 30, 600-603.
- Luo, P., Zhang, Z., Yi, T., Zhang, H., Liu, X., Mo, Z., 2008. Anti-inflammatory activity of the extracts and fractions from *Erigeron multiradiatus* through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 232-237.
- Martins, E.F., Pereira, L.M., Lima, T.M., Aguiar, G.R., Chen, S.C., Folador, A., Pithon-Curi, T.C., Curi, R., 2005. Influence of lanolin on cicatrization. *Health in Review* 7, 19-25.
- Marx, F., Andrade, E.H.A., Maia, J.G., 1997. Chemical composition of the fruit pulp and aroma of *Caryocar villosum*. *International Journal of Food Research and Technology* 204, 442-444.
- Matos, F.J.A., 2007. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. Imprensa Universitária. 3ª edição, Fortaleza, Brazil, 394p.
- McDaniel, J.C., Belury, M., Ahijevych, K., Blakely, W., 2008. Omega-3 fatty acids effect on wound healing. *Wound Repair and Regeneration* 16, 337-345.
- Passos, X.S., Castro, A.C.M., Pires, J.S., Garcia, A.C.F., Campos, F.C., Fernandes, O.F.L., Paula, J.R., Ferreira, H.D., Santos, S.C., Ferri, P.H., Silva, M.R.R., 2003. Composition and antifungal activity of the essential oils of *Caryocar brasiliensis*. *Pharmaceutical Biology* 41, 319-324.
- Pereira, L.M., Hatanaka, E., Martins, E.F., Oliveira, F., Liberti, E.A., Farsky, S.H., Curi, R., Pithon-Curi, T.C., 2008. Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. *Cell Biochemistry and Function* 26, 197-204.

- Pianovski, A.R., Vilela, A.F.G., Silva, A.A.S., Lima, C.G., Silva, K.K., Carvalho, V.F.M., Musis, C.R., Machado, S.R.P., Ferrari, M., 2008. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44, 249-259
- Richardson, J.D., Vasko, M.R., 2002. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302, 839-845.
- Roesler, R., Catharino, R.R., Malta, L.G., Eberlin, M.N., Pastore, G., 2008. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* 110, 711-717.
- Saraiva, R.A., Leite, G.O., Oliveira, R.C., Araruna, M.K.A., Menezes, K.D.P., Pereira, C.K.B., Costa, J.G.M., Campos, A.R., Menezes, I.R.A., 2008. Topical anti-inflammatory activity of *Caryocar coriaceum* Wittm.(Caryocaraceae) pulp fruit and seed oils. 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, Porto de Galinhas, Brazil, Abstracts.
- Saraiva, R.A., Sampaio, R.S., Oliveira, R.C., Menezes, K.D.P., Fernandes, C.N., Souza, H.H.F., Costa, J.G.M., Campos, A.R., Kerntopf, M.R., Menezes, I.R.A., 2009. Ação antiedematogênica do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm. no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico. IV Reunião Regional da FeSBE, Goiânia, Brazil, Abstracts.
- SAS/STAT, 1999. User's Guide. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.
- Segall, S.D., Artz, W.E., Raslan, D.S., Ferraz, V.P., Takahashi, J.A., 2006. Triacylglycerol analysis of pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) oil by electrospray and tandem mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 445-452.
- Tramontina, V.A., Machado, M.A., Nogueira Filho G.R., Kim, S.H., Vizzioli, M.R., Toledo, S., 2002. Effect of bismuth subgallate (local hemostatic agent) on wound healing in rats. Histological and histometric findings. *Brazilian Dental Journal* 13, 11-16.
- Wilgus, T.A., 2008. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. *Pharmacological Research* 58, 112-116.

Table 1. Percentage composition of the fixed oil of *C. coriaceum* obtained by gas chromatography/mass spectrometry.

Constituents		Yield (%)
Methyl esters	Fatty acid	
Methyl hexadecanoate	Palmitic acid (C16:0)	35.53
Methyl linoleate	Linoleic acid (C18:2)	2.38
Methyl oleate	Oleic acid (C18:1)	57.15
Methyl stearate	Stearic acid (C18:0)	4.00
Methyl 11-eicosenoate	11-Eicosenoic acid (C20:1)	0.93

Table 2. Topical anti-inflammatory activity of *C. coriaceum* fixed oil (FOCC) in xylene-induced ear edema in mice at 15 min or 1 h after induction of inflammation.

Treatment	15 min		1 h	
	Edema (mg)	Inhibition (%)	Edema (mg)	Inhibition (%)
Xylene (G1)	4.42±0.50 ^a	-	2.50±0.52 ^a	-
FOCC (G2)	0.14±0.05 ^e	-	0.20±0.07 ^d	-
Xylene + FOCC (G3)	2.74±0.43 ^b	38.01±9.68 ^A	1.52±0.32 ^b	39.20±12.77 ^A
Dexamethasone (G4)	0.24±0.05 ^d	94.57±1.24 ^A	0.20±0.12 ^d	92.00±4.90 ^A
Indomethacin (G5)	0.40±0.10 ^c	90.95±2.26 ^A	0.34±0.09 ^c	86.40±3.58 ^B

Results are expressed as mean ± S.E.M. (n=5).

Different small letters within the same column indicate significant difference among groups ($P<0.05$). Different capital letters within the same line indicate significant difference among times ($P<0.05$).

Table 3. Effects of *C. coriaceum* fixed oil (FOCC) on wound contraction by excision wound model.

Day	Unhealed wound area (mm ²) and wound contraction (%)				
	FOCC 6% (T1)	FOCC 12 % (T2)	Vehicle (T3)	Reference (T4)	Saline 0.9% (T5)
0	27.52±2.67 ^a	28.65±2.65 ^a	28.75±3.52 ^a	30.92±2.96 ^a	26.57±2.45 ^a
3	17.35±2.39 ^{ab}	14.63±2.06 ^{bc}	18.02±1.74 ^a	17.07±1.83 ^{ab}	12.63±1.28 ^c
	(37.11±3.54) ^B	(48.63±8.49) ^A	(36.95±5.48) ^B	(44.72±4.51) ^{AB}	(52.33±4.18) ^A
7	2.58±0.88 ^a	0.97±0.32 ^b	3.28±1.59 ^a	3.67±1.15 ^a	3.12±0.76 ^a
	(90.67±2.86) ^A	(96.54±1.42) ^B	(88.61±5.28) ^A	(88.04±3.73) ^A	(88.10±3.47) ^A
14	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)	(100.0)

Results are expressed as mean ± S.E.M. (n=6).

Different small letters within the same line indicate significant difference of unhealed wound area among groups ($P<0.05$). Different capital letters within the same line indicate significant difference of wound contraction among groups ($P<0.05$).

Table 4. Histological evaluation of wound healing process in different groups of treatment per biopsy day.

Treatment groups per biopsy day	Wound healing process						
	Ed	PMN	MNC	FP	NV	RE	U
Day 3							
FOCC 6% (T1)	++	+++	-	+++	-	-	+
FOCC 12% (T2)	+	++	-	+++	-	-/+	-/+
Vehicle (T3)	++	++	-	++	-	-	+
Reference (T4)	+	++	++	++	-	-/+	-/+
Saline 0.9% (T5)	++	+	++	++	-	-	+
Day 7							
FOCC 6% (T1)	-	-	+	+++	++	+	-
FOCC 12% (T2)	-	-	+	+++	++	+	-
Vehicle (T3)	-	-	+	+++	++	+	-
Reference (T4)	-	-	+	++	+++	+	-
Saline 0.9% (T5)	-	-/+	+ / ++	+++	++	+	-
Day 14							
FOCC 6% (T1)	-	-	-/+	++	+++	+	-
FOCC 12% (T2)	-	-	-/+	++	+++	+	-
Vehicle (T3)	-	-	-/+	++	+++	+	-
Reference (T4)	-	-	+	++	+++	+	-
Saline 0.9% (T5)	-	-	-/+	+++	++	+	-

Haematoxylin and eosin stained sections were scored as mild (+), moderate (++) and severe (+++) for epidermal and/or dermal re-modeling. Re-epithelialization and ulceration were scored as present (+) and absent (-). Ed: edema; PMN: polymorphonuclear cells; MNC: mononuclear cells; FP: fibroblast proliferation; NV: neovascularization; RE: re-epithelialization; U: ulceration.

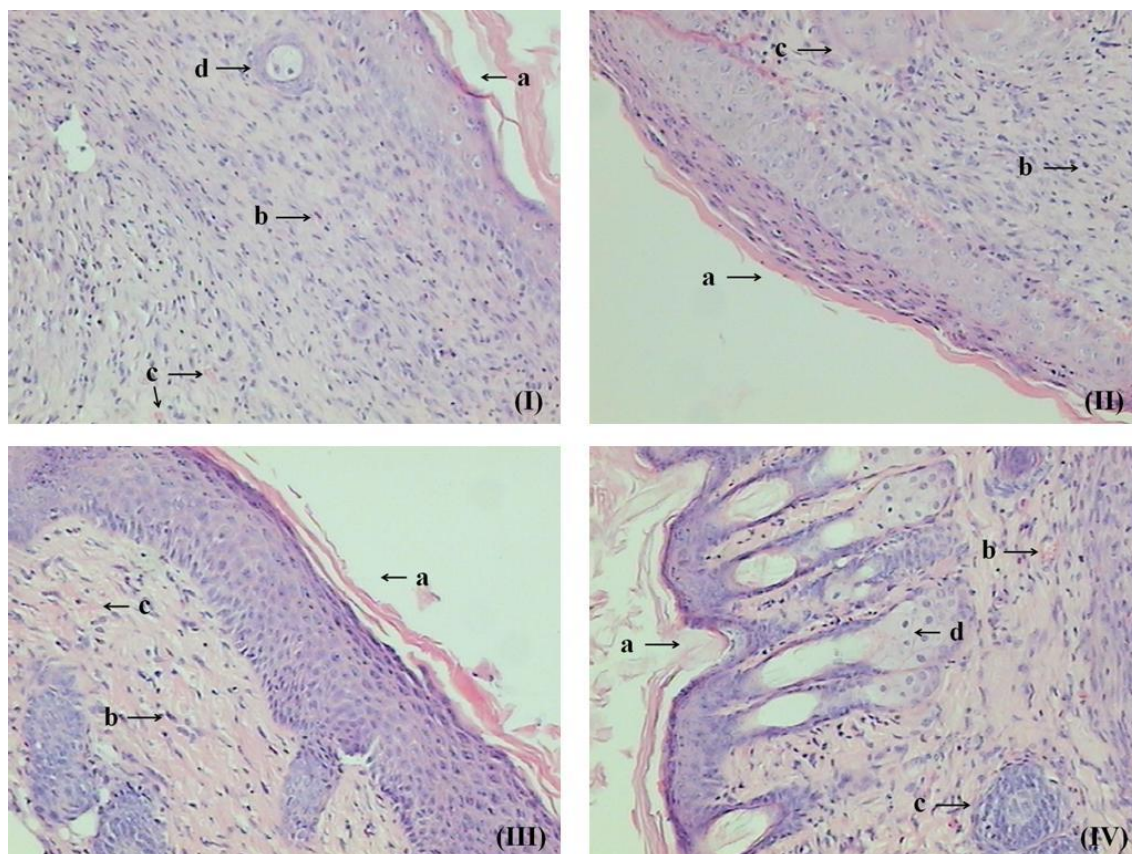


Figure 1. Microscopic view of hematoxylin and eosin stained sections of wound tissues on day 7. (I) Saline 0.9% (T5): (a) Epithelium; (b) Fibroblast; (c) New capillaries vessels; (d) hair follicle. (II) Solid ointment vehicle (T3): (a) Epithelium with keratin; (b) Mononuclear cells; (c) Formation hair follicle. (III) FOCC ointment 6% (T1): (a) Stratified epithelium with keratin; (b) Fibroblast; (c) New capillaries vessels. (IV) FOCC ointment 12% (T2): (a) Re-epithelized epidermis with keratin; (b) New capillaries vessels; (c) Re-organization hair follicle; (d) dermal papillae. Magnification 100 $\times$.

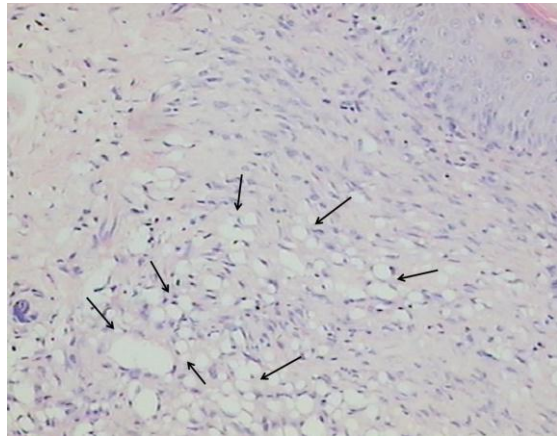


Figure 2. Microscopic view of hematoxylin and eosin stained section of wound tissue on day 7 treated with reference ointment (T4). Arrows pointing several new capillaries vessels. Magnification 100×.

7 CAPÍTULO II

ARTIGO

INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae): PROPOSTA DE NOVO MODELO EXPERIMENTAL

**(Inflammation induced by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae):
proposal of new experimental model)**

Artigo submetido à Revista Brasileira de Plantas Medicinais

Maria Liduína M. de Oliveira^a; Islene A. Lima-Verde^a; Diana C. S. Nunes-Pinheiro^{a*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Brasil.

*E-mail: diana@uece.br

**INFLAMAÇÃO INDUZIDA POR ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* Cham.
(Verbenaceae): PROPOSTA DE NOVO MODELO EXPERIMENTAL**

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito do óleo essencial (OE) de *Lippia sidoides* Cham. sobre a inflamação aguda em modelos experimentais *in vivo*. Para avaliar o efeito do OE de *L. sidoides* sobre a inflamação tópica, utilizou-se o modelo de edema de orelha induzido por xileno ou OE de *L. sidoides in natura* em camundongos, usando dexametasona e indometacina como drogas de referência. Os animais receberam o agente flogístico (25 µL) nas partes interna e externa da orelha direita, enquanto a orelha esquerda não recebeu nenhum tratamento. Quinze minutos ou uma hora após indução da inflamação, os animais foram eutanasiados e fragmentos de cada orelha foram coletados e pesados. A diferença de peso entre os fragmentos representou o efeito induzido pelos tratamentos. Para avaliar o efeito do OE de *L. sidoides* sobre a cicatrização, utilizou-se o modelo de feridas por excisão cutânea em ratos. Após anestesia, uma ferida foi induzida no dorso de cada animal. Os grupos testes receberam ungentos à base do OE de *L. sidoides*, veículo do unguento, droga de referência e salina 0,9%. Os tratamentos foram realizados diariamente durante 21 dias consecutivos. As áreas das lesões foram mensuradas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 por planimetria digital. OE de *L. sidoides in natura* apresentou efeito edematogênico quando aplicado topicamente na orelha de camundongos e foi pró-inflamatório no modelo de inflamação induzida por xileno. Dexametasona e indometacina inibiram o processo inflamatório provocado pelo OE de *L. sidoides*, não diferindo entre os tempos de avaliação. OE de *L. sidoides* aumentou o edema e a exsudação das feridas na fase inflamatória do processo cicatricial. O grupo tratado apenas com veículo do unguento apresentou maior contração das feridas no dia 7, sendo similares entre todos os grupos nos outros dias. Estes resultados sugerem o uso do OE de *L. sidoides in natura* como agente flogístico em um novo modelo de inflamação tópica.

PALAVRAS-CHAVE: *Lippia sidoides*, inflamação tópica, cicatrização, modelo experimental.

ABSTRACT

It was evaluated the effect of essential oil (EO) of *Lippia sidoides* Cham. on acute inflammation in experimental models *in vivo*. To evaluate the effect of EO of *L. sidoides* on topical inflammation, the chosen model was the ear edema in mice induced by xylene or EO of *L. sidoides* in nature with dexamethasone and indomethacin as the reference drugs. The animals were treated with phlogistic agent (25 μ L) on the inner and outer surfaces of the right ear lobe, while the left ear was not treated. Fifteen minutes or one hour after induction of inflammation, the mice were euthanized and both ears were removed and weighed. The weight difference between the right and left ears represented the effect induced by the treatments. To evaluate the effect of EO of *L. sidoides* on wound healing, the chosen model was the excision wound in rats. After anesthesia, a skin wound was induced on the dorsum of each animal. Test groups were treated with OE of *L. sidoides* ointment, vehicle ointment, drug reference and 0.9% saline. Treatments were performed daily for 21 consecutive days. The lesion areas were measured on days 0, 3, 7, 14 and 21 by digital planimetry. EO of *L. sidoides* in nature showed edematogenic effect when applied topically in ear of mice and it was pro-inflammatory in the model of inflammation induced by xylene. Dexamethasone and indomethacin inhibited the inflammatory process induced by EO of *L. sidoides* and did not differ between times. EO of *L. sidoides* increased edema and exudate wounds in the inflammatory phase of wound healing. The group treated with vehicle ointment showed higher wound contraction on day 7, which was similar among all groups on other days. These results suggest the use of EO of *L. sidoides* in nature as phlogistic agent in a new topical inflammation model.

KEYWORDS: *Lippia sidoides*, topical inflammation, wound healing, experimental model.

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta biológica complexa dos tecidos vascularizados a diferentes estímulos, que consiste de um mecanismo de defesa inato, auxiliando na eliminação de agentes estranhos e dando início ao processo de reparo tecidual. Os tecidos inflamados podem responder a estímulos nocivos, tais como patógenos, células lesionadas e injúrias químicas, térmicas ou mecânicas, através da produção de diferentes

mediadores bioativos, os quais interagem com diversos tipos celulares e moleculares para amplificar a reação flogística. A reação inflamatória aguda é caracterizada pela liberação de mediadores secretados localmente que mediam a contração das células endoteliais, causando aumento da permeabilidade vascular e consequente formação do edema. Simultaneamente, os leucócitos são recrutados através do aumento da expressão das moléculas de adesão e secreção de quimiocinas que participam efetivamente na migração transendotelial do neutrófilo ao foco inflamatório. Em geral, essa reação é autolimitante e sofre resolução, que envolve remoção de células mortas, depuração de células de resposta aguda e regeneração da matriz extracelular (Murphy & Ward, 2006).

A resposta inflamatória tópica, dependendo do agente flogístico, pode ser desencadeada por diferentes mecanismos. Várias substâncias têm sido utilizadas como indutoras deste processo, dentre elas compostos sintéticos, tais como, xileno, desencadeando uma inflamação neurogênica através da liberação de substâncias pró-inflamatórias a partir de neurônios sensoriais (Luo et al., 2008); ésteres de forbol, como TPA (13-acetato de 12-o-tetradecanoil-forbol) e PMA (acetato de forbol mirístico), ativadores da proteína quinase C, produzindo resposta inflamatória caracterizada pela ação das prostaglandinas (Aquila et al., 2009; Hernández et al., 2009); EPP (etil-fenil-propiolato), levando à formação de edema pela liberação de mediadores inflamatórios como histamina e serotonina (Nualkaew et al., 2009); além de compostos naturais, como o ácido araquidônico, componente biológico das membranas celulares, que promove inflamação caracterizada pela produção de leucotrienos (Hernández et al., 2009) e óleo de cróton, que promove eventos inflamatórios como edema, proliferação e infiltração celular, com produção de metabólitos do ácido araquidônico, citocinas e outros mediadores (Gomig et al., 2008). Nesse contexto, as substâncias sintéticas têm sido relatadas por seus efeitos pró-carcinogênicos, o que tem aumentado a procura por compostos naturais, como extratos e óleos vegetais, que possam funcionar como agentes flogísticos alternativos.

O uso destes modelos experimentais permite o estudo da ação de novos compostos que possam auxiliar na conduta terapêutica ou profilática de doenças inflamatórias e são fundamentais para o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, permite a avaliação das propriedades pró ou anti-inflamatórias de substâncias com ação tópica, utilizando drogas de referência para cada modelo.

Lippia sidoides é um arbusto próprio da vegetação do semi-árido nordestino, comum na caatinga entre Mossoró-RN e Tabuleiro do Norte-CE. Pertence à família

Verbenaceae, sendo conhecida popularmente como alecrim-pimenta. O óleo essencial (OE) de *L. sidoides* é constituído principalmente por timol, α -felandreno, β -cariofileno, p-cimeno, mirceno, carvacrol, acompanhados de outros constituintes minoritários (Matos, 2007). O uso popular deste óleo tem amplo apoio experimental em termos de atividade antibacteriana (Bertini et al., 2005), antifúngica (Fontenelle et al., 2007) e anti-helmíntica (Camurça-Vasconcelos et al., 2008). OE de *L. sidoides* apresentou atividade antioxidante, sugerindo potencial gastroprotetor e anti-inflamatório tópico quando utilizado em diferentes concentrações (Monteiro et al., 2007). Além disso, colutórios preparados à base deste OE reduziu a placa bacteriana em humanos (Fernandes-Filho et al., 1998) e impediu a progressão da doença periodontal em cães (Girão et al., 2003). Entretanto, estudos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram propriedades irritantes do OE de *L. sidoides* quando utilizado *in natura*. Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito do OE de *L. sidoides* sobre a inflamação aguda em modelos experimentais *in vivo*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do óleo essencial de *L. sidoides*

OE obtido das folhas de *L. sidoides* foi adquirido comercialmente, em setembro de 2008, do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC), pertencente à Universidade Federal do Ceará, que obtém o óleo a partir de plantas cultivadas no estado do Ceará pela técnica de arraste a vapor d'água (Craveiro et al., 1976).

Análise química do óleo essencial de *L. sidoides*

A composição química do OE utilizado neste estudo foi determinada através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). OE foi analisado usando um instrumento da Shimadzu modelo GCMS-QP 5050 sob as seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida W Scientific DB-5MS (50 m x 0,25 mm); gás de arraste: He (1 mL/min); temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do detector: 200 °C; temperatura da coluna: 35- 180 °C a 4 °C/min e depois 250 °C/15 min; espectro de massa: por impacto eletrônico a 70 eV. A identificação dos constituintes foi feita por busca em biblioteca de espectros de massa do computador, tempos de retenção e comparação visual dos espectros de massa obtidos com os publicados na literatura (Alencar et al., 1984; Adams, 1989).

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando entre 30-40 g, e ratos Wistar, fêmeas, pesando entre 150-180 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos e mantidos, coletiva ou individualmente, em caixas de polipropileno sob condições adequadas de umidade, luz e temperatura, recebendo ração e água à vontade. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* sobre a inflamação tópica

Para avaliar o efeito do OE de *L. sidoides* sobre a resposta inflamatória tópica, utilizou-se o modelo de edema de orelha induzido por xileno ou OE de *L. sidoides in natura* em camundongos (Kou et al., 2005 modificado). Os animais (n=5/grupo) foram divididos nos grupos G1 a G7, sendo: G1 - animais que receberam apenas aplicação tópica de xileno; G2 - animais que receberam apenas aplicação tópica do OE de *L. sidoides in natura*; G3 - animais que receberam OE de *L. sidoides* topicamente, aplicado imediatamente após xileno. Dexametasona (2,5 mg kg⁻¹) e indometacina (5 mg kg⁻¹) foram administradas em G4 e G5 com aplicação tópica de xileno, e em G6 e G7 com aplicação tópica do OE de *L. sidoides*, respectivamente. As drogas de referência foram previamente administradas oralmente durante 3 dias consecutivos. Uma hora após o último tratamento, xileno ou OE de *L. sidoides* (25 µL) foram aplicados nas superfícies interna e externa da orelha direita. A orelha esquerda foi considerada como controle e não recebeu nenhum tratamento. Quinze minutos ou uma hora após ação do xileno ou OE de *L. sidoides*, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica com éter etílico. Em seguida, foram coletados fragmentos circulares de ambas as orelhas, com auxílio de um *punch* de 5 mm de diâmetro, e pesados. A diferença de peso entre os fragmentos das orelhas direita e esquerda representou o edema. A atividade anti-inflamatória das drogas de referência foi expressa como percentual de inibição do edema, calculado em relação aos controles positivos (Luo et al., 2008). Este protocolo (nº 08352607-2) foi aprovado pelo CEUA/UECE.

Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* sobre a cicatrização de feridas cutâneas

Para avaliar o efeito do OE de *L. sidoides* sobre a cicatrização, utilizou-se o modelo de feridas por excisão cutânea. Ratos Wistar (n=6/grupo) foram divididos nos

grupos T1 a T5, sendo: T1 e T2 - animais tratados com ungentos contendo OE de *L. sidoides* nas concentrações 5 e 12% (volume/peso), respectivamente; T3 - animais tratados com base sólida do unguento (vaselina e lanolina - 1:2); T4 - animais tratados com droga de referência, associação de acetato de clostebol e sulfato de neomicina (controle positivo); T5 - animais que receberam solução salina 0,9% (controle negativo).

Os ratos foram submetidos à anestesia por via intramuscular na região do músculo bíceps femoral, utilizando-se a associação de quetamina (100 mg kg^{-1}) e xilazina (10 mg kg^{-1}). Em seguida, realizou-se tricotomia na região dorsal e anti-sepsia tópica com iodo-povidine. Uma ferida experimental de espessura total, envolvendo epiderme, derme e subcutâneo até exposição da fáscia muscular, de aproximadamente $2 \times 2 \text{ cm}$, foi realizada no dorso de cada animal com auxílio de bisturi, tesoura e pinça cirúrgicas (Garros et al., 2006). As lesões foram observadas diariamente. Os tratamentos foram administrados topicamente uma vez ao dia, durante 21 dias, em quantidade suficiente para cobrir toda lesão.

A planimetria foi realizada nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 do experimento para mensuração da área não-cicatrizada e contração das feridas. As lesões foram reproduzidas em papel transparente com caneta de retroprojeter (Dalazen et al., 2005). Os traçados obtidos juntamente com um pedaço de papel milimetrado de área conhecida (1 cm^2) foram digitalizados utilizando scanner. As áreas das feridas foram obtidas pela comparação da quantidade de *pixels* dentro do perímetro traçado e da área conhecida, utilizando a expressão matemática: $A_f = (A_c * N_f) / N_c$, onde A_f = área da ferida, A_c = área conhecida, N_f = número de *pixels* dentro da área da ferida, N_c = número de *pixels* dentro da área conhecida. O percentual de contração das feridas foi calculado comparando-se a área não-cicatrizada em cada dia de avaliação com a área inicial obtida no dia 0. Este protocolo (nº 08475595-4) foi aprovado pelo CEUA/UECE.

Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificar a distribuição normal e homogeneidade de variância, respectivamente. Inibição do edema, área não-cicatrizada e contração das feridas apresentaram os pré-requisitos exigidos para ANOVA, que foi realizada utilizando procedimento GLM do SAS (1999), seguido pelo teste Student-Newman-Keuls para comparação das médias. No teste da inflamação tópica, as diferenças de peso das orelhas entre os tratamentos nos diferentes tempos não mostraram homocedasticidade e, então, foram comparados

pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ e os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.).

3. RESULTADOS

Análise química do óleo essencial de *L. sidoides*

Os resultados da análise química do OE *L. sidoides* estão sumarizados na tabela 1. CG-EM indicou a presença de timol (70,97%) como principal componente, além de outros constituintes minoritários.

TABELA 1. Composição química do óleo essencial de *L. sidoides*.

Constituintes	Teor (%)
Mirceno	2,12
α -terpineno	0,50
p-cimeno	7,51
γ -terpineno	0,80
Timol metil éter	1,45
Timol	70,97
Carvacrol	0,30
Eugenol	0,11
Cariofileno	8,30
Óxido cariofileno	1,59
Outros	6,35

Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* sobre a inflamação tópica

OE de *L. sidoides in natura* apresentou efeito edematogênico, quando aplicado topicamente na orelha de camundongos, tendo sido utilizado como controle, e foi pró-inflamatório no modelo de inflamação induzida por xileno. Os resultados destes efeitos estão apresentados na tabela 2.

TABELA 2. Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* em modelo de inflamação tópica.

Tratamento	15 min		1 h	
	Edema (mg)	Inibição (%)	Edema (mg)	Inibição (%)
Xileno (G1)	4,42±0,50 ^b	-	2,50±0,52 ^b	-
OE <i>L. sidoides</i> (G2)	4,22±0,55 ^b	-	5,08±0,61 ^{ab}	-
Xileno + OE <i>L. sidoides</i> (G3)	6,74±0,65 ^a	-	8,10±0,65 ^a	-
Xileno + Dexametasona (G4)	0,24±0,05 ^d	94,57±1,24 ^A	0,20±0,12 ^e	92,00±4,90 ^A
Xileno + Indometacina (G5)	0,40±0,10 ^c	90,95±2,26 ^A	0,34±0,09 ^c	86,40±3,58 ^B
OE <i>L. sidoides</i> + Dexametasona (G6)	0,20±0,10 ^d	95,26±2,37 ^A	0,24±0,05 ^{de}	95,28±1,08 ^A
OE <i>L. sidoides</i> + Indometacina (G7)	0,28±0,13 ^{cd}	93,36±3,09 ^A	0,32±0,08 ^{cd}	93,70±1,65 ^A

A inflamação tópica foi avaliada 15 min ou 1 h após aplicação do agente flogístico.

Resultados estão expressos em média ± E.P.M (n=5).

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre grupos ($P<0,05$).

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre tempos ($P<0,05$).

Não houve diferenças entre a inflamação tópica induzida nos grupos G1 e G2, que receberam apenas xileno e OE de *L. sidoides*, respectivamente, nos tempos 15 min ou 1 h após aplicação dos agentes flogísticos. A associação destes agentes (G3), potencializou o edema, mostrando um efeito sinérgico, tanto no tempo 15 min quanto no tempo 1 h, quando comparado com G1 ($P<0,05$). Dexametasona (G6) e indometacina (G7) inibiram o processo inflamatório provocado pelo OE de *L. sidoides*, não sendo observadas diferenças entre os tempos avaliados ($P>0,05$). Quando se utilizou indometacina (G5) para inibir a inflamação induzida por xileno, observou-se diferenças entre os tempos 15 min e 1 h ($P<0,05$).

Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* sobre a cicatrização de feridas cutâneas

No modelo de cicatrização por excisão cutânea, as feridas mostraram-se limpas e enxutas em todos os grupos ao longo do estudo, exceto nos grupos tratados com unguentos à base do OE de *L. sidoides* (T1 e T2), onde se observou intensa exsudação até o dia 5 do experimento. No dia 3, observou-se presença de edema em todos os grupos, exceto em T5, que recebeu apenas salina fisiológica 0,9%. O edema regrediu

gradativamente nos grupos T1 a T4, entretanto mostrou-se mais intenso e notório nos animais tratados com OE de *L. sidoides* (T1 e T2).

O efeito do OE de *L. sidoides* sobre as áreas não-cicatrizadas e contração das feridas estão apresentados na tabela 3.

TABELA 3. Efeito do óleo essencial de *L. sidoides* em modelo de cicatrização por excisão cutânea.

Dia	Área não-cicatrizada (mm ²) e contração das feridas (%)				
	OE <i>L. sidoides</i> 5% (T1)	OE <i>L. sidoides</i> 12% (T2)	Veículo (T3)	Referência (T4)	Salina 0,9% (T5)
0	432,95±39,53 ^a	524,38±76,15 ^a	422,08±76,47 ^a	464,08±53,10 ^a	449,15±67,23 ^a
3	503,90±58,39 ^{ab}	539,90±52,26 ^a	476,08±97,81 ^{ab}	533,60±66,51 ^a	406,20±69,05 ^b
7	308,52±44,40 ^{ab} (28,50±9,75) ^{AB}	386,90±41,55 ^a (25,18±11,32) ^A	237,70±46,84 ^b (43,12±10,53) ^B	360,63±59,27 ^a (22,31±9,17) ^A	286,15±89,56 ^{ab} (36,29±16,33) ^{AB}
14	72,47±8,73 ^{ab} (82,99±3,81) ^A	89,14±26,24 ^a (82,83±4,81) ^A	58,38±16,03 ^b (85,62±5,04) ^A	86,02±19,30 ^{ab} (81,45±3,65) ^A	58,52±12,30 ^b (86,95±2,09) ^A
21	24,67±5,75 ^a (94,18±1,97) ^A	30,26±19,69 ^a (94,35±3,72) ^A	9,84±13,95 ^a (97,29±4,11) ^A	28,33±16,15 ^a (93,84±3,48) ^A	17,10±8,50 ^a (96,17±1,82) ^A

Resultados estão expressos em média ± E.P.M (n=6).

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa da área não-cicatrizada das feridas entre grupos ($P<0,05$).

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa da contração das feridas entre grupos ($P<0,05$).

No dia 3, observou-se contração inicial das feridas ($9,57 \pm 7,53\%$) com redução da área não-cicatrizada no grupo salina (T5), enquanto nos grupos T1 a T4 foi observado presença de edema com aumento da área não-cicatrizada. A partir do dia 7, houve uma diminuição progressiva das áreas das lesões em todos os grupos. A menor área não-cicatrizada e o maior percentual de contração das feridas foram observados em T3 ($P<0,05$), tratado apenas com a base sólida do unguento, quando comparado a T2 e T4, que receberam unguento de OE de *L. sidoides* a 12% e droga de referência, respectivamente. No dia 14, a contração das feridas não diferiu entre os diferentes grupos, porém a área não-cicatrizada em T2 (OE de *L. sidoides* 12%) foi superior àquela encontrada em T3 (base do unguento) ($P<0,05$). Ao final do experimento (dia 21), todos os grupos mostraram resultados similares ($P>0,05$).

4. DISCUSSÃO

A análise química do OE de *L. sidoides* utilizado no presente trabalho apresentou 70,97% de timol como componente majoritário. Em outros estudos, esse constituinte apresentou-se em concentrações de 66,67% (Monteiro et al., 2007) e 59,65% (Camurça-Vasconcelos et al., 2008). As variações na composição química de óleos essenciais e outros produtos derivados das plantas medicinais são principalmente devido às condições ambientais, tais como tipo de solo, época do ano e horário de coleta das plantas (Taylor et al., 2001). O timol é um potente anti-séptico e OE de *L. sidoides* apresenta atividades antibacteriana e antifúngica (Bertini et al., 2005; Fontenelle et al., 2007). Estudos prévios em nosso laboratório sugeriram propriedades irritantes do OE de *L. sidoides in natura*, provavelmente, em virtude de altas concentrações deste constituinte.

Neste trabalho, OE de *L. sidoides* foi utilizado para avaliar seu efeito sobre a inflamação tópica aguda, utilizando o modelo do edema de orelha em camundongos. Verificou-se que o grupo controle constituído apenas com OE de *L. sidoides in natura* provocou edema, enquanto que OE de *L. sidoides in natura* adicionado às orelhas sensibilizadas com xileno potencializou o edema. O xileno é um irritante pertencente ao grupo benzeno, enquanto o óleo essencial em estudo apresenta altas concentrações de timol, substância irritante pertencente ao grupo fenol.

A inflamação induzida pelo xileno desencadeia mecanismos celulares envolvidos na liberação de substâncias bioativas a partir das terminações periféricas de neurônios sensoriais, que agem sobre células-alvos periféricas, tais como mastócitos e outras células do sistema imune, e células da musculatura lisa vascular, produzindo uma resposta inflamatória do tipo neurogênica caracterizada por calor, rubor, edema e hipersensibilidade. Esta inflamação é iniciada pela ação de mediadores, tais como acetilcolina, bradicinina, prostaglandinas e capsaicina. Estes mediadores promovem a excitação dos neurônios, levando à liberação direta dos neuropeptídeos e ativação dos seus receptores, incluindo VR1, B₂ e PAR, a qual é promovida, respectivamente, por influxo de cálcio, ativação da proteína quinase C ou desinibição do fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂) (Richardson & Vasko, 2002). A capsaicina é um mediador cujo mecanismo está relacionado aos canais vanilóides, sendo responsável pela despolarização e pela liberação direta de neuropeptídeos, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP), os principais iniciadores desse tipo de inflamação (Holzer, 1988).

No presente estudo, OE de *L. sidoides in natura* apresentou efeito inflamatório similar àquele produzido pelo xileno, sugerindo-o como potente indutor deste processo. Os efeitos inibitórios das drogas de referência, dexametasona e indometacina, foram similares quando se utilizou xileno ou OE de *L. sidoides* como agente flogístico (Tabela 2). Contudo, Monteiro et al. (2007) utilizando OE de *L. sidoides* nas concentrações de 1 e 10 mg/orelha em veículo, observaram redução do edema de orelha induzido por TPA em 46 e 35%, respectivamente, mostrando resultados similares ao efeito inibitório promovido pela indometacina. Os autores atribuíram o efeito anti-inflamatório apresentado pelo óleo ao timol. Os protocolos experimentais existentes utilizam tempos diferentes para mensuração do edema após indução da inflamação (Kou et al., 2005; Luo et al., 2008; Hernández et al., 2009). No presente estudo, observou-se que não houve diferenças em relação ao percentual de inibição do edema quando a avaliação foi realizada 15 min ou 1 h após aplicação do agente flogístico.

No modelo de cicatrização cutânea, utilizou-se OE de *L. sidoides* na forma de unguentos tópicos. Kerr (2002) indica o uso de óleos essenciais na cicatrização de feridas nas concentrações de 5 a 12%. No entanto, considerando a composição do OE de *L. sidoides*, essas concentrações foram irritantes ao processo de reparo. A análise macroscópica das lesões revelou que a presença de intensa exsudação nos grupos tratados com OE de *L. sidoides* prejudicou a cicatrização, uma vez que o exsudato é capaz de promover a desagregação do tecido de granulação em formação e o desenvolvimento de micro-organismos (Vasconcelos et al., 2007). A base sólida do unguento apresentou maior contração das feridas quando comparada com os grupos que receberam OE *L. sidoides* a 12% e droga de referência no dia 7 do experimento. A lanolina tem sido relatada por exercer um efeito positivo sobre o processo cicatricial (Martins et al., 2005). Estes resultados dão suporte àqueles verificados no modelo de inflamação tópica, apoiando a utilização do OE de *L. sidoides* como agente indutor do processo inflamatório.

Em conclusão, óleo essencial de *L. sidoides* pode ser utilizado, na forma *in natura*, como agente flogístico em modelo de inflamação tópica. Ressalta-se a importância de esclarecer seu mecanismo de ação e o comprometimento dos parâmetros histológicos em futuros estudos.

5. REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy**. London: Academic Press, 1989. 456p.
- ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A. Kovats' indices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of Natural Products**, v.47, n.5, p.890-92, 1984.
- AQUILA, S. et al. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v.121, p.333-37, 2009.
- BERTINI, L.M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do Nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.3/4, p.80-83, 2005.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F. et al. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.154, p.167-70, 2008.
- CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. **Journal of Chemical Education**, v. 53, p.652, 1976.
- DALAZEN, P. et al. Effects of the topical application of the extract of *Vernonia scorpioides* on excisional wounds in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.82-87, 2005.
- FERNANDES-FILHO, E.S. et al. Preparação e avaliação clínica de um anti-séptico bucal à base do óleo essencial da planta medicinal *Lippia sidoides* Cham. (Alecrim pimenta). **Revista da Associação Brasileira de Odontologia**, v.6, n.5, p.323-25, 1998.
- FONTENELLE, R.O.S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.934-40, 2007.
- GARROS, I.C. et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, supl.3, p.55-65, 2006.
- GIRÃO, V.C.C. et al. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham. essential oil in dogs with mild gingival disease. **Preventive Veterinary Medicine**, v.59, p.95-102, 2003.
- GOMIG, F. et al. Topical anti-inflammatory activity of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p.220-24, 2008.
- HERNÁNDEZ, I. et al. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkamides-derived from *Heliopsis longipes* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.649-52, 2009.

- HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v.24, n.3, p.739-68, 1988.
- KERR, J. The use of essential oils in healing wounds. **The International Journal of Aromaterapy**, v.12, n.4, p.202-06, 2002.
- KOU, J. et al. Anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Radix Ophiopogon japonicas* and its two constituents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.7, p.1234-38, 2005.
- LUO, P. et al. Anti-inflammatory activity of the extracts and fractions from *Erigeron multiradiatus* through bioassay-guided procedures. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.232-37, 2008.
- MARTINS, E.F. et al. Influence of lanolin on cicatrization. **Health in Review**, v.7, n.16, p.19-25, 2005.
- MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 3.ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007. 394p.
- MONTEIRO, M.V.B. et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.378-82, 2007.
- MURPHY, H.S.; WARD, P.A. Inflamação. In: RUBIN, E. et al. **Rubin, patologia**: bases clinicopatológicas da medicina. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.43-85.
- NUALKAEW, S. et al. Anti-inflammatory, analgesic and wound healing activities of the leaves of *Memecylon edule* Roxb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.121, p.278-81, 2009.
- RICHARDSON, J.D.; VASKO, M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.302, n.3, p.839-45, 2002.
- SAS/STAT. **User's Guide**. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA, 1999.
- TAYLOR, J.L.S. et al. Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. **Plant Growth Regulation**, v.34, p.23-37, 2001.
- VASCONCELOS, A.K.P. et al. Avaliação dos unguentos à base de extratos hexânicos ou etanólico das folhas de *Momordica charantia* L. sobre as lesões cutâneas experimentais em coelhos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.1, p.59-65, 2007.

8 CONCLUSÕES

O óleo fixo das sementes de *Caryocar coriaceum* Wittm. inibe a inflamação tópica e acelera o processo de cicatrização cutânea, mostrando potencial terapêutico sobre o sistema imune da pele e apoiando seu uso popular como agente anti-inflamatório e cicatrizante.

O óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. apresenta efeito deletério ao processo cicatricial e possui efeito edematogênico quando aplicado *in natura*, sugerindo sua utilização como agente flogístico em modelo de inflamação tópica.

9 PERSPECTIVAS

A partir deste trabalho surgem perspectivas para a utilização do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* no preparo de formulações tópicas, como cremes e pomadas dermatológicas, destinadas ao tratamento de feridas cutâneas. A eficiência deste procedimento tornar-se-á mais evidente à medida que estudos toxicológicos, celulares e moleculares, bem como ensaios clínicos em espécies domésticas forem realizados e correlacionados à clínica médica veterinária.

Em relação ao óleo essencial de *Lippia sidoides* como agente flogístico, este trabalho fornece subsídios para estudos mais aprofundados, explorando outros modelos experimentais, a fim de esclarecer seu mecanismo de ação e o comprometimento dos parâmetros histológicos envolvidos no processo.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

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

ADAMS, R.P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy**. London: Academic Press, 1989. 456p.

AGUIAR, L.M.B.A.; MATOS, F.J.A.; MOURA, V.R.A. Atividade antibiótica de plantas da flora nordestina. **Ciência e Cultura**, v.36, p.547, 1984.

ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, A.L.; MONTEIRO, J.M.; LINS-NETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p.325-354, 2007.

ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A. Kovats' indices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of Natural Products**, v.47, n.5, p.890-92, 1984.

AKKOL, E.K.; KOCA, U.; PESIN, I.; YILMAZER, D.; TOKER, G.; YESILADA, E. Exploring the wound healing activity of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. by *in vivo* models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.137-141, 2009.

AQUILA, S.; GINER, R.M.; RECIO, M.C.; SPEGAZZINI, E.D.; RÍOS, J.L. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v.121, p.333-337, 2009.

AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.17, p.385-396, 2004.

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

BARA, M.T.F.; VANETTI, M.C.D. Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.7-8, p.21-34, 1998.

BARBOZA, R.R.D; SOUTO, W.M.S.; MOURÃO, J.S. The use of zootherapeutics in folk veterinary medicine in the district of Cubati, Paraíba State, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.3, p.1-14, 2007.

BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New England Journal of Medicine**. v.336, p.1066-71, 1997.

BAUHMANN, H.; GAUDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v.15, p.74-80, 1994.

BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**, v.31, p.674-686, 2005.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências**: desvendando o sistema nervoso. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 857p.

BERGER, C.L.; VASQUEZ, J.G.; SHOFNER, J.; MARIWALLA, K.; EDELSON, R.L. Langerhans cells: Mediators of immunity and tolerance. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.38, p.1632-1636, 2006.

BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.L.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.M.; CUNHA, F.A.; CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do Nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.3/4, p.80-83, 2005.

BEZERRA, J.C.B.; SILVA, I.A.; FERREIRA, H.D.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v.73, n.5, p.428-430, 2002.

BOTELHO, M.A.; RAO, V.S.; CARVALHO, C.B.M.; BEZERRA-FILHO, J.G.; FONSECA, S.G.C.; VALE, M.L.; MONTENEGRO, D.; CUNHA, F.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G.A. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.471-478, 2007.

BOTELHO, M.A.; SANTOS, R.A.; MARTINS, J.G.; CARVALHO, C.O.; PAZ, M.C.; AZENHA, C.; RUELA, R.S.; QUEIROZ, D.B.; RUELA, W.S.; MARINHO, G.; RUELA, F.I. Comparative effect of an essential oil mouthrinse on plaque, gingivitis and salivary *Streptococcus mutans* levels: a double blind randomized study. **Phytotherapy Research**, v.23, p.1214-1219, 2009.

BRAFF, M.H.; DI NARDO, A.; GALLO, R.L. Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies. **Journal of Investigative Dermatology**, v.124, p.394-400, 2005.

BYEON, S.E.; CHUNG, J.Y.; LEE, Y.G.; KIM, B.H.; KIM, K.H.; CHO, J.Y. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from inner bark of *Tabebuia avellanedae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.145-152, 2008.

CABRAL, G.A. Lipids as bioeffectors in the immune system. **Life Sciences**, v.77, p.1699-1710, 2005.

CALDER, P. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.77, p.327-335, 2007.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America - A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILÁQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S.; NAVARRO, A.M.C. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v.154, p.167-170, 2008.

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

CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M.; CRAVEIRO, A.A.; MACHADO, M.I.L.; BANTIM, M.B.; RABELO, E.F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.4, p.569-571, 2003.

CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V.; POSSEBON, L.S.; MORIMOTO, M.S.S.; CARDOSO, L.G.V.; KAPLAN, M.A.C.; GILBERT, G. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v.19, p.946-950, 2005.

COWIN, A.J.; KALLINCOS, N.; HATZIRODOS, N.; ROBERTSON, J.G.; PICKERING, K.J.; COUPER, J.; BELFORD, D.A. Hepatocyte growth factor and macrophage-stimulating protein are up regulated during excisional wound repair in rats. **Cell and Tissue Research**, v.306, p.239-250, 2001.

CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. **Journal of Chemical Education**, v. 53, p.652, 1976.

DALAZEN, P.; MOLON, A.; BIAVATTI, M.W.; KREUGER, M.R.O. Effects of the topical application of the extract of *Vernonia scorpioides* on excisional wounds in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.5, n.2, p.82-87, 2005.

D'AMBROSIO, D.; PANINA-BORDIGNON, P.; SINIGAGLIA, F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. **Journal of Immunological Methods**, v.273, p.3-13, 2003.

Da SILVA QUIRINO, G.; LEITE, G.O.; REBELO, L.M.; TOMÉ, A.R.; COSTA, J.G.M.; CARDOSO, A.H.; CAMPOS, A.R. Healing potential of pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. **Phytochemistry Letters**, v.2, p.179-183, 2009.

DELHASE, M. IκB kinase and NF-κB signaling in response to pro-inflammatory cytokines. In: WINYARD, P.G.; WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation protocols**. New Jersey: Humana Press, 2003. p.7-17.

De LIMA, A.; SILVA, A.M.O.; TRINDADE, R.A.; TORRES, R.P.; MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.3, p.695-698, 2007.

DENDA, M.; TSUCHIYA, T.; ELIAS, P.M.; FEINGOLD, K.R. Stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis. **American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.278, p.R367-R372, 2000.

DESHMUKH, P.T.; FERNANDES, J.; ATUL, A.; TOPPO, E. Wound healing activity of *Calotropis gigantea* root bark in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.125, p.178-181, 2009.

DIPIETRO L.A.; BURDICK, M.; LOW, Q.E.; KUNKEL, S.L.; STRIETER, R.M. MIP1alpha as a critical macrophage chemo attractant in murine wound repair. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, p.1693-1698, 1998.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington DC: American Public Health Association, 2001. 676p.

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

ELIAS, P.M. The skin barrier as an innate immune element. **Seminars in Immunopathology**, v.29, p.3-14, 2007.

ELIAS, P.M.; MENON, G.K. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. **Advances in Lipid Research**, v.24, p.1-26, 1991.

EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J.M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, v.127, p.514-525, 2007.

FAÇANHA, M.C.C.; CAVALCANTE, I.F.; TEIXEIRA, M.J.; MATOS, F.J.A.; SOUSA, A.Q.; POMPEU, M.M.L. Terapia da leishmaniose experimental com constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. In: **X Reunião Anual da FeSBE**, Caxambu, Minas Gerais, 1995. p. 270.

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

FERNANDES-FILHO, E.S.; MORAIS, S.M.; FONSECA, S.G.C.; MOTA, O.M.L. Preparação e avaliação clínica de um anti-séptico bucal à base do óleo essencial da planta medicinal *Lippia sidoides* Cham. (alecrim pimenta). **Revista da Associação Brasileira de Odontologia**, v.6, n.5, p.323-325, 1998.

FONTENELLE, R.O.S.; MORAIS, S.M.; BRITO, E.H.S.; KERNTOPF, M.R.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; TOMÉ, A.R.; QUEIROZ, M.G.R.; NASCIMENTO, N.R.F.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.934-940, 2007.

FORTE, W.C.N. **Imunologia**: do básico ao aplicado. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.27-33.

FREEDBERG, I.M.; TOMIC-CANIC, M.; KOMINE, M.; BLUMENBERG, M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. **Journal of Investigative Dermatology**, v.116, n.5, p.633-640, 2001.

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nature Reviews Genetic**, v.3, p.199-209, 2002.

FUHLBRIGGE, R.C.; WEISHAUPT, C. Adhesion molecules in cutaneous immunity. **Seminars in Immunopathology**, v.29, p.45-57, 2007.

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

GARCÍA, C.C.; TALARICO, L.; ALMEIDA, N.; COLOMBRES, S.; DUSCHATZKY, C.; DAMONTE, E.B. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. **Phytotherapy Research**, v.17, p.1073-1075, 2003.

GARROS, I.C.; CAMPOS, A.C.L.; TÂMBARA, E.M.; TENÓRIO, S.B.; TORRES, O.J.M.; AGULHAM, M.A.; ARAÚJO, A.C.F.; SANTIS-ISOLAN, P.M.B.; OLIVEIRA, R.M.; ARRUDA, E.C.M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, supl.3, p.55-65, 2006.

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

GHOSH, K.; CLARK, R.A.F. Wound repair. In: LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**. 3. ed. New York: Elsevier/Academic Press, 2007. p.1149-1166.

GILBERT, B.; FERREIRA, J.L.P.; ALVES, L.F. **Monografia de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas**. Curitiba: Abifito, 2005. p.78-89.

GILL, S.E.; PARKS, W.C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.40, p.1334-1347, 2008.

GIRÃO, V.C.C.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; MORAIS, S.M.; SEQUEIRA, J.L.; GIOSO, M.A. A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. **Preventive Veterinary Medicine**, v.59, p.95-102, 2003.

GOMIG, F.; PIETROVSKI, E.F.; GUEDES, A.; DALMARCO, E.M.; CALDERARI, M.T.; GUIMARÃES, C.L.; PINHEIRO, R.M.; CABRINI, D.A.; OTUKI, M.F. Topical anti-inflammatory activity of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p.220-224, 2008.

GUL, N.Y.; TOPAL, A.; CANGUL, T.; YANIK, K. The effects of topical tripeptide copper complex and helium-neon laser on wound healing in rabbits. **Veterinary Dermatology**, v.19, p.7-14, 2008.

GURUNG, S.; SKALKO-BASNET, N. Wound healing properties of *Carica papaya* latex: *In vivo* evaluation in mice burn model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.121, p.338-341, 2009.

GUY-GRAND, D.; VASSALLI, P. Gut intraepithelial lymphocyte development. **Current Opinion in Immunology**, v.14, p.255-259, 2002.

HACHEM, J.P.; CRUMRINE, D.; FLUHR, J.; BROWN, B.E.; FEINGOLD, K.R.; ELIAS, P.M. pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. **Journal of Investigative Dermatology**, v.121, p.345-353, 2003.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v.92, n.9, p.3007-3014, 1998.

HARDING, C.R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. **Dermatologic Therapy**, v.17, suppl.1, p.6-15, 2004.

HARTLAPP, I.; ABE, R.; SAEED, R.W.; PENG, T.; VOELTER, W.; BUCALA, R.; METZ, C.N. Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. **FASEB Journal**, v.15, n.12, p.2215-2224, 2001.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.88, n.2, p.53-58, 2007.

HERNÁNDEZ, I.; MÁRQUEZ, L.; MARTÍNEZ, I.; DIEGUEZ, R.; DELPORTE, C.; PRIETO, S.; MOLINA-TORRES, J.; GARRIDO, G. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkamides-derived from *Heliopsis longipes* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.649-652, 2009.

HERZOG-SOARES, J.D.; ALVES, R.K.; ISAC, E.; BEZERRA, J.C.B.; GOMES, M.H.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, supl., p.1-2, 2002.

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v.24, n.3, p.739-768, 1988.

HOWDIESHELL, T.R.; CALLAWAY, D.; WEBB, W.L.; GAINES, M.D.; PROCTER-JR, C.D.; SATHYANARAYANA; POLLOCK, J.S.; BROCK, T.L.; MCNEIL, P.L. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. **Journal of Surgical Research**, v.96, n.2, p.173-182, 2001.

HU, X.; JIN, H.; XU, W.; ZHANG, W.; LIU, X.; YAN, S.; CHEN, M.; LI, J.; ZHANG, W.D. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Daphne retusa* Hemsl. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.118-122, 2008.

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

JIA, Y.; ZHAO, G.; JIA, J. Preliminary evaluation: the effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.181-189, 2008.

JORGE, M.P.; MADJAROF, C.; RUIZ, A.L.T.G.; FERNANDES, A.T.; RODRIGUES, R.A.F.; SOUSA, I.M.O.; FOGLIO, M.A.; CARVALHO, J. E. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.118, p.361-366, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.359-370.

KERR, J. The use of essential oils in healing wounds. **The International Journal of Aromaterapy**, v.12, n.4, p.202-206, 2002.

KHOURI, J.; RESCK, I.S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUSA, T.M.M.; PEREIRA, L.O.; OLIVEIRA, A.B.B.; GRISOLIA, C.K. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.2, p.442-448, 2007.

KOKANE, D.D.; MORE, R.Y.; KALE, M.B.; NEHETE, M.N.; MEHENDALE, P.C.; GADGOLI, C.H. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.311-315, 2009.

KOU, J.; SUN, Y.; LIN, Y.; CHENG, Z.; ZHENG, W.; YU, B.; XU, Q. Anti-inflammatory activities of aqueous extract from *Radix Ophiopogon japonicas* and its two constituents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.7, p.1234-1238, 2005.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran - Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.49-124.

KUPPER, T.S.; FUHLBRIGGE, R.C. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p.211-222, 2004.

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

LEE, D.Y.; CHOI, G.; YOON, T.; CHEON, M.S.; CHOO, B.K.; KIM, H.K. Anti-inflammatory activity of *Chrysanthemum indicum* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.149-154, 2009.

LEE, J.L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D.R.; KOPELOVICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenase in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.192, p.294-306, 2003.

LEE S.H.; ELIAS, P.M.; PROKSCH, E.; MENON, G.K.; MAO-QUIANG, M.; FEINGOLD, K.R. Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. **Journal of Clinical Investigation**, v.89, p.530-538, 1992.

LEITE, A.K.R.M. **Atividade antiinflamatória e imunomoduladora do óleo essencial e de extratos de *Lippia sidoides* Cham.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2003. 89p.

LEITE, G.O.; PENHA, A.R.S.; Da SILVA QUIRINO, G.; COLARES, A.V.; RODRIGUES, F.F.G.; COSTA, J.G.M.; CARDOSO, A.L.H.; CAMPOS, A.R. Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. **Journal of Young Pharmacists**, v.1, p.54-56, 2009.

LIMA, J.R.O.; SILVA, R.B.; SILVA, C.C.M.; SANTOS, L.S.S.; SANTOS-JÚNIOR, J.R.; MOURA, E.M.; MOURA, C.V.R. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. **Química Nova**, v.30, p.600-603, 2007.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS-FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wound in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.265-272, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 520 p.

LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.199-206, 2005.

LUO, P.; ZHANG, Z.; YI, T.; ZHANG, H.; LIU, X.; MO, Z. Anti-inflammatory activity of the extracts and fractions from *Erigeron multiradiatus* through bioassay-guided procedures. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.232-237, 2008.

MALDINI, M.; SOSA, S.; MONTORO, P.; GIANGASPERO, A.; BALICK, M.J.; PIZZA, C.; DELLA-LOGGIA, R. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.430-433, 2009.

MANN, A.; BREUHAHN, K.; SCHIRMACHER, P.; BLESSING, M. Keratinocyte derived granulocytemacrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation and vascularization. **Journal of Investigative Dermatology**, v.117, p.1382-1390, 2001.

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

MARTINS, E.F.; PEREIRA, L.M.; LIMA, T.M.; AGUIAR, G.R.; CHEN, S.C.; FOLADOR, A.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. Influence of lanolin on cicatrization. **Health in Review**, v.7, n.16, p.19-25, 2005.

MARTINS, P.S.; ALVES, A.L.G.; HUSSNI, C.A.; SEQUEIRA, J.L.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A. Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em equinos. **Archives of Veterinary Science**, v.8, n.2, p.1-7, 2003.

MARX, F.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G. Chemical composition of the fruit pulp and aroma of *Caryocar villosum*. **International Journal of Food Research and Technology**, v.204, p.442-444, 1997.

MATHERS, A.R.; LARREGINA, A.T. Professional antigen-presenting cells of the skin. **Immunologic Research**, v.36, p.127-136, 2006.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**: Sistemas de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 4. ed. Fortaleza: Editora UFC, 2002. 267 p.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007. 394p.

MATOS, F.J.A.; MATOS, M.E.O.; SOUSA, M.P.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A. **Constituintes ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras**. 2.ed. Fortaleza: editora UFC, 2004. p.51-58.

McDANIEL, J.C.; BELURY, M.; AHIJEVYCH, K.; BLAKELY, W. Omega-3 fatty acids effect on wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.16, p.337-345, 2008.

McDONNELL, M.A.; LAW, B.K.; SERRA, R.; MOSES, H.L. Antagonistic effects of TGFbeta1 and BMP-6 on skin keratinocyte differentiation. **Experimental Cell Research**, v.263, p.265-273, 2001.

McGAW, L.J.; ELOFF, J.N. Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.559-574, 2008.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.3, p.257-262, 2009.

MILLER, L.S.; MODLIN, R.L. Toll-like receptors in the skin. **Seminars in Immunopathology**, v.29, p.15-26, 2007.

MONTEIRO, M.V.B.; LEITE, A.K.R.M.; BERTINI, L.M.; MORAIS, S.M.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.378-382, 2007.

MURPHY, H.S.; WARD, P.A. Inflamação. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Rubin, Patologia**: bases clinicopatológicas da medicina. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.43-85.

NABAS, F.; CONTESINI, F.J.; MENIN, S.E.A.; ANTÔNIO, M.A.; BIGHETTI, A.E.; ARAÚJO, C.E.P.; CARVALHO, P.O. Efeito antiedematogênico de óleos contendo ácidos graxos ômega-3 e 6 em camundongos. **Revista Brasileira de Medicina**, v.66, n.4, p.92-96, 2009.

NASCIMENTO, C.G.H.; MONTENEGRO, R.C.; FARIAS, R.A.F.; COSTA, J.G.M.; LEYA, A.; PESSOA, C. Avaliação da atividade citotóxica de compostos isolados da *Lippia sidoides* em diferentes linhagens leucêmicas humanas. In: **XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Recife, Pernambuco, 2001. p.212.

NAYAK, B.S.; RAJU, S.S.; EVERSLEY, M.; RAMSUBHAG, A. Evaluation of wound healing activity of *Lantana camara* L. - A preclinical study. **Phytotherapy Research**, v.23, p.241-245, 2009.

NUALKAEW, S.; RATTANAMANEE, K.; THONGPRADITCHOTE, S.; WONGKRAJANG, Y.; NAHRSTEDT, A. Anti-inflammatory, analgesic and wound healing activities of the leaves of *Memecylon edule* Roxb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.121, p.278-281, 2009.

NYLANDER-LUNDQVIST, E.; EGELRUD, T. Formation of active IL-1 beta from pro-IL-1 beta catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro. **Acta Dermato-Venereologica**, v.77, p.203-206, 1997.

OLIVEIRA, I.G.; CARTAXO, S.L.; SILVA, M.A.P. Plantas medicinais utilizadas na farmacopéia popular em Crato, Juazeiro e Barbalha (Ceará, Brasil). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, supl.1, p.189-191, 2007.

OLIVEIRA, M.E.B.; GUERRA, N.B.; BARROS, L.M.; ALVES, R.E. **Aspectos agronômicos e de qualidade do pequi**. Documentos, 113. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 32p.

PAIVA, L.A.F.; CUNHA, K.M.A.; SANTOS, F.A.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**, v.16, p.737-739, 2002.

PANTHONG, A.; NORKAEW, P.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTIKUL, T.; ANANTACHOKE, N.; REUTRAKUL, V. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of the extract of gamboges from *Garcinia hanburyi* Hook f. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.335-340, 2007.

PARK, J.E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v.187, p.11S-16S, 2004.

PASCUAL, G.; GLASS, C.K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.17, p.321-328, 2006.

PASSOS, X.S.; CASTRO, A.C.M.; PIRES, J.S.; GARCIA, A.C.F.; CAMPOS, F.C.; FERNANDES, O.F.L.; PAULA, J.R.; FERREIRA, H.D.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H.; SILVA, M.R.R. Composition and antifungal activity of the essential oils of *Caryocar brasiliensis*. **Pharmaceutical Biology**, v.41, n.5, p.319-324, 2003.

PASSOS, X.S.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H.; FERNANDES, O.F.L.; PAULA, T.F.; GARCIA, A.C.F.; SILVA, M.D.R.R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.623-627, 2002.

PATTANAYAK, S.P.; SUNITA, P. Wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcata* (L.f) Ettingsh. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p.241-247, 2008.

PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F.H.; DONATTI, L.; FADELPICHETH, C.M.T.; WEFFORT-SANTOS, A.M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.625-630, 2006.

PEREIRA, A.M.; ARIAS, M.V.B. Manejo de feridas em cães e gatos - revisão. **Clínica Veterinária**, n.38, p.33-42, 2002.

PEREIRA, L.M.; HATANAKA, E.; MARTINS, E.F.; OLIVEIRA, F.; LIBERTI, E.A.; FARSKY, S.H.; CURI, R.; PITHON-CURI, T.C. Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. **Cell Biochemistry and Function**, v.26, p.197-204, 2008.

PIANOVSKI, A.R.; VILELA, A.F.G.; SILVA, A.A.S.; LIMA, C.G.; SILVA, K.K.; CARVALHO, V.F.M.; MUSIS, C.R.; MACHADO, S.R.P.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, p.249-259, 2008.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J.M.; JENSEN, J.M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v.17, p.1063-1072, 2008.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Rang & Dale - Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 829p.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

REDDY, B.S.; REDDY, R.K.K.; NAIDU, V.G.M.; MADHUSUDHANA, K.; AGWANE, S.B.; RAMAKRISHNA, S.; DIWAN, P.V. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and wound-healing potentials of *Holoptelea integrifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p.249-256, 2008.

RICHARDSON, J.D.; VASKO, M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.302, p.839-845, 2002.

RICHES, D.W. Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R.A.F. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2. ed. New York: Plenum, 1996. p.143-168.

RISAU, W. Angiogenic growth factors. **Progress in Growth Factor Research**, v.2, p.71-79, 1990.

ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B. Transforming growth factor- β . **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. 2. ed. New York: Plenum, 1996. p.275-308.

ROESLER, R.; CATHARINO, R.R.; MALTA, L.G.; EBERLIN, M.N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.110, p.711–717, 2008.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.53-60, 2007.

SANTA ROSA, J. **Enfermidades em caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1996. p.133-146.

SANTORO, M.M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cell Research**, v.304, p.274-286, 2005.

SARAIVA, R.A.; LEITE, G.O.; OLIVEIRA, R.C.; ARARUNA, M.K.A.; MENEZES, K.D.P.; PEREIRA, C.K.B.; COSTA, J.G.M.; CAMPOS, A.R.; MENEZES, I.R.A. Topical anti-inflammatory activity of *Caryocar coriaceum* Wittm.(Caryocaraceae) pulp fruit and seed oils. In: **4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry**, Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, 2008.

SARAIVA, R.A.; SAMPAIO, R.S.; OLIVEIRA, R.C.; MENEZES, K.D.P.; FERNANDES, C.N.; SOUZA, H.H.F.; COSTA, J.G.M.; CAMPOS, A.R.; KERNTOPF, M.R.; MENEZES, I.R.A. Ação antiedematogênica do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm. no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico. In: **IV Reunião Regional da FeSBE**, Goiânia, Goiás, Brasil, 2009.

SAS/STAT. **User's Guide**. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA, 1999.

SATO, J.; DENDA, M.; NAKANISHI, J.; NOMURA, J.; KOYAMA, J. Cholesterol sulfate inhibits proteases that are involved in desquamation of stratum corneum. **Journal of Investigative Dermatology**, v.111, p.189-193, 1998.

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

SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E.M.M.; BITTENCOURT, C.F.; ZANETTI, G.D.; HEINZMANN, B.M.; LAUFER, S.;

MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.523-532, 2009.

SECCO, D.D.; PARON, J.A.; DE OLIVEIRA, S.H.P.; FERREIRA, S.H.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v.9, p.153-164, 2004.

SEGALL, S.D.; ARTZ, W.E.; RASLAN, D.S.; FERRAZ, V.P.; TAKAHASHI, J.A.; Triacylglycerol analysis of pequi (*Caryocar brasiliensis* Camb.) oil by electrospray and tandem mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p.445-452, 2006.

SEGRE, J.A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.5, p.1150-1158, 2006.

SEPHEL, G.C.; WOODWARD, S.C. Reparação, regeneração e fibrose. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Rubin, Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.89-120.

SERHAN, N.C.; SAVIL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v.6, n.12, p.1191-1197, 2005.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research Clinical Anesthesiology**, v.18, n.3, p.385-405, 2004.

SILVA, M.A.P.; MEDEIROS-FILHO, S. Morfologia de fruto, semente e plântula de piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Ciência Agronômica**, v.37, n.3, p.320-325, 2006.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel - A holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v.67, p.477-502, 2000.

STOCUM, D.L. Repair of skin wounds by fibrosis. **Regenerative Biology and Medicine**. New York: Elsevier/Academic Press, 2006. p.21-39.

STRID, J.; TIGELAAR, R.E.; HAYDAY, A.C. Skin immune surveillance by T cells - A new order? **Seminars in Immunology**, v.21, p.110-120, 2009.

TAMURA, E.K.; JIMENEZ, R.S.; WAISMAM, K.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P.; MALPEZZI-MARINHO, E.A.L.; MARINHO, E.A.V.; FARSKY, S.H.P. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.478-485, 2009.

TAYLOR, J.L.S.; RABE, T.; MCGAW, L.J.; JÄGER, A.K.; VAN-STADEN, J. Towards the scientific validation of traditional medicinal plants. **Plant Growth regulation**, v.34, p.23-37, 2001.

THEORET, C.L. The pathophysiology of wound repair. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v.21, p.1-13, 2005.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária**: uma introdução. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 587p.

TRAMONTINA, V.A.; MACHADO, M.A.; NOGUEIRA FILHO G.R.; KIM, S.H.; VIZZIOLI, M.R.; TOLEDO, S. Effect of bismuth subgallate (local hemostatic agent) on wound healing in rats. Histological and histometric findings. **Brazilian Dental Journal**, v.13, p.11-16, 2002.

TÜZÜN, Y.; ANTONOV, M.; DOLAR, N.; WOLF, R. Keratinocyte cytokine and chemokine receptors. **Dermatologic Clinics**, v.25, p.467-476, 2007.

UCHI, H.; TERAOKA, H.; KOGA, T.; FURUE, M. Cytokines and chemokines in the epidermis. **Journal of Dermatological Science**, v.24, suppl.1, p.S29-S38, 2000.

VALLADEAU, J.; SAEELAND, S. Cutaneous dendritic cells. **Seminars in Immunology**, v.17, p.273-283, 2005.

VASCONCELOS, A.K.P.; TOMÉ, A.R.; PEREIRA, B.S.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S. Avaliação dos unguentos à base de extratos hexânicos ou etanólico das folhas de *Momordica charantia* L. sobre as lesões cutâneas experimentais em coelhos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.1, p.59-65, 2007.

VEERPORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, v.52, p.253-262, 2000.

VIEIRA, R.C.; BOMBARDIERE, E.; OLIVEIRA, J.J.; LINO-JÚNIOR, R.S.; BRITO, L.A.B.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.8, p.358-366, 2008.

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

WHAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. **Swiss Medical Weekly**, v.132, n.7-8, p.83-91, 2002.

WILGUS, T.A. Immune cells in the healing skin wound: Influential players at each stage of repair. **Pharmacological Research**, v.58, p.112-116, 2008.

ZHANG, L.; HU, J.J.; LIN, J.W.; FANG, W.S.; DU, G.H. Anti-inflammatory and analgesic effects of ethanol and aqueous extracts of *Pteroccephalus hookeri* (C.B. Clarke) Höeck. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.510-514, 2009.

ZHOU, M.; WANG, H.; SUOLANGJIBA; KOU, J.; YU, B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.117, p.345-350, 2008.

ANEXO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
Comitê de Ética para o Uso de Animais

Av. Paranjana, 1700 - Itaperi
 CEP 60740-903 - fone: 55-85-3101-9890



PARECER CONSUBSTANCIADO

1) Identificação

Processo nº 08475595-4

Título: Atividade do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham, e do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm. sobre a cicatrização de feridas cutâneas em modelos experimentais *in vivo*.

Finalidade: apresentação do projeto de mestrado de Maria Liduína Maia de Oliveira, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias para apreciação do CEUA.

Pesquisador responsável: Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro

2) Objetivos:

- Avaliar a atividade cicatrizante do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham, e do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm. sobre a cicatrização de feridas cutâneas, por segunda intenção, em modelos experimentais *in vivo*;
- Analisar microbiologicamente e determinar a composição química do óleo essencial de *Lippia sidoides* e do óleo fixo de *Caryocar coriaceum*;
- Observar os aspectos macroscópicos e mensurar a área de retração das feridas em cicatrização;
- Avaliar os aspectos histológicos através da contagem de células mononucleares e polimorfo nucleares, fibroblastos e vasos sanguíneos;
- Avaliar a densidade do colágeno gerado no processo cicatricial e o nível de reepitelização da pele.

3) Sumário do projeto

a. Animais a serem utilizados

Serão utilizados ratos Wistar fêmeas, camundongos Swiss machos e coelhos Nova Zelândia machos com idade entre 2 e 4 meses e peso de 28 a 30 g, 150 a 180 g e 1.800 a 2.000 g, respectivamente. Os animais serão utilizados em protocolos de indução de feridas experimentais nas quais serão aplicadas posteriormente no local da lesão creme contendo óleo essencial de *Lippia sidoides* e creme contendo óleo fixo de *Caryocar coriaceum*, conforme descrição detalhada dos experimentos contida nas páginas 16 a 19 do item Material e Métodos.

Os ratos (n = 50) serão divididos em cinco grupos de 10 animais, quatro experimentais e um controle, os camundongos (n = 35) em sete grupos de cinco animais, seis experimentais e um controle e os coelhos (n = 15) em cinco grupos de três animais cada, quatro experimentais e um controle.

b. Protocolos experimentais

O experimento será dividido em várias etapas:

- 1) Obtenção do óleo essencial de *Lippia sidoides* e do óleo fixo da semente de *Caryocar coriaceum*.
- 2) Análises microbiológica e química do óleo essencial de *Lippia sidoides* e do óleo fixo da semente de *Caryocar coriaceum*.
- 3) Envio do óleo essencial de *Lippia sidoides* e do óleo fixo da semente de *Caryocar coriaceum* para farmácias de manipulação pela adição de 5% ou 12% dos respectivos óleos.
- 4) Procedimento cirúrgico nos três modelos experimentais: ratos, camundongos e coelhos mediante prévia anestesia específica para cada tipo de animal, para indução de feridas envolvendo epiderme, derme e subcutâneo até exposição da fáscia muscular segundo protocolos recomendados por Carros et al., 2006, Magalhães, 2007 e Gul et al., 2008).
- 5) Aplicação tópica de cremes com óleo essencial de *Lippia sidoides* e com óleo fixo da semente de *Caryocar coriaceum* a 5 ou 12%, além de aplicação tópica da base do creme (vaselina ou lanolina) e da droga de referência (acetato de clostebol + sulfato de neomicina), conforme o tratamento ou o modelo experimental.
- 6) Observação macroscópica das lesões considerando os seguintes parâmetros: edema, hiperemiação, exsudato, tecido de granulação e reepitelização e planimetria das lesões realizadas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 do pós-operatório.
- 7) Análise histopatológica de fragmentos da pele nas dias 0, 3, 7, 14 e 21 do pós-operatório.

c. Adequação da metodologia

A metodologia utilizada está detalhada de maneira clara e objetiva e encontra-se plenamente adequada aos objetivos do trabalho.

d. Adequação das condições

As condições técnicas, estruturais e de pessoal foram devidamente referidas no projeto, e encontram-se, portanto, perfeitamente adequadas ao seu pleno desenvolvimento.

4) Aspectos éticos da experimentação animal

a. Estrutura do projeto de pesquisa.

O projeto apresenta os seguintes itens: Introdução, Revisão de Literatura, Hipótese Científico, Objetivo Geral e Objetivos Específicos, Material e Métodos e Referências Bibliográficas, Cronograma de Atividades, Resumo e Orçamento Detalhado. Além disto, no processo foram anexados os seguintes

documentos: ofício de encaminhamento assinado pela mestranda e sua orientadora, protocolo de licenciamento do projeto devidamente preenchido, termo de responsabilidade e compromisso devidamente assinado pela mestranda e sua orientadora, termos de colaboração assinados pela Profa. Dra. Selene Maia de Moraes e Profa. Dra. Adriana de Queiroz Pinheiro, Coordenadoras do Laboratório de Produtos Naturais e do Laboratório de Microbiologia Veterinária da UECE, respectivamente e termo de colaboração assinada pela Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão.

b. Análise dos benefícios

A ocorrência de feridas cutâneas é muito comum em animais, destacando-se as infecções de origem bacteriana, virótica e fúngica, além daquelas causadas por ectoparasitas e por doenças sistêmicas como a leishmaniose. Além disto, animais criados em campo estão sujeitos a picadas de artrópodes hematófagos, arranhões causados por cactáceas, estacas e cerca de arame farpado que podem ocasionar processos infecciosos.

Embora já existam no mercado pomadas e cremes cicatrizantes, nos últimos anos vem aumentando o interesse por drogas obtidas a partir de fitoterápicos em Medicina Veterinária devido ao seu baixo custo quando comparado com produtos comerciais.

c. Manejo animal

O manejo dos animais foi detalhado tanto no projeto como no termo de responsabilidade e compromisso. Os ratos e camundongos utilizados nos experimentos serão provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e os coelhos do Departamento de Zootecnia do UFC. Os ratos e camundongos receberão diariamente ração e água à vontade e serão mantidos em gaiolas de polipropileno com tampa de grade metálica; os coelhos em gaiolas individuais de arame galvanizado. Todos os animais serão mantidos no Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal da UECE sob condições adequadas de higiene, umidade, luz e temperatura.

d. Sacrifício

Somente os camundongos serão sacrificados por deslocamento cervical nos respectivos dia de avaliação, anteriormente mencionados, primeiramente para avaliar as lesões por meio de planimetria e, em seguida, para coleta de material cutâneo que irá para análise histopatológica.

e. Descarte

As carcaças dos camundongos sacrificados serão congeladas e armazenadas até o dia de coleta semanal de material biológico existente na UECE.

f. Adequação do termo de responsabilidade

O termo de responsabilidade está de acordo com as exigências do CEUA.

5) Parecer

Considerando que o projeto atende às exigências éticas preceituadas pelo CEUA;

Considerando que toda a documentação exigida pelo CEUA encontra-se devidamente anexada ao processo;

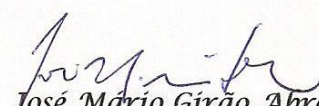
Considerando a relevância e a exeqüibilidade do projeto apresentado;

Considerando que o projeto está escrito de maneira clara e objetiva;

Considerando que o projeto será desenvolvido por uma aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - PPGCV sob a orientação de um pesquisador da área;

Somos de parecer FAVORÁVEL à aprovação desse processo s.m.j.

Fortaleza, 30 de janeiro de 2009.


José Mario Girão Abreu
Presidente CEUA-UECE