

MICHELLE SUASSUNA DE AZEVEDO RÊGO

Avaliação da toxicidade aguda e do efeito cicatrizante em feridas cutâneas de um gel à base de *Plectranthus neochilus*, Schlechter (boldo-gambá) e *Cnidoscolus quercifolius* (favela) em roedores

**RECIFE
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

MICHELLE SUASSUNA DE AZEVEDO RÊGO

Avaliação da toxicidade aguda e do efeito cicatrizante em feridas cutâneas de um gel à base de *Plectranthus neochilus*, Schlechter (boldo-gambá**) e *Cnidocolus quercifolius* (**favela**) em roedores**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Doutora: Evilda Rodrigues de Lima.

Co-Orientador: Prof. Doutor: Eryvelton de Souza Franco

**RECIFE
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

R343a Rêgo, Michelle Suassuna de Azevedo
Avaliação da toxicidade aguda e do efeito cicatrizante em
feridas cutâneas de um gel a base de *Plectranthus neochilus*,
Schlechter (Boldo-Gambá) e *Cnidocolus quercifolius* (favela) em
roedores / Michelle Suassuna de Azevedo Rêgo. – 2017.
114 f. : il.

Orientadora: Evilda Rodrigues de Lima.
Coorientador: Eryvelton de Souza Franco.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência
Veterinária, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. Fitoterapia 2. Toxicologia 3. Fitoquímica 4. Dermatologia
5. Cicatrização 6. Ratos I. Lima, Evilda Rodrigues de, orient.
II. Franco, Eryvelton de Souza, coorient. III. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DO EFEITO
CICATRIZANTE EM FERIDAS CUTÂNEAS DE UM GEL A BASE
DE *Plectranthus Neochilus*, Schlechter (**BOLDO-GAMBÁ**) E
Cnidocolus quercifolius (**FAVELA**) EM ROEDORES**

Tese de Doutorado elaborado por

MICHELLE SUASSUNA DE AZEVEDO RÊGO

Aprovada em:/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Evilda Rodrigues de Lima
Orientador – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Eryvelton de Souza Franco
Co-Orientador – Coordenador do Departamento de Medicina Veterinária - IBGM

Prof^ª. Dr^ª. Melânia Loureiro Marinho
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG - Patos

Prof^ª. Dr^ª. Maria Bernadete de Sousa Maia
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Mirian Teixeira Nogueira
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais IRACEMA AZEVEDO e ROBERTO MEDEIROS DE AZEVEDO que sempre souberam me dar tudo o que eu precisava para que eu crescesse e desenvolvesse meu potencial. A você MÃE jamais conseguirá retribuir tamanha dedicação. Ao meu PAI, que partiu antes que este momento esperado chegasse, partiu deixando saudades. Procuro viver seguindo os valores que você me ensinou, pois assim tenho a sensação de andarmos de mãos dadas.

As minhas irmãs MILLENA AZEVEDO e ROBERTA AZEVEDO, agradeço as palavras de incentivo, e por estarem sempre presentes em minha vida.

Ao meu marido RÔMULO PINTO e minhas filhas ANNA LUIZA SUASSUNA e IZABELLA SUASSUNA que tantas vezes deixamos em segundo plano, que nos momentos importantes suportaram minha ausência, que nos dias de fracasso respeitaram meus sentimentos e enxugaram minhas lágrimas, obrigada especial e que só o coração de vocês é capaz de interpretar.

AGRADECIMENTO

Quero antes de tudo agradecer a DEUS, que é tão presente na minha vida, iluminando o meu caminho e me ajudando a superar cada obstáculo, por maior que seja, me fortalecendo e me dando forças para lutar pelo que acredito.

Obrigada a todos aqueles que amo tanto e acompanharam a minha caminhada, mesmo quando foi preciso correr para acompanhar meus passos.

A minha orientadora EVILDA RODRIGUES DE LIMA pelo companheirismo e dedicação.

A professora MELÂNIA LOUREIRO MARINHO pela confiança em desenvolver esse projeto.

Ao meu co-orientador ERYVELTON DE SOUZA FRANCO e professoras MARIA BERNADETE DE SOUSA MAIA e CARINA SCANONI e estagiários, que me acolheram na UFPE e foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão desta pesquisa.

A professora MIRIAN NOGUEIRA TEIXEIRA pelo apoio e realização dos exames laboratoriais.

A minha estagiária do PIBIC ISABELLA MARIA APOLINÁRIO pela ajuda, pelos finais de semana perdidos, por tudo!

As EVILDETES FERNANDA LÚCIA PASSOS FUKAHORI, VANESSA CARLA LIMA DA SILVA e a FERNANDO JOSÉ LIRA XAVIER, meu obrigada! “Pode ser que um dia deixemos de nos falar. Mas, enquanto houver amizade, faremos as pazes de novo. Pode ser que um dia o tempo passe. Mas, se a amizade permanecer, um do outro se há de lembrar. Pode ser que um dia nos afastemos. Mas, se formos amigos de verdade, a amizade nos reaproximará. Pode ser que um dia não mais existamos. Mas, se ainda sobrar amizade, nasceremos de novo, um para o outro. Pode ser que um dia tudo acabe.... Mas, com a amizade construiremos tudo novamente, cada vez de forma diferente. Sendo único e inesquecível cada momento que juntos viveremos e nos lembraremos para sempre...

“Albert Einstein”

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo investigar as características fitoquímicas e a toxicidade oral aguda dos extratos hidroalcoólicos de *Plectranthus neochilus*, Schlechter (boldo-gambá) e *Cnidioscolus quercifolius*, Pohl (favela) em camundongos Swiss, e a toxicidade dérmica e reparação tecidual de uma formulação em gel da associação destas espécies vegetais em ratos Wistar com feridas experimentais. Para as análises fitoquímicas utilizou-se um espectrofotômetro de massas XEVO G2-S QTOF (Waters, Manchester, UK) acoplado a um cromatógrafo de fase líquida Acquity UPLC e fonte de ionização para eletrospray ESI (Waters Corp., Milford, MA, USA). Para a análise toxicológica oral aguda foi utilizada a metodologia descrita no Guia 423 das diretrizes da OECD, onde foram utilizados nove camundongos Swiss, fêmeas, com três grupos (n=3/grupo): Grupo 1 - animais tratados com o extrato hidroalco de *Plectranthus neochilus* e *Cnidioscolus quercifolius*; Grupo 2 – tratados com o extrato de *Cnidioscolus quercifolius* e Grupo 3 - tratados com o extrato de *Plectranthus neochilus*. Todos em dose única (2000mg/kg), administradas por gavagem. Para a reparação tecidual e toxicidade dérmica utilizou-se 35 ratos Wistar, machos. Em todos os animais foi induzida uma ferida cirúrgica do tipo excisional na região dorso-cervical, os quais foram distribuídos em cinco grupos (n=7/grupo) e tratadas de acordo com o respectivo grupo: Grupo 1 - controle positivo, animais tratados com o gel fitoterápico comercial; Grupo 2 - controle negativo, tratados com o gel de carbopol 1%; Grupo 3 - Formulação Gel Boldo-gambá mais Favela (FGBF) 2,5%; Grupo 4 - FGBF 5%; Grupo 5 - FGBF 10%. Todos receberam 1,0ml do produto, via tópica, diariamente, durante 14 dias. Observou-se que os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade oral após exposição aos extratos testados. Contudo, o grupo tratado com o extrato hidroalcoólico de *P. neochilus* na dose estudada, apresentou aumento estatisticamente significativo quanto ao peso do fígado comparado ao grupo tratado com *C. quercifolius* ou com os dois extratos associados. Na análise macroscópica verificou-se a presença de inflamação, granulação e epitelização nas feridas de todos os grupos de ratos tratados topicamente. No primeiro dia de tratamento nos grupos FGBF 5% ou 10% verificou-se aumento significativo (52,53% e 53,51%) das médias e erro padrão da média da área cirúrgica. Do segundo até o sexto dia de tratamento no grupo FGBF 2,5% houve aumento significativo de 30,24%, 54,82%, 55,62%, 65,60%, 63,77%. Do quarto até o sexto dia houve aumento de 71,07%, 59,65% e 94,49% nos tratados com FGBF 5%. Os animais tratados com FGBF 10% apresentou um aumento significativo (54,32%, 94,91% e 116,70%) do quarto ao sexto dia. No oitavo dia de tratamento no grupo 2,5% houve aumento significativo de 115,30%. Todas as alterações verificadas anteriormente foram comparadas com o grupo controle positivo. Os grupos tratados com FGBF 2,5%, 5% ou 10% apresentaram no 14º dia o processo de reepitelização em 85,72%, 85,72% e 57,15% respectivamente, enquanto os grupos controle positivo e negativo em 100%. O peso corporal dos ratos tratados topicamente com FGBF 10% teve redução significativa quando comparados aos outros grupos tratados, nos tempos zero, sete, dez e treze dias de tratamento. A quantificação do colágeno teve redução estatisticamente significativa nos grupos de FGBF 5% e 10%, quando comparado ao tratado com o fitoterápico comercial. No hemograma houve aumento significativo na contagem de plaquetas nos grupos FGBF 2,5% (13,22%) e FGBF 10% (22,94%). Na análise bioquímica observou-se uma redução estatisticamente significativa nos níveis de colesterol nos grupos FGBF 2,5% (40,02%), 5% (38,59%) e 10% (34,06%); A fosfatase alcalina teve aumento significativo nos grupos FGBF 2,5% (46,24%) e 5% (31,80%); Na ALT e AST houve aumento significativo no grupo FGBF 5% (95,39% e 38,55%). Todos foram comparados com o grupo tratado com o veículo da formulação. A análise

histomorfológica do fígado dos ratos apresentou no grupo 5% leve infiltrado inflamatório subcapsular, hepatócitos com morfologia normal, inclusões lipídicas, núcleos e nucléolos evidentes. Conclui-se que os extratos hidroalcoólicos de *P. neochilus* e *C. quercifolius* quando administrados associados e/ou isolados em dose única (2000mg/kg), por gavagem, em camundongos Swiss não causou morte em nenhum animal, classificando como “classe toxicológica V”, como de baixa toxicidade. As três formulações (FGBF 2,5%, 5% ou 10%) quando comparadas ao controle positivo, não resultou em melhora significativa na redução do tempo para o processo de cicatrização das feridas cutâneas de ratos. Contudo, entre as três formulações, a de 2,5% foi aquela que apresentou aumento na proliferação de fibroblastos e colagenização mais intensa no 14º dia de tratamento.

Palavras-chave: Fitoterapia, toxicologia, fitoquímica, dermatologia, cicatrização, ratos

ABSTRAT

The objective of this work was to investigate the phytochemical characteristics and acute oral toxicity of the hydroalcoholic extracts of *Plectranthus neochilus*, Schlechter (boldo-opossum) and *Cnidocolus quercifolius*, Pohl (favela) in Swiss mice, and the dermal toxicity and tissue repair of a formulation in Gel of the association of these plant species in Wistar rats with experimental wounds. For the phytochemical analyzes, a XEVO G2-S QTOF (Waters, Manchester, UK) mass spectrometer coupled to an Acquity UPLC liquid phase chromatograph and ESI electrospray ionization source (Waters Corp., Milford, MA, USA). For acute oral toxicological analysis, the methodology described in Guide 423 of the OECD guidelines was used, in which nine female Swiss mice were used with three groups (n = 3 / group): Group 1 - animals treated with *Plectranthus* hydroalcohol extract *Neochilus* and *Cnidocolus quercifolius*; Group 2 - treated with the extract of *Cnidocolus quercifolius* and Group 3 - treated with the extract of *Plectranthus neochilus*. All in single dose (2000mg / kg), administered by gavage. For tissue repair and dermal toxicity 35 male Wistar rats were used. In all animals, a surgical wound of the excisional type was induced in the dorso-cervical region, which were distributed in five groups (n = 7 / group) and treated according to the respective group: Group 1 - positive control, animals treated with The commercial herbal gel; Group 2 - negative control, treated with carbopol gel 1%; Group 3 - Formulation Gel Boldo-opossum plus Favela (FGBF) 2.5%; Group 4 - FGBF 5%; Group 5 - FGBF 10%. . All received 1.0 ml of the product, topically, daily, for 14 days. It was observed that the animals showed no clinical signs of oral toxicity after exposure to the tested extracts. However, the group treated with the hydroalcoholic extract of *P. neochilus* at the dose studied presented a statistically significant increase in liver weight compared to the group treated with *C. quercifolius* or the two extracts associated. Macroscopic analysis revealed the presence of inflammation, granulation and epithelization in the wounds of all groups of rats treated topically. On the first day of treatment in the 5% or 10% FGBF groups there was a significant increase (52.53% and 53.51%) of the means and standard error of the mean of the surgical area. From the second to the sixth day of treatment in the 2.5% FGBF group there was a significant increase of 30.24%, 54.82%, 55.62%, 65.60%, 63.77%. From the fourth to the sixth day there was an increase of 71.07%, 59.65% and 94.49% in those treated with FGBF 5%. Animals treated with 10% FGBF showed a significant increase (54.32%, 94.91% and 116.70%) from the fourth to the sixth day. On the eighth day of treatment in the 2.5% group there was a significant increase of 115.30%. All the previously verified changes were compared with the positive control group. The groups treated with 2.5%, 5% or 10% FGBF presented on the 14th day the re-epithelialization process in 85.72%,

85.72% and 57.15% respectively, whereas the positive and negative control groups in 100% . The body weight of the mice treated topically with 10% FGBF had a significant reduction when compared to the other treated groups at times zero, seven, ten and thirteen days of treatment. The collagen quantification had a statistically significant reduction in the 5% and 10% FGBF groups when compared to the commercial herbal treatment. On the blood count, there was a significant increase in the platelet count in the FGBF groups, 2.5% (13.22%) and 10% FGBF (22.94%). In the biochemical analysis a statistically significant reduction in cholesterol levels was observed in the FGBF groups, 2.5% (40.02%), 5% (38.59%) and 10% (34.06%); Alkaline phosphatase had a significant increase in the FGBF groups of 2.5% (46.24%) and 5% (31.80%); In ALT and AST there was a significant increase in the 5% FGBF group (95.39% and 38.55%). All were compared to the vehicle treated group of the formulation. The histomorphological analysis of the liver of the rats presented in the 5% group mild subcapsular inflammatory infiltrate, hepatocytes with normal morphology, lipid inclusions, nuclei and evident nucleoli. It is concluded that the hydroalcoholic extracts of *P. neochilus* and *C. quercifolius* when administered in association with and / or isolated in a single dose (2000mg / kg) by gavage in Swiss mice did not cause death in any animal, classifying them as "toxicological class V "As low toxicity. The three formulations (FGBF 2.5%, 5% or 10%) when compared to the positive control, did not result in a significant improvement in the reduction of the time to the healing process of the cutaneous wounds of rats. However, among the three formulations, that of 2.5% was the one that presented increased fibroblast proliferation and more intense collagenization on the 14th day of treatment.

Keywords: Phytotherapy, toxicology, phytochemistry, dermatology, healing, rats

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - Folhas e flores de Boldo-gambá (<i>Plectranthus neochilus</i>) | 21 |
| FIGURA 2 - Boldo-gambá (<i>Plectranthus neochilus</i>) | 21 |
| FIGURA 3 - Folhas e flores da faveleira (<i>Cnidocolus quercifolius</i>) | 22 |
| FIGURA 4 - Faveleira (<i>Cnidocolus quercifolius</i>) | 22 |
| FIGURA 5 – Representação das camadas que compõem a pele | 25 |

ARTIGO 1

| | |
|--|----|
| FIGURA 1A e 1B - UPLC-DAD (290nm) de etanol extraído de folhas de <i>Plectranthus neochilus</i> (boldo-gambá). Cromatogramas de ions de pico de base de extratos de etanol extraídos obtidos por um método de recolha de dados de MSE (UPLC-Q-TOF / MSE) em modo negativo | 62 |
| FIGURA 2A e 2B - UPLC-DAD (290nm) de etanol extraído da entrecasca da <i>Cnidocolus quercifolius</i> (favela). Cromatogramas de ions de pico de base de extratos de etanol extraídos obtidos por um método de recolha de dados de MSE (UPLC-Q-TOF / MSE) em modo negativo | 63 |
| FIGURA 3A e 3B - Espectro UV e de massa do composto principal de etanol extraído de folhas de <i>Plectranthus neochilus</i> (boldo-gambá) | 63 |
| FIGURA 4A e 4B - Espectro UV e de massa do composto principal de etanol extraído da entrecasca de <i>Cnidocolus quercifolius</i> (favela) | 64 |
| FIGURA 5 – Evolução ponderal do peso corporal (g) de camundongos fêmeas durante o estudo da toxicidade oral aguda com os extratos hidroalcoólicos de <i>Plectranthus neochilus</i> (boldo-gambá) e/ou <i>Cnidocolus quercifolius</i> (favela) | 66 |
| FIGURA 6 - Peso relativo dos órgãos (g) dos animais durante o estudo de toxicidade oral aguda com os extratos hidroalcoólicos de <i>Plectranthus neochilus</i> (boldo-gambá) e/ou <i>Cnidocolus quercifolius</i> (favela) | 67 |
| FIGURA 7 - Evolução ponderal do peso corporal (g) de ratos Wistar machos durante o estudo da toxicidade dérmica dos grupos controle positivo (fitoterápico comercial), | |

controle negativo (veículo), Formulação em Gel da associação de *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá) e/ou *Cnidocolus quercifolius* (favela) nas concentrações 2,5%, 5% ou 10% 68

FIGURA 8 - Peso relativo dos órgãos (g/100g) dos ratos Wistar machos durante o estudo de toxicidade dérmica dos grupos controle positivo (fitoterápico comercial), controle negativo (veículo), Formulação em Gel da associação de *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá) e/ou *Cnidocolus quercifolius* (favela) nas concentrações 2,5%, 5% ou 10% 69

FIGURA 9 A, B, C, D, E - Fotomicrografia do parênquima hepático sem alterações morfológicas. **A** – Ratos do grupo controle positivo; **B** – Ratos do grupo controle negativo; **C** – Ratos do grupo FGBF 2,5%; **D** – Ratos do grupo FGBF 5% e **E** – Ratos do grupo 10% apresentando leve infiltrado inflamatório subcapsular; hepatócitos com morfologia normal, com inclusões lipídicas, núcleos e nucléolos evidente 73

ARTIGO 2

FIGURA 1 - Procedimento cirúrgico para ferida excisional em ratos Wistar: **A** – Tricotomia manual; **B** – Molde metálico vazado; **C** – Marcação com caneta; **D** – Remoção da pele utilizando tesoura reta de Iris e pinça de Adson; **E** – Ferida Excisional; **F** - Colocação do anel de contenção de silicone 88

FIGURA 2 - Evolução das feridas excisionais do grupo controle positivo e negativo; **A** – Dia zero; **B** – Dia 7, antes da retirada da crosta; **C** – Dia 14 com total reepitelização (controle positivo); **D** – Dia zero; **E** – Dia 7, antes da retirada da crosta; **F** – Dia 14 com total reepitelização (controle negativo) 92

FIGURA 3 - Evolução das feridas excisionais do grupo FGBF 2,5%, 5 e 10%; **A** – Dia zero; **B** – Dia 7, antes da retirada da crosta; **C** – Dia 14 com total reepitelização (FGBF 2,5%), **D** – Dia zero; **E** – Dia 7, antes da retirada da crosta; **F** – Dia 14 com total reepitelização (FGBF 5%); **G** – Dia zero; **H** – Dia 7, antes da retirada da crosta; **I** – Dia 14 com total reepitelização (FGBF 10%) 93

FIGURA 4 - Evolução do peso corporal (g) dos ratos Wistar machos tratados com fitoterápico comercial, veículo da formulação ou FGBF (2,5%, 5% ou 10%) 94

| | |
|---|----|
| FIGURA 5 - Espessura do epitélio da pele dos ratos Wistar machos tratados com fitoterápico comercial, veículo da formulação ou FGBF (2,5%, 5% ou 10%) | 94 |
| FIGURA 6 - Quantificação do colágeno da pele dos ratos Wistar machos tratados com fitoterápico comercial, veículo da formulação ou FGBF (2,5%, 5% ou 10%) | 95 |
| FIGURA 7 - Quantificação de vasos sanguíneos da pele dos ratos Wistar machos tratados com fitoterápico comercial, veículo da formulação ou FGBF (2,5%, 5% ou 10%) | 95 |
| FIGURA 8 - A - Fotomicrografia da pele de ratos do grupo controle positivo, apresentando reepitelização completa da epiderme e derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais, fibroblastos e vasos sanguíneos. B - Fotomicrografia da derme profunda da pele de ratos do grupo controle positivo, apresentando fibroblastos, fibras colágenas transversais e longitudinais, vasos sanguíneos e escassas células inflamatórias | 96 |
| FIGURA 9 - A - Fotomicrografia da pele de ratos do grupo controle negativo, apresentando reepitelização completa da epiderme e derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais, fibroblastos, fibrócitos e vasos sanguíneos. B - Fotomicrografia da derme profunda da pele, apresentando fibroblastos, fibras colágenas longitudinais e transversais, vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias mononucleares | 97 |
| FIGURA 10 - A - Fotomicrografia da pele de ratos do grupo FGBF 2,5%, apresentando reepitelização completa da epiderme e derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais e transversais, com presença de fibroblastos e muitos vasos sanguíneos. B - da derme profunda da pele, apresentando muitos fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias mononucleares | 97 |
| FIGURA 11 - A - Fotomicrografia da pele de ratos do grupo FGBF 5%, apresentando reepitelização completa da epiderme, porém, estrato córneo não evidenciado nessa imagem; derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais, fibroblastos e muitos vasos sanguíneos. B - Fotomicrografia da derme profunda da pele, apresentando muitas células inflamatórias mononucleares difusas em meio a fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos | 98 |

FIGURA 12 - A - Fotomicrografia da pele de ratos do grupo FGBF 10%, apresentando reepitelização completa da epiderme e derme com presença de fibroblastos e vasos sanguíneos. **B** - Fotomicrografia da derme profunda da pele, apresentando muitas células inflamatórias mononucleares difusas em meio a fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos 98

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 1 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar machos tratados com o gel fitoterápico comercial, veículo da formulação ou FGBF (2,5%, 5% ou 10%) 70

TABELA 2 - Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos tratados com o gel fitoterápico comercial, veículo da formulação ou FGBF (2,5%, 5% ou 10%) 72

ARTIGO 2

TABELA 1 - Área cirúrgica de ferida excisional em ratos nos grupos controle positivo, controle negativo ou FGBF (2,5%, 5% ou 10%) 91

SUMÁRIO

| | | |
|--------|---|-----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 | OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 | Objetivo geral | 17 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 17 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 3.1 | Plantas medicinais | 18 |
| 3.2 | Uso de plantas medicinais como cicatrizantes | 19 |
| 3.3 | <i>Plectranthus neochilus</i> Schlechter, Lamiaceae | 20 |
| 3.4 | <i>Cnidocolus quercifolius</i> Pohl, Euphorbiaceae | 22 |
| 3.5 | Fármacos convencionais utilizados como cicatrizantes | 24 |
| 3.6 | Anatomia e fisiologia da pele | 25 |
| 3.7 | Classificação das feridas | 26 |
| 3.7.1 | De acordo com o agente causal | 27 |
| 3.7.2 | Quanto ao grau de contaminação | 27 |
| 3.7.3 | Quanto ao comprometimento tecidual | 27 |
| 3.8 | Classificação da cicatrização | 28 |
| 3.9 | Fases da reparação tecidual | 29 |
| 3.9.1 | Fase inflamatória | 29 |
| 3.9.2 | Fase fibroblástica e de deposição da matriz extracelular | 34 |
| 3.9.3 | Remodelação | 42 |
| 3.10 | Fatores que interferem no processo de cicatrização | 45 |
| 3.10.1 | Fatores locais | 46 |
| 3.10.2 | Fatores gerais | 46 |
| 4 | ARTIGO 1 - Avaliação da segurança e características fitoquímicas do extrato de <i>Plectranthus neochilus</i> , Schlechter (boldo-gambá) e <i>Cnidocolus quercifolius</i> (favela) | 48 |
| 5 | ARTIGO 2 - Avaliação da reparação tecidual do gel fitoterápico de <i>Plectranthus neochilus</i> , Schlechter (boldo-gambá) e <i>Cnidocolus quercifolius</i> Pohl (favela) em ratos Wistar | 81 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 102 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 103 |

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Plectranthus neochilus* Schlechter, conhecida como boldo-gambá, pertence ao gênero *Plectranthus*, família Lamiaceae (sub-família Nepetoideae), contendo cerca de 350 espécies de ervas e arbustos perenes nativas de regiões tropicais da África, Ásia e Austrália (CODD, 1985). Várias espécies do gênero *Plectranthus* são cultivadas como tubérculos comestíveis, condimentos, fragrâncias para xampus, plantas ornamentais ou como fontes de óleos essenciais (ASCENSÃO et al., 1999), preparações farmacêuticas, perfumaria e cosméticos (ASCENSÃO et al., 1998), componentes de preparações cosméticas patenteadas como anti-sinais (OKAMOTO et al., 2005), e produtos para a estimulação do crescimento capilar (KANEDA et al., 2005). As diversas utilizações na medicina tradicional incluem tratamentos de dores de cabeça, feridas, queimaduras, dermatite, alergias, picadas de inseto e de escorpião e como agente anti-séptico (ASCENSÃO et al., 1998, 1999).

Estudos químicos das espécies do gênero *Plectranthus* são descritos desde a década de 60. Até o momento, foram identificados mais de 200 compostos isolados das espécies do gênero, sendo os diterpenóides os principais metabólitos secundários presentes. O estudo fitoquímico do extrato hexânico das folhas e caules de *P. neochilus* forneceu dois triterpenos, a friedelina e α -amirina esterificada na posição C-3. A investigação química foi realizada ainda com o extrato em acetato de etila das folhas e caules da planta, conduziu ao isolamento da flavona metoxilada nas posições C-6 e C-7, conhecida como cirsimaritina, isolada previamente em *P. ecklonii* e *P. Fruticosus* (VIANA, 2002).

A *Cnidoscolus quercifolius* Pohl é popularmente conhecida como favela ou faveleira, pertencente ao gênero *Plectranthus*, família Euphorbiaceae, está presente nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia e dentre outros (DUQUE, 2004). O gênero *Cnidoscolus* compreende cerca de 50-75 espécies, distribuídas excepcionalmente na América tropical e concentradas, principalmente, no México e Nordeste do Brasil (WEBSTER, 1994). Essas espécies possuem diversas propriedades medicinais, dentre elas, atividade antitumoral, anti-inflamatória para o sistema genito-urinário, antisséptica e no tratamento de infecções renais, dermatológicas e lesões oftalmológicas, contusões, fraturas, feridas, verrugas, disenteria, hemorragia, apendicite e reumatismo (AGRA et al., 2008). Na medicina popular do Nordeste, a decocção, a infusão e maceração das cascas e entrecasas do caule são empregadas contra inflamações ovarianas e inflamações gerais (LORENZI e MATOS, 2002).

Gomes (2014) relatou que na análise fitoquímica da *Cnidoscolus quercifolius* indicou reação positiva para presença de cumarinas, flavonóides, monoterpenos/diterpenos e naftoquinonas no extrato etanólico da casca, enquanto, o extrato etanólico das folhas demonstrou reação positiva para

cumarinas, derivados antracênicos, flavonóides, lignanas e triterpenos/esteróides. Não foram detectados no extrato da casca os seguintes constituintes: alcaloides, antocianinas, derivados antracênicos, lignanas, saponinas e triterpenos/esteróides. O extrato da folha evidenciou reação negativa para alcaloides, antocianinas, monoterpenos/diterpenos, naftoquinonas e saponinas.

A toxicidade oral aguda é um método utilizado para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando administrada durante um período não superior a 24 horas, seguido da observação dos animais por 14 dias após essa administração (OECD 423, 2001). É importante o estudo fitoquímico e a toxicidade da planta para o conhecimento dos componentes químicos, como princípios ativos, podendo contribuir na aplicação de produtos farmacêuticos e indicar os efeitos nocivos no organismo, por ingestão, ou absorção cutânea. As plantas medicinais e outros produtos naturais são recursos terapêuticos amplamente utilizados no auxílio da cicatrização de feridas cutâneas (EURIDES et al.,1998).

A pele é a primeira barreira de proteção do organismo contra agentes externos, e sujeita a constantes agressões e sua capacidade de reparação tecidual é de grande importância para a sobrevivência (NOGUEIRA, 2005). Plantas medicinais como *Calendula officinalis*, *Stryphnodendron barbatiman*, *Aloe vera*, *Matricaria chamomilla*, entre outras são utilizadas no tratamento de feridas. A associação da *Plectranthus neochilus* e *Cnidocolus quercifolius* em um preparado semissólido tem sido usado como cicatrizante em lesões de pele em animais, porém sem o embasamento científico necessário para que seja estabelecida a segurança e eficácia terapêutica.

Diante da importância da *Plectranthus neochilus* e *Cnidocolus quercifolius*, como possíveis fitoterápicos para a medicina popular, objetivou-se obter extratos hidroalcoólicos e analisar as características fitoquímicas e toxicológica oral aguda destas plantas em camundongos, investigar o efeito de uma Formulação em Gel da associação do Boldo-gambá e Favela (FGBF), no processo de reparação tecidual e toxicidade dérmica de feridas experimentais em ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade aguda e o efeito cicatrizante de um Gel à base de *Plectranthus neochilus*, Schlechter (Boldo-gambá) e *Cnidocolus quercifolius*, Pohl (Favela) em feridas cutâneas de roedores.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar as características fitoquímicas do extrato hidralcoólico de *Plectranthus neochilus* e *Cnidocolus quercifolius*;
- Avaliar a toxicidade oral aguda e determinar a DL_{50} de uma Formulação em Gel da associação do Boldo-gambá e Favela (FGBF) em camundongos Swiss;
- Avaliar a toxicidade dérmica de uma FGBF em ferida cutâneas de ratos Wistar;
- Avaliar a atividade de uma FGBF na reparação tecidual em ferida cutânea de ratos Wistar.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas medicinais

Nas referências históricas sobre plantas medicinais, podemos verificar que existem relatos de seu uso em praticamente todas as antigas civilizações. A primeira referência escrita sobre o uso de plantas como remédios é encontrada na obra chinesa Pen Ts'ao (“A Grande Fitoterapia”), de Shen Nung, que remonta a 2800 a.C (ELDIN e DUNFORD, 2001).

No Egito, antigos papiros mostram que, a partir de 2000 a.C., grande número de médicos utilizava as plantas como remédio e considerava a doença como resultado de causas naturais e não como consequência dos poderes de espíritos maléficos. No Papiro Ebers, que data de cerca de 1500 a.C., foram mencionadas cerca de 700 drogas diferentes, incluindo extratos de plantas, metais como chumbo e cobre, e venenos de animais de várias procedências. Neste mesmo papiro, mencionam-se ainda fórmulas específicas para doenças conhecidas e, dentre as espécies que aparecem na lista, estão incluídas algumas utilizadas por fitoterapeutas até hoje (ELDIN e DUNFORD, 2001).

Outros relatos demonstram também que, desde 2300 a.C., os egípcios, assírios e hebreus cultivavam diversas ervas e traziam de suas expedições tantas outras, e com estas plantas criavam classes de medicamentos. Esses autores referem, ademais, que, na antiga Grécia, as plantas e o seu valor terapêutico ou tóxico eram muito conhecidos e que Hipócrates (460-377 a.C.), denominado o “Pai da Medicina”, reuniu em sua obra *Corpus Hipocratium* a síntese dos conhecimentos médicos de seu tempo, indicando para cada enfermidade o remédio vegetal e o tratamento adequado (MARTINS et al., 2000).

Na Bíblia, tanto no Antigo como no Novo Testamento, há muitas referências a plantas curativas ou seus derivados, como, por exemplo, o aloés (*Aloe vera*), o benjoim (*Styrax benzoin*), a mirra (*Commiphora myrrha*), entre outros. Na Idade Média, os eventos históricos que surgiram na Europa, como a ascensão e queda do Império Romano e o fortalecimento da Igreja Católica, exerceram enorme influência sobre todo o conhecimento existente na época. Por consequência desta influência, a medicina, o estudo e as informações sobre as plantas medicinais se mantiveram estagnados por um longo período. No Brasil, a história da utilização de plantas, no tratamento de doenças, apresenta influências da cultura africana, indígena e europeia (MARTINS et al., 2000).

A crença popular de que a utilização de plantas para tratar doenças obtinha resultados satisfatórios, aos poucos foi sendo substituída pelo uso dos remédios industrializados, que atraíam as pessoas com a promessa de cura rápida e total. Atualmente este panorama começa a ser modificado. Apesar das drogas sintéticas ainda representem a maioria dos medicamentos utilizados pela população, os fitoterápicos também têm conseguido espaço cada vez maior na farmácia caseira. Nos países em desenvolvimento, entre eles o Brasil, assim como em países desenvolvidos, a

partir da segunda metade dos anos 70 e década de 80, teve verificado o crescimento das “medicinas alternativas” e, entre elas, a fitoterapia (GRAMS, 1999; ALVES e SILVA, 2002).

Esse aumento do consumo de fitoterápicos pode ser associado ao fato de que as populações estão questionando os perigos do uso abusivo e irracional de produtos farmacêuticos e procuram substituí-los por produtos naturais. A comprovação da ação terapêutica também favorece essa dinâmica. Além disso, registra-se a insatisfação da população perante o sistema de saúde oficial e também a necessidade de poder controlar seu próprio corpo e recuperar sua saúde, assumindo as práticas de saúde para si ou para sua família (LEITE, 2000).

A fitoterapia evoluiu e sofisticou-se: portanto o conhecimento sobre o poder curativo das plantas não pode mais ser considerado apenas como tradição passada de pais para filhos, mas como ciência que vem sendo estudada, aperfeiçoada e aplicada por diversas culturas, ao longo dos tempos.

3.2 Uso de plantas medicinais como cicatrizantes

Um dos avanços, além da Política Nacional de Plantas Medicinais (Brasil, 2006a) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (Brasil, 2006b), trata-se da RDC nº 10, de 2010, que traz uma lista com 66 plantas medicinais que podem ser utilizadas e distribuídas pelos serviços de saúde, elucidando aspectos como dose, preparação e contraindicações. Dentre as plantas citadas, oito delas são indicadas para cicatrização de feridas, com comprovadas ações, sendo que algumas já foram citadas anteriormente no presente estudo (Brasil, 2010a).

Dentre as principais, destacam-se a *Anacardium occidentale* L., *Caesalpinia ferrea* Mart., *Casearia sylvestris* Sw., *Schinus terebinthifolia* Raddi, *Stryphnodendrom adstringens* (Mart.) Coville, *Calendula officinalis* L., *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek e *Polygonum punctatum* Elliott (Brasil, 2010a). Além disso, a planta *Schinus terebinthifolius* Raddi., com ações cicatrizantes, já é distribuída pelo sistema de saúde brasileiro na forma de medicamento fitoterápico, integrando a lista da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (Brasil, 2010b).

Dentre os fitoterápicos destacam-se, também, as soluções hidro-alcoólica de *Calendula officinalis* (calêndula) e de *Symphytum officinale* (confrey), produtos utilizados na homeopatia e na alopatia (ROSLINDO et al., 1999). A *Calendula officinalis* foi amplamente empregada na medicina popular européia, sendo atualmente aprovada pela comissão científica alemã como anti-séptica e cicatrizante (BROWN e DATNER, 1998; BEDI e SHENEFELT, 2002). Possui na sua composição uma fração lipofílica, os triterpenóides, responsáveis pela ação antiinflamatória (AKIHISA et al., 1996), carotenóides, flavonóides, carboidratos, ácidos graxos e polissacarídeos, que lhe conferem ação epitelizante e imunoestimulante (CARRICONDE, 1995a; BROWN e DATNER, 1998). A inflorescência é a parte da planta empregada na terapêutica (TESKE e

TRENTINI, 1995). Com relação ao confrey, possui na sua composição alcalóides pirrolizídnicos, alantoína, tanino (ROSLINDO et al., 1999) e saponinas triterpenóides (MOHAMMAD et al., 1995). Possui efeito cicatrizante, antiinflamatório, antirreumático e antiulcerogênico (CARRICONDE, 1997).

Considera-se também o uso popular do barbatimão, produto fitoterápico extraído a quente em solução aquosa do *Stryphnodendron barbatiman*, espécie incluída na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. Contém no mínimo 20% de tanino, princípio ativo que confere à casca ação adstringente, explicando seu uso como cicatrizante (PANIZZA et al, 1988). Os taninos precipitam as proteínas dos tecidos lesados, formando um revestimento protetor que favorece a sua reparação (NETO et al., 1996), diminuindo a permeabilidade e exsudação da ferida (BROWN e DATNER, 1998; BEDI e SHENEFELT, 2002).

Com base no exposto, as plantas medicinais tornam-se alternativas de grande relevância para o processo de cicatrização de feridas, que começam a fazer parte da atenção à saúde brasileira, considerando que seu uso seja validado por estudos que afirmem seu potencial cicatrizante, o que sugere novos estudos de comprovação clínica, custos e benefícios, e a constante atualização acerca das publicações realizadas.

3.3 *Plectranthus neochilus* Schlechter (boldo-gambá)

A espécie *Plectranthus neochilus* Schlechter, conhecida como boldo-gambá, pertence ao gênero *Plectranthus*, família Lamiaceae (sub-família Nepetoideae), contendo aproximadamente 350 espécies de ervas e arbustos perenes nativas de regiões tropicais da África, Ásia e Austrália (CODD, 1985). São cultivadas como tubérculos comestíveis, condimentos, fragrâncias para xampus, plantas ornamentais ou como fontes de óleos essenciais (ASCENSÃO et al., 1999), que são utilizados amplamente em preparações farmacêuticas, em perfumaria e cosméticos (ASCENSÃO et al., 1998). Alguns extratos são utilizados também como componentes de preparações cosméticas patenteadas como anti-sinais (OKAMOTO et al., 2005), e produtos para a estimulação do crescimento capilar (KANEDA et al., 2005).

As diversas utilizações das espécies do gênero *Plectranthus*, na medicina tradicional incluem tratamentos de dores de cabeça, feridas, queimaduras, dermatite, alergias, picadas de inseto e de escorpião e como agente anti-séptico (ASCENSÃO et al., 1998, 1999).

Estudos químicos das espécies do gênero *Plectranthus*, dentre elas o *Plectranthus neochilus* (Figuras 1 e 2) são descritos desde a década de 60. Até o momento, foram identificados mais de 200 compostos isolados das espécies do gênero, sendo os diterpenóides os principais metabólitos secundários presentes. Os diterpenos formam uma classe de metabólitos secundários que apresentam uma grande variedade estrutural. Estas substâncias são encontradas em angiospermas,

principalmente nas famílias Asteraceae e Lamiaceae, sendo esta última a que se encontra o gênero *Plectranthus* (WALDIA et al., 2011).



Figura 1. Folhas e flores de Boldo-gambá (*Plectranthus neochilus*) (FONTE: terranostra-terranostra.blogspot.com.br)



Figura 2. Boldo-gambá (*Plectranthus neochilus*) (FONTE: terranostra-terranostra.blogspot.com.br)

Diterpenóides são compostos predominantes no gênero *Plectranthus*, com aproximadamente 170 identificados nas espécies do gênero. A maioria dos compostos identificados é do tipo abietanóides altamente modificados. Vale ressaltar que vários dos abietanóides isolados do gênero *Plectranthus* são substâncias de interesse farmacológico (GASPAR-MARQUES et al., 2005).

Os diterpenóides labdanos são também uma importante classe de substâncias bioativas presentes no gênero *Plectranthus*, descritos em algumas espécies como *P. barbatus*, *P. fruticosus* e *P. ornatus* (LUKHOBBA et al., 2006). Para a espécie *P. barbatus*, são descritos 68 diterpenóides. Destes, 25 são pertencentes à classe dos abietanos e 43 a dos labdanos (ALASBAHI et al., 2010), sendo a China e a Índia os países responsáveis pelo isolamento da maioria destes compostos (CHANG et al., 1984; YOUSIF et al., 2000).

Outros diterpenos isolados no gênero *Plectranthus* incluem filocladanos tetracíclicos (ou 13- β -cauranos) e derivados caurânicos, como a camebacaurina. Diterpenóides caurânicos foram identificados em um grande número de plantas medicinais e são utilizados no tratamento de inflamações e câncer (LEE et al., 2002).

O estudo realizado por Waldia et al. (2011) mostram o isolamento de triterpenos tipo esqualeno (acíclicos), ambreina (tricíclicos), lanosterol (tetracíclico) e amirinas (pentacíclicos), flavonas e ácidos graxos em diferentes espécies do gênero *Plectranthus*. Foram encontrados triterpenos em *Plectranthus caninus*, *P. rugosus* e *P. straitus*. As flavonas 3,7-dimetilquercetina e 3,7-dimetilcanferol foram encontradas em partes aéreas de *P. caninus*.

O estudo fitoquímico do extrato hexânico das folhas e caules de *Plectranthus neochilus*, forneceu dois triterpenos, a friedelina e α -amirina esterificada na posição C-3. Deste extrato foi obtida também a mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol. A investigação química foi

realizada ainda com o extrato em acetato de etila das folhas e caules da planta, conduziu ao isolamento da flavona metoxilada nas posições C-6 e C-7, conhecida como cirsimaritina, isolada previamente em *Plectranthus ecklonii* e *P. fruticosus*, e a obtenção de quantidades adicionais da mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol. Os flavonóides têm ocorrência restrita no gênero *Plectranthus*, sendo descrito o isolamento principalmente de flavonas, flavonóis e flavanonas e os diterpenos são os metabólitos secundários de maior ocorrência nas espécies (VIANA, 2002).

A família Lamiaceae compreende espécies citadas como potenciais fontes de compostos antifúngicos, antibacterianos e inseticidas (RASIKARI et al., 2005; MATU et al., 2003). Entretanto, poucos estudos descrevem o fracionamento monitorado por atividades biológicas para o isolamento de compostos associados a usos específicos etnobotânicos das espécies de *Plectranthus* (LUKHOBÁ et al., 2006).

Os extratos metanólicos das folhas, caules e das flores de *Plectranthus neochilus* mostraram moderado poder de retirada de radical DPPH em ensaio de avaliação da atividade antioxidante, sendo o extrato metanólico das folhas e caules, o que mostrou o maior poder de retirada de radical, confirmado pelo conteúdo de fenólicos totais dos extratos (VIANA, 2002).

3.4 *Cnidoscolus quercifolius* Pohl (Favela)

Pertencente à família Euphorbiaceae, a espécie *Cnidoscolus quercifolius* Pohl, (Figura 3 e 4) está presente nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia e dentre outros (DUQUE, 2004). A espécie é conhecida popularmente como favela ou faveleira, sendo uma árvore de porte pequeno e muito conhecida por possuir tricomas urticantes distribuídos por toda a planta (MAIA-SILVA et al., 2012). Na medicina popular do Nordeste, a decocção, a infusão e maceração das cascas e entrecasas do caule são empregadas contra inflamações ovarianas e inflamações gerais (LORENZI e MATOS, 2002).



Figura 3. Folhas e flores da faveleira (*Cnidoscolus quercifolius*) (FONTE: www.ebah.com.br)



Figura 4. Faveleira (*Cnidoscolus quercifolius*) (FONTE: www.ebah.com.br)

Essas espécies possuem diversas propriedades medicinais, dentre elas, atividade antitumoral, anti-inflamatória para o sistema genito-urinário, antisséptica e no tratamento de infecções renais, dermatológicas e lesões oftalmológicas, contusões, fraturas, feridas, verrugas, disenteria, hemorragia, apendicite e reumatismo (AGRA et al., 2008). Outro fato relevante, é que várias espécies do gênero *Cnidocolus* possuem atividade antioxidante, dentre elas, as raízes de *C. infestus* e as folhas de *C. pubescens* (SOBRINHO et al., 2011).

É característica desta família, a ocorrência de vários metabólitos secundários. Uma classe de metabólitos secundários presentes na família são os diterpenos, os mesmos são considerados o grupo de substâncias mais característico e complexo da família (SALATINO et al., 2007).

Gomes (2014) na análise fitoquímica da *Cnidocolus quercifolius* indicou reação positiva para presença de cumarinas, flavonoides, monoterpênicos/diterpenos e naftoquinonas no extrato hidroalcoólico da casca, enquanto, o extrato hidroalcoólico das folhas demonstrou reação positiva para cumarinas, derivados antracênicos, flavonoides, lignanas e triterpenos/esteroides. Não foram detectados no extrato hidroalcoólico da casca os seguintes constituintes: alcaloides, antocianinas, derivados antracênicos, lignanas, saponinas e triterpenos/esteroides. O extrato hidroalcoólico das folhas evidenciou reação negativa para alcaloides, antocianinas, monoterpênicos/diterpenos, naftoquinonas e saponinas.

Estudos fitoquímicos dos extratos de *Cnidocolus quercifolius* possibilitou a análise qualitativa dos seus metabólitos secundário, podendo evidenciar nos extratos hexânicos das folhas e galhos a presença de flavonoides do tipo flavonas, flavonóis e xantonas, bem como, triterpenóides pentacíclicos livres em suas raízes. Observou-se novamente a presença de flavonas, flavonóis e xantonas em suas folhas, agora no extrato etanólico. Além disso, foi possível a determinação de saponinas nos extratos etanólicos das raízes e catequinas e flavanonas nos galhos da *C. quercifolius*. Já nos extratos hidrólicos, as folhas apresentaram testes positivos para análises de fenóis, flavonóides e xantonas e os galhos para fenóis, flavonóides e xantonas e saponinas (MORAIS et al., 2016).

Através do estudo quantitativo de alcalóides totais do extrato da *Cnidocolus quercifolius* pode-se observar que os extratos hidroalcoólicos das folhas apresentaram a menor porcentagem de alcalóides, apenas com 0,27 % no total. Obtiveram destaque os galhos e as raízes da *C. quercifolius* com 0,45 % e 0,62 %, respectivamente. O resultado mostra que partes, como os galhos e as raízes são boas fontes de alcaloides, compostos com inúmeras atividades biológicas e farmacológicas amplamente descritas na literatura. Vale ressaltar que a sua raiz apresentou teor de alcalóides superior aos descritos por Lúcio et al. (2002) em seu estudo utilizando *Pilocarpus pennatifolius* (com máximo de 0,53 %), reconhecida pela presença de diversos alcaloides, dentre eles a pilocarpina, utilizada no tratamento de glaucoma (MORAIS et al., 2016).

A análise do teor de taninos em *Cnidocolus quercifolius* demonstrou uma alta concentração em suas raízes, com 72,0 ppm, seguido dos galhos, 59,0 ppm, e das folhas, 22,0 ppm. Na literatura os testes para a quantificação de taninos são realizados, muitas vezes, a partir de extratos do caule das plantas visto que, estes, principalmente os taninos condensados, são associados pela alta concentração. No caso de *C. quercifolius* pode-se observar que a maior concentração de taninos se encontra nas raízes. Esse fato pode servir de questionamento para que sejam feitas pesquisas sobre a quantificação de taninos presentes em outras espécies vegetais, podendo assim permitir a descoberta de novas fontes desse grupo de substâncias (MORAIS et al., 2016).

Os extratos hidroalcoólicos das cascas e folhas da espécie *Cnidocolus quercifolius* apresentaram atividades antinociceptiva e anti-inflamatória relevantes nas doses testadas (100, 200 e 400mg/kg, intraperitoneal) e demonstraram efeito antinociceptivo envolvendo mecanismos centrais e periféricos, que podem estar relacionado aos receptores opioides, além de possuírem atividade anti-inflamatória, comprovadas pela diminuição da migração leucocitária e provavelmente envolve a inibição da síntese de mediadores pró-inflamatórios. Os extratos hidroalcoólicos são de baixa toxicidade, nas doses de 2,0 e 5,0 g/kg por via intraperitoneal e oral, respectivamente (GOMES, 2014).

Testes antioxidantes dos extratos da *Cnidocolus quercifolius* apresentaram uma capacidade antioxidante relativamente baixa com valores altos de CI50 quando comparados aos padrões positivos. Deve-se destacar, dentre estes, o extrato hexânico das folhas que apresentou uma relevante atividade antioxidante, com valor de CI50 (58,3 ppm) próximo ao obtido com o padrão positivo vitamina C (43,0 ppm) (MORAIS et al., 2016).

3.5 Fármacos convencionais utilizados como cicatrizantes

Os medicamentos cicatrizantes são facilmente encontrados em farmácias, geralmente na forma de pomada e variam de acordo com tipos de pele, gravidade dos ferimentos e outros fatores comuns.

O Nebacetin é um dos medicamentos mais conhecidos para esse fim, ele tem a função de também eliminar as bactérias do local afetado. É utilizado em casos de piercings e brincos inflamados. Novacorts é uma pomada composta basicamente de corticoides e possui solução antialérgica. O iruxol é o Cloranfenicol, antimicrobiano que está associado a colagenase. O cloranfenicol foi o primeiro antibiótico de amplo espectro produzido em laboratório. Foi isolado do *Streptomyces venezuelae*. Na atualidade é sintetizado. O principal derivado é o tianfenico I. É primeiramente bacteriostático, embora possa ser bactericida contra certas espécies, em determinadas condições. Inibe a síntese protéica das bactérias (DEF, 1996).

O cloranfenicol mostra-se eficaz contra microorganismos gram-positivos e negativos, *Rickettsia*, *Chlamydia* e *Mycoplasma*. Constitui o antibiótico mais eficaz no tratamento de infecções por *Salmonella* e por bacterióides, bem como infecções por anaeróbios. Durante o uso podem aparecer reações de hipersensibilidade, inclusive com o uso tópico. As doses terapêuticas do cloranfenicol podem interferir na resposta anamnésica ao toxóide tetânico de modo que não pode ser utilizado com a imunização ativa. Inibe a biotransformação das drogas metabolizadas pelas enzimas microssômicas hepáticas. Pode causar depressão medular levando a anemia, reticulocitopênica e leucopenia (DEF, 1996).

3.6 Anatomia e fisiologia da pele

A pele divide-se em três camadas específicas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 5). A epiderme é a camada externa de revestimento da pele. Sua permeabilidade é moderada à água e pouca em relação aos lipídeos. É composta por três diferentes tipos de linhagens celulares: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans e de Merkel (BLANES, 2004; CANDIDO, 2006).

É subdividida em camadas tais como a germinativa, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada germinativa, também conhecida como basal, é a mais profunda e faz limite com a derme. O pigmento melanina, presente na epiderme, protege os tecidos subjacentes contra os efeitos nocivos da luz ultravioleta. (BLANES, 2004; CANDIDO, 2006).

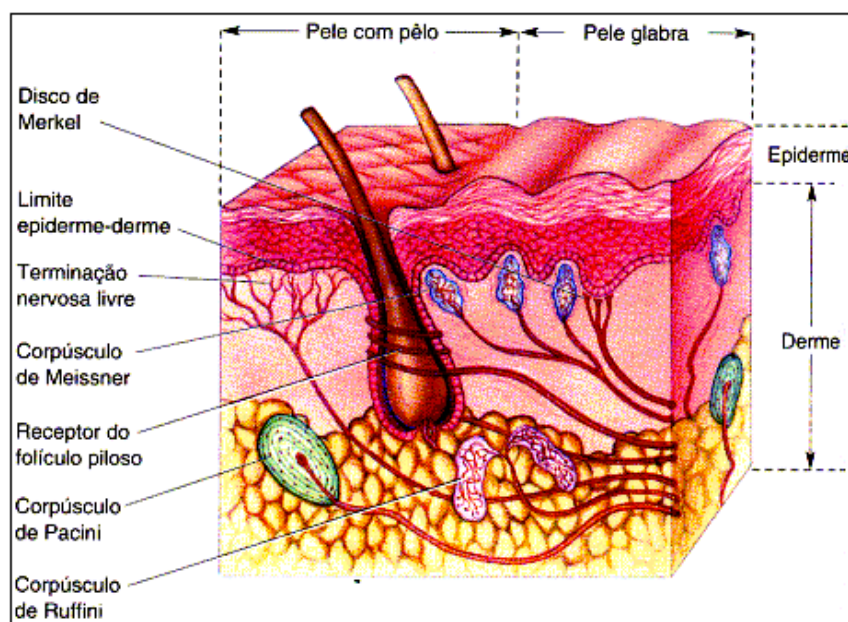


Figura 5 - Representação das camadas que compõem a pele

Fonte: BEAR et al. (2002)

A epiderme possui poros invaginantes de folículos pilossebáceos e de glândulas sudoríparas, os quais penetram na derme, contendo também anexos cutâneos como o pêlo e a unha. O processo

de renovação celular epitelial acontece de forma permanente, o que proporciona gradativa substituição da superfície externa. A vitalidade destes tecidos é mantida por difusão de oxigênio e nutrientes provenientes de vasos sanguíneos dérmicos (BLANES, 2004; CANDIDO, 2006).

A derme é a camada intermediária da pele, responsável pela vascularização cutânea, manutenção do potencial hidrogeniônico, proteção antimicrobiana e antifúngica e pela resistência e elasticidade da cutis. Apresenta em sua constituição tecido conjuntivo, fibras colágenas e elásticas, terminações nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e músculo eretor de pêlo. Pode ser dividida em camada papilar (mais externa) e reticular (mais interna) (BLANES, 2004; CANDIDO, 2006).

A derme contém diferentes tipos de células, dentre elas fibroblastos, fibrócitos, mastócitos e leucócitos sanguíneos, especialmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos. É uma camada que fornece base firme para a epiderme e para os outros anexos cutâneos. As fibras colágenas proporcionam força de tensão e as elásticas dão flexibilidade à pele. Plexos vasculares fornecem sangue para a epiderme, sem penetrá-la, no entanto. O mecanismo de termorregulação é proporcionado pelo controle realizado pelo hipotálamo e pelas fibras nervosas simpáticas sobre o fluxo sanguíneo da derme (BLANES, 2004; CANDIDO, 2006).

A estrutura da hipoderme, também denominada de tecido subcutâneo, oferece proteção contra lesão traumática, promove o isolamento térmico e proporciona reserva calórica. Têm em sua estrutura os adipócitos, que são envolvidos em feixes de tecido conjuntivo e agrupados em lobos gordurosos (BLANES, 2004; CANDIDO, 2006).

Vários fatores interferem no processo de cicatrização, como desnutrição, infecção, diabetes, obesidade, uso de corticóides, quimioterápicos e radioterapia. Assim, neste estudo, as lesões foram causadas em ratos saudáveis, com peso e idades bastante aproximados (GUIMARÃES, 2002; TOWNSEND, 2005).

3.7 Classificação das feridas

Guimarães (2002) e Townsend (2005) definiram como ferida toda lesão que leve à interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, podendo ser causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona as frentes de defesa orgânica.

As feridas podem ser classificadas de três formas diferentes de acordo com o agente causal, o grau de contaminação e o comprometimento tecidual (TAZIMA et al., 2008).

3.7.1 De acordo com o agente causal

As feridas são classificadas em incisivas ou cirúrgicas, contusas, lacerantes ou perfurantes. As feridas incisivas são produzidas por um instrumento cortante. Podem ser acidentais ou intencionais, as margens cutâneas do corte são perfeitamente delimitadas e com muito pouco tecido danificado. As contusas resultam de danos primários aos tecidos subepiteliais, podendo estar associado ao desenvolvimento de hematoma característico; o epitélio pode ser perdido secundariamente como consequência de anóxia e necrose após danos à vasculatura subcutânea (TAZIMA et al., 2008).

As lacerantes são ferimentos com margens irregulares e com mais de um ângulo. O mecanismo da lesão é por tração, rasgo ou avulsão tecidual. Um exemplo clássico é a mordedura de cão e o atropelamento. Já as perfurantes são caracterizadas por pequenas aberturas na pele. Há um predomínio da profundidade sobre o comprimento. É um tipo especial de ferida, porque embora a perda tecidual seja mínima, a injúria das estruturas mais profundas após penetração pode resultar em debilidade. As perfurações tendem a ser episódios importantes por afetarem camadas teciduais múltiplas, órgãos cavitários ou cavidades corpóreas, além de possibilitar a penetração de corpos estranhos, fontes de contaminação e difícil localização (TAZIMA et al., 2008).

3.7.2 Quanto ao grau de contaminação

As feridas são classificadas em limpas, limpas-contaminadas, contaminadas e infectadas. Este sistema de classificação foi desenvolvido para humanos e classifica o nível de contaminação potencial tanto em feridas eletivas como traumáticas (SLATTER, 2007).

As limpas são as que não apresentam sinais de infecção. São criadas cirurgicamente, sob condições assépticas. As limpas-contaminadas são as que tem entre 0 e 6 horas e apresenta pouca contaminação. As contaminadas são as feridas acidentais, com mais de seis horas de trauma, com debris celulares sem exsudato ou que tiveram contato com terra e fezes, por exemplo. Já as feridas infectadas são aquelas que apresentam sinais nítidos de infecção, edema e supuração, tecido desvitalizado, corpos estranhos e pus, e têm mais de 12 horas (TAZIMA et al., 2008).

3.7.3 Quanto ao comprometimento tecidual

Segundo Tazima et al. (2008), o comprometimento tecidual está relacionado com a profundidade da ferida, a qual é caracterizada em quatro estágios onde no estágio I ocorre comprometimento da epiderme apenas, sem perda tecidual; no estágio II ocorre perda tecidual e comprometimento da epiderme, derme ou ambas; no estágio III há comprometimento total da pele e necrose de tecido subcutâneo, entretanto não atinge a fáscia muscular; e o estágio IV, que concorre com extensa destruição de tecido, chegando a ocorrer lesão óssea ou muscular ou necrose tissular.

A grande maioria das lesões no organismo é reparada pela regeneração das células parenquimais, seguidas de uma regeneração acentuada do tecido conjuntivo. Na ocorrência de perdas parciais de espessura da pele forma-se um coágulo, que seca em seguida para promover certa proteção à lesão. A partir disso inicia-se então um processo de migração celular, sendo este o primeiro evento responsável pelo reparo tecidual. É possível dizer, portanto, que perdas parciais de tecido cicatrizam-se por epitelização. Em escoriações superficiais, mas que não comprometem a membrana basal ocorre uma regeneração tecidual, mas quando a membrana basal é atingida, este resultado é insatisfatório (CANDIDO, 2001; FERREIRA, 2003).

3.8 Classificação da cicatrização

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

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

De acordo com a literatura, a cicatrização é classificada como primeira, segunda ou terceira intenção (DANTAS e JORGE, 2005).

Na cicatrização de primeira intenção ocorre em ferimentos com perdas mínimas de tecidos e cujas bordas são aproximadas ou fechadas por sutura. Na segunda intenção ocorre quando as bordas da ferida não estão aproximadas, ou seja, não estão apostas, por perda tecidual, como em queimaduras ou e ferimentos profundos que são deixados abertos para formação de tecido de granulação. Nesse caso, o tecido de granulação preenche a ferida e esta se contrai e “reepiteliza-se”. E a cicatrização de terceira intenção (ou primária tardia): ocorre quando a ferida aberta é fechada secundariamente, dias após a lesão, cicatrizando assim por primeira intenção tardia. Geralmente essas feridas são mantidas abertas para a resolução de edema e infecção.

3.9 Fases da reparação tecidual

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

Estes fatores são responsáveis pela recomposição da celularidade da região ou pelo restabelecimento da homeostasia com formação de cicatriz. O processo de reparo é dividido em três fases priorizando-se os aspectos macroscópicos e histopatológicos em: inflamatória, fibroblástica e de deposição de matriz extracelular e de remodelação (RICHERS, 1996).

3.9.1 Fase inflamatória

Na fase inflamatória, as diversas formas de lesão no organismo levam a alteração nas junções e nas células endoteliais ocorrendo às vezes ruptura de vasos sanguíneos e extravasamento de seus constituintes. Nos primeiros momentos do processo de reparo ocorre tamponamento desses vasos. Concomitantemente ao estímulo lesivo ocorre vasoconstrição devido a descargas adrenérgicas e a ação de mediadores oriundos de desgranulação de mastócitos. Uma seqüência de eventos acontece após o sofrimento da injúria caracterizada por deposição de plaquetas, sua ativação e recrutamento de novas plaquetas dando resultado à formação de trombo rico em plaquetas que tampona a lesão no endotélio (COLLER, 1992; LEFKOVITS et al., 1995; MANDELBAUM et al., 2003).

O trombo rico em plaquetas (trombo branco) de imediato é infiltrado pela fibrina e transforma-se em trombo fibrinoso. Depois, eritrócitos são capturados por essa rede fibrinosa formando-se então o trombo vermelho que é o principal responsável pela oclusão do vaso rompido. Assim, além de limitar a perda de constituintes circulatórios para os interstícios celulares, proporciona uma matriz preliminar, que dará alicerce a migração das células responsáveis para desencadear o processo de reparo (DAVIES, 1990).

O colágeno subendotelial que ficou exposto por ocasião da ruptura do vaso e a trombina gerada pelos processos de coagulação é forte agonista da ativação e agregação plaquetárias (DAVIES, 1990; LEFKOVITS et al., 1995; De NARDI et al., 2004). Sendo assim, quando a plaqueta é ativada aumenta a ação da protrombinase, que por sua vez promove maior produção de trombina, a partir da protrombina, proporcionando assim condições para a amplificação da adesão

plaquetária. O difosfato de adenosina liberado das hemácias e grânulos densos das próprias plaquetas constitui outro elemento amplificador da agregação das plaquetas, que induz nelas a exposição do receptor GP IIb/IIIa ao fibrinogênio e fator de von WILLEBRAND (LEFKOVITS et al., 1995; WILLERSON, 1995; COELHO et al., 1998).

O ácido araquidônico da membrana das plaquetas em processo de agregação, também contribui para a agregação plaquetária, pois é convertido em tromboxane A₂ (TxA₂) pelas enzimas ciclooxigenase e tromboxane sintetase. O TxA₂ é um potente vasoconstritor, forte agonista de agregação plaquetária, e também indutor da exposição dos sítios de ligação da GP IIb/IIIa ao fibrinogênio e fator de von WILLEBRAND. A forma como ocorre sua ação na indução da exposição dos sítios de ligação da GP IIb/IIIa, é diferente da dos mediadores anteriores, pois se dá por mecanismo dependente da mobilização do cálcio intracelular. O fator de agregação plaquetária, que é liberado por macrófagos e mastócitos, plaquetas e outras células ativadas é outro importante derivado do araquidonato. Este fator é um importante ativador de plaquetas e indutor de sua agregação. A noradrenalina e a serotonina também podem ser citadas como agonistas da agregação plaquetária (COLLER, 1992; LEFKOVITS et al., 1995; De NARDI et al., 2004).

As diferentes cascatas de ativação plaquetária são estimuladas por esses mediadores, mas a via final comum a todos é a ativação do receptor GP IIb/IIIa que através da interação com o fator de von WILLEBRAND e o fibrinogênio é o verdadeiro efetor da agregação e ativação plaquetárias. Assim que ativadas, as plaquetas liberam fatores de crescimento como Fator de crescimento transformador β (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), quimiocinas como ativação de tecido conectivo quimiocina peptídeo II (CTAP-III) e outras proteínas como fibrinogênio, fibronectina e tromboplastina, encontradas em seus grânulos (WERNER e GROSE, 2003; BALBINO et al., 2005; HATANAKA e CURI, 2007).

As proteínas dos grânulos plaquetários em interação com proteínas da matriz extracelular somados à massa de corpos plaquetários agregados, estabilizam-se e formam uma matriz provisória, que se torna mais consistente à proporção que a fibrina é polimerizada por vias intrínseca ou extrínseca da coagulação. As plaquetas ativadas liberam mediadores como TGF- β , PDGF, troboxanos e fator de ativação plaquetário (PAF) são difundidos através da matriz provisória resultando em um gradiente quimiotático que orienta a migração das células existentes na circulação e regiões adjacentes envolvidas na resposta inflamatória (WERNER e GROSE, 2003; BALBINO et al., 2005; HATANAKA e CURI, 2007).

Os neutrófilos, como células mais abundantes no sangue, migram para a superfície da ferida com a finalidade de formar uma barreira contra a invasão de microorganismos, promovendo o recrutamento dinâmico de mais neutrófilos de vasos adjacentes não lesados (FOXMAN et al., 1997; ENGELHARD et al., 1998; MANDELBAUM et al., 2003; HATANAKA e CURI, 2007). Estas

células constituirão 50% das migradas ao local no final do primeiro dia após a lesão. O recrutamento de mais neutrófilos sofre influência também por quimiocinas produzidas pelos neutrófilos que foram coletados pelo trombo provisório (ENGELHARD, 1998; MORI et al., 2004; CARDOSO et al., 2004).

O gradiente quimiotático tem origem de proteínas plasmáticas como o Fator de Hageman e o cininogênio de alto peso molecular. A interação destas duas moléculas gera a bradicinina que além de propriedades vasoativas e nociceptivas, também induz o metabolismo do ácido araquidônico para eicosanóides. Esta família de moléculas possuem importância em vários fenômenos inflamatórios como a atividade quimiotática. A C5a (oriunda da circulação) é a principal fração livre do complemento que participa da formação do gradiente (HUYBRECHTS-GODIN et al., 1979; CARDOSO et al., 2004).

Esta molécula tem ação quimiotática direta e sua ligação a receptores da superfície dos mastócitos ativa a produção de eicosanóides e libera o conteúdo de seus grânulos que é composto por moléculas com atividades pró-inflamatórias. A contribuição final na formação de gradiente quimiotático nos momentos iniciais da resposta inflamatória são os produtos da fibrinólise. Para o processo de formação do trombo definitivo ocorre proteólise da rede de fibrina. A sua degradação produz fortes agentes quimiotáticos para leucócitos (HUYBRECHTS-GODIN et al., 1979; CARDOSO et al., 2004).

O gradiente é retroalimentado de forma positiva à proporção que ocorrem as primeiras migrações de células inflamatórias para o local da lesão. Os neutrófilos, monócitos e fibroblastos são células que migram em resposta ao gradiente químico e em sua maioria produzem substâncias quimiotáticas com destaque para os eicosanóides e as quimiocinas. A produção e liberação destes mediadores de forma isolada são insuficientes para o recrutamento de neutrófilos a partir da circulação. Em decorrência da ação dos eicosanóides (leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas), de citocinas (principalmente a Interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF α), produzidos por macrófagos, mastócitos e células estromais. Entre outros mediadores, as células endoteliais dos vasos não lesados induzem a expressão em sua membrana, de proteínas de adesão para leucócitos (GERSZTEN et al., 1999; HATANAKA e CURI, 2007).

De acordo com o estímulo, outros tipos celulares podem predominar, desde eosinófilos, responsáveis pelas reações de hipersensibilidade, até macrófagos. Os neutrófilos provenientes da circulação são as primeiras células a atingirem a região inflamada, sendo predominantes entre o primeiro e o segundo dias. Sua principal função é fagocitar microorganismos. A saturação de mediadores quimiotáticos é dirigida a um mesmo receptor tornando a célula em migração irresponsiva a este e levando à regulação negativa de sua expressão na membrana (MURDOCH e FINN, 2000).

Os macrófagos derivados de monócitos são as próximas células a surgirem na região, por volta do segundo ao quinto dia, que ao invés do papel desenvolvido pelos neutrófilos é considerado o elemento mais crítico na indução do processo de reparo (DI PIETRO, 1995). São os macrófagos que além de auxiliar os neutrófilos na eliminação dos microorganismos através da fagocitose, depois de fagocitá-los e processá-los nos fagossomas apresentam seus peptídios pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) às células T auxiliares (DI PIETRO, 1995; RICHES, 1996). Sendo assim, a fagocitose destas células atua como elo de ligação entre o sistema imune inato e o adaptativo. Some-se a isso o fato de ser a célula mais eficiente na eliminação dos fragmentos de tecidos removendo inclusive os neutrófilos que perderam função através da fagocitose (NEWMAN et al., 1992).

Por influência dos ligantes aos seus receptores de membrana, os macrófagos ainda produzem e exportam mediadores lipídicos, os eicosanóides peptídicos, as citocinas e os fatores de crescimento, as outras proteínas como as frações do complemento e os fatores de coagulação, e as enzimas relacionadas ao reparo, como as collagenases e metaloproteases da matriz. Os macrófagos além de ativados por ligantes, podem ser também ativados por alterações físico-químicas do microambiente. Os vasos ao se romperem nas regiões distais comprometem o aporte de oxigênio em função da formação de trombo. O influxo de neutrófilos e macrófagos ativados no sentido desta região aumentam a demanda de oxigênio que conseqüentemente eleva a concentração de ácido láctico e provoca queda de pH. A combinação hipóxia, pH baixo e elevada concentração de ácido láctico faz ativar o macrófago para produzir fatores de crescimento (BALBINO et al., 2005).

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

Vários efeitos pró-inflamatórios lhe são atribuídos, entre eles estão intimamente relacionados ao processo de reparo em etapa mais tardia, a indução mitótica de queratinócitos e, em fase precoce, os efeitos quimioatrativos sobre neutrófilos. O reparo tissular em um processo de forma simplista pode ser feito pela indução de células lábeis (os fibroblastos, as células do endotélio e os queratinócitos) para mitose e pela mudança de seus fenótipos de células fixas para migratórias.

Além dessas, nos fibroblastos também ocorrem mudança de fenótipo para células contráteis e secretórias de acordo com a etapa (SATO et al., 1999).

A mitose e a migração só ocorrem se houver a existência de um substrato sólido que sirva de base de sustentação para as células e a construção deste substrato se realiza através da lise de constituintes inertes como, colágeno, integrinas, actina e fibronectina, da matriz extracelular após sua reposição com novas características. Havendo algum descontrole no processo lítico, em vez de benefícios pode haver prejuízo à evolução do reparo. Some-se a isso o fato de que as células inflamatórias ativadas tornam-se produtoras de outras substâncias como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que têm um conhecido potencial lítico sobre as membranas celulares (SATO et al., 1999).

Além dessas duas formas de riscos em potencial à integridade tissular, existem mediadores inflamatórios como os TNFs e TGF- β que podem induzir apoptose de células via receptores de morte. No processo de evolução do reparo existe alternância harmônica e sincronizada em que ocorrem momentos de predominância de lise sobre reposição celular e vice-versa. Ocorre também o mesmo processo com apoptose e a indução mitótica. Faz-se necessário assim a retroalimentação negativa ao processo, sendo a IL-10 um dos mais conhecidos sinalizadores negativos da inflamação. Acredita-se que, por ter um papel limitador e finalizador da resposta inflamatória seja o mais importante mediador. Some-se a isso, o fato de que ela não só regula crescimento ou diferenciação de várias células do sistema imune como também de queratinócitos e células do endotélio (MOORE et al., 2001).

A inibição da infiltração de neutrófilos e macrófagos nos sítios de sofrimento tissular é uma das suas formas de atuação. Entre o segundo e quinto dias após a lesão, os macrófagos derivados de monócitos acumulam-se no local tendo como funções primárias auxiliar os neutrófilos na fagocitose de microorganismos, debris de tecidos e remoção de neutrófilos senis. Porém, a maior relevância de sua participação na inflamação e no reparo tissular são a produção e a liberação no local da ferida de fatores de crescimento e citocinas, essenciais na maturação da reação inflamatória e no início do processo de cura da ferida (SATO et al., 1999).

Após o início do processo inflamatório ocorre a sinalização de moléculas do microambiente sobre as células do endotélio fazendo com que ela mude a expressão de moléculas da superfície voltada para o leito vascular facilitando a adesão de monócitos circulantes em vez dos neutrófilos. Em processo igual ao dos neutrófilos, os monócitos quando transmigram pelas frestas entre as células do endotélio que são ativados assumindo fenótipo de macrófagos, derivados de monócitos (SATO et al., 1999).

Quando fora do leito capilar, estas células também são conduzidas para o local da lesão orientadas por um dos gradientes de mediadores químicos cuja ação é quimioatraente. As moléculas

das superfamílias do TGF- β e das PDGF (HELDIN et al., 2002) são agentes quimiotáticos para neutrófilos e macrófagos. Enquanto isso, na família das quimiocinas, somente as proteínas quimioatraente para monócito 1 (MCP-1) partilha esta propriedade para as duas células (CHRISTOPHERSON e HROMAS, 2001). A migração de macrófagos é influenciada pelos seguintes membros: o MIP1- α /CCL3 (DI PIETRO et al., 1998; HATANAKA e CURI, 2007), RANTE (CCL5), MIP1- β /CCL4, I309/CCL1, MCP-1 e MCP-3, IL-1, IL-6, IL-8 e o TNF- α . A IL-10 possui efeitos inibitórios sobre a quimiotaxia de macrófagos de forma idêntica que para os neutrófilos (SATO et al., 1999; HATANAKA e CURI, 2007).

3.9.2 Fase fibroblástica e de deposição da matriz extracelular

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

A fibroplasia e formação da matriz que é extremamente importante para a formação de tecido de granulação, em torno do quarto dia (GUIDUGLI-NETO, 1987; MANDELBAUM et al., 2003) é constituída por macrófagos, fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, que estão amparados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas e colágeno tipos I e II (GUIDUGLI-NETO, 1992; MANDELBAUM et al., 2003).

A formação do tecido de granulação depende do fibroblasto, célula crítica na formação da matriz. Distante de ser apenas um produtor de colágeno, o fibroblasto produz elastina, fibronectina, glicosaminaglicana e proteases, que são responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (MANDELBAUM et al., 2003).

O tecido apresenta edema e é caracterizado por muitos espaços vazios que são exudativos e sangram com facilidade. A neovascularização é muito importante neste estágio por permitir a troca de gases, suprimento de oxigênio e nutrientes para as células metabolicamente ativas (ECKERSLEY e DUDLEY, 1988; MANDELBAUM et al., 2003).

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

Quando ocorre um processo lesivo há perda de massa de tecido. Para preencher um leito de ferida aberta duas estratégias precisam ser desencadeadas. Na primeira, a própria natureza anatômica da ferida se encarrega de proporcionar um estímulo para migração e proliferação de células como fibroblastos, células epiteliais e queratinócitos, a partir de suas bordas.

Montesano e Orci (1988) denominaram este fenômeno de “efeitos de vizinhança livre”, as células basais que ficam próximas à região da ferida, que quando perdem a interação com as células adjacentes são ativadas, adquirindo propriedades mitóticas e proliferando na direção do centro da lesão. Na segunda, embora o espaço da lesão esteja preenchido por tecido de granulação, as bordas se deslocam em direção uma da outra, como se estivesse presente uma força de tração invisível (PEACOCK, 1984; MANDELBAUM et al., 2003; CARDOSO et al., 2004; MORI et al., 2004).

Essa ocorrência é devida à diferenciação de alguns fibroblastos das bordas da ferida para miofibroblastos (fibroblastos com capacidade contrátil). O processo evolui e a matriz extracelular que inicialmente era formada essencialmente por proteínas derivadas de plaquetas e de plasma tem sua composição modificada. Ocorrem migração e ativação de macrófagos e fibroblastos para o local, que acrescidos da presença de neovasos permitem que componentes da nova matriz extracelular sejam localmente produzidos por estas células. Sendo assim, os fibroblastos começam a depositar grandes quantidades de fibronectina que, mesmo sendo um substrato que desenvolve outras funções, serve basicamente para fixação da própria célula (BALBINO et al., 2005).

Neste segundo momento há produção também de grande quantidade de ácido hialurônico, um polissacarídeo glicosaminoglicano não sulfatado que facilmente se liga à água, auxiliando na resistência do tecido à compressão. São duas substâncias predominantes na matriz no momento em que ocorrem as primeiras fases do reparo do tecido, pois é uma combinação que propicia um microambiente favorável e eficiente para que ocorra movimentação de células, necessárias nesta fase. À proporção que o processo de maturação da ferida avança, ocorrem diminuição de concentração de ácido hialurônico e aumento da síntese de proteoglicanos ou glicosaminoglicanos sulfatados (BALBINO et al., 2005).

A composição da matriz extracelular se modifica favorecendo a fixação e imobilidade das células, contribuindo para sua diferenciação para fenótipos mais maduros. As células endoteliais dos neovasos se diversificam em células de revestimento e os neovasos ganham características funcionais de capilares. As células que passam por mudanças fenotípicas mais acentuadas são os fibroblastos, que de fenótipo de células imaturas migratórias e replicativas inicialmente, passam a fenótipo característico de células ativas engajadas na síntese protéica, onde seu citoplasma torna-se volumoso, apresentando um retículo endoplasmático rugoso abundante (BALBINO et al., 2005).

Desta forma, passam a secretar grandes quantidades de colágeno, que aos poucos substitui os proteoglicanos e a fibronectina, tornando-se o principal componente da cicatriz em formação. No processo de reparo a tensão de oxigênio constitui um importante mecanismo de regulação. Em seu início, a baixa tensão contribuía como estímulo ao macrófago para a produção de fatores de crescimento, migração e proliferação centrípeta de células das bordas da ferida e indução de angiogênese (BALBINO et al., 2005).

Neste momento, faz-se necessária uma alta tensão de oxigênio para hidroxilação de resíduos de prolina e lisina nas cadeias polipeptídicas de colágeno, encontradas no citoplasma dos fibroblastos, proporcionada pela rede de neocapilares. Por ocasião da fixação de fibroblastos e amadurecimento fenotípico para células produtoras de colágeno, evolui um processo máximo de contração da ferida, explicado pela mudança de fenótipo dos fibroblastos das bordas da ferida para miofibroblastos (BALBINO et al., 2005).

Os miofibroblastos são células intermediárias entre musculares lisas e fibroblastos, que são encontradas alinhadas ao redor de depósitos da nova matriz extracelular, unindo célula a célula e criando força tensil. O ressecamento da crosta superficial, também auxilia no processo de contração da ferida, que durante a desidratação diminui de tamanho e leva o tecido a ela aderido (MAJNO e JORIS, 1996); CARDOSO et al., 2004).

Em virtude de uma ineficiência e dificuldade de constatação de um processo mitótico por parte destas células em etapas iniciais são devidas pela inexistência de um substrato específico na região da ferida. Isto só ocorre quando o tecido de granulação alcança o nível da epiderme. O fator de desenvolvimento da epiderme contribui para o processo de reepitelização. As células da epiderme quando ativadas retraem os tonofilamentos intracelulares, ocorrendo também dissolução de desmossomas intercelulares e formam-se filamentos de actina na periferia do interior da célula (MAJNO e JORIS, 1996; CARDOSO et al., 2004).

Desta forma, estas alterações as liberam da membrana basal e das células epiteliais adjacentes, o que permite uma movimentação em direção ao centro da ferida. As células deslocam-se sobre a matriz celular provisória e, em sua trajetória continuam colocando grande quantidade de fibronectina. Uma ferida com superfície úmida e oxigenada acelera o processo de migração. Se

estas células encontram crosta recobrando uma região lesada, elas promovem dissecação de velocidade de migração. À proporção que a região lesada recebe cobertura de células da epiderme o mecanismo de “inibição de contato” é acionado. As células reapercebem o fenótipo original, a membrana basal torna-se refeita, os hemidesmossomos e desmossomos são reconstituídos (BALBINO et al., 2005).

A matriz extracelular passa a ser substituída por tecido conjuntivo mais denso e mais elástico a partir da ativação de macrófagos na região da lesão e da produção de fatores de crescimento específicos. A fibroplasia é iniciada pela formação de tecido de granulação no local do ferimento que é formado por uma matriz frouxa de colágenos tipo I e II, fibronectina, ácido hialurônico contendo macrófagos, fibroblastos, vasos recém formados e exudatos (GUIDUGLI-NETO, 1992). Este fato ocorre em torno do quarto dia após a lesão, observando-se novos fibroblastos, que se acumulam misturando-se a capilares neoformados (GUIDUGLI-NETO, 1987; HATANAKA e CURI, 2007).

Aqui, a sinalização entre as células é realizada por um maior número de mediadores, envolvendo além da atenção das células que produzem mediadores, a migração e indução de mitose de células estromais. Os membros da superfamília do TGF- β possuem papel importante na fibroplasia além de possuírem atividades quimioatraentes. Já foi demonstrado que, *in vitro*, os TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 são mitogênicos para fibroblastos, embora inibidores da proliferação de várias outras células incluindo-se os queratinócitos. Ressalte-se que sua ação sobre os queratinócitos é paradoxal, considerando-se que de um lado exercem atividade antiproliferativa *in vivo* e *in vitro* (COFFEY et al., 1988; SELLHEYER et al., 1993).

Enquanto do outro lado induz a expressão de integrinas necessárias à migração pela matriz extracelular provisória rica em fibronectina (GAILIT et al., 1994; ZAMBRUNO et al., 1995). Some-se a isso o fato das três isoformas serem potentes estimuladores da expressão de proteínas da matriz extracelular além das integrinas (MASSAGUÉ, 1990, 1998; ROBERTS e SPORN, 1996). Os TGF- β além de efeitos sobre a proliferação de fibroblastos, da ação sobre os queratinócitos e da deposição de matriz extracelular, participam ainda da diferenciação de miofibroblastos e do processo de angiogênese (ROBERTS e SPORN, 1986 e 1996; DESMOULIERE et al., 1993; CARDOSO et al., 2004).

Provavelmente as ativinas induzem em fibroblastos a expressão do Fator de crescimento epidérmico (EGF), mas já se sabe que elas inibem a proliferação de queratinócitos. Sendo assim, há um aumento considerável de tecido de granulação (SHIMIZU et al., 1998; SEISHIMA et al., 1999). Tem atuação ainda na estimulação da deposição de tecido de granulação, embora de forma mais seletiva que os TGF- β . Estes promovem uma deposição de forma geral, enquanto as ativinas

induzem de forma mais rica a deposição de fibronectina e tenascina-C (ROBERTS e SPORN, 1986; HATANAKA e CURI, 2007).

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

Existem evidências que o fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), além de efeitos sobre a proliferação de granulócitos e macrófagos possui papel importante no processo de reparo (BREUHAN et al., 2000; MANN et al., 2001). Estudo com camundongos transgênicos demonstrou que o GMCSF proporciona melhora substancial de neovascularização e formação de tecido de granulação que resulta em aceleração do processo de reepitelização. Esses estudos demonstram que este fator, além de afetar diretamente sobre as células locais, também atua indiretamente aumentando de forma secundária o conteúdo de citocinas e de TGF- β 1 na região lesada (MANN et al., 2001).

De acordo com Ornitz e Itoh (2001), a família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) é composta por 22 membros estruturalmente relacionados. Esta família possui a característica de interação com heparina e proteoglicanos que os estabiliza de desnaturação térmica e proteolítica e limita sua difusibilidade, sendo esta interação essencial para sinalização de seus receptores (ORNITZ, 2000). Os membros desta família em sua maioria possuem um amplo espectro de ação mitogênica que estimulam a proliferação de células de origem mesodermal, ectodermal e endodermal. Neste aspecto, a única exceção é o fator de crescimento de queratinócitos 7 (FGF 7) que parece ser específica para células epiteliais e em organismos adultos, de menor efeito (WENER, 1998).

Em ferimentos de diversas espécies há efetivamente expressão de IGF-I e IGF-II (STEENFOS e JANSSON, 1992; MARIKOVSKY et al., 1996; ROBERTSON et al., 1999). Um número mínimo de células expressa receptores para IGFs. Mas, todas as células da epiderme e ainda macrófagos e outras células inflamatórias começam a expressá-los entre o primeiro e o terceiro dia após a lesão (JENNISCHE et al., 1987; GARTNER et al., 1992). Gahary et al. (1995) demonstrou que o IGF-I aumenta a expressão da cadeia pró-alfa 1 (I) e da pró-alfa 1 (III) do procolágeno em cultura defibroblastos da derma.

Harsum et al. (2001) demonstraram que a inervação é essencial para a cicatrização de feridas. De acordo com Lewin e Mendell (1993); Reynolds et al. (1997), o fator de crescimento de nervos (NGF) é um polipeptídeo protótipo da família das neurotrofinas consideradas essenciais para desenvolvimento e sobrevivência dos neurônios sensoriais simpáticos no sistema nervoso central e

periférico. Some-se a isso o fato de possuírem funções importantes na iniciação e manutenção de inflamação em diferentes órgãos, além da ação sobre o crescimento de nervos (HUTSON et al., 1979). Estudos comprovaram que a administração de NGF acelerou a cicatrização de feridas em camundongos diabéticos (LI et al., 1980; MATSUDA et al., 1998) e a cicatrização de úlceras de pressão em humanos (BERNABEI et al., 1999).

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

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

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

A família fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) inclui o VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o PLGF, que são outros sinalizadores que contribuem para a formação de neovasos. Galé e Yancopoulos (1999), Hatanaka e Curi (2007) identificaram o VEGF-A como o principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento.

De acordo com Brown et al. (1992); Frank et al. (1995), os macrófagos e os queratinócitos da região que se encontra em reparo aumentam de forma pronunciada a expressão gênica de VEGFA e os seus receptores ficam aumentados nos vasos sanguíneos do tecido de granulação (PETERS et al., 1993; LAUER et al., 2000). A associação destes fatos dá indicativos de sua participação na angiogênese. Howdieshell et al. (2001) reforçaram esta hipótese pela demonstração

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

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

O crescimento relacionado ao oncogen α (GRO- α) possui ação indutora e a proteína induzida por interferon 10 (IP-10) com ação inibidora são moléculas da família das quimiocinas com influência sobre a angiogênese. Na fase inicial da inflamação são encontradas altas concentrações de GRO- α , onde além da ação quimioatraente apresenta também papel na migração de queratinócitos e na neovascularização (ENGELHARDT et al., 1998). O efeito da IP-10/ CXC quimiocina ligante 10 (CXCL 10) na resposta inflamatória *in vivo* foi determinada por Luster et al. (1988), que projetaram um camundongo que constitutivamente expressava em queratinócitos.

A seguir a lesão, estes camundongos apresentaram inflamação mais intensa que o controle, retardo na reepitelização e tiveram uma fase de granulação desorganizada, demonstrando ao final seu efeito inibitório sobre a angiogênese (BELPERIO et al., 2000). Desta forma, o IP/CXCL provavelmente inibe o reparo de ferida por interferência no desenvolvimento de granulação de tecidos normais. Para Shiraha et al. (1999), é um efeito que de forma parcial pode resultar de uma ação inibitória sobre a motilidade de fibroblastos após serem ativados por EGF.

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

Na remodelação tecidual, de acordo com Guidugli-Neto, (1987); Mandelbaum et al. (2003); Hatanaka e Curi, (2007), o leito da ferida fica totalmente preenchido pelo tecido de granulação em torno do décimo dia da ocorrência da lesão, com presença de rede capilar e a rede linfática em plena regeneração, em virtude de sua reconstrução ser iniciada após a da vasculatura. O tecido de granulação passa a ser enriquecido por mais fibras de colágeno e desta forma vai adquirindo aparência de massa fibrótica característica da cicatriz. Agora, surgem as primeiras fibras de colágeno tipo I (BALBINO et al., 2005).

O processo vai evoluindo e a deposição de colágeno é acentuada, observando-se apoptose de fibroblastos e de células endoteliais, formando-se assim a cicatriz. A resolução completa da ferida somente acontece após a maturação e remodelagem da matriz extracelular, que às vezes ocorre lentamente durante meses e até anos para que a cicatriz cutânea fique completamente madura com apenas 70% da resistência da pele normal (BALBINO et al., 2005).

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

A resistência de uma cicatriz está diretamente relacionada com a quantidade de colágeno depositada e de acordo com a forma com que as fibras estão organizadas. A resistência da cicatriz é maior quanto maior for o número de ligações covalentes transversais. Em sendo secretado na forma de tropocolágeno, as ligações transversais das fibras ocorrem por pontes de hidrogênio. Quando acontece o processo de amadurecimento da fibra, as lisinas, as hidroxilisinas e as lisinas glicosiladas que constituem a molécula de tropocolágeno são oxidadas até aldeídos pela enzima lisiloxidase, que depois de oxidação ligam-se covalentemente a outros grupos aldeídos ou a lisinas não oxidadas, aumentando a resistência da fibra (BALBINO et al., 2005).

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

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

A evolução do processo de reparo garante uma sucessão de eventos como a infiltração de neutrófilos, de macrófagos, fibroplasia e deposição de matriz extracelular, angiogênese, cicatrização e reepitelização. Embora estejam distribuídos nas três fases já descritas possuem peculiaridades que merecem destaque. Para regulação destes eventos existe envolvimento de mediadores derivados da circulação (as frações livres do complemento, os fatores de coagulação, as moléculas do sistema fibrinolítico e os hormônios como os esteroidais, os tireoidianos e a insulina). Há envolvimento também das cininas (histamina, bradicinina e serotonina), os mediadores peptídicos (citocinas, fatores de crescimento, neuropeptídicos e estruturas da matriz extracelular) e os mediadores lipídicos (eicosanóides e fator de agregação plaquetária). A elevada concentração de alguns mediadores, bem como redundância de efeitos e até ausência destes demonstra que, da fase de inflamação até a remodelação da ferida existe interdependência entre eles para um mesmo efeito (BALBINO et al., 2005).

3.9.3 Remodelação

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

Outro sinalizador com participação importante nessa fase é o TGF- β , que é um mitógeno importante de fibroblastos, embora exercendo efeitos inibitórios sobre a proliferação dos queratinócitos, é considerado um potente estimulador da expressão de proteínas da matriz extracelular e de integrinas (MASSAGUÉ, 1990, 1998; ROBERTS e SPORN, 1996). Experimentos com feridas tratadas com anticorpos neutralizantes de TGF- β 1 ou combinações TGF- β 1 e TGF- β 2, Shah et al. (1994) observaram que este tratamento provoca redução significativa na deposição de matriz extracelular e subsequente cicatrização (SHAH et al., 1994, 1995). Choi et al. (1996), observaram redução na cicatrização de feridas em camundongos tratados topicamente com oligonucleotídeos antisense de TGF- β 1.

Em outro estudo Huang et al. (2002), fizeram uso de antagonistas sintéticos de TGF- β 1 e reduziram a cicatrização de queimaduras em porcos e a cicatriz incisional em coelhos. Com a isoforma TGF- β 3 os estudos apresentaram resultados contraditórios. Embora Balbino et al. (2005) tenham demonstrado aumento na deposição da nova matriz pela aplicação de TGF- β 3 exógena, Cribbs et al. (2002) e Ring et al. (2000), constataram que com aplicação de TGF- β 3 recombinante inibe a cicatrização sugerindo que este tipo de TGF- β antagoniza os efeitos das duas outras isoformas (SHAH et al., 1995).

Vinte quatro horas após a lesão, a expressão de ativina β A e em menor concentração da ativina β B aumenta de forma considerável, permanecendo em concentrações elevadas até finalizar o processo de reparo (HUBNER et al., 1996; WANKELL et al., 2001). Embora haja inibição da proliferação de queratinócitos, induzem em fibroblastos a expressão de EGF aumentando de forma considerável o tecido de granulação (SHIMIZU et al., 1998; SEISHIMA et al., 1999). As ativinas induzem de forma mais acentuada a deposição de fibronectina e tenascina-C, enquanto os TGF- β S promovem deposição de tecido de granulação e de matriz extracelular de forma geral (ROBERTS e SPORN, 1986).

Kothapalli et al. (1997) encontraram após um dia de lesão o RNAm do CTGF e Igarashi et al. (1993), nove dias após a lesão. Estudo de Bradham et al. (1991) mostraram que este mediador, além de possuir propriedades quimiotáticas sobre os fibroblastos, modula o conteúdo de TGF- β 1 nas regiões das feridas (KOTHAPALLI et al., 1997). Posteriormente, (BABIC et al., 1998; SHIMO et al., 1999) demonstraram seus efeitos sobre a proliferação, migração, sobrevivência e adesão *in vitro* de células endoteliais, sugerindo também sua participação na angiogênese. Com as características descritas e sua detecção nas diversas etapas do reparo, torna-se provável que este fator de crescimento seja fundamental na formação do tecido cicatricial.

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

Quanto à modelagem da matriz extracelular, quimiocinas como IL-8, expressão e secreção regulada da ativação normal de célula T (RANTES), proteínas inflamatórias para macrófagos (MIP-1 α , MIP-1 β) e MCP-1, além das ações quimioatraentes sobre neutrófilos e macrófagos derivados de monócitos, há indução de expressão de metaloproteinases em diversos tipos de leucócitos (DI

PIETRO, 1995; D'SOUZA et al., 2001; EFRON e MOLDAWER, 2004). O VEGF-A e o PLGF são exemplos de mediadores com relação à angiogênese e influência direta sobre células de revestimento. Sua expressão também se apresenta aumentada durante a migração de queratinócitos (FAILLA et al., 2000).

O fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e o GRO- α são outros dois mediadores que também participam da reconstrução epitelial além de suas funções angiogênicas. No início, o HGF foi tido como um poderoso mitógeno de hepatócitos. É um fator que auxilia na recomposição celular e estimula a dissociação de células epiteliais (COMOGLIO e BOCCACCIO, 2001). O GRO- α apresentou intensa atividade mitogênica para queratinócitos em experimentos *in vitro*, o que sugere seu envolvimento na reepitelização. Mas, Rennekampff et al. (1997), acompanhando este efeito do GRO- α observaram significativa redução na contração da ferida. Na reepitelização o efeito do TGF- β 1 parece ser paradoxal. De uma forma, tanto *in vivo* como *in vitro* inibe a proliferação de queratinócitos, sugerindo ser um regulador negativo da reepitelização e de outra forma induz expressão de integrina que é fundamental para que haja migração destas células para a matriz provisória que é rica em fibronectina (GAILIT et al., 1994; ZAMBRUNO et al., 1995).

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

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

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

processo e restabeleceu a reepitelização. Isto foi demonstrado por Sato et al. (1999) em que a IL-6 exerceu efeitos mitogênicos sobre os queratinócitos e Gallucci et al. (2000) quando demonstraram que em camundongos knockout para IL-6 o processo de reparo evoluiu lentamente.

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

O único membro dessa família que parece ser específico para células epiteliais e de menor potência nos organismos adultos é o FGF 7 (WENER, 1998).

Enquanto seu receptor de alta afinidade (FGFR2IIIb) é superexpresso em queratinócitos de feridas de humanos e porcos (DANILENKO et al., 1995; MARCHESE et al., 1995). Kurita et al. (1992) encontraram o FGF 2 em queratinócitos basais na epiderme de feridas hiperproliferativa e normal. Depois, Antoniades et al. (1993) encontraram relação positiva de FGF 1 e FGF 2 em queratinócitos na epiderme de feridas de porcos. Com estes resultados fica demonstrado que os membros da família dos fatores de crescimento derivados de fibroblastos têm participação nas diversas etapas do processo de reparo, possuindo também papel importante na reepitelização.

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

Utilizando um modelo de hibridização *in situ*, o fator de crescimento foi encontrado por imunohistoquímica em eosinófilos de feridas de coelhos e de hamsters (TODD et al., 1991; WONG et al., 1993). Em queimaduras de ratos, também foi encontrado o TGF- α , principalmente na fase de proliferação de queratinócitos (CRIBBS et al., 2002). Resultados assim demonstraram a importância da participação deste fator de crescimento (HB-EGF) na reepitelização de lesões cutâneas, agindo principalmente na estimulação de migração, proliferação de queratinócitos (SHIRAKATA et al., 2005).

3.10 Fatores que interferem no processo de cicatrização

Segundo MADELBAUM et al. (2003) e TAZIMA et al. (2008) são vários os fatores que podem interferir em maior ou menor grau no processo de cicatrização, os quais podem ser divididos em locais e gerais.

3.10.1 Fatores locais

Vascularização das bordas da ferida onde a boa irrigação das bordas da ferida é essencial para a cicatrização, pois permite aporte adequado de nutrientes e oxigênio. Entretanto, a boa vascularização depende das condições gerais do paciente, bem como do tratamento dado a esta ferida.

- Grau de contaminação da ferida, onde uma incisão cirúrgica realizada com boa técnica e em condições de assepsia tem melhor condição de cicatrização do que um ferimento traumático ocorrido fora do ambiente hospitalar. O cuidado mais elementar e eficiente é a limpeza mecânica, remoção de corpos estranhos, detritos e tecidos desvitalizados.
- Tratamento das feridas, onde a assepsia e antissepsia, técnica cirúrgica correta (diérese, hemostasia e síntese), escolha de fio cirúrgico (que cause mínima reação tecidual), cuidados pós-operatórios adequados (curativos e retirada dos pontos), são alguns dos aspectos importantes a serem observados em relação ao tratamento das feridas.

3.10.2 Fatores gerais

Os fatores gerais estão relacionados às condições clínicas do paciente, e estas podem alterar a capacidade do paciente de cicatrizar com eficiência.

- Idade, onde quanto mais idoso o paciente menos flexíveis são os tecidos. Há uma diminuição progressiva de colágeno.
- Hiperatividade do paciente, onde a hiperatividade dificulta a aproximação das bordas da ferida. O repouso favorece a cicatrização.
- Oxigenação e perfusão dos tecidos, onde doenças que alteram o fluxo sanguíneo normal podem afetar a distribuição dos nutrientes das células, assim como a dos componentes do sistema imune do corpo. Essas condições afetam a capacidade do organismo de transportar células de defesa e antibióticos, o que dificulta o processo de cicatrização.
- Nutrição, onde uma deficiência nutricional pode dificultar a cicatrização, pois deprime o sistema imune e diminui a qualidade e a síntese de tecido de reparação. As carências de proteínas e de vitamina C são as mais importantes, pois afetam diretamente a síntese de colágeno. A vitamina A contrabalança os efeitos dos corticóides que inibem a contração da ferida e a proliferação de fibroblastos. A vitamina B aumenta o número de fibroblastos. A vitamina D facilita a absorção de cálcio e a E é um co-fator na síntese do colágeno, melhora a resistência da cicatriz e destrói radicais livres. O zinco é um co-fator de mais de 200 metaloenzimas envolvidas no crescimento celular e na síntese protéica, sendo, portanto, indispensável para a reparação dos tecidos.

- Diabetes, onde a diabetes melito prejudica a cicatrização de ferida em todos os estágios do processo. O paciente diabético com neuropatia associada e aterosclerose é propenso à isquemia tecidual, ao traumatismo repetitivo e à infecção.
- Medicamentos, onde os corticosteróides, os quimioterápicos e os radioterápicos podem reduzir a cicatrização de feridas, pois interferem na resposta imunológica normal à lesão. Eles interferem na síntese protéica ou divisão celular agindo diretamente na produção de colágeno. Além do mais, aumentam a atividade da colagenase, tornando a cicatriz mais frágil.
- Estado imunológico, onde nas doenças imunossupressoras, a fase inflamatória está comprometida pela redução de leucócitos, com conseqüente retardo da fagocitose e da lise de restos celulares. Pela ausência de monócitos a formação de fibroblastos é deficitária.

Além destes fatores acima mencionados, longos períodos de internação hospitalar e tempo cirúrgico elevado são também aspectos complicadores importantes para o processo de cicatrização (TAZIMA et al., 2008).

4 ARTIGO 1

Avaliação da segurança e características fitoquímicas do extrato de boldo-gambá (*Plectranthus neochilus* Schlechter, Lamiaceae) e favela (*Cnidoscolus quercifolius* Pohl, Euphorbiaceae)

Evaluation of the safety and phytochemical characteristics of the boldo-possum (*Plectranthus neochilus* Schlechter, Lamiaceae) and favela (*Cnidoscolus quercifolius* Pohl, Euphorbiaceae)

Michelle Suassuna de Azevedo Rêgo^{1}, Fernanda Lúcia Passos Fukahori¹, Eryvelton de Souza Franco³, Vanessa Carla Lima da Silva³, Tania Maria Sarmiento da Silva¹, Maria Bernadete de Sousa Maia², Carina Scanoni², Melânia Loureiro Marinho⁴, Mirian Nogueira Teixeira², Evilda Rodrigues de Lima²*

¹*Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52.171-900 Recife, PE, Brasil*

²*Laboratório de Farmacologia de produtos bioativos, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, 50.670-901 Recife, PE, Brasil*

³*Instituto Brasileiro de Gestão e Marketing/Instituto Brasileiro de Saúde, 50.050-365 Recife, PE, Brasil*

⁴*Universidade Federal de Campina Grande – Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos-PB. Av. Universitária, s/n - Sta. Cecília; CEP: 58708-110 Patos - PB - Brasil*

Correspondência: Autor 1* - michellesuassuna@hotmail.com. Telefone: (81) 99141.4070

RESUMO

Extratos hidroalcoólicos de Boldo-gambá (*Plectranthus neochilus* Schlechter, Lamiaceae) e Favela (*Cnidocolus quercifolius* Pohl, Euphorbiaceae) foram obtidos com o propósito de analisar suas características fitoquímicas e sua toxicidade aguda via gavagem e fórmula em gel para verificar sua toxicidade dérmica em roedores. Para as análises fitoquímicas utilizou-se um espectrofotômetro de massas XEVO G2-S QTOF (Waters, Manchester, UK) acoplado a um cromatógrafo de fase líquida Acquity UPLC e fonte de ionização para eletrospray ESI (Waters Corp., Milford, MA, USA). Para a análise toxicológica oral aguda foi utilizada a metodologia descrita no Guia 423 das diretrizes da OECD, onde foram utilizados nove camundongos Swiss (*Mus musculus albinus*), fêmeas, com três grupos (n=3/grupo): Grupo 1 – animais tratados com o extrato hidroalcoólico de *Plectranthus neochilus* e *Cnidocolus quercifolius*; Grupo 2 – tratados com o extrato de *Cnidocolus quercifolius* e Grupo 3 – tratados com o extrato de *Plectranthus neochilus*. Todos em dose única (2000mg/kg) administrados por gavagem em volumes semelhantes. Para o teste de toxicidade dérmica em pele lesionada foram utilizados 35 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, que foram submetidos a indução de uma ferida cirúrgica do tipo excisional na região dorso-cervical, distribuídos em cinco grupos (n=7/grupo), e tratados de acordo com o respectivo grupo: Grupo 1 – controle positivo, animais tratados com o gel fitoterápico comercial; Grupo 2 – controle negativo, tratados com o gel de carbopol 1%; Grupo 3 - Formulação em Gel da associação do Boldo-gambá e Favela (FGBF) na concentração 2,5%; Grupo 4 - Formulação em Gel da associação do Boldo-gambá e Favela (FGBF) na concentração 5%; e Grupo 5 - Formulação em Gel da associação do Boldo-gambá e Favela (FGBF) na concentração 10%. Todos receberam 1,0ml do produto tópico, diariamente durante 14 dias, observados para registrar alterações fisiológicas e/ou comportamentais ou morte. Foi realizado hemograma, plaquetograma, análises bioquímicas séricas e avaliação macroscópica de rim, baço, coração e fígado, e análise histomorfológica de fígado dos ratos. A análise fitoquímica sugere a presença de flavonoides. Observou-se que os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade oral após exposição aos extratos testados. Contudo, o grupo tratado

com o extrato hidroalcoólico de *Plectranthus neochilus* na dose estudada apresentou aumento significativo quanto ao peso do fígado comparado aos outros grupos. O peso corporal dos ratos tratados topicamente com FGBF 10% teve aumento significativo quando comparados aos outros grupos tratados, nos tempos zero, sete, dez e treze dias de tratamento. Na avaliação hematológica apenas a contagem das Plaquetas tiveram aumento significativo para FGBF 2,5% (13,22%) e 10% (22,94%) ($p < 0,05$). Na análise bioquímica observou-se uma redução significativa nos níveis de colesterol nos grupos FGBF 2,5% (40,02%), 5 % (38,59%) e 10% (34,06%), respectivamente ($p < 0,05$); A fosfatase alcalina teve aumento significativo nos grupos FGBF 2,5% (46,24%) e 5% (31,80%) ($p < 0,05$); Na ALT e AST houve aumento significativo (95,39% e 38,55%) no grupo FGBF 5% ($p < 0,05$), comparados entre os grupos estudados. A análise histomorfológica do fígado dos ratos apresentou no grupo 5% leve infiltrado inflamatório subcapsular, hepatócitos com morfologia normal, inclusões lipídicas, núcleos e nucléolos evidentes. Conclui-se que os extratos hidroalcoólicos de *Plectranthus neochilus* e *Cnidocolus quercifolius* quando administrados associados e/ou isolados em dose única (2000mg/kg), por gavagem, em camundongos Swiss não causou morte em nenhum animal, classificando como “classe toxicológica V”, considerado de baixa toxicidade. As Formulações em gel à base de Boldo-gambá e Favela nas concentrações 2,5%, 5% ou 10% não causaram nenhum tipo de intolerância ou alergia na pele de ratos Wistar com ferida cutânea.

Palavras-chave: fitoterapia, toxicidade, plantas medicinais

ABSTRAT

Hydroalcoholic extracts of Boldo-possum (*Plectranthus neochilus* Schlechter, Lamiaceae) and Favela (*Cnidocolus quercifolius* Pohl, Euphorbiaceae) were obtained for the purpose of analyzing their phytochemical characteristics and their acute toxicity via gavage and gel formula to verify their dermal toxicity in rodents. For the phytochemical analyzes, a XEVO G2-S QTOF (Waters, Manchester, UK) mass spectrometer coupled to an Acquity UPLC liquid phase chromatograph and

ESI electrospray ionization source (Waters Corp., Milford, MA, USA) . For the acute oral toxicological analysis, the methodology described in Guide 423 of the OECD guidelines was used, in which nine Swiss (*Mus musculus albinus*) females were used with three groups (n = 3 / group): Group 1 - animals treated with The hydroalcoholic extract of *Plectranthus neochilus* and *Cnidocolus quercifolius*; Group 2 - treated with the extract of *Cnidocolus quercifolius* and Group 3 - treated with the extract of *Plectranthus neochilus*. All in single dose (2000mg / kg) administered by gavage in similar volumes. For the dermal toxicity test on injured skin, 35 male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) were used, which were submitted to induction of an excisional surgical wound in the dorso-cervical region, distributed in five groups (n = 7 / group), And treated according to the respective group: Group 1 - positive control, animals treated with the commercial herbal gel; Group 2 - negative control, treated with carbopol gel 1%; Group 3 - Gel Formulation of the association of Boldo-opossum and Favela (FGBF) in the concentration 2.5%; Group 4 - Gel Formulation of the Boldo-opossum and Favela (FGBF) in the 5% concentration; And Group 5 - Gel Formulation of the Boldo-opossum and Favela (FGBF) in the concentration 10%. All received 1.0 ml of the topical product daily for 14 days, observed for physiological and / or behavioral changes or death. Hemogram, plaquetogram, serum biochemical analysis and macroscopic evaluation of kidney, spleen, heart and liver, and histomorphological analysis of rats' liver were performed. Phytochemical analysis suggests the presence of flavonoids. It was observed that the animals showed no clinical signs of oral toxicity after exposure to the tested extracts. However, the group treated with the hydroalcoholic extract of *Plectranthus neochilus* at the dose studied showed a significant increase in liver weight compared to the other groups. The body weight of mice treated topically with 10% FGBF had a significant increase when compared to the other treated groups, at times zero, seven, ten and thirteen days of treatment. In the hematological evaluation only the platelet count had a significant increase for FGBF 2.5% (13.22%) and 10% (22.94%) (p <0.05). In the biochemical analysis a significant reduction in cholesterol levels was observed in the FGBF groups, 2.5% (40.02%), 5% (38.59%) and 10% (34.06%), respectively (p <0 , 05); Alkaline

phosphatase had a significant increase in the FGBF 2.5% (46.24%) and 5% (31.80%) groups ($p < 0.05$); In ALT and AST there was a significant increase (95.39% and 38.55%) in the FGBF group 5% ($p < 0.05$), compared between the groups studied. The histomorphological analysis of the liver of the rats presented in the 5% group mild subcapsular inflammatory infiltrate, hepatocytes with normal morphology, lipid inclusions, nuclei and evident nucleoli. It is concluded that the hydroalcoholic extracts of *Plectranthus neochilus* and *Cnidocolus quercifolius* when administered in combination with and / or isolated in a single dose (2000mg / kg) by gavage in Swiss mice did not cause death in any animal, classifying as "toxicological class V" Considered of low toxicity. Boldo-opossum and Favela gel formulations at concentrations of 2.5%, 5% or 10% did not cause any type of intolerance or allergy in the skin of Wistar rats with cutaneous wound.

Keywords: Herbal medicine, toxicity, medicinal plants

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm finalidades terapêuticas e/ou profiláticas importantes para várias doenças, sendo uma das formas de tratamento mais antigas. O seu uso vem sendo propagado do início da civilização até os dias de hoje (Veiga Jr. et al., 2005; Carvalho, 2011). No entanto, nem todas as propriedades terapêuticas são conhecidas e podem causar intoxicação em seres humanos e animais, a depender da dose e forma de administração (Rodrigues et al., 2010; Martins et al., 2012).

Algumas plantas, como a *Plectranthus* - família Lamiaceae, têm finalidade medicinal, e pertence ao grande gênero contendo aproximadamente 350 espécies de ervas e arbustos perenes (dentre elas a *Plectranthus neochilus*) nativas de regiões tropicais da África, Ásia e Austrália (Codd, 1985). Várias espécies de *Plectranthus* são cultivadas como tubérculos comestíveis, condimentos, fragrâncias para xampus, plantas ornamentais ou como fontes de óleos essenciais (Ascensão et al., 1999), que são utilizados amplamente em preparações farmacêuticas, em perfumaria e cosméticos (Ascensão et al., 1998).

Utiliza-se alguns extratos como componentes de preparações cosméticas patenteadas como anti-sinais (Okamoto et al., 2005), e como estimulantes para o crescimento capilar (Kaneda et al., 2005). As diversas utilizações das espécies de *Plectranthus* na medicina tradicional incluem tratamentos de cefaléia, feridas, queimaduras, dermatite, alergias, picadas de inseto e de escorpião e como agente antisséptico (Ascensão et al., 1998, 1999).

O gênero *Cnidocolus* – família Euphorbiaceae, compreende cerca de 50-75 espécies, distribuídas excepcionalmente na América tropical e concentradas, principalmente, no México e Nordeste do Brasil (Webster, 1994). Muito bem representado no Brasil (aproximadamente 18 espécies), com cerca de 10 espécies (dentre elas a *Cnidocolus quercifolius*) especialmente na região Nordeste prováveis centros de diversidade de *Cnidocolus* (Macbride, 1951). Possuem propriedades medicinais diversas, como atividades antitumoral, antiinflamatória para o sistema genito-urinário, antisséptica e tratamento de infecções renais, dermatológicas, lesões oftalmológicas, contusões, fraturas, feridas, verrugas, diarreia, hemorragia, apendicite e reumatismo (Agra et al., 2008).

Toxicidade oral aguda é o método utilizado para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando administrada durante um período não superior a 24 horas, seguido da observação dos animais por 14 dias após essa administração (OECD 423, 2001). Os primeiros métodos alternativos validados e adotados pela ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) estão relacionados com a determinação da toxicidade aguda oral, sendo eles: o teste de doses fixadas (*Fixed Dose Method* - OECD 420), adotado em 1992, o método de classe tóxica aguda (*Acute Toxic Class Method* - OECD 423), adotado em 1996, e o teste *Up-and-down* (*Up-and-down procedure* - OECD 425), adotado em 1998 (Botham, 2002; Organisation for economic cooperation and development (OECD), 1987, 1992, 1996, 2000, 2002a, b, c).

Estes testes demonstraram informações adequadas de toxicidade aguda e letalidade utilizando um número menor de animais comparado ao teste clássico de DL₅₀. Embora o principal

ainda seja a letalidade, estes testes diminuem o número de animais e o sofrimento e em alguns casos nos dizem informações adequadas para a classificação toxicológica das substâncias estudadas (Dipasquale & Hayes, 2001).

Numa avaliação de toxicidade aguda podemos obter informações como: indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica; estabelecimento das doses para estudos adicionais de toxicidade; informações para a comparação de toxicidade entre substâncias de mesma classe; informações sobre quais seriam as consequências de exposições acidentais no trabalho ou no ambiente doméstico; além de ser um padrão para a avaliação de testes alternativos ao uso de animais experimentais (Purchase et al., 1998; Blaauboer, 2003; Prieto et al., 2006; Coecke et al., 2006).

Baseado nesse esquema de estudo, a toxicidade aguda é amplamente empregada para verificar e classificar as substâncias quanto à sua letalidade, o que estabelece parâmetros de segurança para a saúde humana avaliando, em animais as alterações neurocomportamentais (Cunha et al., 2009; Malone & Robichaud, 1983), além de contar com a mensuração de parâmetros hematológicos (Santos et al., 2009) e bioquímicos (Oduola et al., 2016).

Cinco categorias foram incluídas, assim, na classificação do esquema de toxicidade aguda, sendo que a categoria 1 é a mais severa em toxicidade, enquanto a categoria 5 é destinada a produtos com toxicidade aguda relativamente baixa, mas que, sob certas circunstâncias, representando um risco para populações vulneráveis, seja, por exemplo, por comorbidades ou faixa etária extrema. Estas 5 categorias figuram no Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação (GHS) das substâncias (OECD 423, 2001).

Diante da importância do Boldo-Gambá (*Plectranthus neochilus* Schlechter) e da Favela (*Cnidocolus quercifolius* Pohl), como planta medicinal na medicina popular, objetivou-se obter extratos e analisar as características fitoquímicas e toxicológica oral aguda e dérmica destas plantas em roedores.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

As partes aéreas de *Plectranthus neochilus* Schlechter, (Lamiaceae) e entrecascas de *Cnidoscolus quercifolius* Pohl, (Euphorbiaceae), foram coletadas de espécimes localizados na mesorregião do Sertão Paraibano, município de Patos – Brasil (7° 01' 28" Sul, 37° 16' 48" Oeste). O material coletado foi identificado pela Engenheira Florestal Dra. Ângela Maria Miranda do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e uma exsicata de cada depositada no Herbário da UFRPE sob os números 21717 e 21101, respectivamente.

Animais

No modelo experimental da toxicidade oral aguda foram utilizados nove camundongos Swiss (*Mus musculus albinus*) adultos jovens, fêmeas, peso entre 19 e 25g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Foram agrupados em três grupos aleatórios de três animais cada: Grupo 1- animais tratados com boldo-gambá e favela juntos; Grupo 2-animais tratados com favela e Grupo 3-animais tratados com boldo-gambá. Os animais foram mantidos na Sala de Experimentação do Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, mantidos em gaiolas de propileno translúcido (40x32x16 cm), com tampa de arame zincado e cama de maravalha, sob condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro), temperatura (22±2°C) e umidade (76 ±5,4%), água e dieta (Presence®) *ad libitum*. Para o tratamento com administração via gavagem com utilização de sondagem orogástrica, utilizou-se volume máximo de administração de 1mL/100g de peso corporal.

No modelo experimental da toxicidade dérmica foram utilizados 35 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, peso corpóreo de 220 a 250g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os animais da pesquisa foram mantidos em ambiente climatizado (20 - 22°C), sob iluminação artificial, com ciclo claro-escuro a cada 12 horas,

acondicionados em gaiolas metabólicas individuais, com livre acesso a alimentação e água. Os primeiros 15 dias antes da cirurgia foram considerados como período de aclimação, visando estabilizar os animais na sala de experimentação.

Obtenção do extrato hidroalcoólico dos extratos

A obtenção do extrato hidroalcoólico (50%) foi realizado no Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Para a obtenção do extrato orgânico, 500g das partes aéreas de *Plectranthus neochilus* e 500g da entrecasca de *Cnidocolus quercifolius* foram desidratadas em estufa de circulação de ar a 60°C, trituradas, maceradas e pesadas. O material resultante foi colocado em balão de fundo chato adicionado a 1L de uma solução (EtOH: ÁGUA 1:1), deixando em repouso por 1 semana à temperatura ambiente, em seguida o material foi filtrado à vácuo. O mesmo procedimento foi repetido mais duas vezes. Os líquidos obtidos foram colocados em balão de fundo redondo e levados ao rotoevaporador a temperatura de aproximadamente 40° a 60° e pressão de aproximadamente -650mmHg. A parte aquosa foi congelada e liofilizada. Obteve-se extrato hidroalcoólico de *Plectranthus neochilus* e *Cnidocolus quercifolius*, que foram armazenados a -20°C.

Preparação do gel fitoterápico

Para a obtenção do veículo foi utilizado carbopol a 1%. O gel apresentou propriedades características como boa viscosidade e o pH foi ajustado para 6,0. Para cada 100mg do veículo foi utilizado 2,5mg do extrato hidroalcoólico bruto de favela associada a 2,5mg do extrato hidroalcoólico bruto de boldo-gambá (FGBF 2,5%); na formulação a 5,0% foi realizada o mesmo procedimento, utilizando 5mg de cada extrato (FGBF 5%), e na 10% utilizou-se 10mg de cada extrato (FGBF 10%).

Considerações bioéticas

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, Processo nº 23076.011939/2014-25.

Análise fitoquímica: uplc / xevo-g2xsqtof - análise de fenólicos

O espectrofotômetro de massa XEVO-G2XSQTOF (Waters, Manchester, UK) foi ligado ao sistema ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, EUA) através de uma interface de ionização por eletropulverização (ESI). A separação cromatográfica dos compostos foi realizada no ACQUITY UPLC com um auto-amostrador acondicionado a 4°C, utilizando uma coluna Acquity BEH C18 (50mm × 2,1 mm i.d., tamanho de partícula de 1,7µm) (Waters, Milford, MA, EUA).

A temperatura da coluna foi mantida a 40° C. A fase móvel constituída por água com ácido fórmico a 0,1% em água (solvente A) e acetonitrilo (solvente B) foi bombeada a um caudal de 0,4 mL min⁻¹. O programa de eluição em gradiente foi o seguinte: 0-5 min, 5-10% B; 5-9 min, 10-95% B. O volume de injeção foi de 10µL. A análise de MS foi realizada num espectrómetro de massa em tandem de tempo de voo quadrupolar, acoplado com uma fonte de ionização por eletropulverização no modo de ions negativos, num Xevo G2 Qtof (Waters MS Technologies, Manchester, Reino Unido). A faixa de varredura foi de 50 a 1200 m / z para aquisição de dados.

Adicionalmente, foram realizados experimentos de MSE que permitem a obtenção de dados de ion precursor e de produto sejam adquiridos numa injeção. Condições de fonte como segue: tensão capilar, 2,0kV; Cone da amostra, temperatura da fonte, 100 ° C; Temperatura de dessolvatação 250 C; Taxa de fluxo de gás de cone 20Lh⁻¹; Vazão de dessolvatação (N2) 600Lh⁻¹. Todas as análises foram realizadas usando o lockspray, o que assegurou precisão e reprodutibilidade. Utilizou-se leucinaencefalina (5ngmL⁻¹) como um composto padrão ou de referência para calibrar espectrômetros de massa durante a análise e introduzido por um pulverizador de fechadura a 10 µLmin⁻¹ para aquisição de massa precisa. Todas as aquisições e análises de dados foram controladas usando o software Waters MassLynx v 4.1.

Ensaio biológico

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado segundo metodologia descrita no Guia 423 das diretrizes da OECD (2001). Em todos os casos foi administrada dose única (2000mg/Kg de cada extrato, por gavagem). A dose foi administrada em volumes semelhantes, dependendo do peso do animal, foram preparadas próximo da aplicação para garantir a estabilidade da mesma. Os animais, os quais estavam em jejum durante 8 horas, foram pesados no tempo zero, 4º, 7º, 10º, 13º dia de estudo e no dia da eutanásia. A duração total do estudo foi de 14 dias.

Os animais foram observados individualmente, após a primeira dose, por cerca de 30 minutos, e periodicamente durante as primeiras 24h, com atenção especial durante as primeiras 4 horas, e diariamente depois disso, num total de 14 dias. Os parâmetros analisados foram: avaliação clínica (modificações na pele, pêlos, olhos, mucosas, alterações respiratórias, circulatórias e dos sistemas nervoso central e periférico) realizada diariamente; avaliação de efeitos gerais (Almeida et al., 1983), ou seja, alterações no estado de consciência e disposição, no sistema motor, o tônus muscular, no sistema nervoso central (tremores, convulsão e sedação) e no sistema nervoso autônomo (lacrimagem, salivação, ptose, piloereção e respiração).

No décimo quinto dia, os animais foram pesados realizada eutanásia por aprofundamento anestésico (cetamina 60mg/kg e xilazina 10mg/kg), via intraperitoneal, e posteriormente exsanguinação por punção venosa cardíaca. Todos os animais do experimento foram submetidos à necropsia, realizando-se análise macroscópica e pesagem em balança analítica de precisão, do coração, baço, rins e fígado, buscando-se possíveis sinais de alterações sugestivas de toxicidade. Após esse procedimento, foi realizada a classificação do risco toxicológico com base na OECD 423 (2001). de acordo com a tabela do Globally Harmonised Classification System (GHS).

Avaliação da ferida excisional

Para realização do procedimento cirúrgico (prévio jejum de 12 horas), os ratos Wistar (n=35) foram pesados, em seguida, anestesiados com cetamina (10mg/kg) e xilazina (3mg/kg)

(Andrade, 2002), por via intraperitoneal. Após indução anestésica, os animais foram colocados em decúbito ventral e submetidos a tricotomia manual e antissepsia com 0,1% de álcool iodado na linha média dorsal da região cervical de cada animal. A área da incisão foi marcada com uma caneta de marcação e molde metálico vazado ($\pm 78,5 \text{ mm}^2$). Para remover a pele, tecido subcutâneo, fáscia e panículo carnoso, utilizou-se tesoura reta de Iris e pinça de Adson. Depois da incisão, um anel de contenção feito de material atóxico e hipoalergênico de silicone foi suturado ao redor da ferida cirúrgica usando de 4 a 6 pontos isolados simples com fio monofilamentoso de nylon 4.0 agulhado, distribuídos simetricamente (Galiano et al., 2004, adaptado por Franco, 2012), de modo que a ferida permanecesse no centro.

Após a cirurgia, os ratos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos com sete animais cada um: Grupo 1, controle positivo, onde utilizou-se um gel fitoterápico já existente no mercado (10ml de tintura de *Calendula officinalis* L.; 10ml de tintura de *Stryphnodendron barbatiman* Mart.; 5ml de tintura de *Symphyntum officinalis* L.; 5ml de tintura de *Aloe vera*; 3ml de tintura de *Matricaria chamomilla* L.; 5ml de tintura de *Echinacea angustifolia* DC.; 8ml de tintura de própolis, 100g do gel carbopol; Grupo 2, controle negativo, utilizou apenas o veículo carbopol; os Grupos 3, 4 e 5 formaram grupos da associação específica com a incorporação do extrato *Plectranthus neochilus* e *Cnidocolus quercifolius* 2,5%, 5% e 10% ao gel de carbopol.

Análise laboratorial

No final do experimento, os animais foram submetidos a prévio jejum de 10 horas, sedados com cetamina (10mg/kg) e xilazina (3mg/kg) e submetidos a eutanásia por decapitação. No momento da decapitação, 4,0ml do sangue dos animais foi coletado em dois tubos diferentes: um com anticoagulante EDTA (Doles Reag. Equip. para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brasil) (1,0ml) e outro em tubo seco (3,0ml). Esse último foi imediatamente centrifugado a 7500 r.p.m. por 15 minutos, para obtenção do soro que foi congelado a -20°C por até 72 horas e posteriormente

utilizado na análise do perfil bioquímico. O sangue coletado em tubo com EDTA foi utilizado para determinar o perfil hematológico.

Os parâmetros hematológicos (hemograma e contagem de plaquetas) foram determinados imediatamente após a coleta através do analisador automático de células hematológicas ABX Micros 60 (HORIBA ABX Diagnostics, Montpellier, França).

Os parâmetros bioquímicos (gama-glutamiltanspeptidase (GGT), aminotransferases (ALT e AST), fosfatase alcalina (FA), uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicérides, glicose, proteínas totais e albumina), foram determinados com o auxílio do analisador automático Labmax 240 (Tokyo Boeki Machinery Ltd, Medical Project Department – Tokyo, Japão) e kits comerciais da marca Labtest.

Análise histomorfológica

Finalizada a coleta de sangue, os animais foram necropsiados, e as vísceras foram removidas rins, baço, coração e fígado para avaliação macroscópica, pesagem e se necessário análise histopatológica.

Os materiais foram fixados em formalina tamponada a 10% por um período mínimo de 24 horas e posteriormente desidratadas, inclusas em parafina, submetidas a cortes transversais de 4 μ , com micrótomo, e coradas com hematoxilina–eosina (HE). (Tolosa et al., 2003).

As lâminas foram examinadas sob microscópio óptico, três imagens por campo (0,0018mm² área) foram capturados com uma câmara digital (magnifi-400x) ligado ao microscópio (Olympus BX-49 microscópio de luz e câmera).

Análise estatística

Os resultados foram expressos por média \pm erro padrão da média e para fins estatísticos, sendo considerada a significância mínima de 0,05 ($p < 0,05$). A normalidade das medidas foi avaliada através do teste de *Kolmogorov Smirnov*. Os dados paramétricos foram submetidos

à Análise de Variância (ANOVA) duas vias, com aplicação do pós-teste de *Bonferroni*. Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa Prism[®] 4.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, US).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil fenólico de UPLC-PDA a partir de extratos hidroalcoólicos de *Plectranthus neochilus*, e *Cnidioscolus quercifolius* foi registrado a 290nm (Figuras 1a, 1b, 2a e 2b) e os compostos foram identificados por cromatografia líquida de ultra alta pressão juntamente com espectrofotometria de massa de tempo de voo quadrupolar (UHPLC-QTOF- MS / MS) como flavonoides, com base na sua característica UV e massa de detecção, bem como medida de massa precisa de ambos os íons precursor e produto (Figuras 3A, 3B, 4A e 4B).

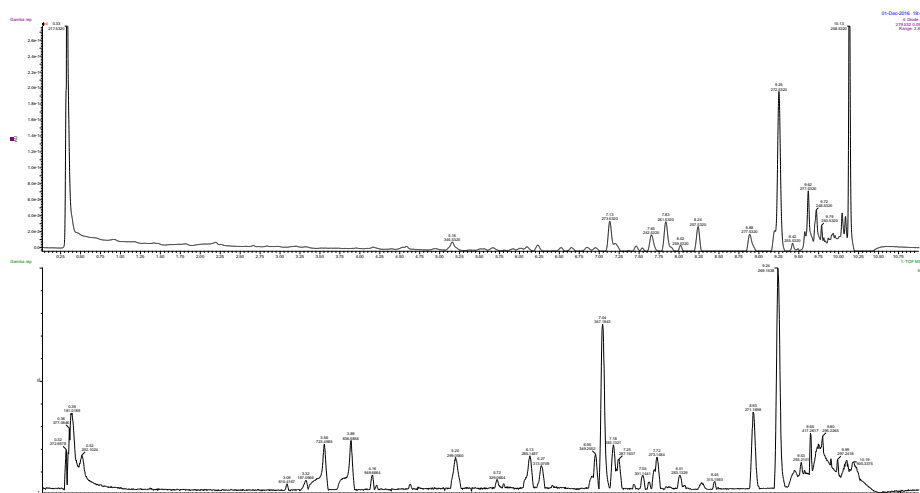


Figura 1A e 1B - UPLC-DAD (290 nm) de etanol extraído de folhas de *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá). Cromatogramas de íons de pico de base de extratos etanólicos extraídos e obtidos por um método de recolha de dados de MSE (UPLC-Q-TOF / MSE) em modo negativo.

A Análise por Cromatografia Líquida desenvolvida há mais de um século, a LC é uma técnica analítica muito bem estabelecida de separação, identificação e quantificação de compostos em uma amostra. Ela garante sua grande aplicabilidade devido à sensibilidade, capacidade de quantificação e separação de moléculas (Fernández-alba, 2005). No sistema de LC adotado em nosso estudo as amostras foram ionizadas por uma fonte de íons à pressão atmosférica (API, do inglês Atmospheric Pressure Ionization), na forma de Eletrospray (ESI do inglês, Electrospray

Ionization) que é uma das técnicas mais importantes para analisar pequenas moléculas polares, peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos e compostos de alto peso molecular (Harris, 2001).

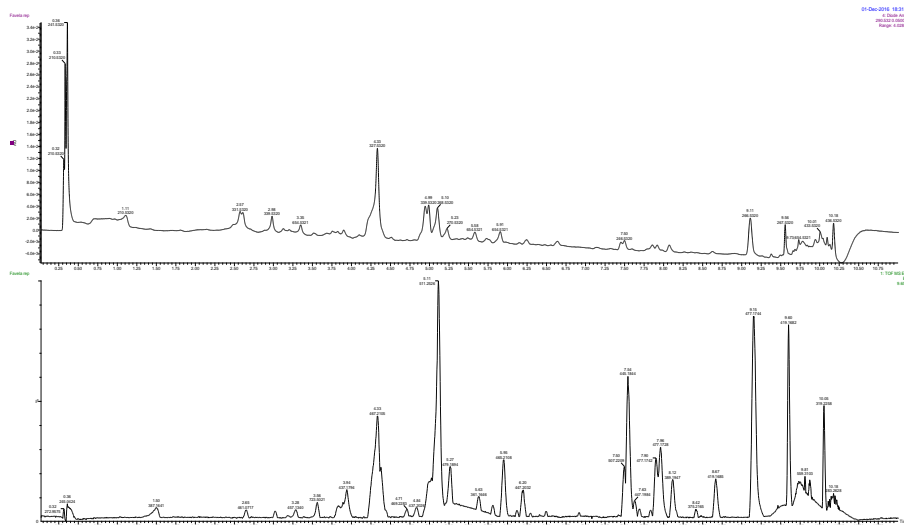


Figura 2A e 2B - UPLC-DAD (290 nm) de etanol extraído da entrecasca da *Cnidioscolus quercifolius* (favela). Cromatogramas de íons de pico de base de extratos etanólicos extraídos e obtidos por um método de recolha de dados de MSE (UPLC-Q-TOF / MSE) em modo negativo.

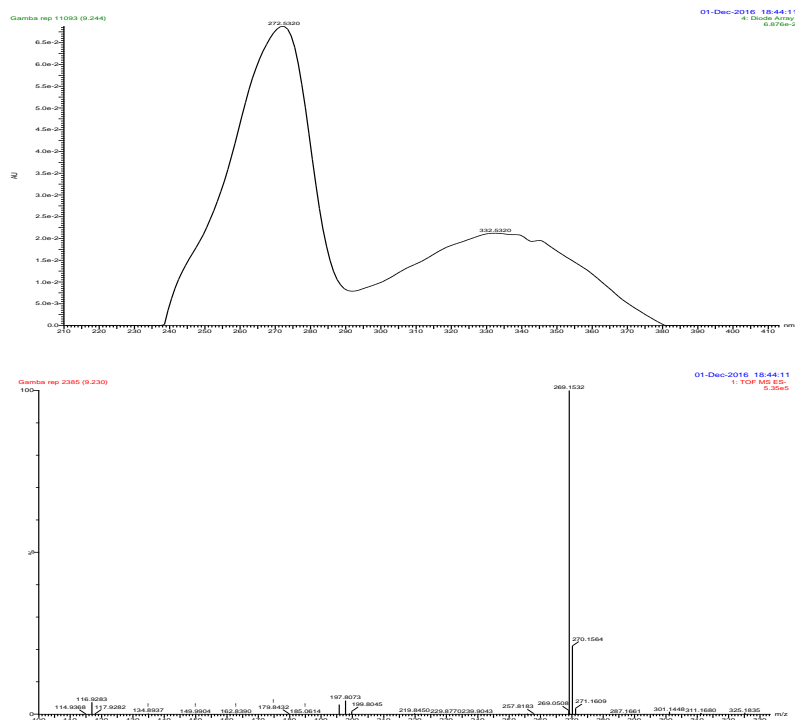


Figura 3A e 3B- Espectro UV e de massa do composto principal de etanol extraído de folhas de *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá).

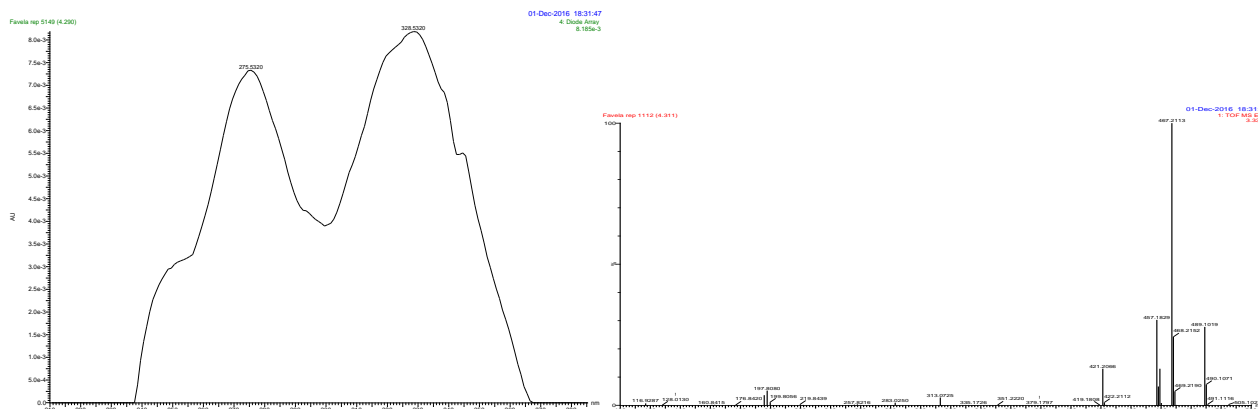


Figura 4A e 4B- Espectro UV e de massa do composto principal de etanol extraído da entrecasca de *Cnidocolus quercifolius* (favela).

Estudos químicos das espécies do gênero *Plectranthus* são descritos desde a década de 60. Até o momento, foram identificados mais de 200 compostos isolados das espécies do gênero, sendo os diterpenóides os principais metabólitos secundários presentes. O estudo realizado por Waldia et al. (2011) mostraram o isolamento de triterpenos tipo esqualeno (acíclicos), ambreina (tricíclicos), lanosterol (tetracíclico) e amirinas (pentacíclicos), flavonas e ácidos graxos em diferentes espécies de *Plectranthus*. Foram encontrados triterpenos em *P. caninus*, *P. rugosus* e *P. straitus*. As flavonas 3,7- dimetilquercetina e 3,7-dimetilcamferol foram encontradas em partes aéreas de *P. caninus*. O estudo fitoquímico do extrato hexânico das folhas e caules de *P. neochilus* forneceu dois triterpenos, a friedelina e α -amirina esterificada na posição C-3. Deste extrato foi obtida também a mistura dos esteróides sitosterol e estigmasterol.

Em relação aos constituintes presentes no extrato hidroalcoólico da casca e das folhas da *Plectranthus neochilus*, Carvalho (2004) e Simões et al. (2010) destacaram a presença de flavonóides em ambos os extratos. Assim, as atividades farmacológicas provavelmente estão relacionadas à presença desta classe de substâncias, visto que esses possuem atividade anti-inflamatória, devido à inibição da COX, da formação de granulação e do aumento da permeabilidade capilar observado no início do processo inflamatório. No extrato hidroalcoólico das folhas do Boldo-gambá há presença de triterpenos/esteroides que atuam na reação imunológica e

revelam efeitos bastante promissores quando utilizados como anti-inflamatório (Carvalho, 2004; Huang et al., 2012).

A análise fitoquímica da *Cnidocolus quercifolius* realizada por Gomes (2014) indicou reação positiva para a presença de cumarinas, flavonoides, monoterpenos/diterpenos e naftoquinonas no extrato etanólico da casca da favela, enquanto, o extrato das folhas da favela demonstrou reação positiva para cumarinas, derivados antracênicos, flavonoides, lignanas e triterpenos/esteroides. Não foram detectados no extrato da casca os seguintes constituintes: alcaloides, antocianinas, derivados antracênicos, lignanas, saponinas e triterpenos/esteroides. O extrato etanólico das folhas da Favela evidenciou reação negativa para alcaloides, antocianinas, monoterpenos/diterpenos, naftoquinonas e saponinas. Esses resultados são semelhantes aos encontrados nesta pesquisa, principalmente em relação à presença de flavonóides.

A importância do delineamento da fitoquímica está em correlacionar às substâncias encontradas por LC e que ainda estão sendo identificadas, com as atividades biológicas pesquisadas neste trabalho.

Os extratos hidroalcoólicos de *Plectranthus neochilus* e de *Cnidocolus quercifolius* tiveram rendimento de 26,6% e 10% respectivamente.

TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

Não foi observado morte ou qualquer outro sinal de toxicidade nos animais tratados com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Plectranthus neochilus* e/ou entrecascas de *Cnidocolus quercifolius*, dose única (2000mg/kg) administradas por gavagem.

Gomes (2014) avaliando a toxicidade aguda do extrato etanólico das cascas de *Cnidocolus quercifolius*, afirma que não foram observadas mortes dos camundongos que receberam a dose 5g/kg administrada pela via oral, indicando baixa toxicidade dos extratos estudados.

Nas observações clínicas realizadas durante o experimento como alterações do sistema respiratório, sistema nervoso central e periférico somático e autônomo e sistema locomotor, não houve alterações comportamentais dos animais.

As observações descritas na triagem comportamental servem para facilitar a investigação da possível atividade do extrato no sistema nervoso central, bem como indicar os efeitos do mesmo no comportamento dos animais (Almeida, 2006).

Gomes (2014) na avaliação comportamental de camundongos que receberam o extrato etanólico da casca de favela na dose de 5g/kg por via oral, os animais (fêmeas e machos) demonstraram as seguintes alterações comportamentais: ambulação diminuída, ptose palpebral e diarreia. Durante a triagem comportamental dos camundongos que receberam a dose de 5g/kg do extrato das folhas (fêmeas e machos) não demonstraram alterações no comportamento.

Na Figura 5 observou-se a evolução ponderal do peso corporal (g) de camundongos fêmeas durante o estudo da toxicidade aguda. A administração do extrato de *Plectranthus neochilus*, e *Cnidocolus quercifolius* (associados e/ou isolados) na dose de 2000mg/kg não gerou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados ($p > 0,05$) em relação ao ganho de peso corporal dos camundongos.

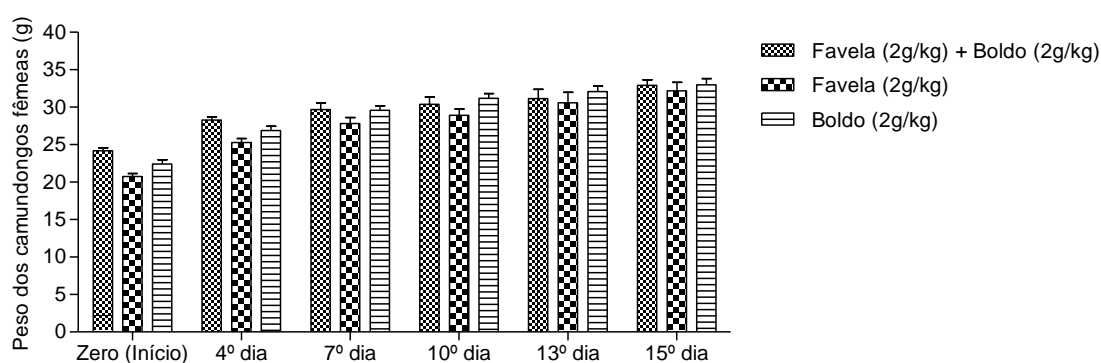


Figura 5- Evolução ponderal do peso corporal (g) de camundongos fêmeas durante o estudo da toxicidade oral aguda dos extratos hidroalcoólicos de *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá) e/ou *Cnidocolus quercifolius* (favela)

Sangeetha et al. (2013) observaram a perda de peso corporal como sendo um sinal característico observado na maioria dos animais expostos a substâncias tóxicas, essa diminuição do peso geralmente se manifesta dentro de alguns dias após a exposição, e resulta numa redução substancial do tecido adiposo e do tecido muscular.

Em estudo Gomes (2014) avaliou o peso corporal de camundongos que ingeriram extrato hidroalcoólico da casca da favela e observaram no dia 1 ao dia 14, onde apresentou diferença estatística nos grupos fêmeas na dose de 5g/kg por via oral. Já os tratados com o extrato das folhas apresentaram diferença estatística no grupo 5g/kg por via oral em machos.

A perda de peso corporal é um sinal característico observado na maioria dos animais expostos a substâncias tóxicas, essa diminuição do peso geralmente se manifesta dentro de alguns dias após a exposição, e resulta numa redução substancial do tecido adiposo e do tecido muscular (Sangeetha et al., 2013). Segundo Jahn & Geunzel (1997) o acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de substâncias exógenas.

Os pesos relativos dos órgãos dos animais tratados com os extratos hidroalcoólicos de *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá) e/ou *Cnidocolus quercifolius* (favela) encontram-se na Figura 6. Não houve diferenças estatísticas em relação ao peso do coração, rins e baço, entretanto, verificaram-se aumento estatisticamente significativo no peso do fígado dos animais tratados apenas com o extrato de *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá). Na análise macroscópica não foi visualizada alterações da consistência do fígado.

Gomes (2014) no resultado da análise dos pesos dos órgãos dos animais tratados com 5g/kg por via oral, fêmeas e machos não apresentaram nenhum órgão com alteração macroscópica, demonstrando que não houve toxicidade, quando avaliados os aspectos macroscópicos desses órgãos.

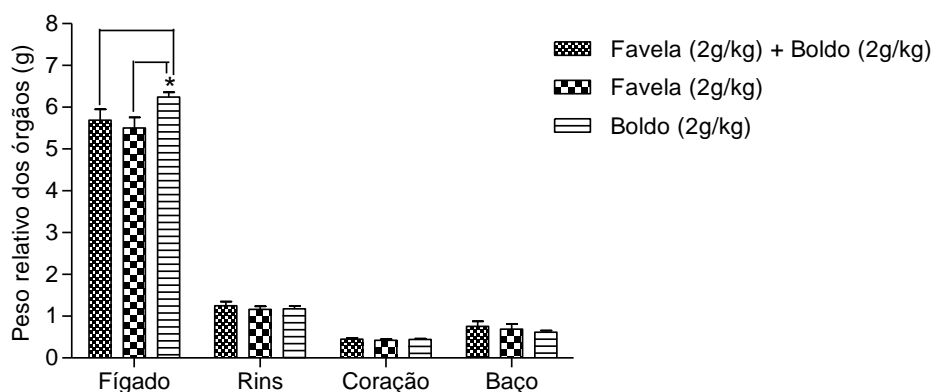


Figura 6- Peso relativo dos órgãos (g/100g) de camundongos fêmeas durante o estudo de toxicidade oral aguda com extratos hidroalcoólicos de *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá) e/ou *Cnidocolus quercifolius* (favela)

TESTE DE TOXICIDADE DÉRMICA

As avaliações clínicas diárias mostraram ausência de toxicidade dérmica com adequada recuperação, com manutenção do estado geral, presença de atividade física e disposição para alimentar-se nos animais tratados com FGBF a 2,5%, 5% ou 10% e grupos controle positivo e negativo. Não houve óbitos.

A Figura 7 apresenta a evolução do peso corporal dos ratos Wistar machos durante o experimento. Observa-se que foi estatisticamente significativo o grupo da FGBF a 10% nas pesagens zero, sete, dez e treze dias comparados aos demais grupos. No entanto, estes resultados podem estar relacionados ao menor peso corpóreo dos ratos desde o dia zero comparados com os demais grupos e por não apresentarem perda de peso. Possivelmente, devido ao mesmo manejo a que foram submetidos, não afetando a ingestão de água ou alimentos, bem como reações clínicas significativas, como: prurido intenso, edema, eritema, diarreia, vômitos, mudanças de comportamento ou mortes.

Animais que apresentam lesões dermatológicas, acompanhadas de prurido e dor, não se alimentam bem e apresentam perda de peso (Brito, 1995). Este fato não foi observado nos animais que foram submetidos aos tratamentos durante 14 dias, tendo em vista estes apresentarem ganho de peso.

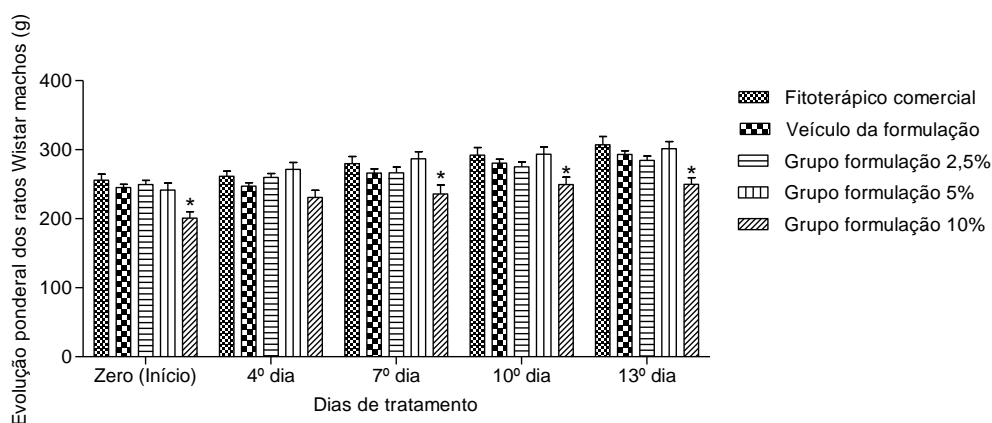


Figura 7 – Evolução ponderal do peso corporal (g) de ratos Wistar machos durante o estudo da toxicidade dérmica dos grupos controle positivo (fitoterápico comercial), controle negativo (veículo), Formulação em Gel da associação de *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá) e/ou *Cnidocolus quercifolius* (favela) nas concentrações 2,5%, 5% ou 10%

A Figura 8 apresenta o peso dos órgãos (fígado, rins, coração e baço) dos ratos Wistar machos durante o estudo de toxicidade dérmica nos grupos: Controle positivo (fitoterápico comercial), controle negativo (veículo), Formulação em Gel da associação de *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá) e/ou *Cnidioscolus quercifolius* (favela) nas concentrações 2,5%, 5% ou 10%. Houve redução significativa no peso do fígado dos animais tratados com FGBF 5% e 10%, nas porcentagens respectivamente. Klaassen & Watkins (2001) relatam que a toxicidade subcrônica estabelece a existência ou não de efeitos adversos e posteriormente identifica e caracteriza os órgãos afetados determinados pelo efeito cumulativo da substância administrada.

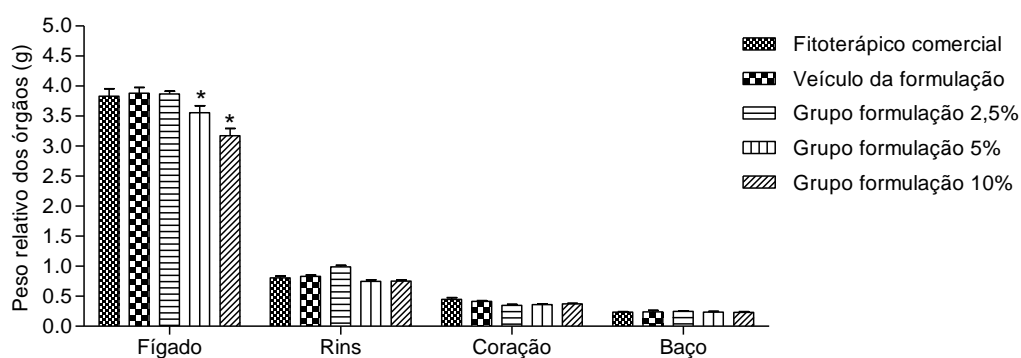


Figura 8 - Peso relativo dos órgãos (g/100g) dos ratos Wistar machos durante o estudo de toxicidade dérmica dos grupos controle positivo (fitoterápico comercial), controle negativo (veículo), Formulação em Gel da associação de *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá) e/ou *Cnidioscolus quercifolius* (favela) nas concentrações 2,5%, 5% ou 10%

Analisando a Tabela 1 observa-se que houve aumento estatisticamente significativo quanto a variável contagem de plaquetas para o Grupo FGBF 2,5% e Grupo FGBF 10% (13,22% e 22,94%), contudo estão dentro do padrão de referência. As demais variáveis relacionadas com o hemograma em todos os grupos não apresentaram diferenças estatísticas, demonstrando assim que as formulações não tiveram influência sobre esses parâmetros (Werner & Grose, 2003; Eming et al., 2007).

Após a ocorrência da lesão, inicia-se o extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. Agregação plaquetária e a coagulação sanguínea geram um tampão, rico em fibrina que além de restabelecer a homeostasia e formar uma barreira contra invasão de microorganismos, organiza matriz provisória necessária para a migração celular. Essa matriz servirá como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial (Werner & Grose, 2003; Eming et al., 2007).

Tabela 1 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar machos tratados com o gel fitoterápico comercial, veículo da formulação, ou FGBF (2,5%, 5% ou 10%)

| Parâmetros | Valores do Biotério do LTF-UFPB [#] | Grupos | | | | |
|--|--|------------------------|-----------------------|---------------|--------------|---------------|
| | | Fitoterápico comercial | Veículo da formulação | FGBF 2,5% | FGBF 5% | FGBF 10% |
| Hemácias (10 ⁶ /mm ³) | 7,3±0,1 | 7,87±0,10 | 7,21±0,28 | 7,90±0,21 | 7,41±0,12 | 7,53±0,15 |
| Hemoglobina (g/dL) | 15,0±0,2 | 13,66±0,12 | 12,41±0,34 | 12,39±0,27 | 12,31±0,24 | 13,11±0,14 |
| VCM (µm ³) | 48,0±0,3 | 55,71±0,42 | 55,14±0,40 | 55,86±0,40 | 56,43±0,43 | 56,00±0,79 |
| HCM (pg) | 20,0±0,2 | 17,36±0,15 | 17,29±0,24 | 15,66±0,18 | 16,71±0,11 | 17,44±0,29 |
| CHCM (g/dL) | 42,0±0,2 | 31,16±0,27 | 31,26±0,30 | 27,96±0,19 | 29,40±0,18 | 31,13±0,18 |
| RDW (%) | 13,0±0,2 | 12,31±0,10 | 12,21±0,09 | 12,91±0,13 | 12,89±0,26 | 12,87±0,60 |
| Plaquetas (mm ³) | 730±33,0 | 616,14±17,98 | 598,29±33,13 | 677,43±25,10* | 639,86±14,47 | 735,57±41,07* |
| Leucócitos (mm ³) | 6,3±0,5 | 7,60±0,46 | 7,90±0,82 | 7,09±0,44 | 4,84±0,27 | 3,81±0,25 |
| Monócitos (%) | 5,1±0,3 | 11,3±0,11 | 8,4±0,06 | 11,1±0,10 | 12,6±0,07 | 14,9±0,05 |
| Granulócitos (%) | 27,0±1,5 | 29,1±0,31 | 31,7±0,41 | 28,8±0,14 | 18,0±0,06 | 16,8±0,09 |
| Linfócitos (%) | 67,0±1,6 | 59,6±0,31 | 59,9±0,45 | 60,0±0,35 | 69,4±0,21 | 68,3±0,16 |

Valores são expressos em média ± erro padrão da média. Valores submetidos a ANOVA duas vias com pós-teste *Bonferroni* significância*(p<0,05) grupos (FGBF 2,5%, 5%, 10% ou fitoterápico comercial x veículo da formulação [#](Branco, 2011)

Na avaliação da toxicidade de plantas medicinais é de fundamental importância avaliar as alterações hematológicas, visto que essas permitem a detecção de alterações fisiopatológicas de animais em diferentes condições de estresse e são capazes de indicar a toxicidade induzida por hemólise (Nussey et al., 1995).

No trabalho de Gomes (2014) com a administração oral de extrato etanólico da casca de *Cnidocolus quercifolius* na dose de 5g/kg em fêmeas, observou-se diferença estatística dos parâmetros hematológicos apenas dos neutrófilos.

Dentre os efeitos adversos envolvidos no uso de plantas medicinais, podemos citar as alterações hematológicas, onde estas plantas podem desencadear reações adversas sanguíneas, detectáveis através de exames laboratoriais, sendo possível avaliar os efeitos tóxicos destes elementos no sangue (Ferreira et al., 2013).

Nesse sentido, a análise dos parâmetros hematológicos sanguíneos é relevante para a avaliação de risco, pois sugerem a probabilidade de ocorrerem alterações do sistema hematológico em seres humanos tratados com a droga em questão, fornecendo um valor preditivo importante de toxicidade humana (Olson et al., 2000). O hemograma é utilizado para avaliar de forma quantitativa e qualitativa os elementos figurados do sangue, sendo composto pelo eritrograma, leucograma e plaquetograma (Costa, 2013).

Analisando os parâmetros bioquímicos na Tabela 2 verificou-se que houve redução significativa nos níveis de colesterol nos Grupos das FGFB 2,5% (40,02%), 5 % (38,59%) e 10% (34,06%), e aumento na fosfatase alcalina nos grupo FGFB 2,5% (46,24%) e 5% (31,80%). Essa enzima é encontrada em praticamente todos os tecidos do corpo, mas que se apresenta, sobretudo no fígado, nas vias biliares e nos ossos (Meyer, 1998). Essas variáveis podem ter sido influenciadas pela ação do boldo que é indicado para insuficiência hepática e dispepsia e a favela em ter ação colagoga, colerética e hepática. Essas plantas são recomendadas para diminuição dos níveis de colesterol e seu consumo excessivo podem provocar efeitos tóxicos (Lourenzi & Matos, 2002).

Quanto às transaminases analisadas (Tabela 2) verificou-se que houve aumento estatisticamente significativo para as variáveis ALT e AST (95,39% e 38,55%) no grupo da formulação 5% apresentando aumento em relação aos valores referenciais apenas na AST. Todos foram comparados ao grupo tratado com o fitoterápico comercial. A ALT é considerada hepato-específica porque um significativo aumento em sua atividade sérica somente é observado na degeneração hepatocelular (Kaneko et al., 1997).

O aumento nestas enzimas apresentados pelos animais tratados topicamente com o gel FGFB a 5%, deve-se provavelmente a absorção do medicamento e posterior lesão dos hepatócitos, grave o bastante para provocar o aumento também da enzima AST. Valores elevados de AST e baixos valores de colesterol observados nesta pesquisa, revelam transtornos na função hepática (Bush, 1991). O ato de lambadura dos roedores pode ter contribuído na intoxicação dos animais.

Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos tratados com o gel fitoterápico comercial, veículo da formulação, ou FGBF (2,5%, 5% ou 10%)

| Parâmetros | Valores do Biotério do LTF-UFPB [#] | Grupos | | | | |
|--------------------------|--|------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| | | Fitoterápico comercial | Veículo da formulação | FGBF 2,5% | FGBF 5% | FGBF 10% |
| Glicose (mg/dL) | 117,4±2,8 | 128,67±5,08 | 136,49±5,43 | 148,60±5,01 | 141,91±1,20 | 127,88±3,99 |
| Coolesterol (mg/dL) | 62,2±2,3 | 84,04±4,07 | 76,05±0,68 | 45,61±1,62* | 46,70±2,03* | 50,14±2,90* |
| Triglicérides (mg/dL) | 96,0±5,5 | 90,78±14,11 | 80,68±8,85 | 99,52±9,44 | 75,14±17,56 | 72,98±6,58 |
| Proteína Totais (g/dL) | 6,1±0,1 | 5,68±0,12 | 5,57±0,12 | 7,23±0,11 | 7,14±0,08 | 7,22±0,14 |
| Fosfatase Alcalina (U/L) | 184,0±8,0 | 177,56±14,12 | 175,98±9,26 | 257,36±12,81* | 231,95±17,46* | 205,29±12,28 |
| ALT (U/L) | 61,0±2,4 | 28,40±2,09 | 30,83±1,38 | 50,32±1,82 | 60,24±3,24* | 47,34±4,52 |
| AST (U/L) | 152,4±6,6 | 156, 18±6,62 | 136,36±4,92 | 160,02±10,99 | 188,93±10,85* | 168,52±5,54 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,3±0,1 | 0,27±0,04 | 0,24±0,04 | 0,27±0,01 | 0,22±0,02 | 0,21±0,02 |
| Uréia (mg/dL) | 45,2±2,3 | 43,01±2,46 | 40,83±1,50 | 42,20±1,45 | 38,36±2,56 | 44,33±3,57 |
| Ácido úrico (mg/dL) | 0,8±0,1 | 0,53±0,04 | 0,60±0,08 | 0,90±0,07 | 1,12±0,10 | 1,04±0,05 |
| GGT (U/L) | 20,0±0 | 18,08±7,09 | 11,13±4,10 | 2,24±1,09 | 0,82±0,75 | 2,60±0,75 |
| Albumina (g/dL) | 3,0±0 | 2,83±0,03 | 2,76±0,04 | 2,80±0,04 | 2,78±0,05 | 2,83±0,09 |

Valores são expressos em média ± erro padrão da média. Valores submetidos a ANOVA duas vias com pós-teste Boferromi significância*(p<0,05) grupos (FGBF 2,5%, 5%, 10% ou fitoterápico comercial x veículo da formulação [#](Branco, 2011)

A enzima AST é encontrada em maior quantidade nas mitocôndrias, cerca de 80%, e não é liberada tão rápido como a ALT, que é uma enzima puramente citosólica. A AST está presente em altas concentrações em um grande número de tecidos, como coração, fígado, músculo esquelético, rins e pâncreas. A ALT é primariamente limitada ao citosol dos hepatócitos, é considerada um indicador altamente sensível de dano hepatocelular e, dentro de certos limites, pode fornecer uma taxa quantitativa do grau de danificação sofrido pelo fígado (Al-habori et al., 2002).

Estudos com parâmetros bioquímicos realizados por Gomes (2014) revelaram um decréscimo de triglicerídeos, glicose, ALT e AST nos animais que receberam a dose de 5g/kg por via oral do extrato da casca da favela em roedores.

Em relação ao estudo histopatológico do tecido hepático, não foram observadas alterações nos animais tratados controle positivo (Figura 9A), negativo (Figura 9B), extratos de FGBF 2,5% (Figura 9C) e 10% (Figura 9D). No entanto, nos animais do Grupo 5% observou-se leve infiltrado inflamatório subcapsular mais com hepatócitos com morfologia normal, com inclusões lipídicas, núcleos e nucléolos evidentes (Figura9E).

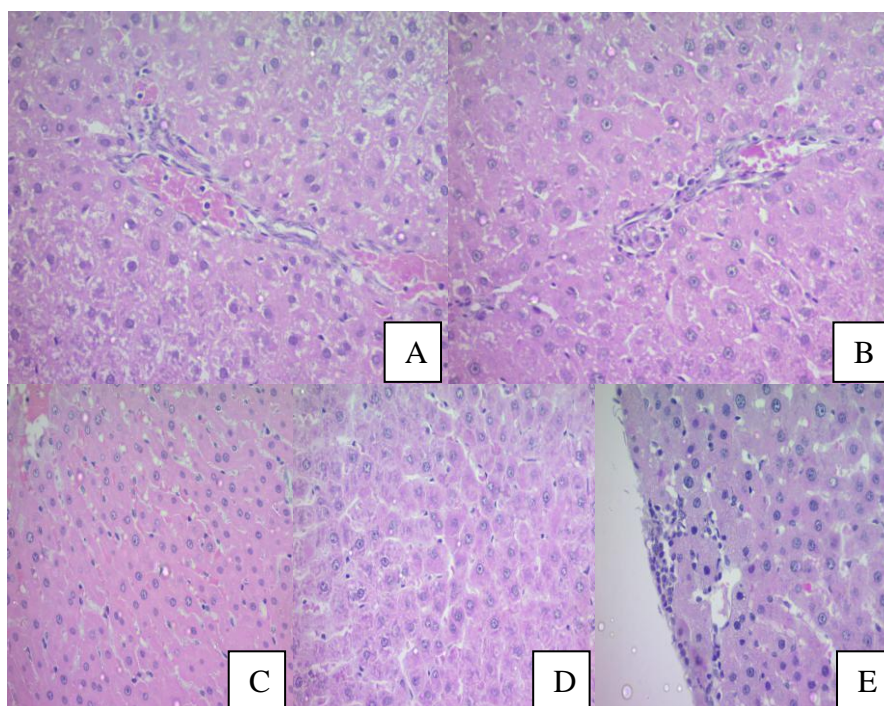


Figura 10 – Fotomicrografia do parênquima hepático sem alterações morfológicas. A – Ratos do grupo FGBF 2,5%, B – Ratos do grupo FGBF 5%; C - Ratos do grupo Controle positivo, D – Ratos do grupo controle negativo; E - Ratos do grupo FGBF 10%, apresentando leve infiltrado inflamatório subcapsular; hepatócitos com morfologia normal, com inclusões lipídicas, núcleos e nucléolos evidentes.

De acordo com os achados descritos, sugere-se que os extratos *Plectranthus neochilus* e *Cnidocolus quercifolius* não ocasionaram toxicidade às células hepáticas. Gomes (2014) realizou pesquisas com o extrato etanólico de *Cnidocolus quercifolius* (favela) por via oral, onde os animais não apresentaram alterações de tecido hepático. O parênquima do órgão mostrou-se ausente de lesões em todos os grupos, tanto para os animais que receberam o extrato da casca, quanto para os que receberam o extrato da folha, confirmando que os extratos não ocasionaram toxicidade às células hepáticas.

Dessa forma, o estudo da toxicidade aguda indica que o extrato etanólico de *Plectranthus neochilus* e/ou *Cnidocolus quercifolius* não apresentaram toxicidade, porém, outros estudos com diferentes metodologias devem ser realizados, com o intuito de determinar uma melhor segurança dos extratos.

CONCLUSÃO

As amostras dos extratos de boldo-gambá e favela expressaram na Cromatografia Líquida (LC), através de cromatogramas picos de substâncias compatível com flavonóides.

As substâncias testes apresentaram Dose Letal Média (DL₅₀), para camundongos fêmeas, maior que 2000 mg/kg de peso vivo quando administradas por via oral, o que permite classificar as substâncias testes na “classe toxicológica V”, como de baixa toxicidade para as doses e via de administração oral. Os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade após exposição oral e dérmica às substâncias, entretanto, o extrato do *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá) provocou aumento relativo do peso do fígado no estudo de toxicidade oral aguda nos camundongos, o que sugere um possível efeito tóxico e, portanto requer cuidado na sua ingestão, mesmo em dose única, apresentando uma tendência crônica de toxicidade. Faz-se necessário a realização de outros ensaios de toxicidade sub-crônica e crônica no intuito de determinar o perfil de segurança dos extratos para que os mesmos possam se tornar agentes seguros para uso terapêutico.

REFERÊNCIAS

- Agra MF, Silva KN, Ionaldo JLDB, Freitas PF, Barbosa-filho JM 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18: (472-508).
- Al-habori M, Al-aghbari A, Al-mamary M, Baker M 2002. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. *Ethno-Pharmacology* 83: (209-217).
- Almeida RN 2006. *Psicofarmacologia: Fundamentos práticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.

- Almeida RN, Almeida JA, Lacet MAA, Thomas G 1983. Triagem farmacológica de plantas do nordeste brasileiro. *Simpósio de produtos naturais*. João Pessoa, Brasil.
- Andrade SF 2002. *Manual de Terapêutica Veterinária*. São Paulo: Roca, Brasil.
- Ascensão L, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Schripsema J, Deans SG, Scheffer JJC 1998. *Plectranthus madagascariensis*: morphology of the glandular trichomes, essential oil composition, and its biological activity. *J. Plant Sciences* 159: (31-38).
- Ascensão L, Mota L, Castro M 1999. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Ann. Bot.*84: (437-447).
- Blaauboer BJ 2003. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. *Alternatives to laboratory animals* 31: (277-281).
- Botham PA 2002. Acute systemic toxicity. *ILAR Journal* 43: (27-30).
- Brito, ARMS 1995. Toxicologia pré-clínica de plantas medicinais. In: Di Stase LC (org.). *Plantas medicinais: arte e ciência*. São Paulo: UNESP, p.100-107.
- Branco ACSC, Diniz MFFM, Almeida RN, Santos HB, Oliveira KM, Ramalho JA, Dantas JG 2011. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério Professor Thomas George. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde* 15: (209-214).
- Bush BM 1991. *Interpretation of laboratory results for small animal clinicians*. Oxford: Blackwell Scientific.
- Carvalho JCT 2004. *Fitoterápico anti-inflamatório : aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Ribeirão Preto , SP : Tecmedd.
- Carvalho LS 2011. Alterações clínicas e histológicas decorrentes de neurointoxicação por plantas medicinais. In: Seminários aplicados, Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia.
- Codd LE 1985. Lamiaceae. In: Leistner OA (ed.). *Flora of Southern Africa*. Pretoria: Botanical Research Institute, Department of Agriculture and Water Supply 28: (137-151).

Coecke S, Blaauboer BJ, Elaut G, Freeman S, Freidig A, Gensmantel N, Hoet P, Kapoulas VM, Ladstetter B, Langley G, Leahy D, Mannens G, Meneguz A, Monshouwer M, Nemery B, Pelkonen O, Pfaller W, Prieto P, Proctor N, Rogiers V, Rostami-hodjegan A, Sabbioni E, Steiling W, Van de sandt JJ 2005. *Toxicokinetics and metabolism. Alternatives to laboratory animals*. suppl 1 (147-175).

Costa EVM 2013. *Estudo etnobotânico sobre plantas utilizadas como antimaláricas no estado do Amapá, avaliação da atividade antimalárica e toxicidade aguda por via oral de Amasonia campestris (Aubl.) Moldenke*. Macapá, 142p. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá.

Cunha LC, Azeredo FS, Mendonça ACV, Vieira MS, Pucci LL, Valadares MC, Freitas HOG, Sena AAS, Lino Junior RS 2009. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Rev. Bras. Farmacognosia* 19: (403-411).

Dipasquale LC, Hayes AW 2001. Acute toxicity and eye irritancy. In: hayes AW. *Principles and methods of toxicology*. 4.ed. London: Taylor & Francis, p. 853-916.

Eming SA, Krieg T, Davidson JM 2007. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*127: (514–525).

Fernández-alba AR 2005. *Chromatographic – Mass Spectrometry Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues*. Amsterdam: Editora Elsevier, 510p .

Ferreira AL, Rocha CP, Vieira LM, Dusse LMSA, Junqueira DRG, Carvalho MG 2013. Alterações hematológicas induzidas por medicamentos convencionais e alternativos. *Revista Brasileira de Farmácia* 94: (94-101).

Galiano RD, Michaels LV, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC 2004. Quantitative and reproducible murine modelo f incisional wound healing. *Wound repair and regeneration* 12: (485-492).

- Gomes LM 2014. A. *Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de Cnidoscolus quercifolius Pohl (EUPHORBIACEAE) em roedores*. Petrolina, 184f. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco,.
- Harris DC 2001. *Análise Química Quantitativa*. 5.ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, p. 640-645.
- Huang GJ, Pan CH, Liu FC, Wuts WUCH 2012. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Antrodia salmonea* in the lipopolysaccharide-stimulated RAW246.7 macrophages and the k-carrageenan-induced paw edema model. *Food Chem Toxicol* 50: (1485-93).
- Jahn AI, Gunzel PKH 1997. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examination in fertility studies provide new and additional information relevante for safety assessment. *Reproductive toxicology* 11: (p.171-178).
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML 1997. (Eds.) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. San Diego: Academic Press, 932p.
- Kaneda K, Serizawa S, Maruyasu S, Hasegawa M, Motono M 2005. Hair growth stimulating compositions containing (benzylamino) purines and Labiatae extracts. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (p. 18).
- Klaassen CD, Watkins III EJB 2001. Absorção, Distribuição e Excreção dos Tóxicos. In: *Toxicologia: A Ciência Básica dos Tóxicos de Casaret e Doull*. McGrawHill, 5ª ed. p. 79-100.
- Lorenzi H, Matos FJA 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum.
- Macbride JF 1951. Flora of Peru. *Field Museum of Natural History* v: 13 (1-200).
- Malone MH, Robichaud RC 1983. The pharmacological evaluation of natura products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *J. Ethnopharmacol* 8: (127-147).
- Martins RT, Almeida DB, Monteiro FMR, Kowacs PA, Ramina R 2012. Receptores opioides até o contexto atual. *Revista Dor* 13: (75-9).
- Meyer DJ, Harvey JW 1998. *Veterinary laboratory medicine*. 2. ed. Philadelphia: W.B. *Manual de Patologia Clínica Veterinária*, Saunders, p.372.

Nussey G, Van vuren JHJ, Du preez HH 1995. Effect of copper on the differential white blood cell counts of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 111: (381-388).

Oduola T, Ngaski AA, Mahe H, Muhammed AO, Akiibinu MO, Ajay AS 2016. Thyrotoxic Evaluation and Lipid Peroxidation in Wistar Albino Rats Exposed to *Vitellaria paradoxa* Stem Bark. *British Journal of Pharmaceutical Research* 10: (2231-2919).

Okamoto H, Tananka K, Hasegawa J 2005. Chrysanthemum and other plant extracts as NF-kB activation inhibitors for treatment of inflammatory diseases and skin aging and related diseases. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*.

Olson H, Betton G, Robinson D, Thomas K, Monro A, Kolaja G, Lilly P, Sanders J, Sipes G, Bracken W, Dorato M, Van Deun K, Smith P, Berger B, Heller A 2000. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 32: (56–67).

Organisation for economic cooperation and development (OECD) 2002a. *Guidelines for the Testing of Chemicals*. OECD 432. Acute Oral Toxicity. *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test, Paris.

Organisation for economic cooperation and development (OECD) 2002b. *Guidelines for the Testing of Chemicals* OECD 431. Acute Oral Toxicity. *In vitro* skin corrosion: Human skin model test, Paris.

Organisation for economic cooperation and development (OECD) 2002c. *Guidelines for the Testing of Chemicals* OECD 431. Acute Oral Toxicity. *In vitro* skin corrosion: Transcutaneous electrical resistance test (TER), Paris.

Organisation for economic cooperation and development (OECD) 2001. *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 423. Acute Oral Toxicity Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Organisation for economic cooperation and development (OECD) 2000. *Guidelines for the Testing of Chemicals* OECD 425. Acute Oral Toxicity. Up-and-down procedure, Paris.

Organisation for economic cooperation and development (OECD) 1996. *Guidelines for the Testing of Chemicals* OECD 423. Acute Oral Toxicity. Acute toxic class method, Paris.

Organisation for economic cooperation and development (OECD) 1996. *Guidelines for the Testing of Chemicals* OECD 423. Acute Oral Toxicity. Acute toxic class method, Paris.

Organisation for economic cooperation and development (OECD) 1992. *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 420. Acute Oral Toxicity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Organisation for economic cooperation and development (OECD) 1987. *Guidelines for the Testing of Chemicals*, OECD 401. Acute Oral Toxicity. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Prieto P, Baird AW, Blaauboer BJ, Castell ripoll JV, Corvi R, Dekant W, Dietl P, Gennari A, Gribaldo L, Griffin JL, Hartung T, Heindel JJ, Hoet P, Jennings P, Marocchio L, Noraberg J, Pazos P, Westmoreland C, Wolf A, Wright J, Pfaller W 2006. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. *Alternatives to laboratory animals* 34: (315-41).

Purchase IF, Botham PA, Bruner LH, Flint OP, Frazier JM, Stokes WS 1998. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. *Toxicological Sciences* 43: (86-101).

Rodrigues E, Duarte-almeida JM, Pires JM 2010. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas. Parte I. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20: (981-991).

Sangeetha MK, Vallabi DE, Sali VK, Thanka J, Vasanthi HR 2013. Sub-acute toxicity profile of a modified resveratrol supplement. *Food and Chemical Toxicology* 59: (492–500).

Santos AP, Bandeira MB, Siqueira LO 2009. Comparação entre diversos métodos de contagem diferencial de leucócitos em pacientes leucopênicos. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 31: (203-205).

Simões CMO, Petrovick PR 2010. *Farmacognosia: da planta ao medicamento* 6. Ed. Porto Alegre: UFRGS.

Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Freitas-neto AG 2003. *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica*. 2ª ed. Manole, São Paulo, p.331.

Veiga júnior VF, Pinto AC, Maciel MAM 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, 28: (519-528).

Waldia S, Joshi BC, Pathak U, Joshi MC 2011. The Genus *Plectranthus* in India and Its Chemistry. *Chemistry & Biodiversity* 8: (244-252).

Webster GL, Rupert EA 1973. *Phylogenetic significance of pollen nuclear number in the Euphorbiaceae*. *Evolution* 27: 524-531.

Werner S, Grose R 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83: (835-870).

(Artigo colocado nas normas da Revista Brasileira de Farmacognosia)

5 ARTIGO 2

Evaluation of the tissue repair of the gel phytotherapeutic of *Plectranthus neochilus*, Schlechter (boldo-opossum) and *Cnidocolus quercifolius*, Pohl (favela) in Wistar rats¹

Avaliação da reparação tecidual do gel fitoterápico de *Plectranthus neochilus*, Schlechter (boldo-gambá) e *Cnidocolus quercifolius* Pohl (favela) em ratos Wistar

¹Realizado no Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco

Michelle Suassuna de Azevedo Rêgo^{I}, Fernanda Lúcia Passos Fukahori^I, Vanessa Carla Lima da Silva^{II}, Eryvelton de Souza Franco^{II}, Sandra Maria Torres^{III}, Maria Bernadete de Sousa Maia^{IV}, Carina Scanoni^V, Mirian Nogueira Teixeira^{VI} Melânia Loureiro Marinho^{VII}, Evilda Rodrigues de Lima^{VI}*

^I*Aluna do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível de doutorado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil*

^{II}*Professor(a) do Curso de Medicina Veterinária do Instituto Brasileiro de Gestão e Marketing/Instituto Brasileiro de Saúde – IBGM/IBS, Brasil*

^{III}*Residente em Patologia Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil*

^{IV}*Professora Titular do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade, Brasil*

^V*Professora Adjunto do Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil*

^{VI}*Professora Titular do Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil*

^{VII}*Professora Titular da Universidade Federal de Campina Grande – Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Campus de Patos-PB.*

Correspondência: Autor I* - Endereço: Rua Rossini Rosevelt de Albuquerque, 1018, apt. 2204. Bairro: Piedade, CEP: 54410-310. Jaboatão dos Guararapes-PE.

Email: michellesuassuna@hotmail.com. Telefone: (81) 99141.4070

RESUMO

OBJETIVO: Investigar os efeitos de uma Formulação em Gel da associação da *Plectranthus neochilus* Schlechter (Boldo-gambá) e *Cnidocolus quercifolius* Pohl (Favela) no processo de reparação tecidual em feridas de pele de ratos.

MÉTODOS: Para a reparação tecidual e toxicidade dérmica utilizou-se 35 ratos Wistar, machos. Em todos os animais foi induzida uma ferida cirúrgica do tipo excisional na região dorso-cervical, os quais foram distribuídos em cinco grupos (n=7/grupo) e tratadas de acordo com o respectivo grupo: Grupo 1 - controle positivo, animais tratados com o gel fitoterápico comercial; Grupo 2 - controle negativo, tratados com o gel de carbopol 1%; Grupo 3 - Formulação Gel Boldo-gambá mais Favela (FGBF) 2,5%; Grupo 4 - FGBF 5%; Grupo 5 - FGBF 10%. Todos receberam 1,0ml do produto, via tópica, diariamente, durante 14 dias. O processo de reparação cutâneo foi avaliado através das observações macroscópicas, mensuração da área da ferida e análise histomorfométrica da pele.

RESULTADOS: Verificou-se a presença de exsudato em todos os grupos nas primeiras 48 horas. Todos os animais tratados apresentaram crostas, porém os tratados com a FGBF (2,5%, 5% ou 10%) ocorreu de forma mais ampla a partir do segundo dia com coloração marron-castanho, no sétimo dia, retirou-se a crosta, onde após dois dias observou-se uma nova formação nos grupos da FGBF, desprendendo-se na reepitelização. Na análise macroscópica verificou-se a presença de inflamação, granulação e epitelização nas feridas de todos os grupos de ratos tratados topicamente. No primeiro dia de tratamento nos grupos FGBF 5% ou 10% verificou-se aumento significativo (52,53% e 53,51%) das médias e erro padrão da média da área cirúrgica. No segundo até o sexto dia de tratamento no grupo FGBF 2,5% houve aumento significativo de 30,24%, 54,82%, 55,62%, 65,60%, 63,77. No quarto até o sexto dia houve aumento de 71,07%, 59,65% e 94,49% tratados com FGBF 5% e tratados com FGBF 10% com aumento significativo (54,32%, 94,91% e 116,70%) no quarto ao sexto dia. No oitavo dia de tratamento no grupo 2,5% um aumento significativo de 115,30%, comparados ao grupo tratado com o gel fitoterápico comercial. Os grupos tratados com FGBF 2,5%, 5% ou 10% apresentaram no 14º dia o processo de reepitelização em 85,72%, 85,72% e 57,15% respectivamente, enquanto os grupos controle positivo e negativo em 100%. O peso corporal dos ratos tratados topicamente com FGBF 10% teve aumento significativo quando comparados aos outros grupos tratados, nos tempos zero, sete, dez e treze dias de tratamento. A quantificação do colágeno teve redução

estatisticamente significativa nos grupos de FGBF 5% ou 10%, respectivamente. No exame histomorfométrico da pele observou-se reepitelização da epiderme e derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais, fibroblastos e vasos sanguíneos e na derme profunda da pele fibroblastos, fibras colágenas transversais e longitudinais, vasos sanguíneos e células inflamatórias em todos os grupos estudados.

CONCLUSÃO: As três formulações (FGBF 2,5%, 5% ou 10%) quando comparadas ao controle positivo, não resultou em melhora significativa na redução do tempo para o processo de cicatrização das feridas cutâneas de ratos. Contudo, entre as três formulações, a de 2,5% foi aquela que apresentou aumento na proliferação de fibroblastos e colagenização mais intensa no 14º dia de tratamento.

Palavras-chave: Fitoterapia, dermatologia, cicatrização

ABSTRAT

OBJECTIVE: To investigate the effects of a Gel Formulation of the association of *Plectranthus neochilus* Schlechter (Boldo-opossum) and *Cnidocolus quercifolius* Pohl (Favela) in the tissue repair process on rat skin wounds.

METHODS: For tissue repair and dermal toxicity, 35 male Wistar rats were used. In all animals, a surgical wound of the excisional type was induced in the dorso-cervical region, which were distributed in five groups (n = 7 / group) and treated according to the respective group: Group 1 - positive control, animals treated with The commercial herbal gel; Group 2 - negative control, treated with carbopol gel 1%; Group 3 - Formulation Gel Boldo-opossum plus Favela (FGBF) 2.5%; Group 4 - FGBF 5%; Group 5 - FGBF 10%. . All received 1.0 ml of the product, topically, daily, for 14 days. The skin repair process was evaluated through macroscopic observations, measurement of the wound area and histomorphometric analysis of the skin.

RESULTS: Exudate was present in all groups in the first 48 hours. All treated animals had crusts, but those treated with FGBF (2.5%, 5% or 10%) occurred more broadly from the second day with brown-brown coloration, on the seventh day, the crust was removed , Where after two days a new formation was observed in the FGBF groups, resulting in re-epithelialization. Macroscopic analysis revealed the presence of inflammation, granulation and epithelization in the wounds of all groups of rats treated topically. On the first day of treatment in the 5% or 10% FGBF groups there was a significant increase (52.53% and 53.51%) of the means and standard error of the mean of the surgical area. In the second to the sixth day of treatment in the 2.5% FGBF group

there was a significant increase of 30.24%, 54.82%, 55.62%, 65.60%, 63.77. In the fourth to the sixth day there was an increase of 71.07%, 59.65% and 94.49% treated with FGBF 5% and treated with 10% FGBF with a significant increase (54.32%, 94.91% and 116.70%) In the fourth to the sixth day. On the eighth day of treatment in the 2.5% group a significant increase of 115.30%, compared to the group treated with the commercial herbal gel. The groups treated with 2.5%, 5% or 10% FGBF presented on the 14th day the re-epithelialization process in 85.72%, 85.72% and 57.15% respectively, whereas the positive and negative control groups in 100% . The body weight of mice treated topically with 10% FGBF had a significant increase when compared to the other treated groups, at times zero, seven, ten and thirteen days of treatment. The quantification of collagen had a statistically significant reduction in the 5% or 10% FGBF groups, respectively. In the histomorphometric examination of the skin we observed reepithelialization of the epidermis and superficial dermis with presence of longitudinal collagen fibers, fibroblasts and blood vessels and in the dermis deep skin fibroblasts, transverse and longitudinal collagen fibers, blood vessels and inflammatory cells in all the studied groups.

CONCLUSION: The three formulations (FGBF 2.5%, 5% or 10%) when compared to the positive control did not result in a significant improvement in the reduction of the time to the healing process of the cutaneous wounds of rats. However, among the three formulations, that of 2.5% was the one that presented increased fibroblast proliferation and more intense collagenization on the 14th day of treatment.

Key words: Phytotherapy, dermatology, healing

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais e outros produtos naturais são recursos terapêuticos amplamente utilizados no auxílio da cicatrização de feridas cutâneas¹. Por ser a primeira barreira de proteção do organismo contra agentes externos, a pele está sujeita a constantes agressões e sua capacidade de reparação tecidual é de grande importância para a sobrevivência².

Há um interesse crescente no uso de terapias holísticas principalmente pela ineficiência de alguns produtos sintéticos, de alto custo e de inúmeros efeitos colaterais.

A *Plectranthus neochilus* Schlechter, é uma planta pertencente à família Lamiaceae popularmente conhecida como boldo-gambá contendo aproximadamente 350 espécies de ervas e arbustos perenes nativas de regiões tropicais da África, Ásia e

Austrália³. Alguns extratos são utilizados também como componentes de preparações cosméticas patenteadas como antissinais⁴, e produtos para a estimulação do crescimento capilar⁵. As diversas utilizações das espécies de *Plectranthus* na medicina tradicional incluem tratamentos de cefaléia, feridas, queimaduras, dermatite, alergias, picadas de inseto e de escorpião e como agente antisséptico^{6,7}.

A espécie *Cnidoscolus quercifolius* Pohl, pertence ao gênero *Cnidoscolus*, compreende cerca de 50-75 espécies, distribuídas na América tropical e concentradas, principalmente, no México e Nordeste do Brasil⁸. As espécies que compreendem o gênero *Cnidoscolus* possuem diversas propriedades medicinais, dentre elas, atividade antitumoral, antiinflamatória para o sistema genito-urinário, antisséptica e no tratamento de infecções renais, dermatológicas e lesões oftalmológicas, contusões, fraturas, feridas, verrugas, disenteria, hemorragia, apendicite e reumatismo⁹. Outro fato relevante, é que várias espécies deste gênero possuem atividade antioxidante¹⁰.

Pertencente à família Euphorbiaceae, *Cnidoscolus quercifolius* Pohl está presente nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Bahia e dentre outros¹¹. A espécie é conhecida popularmente como Faveleira ou Favela, sendo uma árvore de porte pequeno e muito conhecida por possuir tricomas urticantes distribuídos por toda a planta¹². Na medicina popular do Nordeste, a decocção, a infusão e maceração das cascas e entrecascas do caule são empregadas contra inflamações ovarianas e inflamações gerais¹³.

Diversas plantas são utilizadas no tratamento de feridas e algumas delas sem comprovação da sua eficácia. A associação da *Plectranthus neochilus* e *Cnidoscolus quercifolius* em um preparado semissólido tem sido usado como cicatrizante em lesões de pele em animais, porém sem o embasamento científico necessário para que seja estabelecida a sua eficácia terapêutica. Diante desta questão, se fez necessária à pesquisa da ação cicatrizante e seu uso como medicamento seguro, portanto, objetivou-se investigar o efeito de uma formulação em gel da associação da *Plectranthus neochilus* e *Cnidoscolus quercifolius*, no processo de reparação tecidual de feridas experimentais em ratos.

MÉTODOS

Material botânico

As partes aéreas de *Plectranthus neochilus* e entrecascas de *Cnidoscolus quercifolius* foram coletadas de espécimes localizados na mesorregião do Sertão

Paraibano, município de Patos – Brasil (7° 01' 28" Sul, 37° 16' 48" Oeste). O material coletado foi identificado pela Engenheira Florestal Dra. Ângela Maria Miranda do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e uma exsiccata de cada depositada no Herbário da UFRPE sob os números 21717 e 21101, respectivamente.

Obtenção do extrato hidroalcoólico

A obtenção do extrato hidroalcoólico foi realizado no Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Para a obtenção do extrato orgânico, 500g das partes aéreas de boldo-gambá e 500g da entrecasca de favela foram desidratadas em estufa de circulação de ar a 60°C, trituradas, reduzidas a pó e pesadas.

O material resultante foi colocado em balão de fundo chato adicionado a 1L de uma solução (EtOH: ÁGUA 1:1), deixando em repouso por uma semana à temperatura ambiente, em seguida o material foi filtrado à vácuo. O mesmo procedimento foi repetido mais duas vezes. Os líquidos obtidos foram colocados em balão de fundo redondo e levados ao rotoevaporador a temperatura de aproximadamente 40° a 60° e pressão de aproximadamente -650mmHg.

A parte aquosa foi congelada e liofilizada. Obteve-se um extrato hidroalcoólico de *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá) e *Cnidioscolus quercifolius* (favela), que foram armazenados a -20°C, com rendimento de 26,6% e 10% respectivamente.

Preparação do gel fitoterápico

Para a obtenção do veículo foi utilizado carbopol a 1%. O gel apresentou propriedades características como boa viscosidade e o pH foi ajustado para 6,0. Para cada 100mg do veículo foi utilizado 2,5mg do extrato hidroalcoólico bruto de favela associada a 2,5mg do extrato hidroalcoólico bruto de boldo-gambá (FGBF 2,5%); na formulação a 5,0% foi realizada o mesmo procedimento, utilizando 5mg de cada extrato (FGBF 5%), e na 10% utilizou-se 10mg de cada extrato (FGBF 10%).

Modelos biológicos

Foram utilizados 35 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos, peso corpóreo de 220 a 250g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os animais da pesquisa foram mantidos em ambiente climatizado (20-22°C), sob iluminação artificial, com ciclo claro-escuro a cada 12 horas, acondicionados em gaiolas metabólicas individuais, com livre acesso a alimentação e água. Os primeiros 15 dias antes da cirurgia foram considerados como período de

aclimatação, visando estabilizar os animais no seu novo local na sala de experimentação.

Considerações bioéticas

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, nº 23076.011939/2014-25.

Modelo de ferida excisional

Para realização do procedimento cirúrgico (jejum de 12 horas), os ratos Wistar (n=35) submetidos a pesagem e, em seguida, anestesiados com cetamina (10mg/kg) e xilazina (3mg/kg)¹⁴, por via intraperitoneal. Após indução anestésica, os animais foram colocados em decúbito ventral e submetidos a tricotomia manual e antissepsia com 0,1% de álcool iodado na linha média dorsal da região cervical de cada animal.

A área da incisão foi marcada com uma caneta de marcação e molde metálico vazado ($\pm 78,5 \text{ mm}^2$). Para remover a pele, tecido subcutâneo, fáscia e panículo carnososo, utilizou-se tesoura reta de Iris e pinça de Adson. Depois da incisão, um anel de contenção feito de material atóxico e hipoalergênico de silicone foi suturado ao redor da ferida cirúrgica usando de 4 a 6 pontos isolados simples com fio monofilamentoso de nylon 4.0 agulhado, distribuídos simetricamente¹⁵, de modo que a ferida permanecesse centralizada (Figura 1A, B, C, D, E e F).

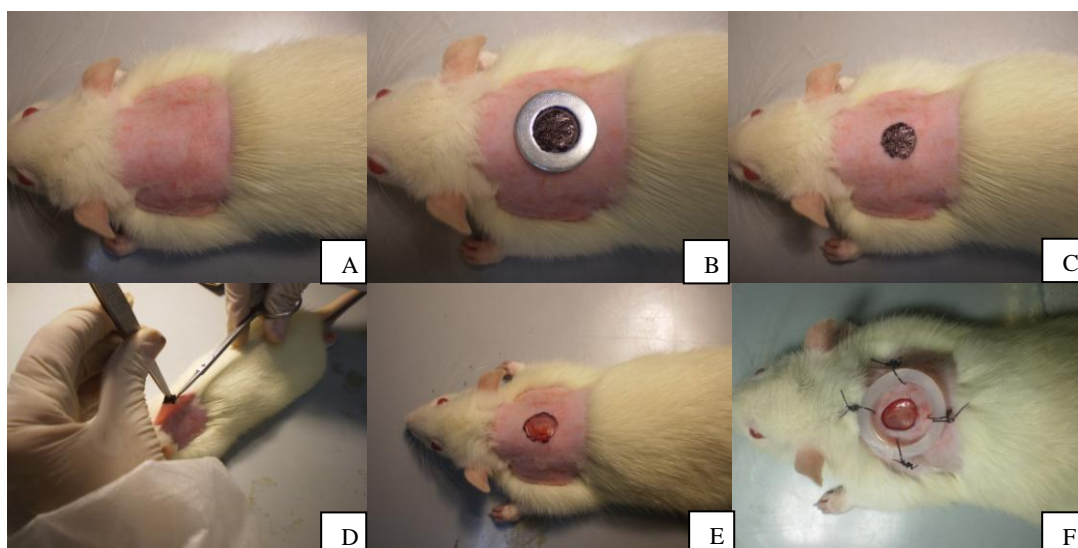


Figura 1 - Procedimento cirúrgico para realização de ferida excisional em ratos Wistar: A – Tricotomia manual; B – Molde metálico vazado; C – Marcação com caneta; D – Remoção da pele utilizando tesoura reta de Iris e pinça de Adson; E – Ferida Excisional; F - Colocação do anel de contenção de silicone

Após a cirurgia, os ratos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n= 7 animais por grupo): Grupo 1, controle positivo tratados com um gel fitoterápico já existente no mercado (10ml de tintura de *Calendula officinalis* L.; 10ml de tintura de *Stryphnodendron barbatiman* Mart.; 5ml de tintura de *Symphytum officinalis* L.; 5ml de tintura de *Aloe vera*; 3ml de tintura de *Matricaria chamomilla* L.; 5ml de tintura de *Echinacea angustifolia* DC.; 8ml de tintura de própolis, 100g do gel carbopol; Grupo 2, controle negativo, tratados com o veículo (carbopol); os Grupos 3, 4 ou 5 tratados com o gel (carbopol) a base de *Plectranthus neochilus* e *Cnidocolus quercifolius* nas concentrações de 2,5%, 5% e 10%, respectivamente.

Todos os animais foram tratados durante 14 dias consecutivos, com o auxílio de seringas estéreis de 1ml de gel específico para cada animal no seu respectivo grupo. A remoção de crostas e resíduos foram realizadas no sétimo dia, para avaliação do tecido em processo cicatricial, o valor real da área da ferida remanescente e melhor absorção do medicamento. Os animais foram pesados antes do início do tratamento, no quarto, sétimo, 10º, 13º e 15º dias pós-cirurgia.

Análise macroscópica da ferida

A contração das feridas cirúrgicas tratadas com os diferentes produtos, foram medidas diariamente através de um paquímetro digital (0-150mm, Mitutoyo®) de acordo com a equação $A = \pi \cdot R \cdot r$, onde A representa a área (mm²), “R” o raio maior, e “r” o menor raio¹⁶. As feridas também foram avaliadas pela presença de hiperemia, edema, sangramento, secreção, odor e crosta.

Análise microbiológica

Para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos utilizou-se o extrato de *Plectranthus neochilus* e *Cnidocolus quercifolius*, segundo a técnica de difusão com discos¹⁷.

Análise histomorfométrica

No final do experimento, os animais foram submetidos a prévio jejum de 10 horas, anestesiados com cetamina (10mg/kg) e xilazina (3mg/kg) e submetidos a decapitação. Foi recolhido material para a análise histomorfométrica das lesões cutâneas. Os materiais foram fixados em formalina tamponada a 10% por um período mínimo de 24 horas e posteriormente desidratadas, inclusas em parafina, submetidas a cortes transversais de 4µ, com micrótomo, e coradas com hematoxilina–eosina (HE), para avaliação global dos cortes de tecido, e pelo Tricômico de Mallory (TM), para avaliar a presença de fibras colágenas existentes nos locais de fibrose do interstício¹⁸.

As lâminas foram selecionadas por amostragem, examinadas sob microscópio óptico, três imagens por campo (0,0018mm² área) foram capturados com uma câmara digital (magnifi-400x) ligado ao microscópio (Olympus BX-49 microscópio de luz e câmara). As imagens foram armazenadas e submetidas a contagem de vasos sanguíneos e avaliação da densidade de colágeno de todas as lesões com a ajuda da marcação digital, segundo metodologia descrita por Rocha júnior¹⁹.

Análise estatística

Os resultados foram expressos por média \pm erro padrão da média e para fins estatísticos, sendo considerada a significância mínima de 0,05 ($p < 0,05$). A normalidade das medidas foi avaliada através do teste de *Kolmogorov Smirnov*. Os dados paramétricos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) duas vias, com aplicação do pós-teste de *Bonferroni*. Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa Prism[®] 4.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, US).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações clínicas diárias mostraram adequada recuperação, com manutenção do estado geral, presença de atividade física e disposição para alimentar-se nos animais tratados com FGBF a 2,5%, 5% ou 10% e grupos controle positivo e negativo. A anestesia e o procedimento cirúrgico de todos os animais transcorreu sem complicações e não houve óbitos.

Verificou-se a presença de exsudato em todos os grupos nas primeiras 48 horas após a cirurgia. Bates-Jensen e col.²⁰ relatou que a presença de exsudato nas primeiras 48 a 72 horas após uma incisão é normal, no entanto, após este período é um sinal de danos para o processo de cicatrização.

Todos os animais tratados apresentaram a formação de crostas, porém os tratados com a FGBF (2,5%, 5% ou 10%) ocorreu de forma mais ampla a partir do segundo dia com coloração marron-castanho. A remoção da crosta foi necessária no sétimo dia, para permitir melhor contato do gel nas diferentes concentrações (2,5%, 5% ou 10%) e dos grupos controles para visualização do leito da ferida. Essas observações também foram relatadas por Oliveira e col.²¹. Howel e Maquart²² definiram como reparação de ferida o processo de cicatrização, que pode ocorrer na primeira intenção, onde há uma união imediata das bordas ou, em segunda intenção, onde as bordas são separadas e há necessidade de formação de tecido cicatricial.

Após dois dias da retirada da crosta, observou-se uma nova formação apenas nos grupos da FGBF a 2,5%, 5% ou 10%, desprendendo-se naturalmente quando reepitalizado, com crescimento de pelos em torno da lesão.

A Tabela 1 apresenta as médias e erro padrão da média da área cirúrgica dos ratos entre os grupos controle positivo, controle negativo, FGBF 2,5%, FGBF 5% ou FGBF 10% durante todo o experimento. As áreas das feridas diminuíram progressivamente em todos os grupos. Quando os grupos foram comparados às médias das áreas foram maiores e estatisticamente significativas ($P < 0,05$). No primeiro dia de tratamento nos grupos FGBF 5% ou 10% verificou-se aumento significativo (52,53% e 53,51%) das médias e erro padrão da média da área cirúrgica. No segundo até o sexto dia de tratamento no grupo FGBF 2,5% houve aumento significativo de 30,24%, 54,82%, 55,62%, 65,60%, 63,77. No quarto até o sexto dia houve aumento de 71,07%, 59,65% e 94,49% tratados com FGBF 5% e tratados com FGBF 10% com aumento significativo (54,32%, 94,91% e 116,70%) no quarto ao sexto dia. No oitavo dia de tratamento no grupo 2,5% um aumento significativo de 115,30%, comparados ao grupo tratado com o gel fitoterápico comercial.

Tabela 1 – Área cirúrgica de ferida excisional em ratos nos grupos controle positivo, controle negativo, Formulação 2,5%, Formulação 5% ou Formulação 10%

| Tempo | Grupos | | | | |
|----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Fitoterápico comercial | Veículo da formulação | FGBF 2,5% | FGBF 5% | FGBF 10% |
| Zero (Início) | 301,99±11,63 | 317,45±9,29 | 336,55±7,71 | 307,28±14,85 | 333,28±10,61 |
| 1º | 187,47±18,44 | 207,38±15,08 | 234,58±12,94 | 285,95±14,59* | 287,71±26,29* |
| 2º | 217,08±16,91 | 208,33±7,52 | 282,73±12,01* | 273,94±20,25 | 21,59±17,74 |
| 3º | 188,75±18,09 | 207,42±12,91 | 292,24±12,02* | 338,13±28,11* | 272,31±19,41* |
| 4º | 172,63±17,31 | 189,44±4,76 | 268,65±10,73* | 295,33±28,27* | 266,41±13,38* |
| 5º | 141,55±12,29 | 155,74±7,26 | 234,41±8,06* | 225,99±29,06* | 275,90±20,26* |
| 6º | 130,70±14,37 | 120,83±11,20 | 214,05±20,43* | 254,20±30,63* | 283,23±30,44* |
| 7º | 107,81±15,09 | 94,82±9,52 | 152,27±11,54 | 115,56±16,30 | 95,23±12,31 |
| 8º | 62,40±8,09 | 51,30±6,56 | 134,35±7,13* | 97,09±12,22 | 101,93±11,06 |
| 9º | 52,55±14,12 | 30,75±5,63 | 74,44±12,62 | 77,10±17,03 | 75,97±20,42 |
| 10º | 36,49±9,97 | 10,60±8,86 | 47,03±14,54 | 42,45±9,94 | 46,16±19,81 |
| 11º | 8,11±4,42 | 0,93±0,93 | 22,94±7,32 | 27,99±12,72 | 52,27±19,08 |
| 12º | 0,00 | 0,00 | 26,71±11,91 | 9,80±6,82 | 20,06±6,47 |
| 13º | 0,00 | 0,00 | 15,54±10,62 | 5,47±4,27 | 6,56±3,26 |
| 14º | 0,00 | 0,00 | 4,44±4,44 | 2,56±2,56 | 7,87±5,07 |

Valores são expressos em média ± erro padrão da média. Valores submetidos a ANOVA duas vias com pós-teste *Bonferroni* significância*($p < 0,05$)

Os grupos tratados com FGBF 2,5%, 5% ou 10% apresentaram no 14º dia o processo de reepitelização em 87,72%, 87,72% e 57,15% respectivamente, enquanto os grupos controle positivo e negativo em 100%. Esses resultados possivelmente deve-se a intensa formação de crosta nos grupos FGBF, mesmo após a retirada no sétimo dia, impedindo a penetração do medicamento.

Estudos com uma formulação semissólida de linhaça mostrou que a administração tópica de SSFLO (1% ou 5%) em feridas excisional experimentais promove reepitelização em 100% dos animais tratados, indicando o potencial de ação terapêutica do óleo de linhaça quando usado em baixas concentrações na preparação de fórmulas dermatológicas, com uma base sólida para ser usado no processo de reparações dermatológicas²³.

A Figura 2 (A, B, C, D, E e F) mostram feridas excisionais em ratos dos grupos controle positivo e negativo nos dias zero, 7 e 14 do experimento. A evolução das feridas nos grupos FGBF 2,5%, 5% e 10% são mostradas na Figuras 3 (A, B e C, D, E, F, G, H e I).

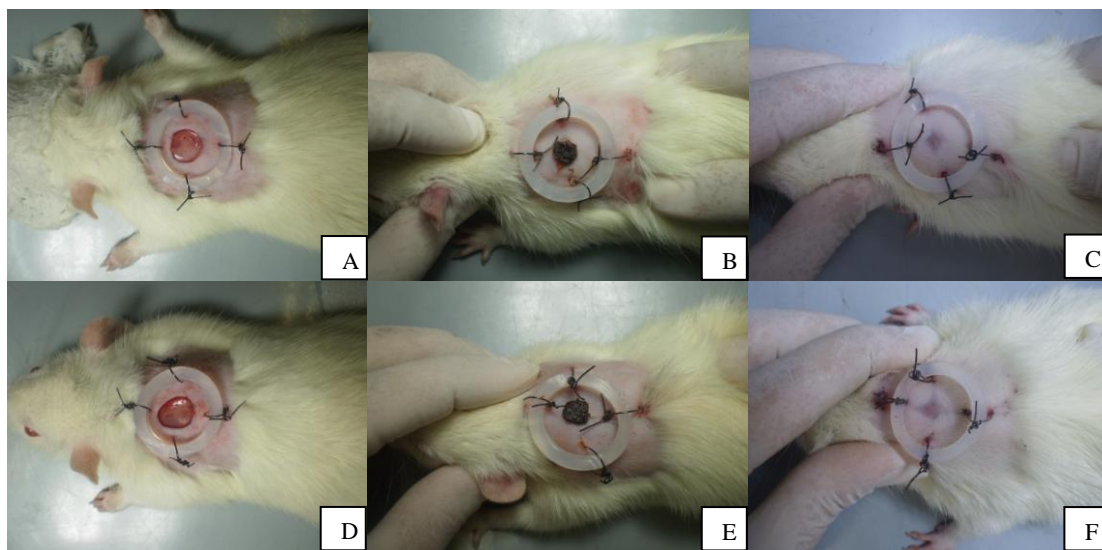


Figura 2- Evolução das feridas excisionais do grupo controle positivo e negativo; A – Dia zero; B – Dia 7, antes da retirada da crosta; C – Dia 14 com total reepitelização (positivo); D – Dia zero; E – Dia 7, antes da retirada da crosta; F – Dia 14 com total reepitelização (negativo);

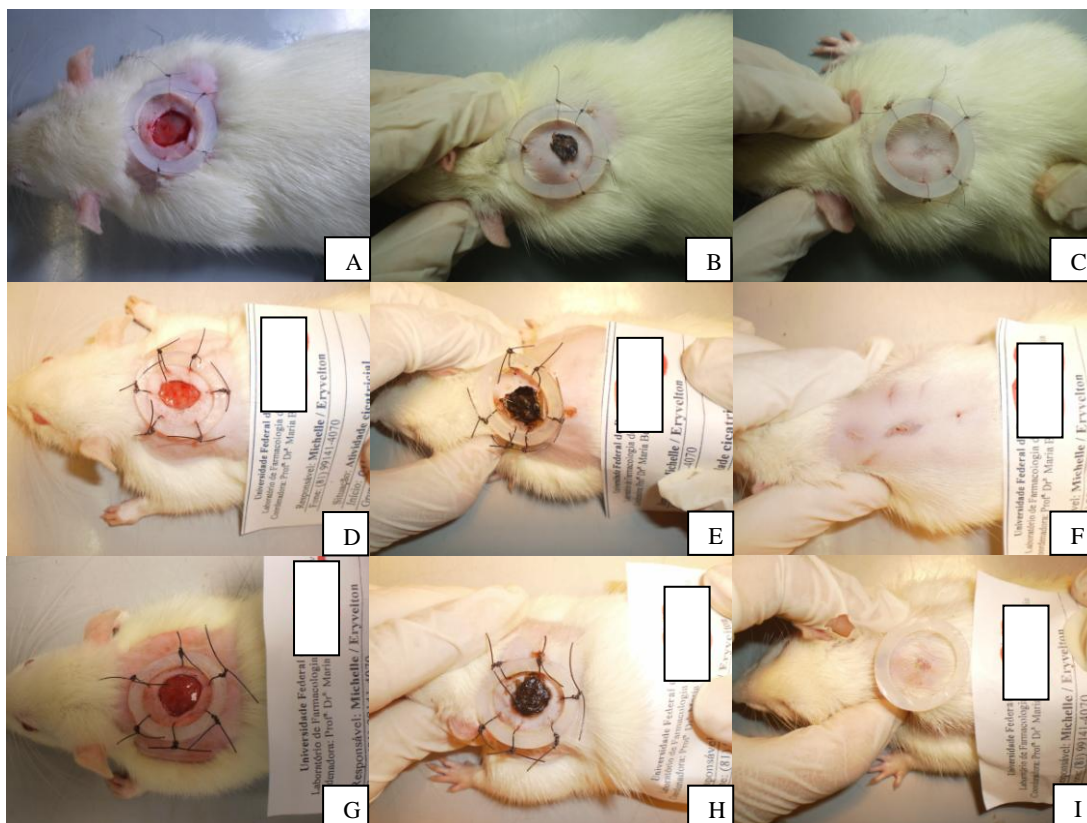


Figura 3- Evolução das feridas excisionais do grupo FGFB 2,5%, 5 e 10%; A – Dia zero; B – Dia 7, antes da retirada da crosta; C – Dia 14 com total reepitelização (2,5%), D – Dia zero; E – Dia 7, antes da retirada da crosta; F – Dia 14 com total reepitelização (5%); G – Dia zero; H – Dia 7, antes da retirada da crosta; I – Dia 14 com total reepitelização (10%)

A Figura 4 apresenta a evolução do peso corporal dos ratos Wistar machos durante o experimento. Observa-se que foi estatisticamente significativo o grupo da FGFB a 10% nas pesagens zero, sete, dez e treze dias. No entanto, estes resultados podem estar relacionados ao menor peso corpóreo dos ratos desde o dia zero comparados com os demais grupos e por não apresentarem perda de peso. Possivelmente, esses resultados deve-se ao mesmo manejo, não afetando a ingestão de água ou alimentos, bem como reações clínicas significativas, como: prurido intenso, edema, eritema, diarreia, vômitos, mudanças de comportamento ou mortes.

Animais que apresentam lesões dermatológicas, acompanhadas de prurido e dor, não se alimentam bem e apresentam perda de peso²⁴. Este fato não foi observado nos animais desta pesquisa que foram submetidos aos tratamentos durante 14 dias, tendo em vista estes apresentarem ganho de peso.

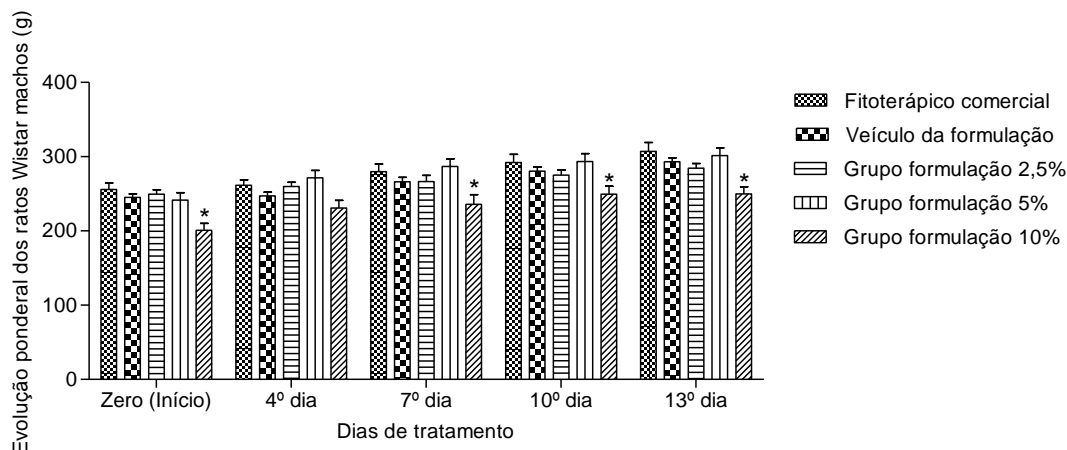


Figura 4 – Evolução do peso corporal (g) dos ratos Wistar machos tratados com fitoterápico comercial, veículo da formulação, formulação (2,5%, 5% ou 10%)

Os resultados apresentados na Figura 5 demonstram que na comparação da espessura do epitélio não houve diferenças estatísticas entre os grupos. Entretanto, observa-se que o grupo FGBG 2,5% apresentou maior espessura, enquanto o grupo FGBG 10% teve menor valor. E quando comparados, o grupo fitoterápico comercial e o grupo FGBG 5% tiveram valores aproximados.

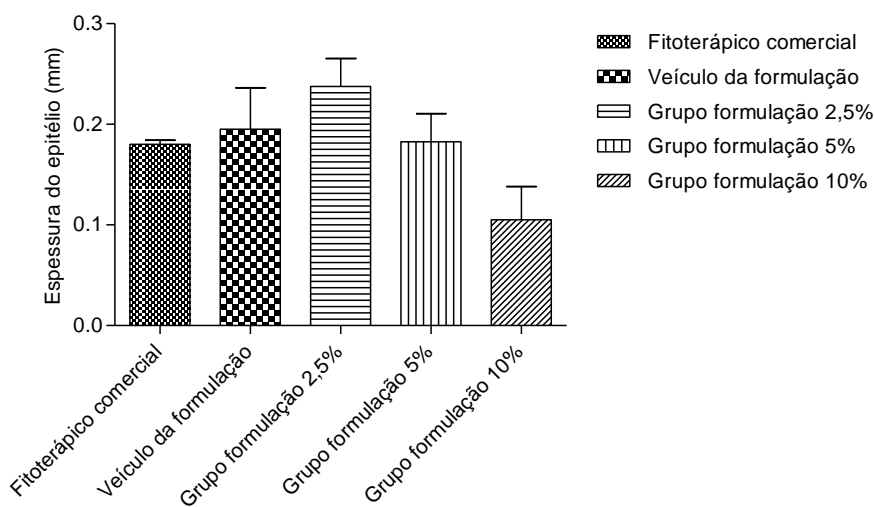


Figura 5 – Espessura do epitélio da pele dos ratos Wistar machos tratados com fitoterápico comercial, veículo da formulação ou formulação (2,5%, 5% ou 10%)

Os resultados observados na Figura 6 demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa nos grupos de FGBF 5% e 10%, no qual apresentaram menor quantidade de colágeno, em relação aos outros. Shetty e col.²⁵ afirmaram que o uso de modelos permite a avaliação dos efeitos dos produtos relacionados sobre o mecanismo de ação, contração e possível estimulação da reparação tecidual e resistência da pele, que deve estar associado com a estimulação da síntese de colágeno.

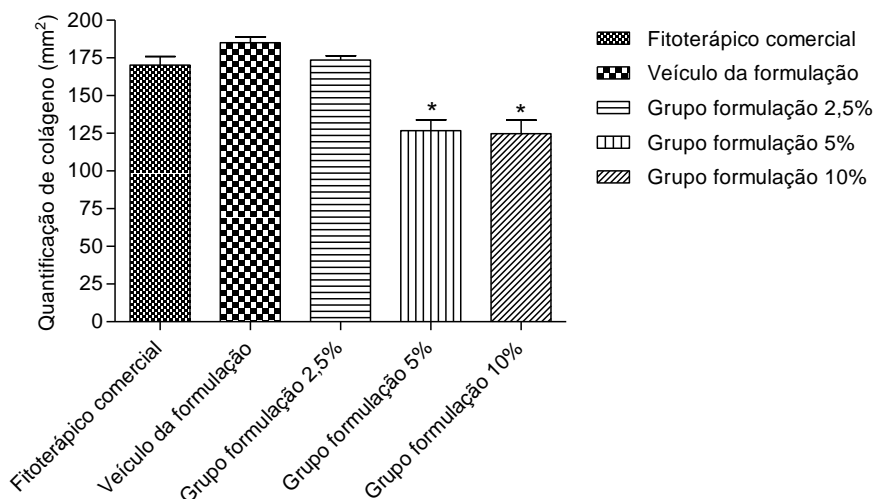


Figura 6 – Quantificação do colágeno da pele dos ratos Wistar machos tratados com fitoterápico comercial, veículo da formulação ou formulação (2,5%, 5% ou 10%)

Na Figura 7 verifica-se que não houve diferença estatisticamente significativa nos grupos de estudados. O grupo FGBF 2,5% apresentou maior quantidade de vasos em relação aos demais grupos. O grupo veículo da formulação apresentou o menor resultado.

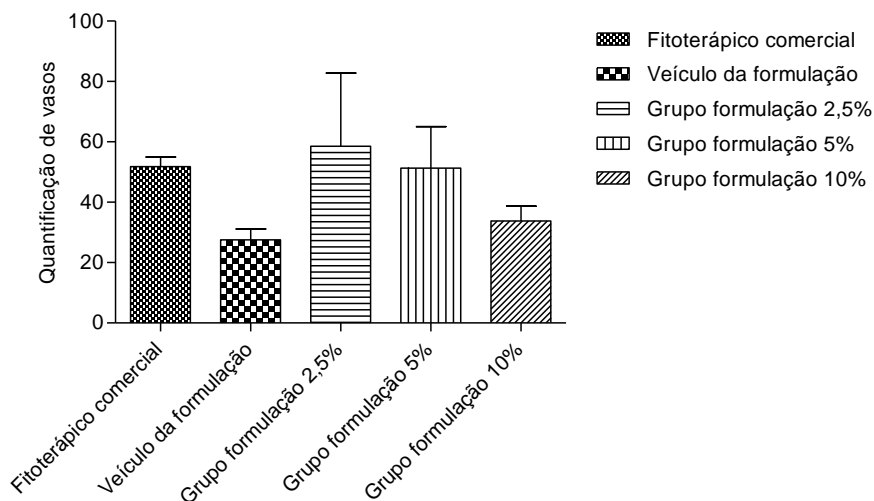


Figura 7 – Quantificação de vasos sanguíneos da pele dos ratos Wistar machos tratados com fitoterápico comercial, veículo da formulação ou formulação (2,5%, 5% ou 10%)

Quanto aos ensaios antimicrobianos dos extratos hidroalcoólicos de *Plectranthus neochilus* ou *Cnidocolus quercifolius* e da associação das duas plantas, utilizando as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides* e *Escherichia coli*, os resultados mostraram que não foram sensíveis aos extratos isolados ou a sua associação.

Isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* são com frequência resistentes a muitos antibióticos. Atualmente, varias cepas são resistentes a agentes microbianos utilizados na clinica, este quadro é preocupante uma vez que são necessários vários anos de estudos para o desenvolvimento de novos antibióticos²⁶.

Em relação ao estudo histomorfométrico da pele no Grupo gel fitoterápico comercial (controle positivo) observou-se reepitelização completa da epiderme e derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais, fibroblastos e vasos sanguíneos (Figura 8A) e na derme profunda da pele fibroblastos, fibras colágenas transversais e longitudinais, vasos sanguíneos e escassas células inflamatórias (Figura 8B).

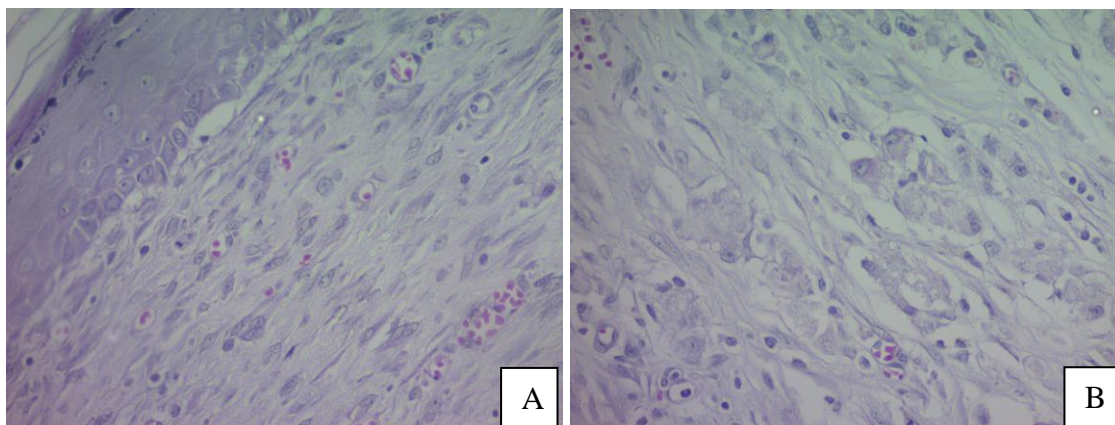


Figura 8 A - Fotomicrografia da pele de ratos do grupo controle positivo, apresentando reepitelização completa da epiderme e derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais, fibroblastos e vasos sanguíneos. B - Fotomicrografia da derme profunda da pele de ratos do grupo controle positivo, apresentando fibroblastos, fibras colágenas transversais e longitudinais, vasos sanguíneos e escassas células inflamatórias. AU 400X; Coloração H.E.

No Grupo veiculo da formulação (controle negativo), a pele apresentou reepitelização completa da epiderme e derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais, fibroblastos, fibrócitos e vasos sanguíneos (Figura 9A) e no exame da derme profunda da pele, apresentando fibroblastos, fibras colágenas longitudinais e transversais, vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias mononucleares (Figura 9B).

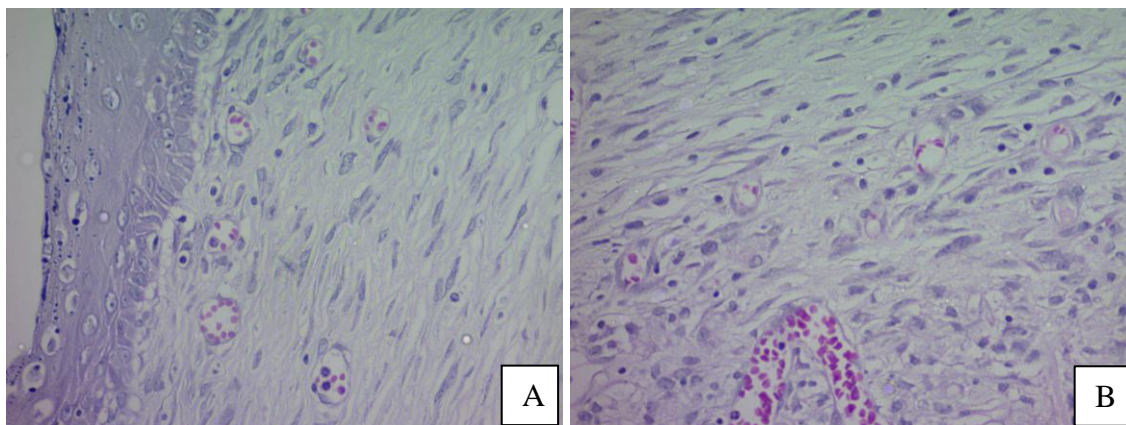


Figura 9 A - Fotomicrografia da pele de ratos do grupo controle negativo, apresentando reepitelização completa da epiderme e derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais, fibroblastos, fibrócitos e vasos sanguíneos. B - Fotomicrografia da derme profunda da pele, apresentando fibroblastos, fibras colágenas longitudinais e transversais, vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias mononucleares. AU 400X; Coloração H.E.

No Grupo FGBF 2,5% a histomorfometria mostrou a pele com reepitelização completa da epiderme e derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais e transversais, com presença de fibroblastos e muitos vasos sanguíneos (Figura 10A) e da derme profunda da pele, apresentando muitos fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias mononucleares (Figura 10B).

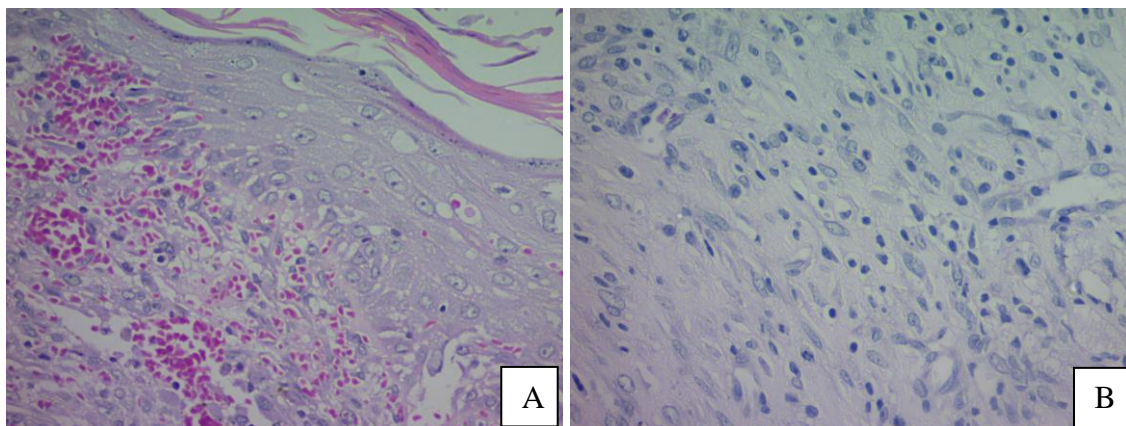


Figura 10 A - Fotomicrografia da pele de ratos do grupo FGBF 2,5%, apresentando reepitelização completa da epiderme e derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais e transversais, com presença de fibroblastos e muitos vasos sanguíneos. B - da derme profunda da pele, apresentando muitos fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias mononucleares. AU 400X; Coloração H.E.

No Grupo FGBF 5% de pele, apresentando reepitelização completa da epiderme, porém, estrato córneo não evidenciado nessa imagem; derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais, fibroblastos e muitos vasos sanguíneos (Figura 11A) e na derme profunda da pele, apresentando muitas células inflamatórias mononucleares difusas em meio a fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos (Figura 11B).

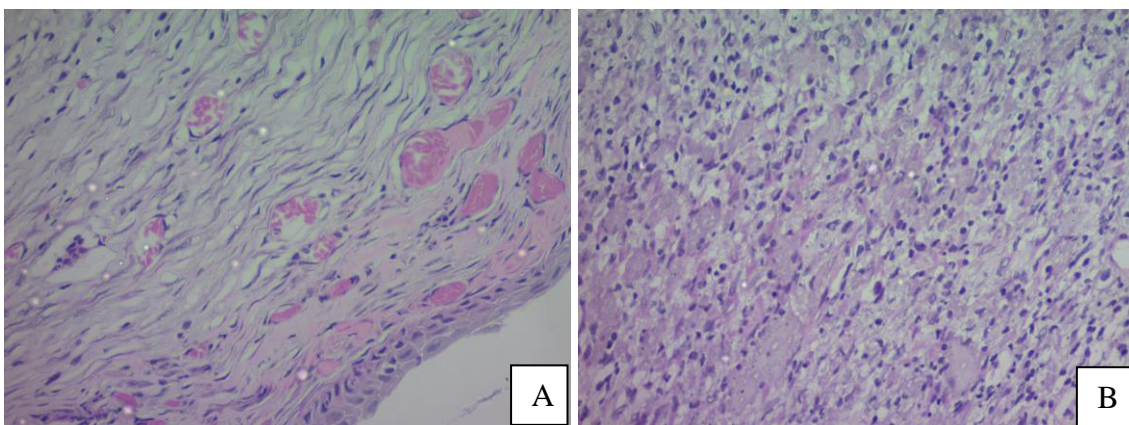


Figura 11 A - Fotomicrografia da pele de ratos do grupo FGBF 5%, apresentando reepitelização completa da epiderme, porém, estrato córneo não evidenciado nessa imagem; derme superficial com presença de fibras colágenas longitudinais, fibroblastos e muitos vasos sanguíneos. B - Fotomicrografia da derme profunda da pele, apresentando muitas células inflamatórias mononucleares difusas em meio a fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos. AU 400X; Coloração H.E.

No Grupo FGBF 10% apresentando reepitelização completa da epiderme e derme com presença de fibroblastos e vasos sanguíneos (Figura 12A) e na análise profunda da pele, apresentando muitas células inflamatórias mononucleares difusas em meio a fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos (Figura 12B).

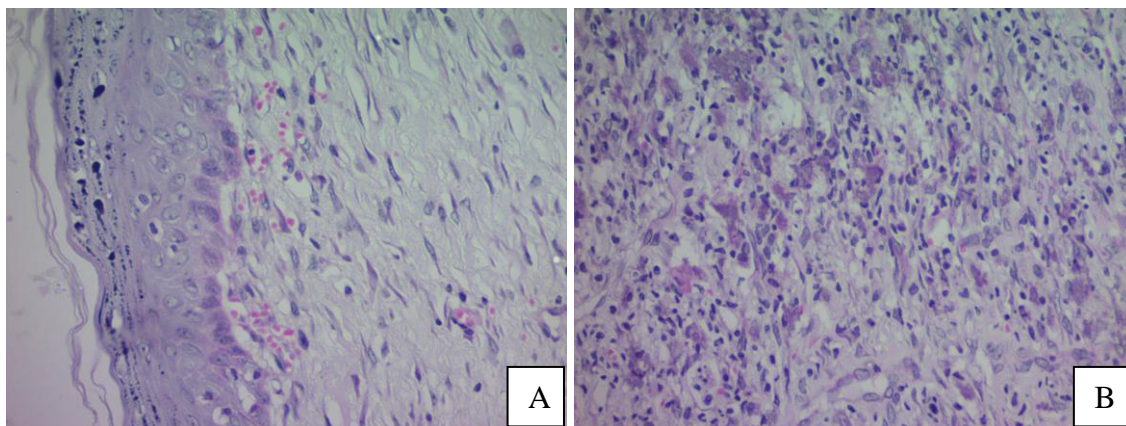


Figura 12 A - Fotomicrografia da pele de ratos do grupo FGBF 10%, apresentando reepitelização completa da epiderme e derme com presença de fibroblastos e vasos sanguíneos. B - Fotomicrografia da derme profunda da pele, apresentando muitas células inflamatórias mononucleares difusas em meio a fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos. AU 400X; Coloração H.E.

Na análise histomorfométrica para avaliar o tratamento com FGBF (2,5%, 5% e 10%) foi influenciado na reparação de segunda intenção a presença de papilas dérmicas, número de vasos sanguíneos, número de células de fibroblastos e densidade de colágeno, avaliou-se a morfologia histológica da região dérmica após 14 dias de tratamento e comparou-se com grupos controles. Observou-se que 100% dos animais

(amostragem) dos grupos tratados com FGBF (2,5%, 5% e 10%) e os grupos controle positivo e negativo mostraram reepitelização completa, bem como a resistência da pele.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e nas condições em que esta pesquisa foi realizada, conclui-se que a utilização do gel fitoterápico da associação da *Plectranthus neochilus* (boldo-gambá) e *Cnidocolus quercifolius* (favela) nas concentrações de 2,5%, 5% ou 10% quando comparadas ao controle positivo, não resultou em melhora significativa na redução do tempo para o processo de cicatrização das feridas cutâneas de ratos Wistar. Contudo, entre as três formulações, a de 2,5% foi aquela que apresentou aumento na proliferação de fibroblastos e colagenização mais intensa no 14º dia de tratamento.

REFERÊNCIAS

1. Eurides D, Mazzanti A, Gonçalves GF, Belletti ME, Silva LAF, Fioravanti MCS, Chaves NST, Bombonato PP, Campos VA, Ogata AS. Aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii*). Veterinária Notícias. 1998; 4(1): 77-82.
2. Nogueira RMB, Kitamura EA, Aguiar OM. Estudo clínico da reparação tecidual de feridas cutâneas de cães tratados com papaína e colagenase. Nosso Clínico. 2005; 8(43): 25-28.
3. Codd LE. Lamiaceae. In: LEISTNER OA. (ed.). Flora of Southern Africa. Pretoria: Botanical Research Institute, Department of Agriculture and Water Supply, 1985. Vol. 28, part 4, p. 137-151.
4. Okamoto H, Tanaka K, Hasegawa J. Chrysanthemum and other plant extracts as NF- κ B activation inhibitors for treatment of inflammatory diseases and skin aging and related diseases. Ago. 2005, Jpn. Kokai Tokkyo Koho.
5. Kaneda K, Serizawa S, Maruyasu S, Hasegawa M, Motono M. Hair growth stimulating compositions containing (benzylamino) purines and Labiatae extracts. Feb. 2005. Jpn. Kokai Tokkyo Koho.
6. Ascensão L, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Schripsema J, Deans SG, Scheffer JJC. *Plectranthus madagascariensis*: morphology of the glandular trichomes,

essential oil composition, and its biological activity. *J. Plant Sciences*. 1998; 159(1): 31-38.

7. Ascensão L, Mota L, Castro M. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. *Ann. Bot.* 1999; 84(4): 437-447.

8. Webster GL. Classification of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 1994; 81(1): 3-32.

9. Agra MF, Silva KN, Ionaldo JLDB, Freitas PF, Barbosa-filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008; 18(3): 472-508.

10. Sobrinho TJSP, Castro VTNA, Saraiva AM, Almeida DM, Tavares EA, Amorim E LC. Phenolic content and antioxidant capacity of four *Cnidocolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011; 5(20): 2310-2316.

11. Duque JG. *Perspectivas Nordestinas*. 2 ed., Fortaleza: Banco do Brasil, 2004.

12. Maia-silva C, Silva CI, Hrcir M, Queiroz RT, Imperatriz-fonseca VL. *Guia de Plantas visitadas por abelhas na caatinga*. 2012. 1 ed., Editora: Fundação Brasil Cidadão.

13. Lorenzi H, Matos FJ. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum. 2002.

14. Andrade SF, *Manual de Terapêutica Veterinário*, São Paulo: Rocca, Brasil, 2002.

15. Galiano RD, Michaels LV, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine modelo f incisional wound healing. *Wound repair and regeneration*. 2004; 12(4): 485-492.

16. Prata MB, Haddad CM, Goldenberg S, Simões MJ, Moura LAR, Trabulsi LR. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 1988; 3(2): 43-48.

17. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 1966; 45: 493-496.

18. Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Freitas-neto AG. 2003. *Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica*. 2ª ed. Manole, São Paulo, p.331.

19. Rocha júnior AM, Oliveira RG, Farias LCR, Andrade LCR, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser

de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2006; 81(2): 150-6.

20. Bates-jensen BM, Wethe J. Acute surgical wound management. In: Sussman C, Bates-jensen BM. *Wound care – a collaborative practice manual for physical therapists and nurses*. 1998. Gaithersburg, MD; Aspen Publishers.

21. Oliveira ST, Leme MC, Pippi NL, Raiser AG, Manfron MP. Formulações de confrei (*Symphytum officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos, *Revista da FZVA Uruguaiana*, 2000/2001; 7/8(1): 65-74.

22. Howel JP, Maquart FX. La cicatrisation. *La Reserch*. 1991; 22(236):1174-81.

23. Franco ES. Avaliação pré-clínica da toxicidade dérmica de reparação tecidual de uma formulação semi-sólida do óleo de linhaça (*Linium usitatissimum* L.) em roedores e coelhos. 2011. Dissertação (Mestrado em inovação terapêutica) – Centro de Ciências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 89f.

24. Brito, ARMS. Toxicologia pré-clínica de plantas medicinais. In : Di stase LC, *Plantas medicinais: arte e ciência*. 1995. São Paulo: UNESP, p.100-7.

25. Shetty BV, Arjuman A, Jorapur A, Samanth R, Yadav SK, Valliammai N, Tharian AD, Sudha K, Rao GM. Effect of extract of *Benincasa hispida* on oxidative stress in rats with indomethacin induced gastric ulcers. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2008; 52:178–182.

26. Ferensis GE, Tapia A, Lopez SN, Zacchino SA. Antimicrobial activity of plants used intraditional medicine of San Juan providence, Argentine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001; 78: 103-107.

(Artigo colocado nas normas da Revista Acta Cirúrgica Brasileira)

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os animais não apresentaram sinais clínicos de toxicidade após exposição via gavagem e dérmica às substâncias, entretanto, o extrato do *Plectranthus neochilus* provocou aumento relativo do peso do fígado no estudo de toxicidade oral aguda nos camundongos, o que sugere um possível efeito tóxico e, portanto requer cuidado na sua ingestão, mesmo em dose única, apresentando uma tendência crônica de toxicidade.

A utilização do gel fitoterápico da associação da *Plectranthus neochilus* e *Cnidocolus quercifolius* na concentração de 2,5%, 5% ou 10% em feridas cutâneas de ratos Wistar quando comparadas ao controle positivo, não resultou em melhora significativa na redução do tempo para o processo de cicatrização das feridas cutâneas de ratos. Contudo, entre as três formulações, a de 2,5% foi aquela que apresentou aumento na proliferação de fibroblastos e colagenização mais intensa no 14º dia de tratamento, sugerindo efeito benéfico no processo de cicatrização.

Faz-se necessário a realização de outros ensaios de toxicidade sub-crônica e crônica no intuito de determinar o perfil de segurança dos extratos para que os mesmos possam se tornar agentes seguros para uso terapêutico, e avaliar novas concentrações com maior número de animais para dá mais consistência aos resultados.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J. A., KLAGSBRUN, M. **Modulation of wound repair by members of the fibroblast growth factor family.** In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (2nd ed.), edited by Clark RAF. New York: Plenum, 1996, p. 195–248.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; IONALDO, J. L. D. B.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry, Great Britain**, v.43, n.6, p.255-1260, 1996.
- ALASBAHI, R. H.; MELZIG, M. F. *Plectranthus barbatus*: a review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology – part1. **Planta Med.**, Vol. 76, n. 7, p. 653-661, May. 2010.
- ALVES, D. L.; SILVA, C. R. **Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal.** São Paulo: Atheneu, 2002.
- ANTONIADES, H. N. GALANOPOUOLOS, T.; NEVILLE-GOLDEN KIRITSY, C.P.; LYNCH, S.E. Expression of growth factor and receptor mRNAs in skin epithelial cells following acute cutaneous injury. **Am. J. Pathol.**, v. 142, p. 1099-1110, 1993.
- ASCENSÃO, L.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; SCHRIPSEMA, J.; DEANS, S. G.; SCHEFFER, J. J. C. *Plectranthus madagascariensis*: morphology of the glandular trichomes, essential oil composition, and its biological activity. **J. Plant Sciences**, vol. 159, n. 1, p. 31-38, Jan. 1998.
- ASCENSÃO, L.; MOTA, L.; CASTRO, M. Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: morphology, distribution and histochemistry. **Ann. Bot.**, vol. 84, n. 4, p. 437-447, Jun. 1999.
- BABIC, A. M. ; CHEN,C.C.; LAU,L.F. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**,v. 95, p. 6355-6360, 1998.
- BALBACH, A. **As Plantas que Curam.** Editora Missionária, São Paulo, 2a ed., 1992.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Braz. J. Pharmac. Sci.**, v. 41, n. 1, p. 1-25, jan./mar. 2005.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W. E PARADISO, M. A. **Neurociência, desvendando o sistema nervoso.** 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 855p.
- BEDI, M.K.; SHENEFELT, P.D. Herbal therapy in dermatology. **Archives of Dermatology**, Chicago, v.138, n.2, p.2332-242, 2002. Disponível em: <<http://gateway1.ovid.com:80/ovidweb.cgi>>. Acesso em: 3 jan. 2016.
- BELPERIO, J. A. ; KEANE, M. P.; ARENBERG, D. A.; ADDISON, C. L.; EHLERT, J. E.; BURDICK, M. D.; STRIETER, R. M. CXC chemokines in angiogenesis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 68, p. 1-8, 2000.
- BERNABEI, R.; LANDI, F.; BONINI, S.; ONDER, G.; LAMBIASE, A. POLA, R. ALOE, L. Effect of topical application of nerve growth-factor on pressure ulcers. **Lancet**, v. 354, 1999, p. 307.

- BLANES, L. 2004. **Tratamento de feridas. Cirurgia Vascular: guia ilustrado**. São Paulo: Baptista-Silva JCC, [acesso 20 novembro 2016]. Disponível em: www.bapbaptista.com.
- BLOTNIK, S. ; Peoples, G.E.; Freeman, M.R.E.; Eberlein, T.J.; Klagsbrun, M. Lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblast differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 2890-2894, 1994.
- BRADHAM, D. M. ; IGARASHI, A.; POTTER, L.R.; GROTTENDORST, G.R. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. **J. Cell. Biol.**, v. 114, p. 1285-1294, 1991.
- BRANCO, A. C. S. C.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K. M., RAMALHO, J. A.; DANTAS, J. G. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v.15, n.2, p. 209-214, 2011.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC Nº 10 de 09 de março de 2010. **Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006a. 60 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC-SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 92 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b.
- BREUHAN, K.; MANN, A.; MULLER, G.; WILHELMI, A.; SCHIRMARCHER, P.; ENK, A.; BLESSING, M. Epidermal overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces both keratinocyte proliferation and apoptosis. **Cell Growth. Different.**, v. 11, p. 111-121, 2000.
- BROWN, D.J.; DATTNER, A.M. Phytotherapeutic approaches to common dermatologic conditions. **Archives of Dermatology**, Chicago, v.134, n.11, p.1401-1404, 1998. Disponível em: [http:// gateway1.ovid.com:80/ovidweb.cgi](http://gateway1.ovid.com:80/ovidweb.cgi). Acesso em: 18 dez. 2017.
- BROWN, L. F. ; YEO,K.T.; BERSE,B.; YEO,T.K.; SENGER,D.R.; DVORAK,H.F.; VAN DE WATER,L. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 1375-1379, 1992.
- BUSSOLINO, F. Granulocyte and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. **Nature Med.**, v. 337, p. 461-463, 1989.

- CANDIDO, L.C. **Livro do Feridólogo: tratamento clínico cirúrgico de feridas cutâneas agudas e crônicas**. Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Tratamento de Feridas, Santos, 2006, 648pp.
- CANDIDO, L.C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo: SENAC.. 2001, 279p.
- CARMELIET, P.; MOONS, L.; LUTTUN, A.; VINCENTI, V.; COMPERNOLLE, V.; DE MOL, M.; WU, Y.; BONO, F.; DEVY, L.; BECK, H.; SCHOLZ, D.; ACKER, T.; DIPALMA, T.; DEWERCHIN, M.; NOEL, A.; STALMANS, I.; BARRA, A.; BLACHER, S.; VENDENDRIESSCHE, T.; PONTEN, A.; ERIKSSON, U.; PLATE, K.H.; FOIDART, J.M.; SCHAPER, W.; CHARNOCK-JONES, S.; HICKLIN, D.J.; BERBERT, J.M.; COLLEN, D.; PERSICO, M.G. Synergism between vascular endothelial growth factors and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nature Med.**, v. 7, p. 575-583, 2001.
- CARRICONDE, C. Barbatimão: *Stryphnodendron coriaceum*. **De Volta às Raízes, Olinda**, ano 10, n.51, p.1-3, 1995a.
- CARRICONDE, C. Confrei: *Symphytum officinale*. **De Volta às Raízes, Olinda**, ano 12, n.63, p.1-3, 1997.
- CHANG, J.; HAND, J. M.; SCHWALM, S.; DERVINIS, A.; LEWIS, A. J. Bronchodilating activity of forskolin in vitro and in vivo. **Eur J Pharmacol**, vol. 101, n. 3-4, p.271-274, Jun. 1984.
- CHOI, B.M.; KWAK, H.J.; JUN, C.D.; PARK, S.D.; KIM, K.Y.; KIM, H.R.; CHUNG, H.T. Control of scarring in adult wounds using antisense transforming growth factorbeta 1 oligodeoxynucleotides. **Immunol. J. Cell Biol.**, v. 74, p. 144-150, 1996.
- CLARK, R. A. F. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations I. **J. Am. Acad. Derm.**, v. 13, p. 701-725, 1985.
- CLARK, R. A. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. **Am. J. Med. Sci.**, v. 306, p. 42-48, 1993.
- CODD, L. E. Lamiaceae. In: LEISTNER OA. (ed.). *Flora of Southern Africa*. **Pretoria: Botanical Research Institute**, Department of Agriculture and Water Supply, 1985. Vol. 28, part 4, p. 137-151.
- COELHO, O. R.; ALMEIDA, A; CIRILLO, W; UETI, O.M.Y. Glicoproteína IIb/IIIa em isquemia miocárdica. **Rev. Soc. Card. Est. S. P.**, v. 8, p. 338-343, 1998.
- COFFEY, R. J. Jr.; BASCOM, C. C.; SIPES, N. J.; GRAVES-DEAL, R.; WEISSMAN, B. E.; MOSES, H. L. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor b. **Mol. Cell. Biol.**, v. 8, p. 3088-3093, 1988.
- COLLER, B. S. Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. In: FOZZAR, H. A.; HABER, E.; JENNINGS, R.B.; KATEZ, A.M.; MORGAN, H.E. **The heart and cardiovascular system: scientific foundations**. 2. ed. New York: Haven, 1992. v. 1. p. 219-273.
- COMOGLIO, P. M.; BOCCACCIO, C. Scatter factors and invasive growth. **Sem. Cancer Bio.**, v. 11, p. 153-165, 2001.

- CONSTANTINOU, J.; REYNOLDS, M.L.; WOOLF, C.J.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; FITZGERALD, M. Nerve growth factor levels in developing rat skin: up regulation following skin wounding. **Neuroreport**, v. 5, p. 2281-2284, 1994.
- CRIBBS, R. K.; HARDING, P.A.; LUQUETTE, M.H.; BESNER, G.R. Endogenous production of heparin-binding EGF-like growth factor during murine partial-thickness burn wound healing. **J. Burn Care Rehab.**, v. 23, p. 116-125, 2002.
- D'SOUZA, P. J.; PAJAK, A.; BALAZSI, K.; DAGNINO, L. Ca²⁺ and BMP-6 signaling regulate E2F during epidermal keratinocyte differentiation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 23531-23538, 2001.
- DANILENKO, D.M.; RING, B.D.; TARPLEY, J.E.; MORRIS, B.; VAN, G.Y.; MORAWIECKI, A.; CALLAHAN, W.; GOLDENBER, G.M.; HERSHENSON, S.; PIERCE, G.F. Growth factors in porcine full and partial thickness burn repair: differing targets and effects of keratinocyte growth factor, platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, and neu differentiation factor. **Am. J. Pathol.**, v. 147, p. 1261-1277, 1995.
- DANTAS, S.R.P.E.; JORGE, S.A. **Feridas e Estomas**. Edição do autor, São Paulo, 2005, 110p.
- DAVIES, M. J. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. **Circulation**, v. 82, p. 38-46, 1990.
- DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S.; BAUDI, D.L.K.; CASTRO, J.H.T. Secondary cicatrization in dermoepidermal wounds treated with essential fatty acids, 143 vitamins A and E, soy lecithin and polynylpyrrolidone-iodine in dogs. **Arch. Vet. Sci.**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2004.
- DESMOULIERE, A.; GEINOZ, A.; GABBIANI, F.; GABBIANI, G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle action expression in granulation tissue myfibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. **J. Cell Biol.**, v.122(1), 1993.
- DI PIETRO, L. A. ; BURDICK, M., LOW, Q.E.; KUNKEL, S.L.; STRIETER, R.M. MIP 1 alpha as a critical macrophage chemo attractant in murine wound repair. **J. Clin. Invest.**, v. 101, p. 1693-1698, 1998.
- DI PIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. **Shock**, v. 4, p. 233-240, 1995.
- Dicionário de Especialidades Farmacêuticas. Rio de Janeiro: J B M, **Wellcome. Publicações Científicas**, 1 995/1 996 .
- DORTA, E. J. **Introdução. In: Escala Rural: especial de plantas medicinais**. 1(4):1-62. São Paulo: Escala Ltda; 1998.
- DUQUE, J.G. **Perspectivas Nordesteiras**. 2 ed., Fortaleza: Banco do Brasil, 2004.
- ECKERSLEY, J. R. T.; DUDLEY, H. A. F. Wound and wound healing. **Brit. Med. Bull.**, v. 44, n. 2, p. 423-36, 1988.
- EFRON, P. A.; MOLDAWER, L. L. Cytokines and wound healing: the role of cytokine and anticytokine therapy in the repair response. **J. Burn Care Rehab.**, v. 25, n. 2, p. 149-60, 2004.
- ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária a saúde**. São Paulo: Manole, 2001.

- ENGELHARD, E.; TOKSOY, A.; GOOBELER, M.; DEBUS, S.; BRÜCKER, E.B.; GILLITZER, R. Chemokines IL-8, Groa, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leucocyte subsets in human wound healing. **Am. J. Pathol.**, v. 153, p. 1849-1860, 1998.
- EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; GONÇALVES, G. F.; BELLETI, M. E.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTI, M. C. S.; CHAVES, N. S. T.; BOMBONATO, P. P.; CAMPOS, V. A.; OGATA, A. S. Aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii*). **Veterinária Notícias**, v. 4, n. 1, p.77-82, 1998.
- FAILLA, C. M.; ODORISTO, T.; CIANFARANI, F.; SCHIETROMA, C.; PUDDU, P.; ZAMBRUNO, G. Placenta growth factor is induced in human keratinocytes during wound healing. **J. Invest. Dermat.**, v. 115, p. 388-395, 2000.
- FERREIRA, S.R. **O grande queimado: uma abordagem fisioterapêutica**. Trabalho de conclusão de curso, apresentado ao Curso de Fisioterapia de Faculdade de Goiás, Goiânia, 2003, pp.148.
- FOXMAN, E. F.; CAMPBELL, J. J.; BUTCCHER, E. Multistep navigation and combinatorial control of leukocyte chemotaxis. **J. Cell Biol.**, v. 139, p. 1349-1360, 1997.
- FRANK, S.; HÜBNER, G.; BREIER, G.; LONGAKER, M.T.; GREENHALGH, D.G.; WERNER, S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 12607-12613, 1995.
- GAHARY, A. SHEN, Y. J.; NEDELEC, B.; SCOTT, P. G.; TREDGET, E. E. Enhanced expression of RNA for insulin like growth factor-1 in post-burn hypertrophic scar tissue and its fibrogenic role by dermal fibroblasts. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 148, p. 25-32, 1995.
- GAILIT, J.; WELCH, M. P.; CARK, R. A. TGF-beta 1 stimulates expression on keratinocytes integrins during re-epithelialization of cutaneous wound. **J. Invest. Dermat.**, v. 103, p. 221-227, 1994.
- GALLUCCI, R. M.; SIMEONOVA, P.P.; MATHESON, J.M.; KOMMINENI, C.; GURIEL, J.L.; SUGAWARA, T.; LUSTER, M.I. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. **FASEB J.**, v. 14, p. 2525-2531, 2000.
- GARTNER, M. H.; BENSON, J. D.; CALDWELL, M. D. Insulin like growth factors I and II expression in the healing wound. **J. Surg. Res.**, v. 52, p. 389-394, 1992. 145.
- GASPAR-MARQUES, C.; SIMÕES, F. M.; RODRÍGUEZ, B. A trihomobietane diterpenoid from *Plectranthus grandidentatus* and an unusual addition of acetone to the ortho-quinone system of cryptotanshinone. **J. Nat. Prod.**, vol. 68, n. 9, p. 1408-1411, Sep. 2005.
- GERSZTEN, R. E.; GARCIA-ZEPEDA, E.A.; LIM, Y.C.; YOSHIDA, M.; DING, H.A.; GIMBRONE, M.A.; LUSTER, A.D.; LUSCINKAS, F.W.; ROSENZWEIG, A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v. 398, p. 718-723, 1999.
- GOFF, J. **As doenças têm história**. 2a ed. Lisboa: Terramar; 1997.

- GOMES, L. M. A. **Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de *Cnidocolus quercifolius* Pohl (EUPHORBIACEAE) em roedores.** 2014. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina. 184f.
- GRAMS, W. F. M. P. **Plantas medicinais de uso popular em cinco distritos da ilha de Santa Catarina – Florianópolis, SC** [dissertação]. Curitiba (PR): Setor de Ciências Biológicas da UFPR, 1999.
- GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue I: quantitative study of the vascular volume. **Rev. Odontol.** Univ. São Paulo, v. 1, p. 6-8, 1987.
- GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue II: ultrastructural aspects. **Rev. Odontol.** Univ. São Paulo, v. 6, p. 66-71, 1992.
- GUIMARÃES, G.C. Nutrição e Câncer. **Acta Oncol Bras.** v.22, p. 227-232. 2002.
- HARSUM, S.; CLARKE, J. D.; MARTIN, P. A reciprocal relationship between cutaneous nerves and repairing skin wounds in the developing chick embryo. **Dev. Biol.**, v. 238, p. 27-29, 2001.
- HASAN, W.; ZHANG, R.; LU, M.; WARN, J.D.; SMITH, P.G. Coordinate expression of NGF and a-smooth muscle actin RNAm and protein in cutaneous wound tissue of developing and adult rats. **Cell Tissue Res.**, v. 300, p. 97-109, 2000.
- HATANAKA, E.; CURI, R. Fatty acids and wound healing: a review. **Rev. Brás. Farm.**, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.
- HELDIN, C. H.; ERIKSSON, U.; O STMAN, A. New emmbers of the plateled-derived growth factor family of mitogens. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 398, p. 284-290, 2002.
- HELDIN, C. H.; WESTRMARK, B. Mechanism of action and in vivo role of plateledderived growth facto. **Physiol. Rev.**, v. 79, p. 1283-1316, 1999.
- HOWDIESHELL, T. R.; CALLAWAY,D.; WEBB,W.L.; GAINES,M.D.; PROCTER, C.D. Jr.; SATHYANARAYANA POLLOCK, J. S.; BROCK,T.L.; McNEIL,P.L. Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. **J. Surg. Res.**, v. 96, p. 163-182, 2001.
- HUANG, J. S.; WANG,Y.H.; LING,T.Y.; CHUANG,S .S.; JHNSON, F. E.; HUANG, S. S. Synthetic TGF-beta antagonist accelerates wound healing and reduces scarring. **FASEB J.**, v. 16, p. 1269-1270, 2002.
- HUBNER, G.; HU, Q.; SMOLA,H.; WERNER, S. Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. **Dev. Biol.**, v. 173, p. 490-498, 1996.
- HUTSON, J. M.; NIALLM.; EVANS,D.; FOWLER,R. Effect of salivary glands on wound contraction in mice. **Nature**, v. 279, p. 793-795, 1979.
- HUYBRECHTS-GODIN, G.; PEETER-JORIS, C.; VAES, G. Macrophage-fibroblast interaction in collagenase production and cartilage degration. **Biochem. J.**, v. 184, p. 643-650, 1979.
- IGARASHI, A.; OKOCHI, H.; BRADHAM, D.M.; GROTENDORST, G.R. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblast and during wound repair. **Mol. Cell. Biol.**, v. 4, p. 637-645, 1993.

- JENNISCHE, E.; SKOTTNER, A.; HANSSON, H. A. Dynamic changes in insulin like growth factor immunoreactivity correlate to repair events in rat ear after freeze-thaw injury. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 47, p. 193-201, 1987.
- JOHNSTON, D. E. Wound healing in skin. *Vet. Clin. North Am.: Small Animal Practica*, v. 20, n. 1, p. 1-25, 1990.
- KANEDA, K.; SERIZAWA, S.; MARUYASU, S.; HASEGAWA, M.; MOTONO, M. Hair growth stimulating compositions containing (benzylamino) purines and Labiatae extracts. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**. JP 2005035903 A2, p. 18, Feb. 2005.
- KNIGHTON, D. R.; SILVER, I.; HUNT, T. K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surg.**, v. 90, p. 262-270, 1981.
- KOTHAPALLI, D.; FRAZIER, K.S.; WELPLY, A.; SEGARINI, P.R.; GROTENDORST, G.R. Transforming growth factor b induce anchorage-independent growth of NRK fibroblast via a connective tissue growth factor dependent signaling pathway. **Cell Growth Differ.**, v. 8, p. 61-68, 1997.
- KURITA, Y.; TSUBOI, R.; UEKI, R.; RIFKIN, D.B.; OGAWA, H. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in wound healing sites of mouse skin. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 284, p. 193-197, 1992.
- LAUER, G.; SOLLBERG, S.; COLE, M.; FLAMME, L.; STURZEBECKER, J.; MANN, K.; KRIEG, T.; EMING, S.A. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wound. **J. Invest. Dermatol.**, v. 115, p. 12-18, 2000.
- LEE, J. H.; KOO, T. H.; HWANG, B. Y.; LEE, J. J. Kaurane diterpene, kamebakaurin, inhibits NF- κ B by directly targeting the DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of antiapoptotic NF- κ B target genes. **The J. Biolog. Chem.** Vol.277, n. 21, p. 18411-18420, Mar. 2002.
- LEFKOVITS, J.; PLOW, E. F.; TOPOL, E. J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 1553-1559, 1995.
- LEITE, S. N. **Além da medicação: a contribuição da fitoterapia para a saúde pública** [dissertação]. São Paulo (SP): Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Saúde Pública/USP, 2000.
- LEWIN, G. R.; MENDELL, L. M. Nerve growth factor and nociception. **Trends Neurosci.**, v. 16, p. 353-359, 1993.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.
- LOW, Q. E. Wound healing in MIP-1 α (-/-) and MCP-1(-/-) mice. **Am. J. Pathol.**, v. 159, p. 457-463, 2001.
- LUSTER, A. D.; CARDIFF, R.D.; MACLEAN, J.A.; CROWE, K.; GRANSTEIN, R.D. Delayed wound healing and disorganized neovascularization in transgenic mice expressing the IP-19 chemokine. **Proc. Assoc. Am. Phys.**, v. 110, p. 183-196, 1988.
- MAJNO, G.; JORIS, I. **Cells, tissues and disease: principles of general pathology**. Cambridge: Blackwell Science, 1996. 974 p.

- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. A. Cicatrization: current and auxiliary resources-Part 1. **An. Brás. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
- MANN, A.; BREUHAHN, K.; SCHIRMACHER, P.; BLESSING, M. Keratinocyte derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation and vascularization. **J. Invest. Dermatol.**, v. 117, p. 1382-1390, 2001.
- MARCHESE, C.; CHEDID, M.; DIRSCH, O.R.; CSAKY, K.G.; SANTANELLI, F.; LATINI, C.; LAROCHELLE, W.J.; TORRISI, M.R.; AARONSON, S.A. Modulation of keratinocyte growth factor and its receptor in re-epithelialising human skin. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 1369-1376, 1995.
- MARIKOVSKY, M.; VOGT, P.; ERKSSON, E.; RUBIN, J.S.; TAYLOR, W.G.; JOACHIM, S.; KLAGSBRUN, M. Wound fluid-derived heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) is synergistic with insulin-like growth factor-I for Balb/MK keratinocyte proliferation. **J. Invest. Dermatol.**, v. 106, p. 616-621, 1996.
- MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Ed. UFV, 2000.
- MASSAGUÉ, J. TGF-beta signal transduction. **Annu. Review Biochem.**, v. 67, p. 753-791, 1998.
- _____. The transforming growth factor-beta family. **Annu. Review Cell Biol.**, v. 6, p. 597-641, 1990.
- MATSUDA, H.; KOYAMA, H.; SATO, H. SAWADA, J.; ITAKURA, A.; TANAKA, A.; MATSUMOTO, M.; KONNO, K.; USHIO, H.; MATSUDA, K. Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 297-306, 1998.
- MATU, E. N.; VAN STADEN, J. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purpose in Knya. **J. Ethnopharmacol.**, vol. 87, n. 1, p. 35-41, Jul. 2003.
- MICERA, A.; VIGNETI, E.; PICKHOLTZ, D.; REICH, R.; PAPPO, O.; BONINI, S.; MAQUART, F.X.; ALOE, L.; LEVI-SCHAFFER, F. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 98, p. 6162-6167, 2001.
- MOHAMMAD, F.V.; NOORWALA, M.; AHMAD, V.U. A bidesmosidic hederagenin Hexasaccharide from the roots of symphytum officinale. **Phytochemistry, Great Britain**, v.40, n.1, p.213- 218, 1995.
- MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor b stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 85, p. 4894-4897, 1988.
- MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MORAIS, N.R.L.; OLIVEIRA NETO, F.B.; MELO, A.R.; BERTINI, L.M.; SILVA, F.F.M.; ALVES, L.A.; Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de

- Cnidocolus phyllacanthus* (müll. Arg.) Pax & k.hoffm. Oriundo de apodi – RN; **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, p.180-185, 2016.
- MORI, R.; KONDO, T.; NISHIIE, T.; OHSHIMA, T.; ASANO, M.. Impairment of skin wound healing in β -1,4-galactosyltransferase-deficient mice with reduced leukocyte recruitment. **Am. J. Pathol.**, v. 164, n. 4, p. 1303-1314, 2004.
- MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v. 95, p. 3032-3043, 2000.
- NETO, J.J.; FRACASSO, J.F.; NEVES, M.C.L.C.; SANTOS, L.E.; BANUTH, V.L. Tratamento de úlceras varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* e/ou com *Stryphnodendron barbatiman* (vellozo) *martius*. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.17, p.181-186, 1996.
- NEWMAN, S. L.; HENSON, J. E.; HENSON, P. M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 156, p. 430-442, 1992.
- NOGUEIRA, R.M.B.; KITAMURA, E.A.; AGUIAR, O.M. Estudo clínico da reparação tecidual de feridas cutâneas de cães tratados com papaína e colagenase. **Nosso Clínico**, v.08, n.43, p.25-28, jan-fev, 2005.
- OKAMOTO, H.; TANANKA, K.; HASEGAWA, J. Chrysanthemum and other plant extracts as NF-kB activation inhibitors for treatment of inflammatory diseases and skin aging and related diseases. **Jpn. Kokai Tokkyo Koho**, JP 2005194246 A2, Ago. 2005.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423**. Acute Oral Toxicity Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.
- ORNITZ, D. M. FGFs heparin sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. **Bioassays**, v. 22, p. 108-112, 2000.
- ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol.**, v. 2, p. 1-12, 2001.
- PANIZZA, S.; ROCHA, A.B.; GECCHI, R.; SOUZA E.; SILVA, R.A.P. *Stryphnodendron barbadetiman* (vellozo) *martius*: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.10, p.101-106, 1988.
- PEACOCK JUNIOR, E. E. **The wound repair**. Philadelphia: WB Saunders, 1984. p. 76-85.
- PETERS, K. G.; DEVRIES, C.; WILLIAMS, L. T. Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 90, p. 8915-8919, 1993.
- PINCELLI, C. Nerve growth factor and keratinocytes: a role in psoriasis. **Eur. J. Dermat.**, v. 10, p. 85-90, 2000.
- RASIKARI, H. L.; LEACH, D. N.; WATERMAN, P. G.; SPOONER-HART, R. N.; BASTA, A. H.; BANBURY, L. K.; FORSTER, P. I. Acaricidal and cytotoxic activities of extracts from selected genera of Australian lamiaceae. **J. Economic Entomology**, vol. 98, n. 4, p. 1259- 1266, Aug. 2005.

- RAYCHAUDHURI, S. K.; RAYCHAUDHURI, S.P.; WELTMAN, H.; FARBER, E.M. Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 293, p. 291-295, 2001.
- RENNEKAPFF, H. O.; HANSBROUGH, J.F.; WOODSM, V. J.R.; DORE, C.; KIESSIG, V.; SCHRODER, J.M. Role of melanoma growth stimulatory activity (MGSA/gro) on keratinocyte function in wound healing. **Arch. Dermat. Res.**, v. 289, p. 204-212, 1997.
- REYNOLDS, M.; ALVARES, D.; MIDDLETON, J.; FITZGERALD, M. Neonatally wounded skin induces NGF-independent sensory neurite out-growth in vitro. **Brain Res.**, v. 102, p. 275-283, 1997.
- RICHES, D. W. Macrophage involvement in repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R. A. F. (Ed.). **Mol. Cell. Boil.** wound rep. 2. ed. New York: Plenum, 1996. p. 143-168.
- RING, B. D.; SCULLY, S.; DAVIS, C.R.; BAKER, M.B.; CULLEN, M.J.; PELLEYMOUNTER, M.A.; DANILENKO, D.M. Systemically and topically administered leptin both accelerate wound healing in diabetic ob/ob mice. **Endocrinology**, v. 141, p. 446-449, 2000.
- RISAU, W. Angiogenic growth factors. **Progr. Growth Factor Res.**, v. 2, p. 71-79, 1990.
- ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of comllagen formation in vivo. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 83, p. 4167-4171, 1986.
- ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Transforming growth factor-b. In: _____. **Mol. Cell. Boil. Wound Rep.** 2. ed. New York: Plenum, 1996. p. 275-308.
- ROBERTSON, J. G.; BELFORD, D. A.; BALLARD, F. J. Clearance of IGFs and insulin from wounds: effect of IGF-binding proteins interactions. **Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.**, v. 276, p. 663-671, 1999.
- ROSLINDO, E.B.; SILVÉRIO, K.G.; MALAGOLI, D.M. Processo de reparo em feridas de extração dentária em camundongos tratados com o complexo *Symphytum officinale* e *Calendula officinalis*. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.113, n.2, 1999. Disponível em: <<http://gateway1.ovid.com:80/ovidweb.cgi>>. Acesso em: 18 dez. 2016.
- RUDOLPH, R.; BALLANTYNE JUNIOR, D. L. Skin grafts. In: MCCARTHY, J. G.; MAY JUNIOR., J. W.; LITTLER, J. W. **Plast. Surg.** Philadelphia: WB Saunders, 1990. V. 1. p. 221-267.
- SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical society**, v. 18, n. 1, p.11-33, 2007.
- SALOMÉ, R.J. **Análise fitoquímica dos princípios ativos, filantina, hipofilantina, e nirantina da espécie quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* Schumach & Thonn), sob condições de déficit hídrico.** 2007. 94f. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- SATO, M.; SAWAMURA, D.; INA, S.; YAGUCHI, T.; HANADA, K.; HASHIMOTO, I. In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocyte: induction of

epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but, not by the alternatively spliced form. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 291, p. 400-404, 1999.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SOBRINHO, T. J. S. P.; CASTRO, V. T. N. A.; SARAIVA, A. M.; ALMEIDA, D. M.; TAVARES, E. A.; AMORIM, E. L. C. Phenolic content and antioxidant capacity of four *Cnidocolus* species (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 20, p. 2310-2316, 2011.

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

- STRACHAN, L.; MURISON, J.G.; PRESTIDGE, R.L.; SLEEMAN, M.A.; WATSON, J.D.; KUMBLE, K.D. Cloning and biological activity of epigen: a novel member of the epidermal growth factor superfamily. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 18265-18271, 2001.
- STRIETER, R. M.; POLVERINI, P.J.; KUNKEL, S.L.; ARENBERG, D.A.; BURDICK, M.D.; KASPER, J.; WALZ, A.; MARRIOT, D.; CHAN, S.Y.; ROCZNIAK, S.; SHANAFELT, A.B. The functional role of the ELR motif in chemokine-mediated angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 27348-27357, 1995.
- TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina (Ribeirão Preto)** 2008; 41 (3): 259-64.
- TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. Calêndula. In: **HERBARIUM: compêndio de fitoterapia**. São Paulo: Herbarium, 1995. p.66-68.
- TODD, R.; DONOFF, B.R.; CHIANG, T.; CHOU, M.Y.; ELOVIC, A.; GALLAGHER, G.T.; WOUNG, D.T. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. **Am. J. Pathol.**, v. 138, p. 1307-1313, 1991.
- TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica, **Texto Contexto Enferm**, Florianópolis, 2006; 15(1): 115-21.
- TOWSEND, M.C. **Sabiston Tratado de Cirurgia: As Bases Biológicas da Prática Cirúrgica Moderna**. 17 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005.
- TZAHAR, E.; MOYER, J.D.; WATERMAN, H.; BARBACCI, E.G.; B.A.O.J.; LEVKOWITZ, G.; SHELLY, M.; STRANO, S.; PINKAS-KRAMARSKI, R.; PIERCE, J.H.; ANDREWS, G.C.; YARDEN, Y. Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. **EMBO. J.**, v. 17, p. 5948-5963, 1998.
- VIANA, A. J. S. **Estudo químico e de atividade biológica de *Plectranthus neochilus* Schltr. (Lamiaceae)**. 2011. Dissertação (Mestrado - Programa de pós-graduação em química. Universidade federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri- UFVJM, Diamantina (MG).
- WALDIA, S.; JOSHI B. C.; PATHAK U.; JOSHI M. C. The Genus *Plectranthus* in India and Its Chemistry. **Chemistry & Biodiversity**, vol. 8, n. 2, p. 244-252, Feb. 2011.
- WANKELL, M.; KAESLER, S.; ZHANG, Y.Q.; FLORENCE, C.; WERNER, S.; DUAN, R. The activin binding proteins follistatin and follistatin-related protein are 157 differentially regulated in vitro and during cutaneous wound repair. **J. Endocrinol.**, v. 171, p. 385-395, 2001.
- WEBSTER, G. L. Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, n. 1, p. 3-32, 1994.
- WENER, S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair process. **Cytok. Growth Factor Rev.**, v. 2, p. 153-165, 1998.
- WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol. Rev.**, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.