

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Liana Morais Vianna Teutschbein

**ATIVIDADE CICATRIZANTE DE TRÊS ESPÉCIES ADAPTADAS AO
CERRADO BRASILEIRO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ÚLCERAS DÉRMICAS EM COELHOS COM ANÁLISE
IMUNOHISTOLÓGICA E MORFOLÓGICA**

Juiz de Fora – MG – Brasil
2011

2011

PGCBIO

Liana M Vianna Teutschbein

ICB/UFJF

LIANA MORAIS VIANNA TEUTSCHBEIN

**ATIVIDADE CICATRIZANTE DE TRÊS ESPÉCIES ADAPTADAS AO
CERRADO BRASILEIRO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ÚLCERAS DÉRMICAS EM COELHOS COM ANÁLISE
IMUNOHISTOLÓGICA E MORFOLÓGICA**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nádia Rezende Barbosa Raposo

Juiz de Fora – MG – Brasil
2011

TEUTSCHBEIN, V. M. Liana. Atividade Cicatrizante de Três Espécies Adaptadas ao Cerrado Brasileiro em Modelo Experimental de úlceras dérmicas em coelhos com análise imunohistológica e morfológica. Juiz de Fora (MG), 2011. 91 f. Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora.

LIANA MORAIS VIANNA TEUTSCHBEIN

**ATIVIDADE CICATRIZANTE DE TRÊS ESPÉCIES ADAPTADAS AO
CERRADO BRASILEIRO EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ÚLCERAS DÉRMICAS EM COELHOS COM ANÁLISE
IMUNOHISTOLÓGICA E MORFOLÓGICA**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Nádia Rezende Barbosa Raposo
(Orientadora – Departamento de Toxicologia – UFJF)

Prof.Dr. Rogério Estevam Farias
(Departamento de Histologia – UFJF)

Dr. Humberto de Mello Brandão
(Embrapa Gado de Leite)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
ao Bruno, minhas irmãs, minha avó Ophelia
e em especial à minha avó Adélia,
que, onde estiver , está sempre orando e torcendo por mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e coragem para enfrentar tantos momentos difíceis ao longo destes dois anos.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram com seu amor incondicional.

Ao meu marido Bruno pelo amor, compreensão, apoio contínuo e paciência.

Às minhas irmãs: Larissa e Laísa que sempre me encorajaram e cujo apoio foi fundamental para a realização deste trabalho.

A amiga Carolina pelo incentivo, apoio inicial e conselhos constantes nesta jornada.

Aos amigos da Drogaria Pacheco em especial Luís Otávio, Elisama, Eduardo e Anderson por terem me apoiado nos momentos difíceis.

Aos amigos da Farmácia Las Casas em especial à Lucimar Las Casas pela paciência, aprendizado constante e confiança.

Ao Prof.Dr. Rogério Estevam Farias pelos ensinamentos.

A Prof^a. Dr^a. Nádia pela paciência, compreensão, oportunidade de amadurecimento profissional e apoio constante.

Aos amigos do NIQUA e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Juiz de Fora.

Muito Obrigada!

RESUMO

O cerrado brasileiro é um dos maiores biomas de diversidade biológica do planeta, abrigando uma ampla variedade de espécies medicinais utilizadas como parte da tradição e costume das comunidades locais. Os objetivos deste estudo foram determinar os teores de polifenóis e flavonóides; avaliar a atividade antioxidante; correlacionar os teores de polifenóis e flavonóides entre si e com a atividade antioxidante e avaliar a atividade cicatrizantes de três espécies deste bioma: *Lippia sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*. Através dos extratos etanólicos (EE), obtidos das folhas, foram quantificados espectrofotometricamente os teores de polifenóis e de flavonóides e, ainda, avaliada a atividade antioxidante (DPPH) e as correlações. Os EE foram incorporados ao creme base (10% de *L. sidoides*; 10% de *Synadenium grantii* e 10% de *Stachytarpheta gesnerioides*) e avaliados quanto à atividade cicatrizante, empregando o modelo de indução de úlceras dérmicas em coelhos albinos da Nova Zelândia (machos 1.5-2.0 kg; n=6). As úlceras foram analisadas macroscopicamente quanto ao aspecto da lesão e a contração de sua área durante 10 dias. Após este período, foi feito estudo histológico em lâminas coradas com hematoxilina-eosina para comparação do número de células inflamatórias; fibroblastos; vasos sanguíneos; área de colágeno e área de matriz extracelular entre os grupos e imunoistoquímica com a contagem dos miofibroblastos. Foram realizadas análises estatísticas descritivas para avaliar a significância das diferenças entre as médias dos resultados dos grupos, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de Tukey, utilizando o SPSS versão 14.0 e $p < 0,05$. Foi avaliada a correlação de *Pearson* entre os teores de polifenóis e flavonóides e entre esses teores e a atividade antioxidante. Todos os EE das espécies utilizadas apresentaram presença de polifenóis, flavonóides e atividade antioxidante. Foi demonstrada uma correlação positiva entre os teores de polifenóis e flavonóides e atividade antioxidante. Não foi observada diferença na contração da lesão quando comparados os grupos controle e tratados e em relação ao número de miofibroblastos os grupos testados foram estatisticamente similares ao controle positivo. O tratamento com *L. sidoides* apresentou número de vasos sanguíneos, área de colágeno e área de matriz extracelular similar ao controle positivo; o número de fibroblastos e células inflamatórias foi 24% ($p=0,002$) e 54% ($p < 0,001$) menor, respectivamente, em relação ao controle positivo. O tratamento com *Synadenium grantii* apresentou número de fibroblastos, área de colágeno e área de matriz extracelular semelhante ao controle positivo e reduziu o número de células inflamatórias (61%) e vasos sanguíneos (54%) ($p < 0,001$ para ambos), em relação ao controle positivo. O tratamento com *Stachytarpheta gesnerioides* apresentou número de fibroblastos; área de colágeno e área de matriz extracelular semelhante ao controle positivo e reduziu o número de células inflamatórias (65%, $p < 0,001$) e vasos sanguíneos (42%, $p=0,005$) em relação ao controle positivo. Em relação ao número de miofibroblastos, todos os tratamentos foram estatisticamente similares ao controle positivo. A análise conjunta dos resultados inéditos sugere a realização de novos estudos científicos relacionados à atividade cicatrizante de *L. sidoides*.

Palavras-chave: Cerrado. Plantas medicinais. Polifenóis. Flavonóides. Cicatrização.

ABSTRACT

The Brazilian cerrado is one of the planet's major biological diversity biomes, hosting a wide variety of medicinal plants used as part of the tradition and customs of local communities. The objectives of this study were to determine the levels of polyphenols and flavonoids; evaluate the antioxidant activity; correlate the levels of polyphenols and flavonoids among themselves and with the antioxidant activity and to evaluate the healing activity of the ethanol extracts (EE) of three species of the cerrado: *Lippia sidoides*, *Synadenium grantii* and *Stachytarpheta gesnerioides*. With the ethanol extracts (EE), obtained from leaves, it was spectrophotometrically quantified the concentrations of polyphenols and flavonoids, and it was also evaluated the antioxidant activity (DPPH) and their correlations. The EE obtained from the leaves were incorporated into the cream base (10% of *L. sidoides*, 10% of *Synadenium grantii* and 10% of *Stachytarpheta gesnerioides*) and their healing activity was evaluated. It was used as experimental model the induction of dermal ulcers in New Zealand albino rabbits (males 1.5-2.0 kg; n = 6). The ulcers were analyzed for the appearance of the lesion and the contraction of the wound area during 10 days. After this period, the histology was conducted using histological sections stained with hematoxylin-eosin to compare the number of inflammatory cells, fibroblasts and blood vessels and immunohistochemistry to compare the number of myofibroblasts among the experimental groups. Descriptive statistics analysis were conducted and, to assess the significance of differences between the mean results of groups, It was also applied the analysis of variance (ANOVA) and Tukey's *post hoc* test, using SPSS version 14.0 and $p < 0.05$. It was evaluated the Pearson correlation between the levels of polyphenols and flavonoids and between these levels and the antioxidant activity. All the EE of the used species showed the presence of polyphenols, flavonoids and antioxidant activity. It was demonstrated a positive correlation among these constituents and antioxidant activity. No difference was observed in the contraction of the lesion when compared to the control and treated groups. At microscopic analysis, treatment with *L. sidoides* showed the number of blood vessels, collagen area and area of extracellular matrix similar to the positive control; the number of fibroblasts and inflammatory cells was 24% ($p = 0.002$) and 54% ($p < 0.001$) lower, respectively, compared to positive control. Treatment with *Synadenium grantii* presented number of fibroblasts, collagen area and area of extracellular matrix similar to the positive control and reduced the number of inflammatory cells (61%) and blood vessels (54%) ($p < 0.001$ for both) compared the positive control. Treatment with *Stachytarpheta gesnerioides* presented number of fibroblasts, collagen area and area of extracellular matrix similar to the positive control and reduced the number of inflammatory cells (65%, $p < 0.001$) and blood vessels (42%, $p = 0.005$) compared the positive control. In relation to the myofibroblasts, all treatments presented number of myofibroblasts similar to the positive control. A combined analysis of these results suggest to perform further scientific studies related to healing activity of *L. sidoides*.

Keywords: Cerrado. Medicinal plants. Polyphenols. Flavonoids. Wound healing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espécime de <i>Lippia sidoides</i> Cham.....	21
Figura 2 – Constituintes químicos de <i>Lippia sidoides</i>	22
Figura 3 – Espécime de <i>Synadenium grantii</i> Hook.....	24
Figura 4 – Espécime de <i>Stachytarpheta gesnerioides</i> Cham..	27
Figura 5 – Estrutura tridimensional da pele, demonstrando as três camadas, epiderme, derme e hipoderme.....	30
Figura 6 – Tecido conjuntivo denso não modelado da derme da pele.	31
Figura 7 – Corte histológico de tecido conjuntivo frouxo.....	31
Figura 8 – Classificação das feridas de acordo com Moura (2004).....	32
Figura 9 – Etapas da cicatrização	34
Figura 10 – Esquema dos passos seguidos desde a colheita do material vegetal até a execução das análises de interesse.	42
Figura 11 – Representação esquemática dos quadrantes na aplicação dos cremes contendo os controles positivo e negativo e os extratos etanólicos (EE) vegetais ...	48
Figura 12 – Correlação entre teores de polifenóis e de flavonóides dos extratos etanólicos de <i>Lippia sidoides</i> ; <i>Synadenium grantii</i> e <i>Stachytarpheta gesnerioides</i> . .	54
Figura 13 – Correlação entre a Atividade Antioxidante e o teor de polifenóis dos extratos etanólicos de <i>Lippia sidoides</i> ; <i>Synadenium grantii</i> e <i>Stachytarpheta gesnerioides</i>	55
Figura 14 – Correlação entre Atividade Antioxidante e o teor de polifenóis dos extratos etanólicos de <i>Lippia sidoides</i> ; <i>Synadenium grantii</i> e <i>Stachytarpheta gesnerioides</i>	55
Figura 15 – Evolução macroscópica das lesões no coelho número 1 nos 1º, 4º, 6º e 9º dia do experimento.	14
Figura 16 – Evolução macroscópica das lesões no coelho número 7 nos 1º, 4º, 6º e 10º dia do experimento.	59
Figura 17 – Análise histomorfométrica das úlceras dérmicas.....	61
Figura 18 – Número de células inflamatórias das amostras de tecido oriundo das úlceras dérmicas dos animais..	62
Figura 19 – Número de fibroblastos das amostras de tecido oriundo das úlceras dérmicas dos animais.	62

Figura 20 – Número de vasos sanguíneos das amostras de tecido oriundo das úlceras dérmicas dos animais.	63
Figura 21 – Porcentagem de campo microscópico ocupada pela área de células contendo fibras de colágeno em amostras de tecido oriundo das úlceras dérmicas dos animais.	63
Figura 22 – Porcentagem de campo microscópico ocupada pela área de matriz extracelular em amostras de tecido oriundo das úlceras dérmicas dos animais. <i>gesnerioides</i>	64
Figura 23 - Análise imunoistoquímica sob método tissue array com o anticorpo anti a-SMA retas)	65
Figura 24 - Número de miofibroblastos das amostras de tecido oriundo das úlceras dérmicas dos animais..	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teores de polifenóis e de flavonóides dos extratos etanólicos das espécies interesse.....	53
Tabela 2 – Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das espécies de interesse.....	54
Tabela 3 – Avaliação da contração da área das lesões nos coelhos albinos submetidos aos tratamentos propostos.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C. – antes de Cristo

AIDS – “Acquired Immunodeficiency Syndrome” – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

$AlCl_3$ – cloreto de alumínio

ANOVA – análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHT – butil-hidróxi-tolueno

CEEA – Comissão de Ética na Experimentação Animal

CESJ – Herbário Leopoldo Krieger

CI_{50} – concentração de inibição em 50%

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX-2 – Ciclooxigenase - 2

d.C. – depois de Cristo

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DPPH – 2,2-difenil-1,2-picrilhidrazil

EE – extrato etanólico

ERNS – espécies reativas de nitrogênio

EROs – espécies reativas de oxigênio

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Km^2 – quilômetro quadrado

OMS – Organização Mundial da Saúde

PMNs – polimorfonucleares

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SUS – Sistema Único de Saúde

v/v – volume por volume

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UV – ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Biomas nacionais: Cerrado.....	14
1.2 Plantas medicinais	15
1.2.1 Histórico.....	15
1.2.2 Fitoterapia	16
1.2.3 Metabolismo secundário.....	18
1.3 Espécies de interesse.....	20
1.3.1 <i>Lippia sidoides</i> Cham.....	20
1.3.2 <i>Synadenium grantii</i> Hook.....	23
1.3.3 <i>Stachytarpheta gesnerioides</i> Cham	26
1.4 Atividade cicatrizante	28
1.4.1 Anatomia e fisiologia da pele.....	28
1.4.2 Tecido conjuntivo	30
1.4.3 Classificação do grau das feridas	32
1.4.4 Cicatrização.....	33
1.4.5 Fatores que interferem na cicatrização	39
2 OBJETIVOS	41
2.1 Geral	41
2.2 Específicos	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Dados ambientais da colheita	42
3.2 Obtenção de extratos.....	43
3.3 Preparo das formulações.....	44
3.4 Quantificação de polifenóis totais.....	44
3.5 Quantificação de flavonóides	45
3.6 Atividade antioxidante	45
3.7 Atividade cicatrizante	46
3.7.1 Protocolo experimental de indução de úlceras dérmicas em coelhos albinos .	47
3.7.2 Avaliação macroscópica.....	49
3.7.3 Avaliação microscópica	49
3.8 Análise estatística	51

4 RESULTADOS.....	53
4.1 Quantificação dos teores de polifenóis e de flavonóides	53
4.2 Atividade antioxidante	53
4.3 Atividade cicatrizante	56
4.3.1 Análise macroscópica	56
4.3.2 Análise microscópica	59
5 DISCUSSÃO	67
6 CONCLUSÃO	73
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXO A – PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	86
ANEXO B.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biomas nacionais: Cerrado

O mapa de vegetação do Brasil reconstitui a situação da vegetação no território brasileiro na época do descobrimento pelos portugueses e mostra que no país ocorrem dois grandes conjuntos vegetacionais: um florestal, que ocupa mais de 60% do território nacional, e outro campestre. O bioma é conceituado no mapa como um conjunto de vida (vegetal e animal) constituído pelo agrupamento de tipos de vegetação contíguos e identificáveis em escala regional, com condições geoclimáticas similares e história compartilhada de mudanças, o que resulta em uma diversidade biológica própria (IBGE, 2004).

O Brasil possui o maior sistema fluvial do mundo e a mais vasta biota continental da Terra. Seus biomas são globalmente importantes: a bacia amazônica; a mata atlântica; o pantanal (a maior área úmida da América do Sul); o cerrado, a caatinga, os pampas gaúchos e as áreas costeiras e marinhas (BRANDON et al., 2005).

O bioma cerrado possuía uma área aproximada de 2.036.448 km², que correspondia à cerca de 23,9 % da área total do território brasileiro e hoje foi reduzida a praticamente a metade para 1.052.708 km². Ocupa a totalidade do Distrito Federal, no planalto Central, mais da metade dos estados de Goiás (97%), Maranhão (65%), Mato Grosso do Sul (61%), Minas Gerais (57%) e Tocantins (91%), além de porções de outros seis estados (IBGE, 2004; IBGE, 2010).

Substancial parte da biodiversidade brasileira está distribuída no cerrado, que, com esta grande superfície vegetal, possui uma enorme heterogeneidade de habitats e paisagens, abrigando uma biota estimada em mais de 300 mil espécies de plantas e animais, o que veio a torná-lo conhecido, internacionalmente, como uma das principais "manchas quentes" de diversidade biológica do planeta: a flora tem 4.400 espécies exclusivas; a fauna apresenta 837 espécies de aves, 67 gêneros de mamíferos, 150 espécies de anfíbios e 120 de répteis. Países de grande diversidade

biológica, como o Brasil, precisam conhecer a fundo o seu meio natural e os seus recursos, para preservá-los, manejá-los e utilizá-los de forma sustentável (VILA VERDE, PAULA e CANEIRO, 2003; IBGE, 2004, MACHADO et al., 2004).

1.2 Plantas medicinais

1.2.1 Histórico

Historicamente, o homem utiliza recursos naturais, como os vegetais, para diversos fins, principalmente alimentícios e medicinais. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. O uso de terapias começou antes dos registros históricos, graças ao instinto do homem primitivo de aliviar a dor de uma lesão colocando-a em água fria, empregando folhas frescas ou protegendo-a com lama. Por meio destas experiências, aprenderam que determinadas terapias eram mais eficazes que as outras. Várias tábuas, rolos antigos e outras relíquias têm sido descobertas e decifradas por arqueólogos. Talvez o mais famoso documento seja o papiro de Ebers datado do décimo sexto século antes de Cristo (XVI a.C.) (ALLEN JR et al., 2007).

Os registros mais antigos descrevem manuscritos egípcios datados de 3000 - 2500 a.C, mencionando curativos à base de mel, graxa, fios de linho e diversos tipos de excrementos. Existe pouca dúvida de que, por volta de 1550 a.C., os egípcios usavam algumas substâncias e formas farmacêuticas que são utilizadas até hoje. As fórmulas descritas eram predominantemente de origem vegetal, embora muitas substâncias de origem animal e mineral também sejam citadas. Plantas como acácia, mamona (óleo de rícino) e funcho são mencionadas juntamente com substâncias minerais como óxido de ferro, carbonato de sódio, cloreto de sódio e enxofre, além de excrementos animais (ZIMMERMAN, 2003).

Hipócrates, 460 – 377 a.C., que lançou as bases da medicina científica, preconizava a limpeza das feridas com água morna, vinho e vinagre e reuniu a totalidade dos conhecimentos médicos de seu tempo no conjunto de tratados

conhecidos pelo nome de *Corpus Hipocraticum*, onde, para cada enfermidade, descreve um remédio vegetal e o tratamento correspondente. Dioscórides, I d.C., médico e botânico grego, descreveu plantas como o ópio, ergot e meimandro que continuam sendo utilizadas até os dias atuais (ALLEN JR et al., 2007).

Com o passar dos anos, nesta constante interação entre o homem e o ambiente, a necessidade tornou-se um fator relevante no delineamento da medicina popular regional e o conhecimento sobre plantas medicinais simbolizava, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (MACIEL; PINTO e JÚNIOR, 2002; VILA VERDE, PAULA e CANEIRO, 2003).

1.2.2 Fitoterapia

Aproximadamente 80% da população mundial acreditam no poder terapêutico das plantas e, apesar dos avanços na síntese de fármacos, 25% das prescrições médicas ainda derivam diretamente ou indiretamente de plantas. Mesmo com o surgimento de fármacos sintéticos, ainda há um crescente interesse em plantas pela sua diversidade e versatilidade química (FOWLER, 2006).

Fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004).

A fitoterapia é uma forma de prática em saúde que vem crescendo nos últimos anos. Segundo uma pesquisa da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2004), entre 2002 e 2003 existia 82 países que regulavam os medicamentos à base de plantas, 35% a mais do que no período de 1995 a 1999 (existiam 60 países) e 78 países possuem um sistema de registro de fitoterápicos. Em 2003, a OMS desenvolveu orientações para Boas Práticas na agricultura e no cultivo de plantas medicinais, desenvolvendo orientações para avaliar a segurança dos fitoterápicos quanto à presença de resíduos e contaminantes (OMS, 2004).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas para a regulamentação destes medicamentos, desde a Portaria nº 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela RDC nº17 de 2000 e a Resolução nº 48 de 16 de março de 2004, atualmente em vigor, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 1995; BRASIL, 2000; BRASIL, 2004).

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. A Química de Produtos Naturais é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores (PINTO et. al., 2002).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos, principalmente, nos conhecimentos transmitidos oralmente de geração para geração. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial. (GALVANI e BARRENECHE, 1994; MACIEL, PINTO e JÚNIOR, 2002; SANTANA et al., 2008).

Entretanto, uma das maiores dificuldades encontradas pelos estudiosos de plantas silvestres é a carência de informações relacionadas à identificação das espécies, visto que a aquisição de material botânico para estudos, muitas vezes se torna difícil. Por outro lado, há preocupação da comunidade científica quanto aos estudos morfológicos e de propagação, no intuito de preservar a flora,

principalmente as espécies que se encontram em via de extinção (AMARO et al., 2006).

1.2.3 Metabolismo secundário

Os metabólitos secundários são assim denominados porque não estão ligados nos processos fisiológicos das plantas, sendo encontrados em determinados grupos destas. Podem ser definidos como compostos químicos, de estrutura complexa; biologicamente ativos; encontrados em baixas concentrações e empregados pelas plantas na defesa contra agentes bióticos e abióticos agressores, sendo de fundamental importância para a sobrevivência das plantas (NETO; CAETANO, 2005).

Estes compostos podem também atuar como repelentes de insetos; atrativos de polinizadores; inibidores do crescimento de outras espécies vegetais (herbicidas naturais), num processo denominado de antagonismo (plantas inimigas). Devido a sua gama de funções, podem estar sendo empregados na produção de medicamentos até como agentes inseticidas (NETO, CAETANO, 2005).

Os polifenóis, metabólitos secundários, são substâncias redutoras e, portanto, oxidam-se com facilidade, resultando em substâncias coradas. Incluem-se neste grupo: flavonóides, taninos e antraquinonas (SIMÕES et al., 2007). Os polifenóis são encontrados em quase todos os alimentos vegetais, uma das principais fontes de compostos bioativos da dieta. Nas plantas, são essenciais para a pigmentação; crescimento; reprodução e resistência a patógenos (TERRA, DORNELLES, 2002).

Os flavonóides constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais, representando um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. O interesse econômico é decorrente de suas diferentes propriedades, podendo ser utilizados como pigmentos e com importância farmacológica (SIMÕES et al., 2007). Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Entre elas, pode-se citar a proteção contra a incidência de raios ultravioleta; proteção

contra microrganismos patogênicos; ação antioxidante; ação alelopática e inibição enzimática (SIMÕES et al., 2007; HARBORNE, WILLIAMS, 2000; HEIM, TAGLIAFERRO, BOBILYA, 2002). Flavonóides como a quercetina e a apigenina têm demonstrado possuir ação antiinflamatória por causar inibição da Ciclooxygenase-2 (COX-2) e de óxido nítrico sintase (MUTOH et al., 2000; RASO et al., 2001).

Componentes com propriedades redutoras presentes em plantas, como os polifenóis e os flavonóides, têm despertado o interesse da comunidade científica principalmente por agirem eliminando o estresse oxidativo em organismos, e desta forma, prevenindo doenças e promovendo a saúde. Tanto os constituintes fenólicos quanto os flavonóides têm capacidade redutora frente ao estresse oxidativo. Desta forma, os resultados dos teores de constituintes fenólicos totais e de flavonóides sugerem a ocorrência de sinergismo destas substâncias quanto ao potencial antioxidante avaliado (SILVA, 2008).

Estudos clínicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos são os principais fatores que contribuem para a significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas em populações que possuem alimentação rica nestes componentes (MASELLA et al., 2001; GIMENO et al., 2002; MARRUGAT et al., 2004). Desta forma, a importância da pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos.

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção do estresse oxidativo (ADEGOKE et al., 1998). Esse estresse oxidativo, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (FINKEL et al., 2000). Seu excesso, no entanto, apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lípides de membrana; agressão às proteínas dos tecidos e das membranas; às enzimas, carboidratos e DNA (HUSAIN et al., 1987). Dessa forma, encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite; choque hemorrágico; doenças do coração; catarata; disfunções cognitivas e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (CHRISTEN, 2000). O estresse oxidativo parece

também exercer um papel importante na carcinogênese (JAYAPRAKASHA e JAGANMOHAN, 2000; WETTASINGHE et al., 2002).

Compostos típicos que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis; ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides; tocoferóis; fosfolípidos; aminoácidos; ácido fítico; ácido ascórbico; pigmentos e esteróis. Antioxidantes fenólicos são antioxidantes primários que agem como terminais para o estresse oxidativo (BASILE et al., 2005).

1.3 Espécies de interesse

1.3.1 *Lippia sidoides* Cham.

O gênero *Lippia* consiste em aproximadamente 200 espécies de ervas e arbustos. Entre as espécies nativas do nordeste brasileiro, destaca-se a *L. sidoides* Cham., vulgarmente conhecida como alecrim pimenta (ROQUINI, COSTA, 2009).

Encontrada no sertão nordestino, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte e no cerrado brasileiro, é uma planta aromática e de uso medicinal popular (Figura 1) (COSTA et al. 2002; MENDONÇA, 2004; DAMASCENO e BARBOSA, 2007).

A espécie *L. sidoides* está presente na relação nacional de plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). Esta relação é constituída de espécies vegetais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar fitoterápicos de interesse do SUS.



Figura 1 – Espécime de *Lippia sidoides* Cham. obtida da Estação Experimental do Departamento de Biologia da UFJF.
Fonte: César Augusto Caneschi.

1.3.1.1 Composição predominante de metabólitos secundários

O *Lippia sidoides* Cham. – pertence à família Verbenaceae e apresenta folhas com 4% de óleo essencial, contendo cerca de 60% de timol ou uma mistura de timol e carvacrol. Além disso, dentre os componentes fixos, são descritos os flavonóides e quinonas. Estes constituintes químicos conferem à espécie um alto valor medicinal, o que implica em largo uso da planta pelas populações carentes (FIGUEIREDO et al., 2009).

Segundo Botelho et al. (2007), a análise da composição química do óleo essencial das folhas de *L. sidoides* revelou a presença de 56,7% de timol; 16,7% de carvacrol; 7,1% de *p*-cymeno, 0,86% de β -mirceno, 1,1% de α -terpineno; 5,06% de éter metil timol e 2,39% de 1,8 cineol.

Segundo Costa et al. (2002), o estudo fitoquímico do extrato etanólico da espécie *L. sidoides* tem resultado no isolamento de vários constituintes químicos: acetato do ácido oleanólico (1); metil-3,4-diidroxibenzoato (2); lapachenol (3); tecomaquinona I (4)7; tectoquinona (5)8; tectol (6); tectol acetilado (7); quercetina (8); luteolina (9); glucoluteolina (10) e lippisidoquinona (11). Neste trabalho, os

autores registraram o isolamento de um flavonóide e uma lignana, identificados como taxifolina (12) e isolariciresinol (13) (Figura 2).

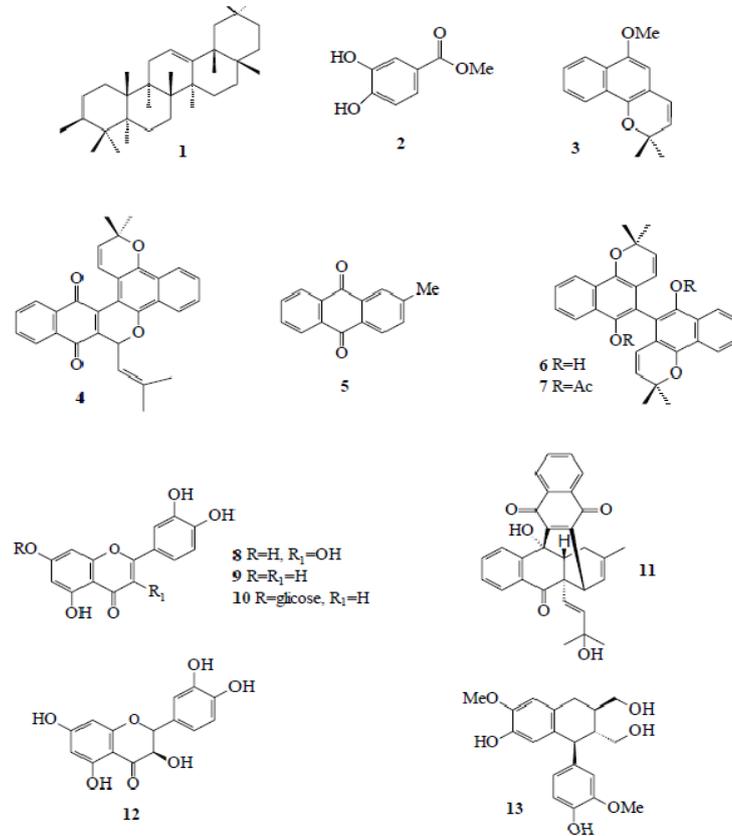


Figura 2 - Constituintes químicos de *Lippia sidoides*.
Fonte: Costa et al. (2002)

1.3.1.2 Atividades biológicas

Na medicina popular, a espécie *Lippia sidoides* é utilizada como agente anti-séptico, no combate a inflamação na região da boca e da garganta, pele, couro cabeludo e mucosas (NUNES et al., 2005; NUNES, LIRA, 2006). Esta espécie produz um óleo essencial rico em timol e de potente ação antimicrobiana contra fungos e bactérias (FEITOSA et al., 2005).

Segundo Feitosa et al. (2005), o óleo essencial de *Lippia sidoides* demonstrou atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Bacillus bulgaricus*; *Bacillus subtilis*; *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*; *Salmonella enteritidis*;

Escherichia coli e *Serratia marcescens* e *Candida albicans*. No entanto, nenhuma atividade antibacteriana foi observada em relação à *Pseudomonas aeruginosa*.

Segundo Cavalcanti et al. (2010), o óleo essencial de *Lippia sidoides* apresentou atividade acaricida potente contra *Teranychus urticae* Koch.

Segundo Roquini e Costa (2009), o extrato etanólico de *L. sidoides* contém princípios ativos capazes de reduzir o crescimento micelial dos fungos *Colleotrichum lindemuthianum*; *Fusarium oxysporum* e *Microsporium gypseum*, sendo que o mesmo não aconteceu com o extrato aquoso obtido da mesma planta.

Moreira et al. (2011) isolaram e caracterizaram duas novas proteínas antifúngicas de flores de *L. sidoides*.

Em virtude destas propriedades, este vegetal é cultivado em hortos de plantas medicinais e faz parte do elenco de plantas selecionadas pelo Governo do Estado, como fitoterápico (COSTA et al., 2002).

1.3.2 *Synadenium grantii* Hook

Synadenium grantii Hook, é um arbusto, membro da família Euphorbiaceae, a qual compreende cerca de 2000 espécies e tem uma distribuição mundial (MENON, VITHAYATHIL e RAMADOIS, 2002; NICHOLSON, 2008). Possui ampla cobertura nos jardins subtropicais e em vasos de plantas na Europa e nos Estados Unidos (NICHOLSON, 2008).

É um arbusto latescente que atinge de 3 a 5 metros, de origem africana e considerada tóxica. Esta planta é conhecida popularmente como tiborna ou colanota, dependendo da região onde se encontra (Figura 3) (JÚNIOR et al., 2005).

Segundo Machado (2008), as plantas do gênero *Synadenium* têm sido historicamente utilizadas pelas populações dos vários países onde ocorrem principalmente em países tropicais, como o Brasil. São usadas para tratar um grande e diversificado número de doenças. No entanto, há pouca literatura disponível sobre a composição química destas plantas e sua suposta ação farmacológica.

No estudo etnobotânico na comunidade de Conceição – Açu - MT, região onde a formação vegetal predominante é o cerrado, o látex da planta é utilizado para tratamento de câncer pela população (PASA, SOARES, NETO, 2005).

Segundo Damasceno e Barbosa (2007), *Synadenium grantii* é chamada também de cancerina ou tiborna, sendo a decocção da raiz utilizada para gripes e hemorróidas, enquanto o látex e as folhas são utilizados nos casos de câncer, feridas e verrugas.



Figura 3 – Espécime de *Synadenium grantii* Hook encontrada no município de Ubá/MG. Fonte: Ana Paula Moreira.

1.3.2.1 Composição predominante de metabólitos secundários

Nas folhas de *Synadenium grantii* foram identificados flavonóides, taninos, triterpenos/alcalóides e cumarinas (MOREIRA, 2010).

Synadenium grantii apresenta diversos grupos químicos com possível ação farmacológica, entre eles diterpenos, alcalóides, flavonóides entre outros.

Segundo Machado (2008), no estudo de extratos bruto hidroalcoólico e aquoso de folhas de *Synadenium carinatum*, foram determinados os seguintes

grupos de compostos químicos: alcalóides, heterosídeos flavônicos, cumarinas, heterosídeos antraquinônicos, esteróides e/ou triterpenos, heterosídeos antociânicos, taninos hidrolisáveis, taninos não-hidrolisáveis, aminogrupos e ácidos fixos.

Dayanand e Murthy (2010) comprovaram *in vitro* a atividade proteolítica e fibrinolítica total do látex de *Synadenium grantii*.

1.3.2.2 Atividades biológicas

Segundo Jager et al. (1994), várias espécies de *Synadenium* são conhecidas no mundo pelo seu uso como antiinflamatório, antitumoral e analgésico.

Segundo Menon et al. (2002), as proteases ou enzimas catalíticas desempenham um papel vital em todas as células, sendo integrante de parte de processos metabólicos e hormonais como enzima de processamento, montagem de membrana, na diferenciação celular e no envelhecimento. Nas células de mamíferos desempenham importante papel na fisiopatologia de várias doenças como asma, câncer e AIDS (EVANS et al., 1997; GOHJI et al., 1997).

O látex da planta tem sido uma boa fonte de proteases. Proteases serina têm sido isoladas de membros da família Euphorbiaceae (LYNN e RARDFORD, 1988).

Segundo Chifundera (2001), *Synadenium grantii* é uma das plantas medicinais conhecidas e utilizadas na área Bushi, Província de Kivo do Sul, República Dominicana do Kongo, sendo seu látex utilizado para aplicar sobre verrugas, o sumo do caldo do caule é utilizado para tratar otite média e, para acalmar a tosse é indicado lambar o pó de caules jovens misturados com sal.

Segundo Tabuti, Lye e Dhillion (2003), *Synadenium grantii* é uma das plantas tradicionais utilizadas em Bulamogi, Uganda, sendo uma árvore selvagem e utilizadas como antiinflamatório.

Assim como muitos outros membros da família Euforbiaceae, o látex desta espécie é rico em diterpenos que são compostos que têm demonstrado atividade contra células tumorais, além de possuir enzimas proteolíticas que desempenham

um importante papel na patofisiologia de graves doenças como o câncer e até mesmo AIDS (JÚNIOR et al., 2005).

Em 2005, Souza e colaboradores isolaram e purificaram uma proteína presente no látex de *S. carinatum* por cromatografia de afinidade. Essa proteína, uma lecitina, é considerada um potente agente de aglutinação de eritrócitos humanos, e, encontrada em diversas outras espécies da família Euphorbiaceae.

Moreira (2010) analisou os extratos acetato de etila; diclorometano; hexânico e metanólico obtidos das folhas de *Synadenium grantii*. Os extratos acetato de etila e metanólico apresentaram teores mais elevados de polifenóis, flavonóides e atividade antioxidante. Os extratos hexânico, acetato de etila e diclorometano apresentaram atividade antimicrobiana para as cepas: *Shigella sonnei* (ATCC 25931); *Escherichia coli* (ATCC 8739); *Salmonella thyphimurium* (ATCC 14028); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Pseudomonas aeruginosa* clínica. Este estudo demonstrou que além do látex, as folhas também apresentam potencial terapêutico.

1.3.3 *Stachytarpheta gesnerioides* Cham

O gênero *Stachytarpheta* da família Verbenaceae possui cerca de 133 espécies, quase que exclusivamente na América. No Brasil, existem 79 espécies e estão localizadas nos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia (ATKINS, 2005). Geralmente, as espécies deste gênero são encontrados em ambientes úmidos ou alagados (SANTOS et al., 2009).

De acordo com o estudo do ambiente e plantas vasculares na Reserva ecológica do IBGE no Centro de Estudos Ambientais do Cerrado situado no Distrito Federal, a espécie *Stachytarpheta gesnerioides* (Figura 4) foi caracterizada como erva sendo encontrada no Cerrado e em Mata de galeria (IBGE, 2004).



Figura 4 – Espécime de *Stachytarpheta gesnerioides* Cham. obtida da Estação Experimental do Departamento de Biologia da UFJF. Fonte: Érika Suzuki.

1.3.3.1 Composição predominante de metabólitos secundários

Na espécie *Stachytarpheta jamaicensis* foi verificada a presença de flavonóides, saponinas e taninos (SOSA, FERRADÁ e LÓPEZ, 2003; IDU et al., 2007).

Segundo OKOYE e colaboradores (2010), no extrato metanólico das folhas da espécie *Stachytarpheta cayennensis* foram encontrados elevados teores de flavonóides e terpenóides.

Segundo Moreira e colaboradores (2008), em extratos etanólicos e hidroalcoólicos das folhas de *Stachytarpheta gesnerioides* foram detectados a presença de flavonóides, taninos condensados, cumarinas, triterpenóides, esteróides e antraquinonas.

1.3.3.2 Atividades biológicas

Segundo Santana e colaboradores (2008), a espécie *Stachytarpheta cayennensis* é utilizada pela comunidade de Campos – Amélia Rodrigues – BA nas doenças do coração. Também apresenta propriedades antiinflamatórias; gastroprotetora e antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (SCHAPOVAL, 1997; VELA, SOUCCAR E LAPA, 2004; PENIDO et al., 2006; SILVEIRA et al., 2007).

Para a espécie *Stachytarpheta gesnerioides*, a atividade antioxidante e os teores de polifenóis do extrato etanólico 100% obtido das folhas foi superior ao extrato etanólico 70% (MOREIRA et al., 2008). Quando os extratos de diferentes polaridades (hexano; acetato de etila; diclorometano e metanol) obtidos das folhas de *Stachytarpheta gesnerioides* foram comparados, foi observado uma melhor atividade antioxidante do extrato acetato de etila. Provavelmente, este resultado foi devido ao elevado teor de polifenóis e flavonóides encontrados (SUZUKI et al., 2008).

Moreira e colaboradores (2009) demonstraram a atividade antibacteriana do extrato aquoso obtido das folhas de *Stachytarpheta gesnerioides* frente a linhagens bacterianas Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 8739); *Shigella sonnei* (ATCC 25931); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027); *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) e *Salmonella typhimurium* (CIP/IAL 1472), sendo esta última selvagem.

1.4 Atividade cicatrizante

1.4.1 Anatomia e fisiologia da pele

A pele, um dos maiores órgãos do corpo humano, atinge cerca de 16% do peso corporal e apresenta-se constituída por uma porção epitelial de origem

ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Abaixo e em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme ou tecido celular subcutâneo, que não faz parte da pele, apenas lhe serve de união com os órgãos subjacentes. A pele desempenha múltiplas funções, como proteção contra a perda de água, o atrito, a penetração de substâncias químicas destrutivas e colabora na termorregulação do corpo e na proteção contra os raios UV (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, sendo os queratinócitos as células mais abundantes. A epiderme possui ainda os melanócitos, as células de *Langerhans*, que desempenham importante papel nas reações imunitárias cutâneas, e as células de *Merkel*, responsáveis pela sensibilidade tátil nas palmas das mãos e nos pés (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). As células da epiderme se diferenciam para cumprir funções protetoras, como a síntese da queratina e melanina (SOUZA, 2004).

A derme é o tecido conjuntivo onde se apóia a epiderme e une a pele à hipoderme. Responsável pela elasticidade da pele, sua maior parte é constituída por tecido conjuntivo denso (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A derme é formada por mucopolissacarídeos ácidos, que desempenham importante papel na fixação da epiderme à derme. Contêm estruturas fibrosas, como as fibras de colágeno, elastina e reticulina, além de diversas células conjuntivas e imunológicas, como os fibroblastos, histiócitos e mastócitos. Na derme reticular, uma camada mais profunda da derme, há fibras colágenas dispostas em grossos feixes horizontais, além de um maior número de células elásticas. (SOUZA, 2004). Nesta camada, situam-se os anexos da pele, muitos vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (BLANES, 2004).

A hipoderme, formada por tecido conjuntivo frouxo, é responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apóia e poderá ter uma camada variável de tecido adiposo, (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004), com propriedades protetoras contra traumatismos e variações térmicas. A rede vascular profunda encontra-se na derme (SOUZA, 2004).

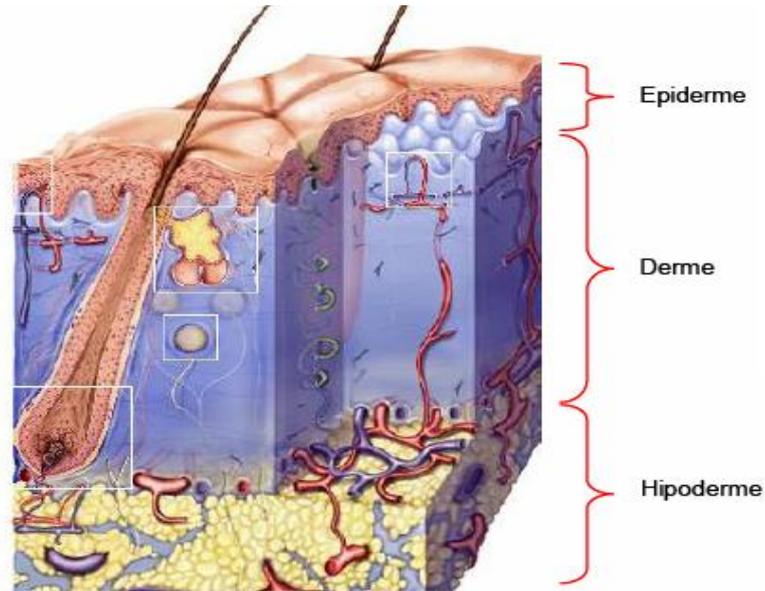


Figura 5 - Estrutura tridimensional da pele, demonstrando as três camadas, epiderme, derme e hipoderme.
 Fonte: SILVA, 2009.

1.4.2 Tecido conjuntivo

Os tecidos conjuntivos são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da forma do corpo, sendo a matriz extracelular seu principal constituinte. Esta consiste em diferentes combinações de proteínas fibrosas e de substância fundamental, complexo viscoso e altamente hidrofílico de macromoléculas aniônicas (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) e glicoproteínas multiadesivas (laminina, fibronectina, entre outras), que se liga às proteínas receptoras (intergínas) presentes na superfície das células bem como a outros componentes da matriz, fornecendo, força tênsil e rigidez a matriz. A matriz serve como um meio de troca de nutrientes e catabólitos entre as células e seu suprimento sanguíneo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A ampla variedade de tecido conjuntivo reflete na composição e na quantidade de seus três constituintes (células, fibras e substância amorfa) os quais

são responsáveis pela notável diversidade estrutural, funcional e patológica. As fibras são predominantemente compostas de colágeno (Figura 6).

As células com intensa atividade de síntese são denominadas fibroblastos, enquanto que as células metabolicamente quiescentes são conhecidas como fibrócitos (Figura 7). Os fibroblastos possuem citoplasma abundante, com muitos prolongamentos, seu núcleo é ovóide, grande e fracamente corado, com cromatina fina e nucléolo proeminente. Os fibrócitos são menores que os fibroblastos e tendem a um aspecto fusiforme (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

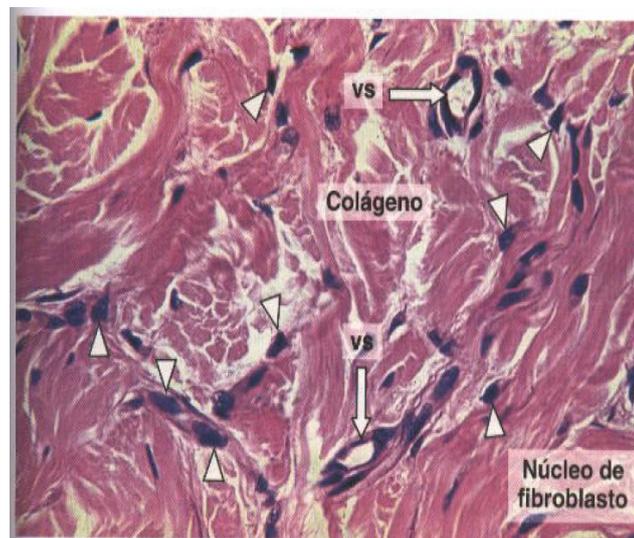


Figura 6 - Tecido conjuntivo denso não modelado da derme da pele. Mostra feixes espessos de fibras de colágeno orientados em diferentes sentidos. Vêm ainda núcleos de fibroblastos (cabeças de setas). Fonte: Junqueira e Carneiro (2004).

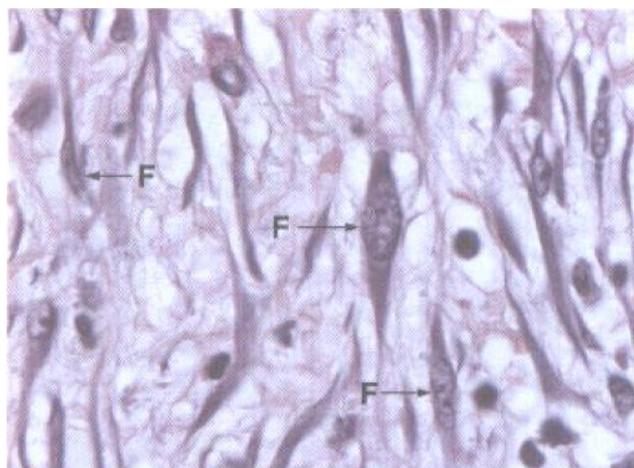


Figura 7 - Corte histológico de tecido conjuntivo frouxo. Mostra vários fibroblastos (F) ativos. Fonte: Junqueira e Carneiro (2004).

1.4.3 Classificação do grau das feridas

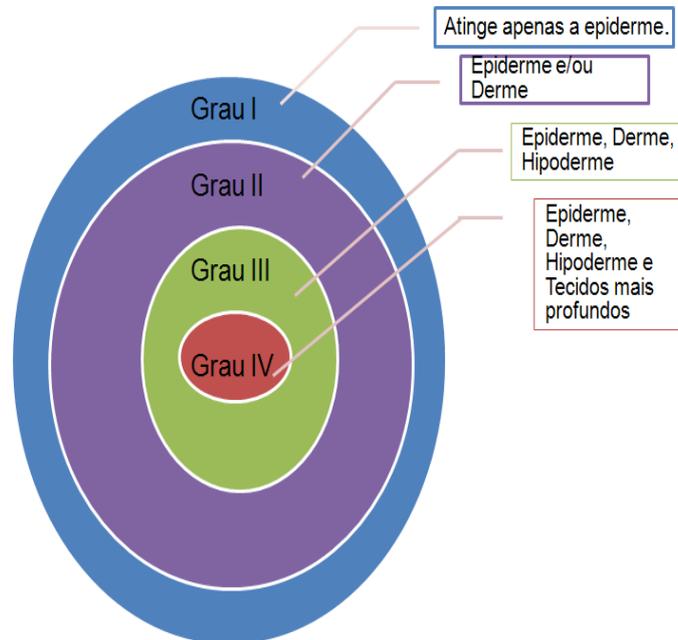


Figura 8- Classificação das feridas de acordo com Moura (2004).

Uma ferida é uma interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou em menor extensão, que pode ser causada por qualquer tipo de trauma (físico, químico ou mecânico) ou desencadeada por uma afecção clínica que aciona as frentes de defesa orgânica para o contra ataque (BLANES, 2004).

Segundo Moura (2004), as feridas podem ser classificadas quanto ao seu grau de acordo com a profundidade quanto à camada tissular envolvida como epiderme, derme, subcutâneo ou tecidos mais profundos, como músculos, tendões, ossos e outros. As feridas são classificadas em graus, são eles (Figura 8):

Grau I: são feridas nas quais ocorreu comprometimento apenas da

Grau II: ocorre comprometimento com perda tecidual da epiderme e/ou derme.

Grau III: existe comprometimento da epiderme, derme e hipoderme.

Grau IV: ocorre comprometimento da epiderme, derme, hipoderme e tecidos mais profundos.

1.4.4 Cicatrização

Segundo Blanes (2004), o processo de reparação tissular compreende dois mecanismos de restauração dos tecidos: a regeneração e a cicatrização. A regeneração ocorre com reposição tissular "original". O trauma inicial gera uma resposta inflamatória aguda, manifestada através de edema e formação de exsudado seroso, rico em leucócitos, que cessa em menos de 24 horas. As células epidérmicas, das margens da ferida e das invaginações epidérmicas dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas começam a proliferar e migrar no leito da ferida, ocluindo rapidamente sua superfície (MANDELBAUM, 2003).

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido. Tal evento é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos que se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular. Como desencadeante da cicatrização, ocorre a perda tecidual, a partir da qual, a fisiologia volta-se completamente para o reparo de um evento danoso ao organismo. A perda tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou mesmo atingir todo o órgão, chegando ao tecido celular subcutâneo (MANDELBAUM, 2003).

Segundo Mandelbaum (2003), o processo da cicatrização foi classificado em 5 fases principais:

1 - coagulação; 2 - inflamação; 3 - proliferação; 4 - contração da ferida e 5 - remodelação.

1.4.4.1 Coagulação

O início da coagulação ocorre imediatamente após o surgimento da ferida. Essa fase depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação (MANDELBAUM, 2003). A ruptura de vasos sanguíneos leva ao extravasamento de

sangue ou apenas à perda de plasma para o tecido circunjacente. Os eventos iniciais no processo de cura são os direcionados para a prevenção de qualquer perda subsequente de sangue. Os vasos lesados contraem-se, ocorrem aderência e agregação das plaquetas no local e, em seguida, a ativação da cascata de coagulação. O resultado é a formação do trombo que não tem apenas o objetivo de limitar a perda de sangue (CARVALHO, 2002), mas também, o de cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida (MANDELBAUM, 2003) (Figura 9).

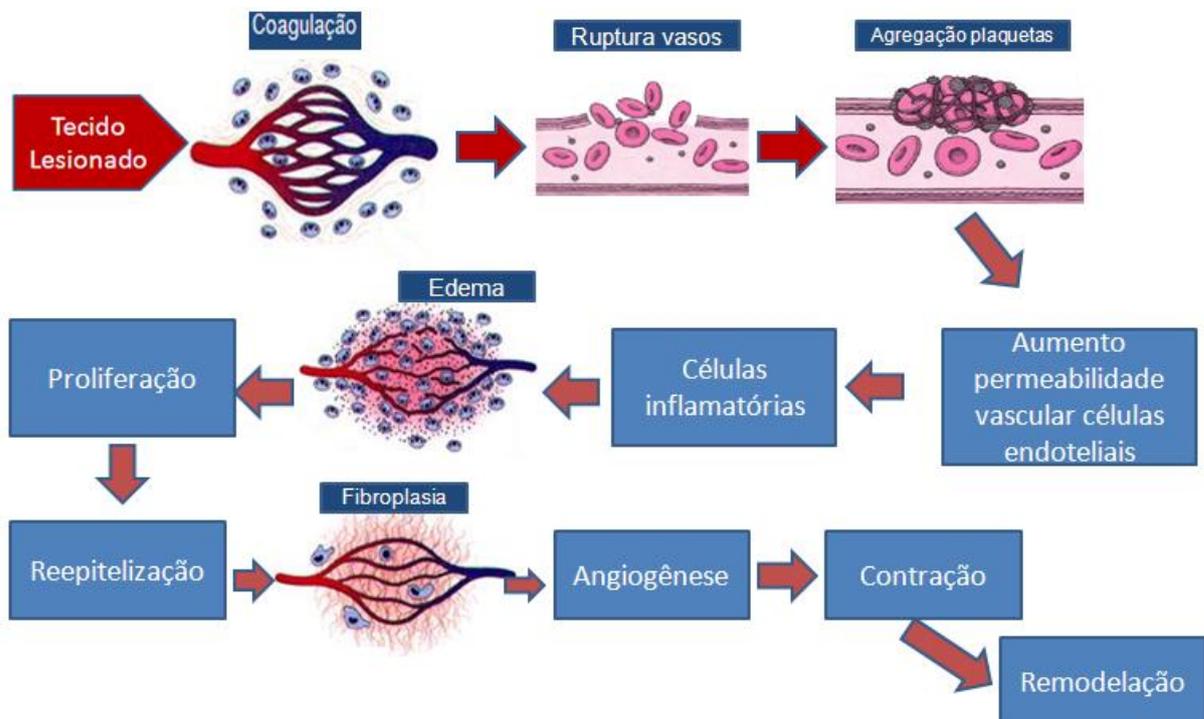


Figura 9 - Etapas da cicatrização adaptado de: Carvalho (2002); Mandelbaum (2003) e Blanes (2004).

1.4.4.2 Inflamação

Após a vasoconstrição, as células endoteliais retraem-se e perdem suas conexões, aumentando a permeabilidade vascular e permitindo a passagem dos

elementos sanguíneos (plasma, eritrócitos e leucócitos) para a ferida. (BLANES, 2004).

Intimamente ligada à fase anterior, a inflamação depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos e linfócitos. Os PMNs chegam ao local da injúria tissular e ficam por período que varia de três a cinco dias; são eles os responsáveis pela fagocitose das bactérias. O macrófago é a célula inflamatória mais importante dessa fase. Permanece prioritariamente do terceiro ao décimo dia do período inflamatório. Fagocita bactérias, desbrida corpos estranhos e direciona o desenvolvimento de tecido de granulação (MANDELBAUM, 2003).

A ocorrência de linfócitos na ferida se dá em aproximadamente uma semana. Seu papel não é bem definido, porém sabe-se que, com suas linfocinas, tem importante influência sobre os macrófagos (MANDELBAUM, 2003).

Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fase inflamatória conta com o importante papel da fibronectina. Sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela adere, simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando assim como uma cola para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes de matriz. Além de formar essa base para a matriz extracelular, apresenta propriedades quimiotáticas e promove a opsonização e fagocitose de corpos estranhos e bactérias (MANDELBAUM, 2003).

A vasodilatação com extravasamento dos elementos para o exterior do vaso forma um exsudado que leva às manifestações clínicas de tumor, calor, rubor e dor. A infecção intensifica e prolonga a inflamação.

1.4.4.3 Proliferação

Nesta fase ocorre a reparação do tecido conjuntivo e do epitélio. Dividida em três subfases, a proliferação é responsável pelo "fechamento" da lesão propriamente dita (MANDELBAUM, 2003).

1.4.4.3.1 Reepitelização

Faz-se a migração de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais, quando a ferida é de espessura parcial (derme incompleta), e apenas das margens nas de espessura total (derme completa ou estendida ao tecido celular subcutâneo). Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio. Feridas superficiais abertas e ressecadas reepitelizam mais lentamente do que as ocluídas (MANDELBAUM, 2003).

1.4.4.3.2 Fibroplasia

A segunda fase da proliferação inclui a fibroplasia e formação da matriz, que é extremamente importante na formação do tecido de granulação (fibroblastos, células inflamatórias, e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, glicosaminoglicanas e colágeno) (MANDELBAUM, 2003).

Na reparação do tecido conjuntivo ocorre a formação do tecido de granulação, com proliferação endotelial e de fibroblastos (BLANES, 2004). A formação do tecido de granulação depende do fibroblasto, célula crítica na formação da matriz, que surge por volta do segundo e terceiro dia após o trauma, sendo uma célula fusiforme, com núcleo oval (MANDELBAUM, 2003; BLANES, 2004). Longe de ser apenas produtor de colágeno, o fibroblasto produz elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (MANDELBAUM, 2003).

O fibrinogênio do exsudado inflamatório transforma-se em fibrina, formando uma rede, onde os fibroblastos depositam-se e passam a multiplicar-se e a secretar os componentes protéicos do tecido cicatricial. Concomitante a esta fibroplasia, ocorre intensa proliferação vascular (BLANES, 2004).

A matriz extracelular, formada por constituintes plasmáticos, plaquetas, macrófagos e fibroblastos, proporciona um meio para a aderência, migração e orientação das células que irão formar o tecido de granulação em desenvolvimento. A fibronectina juntamente com o ácido hialurônico são os componentes predominantes da matriz durante as primeiras fases do reparo de uma ferida. À medida que a ferida vai se curando, diminui a concentração do ácido hialurônico e aumenta a concentração dos proteoglicanos ou glicosaminoglicanos sulfatados. Essa alteração na composição dos proteoglicanos favorece a fixação e imobilidade das células. Com a cessação do movimento, as células diferenciam-se em fenótipos mais maduros. As células endoteliais maturam e resultam em capilares funcionais para as células de revestimento e os fibroblastos dão início à formação de colágeno. À medida que a ferida avança em seu processo de maturação, os proteoglicanos e a fibronectina são cada vez mais substituídos pelo colágeno, o principal componente estrutural da cicatriz (CARVALHO, 2002).

1.4.4.3.3 Angiogênese

A última fase da proliferação é a angiogênese, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização (MANDELBAUM, 2003).

Angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos (RUNDHAUG, J.E., 2005). Este tecido formado por fibroblastos, substâncias produzidas por eles e vasos sanguíneos é denominado tecido de granulação, apresentando-se clinicamente com aspecto granuloso e avermelhado (BLANES, 2004).

1.4.4.4 Contração da ferida

É o movimento centrípeto das bordas da ferida (espessura total). As feridas de espessura parcial não contam com essa fase. Uma ferida de espessura total tem contração mesmo quando há enxertos, que diminuem em 20% o tamanho da ferida (MANDELBAUM, 2003).

A capacidade regenerativa dos tecidos conjuntivos é claramente observada quando os tecidos são destruídos por lesões inflamatórias ou traumáticas. Os espaços deixados pela lesão não são capazes de se regenerar sendo preenchidos por uma matriz de tecido conjuntivo. A principal célula envolvida na cicatrização é o fibroblasto. Durante a cicatrização, com estímulos adequados, os fibrócitos reverterem para o estado de fibroblasto, reativando sua capacidade de síntese. Na reparação das feridas, observam-se células conhecidas como miofibroblastos, que exibem características de fibroblastos e de células musculares lisas. Os miofibroblastos possuem a maioria das características dos fibroblastos, porém contém uma quantidade aumentada de filamentos de actina e miosina, que são abundantes nas células musculares lisas. Sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento das feridas após as lesões, processo conhecido como contração da ferida (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; BERNACCHIO, 2007).

1.4.4.5 Remodelação

Essa é a última fase do processo de cicatrização. Ocorre no colágeno e na matriz, dura meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas e reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura. A neovasculatura diminui, e tardiamente, a cicatriz é considerada

avascular. Uma cicatrização normal tem aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, não é volumosa e apresenta-se plana (MANDELBAUM, 2003).

A remodelação do colágeno inicia-se na formação do tecido de granulação e mantém-se por meses após a reepitelização. As collagenases e outras proteases produzidas por macrófagos e células epidérmicas indicam a direção correta às fibras colágenas difusas. Há diminuição de todos os elementos celulares, inclusive fibroblastos, bem como dos elementos do tecido conjuntivo (BLANES, 2004).

1.4.5 Fatores que interferem na cicatrização

Dentre os fatores que podem afetar o processo de reparação tissular estão os sistêmicos e os locais. Entre os fatores sistêmicos destacam-se: a idade, o estado nutricional do paciente, a existência de doenças de base, como diabetes, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, aterosclerose, disfunção renal, quadros infecciosos sistêmicos e uso de drogas sistêmicas e imobilidade. Esses fatores, muitas vezes, não podem ser eliminados, mas devem ser controlados. Como fatores locais, podem ser citados, a localização anatômica da ferida e a presença de infecção e de tecido desvitalizado. Cabe ressaltar que a análise da ocorrência desses fatores é fundamental na escolha do tratamento local (MANDELBAUM, 2003; BLANES, 2004).

O tratamento de feridas utilizando plantas e produtos naturais vêm sendo utilizado há muitos anos (ZIMMERMAN, 1993). Recentemente, vários pesquisadores têm buscado nos recursos vegetais, uma fonte de moléculas capazes de influenciar positivamente na evolução de cicatrização das feridas (D'ACAMPORA et al., 2007; SILVA, 2008; DUTRA et al., 2009; GOUTHAMCHANDRA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2010; SUNTAR et al., 2010)

Nesse contexto, pretende-se determinar os teores de polifenóis e de flavonóides; avaliar as possíveis atividades biológicas (antioxidante e cicatrizante) das seguintes espécies encontradas no cerrado brasileiro: *Lippia sidoides* Cham., *Synadenium grantii* Hook. e *Stachytarpheta gesnerioides* Cham., sendo que até o

momento, não foi encontrado na literatura o estudo destas espécies na cicatrização de feridas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as possíveis propriedades farmacológicas dos extratos etanólicos (EE) de três espécies de interesse: *Lippia sidoides* Cham.; *Synadenium grantii* Hook. e *Stachytarpheta gesnerioides* Cham..

2.2 Específicos

- 1) Determinar os teores de polifenóis e de flavonóides dos EE obtidos das folhas de *Lippia sidoides*, *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*.
- 2) Avaliar o potencial antioxidante dos EE obtidos das folhas de *Lippia sidoides*, *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*.
- 3) Correlacionar os teores de polifenóis e flavonóides e entre estes teores e a atividade antioxidante.
- 4) Verificar *in vivo* a atividade cicatrizante através das análises histomorfométricas com a contagem de células inflamatórias, fibroblastos, vasos sanguíneos e área de colágeno e matriz extracelular e imunoistoquímica com a contagem dos miofibroblastos dos EE de *Lippia sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*, empregando o modelo experimental de indução de úlceras dérmicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 10 representa esquematicamente todos os passos seguidos, desde a colheita do material vegetal até a execução das análises de interesse.



Figura 10 – Esquema dos passos seguidos desde a colheita do material vegetal até a execução das análises de interesse.

3.1 Dados ambientais da colheita

Folhas da espécie *Lippia sidoides* foram coletadas na Estação Experimental do Departamento de Biologia da UFJF em abril de 2009 com exsicata depositada no Herbário CESJ sob o número 46180.

Folhas da espécie *Synadenium grantii* foram coletadas em Ubá/MG-Brasil, em abril de 2009.

Folhas da espécie *Stachytarpheta gesnerioides* foram coletadas na Estação Experimental do Departamento de Biologia da UFJF. A amostra foi coletada em abril de 2009.

As espécies *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides* não possuem exsicatas depositadas no Herbário CESJ devido à ausência de sumidades floridas necessárias para a correta identificação das mesmas.

3.2 Obtenção de extratos

Antes das folhas das espécies terem sido submetidas à dessecação, passaram por um processo de pré-secagem na temperatura ambiente.

Para o preparo do extrato de *Lippia sidoides*, 40 gramas de folhas foram submetidas à dessecação em temperatura de 50° C, com redução da umidade em até 5%. Foram obtidas 31,5 gramas de material vegetal seco que foi triturado separadamente em moinho mecânico, com peneiras de granulação definida. O material moído foi acondicionado em frasco adequado e os extratos foram obtidos por maceração estática durante 72 horas utilizando 3000 mL de etanol 100% em temperatura ambiente. Os extratos foram submetidos à evaporação rotacionada até eliminação completa do solvente.

Para o preparo do extrato de *Synadenium grantii*, 105 gramas de folhas foram submetidas à dessecação em temperatura de 50° C, com redução da umidade em até 5%. Foram obtidas 99,35 gramas de material vegetal seco que foi triturado separadamente em moinho mecânico, com peneiras de granulação definida. O material moído foi acondicionado em frasco adequado e os extratos foram obtidos por maceração estática durante 72 horas utilizando 3000 mL de etanol 100% em temperatura ambiente. Os extratos foram submetidos à evaporação rotacionada até eliminação completa do solvente.

Para o preparo do extrato de *Stachytarpheta gesnerioides*, 90 gramas de folhas foram submetidas à dessecação em temperatura de 50° C, com redução da umidade em até 5%. Foram obtidas 81,5 gramas de material vegetal seco que foi triturado separadamente em moinho mecânico, com peneiras de granulação definida. O material moído foi acondicionado em frasco adequado e os extratos foram obtidos por maceração estática durante 72 horas utilizando 4500 mL de etanol

100% em temperatura ambiente. Os extratos foram submetidos à evaporação rotacionada até eliminação completa do solvente.

3.3 Preparo das formulações

Após a obtenção do extrato etanólico (EE), foram testadas diversas bases de polaridades diferentes (creme Pollawax; gel de carbopol; gel de natrosol e creme base Lanette) na incorporação dos EE. O melhor resultado foi na incorporação ao creme base Lanette e os EE foram incorporados neste nas seguintes concentrações: 10 % de EE de *Lippia sidoides*; 10% de EE de *Synadenium grantii* e. 10% de EE de *Stachytarpheta gesnerioides*.

Foram preparados 50 g de cremes para cada planta utilizada.

3.4 Quantificação de polifenóis totais

A determinação dos teores de polifenóis foi realizada segundo Leite (2002), com pequenas modificações. Os EE das espécies vegetais utilizadas foram ressuspensos em etanol obtendo-se uma solução na concentração de 10mg extrato/mL. Foi adicionada uma alíquota dessa solução (50 μ L); 250 μ L de *Folin-Ciocalteu*; 500 μ L de carbonato de sódio 20% e 4,2 mL de água destilada. Os ensaios foram realizados em triplicata. Essa reação transcorreu em temperatura ambiente, durante 30 minutos no escuro, em seguida a absorvância foi lida no espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu®, Japão) (λ =765 nm).

Os teores de polifenóis foram determinados por interpolação da absorvância das amostras contra a curva de calibração construída com padrão de ácido gálico (0,25 a 7 μ g/mL) e os resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=3) em mg/100mg de extrato.

3.5 Quantificação de flavonóides

A determinação dos teores de flavonóides foi realizada segundo Leite (2002), com pequenas modificações. Os teores médios de flavonóides foram equivalentes à rutina, a qual foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração (2-30 µg/ml). Os EE das espécies vegetais utilizadas foram ressuspensos em etanol obtendo-se uma solução na concentração de 10mg extrato / mL. Foi adicionada uma alíquota dessa solução (20 µL); 99 µL de água destilada; 25 µL de AlCl₃ 8 %, 100 µL de solução de piridina:metanol (1:8 v/v) e 6 µL ácido acético glacial. Os ensaios foram realizados em triplicata. Essa reação transcorreu em temperatura ambiente, por 30 minutos no escuro, em seguida a absorvância foi lida no espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu®, Japão) (λ =405 nm).

Os teores de flavonóides foram determinados por interpolação da absorvância das amostras contra a curva de calibração construída com o padrão e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (n=3) em mg/100mg de extrato.

3.6 Atividade antioxidante

A atividade sequestrante de radicais 2,2-difenil-1,2-picrilhidrazil (DPPH) (*Sigma-Aldrich*®, EUA) foi determinada de acordo com o método de Sreejavan e Rao (1997) com pequenas modificações. Neste modelo, 150 µL da solução etanólica de DPPH 0,05 mM foram adicionados a 50 µL de cada solução etanólica dos EE das espécies vegetais, nas concentrações de 250; 125; 62,50; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95; 0,97 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata. Essa reação transcorreu em temperatura ambiente, durante 30 minutos no escuro, e em seguida a absorvância foi lida em espectrofotômetro (UV mini 1240, Shimadzu®, Japão) (λ =510 nm). Foi utilizado butil-hidróxi-tolueno (BHT) como padrão nas mesmas concentração. A inibição do radical DPPH foi calculada com o auxílio da equação:

$$CI_{50} (\%) = 100 \times (A_0 - A_s)/A_0$$

Onde:

A_0 é a absorvância do controle negativo,

A_s é a absorvância da amostra-teste.

O valor de CI_{50} representa a concentração dos extratos que causa 50% de inibição do radical DPPH.

3.7 Atividade cicatrizante

Este estudo foi realizado no Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG utilizando procedimentos validados em estudos anteriores do núcleo de pesquisa (SILVA, 2008; DUTRA, 2009).

Foram utilizados coelhos machos (*Oryctolagus cuniculus*) albinos da Nova Zelândia, com peso entre 1.5 a 2.0 kg, provenientes da Fazenda Experimental da UFMG – Igarapé/MG. Os animais foram mantidos com temperatura ($22^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$) e umidade (35 a 65%) controlada e ciclo claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*.

A temperatura e a umidade foram monitoradas com o auxílio de termohigrômetro e mantidas constantes pelo uso do ar condicionado (15000, Springer, Mundial – Brasil) e do desumidificador (Mechanic, Artel, Itália).

Todos os procedimentos estão de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF, número 43 a 45/2010 (ANEXO B).

3.7.1 Protocolo experimental de indução de úlceras dérmicas em coelhos albinos

Os animais foram numerados (1-12) e foi realizada a tricotomia do pelo, sendo o dorso dividido em 4 quadrantes (cada quadrante recebeu um tipo diferente de tratamento).

Para o procedimento da indução de úlceras dérmicas foi realizada a anestesia local com prilocaína 3% + fenilpressina 0,03 UI (0,50 mL via cutânea/quadrante). Sob anestesia, as úlceras dérmicas foram induzidas com o auxílio de uma barra de ferro (com 5cm²), aquecida em banho de água fervente por 1 minuto e aplicada sobre a pele do animal por 10 segundos por quadrante. A queimadura foi classificada como de grau II. Os animais não apresentaram resistência ao procedimento, indicando a eficiência da anestesia local. Após este procedimento, os animais foram colocados nas gaiolas com ração e água *ad libitum*. Solução de meloxicam 0,2mg/kg/dia foi administrada por via oral incorporada na água para o alívio da dor, após o efeito anestésico por 2 dias (Anexo A).

O creme contendo o antibiótico sulfadiazina de prata a 1% foi utilizado no quadrante 1 de todos os coelhos como controle positivo e o creme base Lanette no quadrante 2, como controle negativo.

Nos coelhos numerados de 1 a 6, o quadrante 3 foi tratado com o creme contendo 10% de EE de *Lippia sidoides*.

Nos coelhos numerados de 7 a 12, o quadrante 3 foi tratado com o creme contendo 10% de EE de *Synadenium grantii* e o quadrante 4 com o creme contendo 10% de EE de *Stachytarpheta gesnerioides*.

As formulações foram aplicadas duas vezes ao dia (12-12 horas). No dia seguinte à indução das úlceras dérmicas, os animais foram colocados sob a bancada e uma pequena quantidade de creme de cada tratamento (em torno de 1 grama) foi espalhado em cada quadrante específico. Sobre cada área foi colocado gaze estéril, seguida de bandagem não oclusiva e o animal foi enfaixado de forma a evitar a remoção dos tratamentos. Na segunda aplicação, foram retiradas as bandagens e a gaze, as feridas foram limpas com solução fisiológica estéril. As

formulações foram aplicadas duas vezes ao dia (12-12 horas) repetindo todo o procedimento descrito acima sucessivamente até o final do décimo dia de experimento.

Os cremes foram aplicados de acordo com o esquema representado na Figura 11.

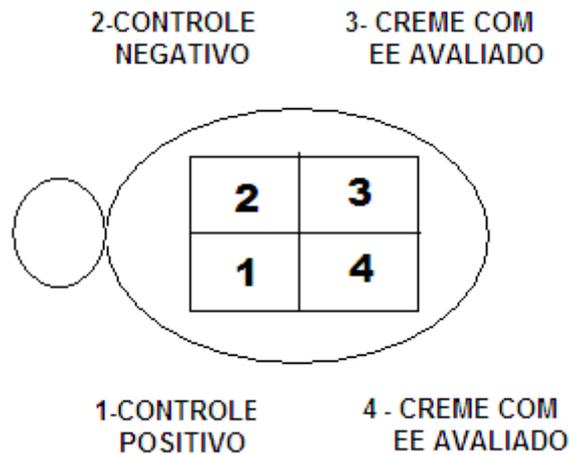


Figura 11 - Representação esquemática dos quadrantes na aplicação dos cremes contendo os controles positivo e negativo e os extratos etanólicos (EE) vegetais

Para todos os animais, foi elaborada uma ficha (Anexo A), na qual se encontram detalhadas os procedimentos diários.

Ao final dos 10 dias, os coelhos foram eutanasiados com superdosagem de pentobarbital sódico intravenoso (200 mg/kg) e tiveram parte das lesões cutâneas retiradas e mantidas em recipiente fixados com solução tamponada de formol a 10% (pH=7,0) por um período mínimo de 24 horas para a análise histopatológica, histomorfométrica e imunohistoquímica, tendo em vista uma avaliação mais detalhada do efeito cicatrizante dos cremes.

3.7.2 Avaliação macroscópica

As lesões eram avaliadas diariamente (duas vezes ao dia): antes da aplicação do creme e preenchidas de acordo com formulário próprio (ANEXO A). No formulário constava dados como: o peso diário do animal; estado de irritação e agitação, além de observações referentes ao aspecto das lesões como: presença ou ausência de ferida aberta; área avermelhada; área esbranquiçada; secreção; escara; edema; pus e sangramento. Todos os animais tiveram suas lesões fotografadas por câmera digital diariamente (*Cyber-Shot DSC-W35*, Sony, Estados Unidos da América).

Todas as lesões foram medidas diariamente e posteriormente foi feito a análise quanto à contração da área ferida, a qual foi expressa em cm².

3.7.3 Avaliação microscópica

3.7.3.1 Análise histomorfométrica

Após a fixação das amostras, estas foram desidratadas gradativamente em concentrações crescentes de álcool etílico (70% a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina, conforme métodos histopatológicos de rotina. Os fragmentos incluídos em parafina foram cortados utilizando-se micrótomo, obtendo-se seções de 3 µm de espessura. As lâminas foram mantidas em estufa, e os cortes, submetidos à coloração por hematoxilina e eosina, para posterior análise histopatológica.

As lâminas foram analisadas através de microscópio óptico (BX51, Olympus – Japão) e as imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo acoplada a ele e digitalizadas por meio do *software Image-Proplus* (Media Cybernetics). Foi realizada a captura de imagens de cinco campos aleatórios na região inflamatória de cada amostra de tecido, com ampliação total de 400x.

As imagens foram arquivadas e submetidas à contagem de células inflamatórias, fibroblastos, número de vasos capilares, área de colágeno e matriz extracelular, n=30 para cada item analisado. A contagem foi realizada através dos softwares *Image Tool* versão 3.0 e *Image-Proplus* 6.0.

Foram identificadas como células inflamatórias mononucleadas sendo aquelas que possuíam núcleo arredondado e ovóide em meio à matriz extracelular e as PMNs sendo aquelas que apresentam citoplasma amplo com núcleo de características polilobulado.

Os fibroblastos foram identificados como células fusiformes alongadas com núcleos vesiculosos ou roliços e achatados, dispostos em feixes ou fascículos.

O colágeno teve sua área determinada além de ter sido caracterizado como não habitual aquele com espessuras variáveis, frequentemente finos, com a coloração pouco evidente e baixa densidade, observando feixes em várias direções ou não. Já o colágeno habitual foi caracterizado como aquele de coloração eosinofílica e mais espessos com a conformação de feixes em várias direções.

A área de matriz extracelular também foi evidenciada por áreas claras ou basofílicas em torno de fibras colagênicas e elementos celulares.

3.7.3.2 Análise imunoistoquímica

A técnica imunoistoquímica se baseia numa reação antígeno-anticorpo. Para a identificação de uma proteína específica (antígeno), um determinado anticorpo reconhecerá um determinado *domain*. O anticorpo liga-se ao antígeno específico, que por sua vez é reconhecido por um anticorpo secundário ao qual se liga um complexo enzimático streptavidina-biotina-peroxidase. A peroxidase transforma uma substância cromogênica, em geral a diaminobenzidina, que confere à reação positiva uma coloração acastanhada (SAMPALIO et al, 2009).

Para avaliar a presença de miofibroblastos nas feridas, cortes histológicos foram submetidos à técnica de imunoistoquímica *sob método tissue array* com o anticorpo anti α -SMA. As lâminas do anticorpo Actina de Músculo Liso Clone 1 A 4

(1:1000), (DAKO, M0851), foram desparafinizadas em 4 banhos de xilol e 4 banhos de álcool anidro. Em seguida, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da imersão em peróxido de hidrogênio a 3% em metanol a 70%, durante 20 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada. Em seguida, os cortes foram ciclados por uma caneta hidrofóbica (Dako, S2002). Logo em seguida, foi aplicado o anticorpo previamente diluído em uma solução contendo solução salina de fosfato (PBS)-TWEEN 20 + BSA a 0,1%. Após *overnight*, foi aplicado o kit Ultravizion Plus Detection System (Thermo Scientific, TP-125-HLX). A seguir, foi adicionado o cromógeno DAB (Thermo Scientific) por 30 segundos a 1 minuto em média. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e contra-coradas em hematoxilina de *Harris*, azuladas em água corrente, desidratadas em 4 banhos de álcool e 4 banhos de xilol ambos, e finalmente montadas com goma de Damar (Proquímios) para fixação das lamínulas e posterior observação ao microscópio óptico (BX51, Olympus – Japão). As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo acoplada ao microscópio e digitalizadas por meio do *software Image-Proplus* (Media Cybernetics), com leitura de 5 campos por corte histológico. Foram escolhidas para contagem as células imunomarcadas e com morfologia de miofibroblastos, excluindo-se as correspondentes às células endoteliais dos vasos neoformados.

3.8 Análise estatística

Foram realizadas análises descritivas dos teores de polifenóis, de flavonóides, da atividade antioxidante, da contração da ferida; contagens de miofibroblastos, fibroblastos; células inflamatórias; vasos sanguíneos; áreas de colágeno e de matriz extracelular, através de medidas de posição e de dispersão (média e desvio padrão). Foi realizada análise de correlação de *Pearson* entre os teores de polifenóis e flavonóides e entre estes teores e a atividade antioxidante.

Para avaliar a significância das diferenças entre as médias dos resultados dos grupos de estudo, quando necessário, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e

teste *post hoc* de Tukey, para os quais foi utilizado o *software Statistical Package for the Social Sciences* versão 14.0. Foi estabelecido como limite de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Quantificação dos teores de polifenóis e de flavonóides

Os teores de polifenóis e de flavonóides dos EE das espécies vegetais utilizadas estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Teores de polifenóis e de flavonóides dos extratos etanólicos das espécies de interesse avaliadas.

Espécies de interesse	POLIFENÓIS (mg / 100mg planta)	FLAVONÓIDES (mg / 100mg planta)
<i>Lippia sidoides</i>	21,04 ± 0,48	6,65 ± 0,35
<i>Synadenium grantii</i>	5,5 ± 0,13	1,60 ± 0,10
<i>Stachytarpheta gesnerioides</i>	9,75 ± 0,15	4,59 ± 0,19

4.2 Atividade antioxidante

Apenas espécies *Lippia sidoides* e *Stachytarpheta gesnerioides* apresentaram significativa capacidade sequestrante frente ao radical DPPH, em comparação com o padrão de referência BHT. Os resultados estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das espécies de interesse.

Espécies de interesse	Cl ₅₀ (µg/ml)
<i>Lippia sidoides</i>	10,75
<i>Synadenium grantii</i>	64,50
<i>Stachytarpheta gesnerioides</i>	24,64
BHT	11,82

Foi demonstrado uma correlação positiva entre os teores de polifenóis e flavonóides ($r = 0,935$) (Figura 12) e entre os teores de polifenóis (Figura 13) ou de flavonóides (Figura 14) e a atividade antioxidante ($r = - 0,864$; $r = - 0,986$, respectivamente) foi observado uma correlação negativa , pois são grandezas inversamente proporcionais.

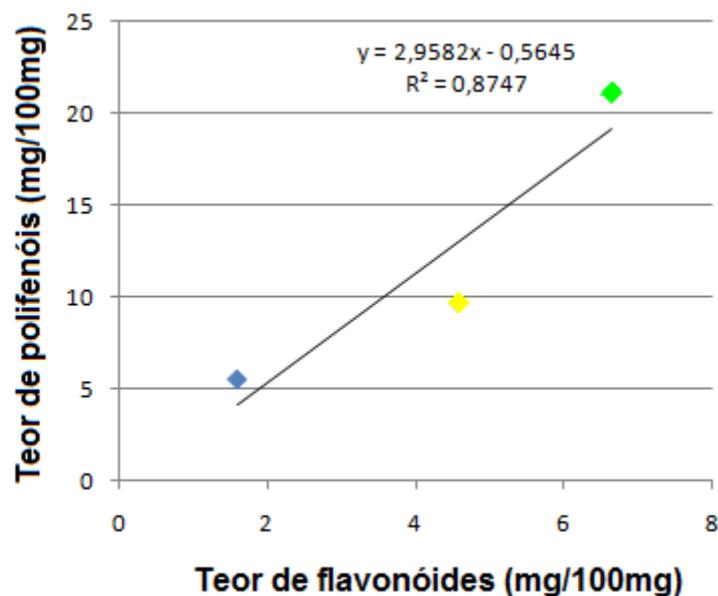


Figura 12 – Correlação entre teores de polifenóis e de flavonóides dos extratos etanólicos de *Lippia sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*. Legenda: ◆ *Lippia sidoides*; ◆ *Synadenium grantii*; ◆ *Stachytarpheta gesnerioides*.

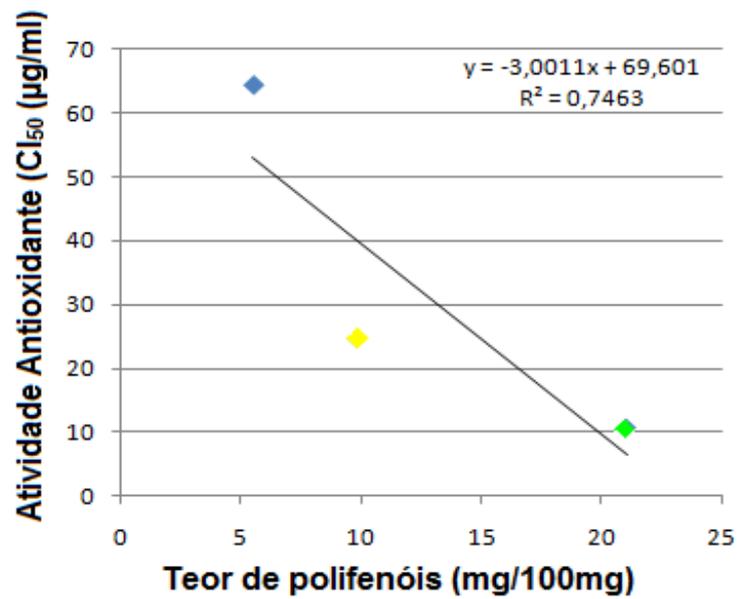


Figura 13 - Correlação entre a Atividade Antioxidante e o teor de polifenóis dos extratos etanólicos de *Lippia sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*.
 Legenda: ◆ *Lippia sidoides*; ◆ *Synadenium grantii*; ◆ *Stachytarpheta gesnerioides*.

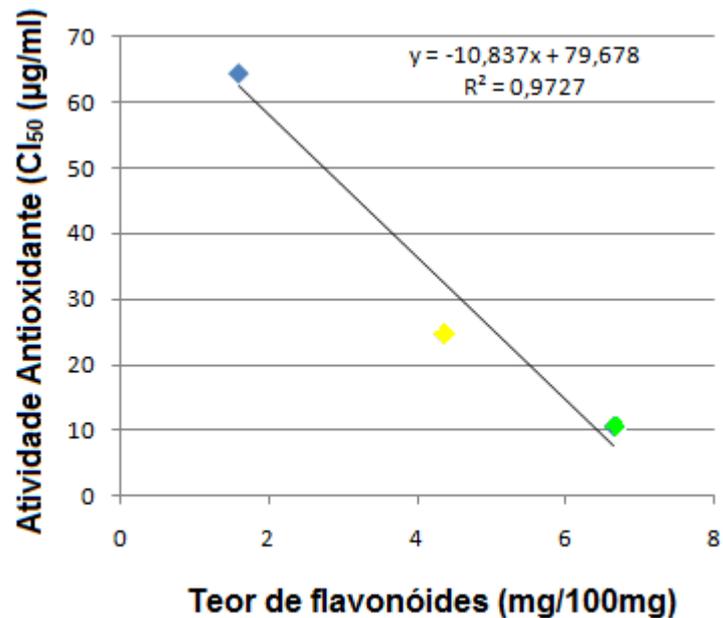


Figura 14 - Correlação entre Atividade Antioxidante e o teor de polifenóis dos extratos etanólicos de *Lippia sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*.
 Legenda: ◆ *Lippia sidoides*; ◆ *Synadenium grantii*; ◆ *Stachytarpheta gesnerioides*

4.3 Atividade cicatrizante

4.3.1 Análise macroscópica

Na análise macroscópica das úlceras dérmicas pode-se notar a presença de eritema nos quadrantes 1 e 2, correspondentes aos controles positivo e negativo, respectivamente até o fim do experimento (Figura 15 e 16).

Após o 4º dia, as amostras correspondentes ao quadrante 3 (coelhos de 1 a 6) (*Lippia sidoides*) (Figura 15) e ao quadrante 3 (*Synadenium grantii*) e 4 (*Stachytarpheta gesnerioides*) (coelhos de 7 a 12) (Figura 16) apresentaram diminuição do eritema e, após o 6º dia de experimento, apresentaram bordas cicatrizadas. Não havia secreção, escara e pus, indicando uma provável eficácia dos cremes contendo os extratos citados.

Todas as úlceras dérmicas foram medidas, no início do trabalho e no final, e após o 10º dia de experimento, ocorreu contração da área lesionada em todas. Não houve diferença estatisticamente significativa na contração da área da lesão entre os tratamentos e o controle positivo, como pode ser visto na (Tabela 3).

Tabela 3 – Avaliação da contração da área das lesões nos coelhos albinos submetidos aos tratamentos propostos.

TRATAMENTOS	N	CONTRAÇÃO DA ÁREA DA LESÃO (cm ²)*	REDUÇÃO DA ÁREA DA LESÃO (%)	VALORES DE P (#)
Controle positivo	12	2,3 ± 1,3	100	0,945 ^b
Controle negativo	12	1,8 ± 0,9	-12	0,945 ^a /
<i>Lippia sidoides</i>	6	2,9 ± 1,8	+28	0,966 ^a / 0,647 ^b
<i>Synadenium grantii</i>	6	1,2 ± 0,5	- 48	0,726 ^a /0,984 ^b
<i>Stachytarpheta gesnerioides</i>	6	1,9 ± 1,3	-17	0,994 ^a / 1,00 ^b

*Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. # Valores de P (ANOVA) resultantes da análise comparativa entre os controles positivo (a) e negativo (b) versus os tratamentos com cremes contendo extratos vegetais.

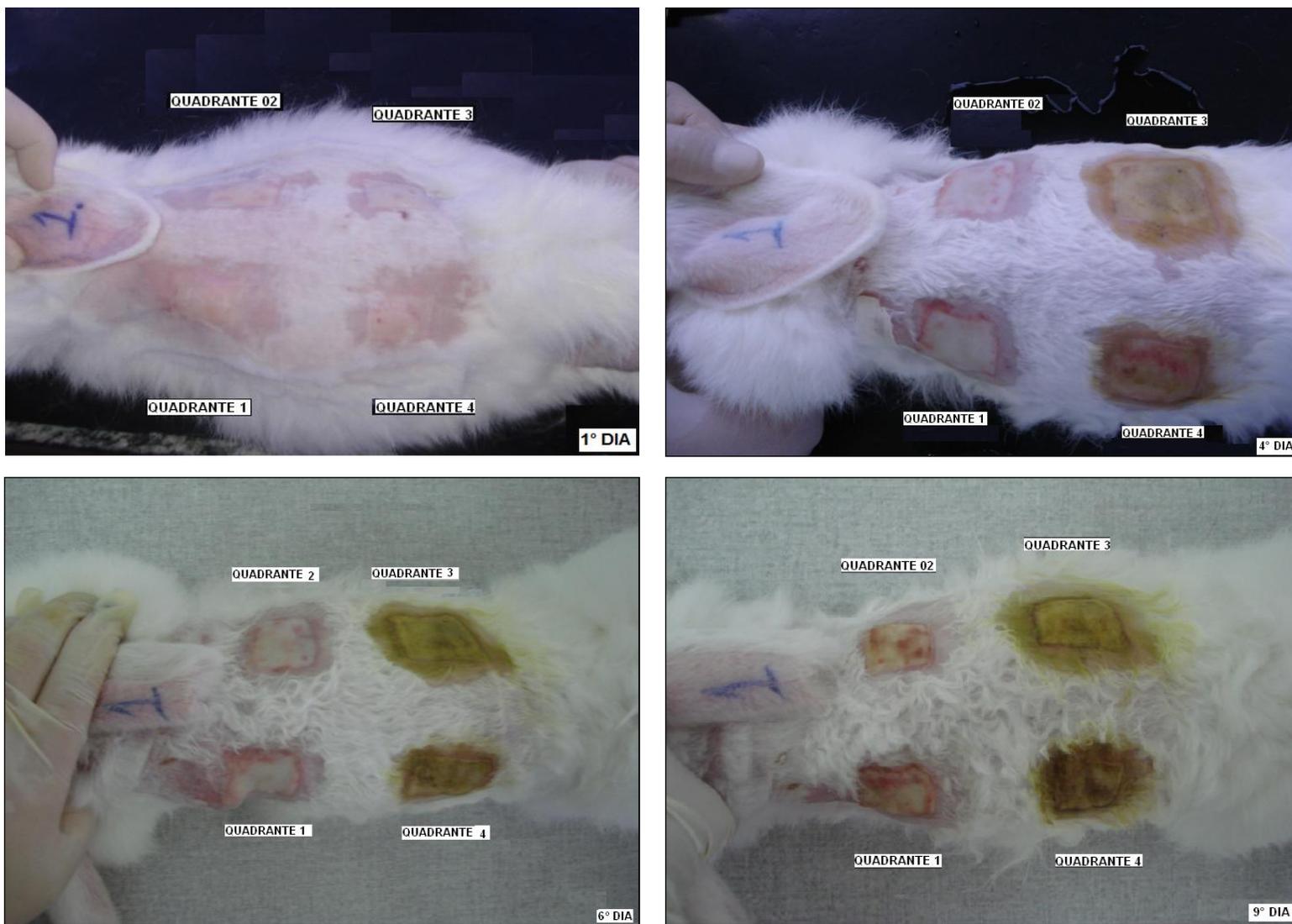


Figura 15 - Evolução macroscópica das lesões no coelho número 1 nos 1º, 4º, 6º e 9º dia do experimento.

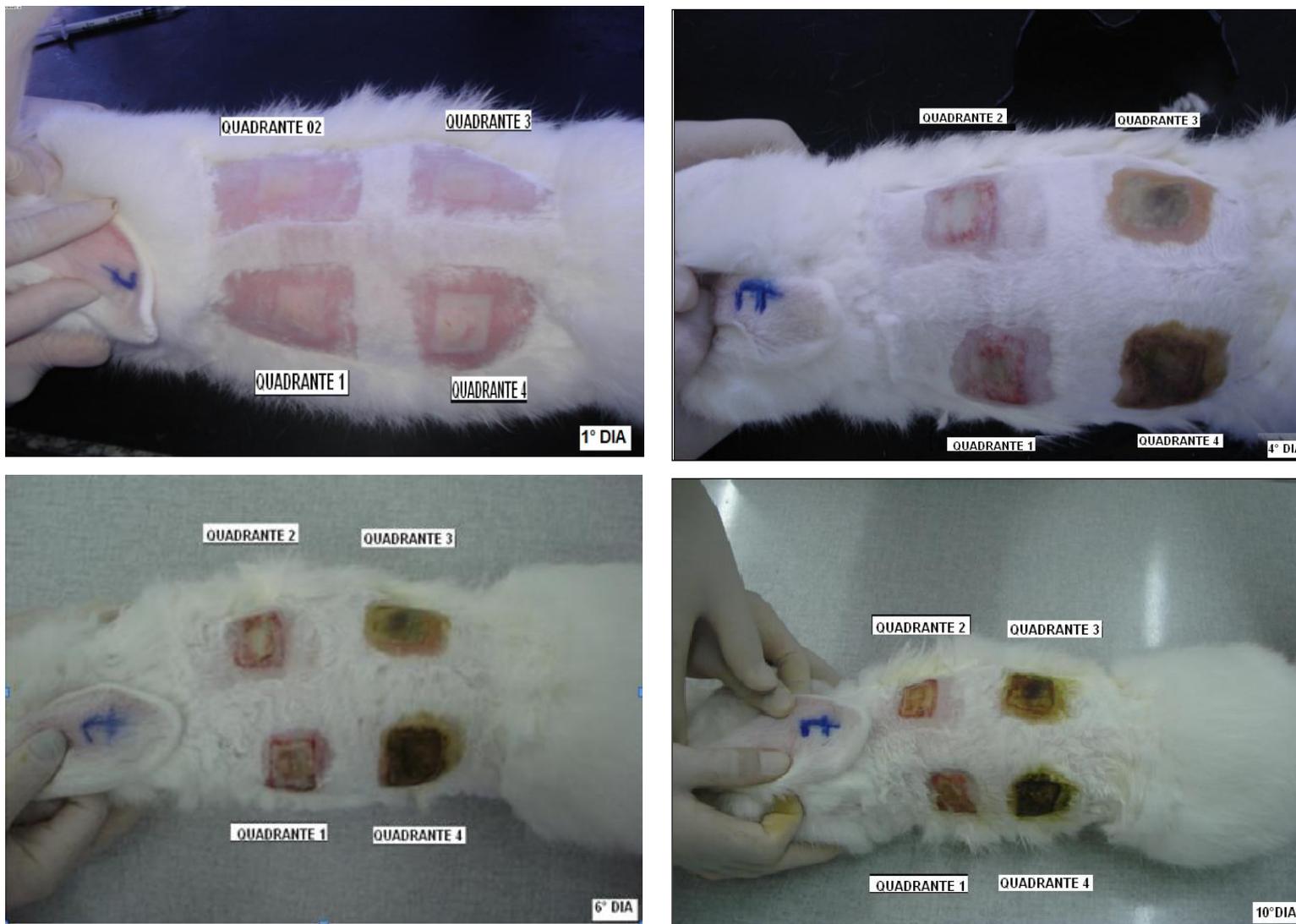


Figura 16 - Evolução macroscópica das lesões no coelho número 7 nos 1º, 4º, 6º e 10º dia do experimento.

4.3.2 Análise microscópica

4.3.2.1 Análise histomorfométrica

As avaliações histomorfométricas foram realizadas para a comparação quantitativa entre as células inflamatórias (leucócitos polimorfonucleares e mononucleares), número de fibroblastos, número de vasos sanguíneos (marcador de irrigação na ferida), área de colágeno e de matriz extracelular (falha na recomposição tecidual) entre os cremes contendo os tratamentos e os controles.

As Figuras 17 (A-E) representa os campos microscópios de amostra do tecido tratado com creme contendo 1% de sulfadiazina de prata (controle positivo) (A); creme lanette (controle negativo) (B); 10% de EE de *L. sidoides*(C); 10% de EE de *Synadenium grantii*(D); 10% de EE de *Stachytarpheta gesnerioides* (E).

A Figura 17 A representa os campos microscópicos de amostra do tecido tratado com o controle positivo, Sulfadiazina de Prata a 1%. Podemos observar um grande número de fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos, grande área de colágeno e pouca matriz extracelular.

A Figura 17 B representa os campos microscópicos de amostra do tecido tratado com o controle negativo, creme Lanette. Podemos observar um pequeno número de fibroblastos, muitas células inflamatórias, pequeno número de vasos sanguíneos, uma pequena quantidade de fibras colágenas e bastante matriz extracelular.

A Figura 17 C representa os campos microscópicos de amostra do tecido tratado com os cremes contendo os EE de *L. sidoides*. Podemos observar um grande número de fibroblastos, poucas células inflamatórias, grande número de vasos sanguíneos, grande área de colágeno e pouca matriz extracelular.

Todas estas características foram observadas em todos os coelhos do grupo tratados com o controle positivo.

A Figura 17 D representa os campos microscópicos de amostra do tecido tratado com os cremes contendo o EE de *Synadenium grantii*. Podemos observar

um grande número de fibroblastos, poucas células inflamatórias, pequeno número de vasos sanguíneos, grande área de colágeno e pequena área de matriz extracelular. Estas características foram observadas em todos os coelhos do grupo tratados com este extrato.

A Figura 17 E representa os campos microscópicos de amostra do tecido tratado com os cremes contendo os EE de *Stachytarpheta gesnerioides*. Podemos observar um grande número de fibroblastos, poucas células inflamatórias, pequeno número de vasos sanguíneos, grande área de colágeno e pequena área de matriz extracelular. Estas características foram observadas em todos os coelhos do grupo tratados com este extrato.

Na Figura 18 é possível observar que o número de células inflamatórias no controle positivo foi estatisticamente maior do que nos tratamentos com *L. sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides* ($p < 0,001$ em todos os tratamentos citados). O número de células inflamatórias no controle negativo foi estatisticamente maior do que todos os outros tratamentos ($p < 0,001$).

Na Figura 19 é possível observar que o número de fibroblastos no controle positivo foi estatisticamente maior do que no tratamento com *L. sidoides* ($p=0,002$) e similar nos tratamentos com *Synadenium grantii* ($p=0,127$) e *Stachytarpheta gesnerioides* ($p=0,097$). O número de fibroblastos no controle negativo foi estatisticamente menor do que todos os outros tratamentos ($p<0,05$).

Na Figura 20 é possível observar que o número de vasos sanguíneos no controle positivo foi estatisticamente maior do que os tratamentos com *Synadenium grantii* ($p<0,001$) e *Stachytarpheta gesnerioides* ($p=0,005$) e foi similar ao tratamento com *L. sidoides* ($p=0,890$). O número de vasos sanguíneos no controle negativo foi estatisticamente menor do que nos tratamentos com *Lippia sidoides* ($p=0,043$).

Na Figura 21 é possível observar que a porcentagem da área de colágeno no controle positivo foi estatisticamente similar ao tratamento com *L. sidoides* ($p=1,000$); *Synadenium grantii* ($p =0,845$) e *Stachytarpheta gesnerioides* ($p = 0,836$) e maior do que o controle negativo ($p<0,001$). A porcentagem área de colágeno no controle negativo foi estatisticamente menor do que todos os outros tratamentos ($p<0,001$ em todos).

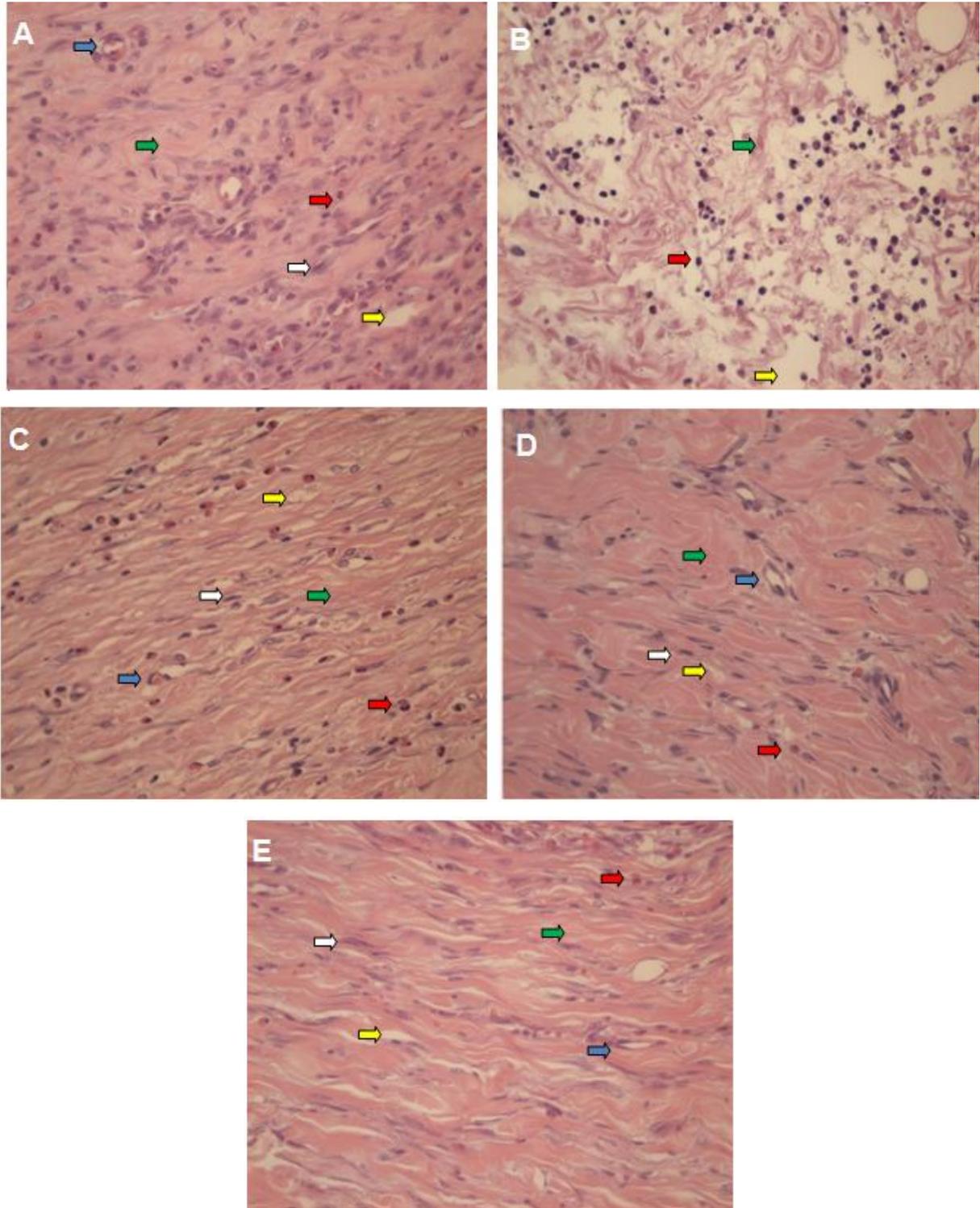


Figura 17 - Análise histomorfométrica das úlceras dérmicas tratadas com sulfadiazina de prata 1% (A); creme base Lanette (B); *Lippia sidoides* (C); *Synadenium grantii* (D) e *Stachytarpheta gesnerioides* (E). Tecido conjuntivo exibindo células inflamatórias (setas vermelhas); fibroblastos (setas brancas); vasos sanguíneos (setas azul), fibras de colágeno (setas verdes) e matriz extracelular (setas amarelas). Coloração por hematoxilina-eosina (HE), análise em microscópio óptico (aumento 400x).

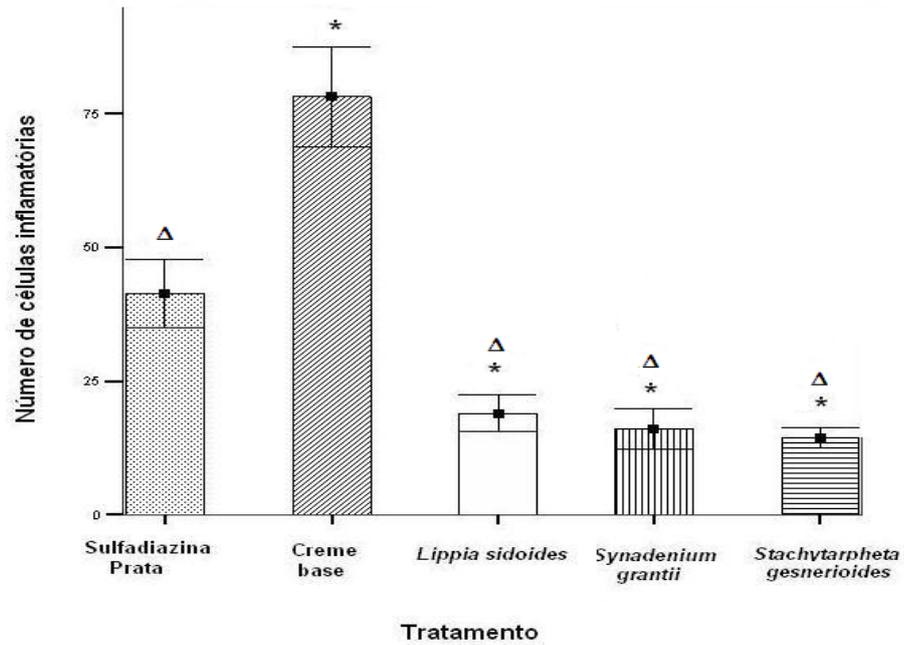


Figura 18 – Número de células inflamatórias das amostras de tecido oriundo das úlceras dérmicas dos animais. Tratamentos: sulfadiazina de prata (controle positivo), creme base ou Lanette (controle negativo), *Lippia sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ tratamentos versus controle positivo e Δ $p < 0,05$ tratamentos versus controle negativo (ANOVA, seguida de Tukey).

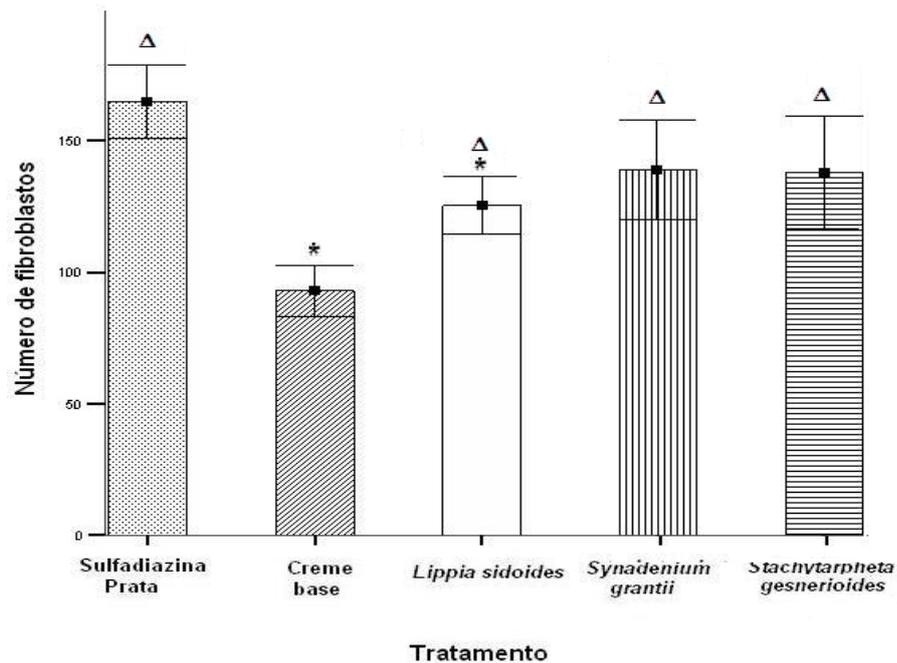


Figura 19 - Número de fibroblastos das amostras de tecido oriundo das úlceras dérmicas dos animais. Tratamentos: sulfadiazina de prata (controle positivo), creme base ou Lanette (controle negativo), *Lippia sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ tratamentos versus controle positivo e Δ $p < 0,05$ tratamentos versus controle negativo (ANOVA, seguida de Tukey).

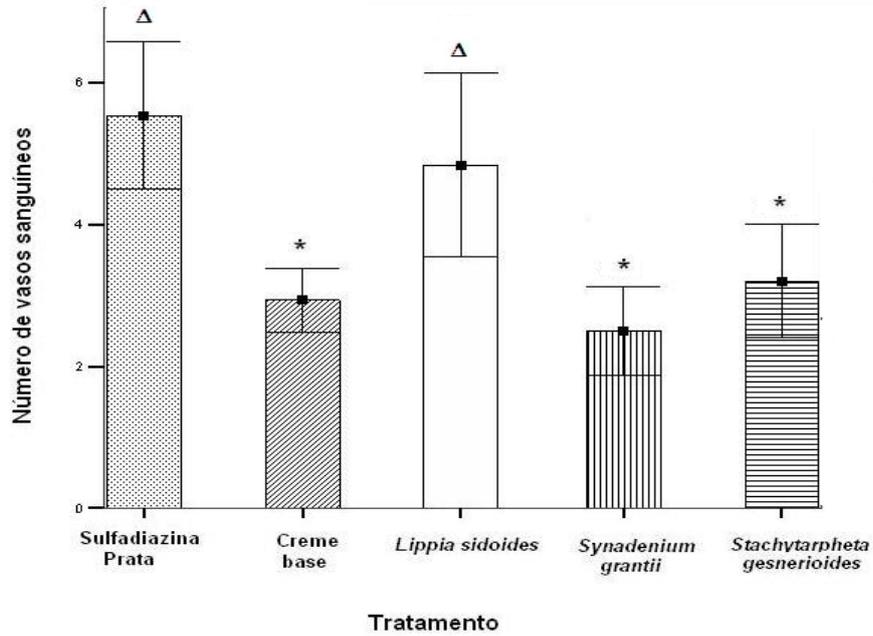


Figura 20 - Número de vasos sanguíneos das amostras de tecido oriundo das úlceras dérmicas dos animais. Tratamentos: sulfadiazina de prata (controle positivo), creme base ou Lanette (controle negativo), *Lippia sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ tratamentos versus controle positivo e $\Delta p < 0,05$ tratamentos versus controle negativo (ANOVA, seguida de Tukey).

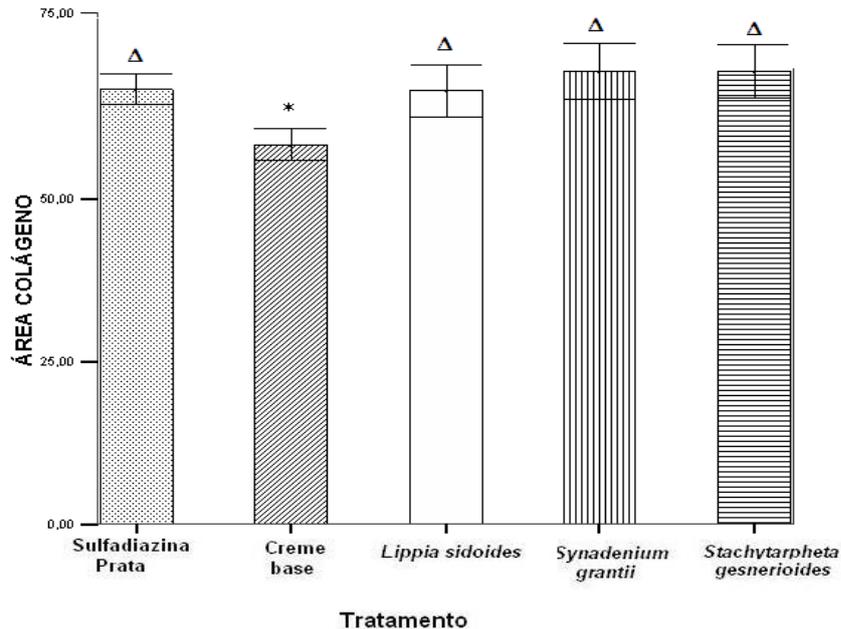


Figura 21 - Porcentagem de campo microscópico ocupada pela área de células contendo fibras de colágeno em amostras de tecido oriundo das úlceras dérmicas dos animais. Tratamentos: sulfadiazina de prata (controle positivo), creme base ou Lanette (controle negativo), *Lippia sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ tratamentos versus controle positivo e $\Delta p < 0,05$ tratamentos versus controle negativo (ANOVA, seguida de Tukey).

Na Figura 22 é possível observar que a porcentagem da área de matriz extracelular no controle positivo foi estatisticamente similar ao tratamento com *L. sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides* ($p = 1,00$ em todos). A porcentagem da área de matriz extracelular no controle negativo foi estatisticamente maior do que todos os outros tratamentos e no controle positivo ($p < 0,01$ em todos).

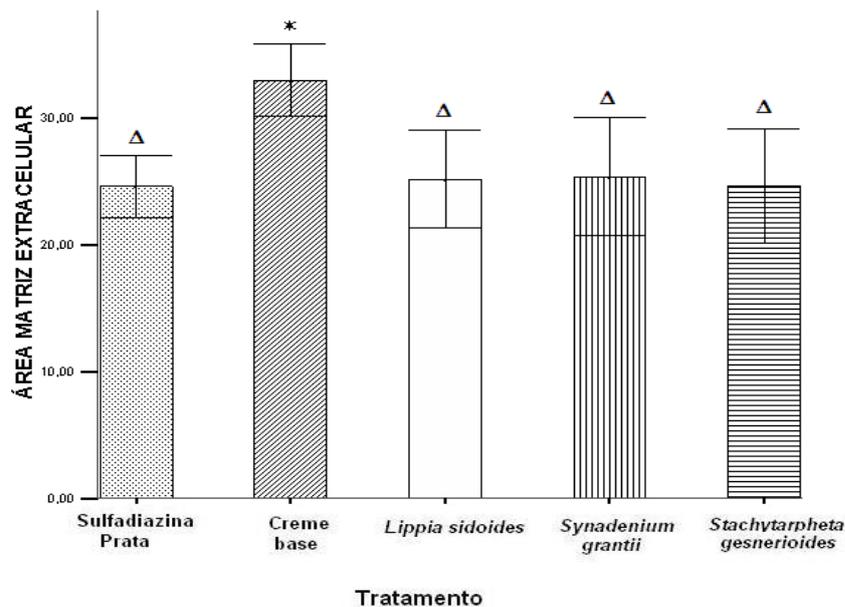


Figura 22 – Porcentagem de campo microscópico ocupada pela área de matriz extracelular em amostras de tecido oriundo das úlceras dérmicas dos animais. Tratamentos: sulfadiazina de prata (controle positivo), creme base ou Lanette (controle negativo), *Lippia sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ tratamentos *versus* controle positivo e $\Delta p > 0,05$ tratamentos *versus* controle negativo (ANOVA, seguida de Tukey).

4.3.2.2 Análise imunoistoquímica

A Figura 23 (A-E) representa os campos microscópicos da análise imunoistoquímica com anticorpo anti α -SMA de amostra do tecido tratado. O controle negativo (B) apresentou um número de miofibroblastos 27% maior que o controle positivo (A). Os tratamentos com *Lippia sidoides* (B) e *Stachytarpheta gesnerioides* (E) apresentaram o número de miofibroblastos 67% e 35% a mais que o controle

positivo, respectivamente. O tratamento com *Synadenium grantii* (D) apresentou o número de miofibroblastos 70% menor que o controle positivo.

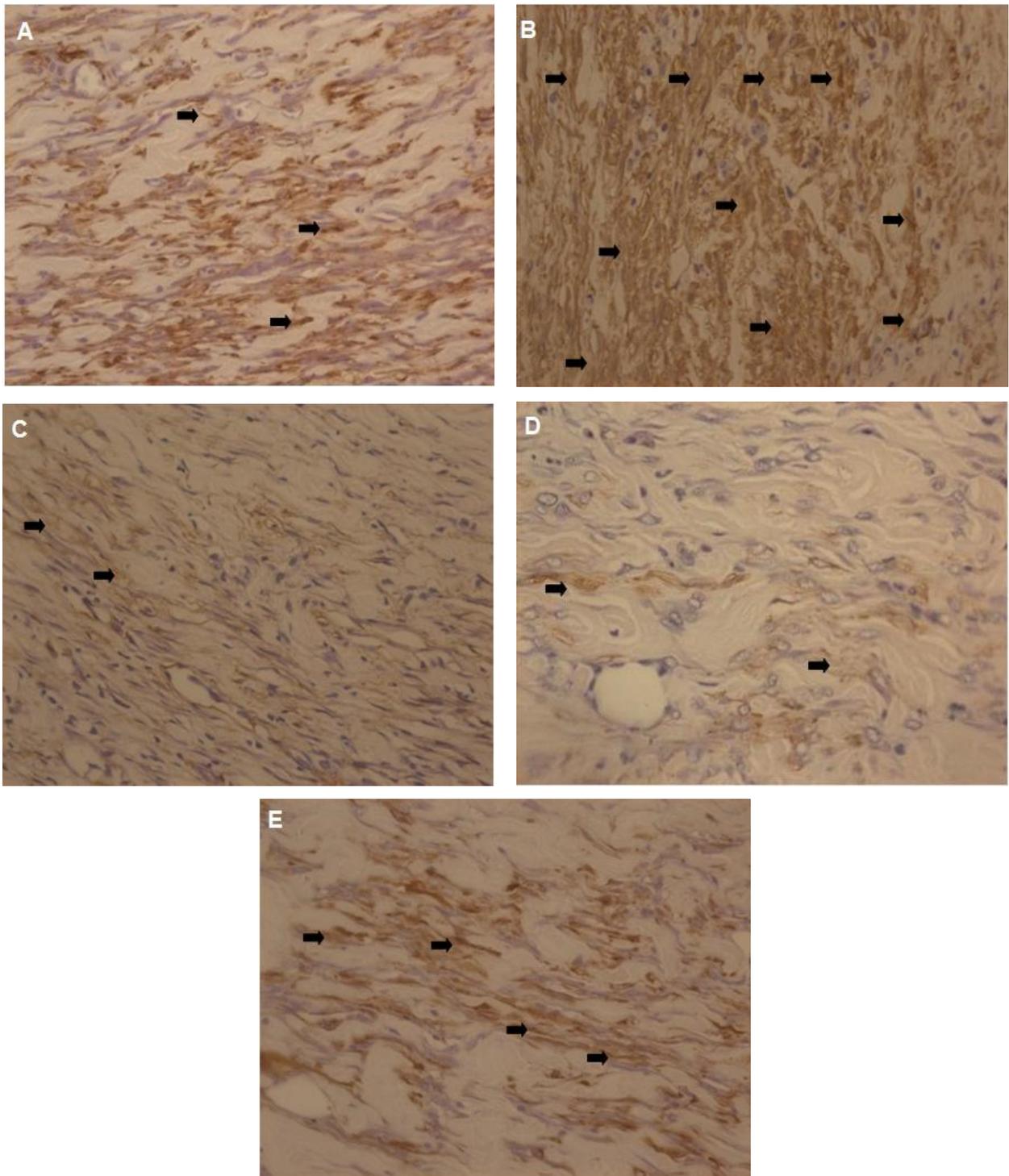


Figura 23 - Análise imunoistoquímica sob método tissue array com o anticorpo anti α -SMA da úlcera dérmica tratada com sulfadiazina de prata (controle positivo) (A); creme base Lanete (controle negativo) (B); *Lippia sidoides* (C); *Synadenium grantii* (D) e *Stachytarpheta gesnerioides*(E). Tecido conjuntivo exibindo miofibroblastos (setas pretas), análise em microscópio óptico (aumento 400x).

Na Figura 24 é possível observar que o número de miofibroblastos no controle positivo foi estatisticamente similar ao tratamento com *Lippia sidoides* ($p=0,621$); *Synadenium grantii* ($p = 0,583$) e *Stachytarpheta gesnerioides* ($p = 0,945$) e menor do que o controle negativo ($p = 0,001$). O número de miofibroblastos no controle negativo foi estatisticamente maior do que todos os outros tratamentos ($p<0,01$ em todos).

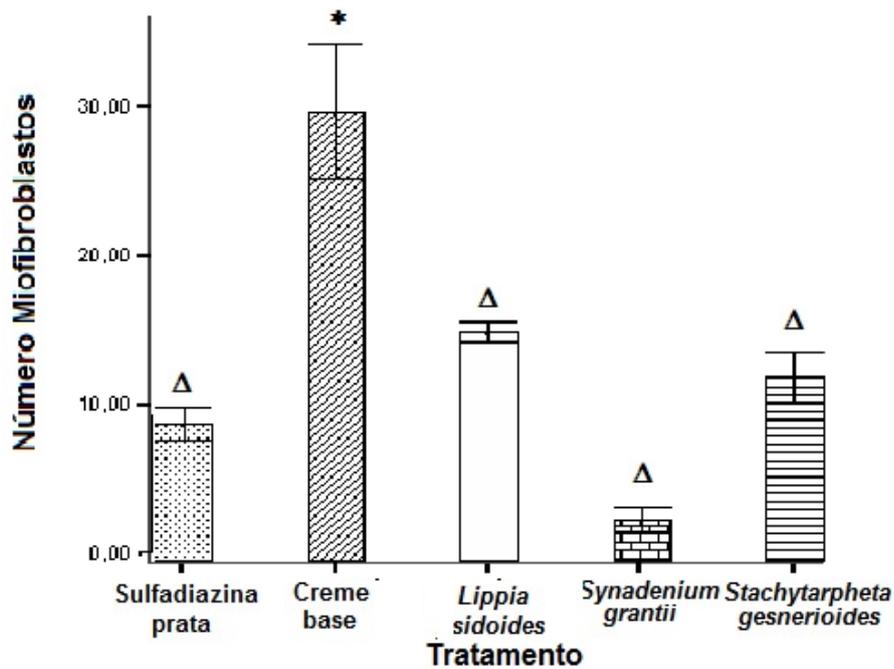


Figura 24 - Número de miofibroblastos das amostras de tecido oriundo das úlceras dérmicas dos animais. Tratamentos: sulfadiazina de prata (controle positivo), creme base ou Lanette (controle negativo), *Lippia sidoides*; *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*. Dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$ tratamentos versus controle positivo e $\Delta p < 0,05$ tratamentos versus controle negativo (ANOVA, seguida de Tukey).

5 DISCUSSÃO

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do planeta, aproximadamente 55 mil espécies de plantas superiores (MELO et al., 2007) onde o bioma cerrado, constitui uma das maiores floras vegetais, compondo um cenário de exuberante diversidade biológica e influente no arcabouço cultural das populações que nele vivem (VILA VERDE et al., 2003).

Recentemente, vários pesquisadores têm buscado nos recursos vegetais uma fonte de moléculas capazes de influenciar na evolução de cicatrização das feridas.

D'Acampora e colaboradores (2007) avaliaram os efeitos da administração intraperitoneal de quercetina (flavonóide) no processo cicatricial da pele em ratos *Wistar*, associados à incisão cirúrgica contaminada com inóculo bacteriano padrão. A administração de quercetina mostrou-se eficaz no processo de cicatrização cutâneo em ratos.

Gouthamchandra e colaboradores (2010) estudaram o potencial antioxidante de três extratos de folhas de *Clerodendrum infortunatum* e o potencial cicatrizante em feridas de ratos albinos. O estudo fitoquímico demonstrou que a planta é rica em compostos fenólicos e flavonóides atribuindo a estes metabólitos sua forte atividade antioxidante e a cicatrização de feridas.

Vasconcelos e colaboradores (2010) analisaram o efeito de taninos e flavonóides presentes nas folhas da planta *Mouriri pusa*, uma planta do cerrado brasileiro na prevenção e no processo de cicatrização de úlceras gástricas. Verificaram que estes metabólitos proporcionaram efeitos benéficos contra úlceras gástricas e com relativa segurança.

Suntar e colaboradores (2010) analisaram quatro diferentes extratos usando os solventes *n*-hexano; éter etílico, acetato de etila e metanol das folhas da espécie *Sambucus ebulus* L. para verificar a atividade cicatrizante *in vivo* através do isolamento de seu componente ativo. O flavonóide isolado da planta, quercetina 3-O-glucosídeo foi um dos princípios ativos relacionados à atividade cicatrizante de feridas.

Tais estudos científicos reforçam a relação da presença de flavonóides nas espécies vegetais e o efeito cicatrizante.

A presença de flavonóides na espécie *Lippia sidoides* ratifica os estudos de Figueiredo et al. (2009) e Botelho et al.(2007); na espécie *Synadenium grantii* ratifica os estudos de Moreira (2010) e na espécie *Stachytarpheta gesnerioides* ratifica os estudos de Moreira et al. (2008). O teor de flavonóides foi encontrado em maior proporção no EE de *Lippia sidoides*, seguido de *Stachytarpheta gesnerioides*; *Synadenium grantii*.

Apenas as espécies *Lippia sidoides* e *Stachytarpheta gesnerioides* apresentaram atividade antioxidante significativa, ratificando os estudos de Almeida et al. (2009) e Moreira et al. (2008), respectivamente. O EE de *Synadenium grantii* apresentou menor atividade antioxidante, sendo que nenhum estudo de atividade antioxidante empregando EE 100% das folhas de *Synadenium grantii* foi encontrado na literatura. No trabalho de Moreira (2010), onde o autor analisa extratos acetato de etila, hexânico e metanólico, foi demonstrada a atividade antioxidante satisfatória apenas nos extratos acetato de etila e metanólico.

Existe uma correlação negativa perfeita entre os teores de polifenóis e de flavonóides e foi demonstrada a correlação positiva entre os teores de polifenóis ou de flavonóides e a atividade antioxidante. Portanto, a atividade antioxidante dos EE *Lippia sidoides*, *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides* pode ser justificada pelos teores de polifenóis e flavonóides presentes nestas espécies.

Para verificar a atividade cicatrizante foram utilizados os seguintes tratamentos: cremes contendo 10% de EE de *Lippia sidoides*; 10% de EE de *Synadenium grantii* e 10% de EE de *Stachytarpheta gesnerioides*. Vale à pena ressaltar que não foi encontrado na literatura, até o momento, estudo de atividade cicatrizante relacionados às espécies vegetais estudadas, o que denota o caráter inovador desta pesquisa.

O modelo experimental utilizando coelhos é empregado para estudos sobre a pele; pesquisas imunológicas; choque; inflamação; colites (doença de *Crohn*); operações vasculares e transplantes (PETROIANU, 1996). O modelo foi utilizado por ser de boa visualização e estes animais são fáceis de trabalhar (SCHANAIDER,

SILVA, 2004). Neste procedimento experimental, o detalhamento da evolução das lesões pode ser acompanhado através de fichas, nas quais foram anotadas as principais características macroscópicas.

Como controle positivo foi utilizado creme contendo 1% de sulfadiazina de prata. Sulfadiazina de prata é descrita em vários estudos para o tratamento de queimaduras, com a finalidade de remover tecidos necrosados e combater infecção local (WARD, SAFLE, 1995; FRANCO, GONÇALVES, 2008; COELHO et. al., 2010). Baseado nestes dados e em estudos anteriores no nosso laboratório (SILVA, 2008; DUTRA et al., 2009), este tratamento foi determinado como controle positivo.

A sulfadiazina de prata 1% é um composto de nitrato de prata e sulfadiazina de sódio, efetivo contra uma ampla microbiota de Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella sp* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de incluir bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e fungos como a *Candida albicans* (WARD, SAFLE, 1995). É um dos agentes tópicos mais utilizados no tratamento de queimaduras, sendo recomendada em queimaduras de segundo e terceiro grau. É facilmente aplicada e removida, não provoca dor e apresenta poucos efeitos colaterais. Como um dos efeitos colaterais, tem sido relatado episódios de discreta leucopenia depois de poucos dias de uso, e de alergias em menos de 5% dos pacientes sem necessidade de interrupção do uso (WARD, SAFLE, 1995). Segundo Ferreira et al. (2003), na prática clínica, os pacientes têm relatado sensação de frescor após a aplicação desse creme. A aplicação de sulfadiazina de prata 1% segue a prescrição médica, que recomenda a sua utilização nos primeiros dias de tratamento da queimadura, enquanto há presença de tecido necrótico ou infecção. Esse agente tópico deve ser trocado duas vezes ao dia em razão da oxidação da prata. Entretanto, há dificuldades para atender a essa recomendação, quando é utilizada em curativos oclusivos, em função dos traumas físico e emocional que cada curativo provoca ao paciente e do alto custo dos recursos utilizados.

Como controle negativo foi utilizado o creme Lanette, uma cera emulsionante aniônica. De acordo com o fornecedor, é uma cera largamente utilizada nas farmácias de manipulação com grande aceitação pelos médicos e consumidores finais, pois confere emoliência e suavidade à pele.

Todos os tratamentos com os cremes contendo os EE e os grupos controle apresentaram redução na área da lesão, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles, tanto quando comparamos controle positivo *versus* tratamentos e controle negativo *versus* tratamentos.

O controle negativo agiu de forma inesperada ao reduzir a área da lesão de forma similar aos outros tratamentos, porém isso pode ser justificado pela ação hidratante que possui. Silva (2008) analisou a atividade cicatrizante de *Centella asiatica in vivo* utilizando creme Lanette como controle negativo. O controle negativo apresentou um baixo número de células inflamatórias e este fato foi justificado por sua ação hidratante e por acreditar que seu sistema umectante possa proporcionar um mecanismo mais ativo para hidratar o estrato córneo, aliviando a irritação da pele.

Na análise histopatológica e histomorfométrica foram analisadas características que influenciam na cicatrização como o número de células inflamatórias, de fibroblastos e de vasos sanguíneos, além da área de colágeno e matriz extracelular. Todos os tratamentos tiveram um número de células inflamatórias menores do que o controle negativo, sendo este resultado condizente, pois este creme não possui atividade terapêutica aparente. Os tratamentos com *Lippia sidoides*, *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides* apresentaram número de células inflamatórias menores comparadas ao controle positivo, 54%, 61% e 65%, respectivamente. Estes resultados demonstram o potencial antiinflamatório destas espécies, ratificando os dados da literatura consultada (SCHAPOVAL et al., 1997; JAGER et al., 2004; DUTRA et al., 2005; VASCONCELOS, 2008). Os resultados demonstram também que foram mais efetivos no combate a inflamação quando comparados com o controle positivo. Estes dados também ratificam os resultados encontrados no doseamento de flavonóides onde as espécies *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides* apresentaram maior teor em relação às outras, ratificando também a ligação de flavonóides no processo inflamatório.

Um produto com atividade cicatrizante deve acelerar a migração e proliferação de fibroblastos. Todos os tratamentos apresentaram maior número de

fibroblastos em relação ao controle negativo, sendo este resultado condizente, pois este creme não possui atividade terapêutica aparente. O tratamento com *Lippia sidoides* apresentou número de fibroblastos em torno de 24% menor do que o controle positivo. Os tratamentos com *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides*, que foram similares ao controle positivo, apresentaram número de fibroblastos 15% e 16% menores quando comparados ao controle positivo, respectivamente. Foi observado também que o tratamento com *Stachytarpheta gesnerioides* foi estatisticamente similar ao tratamento com *Synadenium grantii* e *Lippia sidoides* na produção de fibroblastos.

Todos os tratamentos apresentaram maior número de vasos sanguíneos em relação ao controle negativo, sendo este resultado condizente, pois este creme não possui atividade terapêutica aparente. O tratamento com *Lippia sidoides* foi similar ao controle positivo e apresentou número de vasos sanguíneos em torno de 22% menores do que este. Os tratamentos com *Synadenium grantii* e *Stachytarpheta gesnerioides* que foram diferentes do controle positivo apresentaram número de vasos sanguíneos 55% e 42% menores quando comparados a ele, respectivamente.

Segundo Carvalho (2002) a fase fibroblástica de cicatrização é aquela na qual a matriz extracelular é substituída por fibras de colágeno. Todos os tratamentos apresentaram uma maior área de colágeno em relação ao controle negativo. Todos os tratamentos foram similares ao controle positivo. Todos os tratamentos apresentaram área de matriz extracelular menor que o controle negativo e similar ao controle positivo.

Na análise imunoistoquímica foi observado que não houve relação entre a presença efetiva dos miofibroblastos da lesão e a contração macroscópica da ferida, porém, todos os tratamentos apresentaram um número de miofibroblastos menores que o controle negativo. Este fato demonstra que os miofibroblastos não são os únicos fatores relacionados à redução da ferida, também pode ocorrer uma maior área de colágeno e gerar uma maior compactação do colágeno da matriz extracelular. Estes achados ratificam o estudo de Trindade et al. (2010), no qual verificaram que o uso tópico do metronidazol apresentou ação direta sobre os fibroblastos, impedindo a expressão inicial da α -SMA, menor número de miofibroblastos inicialmente e maior número de fibroblastos.

Embora não tenha ocorrido diferença estatisticamente significativa na contração, as análises histopatológica, histomorfométrica e imunoistoquímica evidenciaram as diferenças entre o tratamentos e o controle negativo.

6 CONCLUSÃO

O teor de flavonóides foi encontrado em maior proporção no EE de *Lippia sidoides*, seguido de *Stachytarpheta gesnerioides* e *Synadenium grantii*.

A atividade antioxidante foi maior no EE de *Lippia sidoides*, seguido de *Stachytarpheta gesnerioides* e *Synadenium grantii*.

Existe uma correlação positiva entre os teores de polifenóis e de flavonóides, no entanto e foi demonstrada a correlação entre os teores de polifenóis ou de flavonóides e a atividade antioxidante

A análise conjunta dos resultados destas espécies avaliadas indicou que o extrato etanólico de *Lippia sidoides* foi o mais eficiente na cicatrização de úlceras dérmicas.

Os resultados inéditos de atividade cicatrizante apresentados neste trabalho demonstraram a potencialidade farmacológica de *Lippia sidoides* e sugere a condução de novos estudos científicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGOKE, G.O.; KUMAR, M.N.; GOPALAKRISHNA, A.G.; VARDARAJ, M.C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. 1998. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of Food Sciences and Technology**, **35**: 283-298.

ALLEN JR., L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. São Paulo: Artmed, 2007.

ALMEIDA, M.C.S.; ALVES, L.A.; MACHADO, L.L.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T.L.G. Flavonóides das folhas de *Lippia sidoides* e atividade antioxidante. **32º Reunião anual da sociedade brasileira de química**, Fortaleza, 2009.

AMARO, M.S.; FILHO, S.M.; GUIMARÃES, R.M.; TEÓFILO, E.M. 2006. Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de janaguba. (*Himatanthusdrasticus* (MART.) PLUMEL. – APOCYNACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**, **28(1)**: 63-71.

BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL POZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, **102**: 32-36.

BERNACCHIO, R.M.G. 2007. **Quantificação de miofibroblastos em tecido cutâneo de ratos submetidos à incisão cirúrgica com lasers de CO2 e diodo, bisturi elétrico e convencional**. Dissertação de mestrado profissional em Laers em Odontologia – IPEN. 66p

BLANES, L. **Tratamento de feridas. Cirurgia vascular: Guia ilustrado**. São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://www.bapbaptista.com>>. Acesso em: 23 fev. 2010.

BOTELHO, M.A.; NOGUEIRA, N.A.P.; BASTOS, G.M.; FONSECA, S.G.C.; LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V.S.; BRITO, G.A.C. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **40**: 349-356

BRANDON, K.; FONSECA, G.A.B; RYLANDS, A.B.; SILVA, J.M.C. 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade**, **1(1)**: 1-13.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Portaria nº6 de 31 de janeiro de 1995. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Diretora Colegiada nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. Aprova o regulamento técnico sobre registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução Diretora Colegiada nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Revoga a RDC nº 17, de 24/02/2000. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, 18 de março de 2004, Brasília, 2002.

CARVALHO, P.T. C. 2002. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através da espectrofotometria: Estudo experimental em ratos diabéticos**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 72 p.

CAVALCANTI, .S.C.; NICULAU, E.S.; BLANK, A.F.; CÂMARA, C.A.; ARAÚJO. I.N; ALVES, P.B. 2010. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, **101**:829–832

CHIFUNDERA, K. 2001. Contribution to the inventory of medicinal plants from the Bushi area, South Kivu Province, Democratic Republic of Congo. **Fitoterapia**, **72**: 351-368.

CHRISTEN, Y. 2000. Oxidative stress and Alzheimer's disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, **71(2)**: 621S-629S.

COELHO, J.M.; ANTONIOLLI, A.B.; SILVA, D.N.; CARVALHO, T.M.M.B; PONTES, R.J.C.; ODASHIRO, A.N. 2010. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, **37(1)**: 45-51.

COSTA, S.M.O.; LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; ASSUNÇÃO, J.C.C.; FILHO, R.B. 2002. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **12**: 66-67.

D'ACAMPORA, A.J.; TRAMONTE, R.; BURGER, D.; BURGER, P.J. 2007. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, **36(1)**: 69-75

DAMASCENO, A.A.; BARBOSA, A.A.A. 2007. **Levantamento etnobotânico de plantas do bioma cerrado na comunidade de Martinésia**. Uberlândia, 2007. Disponível em:<
<http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/viewFile/4140/3087>>. Acesso em: 20 fev. 2010

DAYANAND, C.D.; MURTHY, N.K. 2010. Evidence of Fibrinolytic Protease in the Latex of *Synadenium Grantii* Hook 'f'. **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, **6 (4)**: 645–655.

DUTRA, R.C.; LEITE, M.N.; BARBOSA, N.R. 2008. Quantification of Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of *Pterodon emarginatus* Vogel Seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, **9**: 606-614.

DUTRA, R.C.; PITELLA, F.; FERREIRA, A.S.; LARCHER, P.; FARIAS, R.E.; BARBOSA, N.R. 2009. Efeito cicatrizante das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em modelos de úlceras dérmicas experimentais em coelhos. **Latin American Journal of Pharmacy**, **28(3)**: 375-382

EVANS J.D., GHANEH P., KAWESHA A., NEOPTOLEMOS J.P. 1997. Role of matrix metalloproteases in pancreatic câncer. **Digestion** **58 (6)**: 520-528.

FEITOSA, J.G.R.; ALVES, P.B.; CARDOSO, G.C.; RIBEIRO, A.O.; SANTOS, R.B.; BLANK, A.F. Avaliação antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia sidoides* realizada pelo método de difusão em placa. **28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Poços de Caldas/MG, 2005.

FERREIRA, E.; LUCAS, R.; ROSSI, A.L.; ANDRADE, D. 2003. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. **Revista da Escola de Enfermagem da USP** **37(1)**: 44-51.

FIGUEIREDO, L.S.; BONFIM, F.P.G; FERRAZ, E.O; CASTRO, C.E.; SOUZA, M. F.; MARTINS, E. R. 2009. Influência do ácido indolbutírico no enraizamento de alecrim-

pimenta (*Lippia sidoides*) em leite com umidade controlada. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, 11(1): 33-36.**

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature, 408: 239-247.**

FOWLER, M.W. 2006. Plants, medicines and man. **Journal of the Science of Food and Agriculture, 86: 1797-1804.**

FRANCO, D.; GONÇALVES, L.F. 2008. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, 35(3): 203-206.**

GALVANI, R.F.; BARRENECHE, M.L. 1994. Levantamento das espécies vegetais utilizadas em medicina popular no município de Uruguaiana (RS). **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, 1(1): 1-14.**

GIMENO, E.; FITO, M.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M.; CASTELLOTE, A.I.; COVAS, M.; FARRE, M.; DE LA TORRE-BORONAT, M.C.; LOPEZ- SABATER, M.C. 2002. Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. **European Journal of Clinical Nutrition, 56: 114-120.**

GOHJI, K.; FUJIMOTO, N.; OKHAWA, J.; FUJII, A.; NAKAJIMA, M. 1998. Imbalance between serum matrix metalloprotease-2 and its inhibitor as predictor of the recurrence of urothelial cancer. **Cancer 77 (4): 650-655.**

GOUTHAMCHANDRA, K.; MAHMOOD, R.; MANJUNATHA, H. 2010. Free radical scavenging, antioxidant enzymes and wound healing activities of leaves extracts from *Clerodendrum infortunatum* L. **Environmental toxicology and Pharmacology, 30: 11-18.**

HARBORNE, B. J.; WILLIAMS, A. C. 2000. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry, 55: 481-504.**

HEIM, E.K.; TAGLIAFERRO, R.A.; BOBILYA, J.D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry, 13(1): 572-584.**

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. 1987. Hydroxyl radical scavenger activity of flavonoids. **Phytochemistry**, **26**: 2489-2497.

IBGE, 2004. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/7a12/conhecer_brasil/default.php?id_tema_menu=1&id_tema_submenu=12→ Acesso em 23/02/10.

IBGE, 2010. Reserva Ecológica do IBGE: ambiente e plantas vasculares. **Estudos e Pesquisas Informação Geográfica n. 3**, Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <<ftp://geoftp.ibge.gov.br/documentos/recursosnaturais/levantamento/reserva.pdf>>. Acesso em 18/02/2010.

IBGE, 2010

http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1703 acesso em 22/03/2011

IDU, M.; OMOGBAI, E.K.I.; AGHIMIEN, G.E.; AMAECHINA, F.; TIMOTHY, O.; OMONIGHO, S.E. 2007. Preliminary Phytochemistry, Antimicrobial Properties and Acute Toxicity of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl. Leaves. **Trends in Medical Research 2 (4)**: 193-198.

JAGER, K.A., HUTCHINGS, A., STADEN, V.J. 1996. Screening of Zulu medicinal plants for prostaglandin-synthesis inhibitors. **Journal of Ethnopharmacology**, **52**: 95-100.

JAYAPRAKASHA, F. K.; RAO, J.L. 2000. Phenolics constituents from lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.). Hale and their antioxidant activity. **Zeitschrift für Naturforschung**, **55**: 1018-1022.

JUNIOR, A.M.R.; OLIVEIRA, R.G.; FARIAS, R.E.; ANDRADE, L.C.F.; AARESTRUP, F.M. 2006. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiro Dermatologia**, **81(2)**: 150-6.

JUNIOR, R.J.O.; MENEZES, C.S.R.; LACERDA, E.P.S. Avaliação da atividade antitumoral do látex bruto de *Synadenium grantii* Hook 'f': DL₅₀ e tratamento in vivo via oral. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC**, Fortaleza, 2005.

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

LEITE, J.P.V. **Estudo fitoquímico de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. e variação sazonal e intra-específica de polifenóis em populações nativas**. Tese de Doutorado do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2002.

LYNN K.R.; CLEVETTE-RADFORD N.A. 1988. Proteases of Euphorbiaceae, **Phytochemistry** **27 (1)**: 45-50.

MACHADO, A.A. 2008. **Caracterização fitoquímica e avaliação da citotoxicidade de *Synadenium carinatum* BOISS(EUPHORBIACEAE)**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, v.1, 78p.

MACHADO, R.B.; NETO, M.B.R.; PEREIRA, P.G.P.; CALDAS, E.; GONÇALVES, D.A.; SANTOS, N.S.; TABOR, K.; STEININGER, M. S. 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. **Conservação Internacional, Brasília, DF**. Disponível em: <<http://www.conservation.org.br/arquivos/RelatDesmatamCerrado.pdf>> Acesso em 21/02/2010.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; JÚNIOR, V.F.V.; GRYNBERG, N.F.; ESCHEVARRIA, A. 2002. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, **25(3)**: 429-438.

MANDELBAUM, S.H.; SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M. H. S. 2003. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais brasileiro de Dermatologia** **78 (4)**: 393-410.

MARRUGAT J. COVAS, M.I.; FITÓ, M.; SCHRODER, H.; MIRÓ-CASAS, E.; GIMENO, E.; LÓPEZ-SABATER, M.C.; DE LA TORRE, R.; FARRE, M. 2004. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation - a randomized controlled trial. **European Journal of Nutrition**, **43**: 140-147.

MASELLA, R.; GIOVANNINI, C.; VARI, R.; DI BENEDETTO, R.; CONI, E.; VOLPE, R.; FRAONE, N.; BUCCI, A. 2001. Effects of dietary virgin olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients. **Lipids**, **36**: 1195-1202.

MELO, J.G.; MARTINS, J.D.G.R.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P. 2007. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botânica Brasileira**, **21**: 27-36.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA, M. C.; REZENDE, FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. 2004. **Flora vascular do bioma Cerrado. ("Vascular flora of Cerrado biome")**. Disponível em: < <ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursosnaturais/levantamento/floravascular.pdf> >. Acesso em 20/02/2010.

MENON, M.; VITHAYATHIL, S.M.R.; RAMADOSS, C.S. 2002. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f'. **Plant Science**, **163**: 131-139.

MOREIRA, A.P. 2010. **Triagem fitoquímica e atividades biológicas de extratos obtidos das folhas de *Synadenium grantii* Hook.**. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel, 46 p.

MOREIRA, A.P.; SUZUKI, E.Y.; BARBOSA, N.R.; VICCINI, L.F. Triagem fitoquímica, determinação de polifenóis totais, flavonóides e atividade antioxidante de *Stachytarpheta gesnerioides* Cham. **II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul e na VI Reunião da Sociedade Latino-Americana de Fitoquímica**, Belo Horizonte/MG, 2008.

MOREIRA, A.P.; SUZUKI, E.Y.; CALIL, N. O. FEDOCE, A. G.; BARBOSA, N.R.; VICCINI, L.F. Atividade antibacteriana do extrato de *Stachytarpheta gesnerioides* Cham. frente a linhagens bacterianas gram-negativas. **XXIII Reunião Anual da FeSBE**, São Paulo, 2008.

MOREIRA, J S ; ALMEIDA, R G ; TAVARES, L S ; SANTOS, M O ; VICCINI, LF ; VASCONCELOS, I M ; OLIVEIRA, J T A ; RAPOSO, N. R.B. ; FRANCO, O L. 2011. Identification of botryticidal proteins with similarity to nbs-lrr proteins in rosemary pepper (*Lippia sidoides* Cham.) flowers. **The Protein Journal**, **v. 30** : 32-38.

MOURA, L.A.S. 2004. **Desenvolvimento de modelo experimental para estudo do processo de cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas em coelhos, utilizando extratos de própolis verde de Minas Gerais – Brasil.** Dissertação de mestrado da Universidade Federal de Viçosa – Medicina Veterinária, 62 p.

MUTOH, M.; TAKAHASHI, M.; KOMATSU, H.; ENYA, T.; MATSUSHIMA-HIBIYA, Y.; MUTOH, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. 2000 Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. **Japanese Journal of Cancer Research**, **91**: 686-691.

NETO, P.A.S.; CAETANO, L.C. **Plantas medicinais do popular ao científico.** Alagoas: Editora UFAL, 2005.

NICHOLSON, M.J., 2008. **Euphorbia pseudograntii Bruyns.** Prota 11(1): Medicinal plants / Plantes médicinales 1 Record display. Disponível em : <http://database.prota.org/PROTAhtml/Euphorbia%20pseudograntii_En.htm> Acesso em 20/02/10.

NUNES, R.S.; LIRA, A.A.M.; LACERDA, C.M.; SILVA, D.A.B.; SILVA, J.A.; SANTANA, D.P. 2006. Obtenção e avaliação clínica de dentifrícios à base do extrato hidroalcoólico da *Lippia sidoides* Cham (*Verbenaceae*) sobre o biofilme dentário. **Revista de Odontologia da UNESP**, **35(4)**: 275-283.

NUNES, R.S.; LIRA, A.A.M.; XIMENES, E.; SILVA, J.A.; SANTANA, D.P. 2005. Padronização da matéria-prima vegetal e determinação da atividade antimicrobiana do extrato bruto da *Lippia sidoides* Cham (*Verbenaceae*) frente ao *Streptococcus mutans*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, **86(2)**: 80-83.

OKOYE, T.C.; AKAH, P.A.; OKOLI, C.O.; EZIKE, A.C.; MBAOJI, F.N. 2010. Antimicrobial and antispasmodic activity of leaf extract and fractions of *Stachytarpheta cayennensis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**:189-192.

OMS. **WHO Medicines strategy countries at the core 2004-2007.** Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_EDM_2004.5.pdf> Acesso em 20/03/10.

PASA, M.C.; SOARES, J.J.; NETO, G.G. 2005. Estudo etnobotânico na comunidade de Conceição-Açu (alto da bacia do rio Aricá Açu, MT, Brasil). **Acta botânica brasileira**. **19(2)**: 195-207.

PENIDO, C.; COSTA, K.A.; FUTURO, D.O.; PAIVA, S.R.; KAPLAN, M.A.; FIGUEIREDO, M.R.; HENRIQUES, M.G. 2006. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich) Vahl. **Journal of Ethnopharmacology**, **104**: 225–233.

PETROIANU, A. 1996. Aspectos éticos na pesquisa em animais. **Acta Cirúrgica Brasileira**, **11**: 157-164.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, **25(1)**: 45-61.

RASO, G. M.; MELI, R.; DI CARLO, G.; PACILIO, M.; DI CARLO, R. 2001. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sciences**, **68**: 921–931.

ROQUINI, P.; COSTA, M.C.M. Avaliação de extratos de *Lippia sidoides* CHAM.(VERBENACEAE) em diferentes microorganismos patogênicos. **IV Seminário de Iniciação Científica do Unilavras**, Lavras/MG, 2009

RUNDHAUG, J.E. 2005. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, **v.9, nº2**: 267-285.

SAMPAIO, C.P.P.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; TRINDADE, L.C.T.; FARIAS, R.E.; PIERIN, R.J.; MARTINS, R.C. 2009. Alterações inflamatórias provocadas pelo metronidazol em feridas: estudo experimental em ratos. **Jornal Vascular Brasileiro**, **v.8; nº3**: 232-237.

SANTANA, L.D.;PREZA, C.L.D.; ASSIS, A.J.G.; GUEDES,S.L.M. 2008. Plantas com propriedades terapêuticas utilizadas na comunidade de Campos, Amélia Rodrigues, Bahia, Brasil. **Revista Magistra**, **20(3)**: 218-230.

SANTOS, J.S.; MELO J.I.M.; ABREU, M.C.; SALES, M.F. 2009. Verbenaceae sensu stricto na região de Xingó: Alagoas e Sergipe, Brasil. **Rodriguésia** **60 (4)**: 985-998.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P.C. 2004. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cirúrgica Brasileira**, **19(4)**: 441-447.

SCHAPOVAL, E.E.S.; VARGAS, M.R.W.; CHAVES, C.G.; BRIDI, R.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T. 1998. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. **Journal of Ethnopharmacology**: 53-59.

SILVA, F.P. 2008. **Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de *Centella asiática* (L.) Urban**. Dissertação de mestrado em ciências biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, 150 p.

SILVA, A.R. 2009. **Efeitos de extratos vegetais com potencial antioxidante em fibroblastos submetidos à radiação UV**. Dissertação de mestrado em ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, 104 p.

SILVEIRA, L.M.S.; ROSAS, L.S.; OLEA, R.S.G.; GONÇALVES, E.C.; JÚNIOR, D.C.F. 2007. Atividade antibacteriana de extrato de gervão frente a cepas de *Staphylococcus aureus* oxacilina-sensíveis e oxacilina-resistentes isoladas de amostras biológicas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. **39(4)**: 299-301.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. rev. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC, 2007.

SOSA, I.H.; FERRADÁ, C.A.R.; LÓPEZ, I.M.L. 2003. Momento óptimo de cosecha em verbena cimarrona, *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**: 1

SOUZA, G.A.; SILVA, G.E.; ANDRADE, R.L.; DEOLINA, J. 2005. Isolation and Partial Characterization of a D-Galactose-Binding Lectin from the Latex of *Synadenium carinatum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, **48(5)**: 705-716.

SOUZA, V. M. **Ativos Dermatológicos**. 2.ed. São Paulo : Tecnopress, 2004.

SUNTAR, I.P.; AKKOL, E.K.; YALÇIN, F.N.; KOCA, U.; KELES, H.; YESILADA, E. 2010. Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. **Journal Ethnopharmacology**, **129**: 106–114

SUSUZI, E.Y.; MOREIRA, A.P.; BARBOSA, N. R.; VICCINI, L.F. Avaliação in vitro da atividade antioxidante de *Stachytarpheta gesnerioides* Cham. **XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Águas de Lindóia/São Paulo, 2008.

TABUTI, J.R.S.; LYE, K.A.; DHILLION, S.S. 2003. Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. **Journal of Ethnopharmacology**, **88**: 19-44.

TERRA, N.L.; DORNELLES, B. **Envelhecimento bem-sucedido**. 2. ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

TRINDADE, L.C.T.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; SAMPAIO, C.P.P.; FARIAS, R.E.; PIERIN, R.J.; NETTO, M.C. 2010. Avaliação do uso tópico do metronidazol no processo de cicatrização de feridas: um estudo experimental. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, **37(5)**: 358-363.

VASCONCELOS, P.C.P.; ANDREO, M.A.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A.; PELLIZZON, C.H. 2010. Effect of Mouriri pusa tannins and flavonoids on prevention and treatment against experimental gastric ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**: 1-8.

VELA, S.M.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LAPA, A.J. 2004. Pharmacological study of *Stachytarpheta cayennensis* Vahl in rodents. **Phytomedicine**, **11**: 616-624.

VILA VERDE, G.M.; PAULA, J.R.; CARNEIRO, D.M. 2003. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista brasileira de farmacognosia**, **13**: 64-66.

WARD R.S.; SAFLE, J.R. 1995. Topical agents in burn and wound care. **Physical Therapy**, **75(6)**: 526-538.

WETTASINGHE, M.; BOLLING, B.; PLHAK, L.; PARKIN, K. 2002. Screening for Phase II Enzyme inducing and Antioxidant Activities of Common Vegetables. **Journal of Food Science**, **67(7)**: 2583-2588.

ZIMMERMAN, L.M.; VEITH, I. 1961. **Great ideas in the history of surgery**. San Francisco, California: Norman Publishing, 1993. Disponível em:

http://books.google.com.br/books?id=ABbCI7z4UwMC&printsec=frontcover&dq=Great+ideas+in+the+history&hl=ptBR&ei=AHBVTJDLClmsuAf9icnGBA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CDEQ6AEwAQ#v=onepage&q&f=false Acesso em 10/01/2010.

ANEXO A – PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Ensaio para avaliação da atividade terapêutica de _____
em queimaduras de pele de coelho - DATA: _____

Amostras:

Controle negativo:

Controle positivo:

Coelho nº:

Sexo:

Peso inicial:

Data de início do ensaio:

Horário:

Anestésico local:

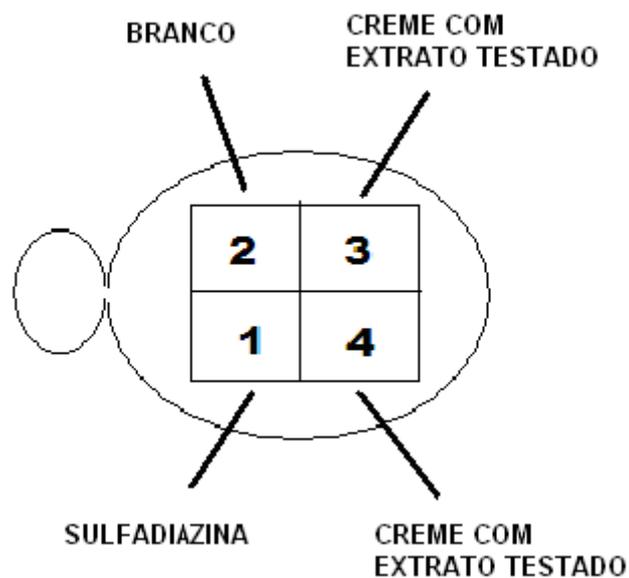
Analgésico:

Observação:

1º Dia - Data: _____

Queimadura

Com barra de ferro (5 cm²) colocado em banho de água fervente por 1 minuto. Tempo de contato da pele com a barra: 10 segundos.



Observação após a queimadura:

2º Dia – Data: _____

Peso:

Observação das queimaduras:

Procedimento de aplicação das amostras na área da queimadura;

As amostras devem ser aplicadas de manhã e à tarde.

Retirar o animal da gaiola. Colocar na bancada. Com a espátula de madeira esterilizada, retirar uma pequena quantidade da amostra e delicadamente espalhar uniformemente sobre toda a área da queimadura. Sobre cada área colocar gaze esterilizada cortada em quadrados, depois com uma faixa de bandagem não oclusiva esterilizada enrolar todo o animal para prender a gaze no local. Colocar duas faixas de bandagem, suficiente para cobrir as áreas de queimadura. Retornar o animal à gaiola. Na segunda aplicação, retirar a bandagem e a gaze com uma tesoura, efetuar a limpeza com soro fisiológico, passar novamente as amostras, repetindo o procedimento de colocação de gaze e bandagem.

Horário Manhã:

Horário Tarde:

3º Dia – 10º Dia - Data: _____

Peso: _____ Kg

Estado de irritação e agitação do animal: Ausente Presente

Observação das queimaduras:

Ferida aberta	<input type="checkbox"/> Área 1	<input type="checkbox"/> Área 2	<input type="checkbox"/> Área 3	<input type="checkbox"/> Área 4
Área avermelhada	<input type="checkbox"/> Área 1	<input type="checkbox"/> Área 2	<input type="checkbox"/> Área 3	<input type="checkbox"/> Área 4
Área esbranquiçada	<input type="checkbox"/> Área 1	<input type="checkbox"/> Área 2	<input type="checkbox"/> Área 3	<input type="checkbox"/> Área 4
Presença de secreção	<input type="checkbox"/> Área 1	<input type="checkbox"/> Área 2	<input type="checkbox"/> Área 3	<input type="checkbox"/> Área 4
Presença de escara	<input type="checkbox"/> Área 1	<input type="checkbox"/> Área 2	<input type="checkbox"/> Área 3	<input type="checkbox"/> Área 4
Presença de edema	<input type="checkbox"/> Área 1	<input type="checkbox"/> Área 2	<input type="checkbox"/> Área 3	<input type="checkbox"/> Área 4
Presença de pus	<input type="checkbox"/> Área 1	<input type="checkbox"/> Área 2	<input type="checkbox"/> Área 3	<input type="checkbox"/> Área 4
Presença de sangramento	<input type="checkbox"/> Área 1	<input type="checkbox"/> Área 2	<input type="checkbox"/> Área 3	<input type="checkbox"/> Área 4
Hematoma	<input type="checkbox"/> Área 1	<input type="checkbox"/> Área 2	<input type="checkbox"/> Área 3	<input type="checkbox"/> Área 4

Tamanho da ferida:

Área 1:

Menor que o dia anterior Maior que o dia anterior Sem alteração

Área 2:

Menor que o dia anterior Maior que o dia anterior Sem alteração

Área 3:

Menor que o dia anterior Maior que o dia anterior Sem alteração

Área 4:

Menor que o dia anterior Maior que o dia anterior Sem alteração

Completa secagem da ferida: Área 1 Área 2 Área 3 Área 4

Outras observações:

Horário de aplicação das amostras:

Manhã: _____ horas

Tarde: _____ horas

ANEXO B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

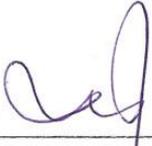
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 045/2010 – CEEA sobre “EFEITO CICATRIZANTE DE CREMES CONTENDO EXTRATOS DE *Lippia sidoides*”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO E MARCOS ANTÔNIO FERNANDES BRANDÃO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 19/11/2010.

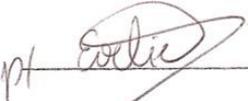
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 045/2010 - CEEA about “HEALING EFFECTS OF CREAMS CONTAINING EXTRACTS OF *Lippia sidoides*” – NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO AND MARCOS ANTÔNIO FERNANDES BRANDÃO - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 19/11/2010.

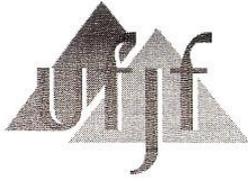
Juiz de Fora, 19 de novembro de 2010.



Presidente/CEEA



Secretário/CEEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
 Comissão de Ética na Experimentação Animal

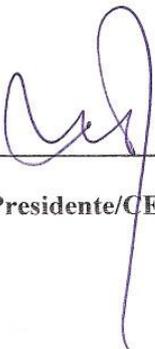
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 044/2010 – CEEA sobre “EFEITO CICATRIZANTE DE CREMES CONTENDO EXTRATOS DE *Stachytarpheta gesnerioides*”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO E MARCOS ANTÔNIO FERNANDES BRANDÃO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 19/11/2010.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 044/2010 - CEEA about “HEALING EFFECTS OF CREAMS CONTAINING EXTRACTS OF *Stachytarpheta gesnerioides*” – NÁDIA REZENDE BARBOSA RAPOSO AND MARCOS ANTÔNIO FERNANDES BRANDÃO - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 19/11/2010.

Juiz de Fora, 19 de novembro de 2010.



 Presidente/CEEA


 PI _____
 Secretário/CEEA