

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MILENE MACHADO MINATELI

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DE *Vernonia polyanthes* LESS (ASTERACEAE)**

JUIZ DE FORA
2015

MILENE MACHADO MINATELI

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO E ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DE *Vernonia polyanthes* LESS (ASTERACEAE)**

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como Requisito Parcial a Obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Orientador: Dr. Orlando Vieira de Sousa

Coorientador: Dr. Marcelo Silva Silvério

JUIZ DE FORA

2015

Minateli, Milene Machado.

Investigação do potencial toxicológico e atividades farmacológicas de *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae) / Milene Machado Minateli. -- 2015.

173 p. : il.

Orientador: Orlando Vieira de Sousa

Coorientador: Marcelo Silva Silvério

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.

1. *Vernonia polyanthes*. 2. Toxicidade de Drogas. 3. Cicatrização de Feridas. 4. Estabilidade de Medicamentos. 5. Dermatologia. I. Sousa, Orlando Vieira de, orient. II. Silvério, Marcelo Silva, coorient. III. Título.

Título da Dissertação:

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL TOXICOLÓGICO E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE
Vernonia polyanthes LESS (ASTERACEAE)

Nome do aluno:

Milene Machado Minateli

ORIENTADOR (A):

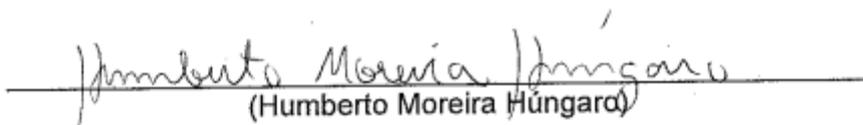
Orlando Vieira de Sousa

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 13/07/2015



(Rômulo Augusto de Abreu Franchini)



(Humberto Moreira Húngaro)



(Orlando Vieira de Sousa)

Ao meu grande e eterno amor, meu esposo,
Rafael Oliveira Santos.

Aos meus pais, Marilene Machado Minateli e
Dézio de Souza Minateli, que sempre
estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pela proteção diária e por ter me direcionado ao crescimento pessoal e profissional, colocando em meu caminho uma grande experiência de vida e proporcionando a realização de um sonho. Obrigada Senhor!

Ao meu orientador Dr. Orlando Vieira de Sousa, pela oportunidade e por ter me incentivado durante toda a trajetória percorrida, me mostrando sempre o melhor caminho a seguir, oferecendo oportunos conselhos e acrescentando conhecimentos valiosos. Agradeço também pela confiança e paciência. Obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Silva Silvério, pela disponibilidade de sempre, empenho, dedicação e incentivo desde o ingresso no Mestrado, contribuindo para a superação deste desafio. Obrigada!

Ao meu esposo Rafael, que sempre esteve ao meu lado, incentivando meu crescimento e torcendo pelo meu sucesso. Obrigada por toda a paciência e amor, tornando mais fáceis os obstáculos interpostos no caminho e por fazer meus dias mais felizes. Te Amo!

Aos meus pais, Dézio e Marilene, por toda a oportunidade oferecida em prol da minha educação, sempre acreditando em mim e confiando na minha evolução. Obrigada por todo carinho, orações e incentivo!

Aos meus irmãos, Michel e Marcelle, que sempre acreditaram que eu pudesse alcançar objetivos cada vez maiores e por momentos de descontração e torcida.

Aos meus sogros Luzia e Heleno, e à Fran e ao Alessandro, por torcerem por mim, acreditando no meu potencial, sempre com uma palavra carinhosa e de incentivo. E à Isadora, por alegrar nossos encontros, simplesmente ao dizer “tia Mimi”!

Às verdadeiras amigas realizadas no Mestrado, Elisa Gomes Lanna, Rafael Pimentel Pinheiro e Fabrini Luiz Alves Almeida. Agradeço por toda a ajuda, reflexões, indecisões e momentos incríveis de alegrias, que fizeram com que a jornada se tornasse mais leve e

divertida. Torço muito por todos vocês e que permaneçamos unidos e em constante aprendizado.

Aos parceiros do laboratório, William Lucas Ferreira da Silva, Pedro Henrique Santos de Freitas, Jean Jackson, Pâmela Xavier e, em especial à Bruna Celeida Silva Santos, por todo o comprometimento, apoio nas atividades realizadas e troca de experiências que foram valiosos durante estes anos.

À Prof. Dra. Célia Hitoni Yamamoto, pelas sugestões, orientações e disponibilização de espaço e equipamentos, que contribuíram para o aperfeiçoamento do trabalho.

Aos técnicos administrativos em educação do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, Jésus de Paula Sarmiento e Éder Luis Tostes, por toda ajuda na realização de tarefas fundamentais.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa da coordenadora Prof. Dra. Maria Silvana Alves, por toda a paciência, solicitude, compreensão e por sempre está disponível a nos atender.

Aos colaboradores do Laboratório de Genética e Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas, em especial à Aryane Campos Reis, pela atenção dispensada e abertura do espaço para que as análises fossem realizadas, proporcionando o engrandecimento do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) através do projeto CDS - APQ-01805-12 no Edital FAPEMIG nº 01/2012 – Demanda Universal.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito curta para ser insignificante.”

Charlie Chaplin

RESUMO

Vernonia polyanthes Less, família Asteraceae, popularmente conhecida no Brasil como assa-peixe, tem sido utilizada no tratamento de afecções do aparelho respiratório, problemas renais e gastrointestinais, feridas, fraturas e torções, contusões e luxações e, ainda, indicada como tônica, emenagoga, diurética e cicatrizante. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial toxicológico e as atividades anti-inflamatória tópica e cicatrizante e desenvolver um creme dermatológico a partir do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes* Less. Folhas secas e pulverizadas foram submetidas à extração em etanol PA por maceração estática seguida de rotaevaporação para obtenção do extrato etanólico de *V. polyanthes* (EEVP). Parâmetros bioquímicos, hematológicos, morfológicos e histopatológicos foram determinados em ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento por via oral com 100, 200 e 400 mg/kg de EEVP. O creme dermatológico do extrato etanólico de *V. polyanthes* (cEEVP) foi desenvolvido nas concentrações 0,10, 0,25 e 0,50% seguido de estudo de estabilidade. A atividade anti-inflamatória tópica de cEEVP foi avaliada pelos métodos de edema de orelha induzido por óleo de cróton, fenol e ácido araquidônico, enquanto EEVP e cEEVP foram usados no ensaio da atividade cicatrizante através de induções de lesões cutâneas. Análises histopatológicas e avaliação da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-Acetil- β -D-glicorominidase (NAG) complementaram os ensaios farmacológicos. Na avaliação da toxicidade, EEVP não alterou os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos, mas promoveu modificações nos níveis lipídicos e enzimas hepáticas nos grupos tratados com EEVP. O cEEVP apresentou conformidades adequadas no estudo de estabilidade e juntamente com o EEVP demonstrou efeitos anti-inflamatório tópico e cicatrizante. Os resultados poderão contribuir com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos através da difusão do conhecimento e da comprovação científica das aplicações terapêuticas de *V. polyanthes*.

Palavras-chave: *Vernonia polyanthes*. Toxicidade de Drogas. Produtos Farmacêuticos. Estabilidade de Medicamentos. Dermatologia. Cicatrização de Feridas.

ABSTRACT

Vernonia polyanthes Less, Asteraceae family, popularly known in Brazil as *assa-peixe*, has been used to treat diseases of the respiratory tract, kidney and gastrointestinal problems, wounds, fractures and sprains, bruises and dislocations, and also indicated as tonic, emmenagogue, diuretic and healing. The aim of this work was to investigate the toxicological potential and topical anti-inflammatory and healing activities and develop a dermatological cream from the ethanol extract of *V. polyanthes* leaves. Dried and powdered leaves were extracted in ethanol PA by static maceration for obtaining dry ethanol extract (EEVP) using a rotaevaporator. Parameters Biochemical, hematologic, morphological and histopathological were determined in Wistar rats after 15 and 30 days of treatment orally with 100, 200 and 400 mg/kg EEVP. Dermatological cream of EEVP (cEEVP) was developed at the concentrations of 0.10, 0.25 and 0.50% and evaluated through stability study. The topical anti-inflammatory activity of cEEVP was assessed by ear edema induced by croton oil, phenol and arachidonic acid, while the wound healing activity was performed by cutaneous lesions test using EEVP and cEEVP. Histopathological analysis and evaluation of the myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- β -D-glicorominidase (NAG) activities were also determined. In the evaluation of toxicity, EEVP did not modify the biochemical, hematological and histopathological parameters, but promoted alterations in lipid and liver enzymes levels. The cEEVP showed adequate conformities in the stability study and together with the EEVP demonstrated topical anti-inflammatory and wound healing effects. The results may contribute to the National Policy of Medical Plants and Herbal through the dissemination of knowledge and scientific evidence of the therapeutic applications of *V. polyanthes*.

Keywords: *Vernonia polyanthes*. Drug related side effects. Pharmaceutical preparations. Drug stability. Dermatology. Wound healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		P.
Gráfico 1	Comportamento de fluidos quanto ao cisalhamento.....	11
Figura 1	Esquema simplificado de um corte transversal da pele.....	15
Figura 2	Esquema simplificado das camadas da epiderme.....	16
Figura 3	Representação esquemática do corte transversal da pele.....	17
Figura 4	Extravasamento de leucócitos na pele.....	19
Figura 5	Representação esquemática das três imunidades adquiridas.....	21
Gráfico 2	Fases da cicatrização correlacionadas com a especificidade imune celular....	26
Figura 6	Eventos da fase inflamatória.....	28
Figura 7	Eventos da fase proliferativa.....	30
Figura 8	Eventos da fase de remodelagem.....	31
Figura 9	Lâmina foliar, observando a organização do mesófilo e tricoma secretor do tipo capitado na epiderme abaxial.....	38
Figura 10	Morfologia externa de <i>Vernonia polyanthes</i> Less.....	39
Figura 11	Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Vernonia polyanthes</i>	40
Quadro 1	Fase oleosa do creme lanette.....	45
Quadro 2	Fase aquosa do creme lanette.....	45
Quadro 3	Esquema dos grupos submetidos à atividade cicatrizante.....	52
Gráfico 3	Valores séricos de colesterol total de ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.....	62
Gráfico 4	Valores séricos de triglicerídeos de ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.....	63
Gráfico 5	Valores séricos de LDL-c de ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.....	63
Gráfico 6	Valores séricos de HDL-c de ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.....	64
Gráfico 7	Valores séricos de AST de ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.....	65
Gráfico 8	Valores séricos de ALT de ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.....	65

Gráfico 9	Valores séricos de fosfatase alcalina de ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.....	66
Figura 12	Cortes representativos de diferentes órgãos de ratos Wistar após 30 dias de tratamento com 400 mg/kg de EEVP.....	67
Figura 13	Formulações submetidas ao teste de estabilidade preliminar.....	71
Figura 14	Formulações submetidas ao teste de centrifugação.....	72
Figura 15	Características organolépticas das formulações submetidas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).....	73
Figura 16	Características organolépticas das formulações submetidas à alta temperatura ($40 \pm 2^\circ\text{C}$).....	74
Figura 17	Características organolépticas das formulações submetidas à baixa temperatura ($-5 \pm 2^\circ\text{C}$).....	75
Gráfico 10	Curva de viscosidade de 100 a 1000 s^{-1} a 30°C em intervalos de tempo.....	77
Gráfico 11	Análises da consistência e comportamento das formulações.....	78
Figura 18	Crescimento bacteriano das formulações.....	79
Figura 19	Crescimento fúngico das formulações.....	81
Gráfico 12	Efeito do cEEVP sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton	83
Gráfico 13	Efeito do cEEVP sobre o edema de orelha induzido por fenol.....	84
Gráfico 14	Efeito do cEEVP sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico..	85
Figura 20	Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação de óleo de cróton após tratamento com cEEVP.....	86
Figura 21	Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação de óleo de cróton após tratamento com cEEVP mostrando vasodilatação e infiltração de leucócitos.....	87
Gráfico 15	Efeito do cEEVP sobre a atividade da MPO em fragmentos de orelhas de camundongos.....	89
Gráfico 16	Efeito do cEEVP sobre a atividade da NAG em fragmentos de orelhas de camundongos.....	90
Quadro 4	Efeito do EEVP durante sete dias sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar.....	92
Quadro 5	Efeito do EEVP durante 14 dias sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar.....	92

Quadro 6	Efeito do cEEVP durante sete dias sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar.....	93
Quadro 7	Efeito do cEEVP durante 14 dias sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar.....	94
Figura 22	Fotomicrografia do tecido cicatrizado de ratos Wistar após sete e 14 dias de tratamento com EEVP.....	97
Figura 23	Fotomicrografia do tecido cicatrizado de ratos Wistar após sete e 14 dias de tratamento com cEEVP.....	99
Gráfico 17	Efeito do EEVP e cEEVP sobre a atividade de MPO de tecido cicatrizado de ratos Wistar após sete dias de tratamento.....	101
Gráfico 18	Efeito do EEVP e cEEVP sobre a atividade de MPO de tecido cicatrizado de ratos Wistar após 14 dias de tratamento.....	102
Gráfico 19	Efeito do EEVP e cEEVP sobre a atividade de NAG de tecido cicatrizado de ratos após sete dias de tratamento.....	103
Gráfico 20	Efeito do EEVP e cEEVP sobre a atividade de NAG de tecido cicatrizado de ratos após 14 dias de tratamento.....	103

LISTA DE TABELAS

		P.
Tabela 1	Principais tipos celulares e mediadores envolvidos na cicatrização.....	27
Tabela 2	Valores médios da massa corporal e do consumo de água e ração de ratos tratados com EEVP durante 15 e 30 dias.....	56
Tabela 3	Massa dos órgãos de ratos após 15 dias de tratamento com EEVP.....	57
Tabela 4	Massa dos órgãos de ratos após 30 dias de tratamento com EEVP.....	57
Tabela 5	Parâmetros hematológicos em ratos Wistar após 15 dias de tratamento com EEVP.....	58
Tabela 6	Parâmetros hematológicos em ratos Wistar após 30 dias de tratamento com EEVP.....	59
Tabela 7	Parâmetros bioquímicos em ratos Wistar após 15 dias de tratamento com EEVP.....	60
Tabela 8	Parâmetros bioquímicos em ratos Wistar após 30 dias de tratamento com EEVP.....	61
Tabela 9	Características do creme lanette e preparações contendo 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP submetidos a temperaturas alternadas de $50 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e $-10 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$	70
Tabela 10	Características organolépticas no teste de estabilidade acelerada das formulações em estudo submetidas à temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).....	73
Tabela 11	Características organolépticas no teste de estabilidade acelerada das formulações em estudo submetidas à alta temperatura ($40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).....	74
Tabela 12	Características organolépticas no teste de estabilidade acelerada das formulações em estudo submetidas à baixa temperatura ($-5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).....	75
Tabela 13	Valores de pH das formulações submetidas à temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).....	76
Tabela 14	Valores de pH das formulações submetidas à estufa ($40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).....	76
Tabela 15	Valores de pH das formulações submetidas ao freezer ($-5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).....	76
Tabela 16	Contagem bacteriana (UFC/g) das formulações de cEEVP.....	79
Tabela 17	Contagem fúngica (UFC/g) das formulações de cEEVP.....	81
Tabela 18	Efeito do cEEVP sobre o tamanho do edema de orelha induzido por óleo de cróton nos cortes histológicos analisados através do programa Imagepro-plus® ..	88
Tabela 19	Média da massa corporal e do consumo de água e ração durante 15 e 14 dias de tratamento com EEVP.....	90

Tabela 20	Média da massa corporal e do consumo de água e ração durante sete e 14 dias de tratamento com cEEVP.....	91
Tabela 21	Efeito do EEVP sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar durante sete dias de tratamento.....	95
Tabela 22	Efeito do cEEVP sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar durante sete dias de tratamento.....	95
Tabela 23	Efeito do EEVP sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar durante 14 dias de tratamento.....	96
Tabela 24	Efeito do cEEVP sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar durante 14 dias de tratamento.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
AA	Ácido Araquidônico
AIE	Anti-Inflamatório Esteroidal
AINE	Anti-Inflamatório Não-Esteroidal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
ALT	Alanina Aminotransferase
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
AST	Aspartato Aminotransferase
BPC	Boas Práticas de Colheita
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CD	Célula dendrítica
CEEA	Conselho de Ética em Experimentação Animal
CEME	Central de Medicamentos
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CK	Creatinoquinase
CL	Célula de Langerhans
CLA	Antígeno Cutâneo de Linfócito
COX	Cicloxigenases
CTAP III	Tecido conectivo quimiocina peptídeo III ativado
Cyr	Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazila
EDTA	Ácido Etilenodiamino-Tetra-Ácético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio

EPP	Etilfenilpropiolato de Etila
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
Gama GT	Gama Glutamil-transferase
GC	Grau de Contração
HB-EGF	Heparina de Ligação ao EGF
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HGF	Fator de Crescimento dos Hepatócitos
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HLE	<i>Human Leukocyte Elastase</i>
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase
HTBA	Hexadeciltrimetilamônio
IP-10	Proteína induzida por interferon 10
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
LDH	Lactato Desidrogenase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LN	Linfonodo
LOX	Lipoxigenase
LPL	Lipase Lipoproteica
LST	Lactona Sesquiterpênica
LT	Leucotrienos
MA	Macrófago
MAPK	Proteína Cinase Ativadora de Mitógeno
MCP	Proteínas Quimioatraentes para Monócito
MIP	Proteína Inflamatória para Macrófagos
MPO	Mieloperoxidase
MSP	Proteína Estimuladora de Macrófagos
NAG	N-acetil- β -d-glucosaminidase
NF- κ β	Fator de Transcrição Nuclear <i>Kappa Beta</i>

NT	Neutrófilo
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de Ativação de Plaquetas
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGs	Prostaglandinas
Ph	Potencial Hidrogeniônico
PIB	Produto Interno Bruto
PK	Proteína Cinase
PLA	Fosfolipase A
PLGF	Fator de Crescimento de Placenta
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PPPM	Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais
QC	Queratinócitos
RANTES	Expressão e secreção regulada da ativação normal de célula T
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SDA	Ágar Sabouraud-Dextrose
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCM	Célula T Central de Memória
TEM	Célula T Efetora de Memória
TGF	Fator de Crescimento de Transformação
TN	Célula T Naive
TNF	Fator de Necrose Tumoral

TPA	12- <i>O</i> -Tetradecanoilforbol acetato
TSA	Meio Caseína-Soja
TX	Tromboxana
UBS	Unidade Básica de Saúde
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UV	Ultravioleta
VCM	Volume Corpuscular Médio
VCAM	Molécula de Adesão Vascular
VEGF	Fator de Crescimento Derivado do Endotélio Vascular
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

SUMÁRIO

	P.
1	INTRODUÇÃO..... 1
2	REVISÃO DA LITERATURA..... 3
2.1	USO POPULAR E BIODIVERSIDADE DAS PLANTAS MEDICINAIS..... 3
2.2	DESENVOLVIMENTO E IMPLANTAÇÃO DE FITOTERÁPICOS..... 5
2.3	ESTUDO DE ESTABILIDADE 8
2.3.1	Reologia..... 10
2.4	USO SEGURO DE FÁRMACOS..... 12
2.5	A PELE..... 14
2.5.1	Estrutura e fisiologia da pele..... 14
2.5.2	Sistema imune da pele..... 18
2.6	PROCESSO INFLAMATÓRIO..... 22
2.7	CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA..... 25
2.7.1	Mecanismos envolvidos na cicatrização..... 25
2.7.2	Fases da cicatrização..... 27
2.7.2.1	<i>Fase inflamatória ou exsudativa.....</i> 27
2.7.2.2	<i>Fase proliferativa ou reconstitutiva.....</i> 29
2.7.2.3	<i>Fase de remodelagem ou maturação.....</i> 31
2.8	PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA..... 32
2.9	PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADE CICATRIZANTE..... 33
2.10	FAMÍLIA ASTERACEAE..... 35
2.11	GÊNERO <i>Vernonia</i> 36
2.12	ESPÉCIE <i>Vernonia polyanthes</i> Less..... 37
3	OBJETIVOS..... 41
3.1	OBJETIVOS GERAIS..... 41
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 41
4	MATERIAIS E MÉTODOS..... 42
4.1	COLETA E MATERIAL VEGETAL..... 42
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO..... 42
4.3	ANIMAIS..... 42
4.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EEVP..... 43

4.4.1	Grupos experimentais.....	43
4.4.2	Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	43
4.4.3	Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	44
4.4.4	Análises dos parâmetros morfológicos.....	44
4.5	PREPARAÇÃO DO CREME DE <i>Vernonia polyanthes</i> LESS.....	44
4.6	ESTUDO DE ESTABILIDADE DO CREME DE <i>Vernonia polyanthes</i> LESS.....	46
4.6.1	Avaliação preliminar da estabilidade.....	46
4.6.2	Testes de estabilidade acelerada.....	46
4.6.2.1	<i>Teste de centrifugação.....</i>	47
4.6.2.2	<i>Teste de submissão a temperaturas de armazenamento.....</i>	47
4.6.2.3	<i>Verificação do valor de pH.....</i>	47
4.6.2.4	<i>Análise reológica.....</i>	47
4.6.3	Critérios de inclusão.....	48
4.6.4	Teste de estabilidade microbiológica das formulações.....	48
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	49
4.7.1	Edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	49
4.7.2	Edema de orelha induzido por ácido araquidônico.....	50
4.7.3	Edema de orelha induzido por fenol.....	50
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE.....	51
4.9	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	53
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS MIELOPEROXIDASE E N- ACETIL- β -D-GLUCOSAMINIDASE.....	53
4.10.1	Obtenção do sobrenadante.....	53
4.10.2	Dosagem de proteínas totais.....	54
4.10.3	Ensaio da atividade da mieloperoxidase.....	54
4.10.4	Ensaio da atividade da N-acetil-β-D-glucosaminidase.....	55
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5	RESULTADOS.....	56
5.1	EFEITOS DO EEVP SOBRE OS PARÂMETROS DE TOXICIDADE.....	56
5.1.1	Efeito do EEVP sobre a massa corporal, consumo de água e ração.....	56
5.1.2	Efeito do EEVP sobre a massa dos órgãos.....	56
5.1.3	Efeito do EEVP sobre os parâmetros hematológicos.....	57
5.1.4	Efeito do EEVP sobre os parâmetros bioquímicos.....	57

5.1.5	Efeito do EEVP sobre os parâmetros histopatológicos.....	66
5.2	ESTABILIDADE DO CREME DE <i>Vernonia polyanthes</i> Less.....	69
5.2.1	Estabilidade preliminar.....	69
5.2.2	Estabilidade acelerada.....	71
5.2.2.1	Centrifugação.....	71
5.2.2.2	Características organolépticas.....	72
5.2.2.3	Análise do pH.....	75
5.2.2.4	Análise reológica.....	76
5.2.2.5	Análise microbiológica.....	78
5.3	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DE cEEVP.....	82
5.3.1	Efeito do cEEVP sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	82
5.3.2	Efeito do cEEVP sobre o edema de orelha induzido por fenol.....	84
5.3.3	Efeito do cEEVP sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico.....	84
5.3.4	Perfil histopatológico de fragmentos de orelhas após tratamento com cEEVP..	85
5.3.5	Efeito do cEEVP sobre a atividade da mieloperoxidase.....	88
5.3.6	Efeito do cEEVP sobre a atividade da N-acetil- β -D-glicorominidase.....	89
5.4	ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EEVP E cEEVP.....	90
5.4.1	Efeito do EEVP e cEEVP sobre a massa corporal e consumo de água e ração....	90
5.4.2	Análise macroscópica.....	91
5.4.3	Efeito do EEVP e cEEVP sobre o perfil histopatológico de tecidos cicatrizados..	96
5.4.4	Efeito do EEVP e cEEVP sobre a atividade da mieloperoxidase em tecidos cicatrizados.....	100
5.4.5	Efeito do EEVP e cEEVP sobre a atividade da N-acetil- β -d-glicorominidase em tecidos cicatrizados.....	102
6	DISCUSSÃO.....	104
7	CONCLUSÃO.....	124
	REFERÊNCIAS.....	125

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é milenar e difundido por todo o mundo, seja no uso em rituais religiosos ou como medicamento (LI; OHIZUMI, 2004). Suas aplicações na fitoterapia buscam a cura e o alívio das moléstias, ferimentos e males dos seres humanos e animais desde a pré-história, evoluindo ao longo dos anos (COUTINHO, 2004).

O emprego de plantas medicinais, como medicamento, é de grande importância e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, 80% da população mundial fazem uso de plantas medicinais, principalmente nos países em desenvolvimento (KINGHORN, 2002; GURIB-FAKIM, 2006). Dentre os fatores envolvidos com o consumo de produtos naturais para os cuidados com a saúde, estão o alto preço dos medicamentos industrializados e o pensamento de que “o que é natural não faz mal”, acreditando, porém, não causar efeitos colaterais ou tóxicos (RATES, 2001). No entanto, sabe-se que todo medicamento, natural ou sintético, deve passar por estudos que comprovem sua eficácia e segurança (ALVES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013). Esta afirmação encontra-se respaldada pela legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que considera fitoterápico aquele medicamento obtido exclusivamente de matérias-primas de origem vegetal, com qualidade constante e reproduzível e que tanto os riscos quanto à eficácia seja caracterizada por levantamentos etnofarmacológicos, documentações técnicas científicas em publicações ou ensaios clínicos, assegurando o uso seguro (BRASIL, 2004a).

A possibilidade de se encontrar novas moléculas a partir de produtos naturais é imensurável (GURBUZ et al., 2002). O Brasil, por exemplo, devido a sua posição geográfica privilegiada, ao clima e umidade adequados e a diversos fatores bióticos e abióticos, detém 20% de toda a biodiversidade mundial e a maior variabilidade genética do mundo (CALIXTO, 2005). Diante dessa larga diversidade, a flora brasileira é considerada uma fonte promissora para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas. Entretanto, apenas uma pequena parcela das espécies vegetais, em torno de 8%, foi estudada, particularmente do ponto de vista químico e farmacológico (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A pele representa a principal barreira protetora do organismo, de modo a desempenhar a função de defesa contra agentes externos e nocivos (BUCKLE; HEDGECOCK, 1997). Qualquer interrupção na continuidade desta barreira representa uma ferida, a qual é acompanhada por processo inflamatório. Em geral, essa reação é autolimitada e sofre resolução, envolvendo remoção de células mortas, depuração de células de resposta aguda e

regeneração da matriz celular, culminando com a cicatrização tecidual (MURPHY; WARD, 2006).

Uma das plantas utilizadas como potente cicatrizante e anti-inflamatória é a *Vernonia polyanthes*, pertencente à família Asteraceae, popularmente conhecida como assa-peixe, encontrada em diferentes regiões do Brasil, especialmente em Minas Gerais (BARBASTEFANO et al., 2007). Indicada na medicina popular para afecções do aparelho respiratório, problemas renais e gastrointestinais, feridas, fraturas, torções, contusões e luxações, sendo indicada como tônica, emenagoga (aumenta o fluxo menstrual), diurética, além de cicatrizante (ALVES; NEVES, 2003; LORENZI; MATOS, 2008). Apresenta ainda ação leishmanicida, antifúngica (BRAGA et al., 2007), reduz a pressão arterial, a depuração de creatinina e aumenta a excreção de sódio renal (SILVEIRA; FOGLIO; GONTIJO, 2003), bem como atividades antiulcerogênica (BARBASTEFANO et al., 2007), antinociceptiva (reduz a percepção dolorosa) e anti-inflamatória (TEMPONI et al., 2012).

Diante das evidências científicas e das possíveis indicações terapêuticas na medicina popular, o trabalho avaliou parâmetros de toxicidade e o potencial anti-inflamatório tópico e cicatrizante do extrato etanólico das folhas de *Vernonia polyanthes* Less em solução e incorporado no creme base lanette, além de analisar a estabilidade desta formulação semissólida desenvolvida frente a diferentes temperaturas de armazenamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 USO POPULAR E BIODIVERSIDADE DA FLORA MEDICINAL

O uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas doenças está associado à medicina tradicional de distintas partes do mundo (ARAÚJO; LEON, 2001). Culturas dos mais diferentes lugares, independente do potencial econômico, reconhecem e utilizam as propriedades terapêuticas dos vegetais no tratamento de doenças, práticas estas que acompanham o homem desde a pré-história e que evoluíram ao longo do tempo (COUTINHO, 2004). Dessa forma, as sociedades vêm acumulando informações e experiências sobre o ambiente, interagindo e provindo suas necessidades para sobrevivência.

O uso milenar destes recursos naturais para o tratamento de doenças é associado ao poder da crença e pela falta de condições financeiras para realizar tratamentos médicos e adquirir medicamentos oficiais, buscando, assim, o auxílio de benzedeiros e curandeiros (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998). Esta tradição é demonstrada pela própria história da profissão farmacêutica no Brasil, ou seja, em 1549, após a instituição do Governo Geral da Colônia, o primeiro governador, Tomé de Souza, trouxe de Portugal para o Brasil, dentre inúmeras pessoas, como autoridades civis e militares, um boticário (antiga denominação do farmacêutico), Diogo de Castro. Neste momento, os medicamentos eram, em sua grande maioria, plantas medicinais que foram cultivadas em jardins caseiros (CAVALHEIRO, 2006) e esta prática foi difundida pela população da época (PEREIRA; FERNANDES; LEITE, 2012; TOMAZZONI; NEGRELLI; CENTA, 2006).

Mesmo com o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permaneceram como forma de tratamento e têm sido valorizadas nas últimas décadas (FAZAL; AHMAD; ABASI, 2013). Neste sentido, muitos fatores têm contribuído para o aumento da utilização das plantas como recurso medicinal, entre eles, o alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência ao uso de produtos de origem natural. Acredita-se que o cuidado realizado por meio das plantas medicinais seja favorável à saúde humana, desde que o usuário tenha conhecimento prévio de sua finalidade, riscos e benefícios (BADKE et al, 2012).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o uso de plantas medicinais pela população mundial vem obtendo cada vez mais espaço, sendo a principal opção terapêutica de aproximadamente 80% da população mundial, especialmente aquela de baixa renda (PINTO et al., 2002). Nos Estados Unidos de cada 150 medicamentos receitados e

comercializados, 118 são elaborados a partir de produtos originários da biodiversidade, como plantas, fungos, bactérias e animais (CHIVIAN; BERNSTEIN, 2008). Em países em desenvolvimento, estima-se que 80% dos habitantes dependam da medicina tradicional para suprir suas necessidades básicas de saúde, e 85% dos medicamentos produzidos pela medicina tradicional envolve o uso de extratos de plantas (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011). Esses países mantêm cerca de 67% da biodiversidade vegetal do planeta, com destaque para a sua participação no processo de reforço do uso de plantas medicinais no cuidado de saúde promovido pela OMS (BRASIL, 2006a).

O termo biodiversidade refere-se à diversidade biológica, designando a variedade de formas de vida em todos os níveis, desde micro-organismos até flora e fauna silvestres, adentrando também a espécie humana. A importância da biodiversidade para o bem-estar e a saúde humana ganhou maior destaque quando o processo de perda da diversidade biológica alertou para a necessidade da conservação e do uso racional dos recursos vivos. Dessa forma, foi reconhecida a valoração dos ecossistemas naturais e do imenso potencial que as espécies têm para a economia humana em geral e como fonte potencial de fármacos em particular (CHIVIAN; BERNSTEIN, 2008).

O Brasil detém a maior variabilidade genética do mundo e sua flora é constituída por cerca de 55 mil espécies conhecidas, o que se deve principalmente a sua privilegiada posição geográfica, ao clima e umidade adequados e a inúmeros outros fatores propícios. Além de várias outras espécies ainda não catalogadas ou mesmo desconhecidas pelas ciências biológicas (CALIXTO, 2005). Países, como o Brasil, são detentores de alta biodiversidade e possui uma grande área territorial. No contexto global, a questão da biodiversidade tem enorme relevância, pois o uso e a ocupação do solo com avanço em áreas naturais têm forte implicação na saúde e no bem-estar humano.

Apesar de grande importância, somente nos últimos anos iniciou-se a regulamentação jurídica de toda a biodiversidade, com a adoção de medidas concretas para a criação de mecanismos de segurança biológica, de proteção intelectual de plantas e micro-organismos e mesmo de proteção ao acesso dos recursos genéticos brasileiros. Um dos mais importantes acordos, senão o mais relevante, foi a Agenda 21, realizado durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, realizada no Rio de Janeiro, em 1992, representando um compromisso extenso, com centenas de disposições sobre políticas de cooperação internacional a serem adotadas, com vistas à melhoria da qualidade de vida das populações de todo o mundo e na preservação e recuperação do meio ambiente (VARELLA, 1997).

2.2 DESENVOLVIMENTO E IMPLANTAÇÃO DE FITOTERÁPICOS

O uso de plantas medicinais faz parte da evolução humana e essa prática é relatada na maioria das antigas civilizações, sendo a primeira referência escrita encontrada na obra *Pen Ts'ao* "A Grande Fitoterapia", do chinês Shen Nung, a qual remonta a 2800 a.C. A fitoterapia foi um dos primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos povos, além de ser por muito tempo a única terapia disponível ao homem. Em algumas ocasiões, as plantas curavam, em outras, matavam ou produziam graves efeitos colaterais, sendo, portanto, essencial o uso responsável, racional, seguro e não abusivo das mesmas (CZELUSNIAK, et al., 2012; MELO, 2009).

Inicialmente, os termos medicamentos fitoterápicos e fitomedicamentos, fitofármacos, plantas medicinais, partes de plantas, chás e pós de plantas, compressas, magias ou qualquer destas crenças populares não devem ser confundidos. As plantas medicinais são a matéria-prima para a extração dos princípios ativos para a produção do medicamento fitoterápico. Este fitoterápico passa por processo industrial, evitando contaminações por micro-organismos, agrotóxicos e substâncias estranhas. Isto diferencia das plantas medicinais, pois, além de proporcionar a padronização da quantidade e da forma adequada para a sua utilização, garante a segurança final do produto (CAVALHEIRO, 2006).

A fitoterapia significa o tratamento de uma doença, caracterizado pelo uso de plantas medicinais nas diferentes formas farmacêuticas. Através da RDC 48/2004 (BRASIL, 2004a), a qual foi revogada e hoje está em vigor a RDC 26/2014 (BRASIL, 2014), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera como medicamento fitoterápico aquele obtido exclusivamente de matérias-primas de origem vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco e outros), com qualidade constante e reproduzível e que tantos os riscos quanto à eficácia seja caracterizada por levantamentos etnofarmacológicos, documentações técnico-científicas em publicações ou ensaios clínicos (BRASIL, 2004a). Não podendo considerar fitoterápico qualquer produto que inclua substâncias naturais ou sintéticas que tenha ativos isolados, ou adicionados ao derivado de plantas (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011). Deste modo, não é objeto de registro como medicamento fitoterápico, planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada. Tornando-se evidente a necessidade de uma efetiva fiscalização deste setor, sem a qual pode se deparar com sérios problemas de saúde pública (ALVES et al., 2008).

Segundo levantamento realizado pelo Ministério da Saúde em 2004, foi relatado que em todos os municípios brasileiros, a fitoterapia se mostrou presente em 116 municípios, contemplando 22 unidades federadas (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011), indicando seu crescente uso, impulsionado pela evolução dos estudos científicos, em destaque a descoberta da eficácia de plantas medicinais, principalmente as utilizadas pelas populações com finalidade terapêutica, através dos estudos químicos e farmacológicos (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998), e muitas vezes impulsionado também pelo mercado mundial, o qual movimenta cerca de US\$ 22 bilhões por ano. No Brasil, estima-se que o comércio de fitoterápicos seja de 5% em relação ao mercado total de medicamentos, avaliado em mais de US\$ 400 milhões (PINTO et al., 2002). Dados da OMS apontam que, em 1980, o mercado mundial de fitoterápicos e produtos naturais movimentou 500 milhões de dólares, valor que em 2000 foi registrado somente na Europa. No Canadá, as vendas crescem 15% ao ano e nos Estados Unidos chegam a 20% (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012)

Em relação ao registro de medicamentos fitoterápicos, estima-se que há 512 destes medicamentos registrados na ANVISA, derivados de aproximadamente 162 extratos de plantas medicinais. Apesar de o Brasil ser um país com o maior número de espécies do planeta, cerca de 20% do total, e ter uma longa aceitação de uso de plantas medicinais entre a população, apenas 25% dos medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil vêm de espécies medicinais existentes na América do Sul. Portanto, é importante que os pesquisadores consultem a legislação e deem maior importância à flora nacional, resultando numa abordagem mais voltada para o setor produtivo, a fim de gerar maiores informações sobre as espécies de plantas brasileiras disponíveis (CARVALHO et al., 2011).

No ocidente, considera-se a Alemanha como o principal incentivador das terapias naturais, notadamente a fitoterapia, uma vez que no receituário alemão, os produtos florais chegam a ocupar cerca de 40% das prescrições. Há também países como a França, Bélgica, Suécia, Suíça, Japão e Estados Unidos, onde se enfatiza a técnica fitoterápica e os trabalhos científicos sobre o tema são publicados. A China é campeã na utilização de medicamentos naturais, recorrendo-se à alopatia quando não se encontra um substituto de tal medicamento na flora chinesa (CALIXTO, 2000).

Várias publicações, encontros e conferências têm sido realizados com o intuito de promover o uso de medicamentos fitoterápicos. Em 1978, foi realizada a Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde, como parte do plano de ação da OMS (Organização Mundial da Saúde) para atender o objetivo "Saúde para todos no ano 2000", nela foi incentivada a valorização das terapias tradicionais, entre elas a fitoterapia,

reconhecidas como recursos possíveis, mais fáceis e economicamente viáveis de aumentar a cobertura de atenção primária à saúde. No Brasil, este tema foi discutido na 8ª Conferência Nacional de Saúde, em 1986, quando se recomendava a introdução de práticas tradicionais de cura popular no atendimento público de saúde. Em 1996, durante a 10ª Conferência Nacional de Saúde, houve a proposta de incorporar no SUS as terapias alternativas e práticas populares, especificamente o incentivo à fitoterapia e à homeopatia na assistência farmacêutica pública. O uso da fitoterapia na atenção primária é tecnicamente apropriado, quando a prescrição não é feita de forma indiscriminada e quando os profissionais não incentivam a medicalização excessiva (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

No ano de 1982 entrou em vigência o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais (PPPM) da Central de Medicamentos (CEME), vigente durante 15 anos (1982 e 1997), e objetivou estudar 55 plantas medicinais com o intuito de determinar a ação terapêutica que estas plantas apresentavam segundo a população, a partir de estudos científicos, e assim tornando o uso mais seguro e efetivo (SANTOS et al., 2011). Em 1998, foi aprovada a Política Nacional de Medicamentos, portaria nº 3916, que estabelece a expansão do apoio às pesquisas destinadas a fitoterápicos, visando o potencial terapêutico da flora e fauna nacionais (BRASIL, 1998). Em 2006 foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos a fim de definir e pactuar as ações que visam o uso de plantas medicinais e fitoterápicos no processo de atenção à saúde, respeitando desde o conhecimento tradicional até o uso da biodiversidade do país (SANTOS et al., 2011). Neste mesmo ano, foi publicada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), através da portaria nº 971, como fruto de anos de ensaios referentes a este tema. Esta política trata das diretrizes, ações e responsabilidades dos três governos federal, estadual e municipal e recomenda a implantação e a implementação de várias ações e serviços no SUS, dentre eles a fitoterapia, além de homeopatia, acupuntura, entre outros, objetivando garantir a prevenção de agravos, a promoção e a recuperação da saúde com ênfase na atenção básica (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011).

É de grande importância a introdução da fitoterapia no serviço de atenção básica do SUS, uma vez que representa a cultura de um povo, não podendo desconsiderá-la, além do que os conhecimentos populares podem ser uma contribuição para o aprendizado dos profissionais de saúde, tornando possível, também desenvolver o potencial econômico em relação às plantas com valor medicinal, as quais uma alternativa de tratamento à medicina alopática (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

Em fevereiro de 2009, o Ministério da Saúde divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Renuisus), na qual estão presentes 71 espécies vegetais usadas pela sabedoria popular e confirmadas cientificamente (BADKE et al., 2012). Em 2010, foi aprovada a portaria nº 886/GM/MS, com a finalidade de instituir o programa Farmácias Vivas no SUS. Este programa foi o primeiro de assistência farmacêutica baseado no emprego científico de plantas medicinais desenvolvido no Brasil, tendo por objetivo produzir medicamentos fitoterápicos acessíveis à população (MATOS, 1998) e realizar todas as etapas do cultivo, coleta, processamento, armazenamento de plantas medicinais, manipulação, dispensação de preparações magistrais até oficinas de plantas medicinais e produtos fitoterápicos (SANTOS et al., 2011).

Embora a área de fitoterápicos esteja cada vez mais conhecida e desenvolvida, a disponibilidade de produtos fitoterápicos no mercado brasileiro ainda é bastante preocupante na visão do controle de qualidade desde a produção até a comercialização e uso pela população, pois a capacitação de profissionais nesta área ainda é escassa (CALIXTO, 2000). Os médicos brasileiros não têm o costume de receitar fitoterápicos, simplesmente por não ter conhecimento e, conseqüentemente, não acreditam na sua ação. Na realidade, os profissionais prescritores de medicamentos são vítimas das pressões de mercado, formando uma mentalidade médica voltada mais para a necessidade de consumo do que para a de cura (CAVALHEIRO, 2006). Diante disto, a PNPIC implantou um programa de capacitação na área de "Plantas Medicinais e Fitoterapia", o qual deve ser realizado através de curso básico interdisciplinar comum a toda a equipe e cursos específicos para profissionais de saúde de nível universitário (BRASIL, 2006b).

Espera-se que a implantação destas políticas de medicamentos fitoterápicos nos locais de atenção primária que atendem o SUS permita uma redução nos gastos com saúde no Brasil, uma vez que o problema de falta de medicamento enfrentado pelas UBS poderá ser amenizado quando efetuada a complementação do medicamento convencional pelo fitoterápico, mediante uma orientação (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

2.3 ESTUDO DE ESTABILIDADE

Nos últimos anos tem crescido o desenvolvimento de novas formulações no mercado farmacêutico e cosmético, tornando indispensável a avaliação de sua estabilidade, pois para ter sucesso a forma farmacêutica deve apresentar-se estável durante todo o tempo de armazenamento, garantindo a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e

toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica dentro dos limites especificados (MATTHEWS, 1999; LUCAS; BISHARA; SEEVERS, 2004; ANSEL; POPOVICH; ALLEN-JÚNIOR, 2007).

O estudo de estabilidade de produtos cosméticos fornece indicações sobre o comportamento do produto, indicando seu grau de estabilidade em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, mantendo as características que possuía na época da fabricação até o término da validade (TABORIANSKI, 2003; VEHABOVIC et al., 2003; ANVISA, 2004; STULZER; SILVA, 2009), possuindo como principal aplicabilidade a determinação do prazo de validade do produto farmacêutico, conforme descrito pela Resolução nº1/2005 (BRASIL, 2005). Porém, também determina a quantificação dos produtos de degradação e o método analítico correspondente, conforme o Informe Técnico nº 1/2008, o qual objetiva esclarecer procedimentos nos casos em que a impureza ou o padrão do produto de degradação não estejam disponíveis, através da realização de testes de estresse sob condições variadas (BRASIL, 2008).

Dentre os tipos de estabilidade, existe a física, na qual são mantidas as propriedades físicas originais, inclusive aparência, textura, uniformidade, cor e odor, e a química, na qual cada substância ativa mantém sua integridade química (LEONARDI, 2004), sendo necessária para prever instabilidade entre os princípios ativos (HIR, 1997; ZANIN, 2001). Alterações de pH, reações de oxido-redução e/ou de hidrólise podem levar a alterações da atividade das substâncias ativas, das características organolépticas e físicas das emulsões (ANVISA, 2004). A instabilidade física pode ser observada quando ocorrem fenômenos de coalescência, cremeação, e floculação. (SANCTIS, 1999).

Quanto à origem as alterações podem ser classificadas como intrínsecas (fatores inerentes à formulação) e/ou extrínsecas (fatores externos). Dentre os fatores extrínsecos podem citar o tempo, temperatura, umidade, presença de micro-organismos e vibração. Já os fatores intrínsecos são fatores relacionados à própria formulação e a interações de seus ingredientes, entre si ou com o material de acondicionamento (ANVISA, 2004).

Quanto à duração da análise os estudos de estabilidade podem ser divididos em três fases, conforme a Resolução 01/2005: estudo de estabilidade de acompanhamento, estudo de estabilidade de longa duração, e estudo de estabilidade acelerada (BRASIL, 2005).

Estudo de estabilidade de longa duração é projetado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de

armazenamento. Deve ser realizado anualmente ou bianualmente, dependendo do número de lotes produzidos pela empresa farmacêutica, para comprovação da qualidade do produto com a estabilidade pré-estudada. Após os resultados deste estudo realiza-se a fase de acompanhamento da estabilidade, de modo a verificar se o produto mantém as mesmas características apresentadas anteriormente (BRASIL, 2004b).

E por fim, o estudo de estabilidade acelerada é um teste em que as formulações são submetidas às condições que visam uma aceleração das propriedades químicas e físicas do produto, com a finalidade de prever a vida útil do produto, quando estiver sobre as condições ambientais de armazenamento de uso (LEONARDI, 2004; BABY et al., 2008). Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte (BRASIL, 2005). E assim proporcionar maior segurança e garantir a qualidade destas preparações durante o tempo de uso, o que repercute em uma maior aceitação pela população.

Desta forma a estabilidade é muito relativa, pois vai depender da armazenagem do produto, controle de temperatura, entre outros motivos que possam retardar ou acelerar alterações. Modificações dentro de limites pré-estabelecidos não podem ser motivos para reprovar o produto.

2.3.1 Reologia

Além da análise das características organolépticas, separação de fases, através do teste de centrifugação, verificação do valor de pH e avaliação microbiológica, é imprescindível o estudo reológico de formulações semissólidas, fornecendo resultados relevantes quanto ao seu comportamento.

O termo reologia provém do grego (*rheo = fluir; logos = ciência*), significando "a ciência dos fluidos", que foi sugerido por Bingham e Crawford no século XIX para descrever o fluxo de líquidos e a deformação dos sólidos. O termo foi adotado formalmente em 1929 e hoje representa uma ciência que se dedica ao estudo das propriedades de fluxo e deformação da matéria como um todo, independente do estado físico (LEONARDI; MAIA CAMPOS, 2001).

Dentre os parâmetros reológicos, o de maior importância é a viscosidade, η . Este parâmetro é definido na equação da 2ª Lei de Newton como um fator de inércia (análogo à grandeza *massa*) que mede a resistência ao escoamento (BENNETT; MYERS, 1978):

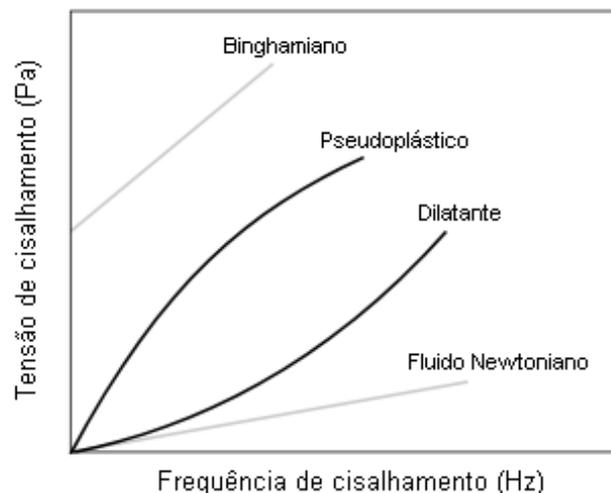
$$F = ma \quad \text{Eq. 1 (2ª Lei de Newton)}$$

$$\tau = \eta\varphi \quad \text{Eq. 2 (2ª Lei de Newton aplicada a fluidos)}$$

A viscosidade representa um fator de proporcionalidade entre o parâmetro τ e a grandeza φ ($\varphi = dv/dy$). Além disso, depende das interações intermoleculares, tamanho, forma e estado de agregação dos componentes do fluido, apresentando unidades de Ns/m^2 . O parâmetro τ representa a tensão de cisalhamento – força aplicada à superfície paralela ao escoamento, tendo dimensões de pressão (N/m^2 no SI), sendo uma grandeza análoga à força (F). A grandeza φ , definida como gradiente de velocidade, é análoga à aceleração (a), mede o movimento transmitido ao fluido devido à aplicação do estímulo externo τ , sendo conhecida também como deformação por cisalhamento ou frequência de cisalhamento, por apresentar dimensões de frequência (s^{-1} no SI) (FOX; McDONALD, 1998).

A análise da viscosidade nos permite caracterizar os fluidos como Newtonianos ou não-Newtonianos. O primeiro apresenta valores constantes de viscosidade, enquanto que o segundo apresenta viscosidade variável e pode ser dividido em Binghamianos, os quais apresentam comportamento similar a sólidos até certo valor de tensão τ_x , a partir da qual passa a escoar, ou ainda fluidos pseudoplásticos e dilatantes, os quais apresentam, respectivamente, a viscosidade decrescente e crescente à medida que se aumenta a tensão (BENNETT; MYERS, 1978). Estes fluidos não-Newtonianos são mostrados no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Comportamento de fluidos quanto ao cisalhamento.



Fonte: Bennett; Myers, 1978.

Na prática, o comportamento de fluxo de um dado material pode ser determinado através da construção de um gráfico de *tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento*, utilizando-se um reômetro. E assim permitindo a avaliação do comportamento do fluido (BENNETT; MYERS, 1978; FOX; McDONALD, 1998).

2.4 USO SEGURO DE FÁRMACOS

O uso popular de plantas medicinais vem desde a antiguidade e ainda nos dias atuais podemos encontrar nas grandes e pequenas cidades brasileiras a comercialização em feiras livres, mercados populares, quitandas residenciais e em outros estabelecimentos, já que se difundiu uma crença popular de que o que é natural não faz mal, que as plantas apenas curam. Esses produtos são comercializados por ervanários e raizeiros que não cumprem com os critérios de adequação à saúde nem atendem ao binômio segurança e eficácia exigidos nos demais produtos, demonstrando assim uma má utilização das plantas medicinais, uma vez que não passam por estudos de farmacovigilância (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012). Neste contexto, o que muitas pessoas não sabem ou não acreditam, é que as plantas medicinais podem conduzir a diversos tipos de danos à saúde, como reações alérgicas, tóxicas, efeitos mutagênicos e interações medicamentosas (ALVES et al., 2008), de modo que o uso popular, e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar eticamente como medicamentos eficazes e seguros. Fazendo-se necessário a realização de estudos toxicológicos para a avaliação de parâmetros de segurança (OLIVEIRA et al., 2013).

Considerando o potencial tóxico das plantas e a necessidade de um rigoroso controle, temos o fato que os venenos mais perigosos são extraídos de vegetais, como a estricnina, retirada da *Strichnos nux-vomica*, a leandro ou espirradeira, da *Nerium oleander*, a mamona, da *Ricinus communis*, a maria mole ou flor das almas, da *Senecio brasilienses*, as quais podem causar a morte (CAVALHEIRO, 2006). E há também casos relatados do potencial tóxico de plantas medicinais que eram utilizadas devido ao conhecimento popular, como o uso há mais de mil anos de *Jin Bu Huan*, uma planta chinesa que apresenta um efeito analgésico e sedativo e cujo emprego está relacionado a sete casos de hepatite severa após sua utilização. Outro relato foi associado ao confrei (*Symphytum officinale* L.), cujo chá e suco já foram largamente utilizados com fins terapêuticos; contudo, estudos científicos comprovaram que esta espécie sintetiza alcalóides pirrolizidínicos, substâncias causadoras de necrose centro-lobular, levando a lesões hepáticas graves. Hoje, o uso do confrei se limita a produtos para aplicação tópica. Estes exemplos, dentre inúmeros outros, nos leva a concluir que o uso

tradicional de plantas medicinais pela população não garante a segurança como medicamento (ALVES et al., 2008). Além disso, é comum o uso de associação das plantas medicinais com fármacos sintéticos, o que pode provocar interações e aumentar o risco de morbimortalidade causada pelos efeitos adversos e tóxicos provocados por estes produtos (FRANCO, 2003; SANTOS et al., 2011).

Considerando a toxicidade das plantas medicinais, as pessoas que fazem uso destas além de não reconhecerem seu potencial tóxico, não têm entendimento quanto à sua ação terapêutica, forma correta de cultivo, preparo, indicação e contraindicação (TAGLIATI et al., 2008). Aliando a isso, uma gama de fatores pode interferir na atuação do princípio ativo, desde aspectos relacionados ao indivíduo, como aspectos genéticos e relacionados às substâncias bioativas e condições climáticas que foram submetidas, como luminosidade, índice pluviométrico, condições do solo, entre outros (FRANÇA et al., 2008).

No Brasil, estas informações têm crescido cerca de 8% anualmente, demonstrando que pesquisas com plantas medicinais deveriam ser mais incentivadas, uma vez que menos de 10% das aproximadamente 55 mil plantas brasileiras foram submetidas a estudos químicos e farmacológicos (TAGLIATI et al., 2008). Afinal, elas poderiam levar à reorganização das estruturas de uso dos recursos naturais e à elevação do PIB, visto que há grande tendência mundial de aumento na utilização de fitoterápicos (BRASIL, 1998; FALCÃO et al., 2005; BARBOSA-FILHO et al., 2005).

Nos últimos anos, as pesquisas têm sido direcionadas para as espécies tradicionais com intuito de buscar novos medicamentos. De acordo com a legislação brasileira, os produtos fitofarmacêuticos com base em plantas tradicionais devem ter sua eficácia farmacológica e ausência de toxicidade comprovada para fins de comercialização (BRASIL, 2004a; CARVALHO et al., 2008). Para isto, deve-se iniciar pela correta identificação e caracterização morfológica (FAZAL; AHMAD; ABASI, 2013), estudos fitoquímicos, químico sintético e medicinal e farmacológicos para, posteriormente, desenvolver as formulações e produção do fitoterápico (MACIEL, 2002). Estes estudos são necessários visto que a origem das drogas é, muitas vezes, adulterada ou substituída por outros materiais vegetais de baixa qualidade antes da colheita e durante o manuseio e armazenamento. Portanto, para alcançar a garantia de formulação à base de plantas de qualidade em qualquer sistema de medicina, a ênfase deve ser dada para as boas práticas de colheita (BPC), boas práticas de laboratório (BPL) e boas práticas de fabricação (BPF) (FAZAL; AHMAD; ABBASI, 2013). Assim, as demandas da saúde da população podem ser atendidas pela fitoterapia, desde que abranja às exigências de controle de qualidade na produção e

processamento das plantas, garantindo a eficácia e segurança aos usuários (TOMAZZONI; NEGRELLI; CENTA, 2006).

De modo a melhorar as condições que garantam qualidade, segurança e eficácia dos fitoterápicos, o Ministério da Saúde tem estabelecido políticas que encorajam o desenvolvimento de estudos com plantas medicinais, objetivando colocar em prática os benefícios advindos destas pesquisas (FRANCO, 2003) e evitar efeitos colaterais e danos que possam ser causados pelo mau uso desta modalidade terapêutica, através da associação do conhecimento popular com o científico. Assim, ao longo de vários anos vem sendo criado portarias e programas relacionados a plantas medicinais e fitoterápicos no SUS.

2.5 A PELE

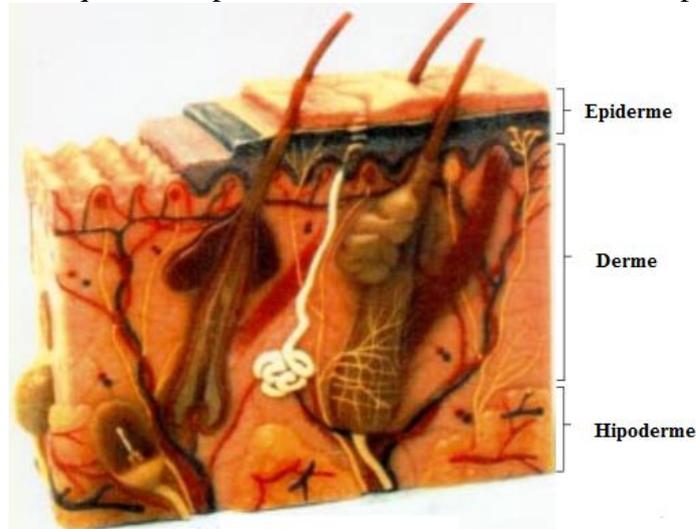
2.5.1 Estrutura e fisiologia da pele

A pele, chamada de tegumento ou *cútis*, é o maior órgão do corpo humano, com uma área de aproximadamente 2 m², peso de cerca de 4,5 kg, correspondendo de 10 a 15% do peso corporal (BORGES, 2001). Apresenta espessura situada entre 0,5 e 4 mm e contém cerca de 20% do conteúdo total de água do organismo (GUIRRO; GUIRRO, 2002), constituindo a principal barreira física contra o meio externo. Apresenta uma estrutura complexa, com tecidos de várias naturezas, dispostos e interrelacionados para exercer suas funções (SAMPAIO; RIVITTI, 2001), envolvendo diversas camadas, cada qual com propriedades particulares, sendo as principais: a epiderme, camada mais superficial; a derme, camada intermediária e a hipoderme, camada mais profunda (Figura 1) (WILLIAMS; KUPPER, 1996; CHUONG et al., 2002).

Embriologicamente, a pele deriva dos folhetos ectodérmicos e mesodérmicos. É fonte imunológica de hormônios para diferenciação celular, apresenta função de proteção contra micro-organismos, agentes tóxicos e organismos estranhos. Além disso, protege contra os efeitos da radiação, perda hídrica, traumas mecânicos e elétricos e funciona como barreira mecânica. Sua função sensitiva se dá por ser base dos receptores sensoriais do tato e mediadora de sensações. Expressa cor em situações de raiva, ansiedade, medo, além de servir como diferenciação pessoal por sua variação individual de cor, odor e textura (GOODWIN; WHEAT, 2004; WALTERS; ROBERTS, 2007). É fonte organizadora e processadora de informações, regula a pressão, o fluxo sanguíneo e a temperatura corporal; participa do metabolismo e armazenamento de gordura, é reservatório de alimento e água, além de formar

compostos importantes como a vitamina D (GUIRRO; GUIRRO, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 1 - Esquema simplificado de um corte transversal da pele.

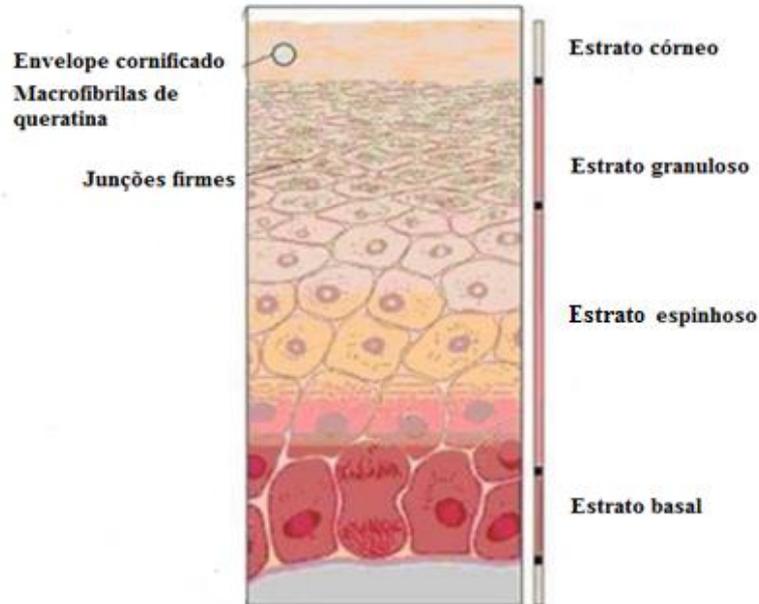


Fonte: Adaptado de BRASIL, 2002.

A camada mais superficial da pele, a epiderme, de origem ectodérmica, é constituída por epitélio estratificado pavimentoso, como resultado da sua constituição de queratinócitos, responsável pela fabricação de queratina, uma proteína que preenche as células mais superficiais da epiderme para formar a camada córnea, camada mais externa da epiderme, responsável pela determinação da permeabilidade de certas substâncias e proteção (AZULAY; AZULAY, 1999; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Além da camada córnea há o estrato granuloso, onde inicia-se o processo de cornificação; o estrato espinhoso, onde ocorre inicialmente o processo de queratinização e a camada basal que promove proliferação celular (Figura 2). Em relação à constituição celular, a epiderme é constituída por três tipos básicos de células: queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans, e ocasionalmente encontram-se células de Merckel (ARNOLD Jr. et al., 1994). Os queratinócitos constituem a maior parte da epiderme, são formados a partir de células cilíndricas que sofrem contínua atividade mitótica. Os melanócitos são as células produtoras de pigmento e se localizam predominantemente ao nível da camada basal e as células de Langehans são apresentadoras de antígenos (GAMONAL, 2002). Estas células estão dispostas em camadas, as quais de dentro para fora recebem, respectivamente, o nome de germinativa ou basal, malpighiana ou corpo mucoso, granulosa ou córnea (BECHELLI, 1988). É verificada também na epiderme a presença de íons cálcio, os quais são importantes para a regulação de proteínas, bem como na

função de adesão intercelular e diferenciação celular epidérmica (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

Figura 2 - Esquema simplificado das camadas da epiderme.



Fonte: Adaptado de SEGRE, 2006.

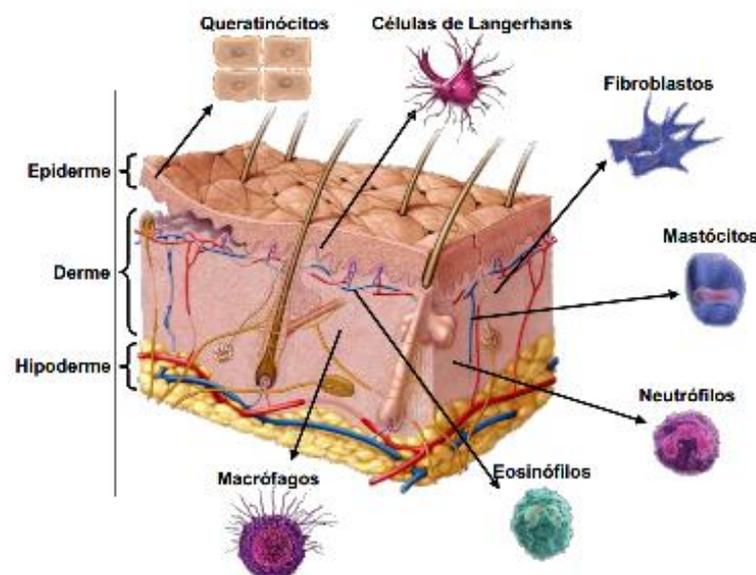
As funções da epiderme são: proteção contra traumas físicos e químicos; resistência às forças de tensão; prevenção da desidratação e perda de eletrólitos; restrição da passagem de corrente elétrica; proteção contra entrada de substâncias tóxicas; proteção dos efeitos nocivos do UV através da melanina (CUCÉ; NETO, 1990).

A maioria das funções de defesa da pele estão localizadas no estrato córneo que limita a colonização por patógenos devido ao baixo teor de água, meio ácido, presença de microbiota residente normal, bem como lipídeos e peptídeos antimicrobianos de superfície. A presença de microbiota é essencial na defesa antimicrobiana e seu crescimento é favorecido pelo pH ácido cutâneo. Além disso, a microbiota possui resistência aos peptídeos antimicrobianos, bem como secreta produtos metabólicos inibidores, como os ácidos propiônico e acético e substâncias antimicrobianas, como penicilina e ácido azeláico, que limitam o crescimento de micro-organismos patogênicos (SPELLBERG, 2000).

A epiderme está situada sobre a camada do tecido conectivo, a derme, e a superfície de contato entre as duas camadas é favorecida pelo formato ondulado disposto na camada mais superficial, estimulando trocas de elementos nutritivos e metabólitos. A interface entre as duas camadas é denominada junção dermoepidérmica (KOSTER; ROOP, 2004; KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004).

A derme é um tecido conjuntivo constituído por uma grande variedade de tipos celulares e por uma abundante matriz extracelular, a qual é formada pelos fibroblastos que sintetizam diferentes macromoléculas (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998; ECKES; KRIEG, 2004). Sua espessura é superior a da epiderme, conferindo assim elasticidade, força e resistência mecânica (SMITH; MALBACH; SUBER, 2000; BARRY, 2002), porém com uma população celular inferior. Esta camada pode ser dividida em três partes distintas: derme papilar, que apresenta fibras de colágeno menos organizadas e finas, perianexial e reticular, onde a matriz é mais densa, com fibras mais grossas e melhor organizadas (SAMPAIO; RIVITTI, 2001). Na derme situam-se algumas fibras elásticas e reticulares, bem como muitas fibras colágenas, e são supridas por vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. As artérias, associadas às arteríolas, veiculam o sangue rico em oxigênio e nutrientes, as veias são responsáveis pelo retorno dos resíduos provenientes do metabolismo celular e os vasos linfáticos são responsáveis por fornecer à derme outros tipos celulares conhecidos como células migratórias, como macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, entre outras, que desempenham um importante papel em eventos como infecção de micro-organismos, inflamação e cicatrização (Figura 3) (WILLIAMS; KUPPER, 1996; RYAN, 2004; WELSS; BASKETTER; SCHRODER, 2004).

Figura 3 - Representação esquemática do corte transversal da pele.



Fonte: BUCKLE; HEDGECOCK, 1997.

A derme também conta com um sistema de inervação sensitiva e vegetativa, de modo que os nervos vegetativos inervam glândulas sudoríparas, músculo piloerector e vasos sanguíneos, auxiliando no controle da temperatura corporal. Além de conduzir estímulos

mecânicos, térmicos, químicos e dolorosos para Sistema Nervoso Central (SNC), através de receptores periféricos (GARLE; FRY, 2003; GOODWIN; WHEAT, 2004). O principal componente da derme é o colágeno, uma proteína fibrosa que atua como a principal proteína estrutural de todo o corpo (ARNOLD Jr. et al. 1994). As funções da derme são: promover flexibilidade à pele; determinar proteção contra traumas mecânicos; manter a homeostase; armazenar sangue para eventuais necessidades primárias do organismo; determinar a cor da pele, por ação da melanina, hemoglobina e dos carotenos e é a segunda linha de proteção contra invasões por micro-organismos, por ação dos leucócitos e macrófagos (CUCÉ; NETO, 1990).

Por sua vez, a epiderme e a derme estão fixadas em uma camada composta por tecido adiposo: a hipoderme (KOSTER; ROOP, 2004; KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004). A hipoderme ou panículo adiposo é a camada mais profunda da pele, de espessura variável. Relaciona-se, em sua porção superior, com a derme profunda, constituindo-se a junção dermo-hipodérmica, na qual encontram-se porções secretoras das glândulas apócrinas ou écrinas e de pêlos, vasos e nervos. A hipoderme é constituída de duas camadas: a areolar, mais superficial e composta por adipócitos globulares e volumosos (GUIRRO; GUIRRO, 2002), e a lamelar, sendo separadas pela fáscia superficial ou subcutânea. Funcionalmente, a hipoderme, além de depósito nutritivo de reserva, participa no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos e facilita a mobilidade da pele em relação às estruturas subjacentes (SAMPAIO; RIVITTI, 2001).

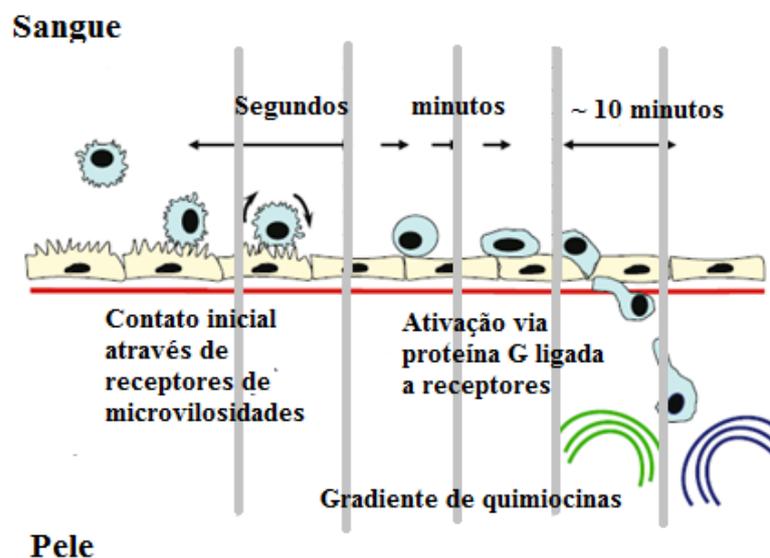
A presença e interligação entre os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele permite que este órgão responda, pronta e constantemente, a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem no organismo, frente ao meio externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação UV e variações extremas de temperatura, garantindo assim a manutenção da homeostasia cutânea (WILLIAMS; KUPPER, 1996; BURBACH; ANSEL; ARMSTRONG, 2000).

2.5.2 Sistema imune da pele

A pele tem um papel importante na imunidade, principalmente em casos que o organismo do indivíduo está debilitado (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004), de modo que células imunológicas são direcionadas para a pele através das ações de moléculas de adesão e fatores quimiotáticos, tanto em peles saudáveis, quanto em tecido inflamado. Dessa forma, ocorre uma série de eventos de adesão e regulação para que leucócitos se direcionem para a

pele e outros tecidos (MACKAY, 2000; HWANG, 2001; MORA; VON ANDRIAN, 2006; VON ANDRIAN) através de interações com células endoteliais. Em seguida, ocorre a migração de leucócitos (Figura 4) (BUTCHER et al., 1999) que permite que estes interajam com compostos quimioatraentes apresentados na superfície endotelial. As células que expressam esses compostos sofrem rápida ativação através de uma proteína G de sinalização, mudando a conformação de moléculas de superfície de baixa afinidade para um estado de alta afinidade (CAMPBELL et al., 1998). Os leucócitos, então, respondem a gradientes quimiotáticos no tecido por forças exercidas pelo fluxo sanguíneo através de quimiocinas (CAMPBELL; BUTCHER, 2000; ALON; FEIGELSON, 2002).

Figura 4 - Extravasamento de leucócitos na pele.



Fonte: Adaptado de FUHLBRIGGE; WEISHAUP, 2007.

O ponto principal deste modelo de adesão e extravasamento é que as populações de leucócitos específicos são direcionados para tecidos específicos em circunstâncias específicas (BUTCHER et al., 1999; CAMPBELL; BUTCHER, 2000), de modo que a expressão diferencial de moléculas de adesão e apresentação de quimiocinas específicas sobre o lúmen endotelial dirige a acumulação de subconjuntos específicos de leucócitos. Este modelo prevê que cada sítio vascular apresenta um único “código de endereço” formado pela expressão de receptores de adesão de leucócitos. É de fundamental importância reconhecer que todos os três componentes devem ser combinados para que ocorra um recrutamento eficiente. Por exemplo, células T naive, por diversas interações, extravasam pelo endotélio e migram através de áreas ricas em linfonodos T, buscando interações com células apresentadoras de antígenos (APCs) e saem através de vasos linfáticos eferentes. Esta recirculação contínua entre sangue e

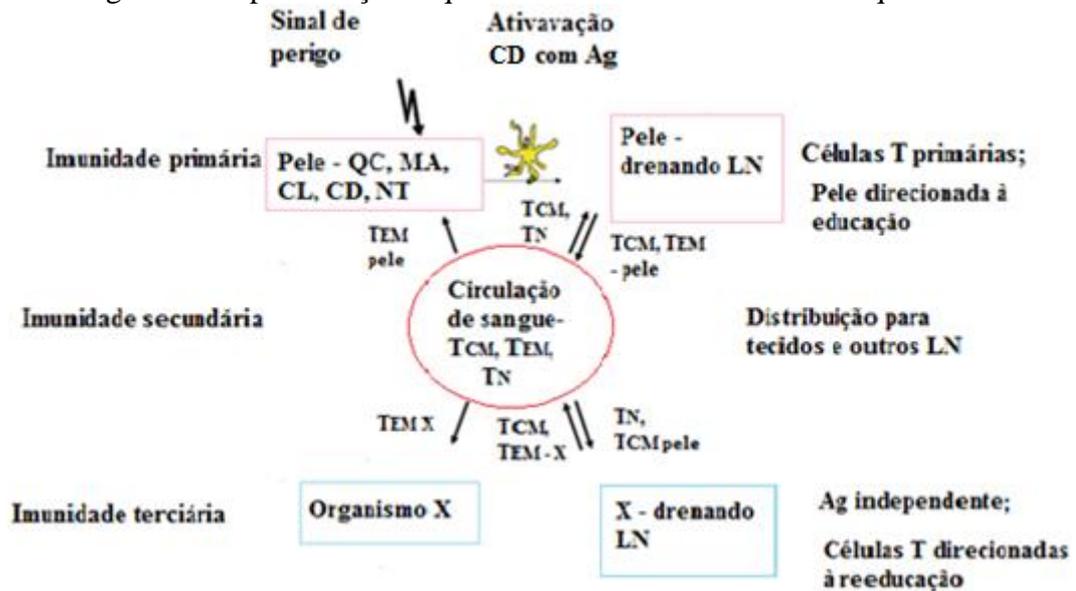
linfonodos e a incapacidade para entrar em tecidos periféricos são as principais características de células T naive e que é importante para a vigilância imunológica (ZLOTNIK; YOSHIE, 2000; VON ANDRIAN; MEMPEL, 2003). Praticamente todas as células T encontradas no compartimento extravascular nos sítios de doença inflamatória da pele são linfócitos que expressam ligantes específicos (PICKER et al., 1990; PITZALIS et al., 1996).

Em relação à vigilância imunológica da pele, tem-se primeiramente a imunidade inata, de modo que células da barreira epitelial e as células imunes inatas residentes na pele formam a primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos. Queratinócitos e células de Langerhans na epiderme, bem como a presença de mastócitos, células dendríticas e macrófagos expressam receptores que reconhecem os componentes de patógenos e desencadeiam uma série de mecanismos para eliminá-los (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997). Os queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais se relacionam com células vizinhas através de integrinas para a cicatrização da lesão. Assim, vários mediadores pró-inflamatórios são liberados, como neuropeptídeos, metabólitos do ácido araquidônico, monoaminas e citocinas, os quais, através de seus receptores produzem segundos mensageiros, ativam várias proteínas quinases, como PKC e PKA, estimulando fatores nucleares, como o fator de transcrição nuclear kappa β (NF- $\kappa\beta$). Este fator é visto como um elo fundamental entre a imunidade inata e adaptativa, regulando a expressão de numerosos genes envolvidos na iniciação da resposta inflamatória (ZHANG; GHOSH, 2001). Entre os genes induzidos por NF- $\kappa\beta$ estão as moléculas de adesão endoteliais E- e P-selectinas, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e VCAM-1, bem como várias quimiocinas e citocinas envolvidas no recrutamento de leucócitos. Em resposta à ativação, APCs, especialmente células dendríticas, pegam o antígeno, altera o padrão de expressão do seu receptor de quimiocina, apresentando antígeno para as células T a fim de iniciar a resposta imune adaptativa (CLARK; KUPPER, 2005). Dessa forma, fornece um mecanismo para uma resposta mais direcionada e eficaz contra patógenos e um meio para prestação de memória, com base em células T e B.

A imunidade adaptativa é dividida em primária, secundária e terciária (KUPPER; FUHLBRIGGE, 2004), de modo que a primária envolve mecanismo para a interposição de antígenos na pele, através da ação das APCs, em conjunto com células T e B, podendo responder imediatamente quando um sinal de perigo é percebido. Citocinas pró-inflamatórias são produzidas, atraindo mais células para o local de ataque, ao mesmo tempo as APCs são ativadas e transportam antígeno para o linfonodo (STEINMAN; HEMMI, 2006). A imunidade secundária envolve a produção e distribuição de células T efectoras de memória, que entram na circulação e têm como alvo o antígeno, ocorrendo liberação de citocinas

primárias na epiderme, aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial e recrutamento de células CLA da circulação. A imunidade terciária direciona células T para linfonodos presentes em outros órgãos (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática das três imunidades adquiridas.



Nota: Ag: Antígeno; QC: queratinócito, MA: macrófago; CL: célula de Langerhans, CD: célula dendrítica; NT: neutrófilo; LN: linfonodo; TCM: célula T central de memória; TEM: célula T efetora de memória; TN: célula T naiva.
 Fonte: Adaptado de FUHLBRIGGE; WEISHAUPT, 2007.

As células T de memória na pele são produzidas depois de um encontro inicial com o antígeno específico (SALLUSTO; GEGINAT; LANZAVECCHIA, 2004). Na ausência de antígeno, eventualmente saem da pele de forma passiva através de vasos linfáticos aferentes, e em última análise voltam para o sangue periférico. Por outro lado, se o trauma acontece simultaneamente com a introdução do antígeno, o conjunto de células T podem tornar-se ativadas por APC no local para realizar suas funções específicas (KUNKEL et al., 2002).

Nesta sequência de vigilância imunitária, estratégias são utilizadas pelo sistema imunológico para melhorar as chances da célula T de encontrar seu antígeno, atingir a resposta efetora no tecido adequado e prolongar a resposta de memória a um antígeno em contato anteriormente, modulando, mantendo e amplificando a resposta inflamatória. A falha deste mecanismo pode fazer com que este processo, inicialmente agudo, desregule a homeostase do órgão, predispondo o mesmo a processos inflamatórios crônicos (DEBENEDICTIS et al., 2001). Desta maneira, a pele demonstra ser muito mais que uma barreira física entre o meio interno e externo, mas sim, indiscutivelmente, uma continuação do sistema imunológico (WILLIANS; KUPPER, 1996).

2.6 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A palavra "inflamação" é derivada da palavra latina "inflammare", e significa um processo biológico complexo, incluindo vários mediadores químicos, ativados quando em contato com vários estímulos nocivos (SARWAR et al., 2011). Deste modo a inflamação representa um conjunto de fatores que constituem uma resposta protetora imediata do sistema imune a algum tipo de agressão ao organismo (LARSEN; HENSON, 1983).

Um processo inflamatório pode ser desencadeado por múltiplos agentes: agentes biológicos, como bactérias, vírus e protozoários; químicos, como ácidos, álcalis, formaldeído, carragenina e substâncias cáusticas; físicos, como temperaturas extremas, radiação UV e ionizante e agentes imunes, os quais ativam a resposta imunológica do hospedeiro (CARVALHO, 2004). Estes agentes são destruídos, juntamente com parte do tecido hospedeiro, através da ação de substâncias tóxicas e enzimas proteolíticas liberadas por células de defesa após a fagocitose (LIEW, 2003).

Como consequência desta destruição ocorre efeitos sobre a circulação sanguínea no local da inflamação, sobre a permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos e liberação de agentes indutores de dor, dando origem aos chamados sinais cardinais da inflamação, que são: calor, rubor, dor e edema, além da perda da função do tecido vascularizado afetado, que também é considerada um sinal cardinal adicional (LARSEN; HENSON, 1983; ALI et al., 1997).

A resposta inflamatória é uma resposta benéfica e fisiológica pela qual o organismo se defende e repara danos teciduais ou perda de funções (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002), dependendo da condição fisiológica do hospedeiro e do potencial patogênico do agente agressor. Esta resposta inicial é chamada de aguda e pode durar horas a dias. Em contrapartida, pode ser verificada também a inflamação crônica, como resultado de uma resposta inflamatória exagerada e descontrolada, podendo durar meses (DEBENEDICTS et al., 2001; SILVA; CARVALHO, 2004; MUELLER, 2006;; BANGERT; BRUNNER; STINGL, 2011). Desta forma este processo pode ser dividido em três fases: a primeira é a fase transitória aguda, a qual é representada por uma vasodilatação localizada e um aumento da permeabilidade vascular; a segunda é a fase subaguda, representada por infiltração dos leucócitos e células fagocitárias, e por último tem-se a fase proliferativa crônica, na qual se verifica degeneração tecidual e fibrose (SILVA; CARVALHO, 2004).

Estudos mostram que em alguns casos as inflamações podem ser toleráveis, mas em quase 99% dos casos, são graves, necessitando do uso de medicamentos que minimizem os

danos causados (SARWAR et al., 2011). Esta terapia medicamentosa é à base dos fármacos anti-inflamatórios, os quais estão entre os mais utilizados pela medicina moderna (SILVA; CARVALHO, 2004).

Os anti-inflamatórios de origem sintética são classificados como esteroides ou glicocorticoides (AIEs) e agentes anti-inflamatórios não-esteroides (AINES). A origem dos AINES se dá dos salicilatos isolados do extrato de folha de casca de salgueiro *Salix alba*, potencialmente usados pelos povos da América do Norte em 200 a.C. (RAINSFORD; WHITEHOUSE, 1980).

Os AIEs são esteroides lipofílicos que exercem sua atividade anti-inflamatória ao inibir fenômenos iniciais do processo inflamatório, como a formação do edema, deposição de fibrina, migração leucocitária, atividade fagocitária e dilatação capilar. Além de limitar manifestações tardias do processo inflamatório, como a proliferação fibrocapilar, acúmulo de colágeno e cicatrização (LONGUI, 2007; TREML, 2010).

A maioria dos AINES são ácidos orgânicos com ação analgésica, antitérmica e anti-inflamatória, apresentando sua atividade sobre as cicloxigenases (COX), de maneira específica (COX-2) ou não (COX-1 e COX-2), agindo sobre canais hidrofóbicos dessas enzimas, com consequente diminuição da síntese de prostaglandinas e tromboxanas (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006; CARNEIRO et al., 2014).

Esses medicamentos, apesar de eficazes sobre a inflamação, apresentam efeitos colaterais diversos, geralmente relacionados ao uso prolongado destas drogas (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006; LONGUI, 2007). Alguns efeitos colaterais incluem irritação gástrica, ulceração, hemorragia, insuficiência renal, nefrite intersticial, dor de cabeça, trombocitopenia, anemia hemolítica, asma, exacerbação, erupções cutâneas, angioedema e prurido. Assim, uma mudança no tratamento da inflamação, de compostos sintéticos para produtos naturais, tem ganhado cada vez mais interesse, aliado ao fato que o mercado para utilização de fármacos à base de plantas no tratamento de doenças inflamatórias constitui 83% em todo o mundo e espera-se chegar a um valor de cerca de mais de 95% nos próximos anos, devido ao aumento da aceitação destas preparações (BOULLATA; NACE, 2000). Como exemplo, foi lançado recentemente o anti-inflamatório tópico Acheflan[®], oriundo do óleo essencial de *Cordia verbenacea* (erva-baleeira).

As substâncias isoladas a partir de plantas com potencial atividade anti-inflamatória incluem as substâncias pertencentes a várias classes de fitofármacos, como alcaloides, glicosídeos, terpenos, polissacarídeos, flavonoides, compostos fenólicos, canabinoides, esteroides e ácidos graxos (SARWAR et al., 2011).

Os modelos de inflamação *in vivo*, como edema de pata e de orelha induzido por agentes flogísticos têm sido utilizados com grande frequência nos estudos de atividade anti-inflamatória com produtos naturais e sintéticos (WILLOUGHBY, 2003). O modelo de edema de orelha, por exemplo, apresenta grande utilidade nesse tipo de avaliação por ser uma metodologia simples e rápida, sendo necessária pequena quantidade de amostra. Além disso, fornece resultados rápidos, apresenta elevada reprodutibilidade e alto grau de confiabilidade (GÁBOR, 2003).

Entre os agentes irritantes usados nos modelos de edema de orelha, o óleo de cróton tem sido largamente empregado e é constituído por uma mistura de lipídeos, sendo o 12-*O*-tetradecanoilforbol acetato (TPA) um dos principais componentes inflamatórios. A aplicação tópica desse agente está associada à resposta inflamatória (vasodilatação, infiltração de leucócitos polimorfonucleares e edema), estresse oxidativo, proliferação e ativação de oncogenes nucleares (GARG; RAMCHANDANI; MARU, 2008).

Quando se trata da busca de mecanismo de ação de uma forma mais precisa, emprega-se o ácido araquidônico (AA) como agente inflamatório que é um ácido graxo constituinte de fosfolípidos de membrana celulares. Este agente funciona como substrato das enzimas cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) que gera mediadores da inflamação como prostaglandinas (PG), e leucotrienos (LT), respectivamente, promovendo a formação do edema. A fosfolipase A2 e a fosfolipase C e, possivelmente, a diacilglicerolipase estão envolvidas na liberação de ácido araquidônico (WYNGAARDEN; SMITH; BENETT, 1993), promovendo deste modo a inflamação.

Outro agente flogístico utilizado é o fenol, conhecido por produzir irritação imediata (LIM; PARK; KIM, 2004). Diversos mecanismos estão envolvidos na inflamação causada pelo fenol decorrentes principalmente da sua ação sobre os queratinócitos, com liberação de mediadores pró-inflamatórios, metabólitos do AA e espécies reativas de oxigênio (ERO's) (WILMER et al., 1994; MURRAY et al., 2007).

2.7 CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

2.7.1 Mecanismos envolvidos na cicatrização

Estimativas indicam que cerca de 6 milhões de pessoas sofrem de feridas crônicas em todo o mundo com quase 4,5 casos por 1000 habitantes e as feridas agudas com cerca de 10,5 casos por 1.000 habitantes (SANDHYA et al., 2011). Ambas as feridas são comuns nos países

em desenvolvimento que pode ser devido às condições de higiene deficiente e falta de acesso a medicamentos eficazes e seguros. Por isto, produtos vegetais são potenciais agentes cicatrizantes em decorrência de sua ampla disponibilidade e eficácia como preparações fitoterápicas (RAGHOW, 1994).

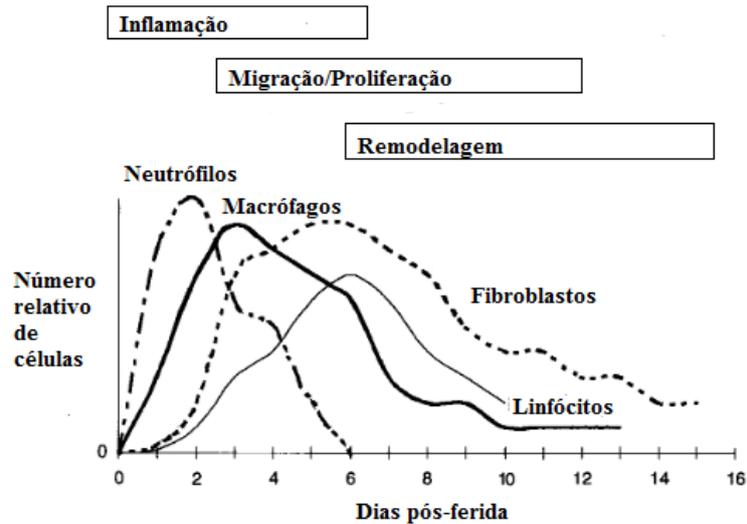
No momento que ocorre uma ferida, inicia-se um processo complexo para a cicatrização do tecido (DECLAIR, 1999), a qual consiste em uma cascata coordenada de eventos celulares e moleculares para que ocorra repavimentação e reconstituição da pele. Esta cascata consiste em um mecanismo dinâmico, envolvendo fenômenos bioquímicos e fisiológicos (FAZIO; ZITELLI; GOSLEN, 2000).

As respostas elétricas, imunológicas, inflamatórias e hormonais do processo de cicatrização também são moduladas neuralmente (KIM et al. 1998; SLOMINSKI; WORTSMAN, 2000). Por conseguinte, em situações de estresse, a hiperestimulação simpática leva a hiperatividade de glândulas e do aparelho pilosebáceo, modificando as propriedades bioelétricas e neurosecretoras da pele, causando desequilíbrio no processo de cicatrização (PINTÉR et al., 1997; ZANCANARO et al., 1999; SAUERSTEIN et al., 2000).

A classificação das lesões é essencial para definir os riscos potenciais, o que repercute no tratamento. Deste modo, a classificação das lesões leva em consideração as condições de integridade da pele, assim como a causa, gravidade e limpeza do local lesionado. Feridas de espessura parcial limitam-se à porção mais superficial da pele, cicatrizando-se por regeneração, com proliferação epitelial e migração, sem ocorrência de perda da sua função. As feridas totais promovem destruição completa do tecido acometido, podendo comprometer músculos e ossos (RAGHOW, 1994; DECLAIR, 1999).

Independente da origem da ferida, a cicatrização segue um curso previsível e contínuo, havendo uma sequência de estágios interdependentes e sobrepostos, como inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação e remodelação (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). Dependendo do enfoque, esses estágios podem ser agrupados em três ou cinco fases a saber: (1) coagulação; (2) inflamação; (3) proliferação; (4) contração da ferida; (5) remodelação (FAZIO; ZITELLI; GOSLEN, 2000; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). Em um determinado período de tempo estas fases ocorrem simultaneamente, permitindo o sucesso da cicatrização (Gráfico 2) (FAZIO; ZITELLI; GOSLEN, 2000).

Gráfico 2 - Fases da cicatrização correlacionadas com a especificidade imune celular.



Fonte: Adaptado de WITTE; BARBUL, 1997.

Considerando a fase inflamatória (Gráfico 2), esta tem como função preparar a área e imobilizar a lesão, ocorrendo inchaço, reação dolorosa e restrição dos movimentos. Nesta fase, alterações no fluxo vascular são responsáveis pelos sintomas clínicos. A próxima fase, referente à migração/proliferação, ocorre a reconstrução da estrutura, envolvendo a geração dos materiais de reparação. E por último, a fase de remodelagem fornece a forma final (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005), permitindo o fechamento da lesão, o qual é mediado por diversas substâncias, como plaquetas, leucócitos polimorfonucleares, células endoteliais, mastócitos teciduais, basófilos e monócitos/macrófagos. Além disso, o tecido lesado funciona como fontes celulares de mediadores vasoativos, os quais podem estar pré-formados e armazenados em grânulos citoplasmáticos, como a serotonina (5-HT). Podem também não estar pré-formados, como as prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LT), tromboxanas (TX) e o fator de ativação de plaquetas (PAF) que são derivados do metabolismo dos fosfolípidos ou ácido araquidônico (Tabela 1) (RUBIN; FARBER, 2000).

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

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

TGF: Fator de Crescimento de Transformação; PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas; PAF: Fator de Ativação de Plaquetas; IL: Interleucina; TNF: Fator de Necrose Tumoral; CTAP-III: Tecido conectivo quimioquina peptídeo III ativado; HGF: Fator de Crescimento dos Hepatócitos; MIP: Proteína Inflamatória para Macrófagos; HLE: *Human Leukocyte Elastase*; VEGF: Fator de Crescimento Derivado do Endotélio Vascular; RANTES: Expressão e secreção regulada da ativação normal de célula T; MCP: Proteínas Quimioatraentes para Monócito; HB-EGF: Heparina de Ligação ao EGF; EGF: Fator de Crescimento Epidérmico; MSP: Proteína Estimuladora de Macrófagos; FGF: Fator de Crescimento de Fibroblastos; IP-10: proteína induzida por interferon 10; PLGF: Fator de Crescimento de Placenta; Cyr: Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo.

Fonte: Adaptado de HATANAKA; CURI, 2007.

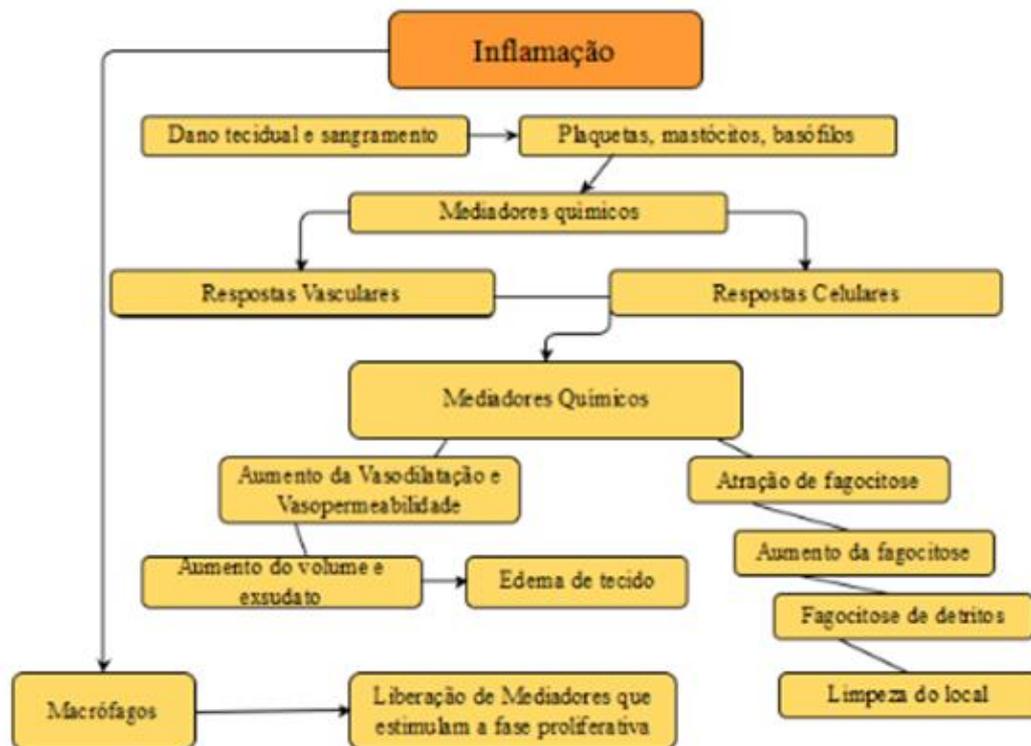
2.7.2 Fases da cicatrização

2.7.2.1 Fase inflamatória ou exsudativa

A fase inflamatória ou exsudativa começa imediatamente após a lesão, percorrendo por 48 a 72 horas após o dano tecidual. Ocorre inicialmente hemostasia, que se prolonga por até 15 minutos, com consequente vasoconstrição, na tentativa de conter a hemorragia. Posteriormente, observa-se uma vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a). Em seguida, sucede a ativação da cascata de coagulação pelo endotélio lesado, com consequente

liberação de grânulos pelas plaquetas que expressam fator de crescimento de transformação β (TGF- β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), além de fator de crescimento epidérmico (EGF), prostaglandinas (PGs) e tromboxanas (TXs) que são substâncias vasoconstritoras, atraindo neutrófilos à região lesionada (JORGE; DANTAS, 2005). A permeabilidade vascular promove extravasamento de plasma e seus componentes formando o exsudato inflamatório. Neste momento, a lesão é preenchida por coágulos, fibrinas e exsudato, formando uma crosta que isola a ferida do meio externo. O coágulo formado é constituído por colágeno, plaquetas e trombina que servem de reservatório proteico para síntese de citocinas e fatores de crescimento (Figura 6) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Figura 6 - Eventos da fase inflamatória.



Fonte: Adaptado de SANDHYA et al., 2011.

A produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6 ocorre imediatamente após a lesão, sendo os primeiros principais mediadores da resposta inflamatória aguda. Essas citocinas exercem papéis importantes na ativação de células endoteliais, induzindo a produção de óxido nítrico (NO), assim como aumento de expressão de moléculas de adesão, contribuindo para o recrutamento de mais fagócitos na área inflamada. Além disso, a IL-6 está relacionada aos processos de reparo dos efeitos quimioatrativos dos neutrófilos e indução mitótica de queratinócitos (SATO et al., 1999).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da lesão, com maior concentração em 24 horas após ter ocorrido o processo. Estas células aderem à parede do endotélio mediante ligação com receptores de membrana, mais especificamente as selectinas e produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana durante o processo. São gradativamente substituídos por macrófagos (MARTINS et al., 2006), os quais migram para a ferida após 48-96 horas da lesão e apresentam papel fundamental no término do debridamento, ou seja, remoção do tecido morto presente na lesão. Secretam citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplastia e síntese de matriz extracelular, fundamentais na transição para a fase proliferativa (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Estas células migram para a região lesada em resposta do organismo à invasão bacteriana e ao fagocitarem as bactérias se degeneram formando o pus com os tecidos necróticos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; GROTE; SCHÜTT; SCHIEFFER, 2011).

2.7.2.2 Fase proliferativa ou reconstrutiva

Esta fase é a responsável pelo fechamento da lesão propriamente dita, ou seja, formação do tecido de granulação que substituirá o tecido lesionado. Este novo tecido é rico em colágeno, preenche a lesão ao se contrair, retrai as bordas da pele lesionada para o centro, tornando menor a área a ser reepitelizada. Quando o exsudato persiste na lesão, ocorre desagregação da crosta, favorecendo o desenvolvimento de micro-organismos, os quais ficam entre a crosta e o tecido de granulação (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008). Ocorre cerca de quatro dias após o processo, durando 12 a 14 dias e compreende: reepitelização, que se inicia horas após a lesão, com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem quanto de apêndices epidérmicos, localizados no centro da lesão; fibroplasia e angiogênese. Nesta fase, os fibroblastos são os responsáveis pela produção da nova matriz extracelular. Para isto, precisam sair do seu estado de quiescência, através da ativação realizada pelo fator de crescimento PDGF. Em seguida é liberado o TGF- β que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e aqueles que se transformarem em miofibroblastos promovem a contração da ferida (Figura 7) (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

A reepitelização é a fase precoce do processo cicatricial, ocorrendo aumento da permeabilidade microvascular, proporcionando extravasamento de proteínas, citocinas e elementos celulares e formando a matriz extracelular provisória (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). Além disso, ocorre migração dos queratinócitos não danificados das bordas

das lesões e dos anexos epiteliais, aumento dos processos mitóticos, com consequente hiperplasia do epitélio. Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. Se a membrana basal for lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a).

Figura 7 - Eventos da fase proliferativa.



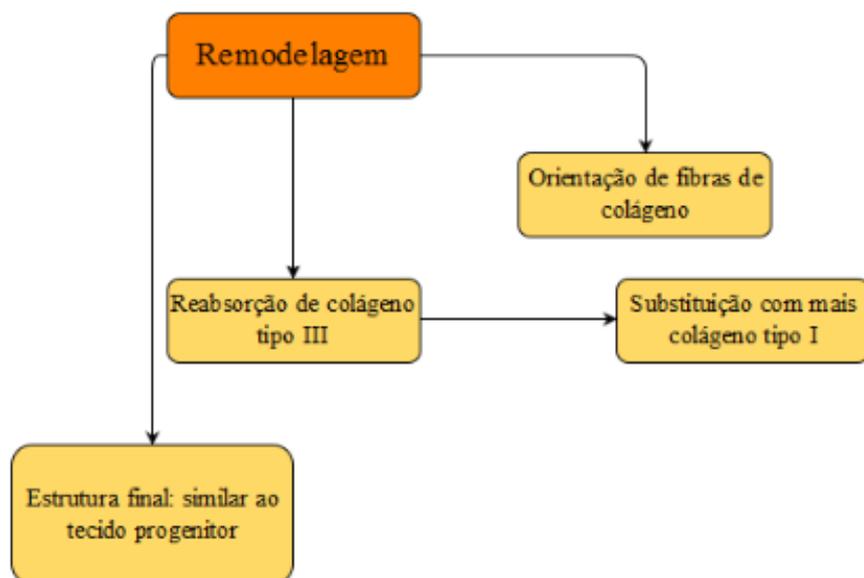
Fonte: Adaptado de SANDHYA et al., 2011.

A fibroplasia constitui a substituição da matriz extracelular por um tecido conjuntivo denso e elástico (HARTLAPP et al., 2001). A indução da angiogênese ocorre pela ação direta de fatores de crescimento sobre as células endoteliais e, em parte, pela baixa tensão de oxigênio no centro da ferida, elevados níveis de ácido láctico e aminas bioativas (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009). No entanto, inicialmente esta indução foi atribuída às moléculas identificadas, como angiogênicas, incluindo o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento de transformação β (TGF- β), angiogenina, angiotropina e angiopoetina-1 (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009). A angiogênese é etapa fundamental do processo de cicatrização, na qual novos vasos sanguíneos são formados e responsáveis por suprir nutrientes e oxigênio ao tecido em crescimento (JORGE; DANTAS, 2005).

2.7.2.3 Fase de remodelagem ou maturação

A fase de maturação ou remodelagem é o processo que organiza a cicatriz, é a fase mais longa de todo o processo, tendo início em torno da terceira ou quarta semana após o dano tecidual e pode durar meses a anos dependendo do grau, extensão e local da lesão. Durante esse período, permanece a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno, os quais comprimem os vasos, diminui a vascularização e a produção de matriz extracelular. É o retrocesso do tecido de granulação com aumento da força tênsil e reorientação das fibras de colágeno, ou seja, substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso e a recomposição celular da epiderme (JORGE; DANTAS, 2005). Os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação e presumi-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento. A collagenase, a gelatinase e outras enzimas hidrofílicas são secretadas pelos fibroblastos na lesão, e novas matrizes de proteínas são depositadas, resultando numa lesão cicatrizada. Quando a ferida completou o seu fechamento e os micro-organismos foram eliminados, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante, os quais produzem fatores de crescimento, além de atuarem no sistema imunológico (Figura 8) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Figura 8 - Eventos da fase de remodelagem.



Fonte: Adaptado de SANDHYA et al., 2011.

À medida que o tempo passa, em torno de 30 a 90 dias, pode apresentar coloração rosada, aumento de volume e se tornar sintomática. Desse período até aproximadamente um

ano, regride gradativamente, atingindo um aspecto um pouco mais claro que a pele, plana e discretamente mais larga que no seu estado inicial. Além desses eventos, ocorre também a retração da cicatriz ao longo de seu comprimento, sendo máxima aos três meses, regredindo, parcial ou totalmente, após um ano. O epitélio que recobre a cicatriz é geralmente mais fino que o normal e não apresenta papilas dérmicas (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a). Uma cicatriz cutânea completamente madura apresenta apenas 70% de resistência se comparada à pele normal (HATANAKA; CURI, 2007).

2.8 PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Os medicamentos anti-inflamatórios tópicos vêm sendo estudados a mais de 30 anos (MEYER et al., 2005). Inúmeras plantas utilizadas na medicina tradicional demonstraram promover a inibição da resposta inflamatória tópica *in vivo*, sendo que algumas delas já tiveram os compostos responsáveis por tal atividade isolados e caracterizados. Dentre as plantas com potencial atividade anti-inflamatória temos:

- *Copaifera duckei*, pertencente à família Caesalpiniaceae demonstrou atividade anti-inflamatória quando aplicado topicamente em modelo de dermatite induzida por óleo de cróton, onde há participação de mediadores obtidos pela via das cicloxigenases. (CARVALHO et al., 2005).
- *Uncaria tomentosa*, pertencente à família Rubiaceae, conhecida popularmente como unha-de-gato, apresenta atividade anti-inflamatória por inibir a produção de TNF- α e PGE2 (GONÇALVES; DINIS; BATISTA, 2005).
- *Zingiber officinale* Roscoe, pertencente à família Zingiberaceae, exibe pontencial contra inflamação por inibir a COX, a biossíntese de leucotrienos e de TNF- α (SETTY; SIGAL, 2005).
- *Garcinia hanburyi*, pertencente à família Clusiaceae, apresenta atividade inibitória sobre a inflamação aguda, verificada em modelo de edema de orelha induzido por etilfenilpropiolato de etila (EPP) em ratos, mecanismo associado à inibição da biossíntese das prostaglandinas (PANTHONG et al., 2007).
- *Arnica montana*, pertencente à família Asteraceae, apresenta atividade anti-inflamatória ao inibir o fator de transcrição NF- κ B, o qual suprime a transcrição gênica de alguns mediadores pró-inflamatórios (MERFORT, 2003).

- *Solidago chilensis*, pertencente à família Asteraceae, teve sua atividade anti-inflamatória verificada através da redução do edema de orelha, o que se dá devido à inibição da interação leucócito-endotélio (TAMURA et al., 2009).
- Extratos ou substâncias isoladas de plantas utilizadas na medicina tradicional tais como *Achillea millefolium* (Asteraceae), *Echinacea angustifolia* (Asteraceae), *Echinacea purpurea* (Asteraceae), *Hamamelis virginiana* (Hamamelidaceae), *Juniperus communis* (Cupressaceae), *Ledum palustre* (Ericaceae), *Polygonum aviculare* (Polygonaceae), *Sanguinaria canadensis* (Papaveraceae) e *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) demonstraram promover a inibição da COX e/ou 5-LOX, e assim exercendo sua atividade anti-inflamatória (BORCHERS et al., 2000).

A literatura sobre o potencial anti-inflamatório de plantas medicinais é vasta, demonstrando importante atividade destes produtos, a qual deve ser cada vez mais explorada e assegurada cientificamente, de modo a enriquecer a capacidade da flora na cura de diversas patologias.

2.9 PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADE CICATRIZANTE

Os dados relacionados ao uso de plantas medicinais para tratamento de feridas revelam que um terço destes vegetais é destinado à aplicação na pele. No entanto, poucas apresentam comprovação científica. Dessa forma, há necessidade de mais pesquisas que comprovem o uso popular, uma vez que os produtos vegetais são agentes potenciais para a cicatrização de feridas e, em grande parte, preferidos por causa da sua disponibilidade e eficácia (BALICK; COX, 1996).

Como exemplo de plantas medicinais utilizadas para o tratamento de cicatrizes e que tiveram validação científica, temos as seguintes espécies:

- *Mormodica charantia*, popularmente conhecida como melão-de-são-caetano, teve sua ação cicatrizante comprovada através da aplicação de unguentos das folhas de *M. charantia* sobre lesões cutâneas em coelhos, avaliando-se macroscopicamente a lesão e quantificando alguns parâmetros, como área de retração de feridas, infiltrado de células mononucleares, fibroblastos e vasos sanguíneos, demonstrando que o extrato hexânico apresenta potencial farmacológico como cicatrizante (VASCONCELOS et al., 2007).

- *Lantana camara*, popularmente conhecida como camará, teve sua atividade cicatrizante comprovada através da aplicação em feridas cutâneas do extrato aquoso, demonstrando aumento da taxa de contração, aumento da síntese de colágeno e redução do tempo médio de cicatrização, além do estudo histológico ter revelado maior organização das fibras de colágeno e fibroblastos, mostrando poucas células inflamatórias (NAYAK et al., 2009).
- *Persea cordata*, popularmente conhecida no sul do Brasil como pau-andrade, pertencente à família Lauraceae, teve sua comprovação científica através de um estudo no qual foi aplicado pomada à base de cascas de *P. cordata* a 10% nos animais, assim verificando uma aceleração do processo cicatricial quando comparado ao grupo controle, principalmente nos estágios iniciais do processo ao facilitar a reepitelização (VIEIRA et al., 2001).
- *Triticum vulgare*, popularmente conhecida como trigo, pertence à família Poaceae, teve seu efeito cicatrizante comprovado em um estudo utilizando animais tratados com o creme incorporado com o extrato, verificando-se a migração de células reparadoras (polimorfonucleares) ao local da lesão, estimulação da mitose, além de estimular a multiplicação e motilidade dos fibroblastos e produção de colágeno, imprescindíveis na redução do tempo de cicatrização das feridas (SOUZA et al., 2006).
- *Vernonia scorpioides*, popularmente conhecida como erva-de-são-simão, teve sua ação cicatrizante comprovada em um estudo em animais, no qual as feridas cirúrgicas tratadas com gel de carbopol incorporado com extrato etanólico a 50% tiveram o tecido conjuntivo mais organizado e coberto por tecido de granulação (LEITE et al., 2002).
- *Passiflora edulis*, popularmente conhecida como maracujá, teve sua atividade cicatrizante avaliada em um estudo no qual foi observado aumento da proliferação fibroblástica no sétimo dia e maior colagenização no 14º dia de tratamento (GARROS et al., 2006).
- *Mimosa pudica*, popularmente conhecida como dormideira, aplicados na forma de unguentos a 2% mostrou atividade significativa na cicatrização de ratos, ao aumentar a contração das feridas e reduzir o período de reepitelização, além de aumentar a força de tensão. Estes resultados podem ser atribuídos à presença de constituintes fenólicos identificados nos extratos (KOKANE et al., 2009).

- *Calotropis gigantea*, popularmente conhecida como bombardeira, ciúme ou flor-de-seda, acelerou o processo de cicatrização em ratos quando aplicado topicamente na forma de unguentos a 5%, aumentando a contração de feridas e reduzindo a área da cicatriz, além do tempo de reepitelização (DESMHUKH et al., 2009).
- Os extratos hidroalcoólicos das plantas: *Galinsoga parviflora*, *Petiveria alliacea*, *Schinus mole*, *Waltheria douradinha* e *Xanthium cavanillesii*, popularmente conhecidas como: picão branco, guiné, aroeirinha, douradinha e carrapicho, respectivamente, bem como o extrato lipofílico de *W. douradinha* mostraram ser ativos no processo de cicatrização através de ensaios biológicos, envolvendo a ação de NF-K β , MAPK, TNF- α , capase-3, elastase, migração e proliferação de fibroblastos (SCHIMIDT et al., 2009).

Esses estudos demonstram o amplo potencial de plantas medicinais com atividade cicatrizante para o tratamento de lesões cutâneas. No entanto, ainda existem inúmeras plantas utilizadas na terapêutica da cicatrização que necessitam de uma validação farmacológica para evidenciar cientificamente e serem usadas de forma segura e eficaz.

2.10 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae ou Compositae possui cerca de 1.600 gêneros e 25.000 espécies distribuídas por todo o mundo, constituindo a maior família de Eucotiledôneas (GONÇALVES, 2010; SILVA; ANDRADE, 2013; REIS, 2013) e representando cerca de 10% da flora mundial (NAKAJIMA; SEMIR, 2001). Seus representantes ocupam com sucesso os mais diversos habitats, entretanto, são mais abundantes nas regiões dos trópicos e subtropicais. São mais representadas em fisionomias campestres de alta altitude e menos frequentes nos ambientes florestais de baixa altitude, assim como em florestas tropicais úmidas (NAKAJIMA; SEMIR, 2001; FUNK et al., 2005).

No Brasil, essa família é constituída por 300 gêneros e 2.000 espécies, distribuídas em diferentes formações vegetacionais (NAKAJIMA; SEMIR, 2001; GONÇALVES, 2010) e é uma das famílias com maior diversidade no país (BORGES et al., 2010). Levantamentos florísticos da família Asteraceae demonstraram a sua importância na composição da vegetação de diferentes áreas, sendo a região sudeste um dos centros de maior riqueza desta família no Brasil, com diferença entre os campos rupestres, cerrados e campos de altitude (NAKAJIMA; SEMIR, 2001; ALMEIDA et al., 2005). No cerrado brasileiro, encontram-se um grande número de espécies endêmicas com cerca de 109 destacadas como raras (REIS,

2013). Em Minas Gerais, os tratamentos florísticos e levantamentos de espécies de Asteraceae, têm demonstrado que a família possui grande importância na composição florística e que é uma das mais importantes nos campos rupestres (ALMEIDA et al., 2005).

Várias plantas desta família são produtoras de óleo essencial de importância comercial, principalmente na Europa e nos Estados Unidos, sendo usados, em sua maioria, nas indústrias de perfumes e licores (SANTOS et al., 2011). Além de suas conhecidas propriedades medicinais, como atividade analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-helmíntica, anti-hemorragica, diurética, antiespasmódica, antiséptica, expectorante, são também utilizadas em afecções gastrointestinais, dermatológicas e enfermidades do sistema esqueleto-muscular (CZELUSNIAK, 2008; GONÇALVES, 2010). Apresenta também potencial toxicológico e alergênico, destacando-se como planta ornamental ou daninha.

Por produzirem constituintes químicos bastante promissores, são de grande interesse para a indústria farmacêutica (ARAÚJO et al., 2008). Apresentam um grupo diverso de compostos, entre eles, as lactonas sesquiterpênicas, maior grupo de substâncias ativas, com aproximadamente 3.000 estruturas, sendo as responsáveis pela atividade de relaxamento do músculo liso e anti-inflamatória, por serem potentes inibidores específicos do fator de transcrição NF- κ B. A capacidade de reduzir a inflamação pode ser devida também à presença de fenóis, como os flavonoides, por provocar uma inibição da síntese de prostaglandinas. Outras substâncias podem também ser encontradas na família Asteraceae, como taninos, poliacetilenos, alcaloides, monoterpenos, esteroides, triterpenos, cumarinas e antraquinonas (GONÇALVES, 2010).

2.11 GÊNERO *Vernonia*

O gênero *Vernonia* recebeu esta denominação em homenagem a Will Vernon, um botânico pesquisador que viajou pela América do Norte (ZANON et al., 2008). É um dos maiores e mais importante membro da família Asteraceae, representado por aproximadamente 1.500 espécies, dentre elas arbustivas, arbóreas, herbáceas, perenes e anuais, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da América, África e Ásia (BARBASTEFANO et al., 2007; TEMPONI et al., 2012). E assim sendo representadas, tanto no antigo e novo mundo, com centros de diversidade no leste da África e do Brasil (BUNWONG; CHANTARANOTHAI; KEELEY, 2014). Na América do Sul, existem cerca de 350 espécies que ocorrem principalmente no norte da Argentina, Paraguai, Bolívia e Brasil (MARTUCI et al., 2014).

Inúmeras espécies de *Vernonia* integram o elenco de plantas medicinais de várias partes do mundo, inclusive do Brasil, onde o uso de plantas como fonte de medicamentos é bastante difundido. No caso de várias espécies de *Vernonia*, destaca-se os extratos alcoólicos de *V. scorpioides* utilizados no tratamento de ferimentos cutâneos (DALAZEN et al., 2005), o macerado de folhas de *V. condensata* Baker, usado como analgésico, anti-ulcerogênico e para a prevenção de distúrbios no estômago e fígado (ZANON et al., 2008; SILVA; ANDRADE, 2013), assim como *V. amigdalina* usada como anti-helmíntica em humanos e em animais de criação (ALAWA et al., 1999). *V. anthelmintica* é utilizada no tratamento de helminto, vitiligo e câncer de mama (HORDEGEN, 2003) e as raízes de *V. kotschyana* são empregadas para o tratamento de desordens gastrointestinais e cicatrização de feridas (NERGARD et al., 2004). Além disso, as ações de *V. cinerea* com propriedades analgésica, antipirética, anti-inflamatória e citotóxica, de *V. colorata* com atividades anti-inflamatória e antibacteriana e *V. arborea* com potencial antifúngico foram comprovadas cientificamente (CAMPOS et al., 2003; OLGUIM et al., 2005).

Plantas deste gênero são ricas em glândulas oleíferas e seus óleos essenciais apresentam diferentes atividades biológicas, como antimicrobiana e inseticida. Além disso, *V. brasiliiana* possui atividade sobre *Plasmodium berghe* e *Plasmodium falciparum* devido à presença de triterpenos (MAIA et al., 2010).

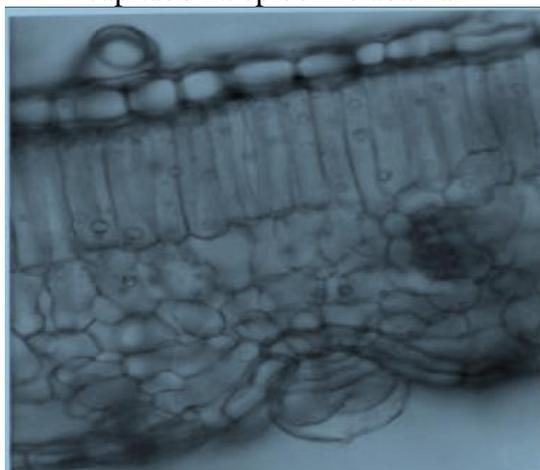
Quanto à caracterização química, o gênero *Vernonia* é rico em flavonoides e lactonas sesquiterpênicas (LST) que demonstraram propriedades anticâncer e antiespasmódica. Glicosídeos esteroidais estão relacionados à atividade anti-inflamatória, enquanto cumarinas e saponinas exercem diversas propriedades biológicas (BARBASTEFANO et al., 2007; MAIA et al., 2010; MARTUCI et al., 2014).

2.12 ESPÉCIE *Vernonia polyanthes* Less

Vernonia polyanthes Less, popularmente conhecida como assa-peixe, assa-peixe branco, estanca-sangue, tramanhém, mato-pasto, cambará-guassu, cambará-do-branco, erva-preá e enxuga é uma planta silvestre, perene, que se espalha por sementes (SILVA, 2010), comumente encontrada nos cerrados de São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais e Góias. É melífera, sendo procurada por abelhas, tanto pelo néctar, quanto pelo pólen e para a produção de própolis (MARTUCI, 2012). É considerada planta daninha, se reproduzindo em terrenos de pastagens, solos pouco férteis e beiras de estradas.

V. polyanthes é um arbusto ou pequena árvore, que atinge, em média, 2,5 metros de altura. As folhas apresentam 13 cm de comprimento e 3 cm de largura, sendo ásperas na face ventral e pilosas na face dorsal, apresentando disposição alterna, curtamente pecioladas, lancioladas, de margem serrilhada, base atenuada e ápice agudo. A lâmina foliar é dorsiventral, apresentando tricomas em ambas as faces (Figura 9), sendo que a epiderme da face adaxial é uniestratificada, e nela são encontrados tricomas simples, pluricelulares, de modo que no interior das células basais foi detectado a presença de conteúdo protéico, alcaloídico e tânico. Suas inflorescências são brancas ou rosadas, localizadas no ápice dos ramos e são compostas por capítulos com 10 a 15 flores (Figura 10A e 10B) (ALVES; NEVES, 2003).

Figura 9 - Lâmina foliar, observando a organização do mesófilo e tricoma secretor do tipo capitado na epiderme abaxial.

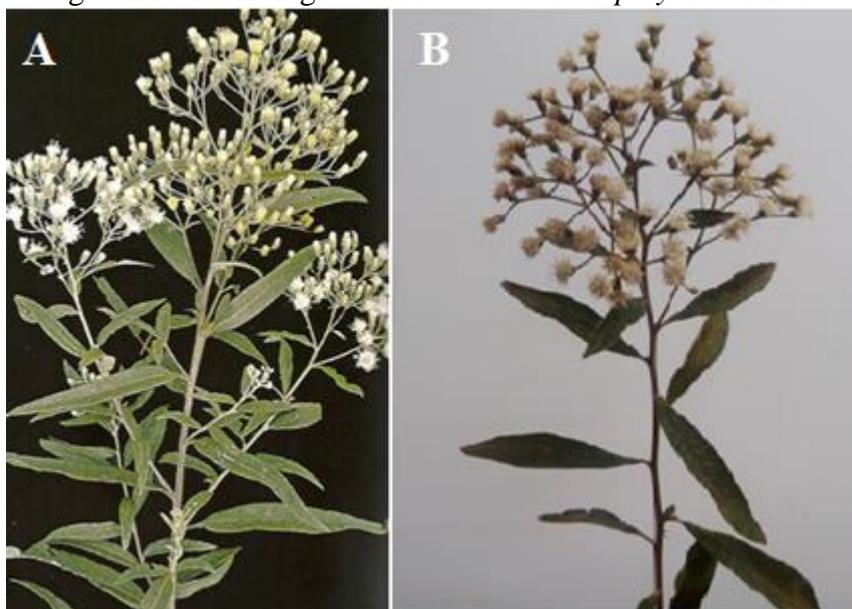


Fonte: ALVES; NEVES, 2003.

No Brasil, apesar do seu forte uso na medicina popular, suas propriedades químicas e farmacológicas ainda não foram totalmente elucidadas. Suas folhas possuem diversas propriedades medicinais, sendo popularmente utilizada sob a forma de chás ou xaropes das folhas ou flores (FONSECA, 2008), tendo efeito diurético, hipotensor, anti-hemorragico, sedativo, abortivo, anti-helmíntico, antiulcerogênico, antirreumático, cicatrizante e anti-inflamatório (SOUZA et al., 2008; TEMPONI et al., 2012). É também utilizada para tratar malária, febre (BARBASTEFANO et al., 2007), eliminar cálculos renais e tosses persistentes (SOUZA et al., 2008), infecções urinárias e sintomas gastrointestinais e respiratórios (ROMANEZI; FOGGIO; GONTIJO, 2003). Foram demonstradas ações sobre micobactérias (SILVA, 2010; JORGETTO et al., 2011), propriedades leishmanicida e antifúngica (BRAGA et al., 2007), antinociceptiva e anti-inflamatória (TEMPONI et al., 2012) e reduz a pressão

arterial, a depuração de creatinina e aumenta a excreção de sódio renal (SILVEIRA; FOGLIO; GONTIJO, 2003).

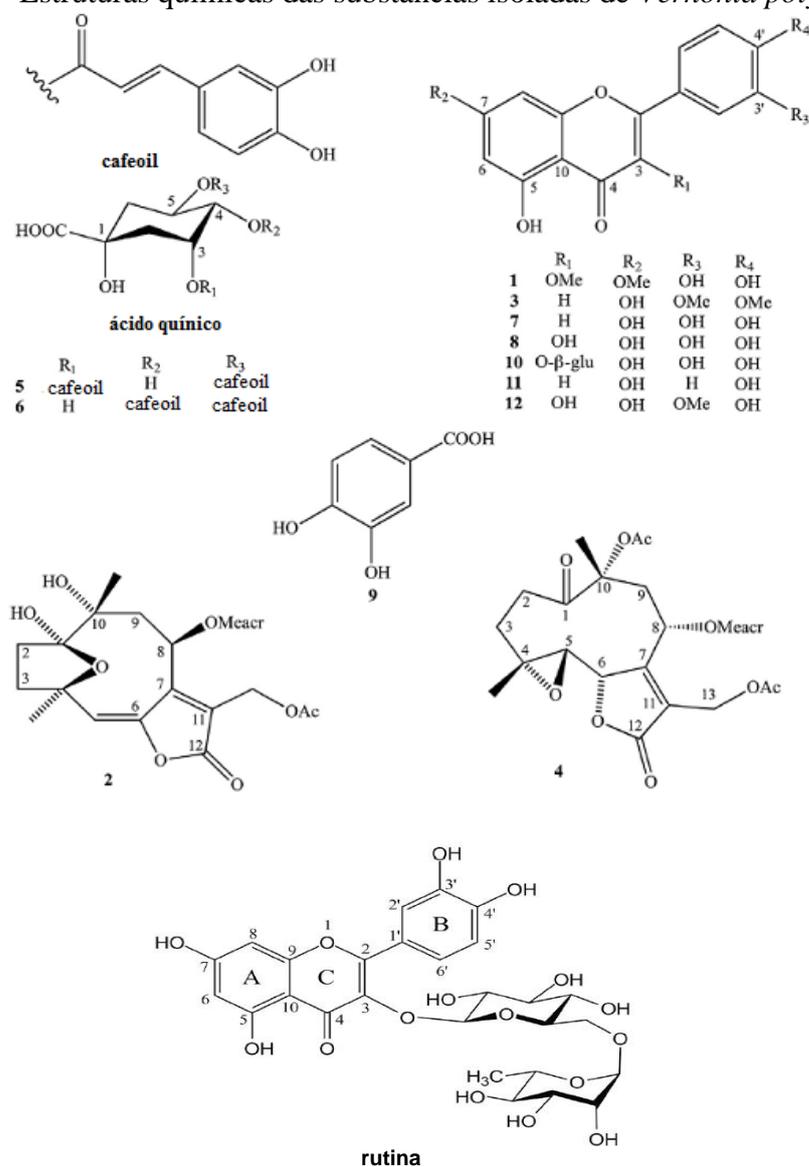
Figura 10 - Morfologia externa de *Vernonia polyanthes* Less.



A. Adaptado de LORENZI; MATOS, 2008. B. Coletada no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Na região de Minas Gerais, o decocto ou infusão de toda a planta é utilizado como antifebril, em bronquites, gripes, resfriados e tosses. As folhas e raízes dessa espécie são usadas para a eliminação de cálculos renais. Na forma de compressa têm efeito anti-reumático e na forma de chá, conferem melhora considerável em tosses persistentes (SOUZA et al., 2008). As raízes são usadas para o tratamento de tuberculose em comunidades indígenas (OLIVEIRA et al., 2007).

Foram encontrados em infusões de suas folhas, uma variedade de metabólitos secundários, os quais incluem ácidos fixos fortes, alcaloides, aminoácidos, cumarinas, esteroides livres, triterpenos, antraquinonas, flavonoides, saponinas, taninos e lactonas sesquiterpênicas (IGUAL et al., 2013; JORGETTO et al., 2011). Dentre os constituintes isolados e identificados foram citados 3,7-dimetoxi-5,3',4'-triidroxiflavona (1), piptocarpina A (2), 3',4'-dimetoxiluteolina (3), glaucolídeo (4), ácido 3,5-di-O-(E)-cafeoilquinico (5), ácido 4,5-di-O-(E)-cafeoilquinico (6), luteolina (7), quercetina (8), ácido protocatéquico (9), quercetina-3-O- β -glucosídeo (10), apigenina (11) e isorhamnetina (12) (Figura 11) (IGUAL et al., 2013). As atividades farmacológicas têm sido atribuídas a esses metabólitos (TEMPONI et al., 2012; IGUAL et al., 2013).

Figura 11 - Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Vernonia polyanthes*.

Fonte: Adaptado de IGUAL et al., 2013.

É importante mencionar que *V. polyanthes* Less tem sido estudada nos últimos anos por nosso grupo de pesquisa, resultando em duas dissertações de mestrado que demonstraram atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante e antibacteriana (TEMPONI, 2012; RODRIGUES, 2013). Além disso, Rodrigues (2013) caracterizou os constituintes químicos dos extratos hexânico, em acetato de etila e etanólico das folhas dessa espécie por cromatografia líquida de alta eficiência. Entre os constituintes encontrados no extrato etanólico, destacaram-se os flavonoides, especialmente rutina e luteolina, entre outros. Dessa forma, para realizar a presente pesquisa, além das citações da literatura e usos tradicionais de *V. polyanthes*, foram considerados os resultados já descritos e publicados por nosso laboratório.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O estudo tem como objetivo avaliar a toxicidade e as atividades anti-inflamatória e cicatrizante do extrato etanólico das folhas de *Vernonia polyanthes* Less a fim de comprovar suas propriedades medicinais apoiadas no uso popular; além de desenvolver produtos fitofarmacêuticos que, a partir de investigações científicas, possam contribuir com a terapêutica, garantindo uma melhor segurança para os usuários.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade através dos parâmetros bioquímicos, hematológicos, morfológicos e histopatológicos em ratos após administração oral do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes*.
- Desenvolver e avaliar a estabilidade de um creme dermatológico a partir do extrato etanólico das folhas de *V. polyanthes*.
- Avaliar o efeito anti-inflamatório e cicatrizante do extrato etanólico e do creme dermatológico em modelos *in vivo*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E MATERIAL VEGETAL

Vernonia polyanthes Less foi cultivada e coletada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais (MG). Uma exsicata, identificada por Dra. Fatima Regina Gonçalves Salimena do Departamento de Botânica/UFJF, foi depositada no Herbário Professor Leopoldo Krieger (CESJ) da UFJF sob nº 49336. A coleta ocorreu em março de 2009 e constou de folhas que foram submetidas à secagem em temperatura de 50°C, com ventilação forçada até perda de 90 a 96% de umidade.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO

Após coleta e secagem, as folhas foram trituradas em moinho elétrico, com peneira de granulação definida (tamise nº 20) para preparo dos extratos. A droga vegetal (450 g) foi submetida a processo de extração em etanol PA (2,5 L) por maceração estática com renovação do solvente, à temperatura ambiente, até seu esgotamento. O extrato líquido foi submetido ao rota-evaporador RII (Buchi Switzerland[®]) para remoção do solvente (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998). Para retirada da umidade, o extrato foi colocado em dessecador com sílica, obtendo 36,68 g do extrato etanólico seco (EEVP) que foi utilizado para realização dos estudos químicos, farmacológicos e farmacêuticos.

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (150-250 g), machos, com 60 dias de idade, e camundongos Swiss (25-30 g), machos, com 45 dias de idade, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF nas avaliações toxicológica e farmacológica. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração comercial tipo Nuvilab[®] e água *ad libitum* a temperatura ambiente (25 ± 4 °C). Os animais foram acondicionados em gaiola de polipropileno, de dimensão 340 mm de largura x 490 mm de comprimento x 160 mm de altura, com tampa gradeada em aço inox e comedouro embutido em “V”, contendo aproximadamente 3 cm de cama de maravalha previamente autoclavada. A maravalha foi trocada a cada 2 dias. Em cada gaiola, foi acondicionado, no máximo, seis animais. Os

protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (protocolos nº 105/2012 e 106/2012).

4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EEVP

Para este teste, o protocolo experimental compreende as observações clínicas e alterações macroscópicas dos animais com adição de parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos que possibilitam uma melhor avaliação de todos os órgãos e funções (ORLANDINI, 2012).

4.4.1 Grupos experimentais

Grupos de quinze ratos Wistar foram tratados durante 15 e 30 dias consecutivos por via oral (gavagem). Dois grupos controles (15 e 30 dias) receberam água, enquanto doses de EEVP foram administradas em três grupos experimentais (100, 200 e 400 mg/kg) durante 15 dias e em três grupos experimentais (100, 200 e 400 mg/kg) durante 30 dias.

Durante o tratamento, os sinais clínicos de toxicidade, a massa corporal dos animais e o consumo de água e ração foram registrados diariamente. Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados com cetamina 10% (75 mg/kg) e xilazina 2% (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida, procedeu-se à coleta de sangue por punção cardíaca (WAYNFORTH, 1980). Os procedimentos descritos acima foram realizados individualmente e em local isolado, a fim de evitar qualquer tipo de angústia ou estresse nos demais animais.

O sangue foi acondicionado em dois tipos de tubo: um com anticoagulante ácido etilenodiamino-tetracético (EDTA) para determinação dos parâmetros hematológicos, e o outro, sem anticoagulante, para obtenção do soro para avaliação dos parâmetros bioquímicos.

4.4.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos

Para análise hematológica, o sangue coletado com anticoagulante EDTA foi usado para determinar os valores para eritrócitos e plaquetas através de contagem em microscópio BX-51 (Olympus®). O hematócrito foi determinado através do método de micro-hemátocrito (LORENZI, 1999). A partir dos resultados da contagem eritrocitária e do hematócrito, foram calculados os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).

Determinação de hemoglobina foi realizada através de *kit* específico (Labtest[®]) e analisada em espectrofotômetro UV/VIS 1800 (Shimadzu[®]). A contagem global de leucócitos e hemácias foi realizada através da câmara de Neubauer (BERNAR, 1986).

4.4.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Para análise bioquímica, o sangue coletado foi submetido à centrífuga Excelsa Baby (Fanem[®]) a 3500 rpm durante 10 minutos para separar o soro. Aliquotas do soro foram acondicionadas em microtubos (Eppendorf[®]) e mantidas refrigeradas a 4°C.

Os parâmetros determinados foram glicose, ureia, creatinina, proteínas totais, colesterol total, triglicérides, bilirrubinas total e direta, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, albumina, ácido úrico, HDL (Lipoproteína de Alta Densidade), LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade), VLDL (Lipoproteína de Muito Baixa Densidade), amilase, LDH (Lactato Desidrogenase), Gama GT (Gama Glutamil Transferase), cálcio, CK (creatinoquinase) total e CK-MB (HENRY, 2008). As análises foram realizadas por espectrofotometria, utilizando-se *kits* comerciais da Labtest[®], seguindo as recomendações do fabricante, em espectrofotômetro UV/VIS 1800 (Shimadzu[®]).

4.4.4 Análises dos parâmetros morfológicos

Após a coleta do sangue, procedeu-se a eutanásia por aprofundamento da anestesia (cetamina 140 mg/kg e xilazina 15 mg/kg) seguida de necrópsia para avaliação da morfologia macroscópica externa dos órgãos. Cérebro, coração, pulmão, fígado, rins, baço e testículos foram cuidadosamente removidos, dissecados e sua massa úmida foi determinada em balança analítica de precisão AY 220 (Shimadzu[®]) (VIJAYALAKSHMI, MUTHULAKSHMI; SACHDANANDAM, 2000) e os valores comparados com o grupo controle. Para a avaliação histopatológica, exemplares dos órgãos removidos foram fixados em formol tamponado a 10%, e foram processados e corados com hematoxilina e eosina, de acordo com Luna (1968).

4.5 PREPARAÇÃO DO CREME DE *Vernonia polyanthes* LESS

O creme base lanette é utilizado em formulações cosméticas e farmacêuticas do tipo O/A (óleo/água). Sua composição baseia-se em duas fases, como mostrado nos Quadros 1 e 2 abaixo:

Quadro 1 - Fase oleosa do creme lanette.

Composição	Quantidade	Estudo crítico da formulação
Lanette 20%	100 g	Fase Oleosa
Vaselina Líquida 6%	30 mL	Emulsificante
BHT 0,05%	0,25 g	Antioxidante
Nipagin® 0,15%	0,75 g	Conservante

Fonte: O autor (2015).

Quadro 2 – Fase aquosa do creme lanette.

Composição	Quantidade	Estudo crítico da formulação
EDTA 0,1%	0,50 g	Antioxidante
Nipazol® 0,05%	0,25 g	Conservante
Propilenoglicol 5%	25 mL	Emulsificante
Água Destilada 68,65%	343,25 mL	Veículo

Fonte: O autor (2015).

Para preparar o creme com EEVP (cEEVP), os componentes sólidos da fórmula (oleosa e aquosa) foram pesados em balança analítica AY (Shimadzu®), separadamente. Na preparação da fase aquosa da emulsão, 0,25 g de Nipazol® e 0,50 g de EDTA foram solubilizados em 25 mL de propilenoglicol seguida de adição de água destilada. Esses componentes foram colocados em um recipiente de aço inox seguido de aquecimento em banho maria com temperatura máxima de 75°C. Na preparação da fase oleosa, solubilizou-se 0,75 g de Nipagin® e 0,25 g de BHT em 30 mL de vaselina seguida de adição de 100 g de lanette. Esta preparação foi colocada em outro recipiente de aço inox, levada ao aquecimento, sem deixar passar de 75 °C sob constante agitação manual com auxílio de um bastão de vidro. Após o preparo das duas fases separadamente, verteu-se vagarosamente a fase aquosa sobre a fase oleosa, fazendo agitação manual constante por um minuto. Após agitação, esta preparação foi submetida a um misturador (*mixer*) por um período de 15 minutos para homogeneizar e obter uma consistência adequada. Em seguida, um creme de consistência espumosa e coloração branca foi adquirido. A formulação foi devidamente armazenada e identificada para preparo do creme de *V. polyanthes* Less (PRISTA, ALVES; MORGATO, 1990; THOMPSON, 2006; BARZOTTO et al., 2009).

Para o preparo do creme de *V. polyanthes*, o EEVP foi pesado em um béquer nas três quantidades (0,10, 0,25 e 0,50 g). Em seguida, o EEVP foi solubilizado em um gral contendo propilenoglicol seguido da adição de creme lanette na quantidade suficiente para completar

100 g para cada concentração, obtendo-se o creme com 0,10, 0,25 e 0,50% (m/m) de EEVP. Após incorporação do extrato, todos os cremes foram acondicionados em um frasco devidamente identificado.

4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DO CREME DE *Vernonia polyanthes* LESS

Para padronização de produtos fitoterápicos, o estudo de estabilidade é de suma importância, pois a instabilidade pode modificar três quesitos essenciais: qualidade, eficácia e segurança (FERREIRA; SOUZA, 2007). Neste sentido, no estudo de estabilidade primeiramente são avaliadas as características organolépticas (aspecto, cor e odor), o valor de pH e a viscosidade das formulações. Estes parâmetros são analisados comparativamente, considerando-se as características iniciais do produto e suas alterações ao longo do tempo (BABY, 2005).

4.6.1 Avaliação preliminar da estabilidade

As formulações foram sujeitas às condições de estresse térmico, visando acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade. Após este teste, aquelas que apresentassem modificações seriam rejeitadas pelo estudo ou pesquisadas as possíveis modificações nos componentes das preparações para melhoria da estabilidade.

As amostras foram intercaladas em temperaturas de $50 \pm 2^\circ\text{C}$ e $-10 \pm 2^\circ\text{C}$ a cada 24 horas durante 12 dias, totalizando seis ciclos (QUEIROZ et al., 2009) e avaliadas diariamente, conforme as suas características organolépticas, dando ênfase para possíveis alterações na aparência, cor e odor. A homogeneidade, brilho e ausência de grumos e precipitados também foram avaliados. Os testes foram realizados por meio da visualização e percepção direta (FERREIRA, 2000). Este procedimento foi realizado em triplicata, usando três recipientes com 30 g cada de base creme lanette e três com 30 g de cada formulação contendo EEVP (0,10, 0,25 e 0,50%).

4.6.2 Testes de estabilidade acelerada

Neste teste, os produtos foram acondicionados em condições específicas de temperatura, de modo a fornecer informações sobre o comportamento do produto frente a diferentes variáveis (AULTON, 2005).

4.6.2.1 Teste de centrifugação

Com o intuito de verificar possíveis separações de fases, 15 gramas das formulações, lanette puro e incorporado com extrato etanólico de *V. polyanthes* nas concentrações 0,10, 0,25 e 0,50% foram submetidos à centrífuga Excelsa Baby (Fanem[®]) a 3.000 rpm por 30 minutos nos dias zero e 90, ou seja, no início e no final do experimento (BRASIL, 2004b).

4.6.2.2 Teste de submissão a temperaturas de armazenamento

As formulações foram submetidas ao armazenamento em situações de temperatura extrema, ou seja, temperatura ambiente (25 ± 2 °C), refrigerador ($-5,0 \pm 2$ °C) e estufa ($40 \pm$ °C) durante 90 dias (QUEIROZ et al., 2009). Essas formulações foram avaliadas nos dias 1, 7, 15, 30, 60 e 90 para verificar possíveis alterações nas características organolépticas (aspecto, cor e odor) (BRASIL, 2005).

As amostras foram analisadas em triplicata, utilizando-se três recipientes contendo 100 g da base do creme lanette e três com 100 g de cada formulação do EEVP (0,10, 0,25 e 0,50%) para cada temperatura analisada.

4.6.2.3 Verificação do valor de pH

A verificação do valor de pH foi realizada em um pHmêtro digital MP 220 (Mettler Toledo[®]) previamente calibrado com soluções tampão de fosfato e biftalato com pH 7 e 4, respectivamente (TAS et al., 2003). Todas as amostras foram colocadas em contato direto com o pHmêtro para verificação do pH nos dias 1, 7, 15, 30, 60 e 90 do experimento (QUEIROZ et al., 2009).

4.6.2.4 Análise reológica

Os comportamentos reológicos das amostras de base lanette e incorporada com diferentes concentrações de extrato etanólico de *V. polyanthes* (0,10, 0,25 e 0,50%) e submetidas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) foram avaliados em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) e do tempo (t), com um reômetro rotacional estacionário de taxa de cisalhamento controlada, marca ProRheo, modelo R-180. Para a construção das curvas de fluxo e de viscosidade, as amostras foram pré cisalhadas a $\dot{\gamma} = 200 \text{ s}^{-1}$ por 5 minutos a 30 °C e

submetidas a uma variação cíclica de taxa de cisalhamento, no intervalo de $100 < \dot{\gamma} < 1000 \text{ s}^{-1}$ também a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ em triplicata. Os experimentos foram repetidos nos intervalos de tempo de 1, 15, 30, 60 e 90 dias com intuito de avaliar o envelhecimento das amostras.

4.6.3 Critérios de inclusão

Os critérios adotados para aprovação das amostras avaliadas pelo teste de estabilidade foram:

- Aspecto: integridade das amostras, mantendo o aspecto inicial nas condições de armazenamento;
- Cor e odor: leves modificações em temperaturas elevadas;
- Precipitado: leves modificações que não comprometam a integridade das amostras;
- Valor de pH: leves modificações;
- Viscosidade: leves modificações que não comprometem a percepção visual das amostras.

4.6.4 Teste de estabilidade microbiológica das formulações

O método utilizado para a determinação do número de micro-organismos viáveis em meio sólido foi o de semeadura em profundidade – *pour plate* (teste de contagem microbiana). Para a determinação da contagem desses micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras), utilizou o método de contagem em placas (QUEIROZ et al., 2009).

Neste método, amostras de um grama do creme base lanette e do creme com EEVP de cada concentração (0,10, 0,25 e 0,50%) foram dispersos em 9 mL de tampão fosfato pH 7,0. Após homogeneização, a amostra foi filtrada, obtendo a diluição 1:10. O diluente tampão fosfato pH 7,0 contém 1% de Tween 80, o qual foi adicionado ao meio para atuar como inativante para o conservante presente na formulação (PINTO et al., 2002). Após homogeneização da diluição 1:10, foi realizada a transferência de um mL para outro frasco contendo nove mL do diluente, obtendo-se a diluição 1:100.

Alíquotas de um mL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri, em duplicata, sobre as quais foram vertidos 20 mL dos meios específicos, liquefeitos a 45°C . Para bactérias, utilizou-se o meio caseína-soja (TSA – Tryptic Say Agar) e, para fungos, o meio ágar Sabouraud-dextrose (SDA).

As placas com ágar caseína-soja foram incubadas em estufa à temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante cinco dias, enquanto as placas com Sabouraud-dextrose foram colocadas em estufa à $25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ durante sete dias. Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias nas placas onde ocorreu o crescimento e o resultado foi expresso em unidade formadora de colônia por grama (UFC/g) (QUEIROZ et al., 2009). Esta análise foi realizada no início e no final dos estudos, ou seja, dias 0 e 90, de modo a verificar o aparecimento e/ou desenvolvimento de micro-organismos.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A atividade anti-inflamatória tópica do extrato etanólico das folhas de *Vernonia polyanthes* foi avaliada pelo modelo de edema de orelha em camundongos. Os agentes flogísticos óleo de cróron, ácido araquidônico e fenol (Sigma-Aldrich[®]) foram dissolvidos em um volume de 20 μL de acetona (Synth[®]) e os cremes lanette, base e contendo o extrato, e a dexametasona (Germed) e/ou indometacina (Sigma-Aldrich[®]) foram aplicadas topicamente na face interna da orelha direita de cada camundongo, em uma quantidade suficiente para cobrir todo o tecido (100 mg). Na orelha esquerda de cada animal foi aplicado 20 μL de acetona (veículo). Cada ensaio foi constituído por seis grupos, todos com seis indivíduos ($n = 6$): controle negativo (sem tratamento), controle negativo (base lanette), controle positivo (dexametasona e/ou indometacina), e o creme com extrato etanólico de *V. polyanthes* em três diferentes concentrações: 0,10, 0,25 e 0,50%.

O edema foi avaliado quanto ao aumento da massa das orelhas (mg), aumento da espessura das orelhas (μm) e pelo método indireto de determinação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG). Para isso, após indução do processo inflamatório e tratamentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, medida a espessura das orelhas e discos de 6 mm de diâmetro de ambas as orelhas foram coletados através de um *punch* (Richter[®]) e pesados em balança analítica AY 220 (Shimadzu[®]). O aumento da massa da orelha foi obtido pela diferença entre a massa da orelha direita e da esquerda e os resultados expressos como média \pm desvio padrão da média (E.P.M.) das diferenças dentro de cada grupo. Igualmente o que foi realizado para obtenção da diferença de espessura entre as orelhas dos animais de cada grupo, sendo que a espessura foi medida próxima à extremidade medial. Para minimizar variações referentes às técnicas, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador.

4.7.1 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

A atividade anti-inflamatória tópica do creme contendo EEVP (cEEVP) foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por óleo de cróton descrito por Schiantarelli e colaboradores (1982). Administrou-se topicamente 20 μ L de solução de óleo de cróton 2,5% (v/v) em acetona na face interna da orelha direita de cada camundongo. Em seguida, foram administrados os tratamentos com o cEEVP (0,10, 0,25 e 0,50%), dexametasona (0,1%), creme base lanette e acetona. Seis horas após o desafio com o agente flogístico, os animais foram sacrificados e o edema avaliado quanto ao aumento da espessura (μ m) da orelha, o que também foi verificado após 24 horas da indução do processo inflamatório, juntamente com a avaliação do aumento da massa (mg) da orelha. A análise compreendeu também a determinação da atividade enzimática da MPO e NAG, como descrito no item 4.10. Amostras das orelhas (discos de 6 mm) de um animal pertencente à cada grupo foram conservadas em formol e submetidas a análise histológica, como descrito no item 4.9.

4.7.2 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico

A atividade anti-inflamatória tópica do creme com extrato etanólico de *V. polyanthes* (cEEVP) foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA) (GÁBOR, 2003). Foi administrado topicamente AA (2 mg em 20 μ L de acetona) na face interna da orelha direita de cada camundongo. Em seguida, foram administrados o cEEVP (0,10, 0,25 e 0,50%), indometacina (10%), creme base lanette e acetona. Uma hora após o desafio com o agente flogístico, os animais foram sacrificados e o edema avaliado quanto ao aumento da massa (mg) e espessura (μ m) da orelha dos camundongos (CRUMMEY et al., 1987; YOUNG et al., 1984).

4.7.3 Edema de orelha induzido por fenol

A atividade anti-inflamatória tópica do extrato etanólico de *V. polyanthes* (EEVP) foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por fenol descrito por Lim, Park e Kim (2004). Administrou-se topicamente 20 μ L de solução de fenol 10% (v/v) em acetona na face interna da orelha direita de cada camundongo. Em seguida, foram administrados os tratamentos com o cEEVP (0,10, 0,25 e 0,50%), dexametasona (0,1%), creme base lanette e acetona. Duas horas após o desafio com o agente flogístico, os animais foram sacrificados e o

edema avaliado quanto ao aumento da massa (mg) e espessura (μm) da orelha dos camundongos.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE

Para que o tratamento de uma lesão tenha sucesso, primeiramente é necessário avaliar a lesão e os fatores que podem interferir no processo de cicatrização. O cuidado se inicia avaliando a ferida, observando sua evolução e cuidando de forma individualizada e eficaz, para que não haja evolução do caso (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 10 grupos ($n = 6$): dois controles negativos (solução fisiológica e creme base lanette), dois controles positivos (dexametasona e Dersani[®]), três experimentais tratados com o EEVP (0,10, 0,25 e 0,50%) e três experimentais tratados com o creme de EEVP (0,10, 0,25 e 0,50%). Esses grupos foram separados em dois subgrupos de acordo com o período de tratamento (7 e 14 dias) (Quadro 3). Após distribuição, os animais foram anestesiados com cetamina 10% (75 mg/kg) e xilazina 2% (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida, o pelo da área dorsocostal próxima ao pescoço de cada animal foi removido e, com auxílio de um *punch* (Richter[®]) contendo lâmina cortante na borda inferior, foram produzidas incisões para retirada de fragmentos cutâneos com diâmetro de 6 mm com exposição da fáscia muscular dorsal (PACHALY, 2006). Após remoção da pele, os animais foram tratados com analgésico opioide (morfina, 2,5mg/kg, via subcutânea, a cada 4 horas por 5 dias) para evitar sofrimento doloroso.

Após um dia de indução das incisões, estas foram tratadas com quantidade suficiente para cobrir a área lesionada (200 mg para formulações semissólidas e 200 μL para formulações líquidas), sendo que os grupos referentes ao controle negativo receberam creme base lanette e solução fisiológica (0,9%). O grupo controle positivo foi tratado com acetato de dexametasona 1mg/g (Germed) e outro grupo controle positivo com Dersani[®] (uma loção cicatrizante à base de ácidos graxos essenciais, com vitaminas A e E). Nos grupos experimentais, foi aplicado creme lanette com EEVP (0,10, 0,25 e 0,50%) e em outros grupos foi aplicado o EEVP 0,10, 0,25 e 0,50% (OKAMOTO, 2010).

Os animais foram examinados diariamente quanto ao aspecto geral, para avaliação macroscópica da lesão, observando-se a presença ou ausência de hemorragia, exsudato e crosta. Ao final do tratamento (sete e 14 dias), os animais foram eutanasiados com aprofundamento da anestesia (cetamina 140 mg/kg e xilazina 15 mg/kg) por via intraperitoneal. As lesões foram avaliadas com o uso de lupa, para verificação de crostas,

secreções, cicatriz hipertrófica e verificação da ferida tecidual. O maior e o menor eixo foram medidos com micrômetro externo digital IP40 (Digimes[®]) conforme protocolos preconizados por Lopes e colaboradores (2005) e Garros e colaboradores (2006).

Quadro 3 - Esquema dos grupos submetidos à atividade cicatrizante.

CONTROLE NEGATIVO	SORO FISIOLÓGICO (NaCl 0.9%)	CREME LANETTE
CONTROLE POSITIVO	DERSANI [®]	DEXAMETASONA
GRUPO EXPERIMENTAL 1 E 4	EXTRATO 0,10%	CREME COM 0,10% DE EEVP
GRUPO EXPERIMENTAL 2 E 5	EXTRATO 0,25%	CREME COM 0,25% DE EEVP
GRUPO EXPERIMENTAL 3 E 6	EXTRATO 0,50%	CREME COM 0,50% DE EEVP

Fonte: O autor (2015).

Para a análise morfométrica, as lesões foram medidas e fotografadas nos dias zero, 4, 7 e 14, utilizando-se de uma câmera digital e as imagens foram digitalizadas em computador. A área foi calculada pela fórmula ($A = \pi \times R \times r/2$), onde R representa o eixo crânio-caudal e o r corresponde ao eixo látero-lateral da lesão (RIELLA et al., 2012). O grau de contração da área (GC) da lesão foi calculado por meio da fórmula demonstrada por Oliveira et al. (2000/2001):

$$GC = \frac{(\text{Área } T^0 - \text{Área } T^{\text{dia sacrifício}})}{\text{Área } T^0} \times 100$$

Onde: T^0 = dia zero; $T^{\text{dia sacrifício}}$ = dias 7 ou 14.

As lesões foram excisadas com 1 cm de pele íntegra, em torno da lesão, em profundidade até a fáscia muscular. Cada exemplar foi identificado individualmente, um de cada subgrupo foi colocado em solução de formalina 10% seguida de análise histopatológica

(GARROS et al., 2006; AMORIM et al., 2006). As demais foram direcionadas para medição da atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG).

4.9 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Amostras de tecido dos órgãos dos ratos submetidos ao teste de toxicidade, os discos de tecido da orelha excisadas no teste anti-inflamatório e as lesões excisadas no teste cicatrizante foram obtidas e conservadas conforme descrito anteriormente. Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) em um período de 16 horas, e em seguida conservadas em álcool 70% até início do processo de desidratação. Os materiais histológicos foram posteriormente desidratados, emblocados em parafina, seccionados em cortes de 5 μ m em um micrótomo e corados com hematoxilina e eosina. O edema (espessura do corte histológico), infiltração de leucócitos, vasodilatação e espessura da epiderme e derme foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 10x e 20x. Nesses mesmos aumentos, foram realizadas fotografias dos cortes histológicos utilizando microscópio (Olympus BX41) acoplado a câmera fotográfica digital utilizando o *software* Imagepro-Plus 4.5 (Media Cybernetics).

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS MIELOPEROXIDASE E N-ACETIL- β -D-GLUCOSAMINIDASE

Foi realizada dosagem das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) das orelhas dos camundongos submetidos ao teste anti-inflamatório e das lesões excisadas da região dorsocostal dos ratos após tratamento com extrato etanólico de *V. polyanthes* (EEVP) e do creme à base desse extrato (cEEVP).

4.10.1 Obtenção do sobrenadante

Aos fragmentos de 6 mm das orelhas dos camundongos submetidos ao teste anti-inflamatório e das feridas excisadas da região dorsocostal dos ratos submetidos ao teste cicatrizante foram adicionados 1mL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4, contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTBA). Em seguida, foram triturados por 30 segundos em gral de porcelana. Os homogenatos foram transferidos para tubos de ensaio e

adicionado mais 1mL de tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4. As amostras (2 mL) permaneceram em banho de gelo a 4 °C e sonicadas em ultrassom Ultra Cleaner 1600A (Unique[®]) por 10 minutos seguida de centrifugação a 3.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e utilizado na dosagem de proteínas totais e nos ensaios da atividade enzimática de MPO e NAG (DE YOUNG et al., 1989; SANCHEZ; MORENO, 1999).

4.10.2 Dosagem de proteínas totais

O método utilizado para dosagem de proteínas foi descrito inicialmente por Lowry e colaboradores (1951) e modificado por Sargent (1987). O ensaio foi realizado em triplicata, colocando-se 20 µL do sobrenadante obtido no item 4.10.1 em cada tubo de ensaio. Em seguida, adiciona-se 380 µL de água destilada e 2 mL da mistura reativa, a qual é composta por solução alcalina (1 g de NaOH mais 5 g de Na₂CO₃ em 250 mL de água), tartarato de cobre e sulfato de cobre. Após adicionar água e mistura reativa no tubo de ensaio, esperar por 10 minutos. Após esse tempo, foram acrescentados 200 µL de solução Folin (1:5), aguardando 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS 1800 (Shimadzu[®]) em comprimento de onda 660 nm, zerando o branco com água destilada.

4.10.3 Ensaio da atividade mieloperoxidase

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido (CAMPA, 2009; PEREIRA et al., 2000). Para a avaliação da atividade da enzima foi utilizada a metodologia de Bradley e colaboradores (1982) modificada por De Young e colaboradores (1989). Triplicatas de 25 µL do sobrenadante, obtido do homogenato do item 4.10.1, foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 25 µL de 3,3',5,5' – tetrametilbenzidina 1,6 mM em dimetilsulfóxido (DMSO), 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,003% v/v diluída em tampão fosfato de sódio 0,08 M (pH 5,4) para promover o início da reação. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos, adicionando 100 µL de ácido sulfúrico 4 M a 4 °C em cada poço para interromper a reação. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando o leitor de placas Thermoplate TR-Reader[®], cuja leitura de absorbância foi feita em 450 nm, sendo expressa em densidade óptica/mg de proteínas (dO/mg de proteínas), zerando o branco com água destilada.

4.10.4 Ensaio da atividade da N-acetil- β -D-glucosaminidase

A atividade da enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) é utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares no tecido. Esta atividade foi avaliada utilizando a metodologia de Sanchez e Moreno (1999). Triplicatas de 100 μ L do sobrenadante, obtido do homogenato no item 4.10.1, foram colocados em placas de 96 poços, adicionando 100 μ L de p-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosamina 2,24 mM em tampão citrato/fosfato de sódio 0,1 M pH 4,5, para promover o início da reação. Em seguida a placa foi incubada a 37 °C por 10 minutos e a reação interrompida pela adição de 100 μ L de tampão glicina 0,2 M pH 10,6 em cada poço. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando um leitor de placas Thermoplate TR-Reader[®], cuja leitura da absorbância foi realizada em 405 nm, sendo expressa em densidade óptica/mg de proteínas (dO/mg de proteínas), zerando o branco com água destilada.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados serão demonstrados através da média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman-Keuls foi utilizada para medir o grau de significância ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DO EEVP SOBRE OS PARÂMETROS DE TOXICIDADE

5.1.1 Efeito do EEVP sobre a massa corporal, consumo de água e ração

Após análise dos resultados, é observado que não houve diferença significativa dos parâmetros massa corporal, consumo de água e ração entre os grupos tratados com EEVP e os respectivos grupos controle durante 15 e 30 dias de experimento (Tabela 2). No entanto, como esperado, houve um aumento da massa corporal, do consumo de água e ração dos animais submetidos a 30 dias de tratamento.

Considerando os parâmetros comportamentais, não foram observados ereção de cauda, redução da atividade locomotora, taquipneia, tremor generalizado, piloereção e sedação dos indivíduos tratados durante 15 e 30 dias. Além disso, não houve morte de animal.

Tabela 2 - Valores médios da massa corporal e do consumo de água e ração de ratos tratados com EEVP durante 15 e 30 dias.

Grupo	Massa corporal (g)		Água (mL)		Ração (g)	
	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias	15 dias	30 dias
Controle	154,99±31,44	235,70±29,81	396,20±5,96	424,65±6,98	273,75±7,87	301,58±8,40
100 (mg/kg)	148,68±33,37	229,16±21,80	391,69±5,62	428,27±10,31	269,25±7,74	308,83±8,00
200 (mg/kg)	157,61±32,19	229,76±30,80	398,50±8,70	420,97±9,77	268,00±6,04	306,07±9,14
400 (mg/kg)	149,31±33,58	232,30±27,61	397,44±8,02	429,80±9,09	268,38±7,54	303,37±8,93

Os valores correspondem a média±E.P.M. de 15 ratos. Após análises de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls, as médias não diferem em relação ao grupo controle para $p < 0,05$.

Fonte: O autor (2015).

5.1.2 Efeito do EEVP sobre a massa dos órgãos

Após 15 e 30 dias de tratamento, ficou evidenciado que EEVP não produziu alteração significativa ($p < 0,05$) na massa dos órgãos removidos (cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rins e testículos) dos animais quando comparado ao grupo controle (administração oral de água) (Tabelas 3 e 4). Assim como na massa corporal, exceto o cérebro, houve um aumento da massa dos órgãos após 30 dias de tratamento em relação aos animais que foram tratados por 15 dias (Tabela 4). Adicionalmente, não foram verificadas alterações macroscópicas anormais nos órgãos dos animais pertencentes ao grupo controle e grupos que receberam EEVP.

Tabela 3 - Massa dos órgãos de ratos após 15 dias de tratamento com EEVP.

Grupo	Cérebro	Coração	Pulmão	Fígado	Baço	Rim	Rim	Testículo	Testículo
						direito	esquerdo	direito	esquerdo
Controle	1,62±0,09	0,90±0,20	1,44±0,37	8,85±1,36	0,47±0,09	0,98±0,17	0,98±0,16	1,16±0,10	1,15±0,12
100 mg/kg	1,61±0,12	0,90±0,21	1,44±0,37	8,88±1,43	0,47±0,12	0,98±0,16	0,96±0,18	1,12±0,11	1,13±0,14
200 mg/kg	1,63±0,13	0,90±0,21	1,44±0,39	8,99±1,45	0,49±0,13	0,97±0,19	0,96±0,18	1,14±0,13	1,14±0,15
400 mg/kg	1,66±0,10	0,91±0,21	1,47±0,38	8,96±1,48	0,51±0,12	0,98±0,16	0,97±0,17	1,15±0,10	1,16±0,11

Os valores correspondem a média±E.P.M. de 15 ratos. Após análises de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls, as médias não diferem em relação ao grupo controle para $p < 0,05$.

Fonte: O autor (2015).

Tabela 4 - Massa dos órgãos de ratos após 30 dias de tratamento com EEVP.

Grupo	Cérebro	Coração	Pulmão	Fígado	Baço	Rim	Rim	Testículo	Testículo
						direito	esquerdo	direito	esquerdo
Controle	1,62±0,08	1,12±0,08	1,97±0,10	10,33±0,47	0,59±0,05	1,14±0,08	1,14±0,09	1,30±0,07	1,35±0,07
100 mg/kg	1,70±0,06	1,13±0,07	1,96±0,09	10,37±0,43	0,61±0,07	1,13±0,09	1,13±0,08	1,36±0,06	1,36±0,06
200 mg/kg	1,66±0,09	1,14±0,06	1,96±0,09	10,27±0,57	0,61±0,07	1,13±0,09	1,12±0,07	1,32±0,10	1,34±0,06
400 mg/kg	1,57±0,11	1,12±0,09	1,98±0,10	10,49±0,75	0,59±0,06	1,12±0,07	1,11±0,08	1,33±0,06	1,34±0,04

Os valores correspondem a média±E.P.M. de 15 ratos. Após análises de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls, as médias não diferem em relação ao grupo controle para $p < 0,05$.

Fonte: O autor (2015).

5.1.3 Efeito do EEVP sobre os parâmetros hematológicos

As Tabelas 5 e 6 apresentam os valores dos parâmetros hematológicos após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP, respectivamente. As doses de 100, 200 e 400 mg/kg de EEVP não produziram diferença significativa entre os valores obtidos no eritrograma e leucograma quando comparadas ao grupo controle. É importante destacar que esses valores estão de acordo com aqueles de referências citados (Tabelas 5 e 6).

5.1.4 Efeito do EEVP sobre os parâmetros bioquímicos

Em relação aos parâmetros bioquímicos, após 15 e 30 dias de tratamentos com EEVP, com pequenas variações, observou-se que as concentrações dos marcadores encontram-se dentro da faixa dos valores de referência citados (Tabelas 7 e 8). Isto significa que EEVP não promoveu alterações das funções fisiológicas investigadas. No entanto, não foram encontrados na literatura valores de referência para os níveis de LDH e amilase. É possível que as concentrações de cálcio e glicose estejam abaixo das referências usadas neste estudo.

Tabela 5 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar após 15 dias de tratamento com EEVP.

Parâmetros	CN	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg	Ref ¹	Ref ²	Ref ³
Hemácias (10 ⁶ /μl)	7,09 ± 1,02	7,18 ± 0,97	7,43 ± 1,13	7,13 ± 1,25	8,65 ± 1,11 (44)	8,39 ± 0,67 (181)	8,0 ± 0,55 (23)
Hemoglobina (g/dL)	15,01 ± 1,56	15,07 ± 1,58	15,35 ± 1,96	15,39 ± 1,72	15,00 ± 1,45 (44)	15,70 ± 1,00 (181)	14,5 ± 0,78 (23)
Hematócrito (%)	41,73 ± 2,32	41,00 ± 3,25	42,07 ± 3,39	41,40 ± 4,24	43,30 ± 3,51 (42)	45,00 ± 3,5 (181)	44,2 ± 2,95 (23)
VCM (f)	60,02 ± 9,25	58,12 ± 9,41	57,74 ± 9,19	59,82 ± 12,56	47,75 ± 2,89 (19)	53,5 ± 2,4 (181)	55,5 ± 2,22 (23)
HCM (pg)	21,69 ± 4,51	21,36 ± 4,32	21,12 ± 4,34	22,35 ± 5,17	16,51 ± 0,30 (17)	18,9 ± 0,8 (181)	18,2 ± 0,57 (23)
CHCM (g/dL)	36,03 ± 3,90	36,93 ± 5,50	36,72 ± 5,50	37,67 ± 6,66	34,89 ± 2,41 (17)	35,30 ± 1,2 (181)	32,8 ± 1,09 (23)
Leucócitos (10 ³ /μL)	7,94 ± 1,34	7,92 ± 1,12	7,93 ± 1,11	7,93 ± 1,05	7,63 ± 2,37 (44)	4,52 ± 1,81 (181)	9,7 ± 2,21 (23)
Neutrófilos (%)	29,80 ± 3,28	29,33 ± 4,45	29,80 ± 5,10	30,73 ± 4,99	33,16 ± 14,99 (26)	15,5 ± 5,5 (178)	24,8 ± 7,85 (23)
Linfócitos (%)	62,80 ± 4,07	62,27 ± 4,65	61,67 ± 5,46	61,63 ± 5,94	67,36 ± 15,31 (42)	80,2 ± 6,3 (179)	70,00 ± 7,37 (23)
Monócitos (%)	4,00 ± 1,20	4,20 ± 1,47	3,67 ± 1,40	3,73 ± 1,33	5,27 ± 3,52 (34)	1,9 ± 0,7 (179)	3,90 ± 1,31(23)
Eosinófilos (%)	3,33 ± 0,90	3,60 ± 1,35	4,20 ± 1,66	3,27 ± 1,67	1,25 ± 1,09 (24)	1,3 ± 0,8 (179)	1,30 ± 0,82(23)
Basófilos (%)	0,53 ± 0,52	0,60 ± 0,63	0,67 ± 0,72	0,60 ± 0,63	0,92 ± 0,74 (28)	0,3 ± 0,2 (181)	-----
Plaquetas (10 ³ /μL)	829,53 ± 124,90	877,07 ± 136,65	871,33 ± 128,03	879,33 ± 182,50	982,34 ± 167,05 (44)	904,00 ± 137,00 (181)	1095,00 ± 152,56 (23)

Os valores correspondem à média ± E.P.M. de 15 ratos. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais e controle negativo (CN) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. EEVP: Extrato etanólico de *V. polyanthes*. Fonte: O autor (2015).

Ref¹: Lima et al., 2014.

Ref²: CLIFFORD; GIKNIS 2008.

Ref³: Melo et al, 2012

(n): número de animais não informado.

-----: dosagem não realizada

Tabela 6 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar após 30 dias de tratamento com EEVP.

Parâmetros	CN	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg	Ref ¹	Ref ²	Ref ³
Hemácias (10 ⁶ /μl)	7,27 ± 0,51	7,66 ± 0,62	7,87 ± 0,71	7,56 ± 0,79	8,65 ± 1,11 (44)	8,39 ± 0,67 (181)	8,0 ± 0,55 (23)
Hemoglobina (g/dL)	15,11 ± 1,64	15,33 ± 1,91	15,35 ± 2,03	15,41 ± 1,90	15,00 ± 1,45 (44)	15,70 ± 1,00 (181)	14,5 ± 0,78 (23)
Hematócrito (%)	44,20 ± 4,26	43,80 ± 3,41	44,67 ± 4,82	44,67 ± 3,70	43,30 ± 3,51 (42)	45,00 ± 3,5 (181)	44,2 ± 2,95 (23)
VCM (f)	61,21 ± 8,24	57,41 ± 5,61	57,16 ± 7,74	59,92 ± 9,62	47,75 ± 2,89 (19)	53,5 ± 2,4 (181)	55,5 ± 2,22 (23)
HCM (pg)	20,95 ± 3,14	20,09 ± 2,72	19,55 ± 2,25	20,60 ± 3,42	16,51 ± 0,30 (17)	18,9 ± 0,8 (181)	18,2 ± 0,57 (23)
CHCM (g/dL)	34,23 ± 2,37	35,01 ± 3,43	34,63 ± 5,36	34,66 ± 4,64	34,89 ± 2,41 (17)	35,30 ± 1,2 (181)	32,8 ± 1,09 (23)
Leucócitos (10 ³ /μL)	7,51 ± 0,92	7,52 ± 0,82	7,37 ± 0,84	7,39 ± 0,84	7,63 ± 2,37 (44)	4,52 ± 1,81 (181)	9,7 ± 2,21 (23)
Neutrófilos (%)	30,07 ± 5,22	28,67 ± 4,58	31,00 ± 4,46	27,40 ± 5,85	33,16 ± 14,99 (26)	15,5 ± 5,5 (178)	24,8 ± 7,85 (23)
Linfócitos (%)	62,47 ± 5,40	62,80 ± 4,96	60,73 ± 4,30	64,67 ± 4,91	67,36 ± 15,31 (42)	80,2 ± 6,3 (179)	70,00 ± 7,37 (23)
Monócitos (%)	3,87 ± 1,77	4,20 ± 1,26	3,93 ± 1,44	3,60 ± 1,24	5,27 ± 3,52 (34)	1,9 ± 0,7 (179)	3,90 ± 1,31(23)
Eosinófilos (%)	3,07 ± 1,16	3,67 ± 1,72	3,60 ± 1,30	3,67 ± 1,23	1,25 ± 1,09 (24)	1,3 ± 0,8 (179)	1,30 ± 0,82(23)
Basófilos (%)	0,67 ± 0,62	0,60 ± 0,63	0,73 ± 0,88	0,73 ± 0,70	0,92 ± 0,74 (28)	0,3 ± 0,2 (181)	-----
Plaquetas (10 ³ /μL)	844,20 ± 121,57	897,73 ± 147,85	885,33 ± 128,14	885,33 ± 128,14	982,34 ± 167,05 (44)	904,00 ± 137,00 (181)	1095,00 ± 152,56 (23)

Os valores correspondem à média ± E.P.M. de 15 ratos. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais e controle negativo (CN) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. EEVP: Extrato etanólico de *V. polyanthes*. Fonte: O autor (2015).

Ref¹: Lima et al., 2014.

Ref²: CLIFFORD; GIKNIS, 2008.

Ref³: Melo et al, 2012

(n): número de animais não informado.

-----: dosagem não realizadas.

Tabela 7 - Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar após 15 dias de tratamento com EEVP.

Parâmetros	CN	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg	Ref ¹	Ref ²	Ref ³
Creatinina (mg/dL)	0,40 ± 0,12	0,50 ± 0,12	0,55 ± 0,13	0,57 ± 0,17	0,58 ± 0,24 (38)	0,5 ± 0,07 (42)	0,30 ± 0,10 (163)
Uréia (mg/dL)	38,59 ± 5,04	39,36 ± 4,88	39,81 ± 4,74	40,12 ± 5,10	39,97 ± 6,78 (38)	48,00 ± 7,60 (35)	17,10 ± 2,90 (164)
Proteínas Totais (g/dL)	6,22 ± 1,03	6,81 ± 0,24	6,53 ± 0,96	6,58 ± 0,87	5,75 ± 0,87 (37)	-----	6,00 ± 0,50 (164)
Albumina (g/dL)	3,78 ± 0,67	3,84 ± 0,47	3,95 ± 0,43	4,10 ± 0,50	2,65 ± 0,30 (38)	-----	4,00 ± 0,40 (164)
Globulina (g/dL)	2,44 ± 0,92	2,59 ± 0,98	2,58 ± 0,78	2,51 ± 0,83	3,50 ± 1,15 (38)	-----	2,00 ± 0,20 (144)
Ácido úrico (mg/dL)	1,70 ± 0,31	1,74 ± 0,32	1,77 ± 0,33	1,76 ± 0,42	1,81 ± 0,67 (18)	-----	-----
Colesterol Total (mg/dL)	93,97 ± 8,47	91,92 ± 8,01	81,68 ± 8,16 ^{***}	76,97 ± 7,89 ^{***}	60,68 ± 6,51 (22)	87,00 ± 18,10 (51)	58,00 ± 13,00 (165)
Triglicerídeos (mg/dL)	99,35 ± 10,25	94,20 ± 8,27	87,39 ± 9,21 ^{**}	73,70 ± 6,74 ^{***}	46,87 ± 18,73 (30)	82,00 ± 24,70 (38)	44,00 ± 21,00 (163)
HDL (mg/dL)	30,23 ± 5,16	32,78 ± 5,13	38,79 ± 4,60 ^{**}	41,31 ± 9,40 ^{***}	-----	48,00 ± 11,40 (37)	-----
LDL (mg/dL)	43,87 ± 10,37	40,30 ± 9,88	25,41 ± 8,77 ^{***}	20,99 ± 9,35 ^{***}	-----	22,60 ± 1,80 (n)	-----
VLDL (mg/dL)	19,87 ± 2,05	18,84 ± 1,65	17,51 ± 1,84 ^{**}	14,77 ± 1,38 ^{***}	-----	16,40 ± 4,90 (38)	-----
AST (U/L)	51,63 ± 5,38	61,98 ± 6,84 ^{***}	77,42 ± 7,44 ^{***}	69,52 ± 7,83 ^{***}	131,33 ± 43,98 (33)	-----	105,00 ± 20,00 (163)
ALT (U/L)	29,81 ± 4,49	40,59 ± 6,44 ^{***}	34,61 ± 6,42 [*]	44,28 ± 6,84 ^{***}	57,55 ± 11,05 (33)	-----	28,00 ± 7,00 (164)
Fosfatase Alcalina (U/L)	62,34 ± 7,67	90,54 ± 11,02 ^{***}	83,05 ± 10,30 ^{***}	99,97 ± 10,75 ^{***}	91,63 ± 28,70 (29)	124,00 ± 6,10 (42)	113,00 ± 44,00 (163)
GAMA-GT (U/L)	3,18 ± 0,97	3,08 ± 0,80	3,04 ± 0,84	3,02 ± 0,90	3,47 ± 1,74 (19)	-----	-----
BILD (mg/dL)	0,22 ± 0,03	0,24 ± 0,05	0,25 ± 0,04	0,25 ± 0,06	0,03 ± 0,02 (37)	-----	0,04 ± 0,01 (109)
BILI (mg/dL)	0,18 ± 0,05	0,17 ± 0,07	0,18 ± 0,05	0,20 ± 0,04	0,06 ± 0,05 (37)	-----	0,06 ± 0,03 (139)
BILT (mg/dL)	0,40 ± 0,05	0,41 ± 0,06	0,43 ± 0,06	0,45 ± 0,05	9,08 ± 0,04 (37)	-----	0,09 ± 0,03 (165)
LDH (U/L)	84,26 ± 8,28	87,15 ± 9,22	91,83 ± 13,17	92,43 ± 14,02	-----	-----	-----
Cálcio (mg/dL)	6,09 ± 0,66	6,24 ± 0,63	6,36 ± 0,76	6,26 ± 0,67	8,19 ± 1,63 (16)	-----	10,40 ± 0,50 (165)
Amilase (U/L)	888,93 ± 90,27	896,28 ± 89,85	910,95 ± 112,48	957,05 ± 110,97	-----	-----	-----
Glicose (mg/dL)	85,89 ± 15,49	75,62 ± 15,84	80,98 ± 12,77	79,89 ± 13,94	138,72 ± 30,17 (29)	108,00 ± 7,40 (64)	123,00 ± 38,00 (165)

Os valores correspondem à média ± E.P.M. de 15 ratos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo (CN) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. EEVP: Extrato etanólico de *V. polyanthes*. Fonte: O autor (2015).

Ref¹: Lima et al., 2014.

Ref²: Dantas et al., 2006.

Ref³: CLIFFORD; GIKNIS, 2008.

(n): número de animais não informado.

-----: dosagem não realizada

Tabela 8 - Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar após 30 dias de tratamento com EEVP.

Parâmetros	CN	100mg/kg	200mg/kg	400mg/kg	Ref ¹	Ref ²	Ref ³
Creatinina (mg/dL)	0,47 ± 0,09	0,53 ± 0,14	0,53 ± 0,15	0,54 ± 0,23	0,58 ± 0,24 (38)	0,50 ± 0,07 (42)	0,30 ± 0,10 (163)
Uréia (mg/dL)	39,29 ± 5,57	40,35 ± 5,94	41,49 ± 6,57	42,46 ± 7,09	39,97 ± 6,78 (38)	48,00 ± 7,6 (35)	17,10 ± 2,90 (164)
Proteínas Totais (g/dL)	6,74 ± 0,74	6,81 ± 0,62	6,89 ± 0,69	7,01 ± 0,65	5,75 ± 0,87 (37)	-----	6,00 ± 0,50 (164)
Albumina (g/dL)	3,96 ± 0,45	4,02 ± 0,54	4,05 ± 0,41	4,14 ± 0,51	2,65 ± 0,30 (38)	-----	4,00 ± 0,40 (164)
Globulina (g/dL)	2,75 ± 0,91	2,79 ± 0,91	2,84 ± 0,98	2,87 ± 0,84	3,50 ± 1,15 (38)	-----	2,00 ± 0,20 (144)
Ácido úrico (mg/dL)	1,72 ± 0,42	1,83 ± 0,49	1,87 ± 0,44	1,92 ± 0,53	1,81 ± 0,67 (18)	-----	-----
Colesterol Total (mg/dL)	93,76 ± 8,62	89,82 ± 6,92	76,54 ± 4,71 ^{***}	73,28 ± 7,11 ^{***}	60,68 ± 6,51 (22)	87,00 ± 18,10 (51)	58,00 ± 13,00 (165)
Triglicerídeos (mg/dL)	96,01 ± 9,93	93,54 ± 10,40	84,68 ± 8,38 ^{**}	68,32 ± 8,97 ^{***}	46,87 ± 18,73 (30)	82,00 ± 24,70 (38)	44,00 ± 21,00 (163)
HDL (mg/dL)	30,41 ± 5,01	32,30 ± 5,92	38,54 ± 4,77 ^{***}	41,55 ± 3,94 ^{***}	-----	48,00 ± 11,40 (37)	-----
LDL (mg/dL)	44,15 ± 10,48	38,31 ± 10,06	21,06 ± 5,73 ^{***}	18,06 ± 7,44 ^{***}	-----	22,60 ± 1,80 (n)	-----
VLDL (mg/dL)	19,20 ± 1,99	18,72 ± 2,08	16,94 ± 1,68 ^{**}	13,67 ± 1,80 ^{***}	-----	16,40 ± 4,90 (38)	-----
AST (U/L)	54,56 ± 7,15	83,43 ± 5,77 ^{***}	75,18 ± 8,31 ^{***}	66,27 ± 8,94 ^{***}	131,33 ± 43,98 (33)	-----	105,00 ± 20,00 (163)
ALT (U/L)	32,69 ± 4,81	42,04 ± 5,98 ^{***}	37,87 ± 7,58 [*]	47,62 ± 7,65 ^{***}	57,55 ± 11,05 (33)	-----	28,00 ± 7,00 (164)
Fosfatase Alcalina (U/L)	79,83 ± 15,95	106,61 ± 14,63 ^{***}	103,24 ± 13,05 ^{**}	109,71 ± 15,92 ^{***}	91,63 ± 28,70 (29)	124,00 ± 6,10 (42)	113,00 ± 44,00 (163)
GAMA-GT	3,37 ± 0,94	3,15 ± 0,74	3,06 ± 0,96	3,02 ± 0,93	3,47 ± 1,74 (19)	-----	-----
BILD (mg/dL)	0,24 ± 0,04	0,25 ± 0,04	0,26 ± 0,04	0,27 ± 0,05	0,03 ± 0,02 (37)	-----	0,04 ± 0,01 (109)
BILI (mg/dL)	0,19 ± 0,08	0,20 ± 0,06	0,20 ± 0,06	0,27 ± 0,06	0,06 ± 0,05 (37)	-----	0,06 ± 0,03 (139)
BILT (mg/dL)	0,43 ± 0,09	0,45 ± 0,07	0,46 ± 0,07	0,49 ± 0,07	9,08 ± 0,04 (37)	-----	0,09 ± 0,03 (165)
LDH (U/L)	86,26 ± 9,08	87,57 ± 8,55	91,08 ± 12,35	93,78 ± 16,83	-----	-----	-----
Cálcio (mg/dL)	6,39 ± 0,71	6,36 ± 0,97	6,77 ± 0,89	6,70 ± 1,01	8,19 ± 1,63 (16)	-----	10,40 ± 0,50 (165)
Amilase (U/L)	891,98 ± 106,34	907,56 ± 115,40	947,32 ± 122,40	982,80 ± 154,39	-----	-----	-----
Glicose (mg/dL)	84,36 ± 14,03	80,89 ± 12,53	75,34 ± 9,49	75,25 ± 9,28	138,72 ± 30,17 (29)	108,00 ± 7,40 (64)	123,00 ± 38,00 (165)

Os valores correspondem à média ± E.P.M. de 15 ratos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo (CN) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. EEVP: Extrato etanólico de *V. polyanthes*. Fonte: O autor (2015).

Ref¹: Lima et al., 2014.

Ref²: Dantas et al., 2006.

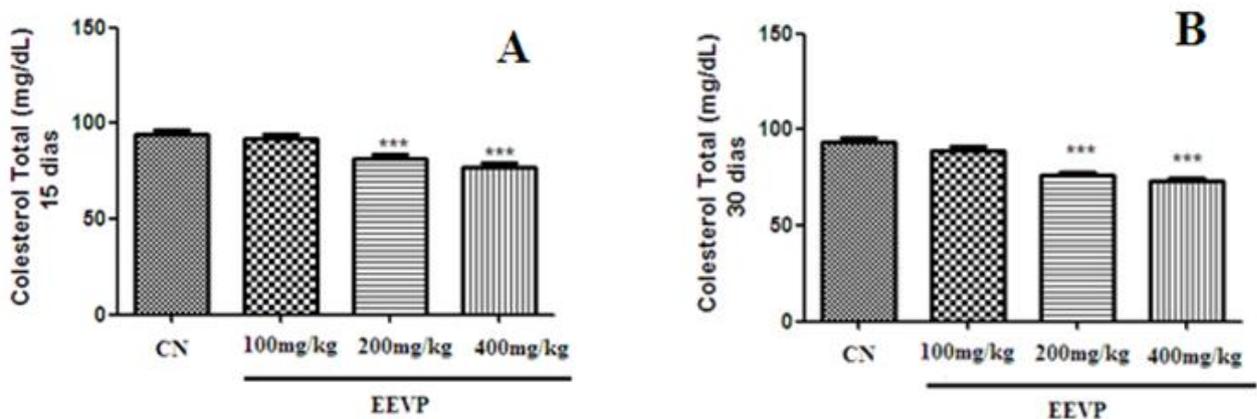
Ref³: CLIFFORD; GIKNIS, 2008.

(n): número de animais não informado.

-----: dosagem não realizada

Com base nos dados das Tabelas 7 e 8, após comparação das médias entre os grupos experimentais e controle, foi verificado que os valores do lipidograma (colesterol total, triglicérides, HDL-c, LDL-c e VLDL) e das enzimas AST, ALT e fosfatase alcalina são significativamente diferentes (Tabelas 7 e 8). As doses de 200 e 400 mg/kg de EEVP, após 15 dias de tratamento, reduziram ($p < 0,001$) o colesterol total em 13,08 e 18,09%, respectivamente, enquanto que, após 30 dias, essa redução foi de 18,36 e 21,84%, respectivamente (Gráficos 3A e 3B).

Gráfico 3 - Valores séricos de colesterol total em ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.

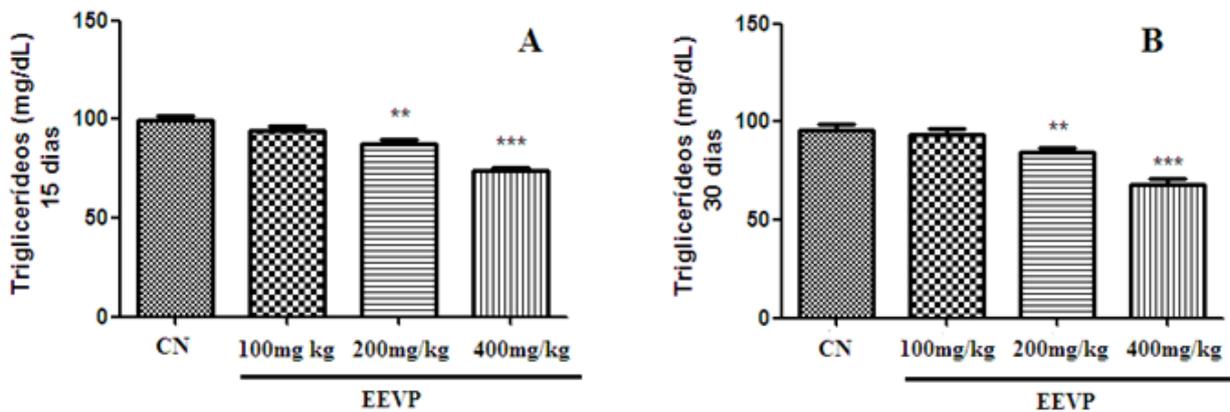


Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de 15 ratos. **A.** Níveis de colesterol total após 15 dias de tratamento. **B.** Níveis de colesterol total após 30 dias de tratamento. *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo (CN) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. EEVP: Extrato etanólico de *V. polyanthes*.

Fonte: O autor (2015).

Os níveis de triglicérides e VLDL foram reduzidos nas mesmas proporções. Após 15 dias de tratamento com 200 e 400 mg/kg do EEVP, os triglicérides diminuíram em 12,03% ($p < 0,01$) e 25,81% ($p < 0,001$), respectivamente. O tratamento de 30 dias também promoveu uma redução de 11,80 ($p < 0,01$) e 28,84% ($p < 0,001$), respectivamente, de triglicérides nas respectivas doses (Gráficos 4A e 4B).

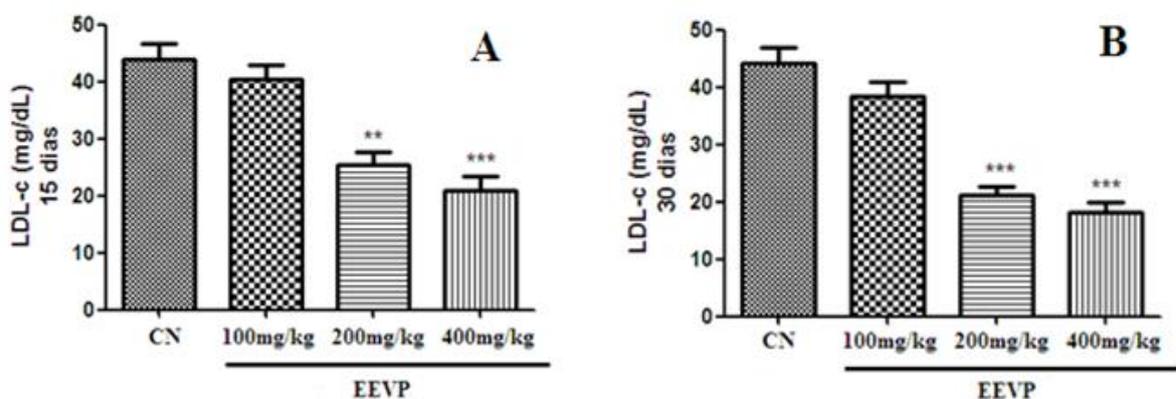
Gráfico 4 - Valores séricos de triglicerídeos em ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de 15 ratos. **A.** Níveis de triglicerídeos após 15 dias de tratamento. **B.** Níveis de triglicerídeos após 30 dias de tratamento. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo (CN) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. EEVP: Extrato etanólico de *V. polyanthes*.
Fonte: O autor (2015).

O gráfico 5 mostra que EEVP foi capaz de reduzir o LDL-c nas doses de 200 e 400 mg/kg quando comparadas ao grupo controle após 15 e 30 dias de tratamento. Considerando as doses, os percentuais de redução foram 200 mg/kg (42,07%; $p < 0,01$) e 400 mg/kg (52,15%; $p < 0,001$) para 15 dias e 200 mg/kg (52,30%; $p < 0,001$) e 400 mg/kg (59,09%; $p < 0,001$) após 30 dias (Gráficos 5A e 5B).

Gráfico 5 - Valores séricos de LDL-c em ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.

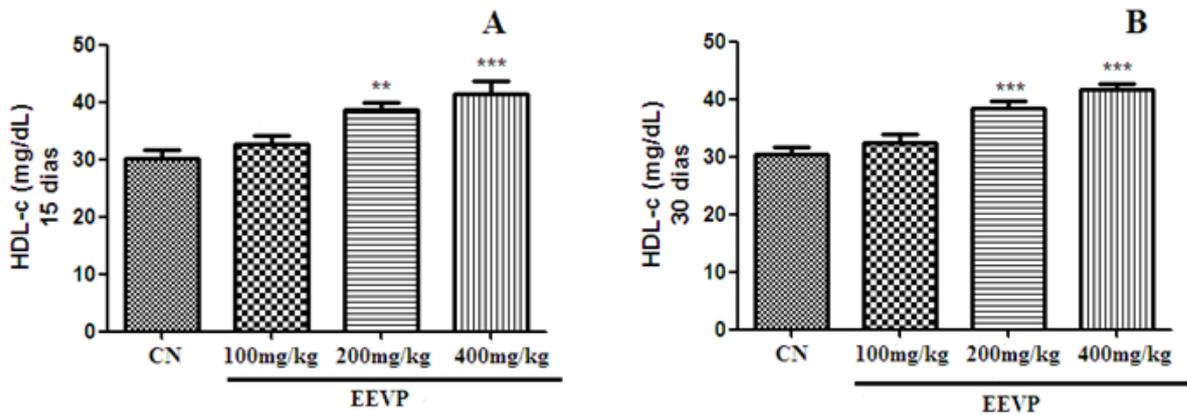


Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de 15 ratos. **A.** Níveis de LDL-c após 15 dias de tratamento. **B.** Níveis de LDL-c após 30 dias de tratamento. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo (CN) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. EEVP: Extrato etanólico de *V. polyanthes*.
Fonte: O autor (2015).

Comparando os níveis de HDL-c, observa-se que nos dois períodos (15 e 30 dias) de tratamento com EEVP houve alterações significativas neste parâmetro (Gráficos 6A e 6B).

Para o período de 15 dias, a dose 200 mg/kg elevou os níveis de HDL-c em 28,31% ($p < 0,01$), enquanto 400 mg/kg em 36,65% ($p < 0,001$). O tratamento de 30 dias com EEVP produziu um aumento de 26,73% (200 mg/kg; $p < 0,001$) e 36,63% (400 mg/kg; $p < 0,001$).

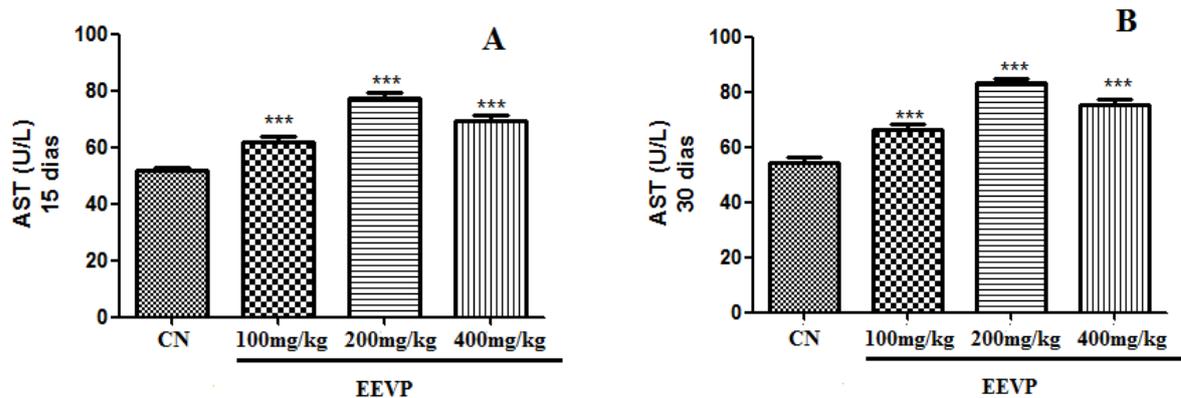
Gráfico 6 - Valores séricos de HDL-c em ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de 15 ratos. **A.** Níveis de HDL-c após 15 dias de tratamento. **B.** Níveis de HDL-c após 30 dias de tratamento. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo (CN) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. EEVP: Extrato etanólico de *V. polyanthes*.
Fonte: O autor (2015).

Em relação aos parâmetros da função hepática, foi constatado aumento significativo nas dosagens das enzimas AST, ALT e fosfatase alcalina dos grupos que receberam EEVP nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg em ambos os períodos de tratamento (15 e 30 dias) quando comparado ao grupo controle. Considerando essas doses, os níveis de AST aumentaram em 20,05, 49,95 e 34,65% ($p < 0,001$) após 15 dias, respectivamente. Após 30 dias, a elevação foi 21,46, 52,91 e 37,79% ($p < 0,001$) nas respectivas doses (Gráficos 7A e 7B).

Gráfico 7 - Valores séricos de AST em ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.

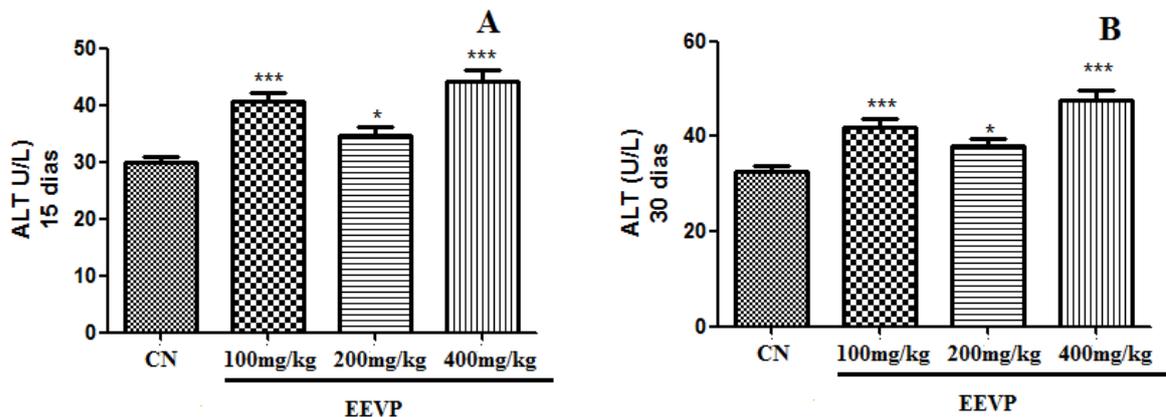


Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de 15 ratos. **A.** Níveis de AST após 15 dias de tratamento. **B.** Níveis de AST após 30 dias de tratamento. *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo (CN) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. EEVP: Extrato etanólico de *V. polyanthes*.

Fonte: O autor (2015).

Analisando os valores de ALT, o aumento foi de 36,16% ($p < 0,01$), 16,10% ($p < 0,05$) e 48,54% ($p < 0,001$) nos grupos que receberam 100, 200 e 400 mg/kg de EEVP, respectivamente, no período de 15 dias (Gráfico 8A). Essas doses também elevaram os níveis de ALT em 28,60 (100 mg/kg; $p < 0,001$), 15,84 (200 mg/kg; $p < 0,05$) e 45,67% (400 mg/kg; $p < 0,001$) após 30 dias de tratamento (Gráfico 8B).

Gráfico 8 - Valores séricos de ALT em ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.

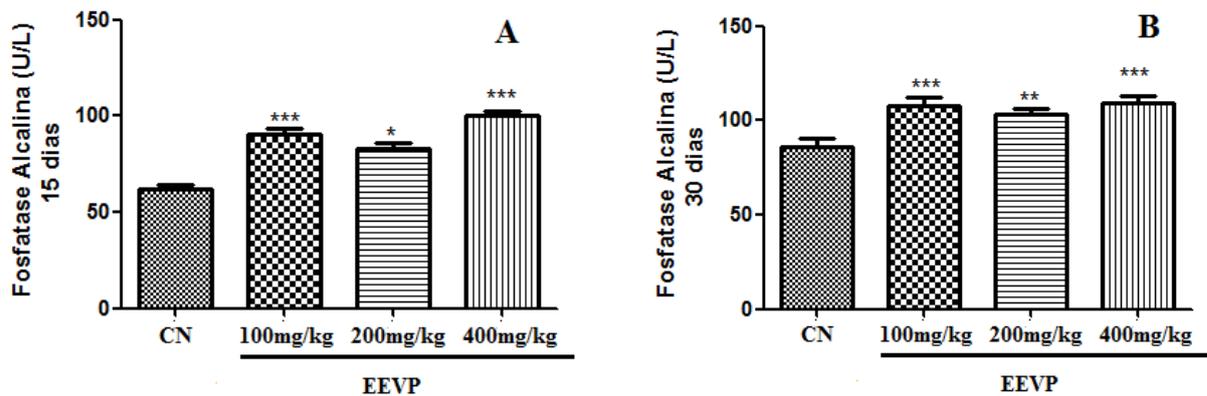


Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de 15 ratos. **A.** Níveis de ALT após 15 dias de tratamento. **B.** Níveis de ALT após 30 dias de tratamento. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo (CN) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. EEVP: Extrato etanólico de *V. polyanthes*.

Fonte: O autor (2015).

Após 15 dias de tratamento, constatou-se uma elevação dos níveis de fosfatase alcalina nas doses de 100 mg/kg (45,23%; $p < 0,001$), 200 (33,22%; $p < 0,05$) e 400 mg/kg (60,36%; $p < 0,001$) (Gráfico 9A). As doses de 100, 200 e 400 mg/kg também aumentaram as concentrações de fosfatase alcalina em 33,55% ($p < 0,001$), 29,32% ($p < 0,01$) e 37,43% ($p < 0,001$), respectivamente, após 30 dias de tratamento (Gráfico 9B).

Gráfico 9 - Valores séricos de fosfatase alcalina em ratos Wistar após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. de 15 ratos. **A.** Níveis de fosfatase alcalina após 15 dias de tratamento. **B.** Níveis de fosfatase alcalina após 30 dias de tratamento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo (CN) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. EEVP: Extrato etanólico de *V. polyanthes*.

Fonte: O autor (2015).

5.1.5 Efeito do EEVP sobre os parâmetros histopatológicos

As análises dos diferentes órgãos (cérebro, coração, pulmão, fígado, baço, rim direito, rim esquerdo, testículo direito e testículo esquerdo) mostraram que não houve alterações relevantes na estrutura dos tecidos após 15 e 30 dias de tratamento com EEVP. Considerando o tratamento de 30 dias (mais prolongado) e a maior dose (400 mg/kg), a Figura 12 mostra cortes representativos dos tecidos de diferentes órgãos avaliados. Após secção, os cortes do tecido cerebral apresentaram estruturas tais como vasos (A), neurônios (B), camada granulosa (C), substância branca (D) e substância cinzenta (E) (Figuras 12A1 e 12A2). O tecido cardíaco mostrou-se uma estrutura com células estriadas (A), multinucleadas (B) e alongadas (Figuras 12B1 e 12B2) com ausência de processo inflamatório, hemorragia, ruptura de fibras e necrose. O tecido pulmonar foi representado nas Figuras 12C1 e 12C2, onde a maior parte da massa pulmonar está constituída por sacos alveolares (A) e alvéolos (B), além de bronquíolos (C) e presença de vasos (D). Os cortes do tecido hepático revelaram a presença

Figura 12 – Continuação.

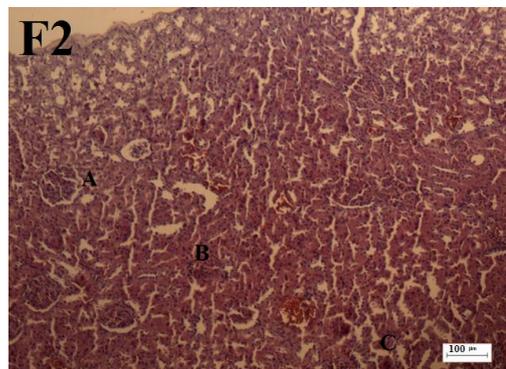
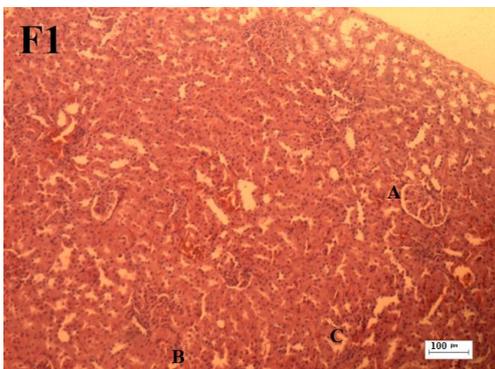
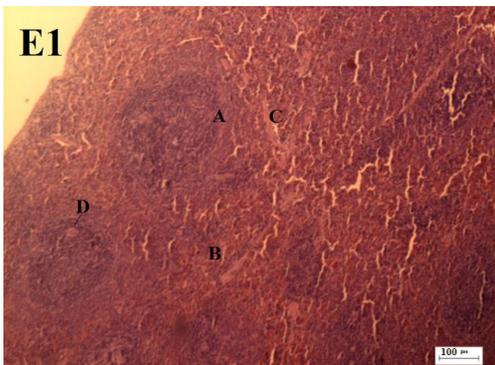
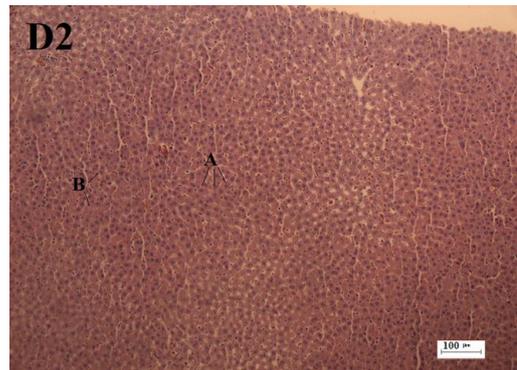
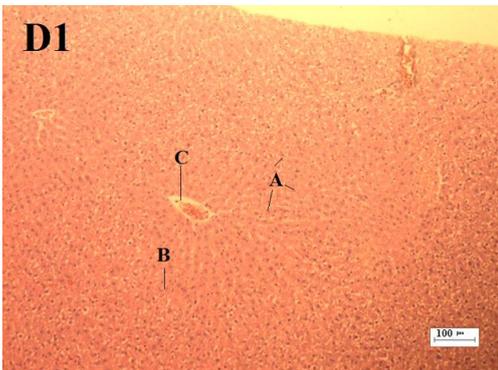
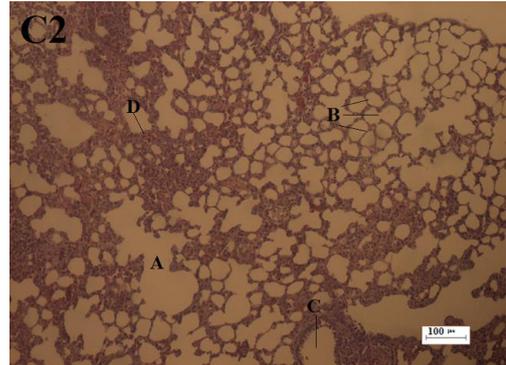
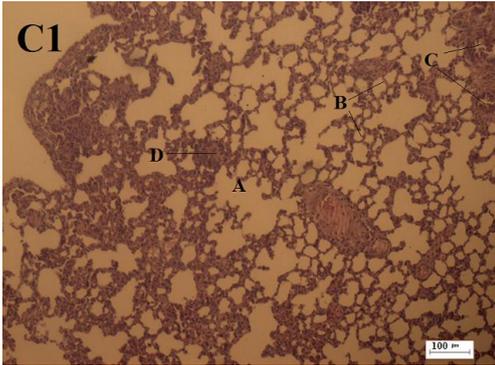
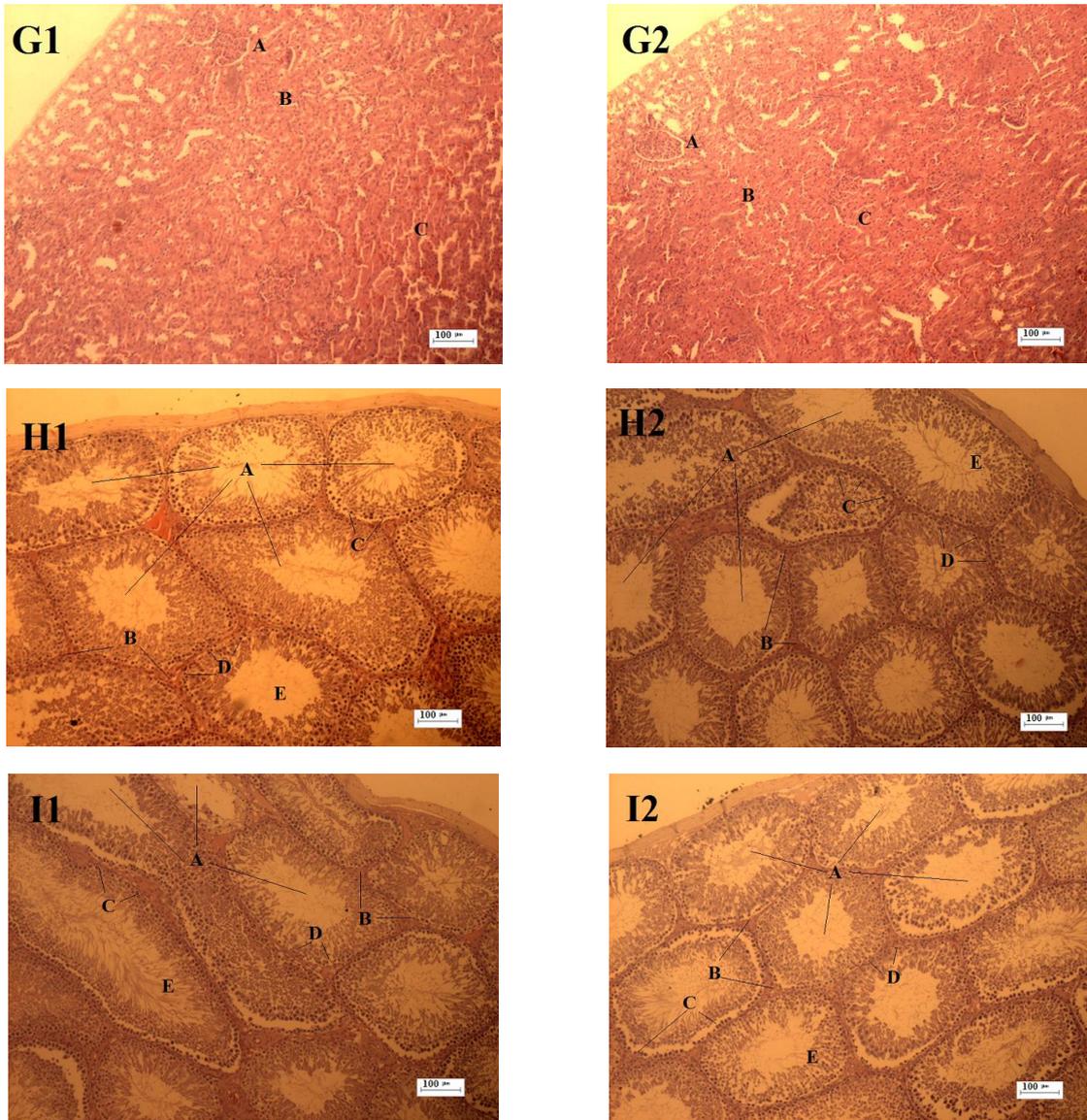


Figura 12 – Continuação.



Cortes histológicos de tecidos de ratos corados com hematoxilina-eosina (10x, escala de 100 µm). Órgãos: (A) Cérebro; (B) Coração; (C) Pulmão; (D) Fígado; (E) Baço; (F) Rim Direito; (G) Rim Esquerdo; (H) Testículo Direito; (I) Testículo Esquerdo.

Fonte: O autor (2015).

5.2 ESTABILIDADE DO CREME DE EEVP

5.2.1 Estabilidade preliminar

O estudo de estabilidade mostrou que os resultados da avaliação preliminar foram considerados satisfatórios, pois todas as preparações mostraram-se estáveis no decorrer dos 12 dias de observação. Não houve sinais de instabilidade, como separação de fases, nem alteração da cor, odor, aparência e homogeneidade. Em relação à coloração, o creme lanette

apresentou cor branca, que é característica do produto, e o creme com extrato etanólico de *V. polyanthes* (EEVP) apresentou cor verde claro, verde médio e verde escuro nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, respectivamente. Essa coloração foi observada no momento da incorporação e permaneceu durante o período de análise (Tabela 9 e Figura 13).

Tabela 9 - Características do creme lanette e preparações contendo 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP submetidos a temperaturas alternadas de $50 \pm 2^\circ\text{C}$ e $-10 \pm 2^\circ\text{C}$.

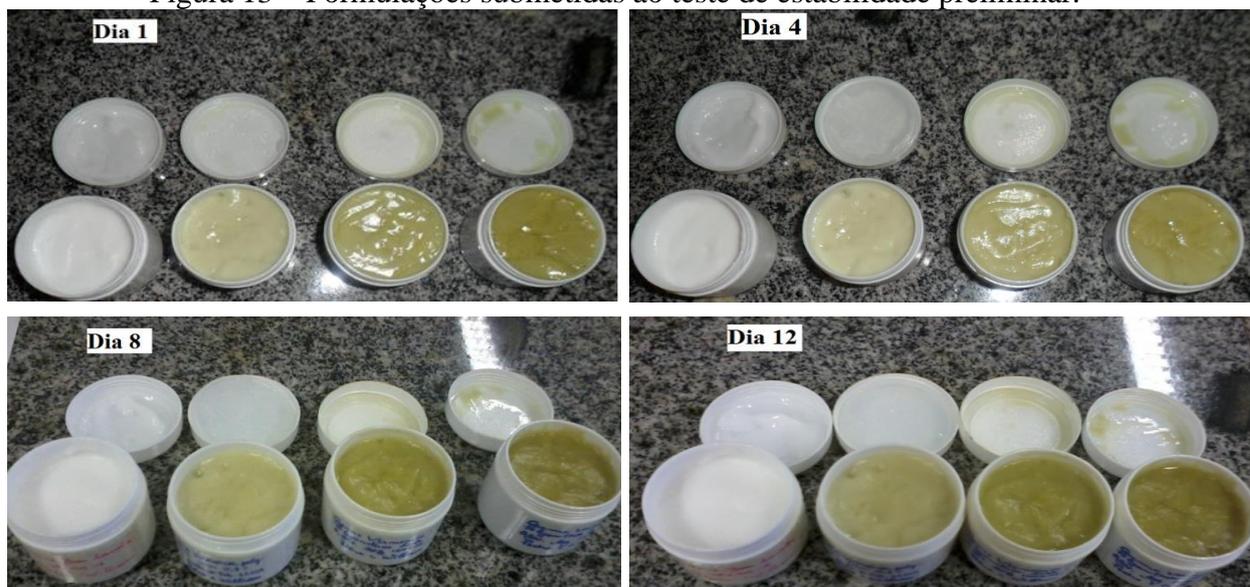
Tempo (dias)	Aspecto	Cor	Odor	PPT
1	Homogêneo	B/VC/VM/VE	Característico	Ausência
2	Homogêneo	B/VC/VM/VE	Característico	Ausência
3	Homogêneo	B/VC/VM/VE	Característico	Ausência
4	Homogêneo	B/VC/VM/VE	Característico	Ausência
5	Homogêneo	B/VC/VM/VE	Característico	Ausência
6	Homogêneo	B/VC/VM/VE	Característico	Ausência
7	Homogêneo	B/VC/VM/VE	Característico	Ausência
8	Homogêneo	B/VC/VM/VE	Característico	Ausência
9	Homogêneo	B/VC/VM/VE	Característico	Ausência
10	Homogêneo	B/VC/VM/VE	Característico	Ausência
11	Homogêneo	B/VC/VM/VE	Característico	Ausência
12	Homogêneo	B/VC/VM/VE	Característico	Ausência

B= branco; VC= verde claro; VM= verde médio; VE= verde escuro. PPT = precipitado. Teste realizado em triplicata.

Fonte: O autor (2015).

Todas as formulações foram consideradas adequadas para dar prosseguimento ao estudo de estabilidade acelerada e aos testes microbiológico, de centrifugação e reológico para confirmar a qualidade do produto. Além disso, essas formulações foram usadas na avaliação dos efeitos anti-inflamatório e cicatrizante.

Figura 13 – Formulações submetidas ao teste de estabilidade preliminar.



Nota: Da esquerda para direita, creme lanette seguida de preparações contendo 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP, respectivamente. Dias 1 e 8: submetidos a $-10 \pm 2^\circ\text{C}$. Dias 4 e 12: submetidos a $50 \pm 2^\circ\text{C}$.

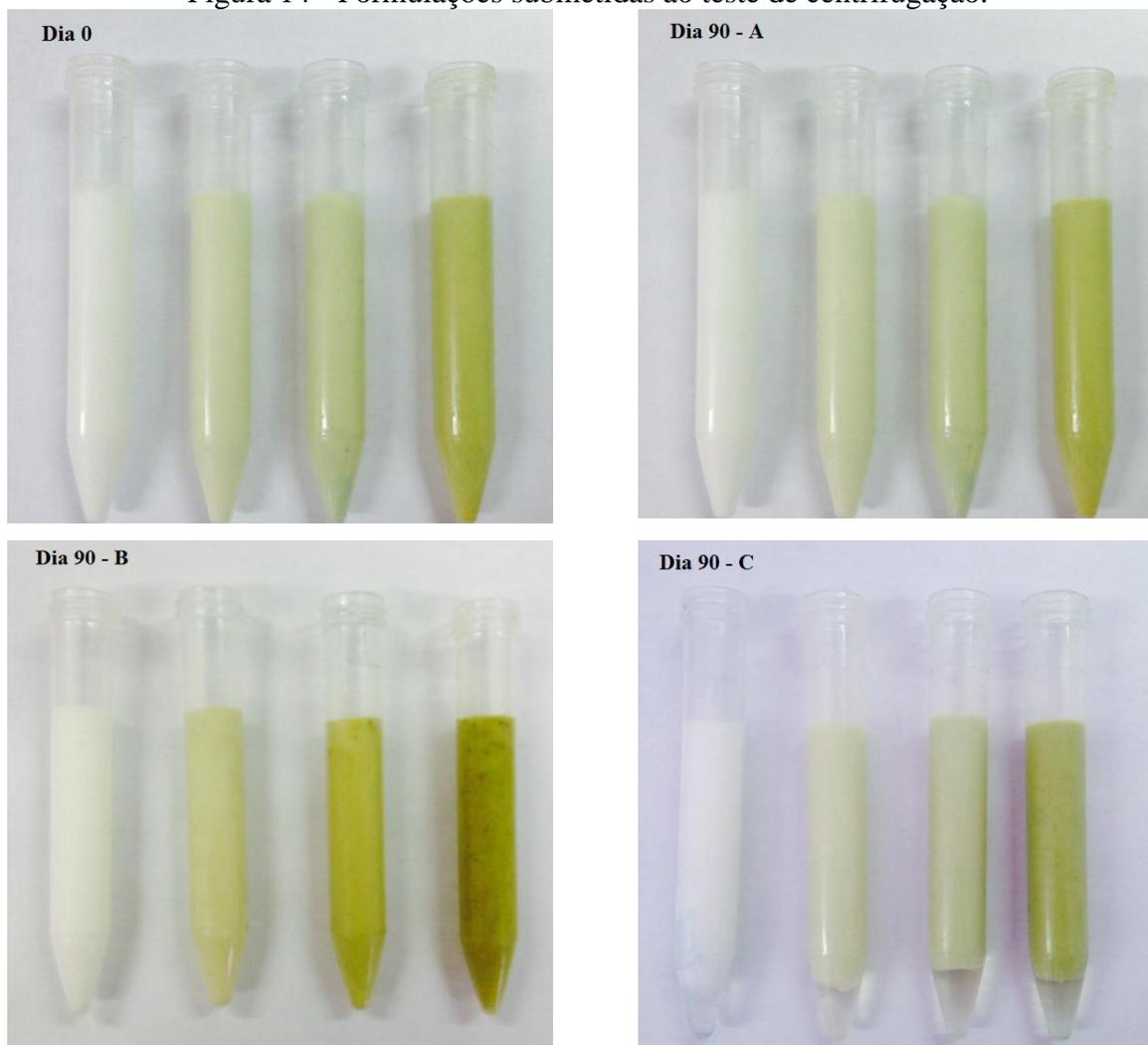
Fonte: O autor (2015).

5.2.2 Estabilidade acelerada

5.2.2.1 Centrifugação

A centrifugação foi realizada como análise preliminar, a fim de determinar qualquer sinal de instabilidade indicativa de necessidade de reformulação (BRASIL, 2004b). Como pode ser observado na Figura 14, no dia zero não houve separação de fases em nenhuma das formulações, tanto no creme lanette quanto no creme incorporado com EEVP nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%. Após 90 dias, as formulações submetidas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e à estufa ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) não sofreram nenhuma alteração em relação à separação de fases. No entanto, as formulações submetidas ao freezer ($-5 \pm 2^\circ\text{C}$) apresentaram as fases separadas (aquosa e oleosa).

Figura 14 - Formulações submetidas ao teste de centrifugação.



A. Formulações submetidas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C); **B.** Formulações submetidas à estufa (40 ± 2 °C); **C.** Formulações submetidas ao freezer (-5 ± 2 °C).

Fonte: O autor (2015).

5.2.2.2 Características organolépticas

A Tabela 10 mostra os perfis da estabilidade das formulações de creme lanette e creme incorporado com EEVP (cEEVP) nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% submetidas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Considerando a análise das características organolépticas (aspecto, cor, odor e formação de precipitado) nos dias previamente estabelecidos (1, 7, 15, 30, 60 e 90), não foram verificadas alterações relevantes (Figura 15).

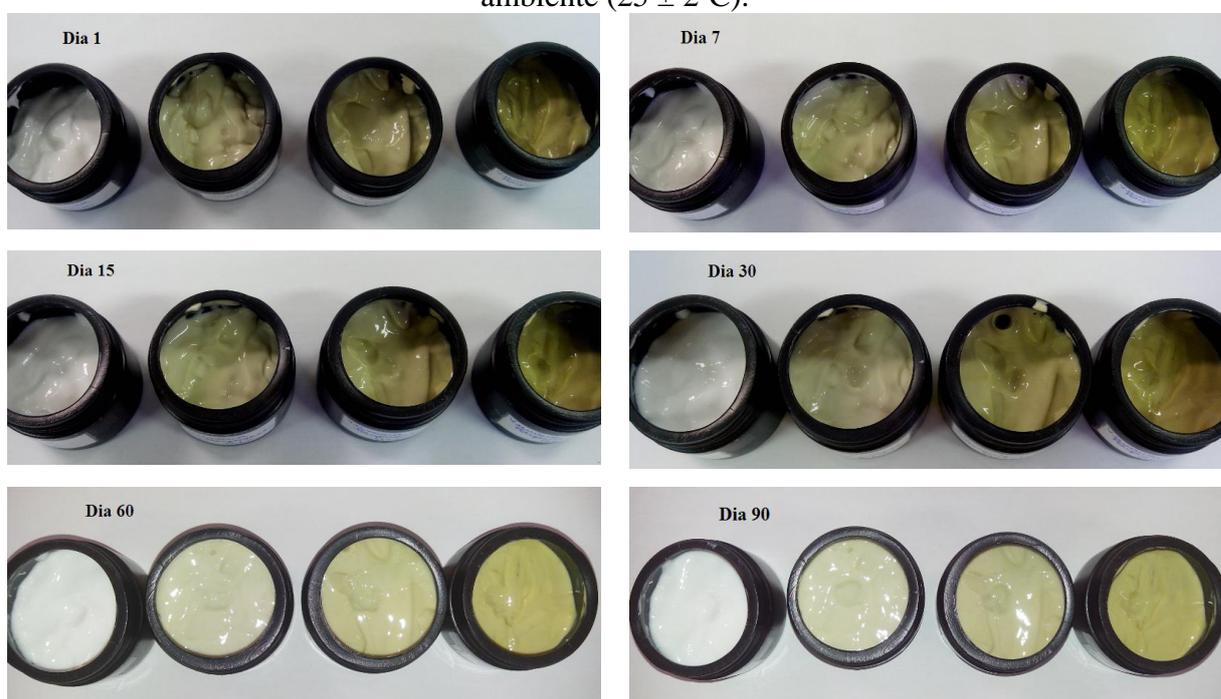
Tabela 10 - Características organolépticas no teste de estabilidade acelerada das formulações em estudo submetidas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Formulações	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Lanette	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au
cEEVP 0,10%	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au
cEEVP 0,25%	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au
cEEVP 0,50%	H/VE/OS/Au	H/VE/OS/Au	H/VE/OS/Au	H/VE/OS/Au	H/VE/OS/Au	H/VE/OS/Au

cEEVP: creme incorporado com extrato etanólico de *Vernonia polyanthes*; H: homogêneo; B: branco; VC: verde claro; VM: verde médio; VE: verde escuro; OS: *odor sui generis*; Au: ausência de precipitado.

Fonte: O autor (2015).

Figura 15 - Características organolépticas das formulações submetidas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).



Nota: Da esquerda para direita: creme lanette seguida de preparações contendo 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP, respectivamente.

Fonte: O autor (2015).

Na Tabela 11 encontram-se as características organolépticas das formulações submetidas à alta temperatura ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) nos dias pré-estabelecidos para análise. O odor e a formação de precipitado permaneceram inalterados após 90 dias de avaliação (Figura 16). No entanto, após 90 dias, todas as formulações (creme lanette puro e incorporado com as três concentrações do EEVP) apresentaram características de endurecimento de superfície.

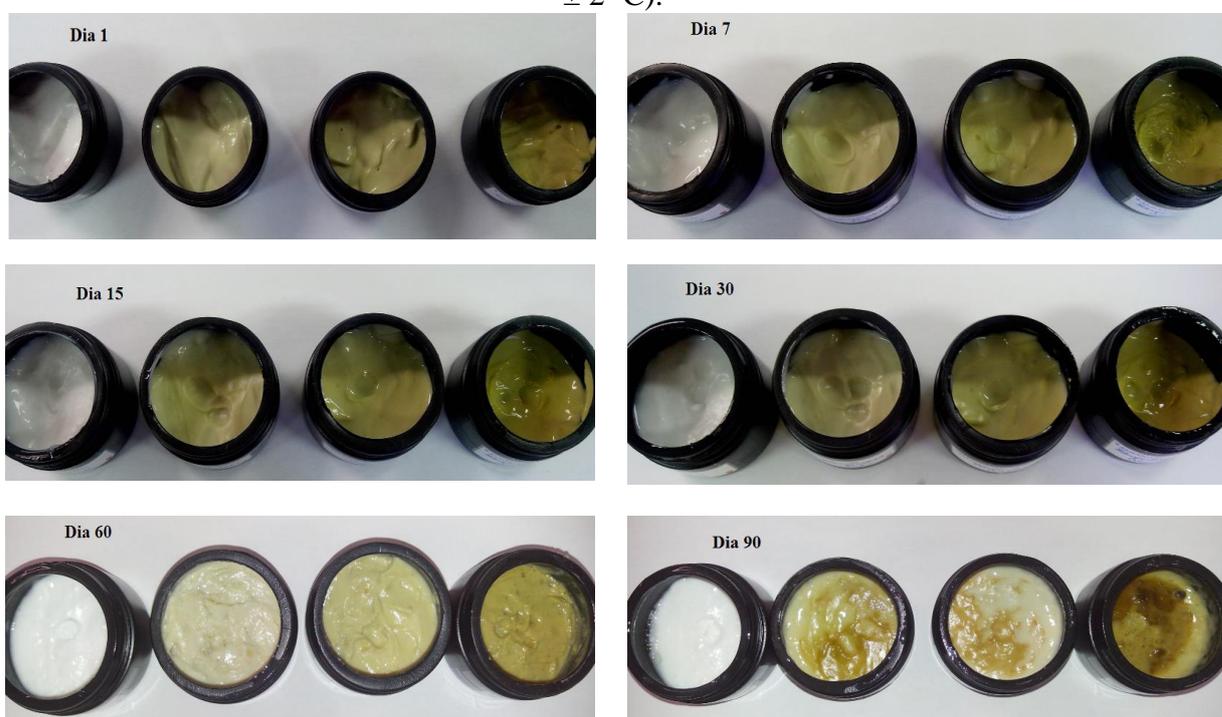
Tabela 11 - Características organolépticas no teste de estabilidade acelerada das formulações em estudo submetidas à alta temperatura ($40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

Formulações	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Lanette	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au	M/B/OS/Au
cEEVP 0,10%	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au	M/VC/OS/Au
cEEVP 0,25%	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	M/VM/OS/Au
cEEVP 0,50%	H/VE/OS/Au	H/VE/OS/Au	H/VE/OS/Au	H/VE/OS/Au	H/VE/OS/Au	M/VE/OS/Au

cEEVP: creme incorporado com extrato etanólico de *Vernonia polyanthes*; H: homogêneo; B: branco; VC: verde claro; VM: verde médio; VE: verde escuro; OS: *odor sui generis*; Au: ausência de precipitado; M: modificado.

Fonte: O autor (2015).

Figura 16 - Características organolépticas das formulações submetidas à alta temperatura ($40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).



Da esquerda para direita, creme lanette seguida de preparações contendo 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP, respectivamente.

Fonte: O autor (2015).

A Tabela 12 apresenta o perfil de estabilidade referente às características organolépticas das formulações submetidas à baixa temperatura ($-5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e analisadas nos dias pré-determinados. Assim como observado na Figura 17, não ocorreram alterações nas características avaliadas.

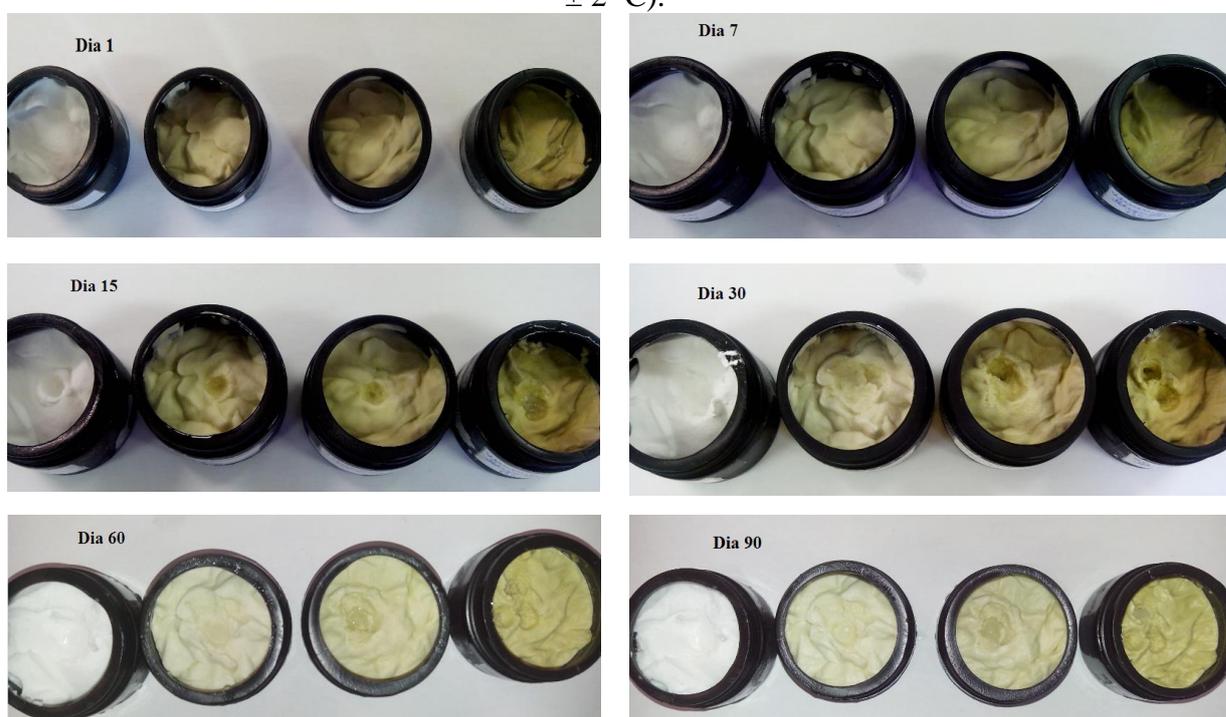
Tabela 12 - Características organolépticas no teste de estabilidade acelerada das formulações em estudo submetidas à baixa temperatura ($-5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

Formulações	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Lanette	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au	H/B/OS/Au
cEEVP 0,10%	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au	H/VC/OS/Au
cEEVP 0,25%	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au
cEEVP 0,50%	H/VE/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au	H/VM/OS/Au

cEEVP: creme incorporado com extrato etanólico de *Vernonia polyanthes*; H: homogêneo; B: branco; VC: verde claro; VM: verde médio; VE: verde escuro; OS: *odor sui generis*; Au: ausência de precipitado.

Fonte: o autor (2015).

Figura 17 - Características organolépticas das formulações submetidas à baixa temperatura ($-5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).



Da esquerda para direita, creme lanette seguida de preparações contendo 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP, respectivamente.

Fonte: O autor (2015).

5.2.2.3 Análise do pH

Os valores médios obtidos por meio do teste de determinação do pH são apresentados nas Tabelas 13, 14 e 15 para as formulações submetidas à temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), estufa ($40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e freezer ($-5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), respectivamente. No primeiro dia, as formulações apresentaram valores de pH que variaram de 5,58 a 5,87, enquanto no sétimo dia os valores foram de 5,53 a 5,90. A faixa de pH no dia 15 foi de 5,50 a 5,91 e no dia 30 foi de 5,49 a 5,96,

enquanto no dia 60 o pH variou de 5,18 a 5,91. No último dia de avaliação (90 dias), o pH variou de 4,91 a 5,84

Tabela 13 - Valores de pH das formulações submetidas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

Formulações	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Lanette	5,83	5,87	5,84	5,80	5,72	5,79
cEEVP 0,10%	5,81	5,77	5,73	5,79	5,72	5,74
cEEVP 0,25%	5,68	5,72	5,69	5,65	5,58	5,62
cEEVP 0,50%	5,59	5,53	5,62	5,59	5,55	5,57

cEEVP: creme contendo extrato etanólico de *Vernonia polyanthes* (em % m/m).

Fonte: O autor (2015).

Tabela 14 - Valores de pH das formulações submetidas à estufa (40 ± 2 °C).

Formulações	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Lanette	5,87	5,83	5,91	5,96	5,62**	5,32***
cEEVP 0,10%	5,66	5,69	5,66	5,71	5,38**	5,19***
cEEVP 0,25%	5,64	5,61	5,57	5,65	5,27**	5,01***
cEEVP 0,50%	5,59	5,55	5,50	5,52	5,18**	4,91***

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo (CN) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. cEEVP: creme contendo extrato etanólico de *Vernonia polyanthes* (em % m/m).

Fonte: O autor (2015).

Tabela 15 - Valores de pH das formulações submetidas ao freezer (-5 ± 2 °C).

Formulações	Dia 1	Dia 7	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90
Lanette	5,85	5,90	5,84	5,86	5,91	5,84
cEEVP 0,10%	5,71	5,77	5,81	5,76	5,71	5,66
cEEVP 0,25%	5,62	5,57	5,60	5,55	5,58	5,53
cEEVP 0,50%	5,58	5,53	5,55	5,49	5,51	5,48

cEEVP: creme contendo extrato etanólico de *Vernonia polyanthes* (em % m/m).

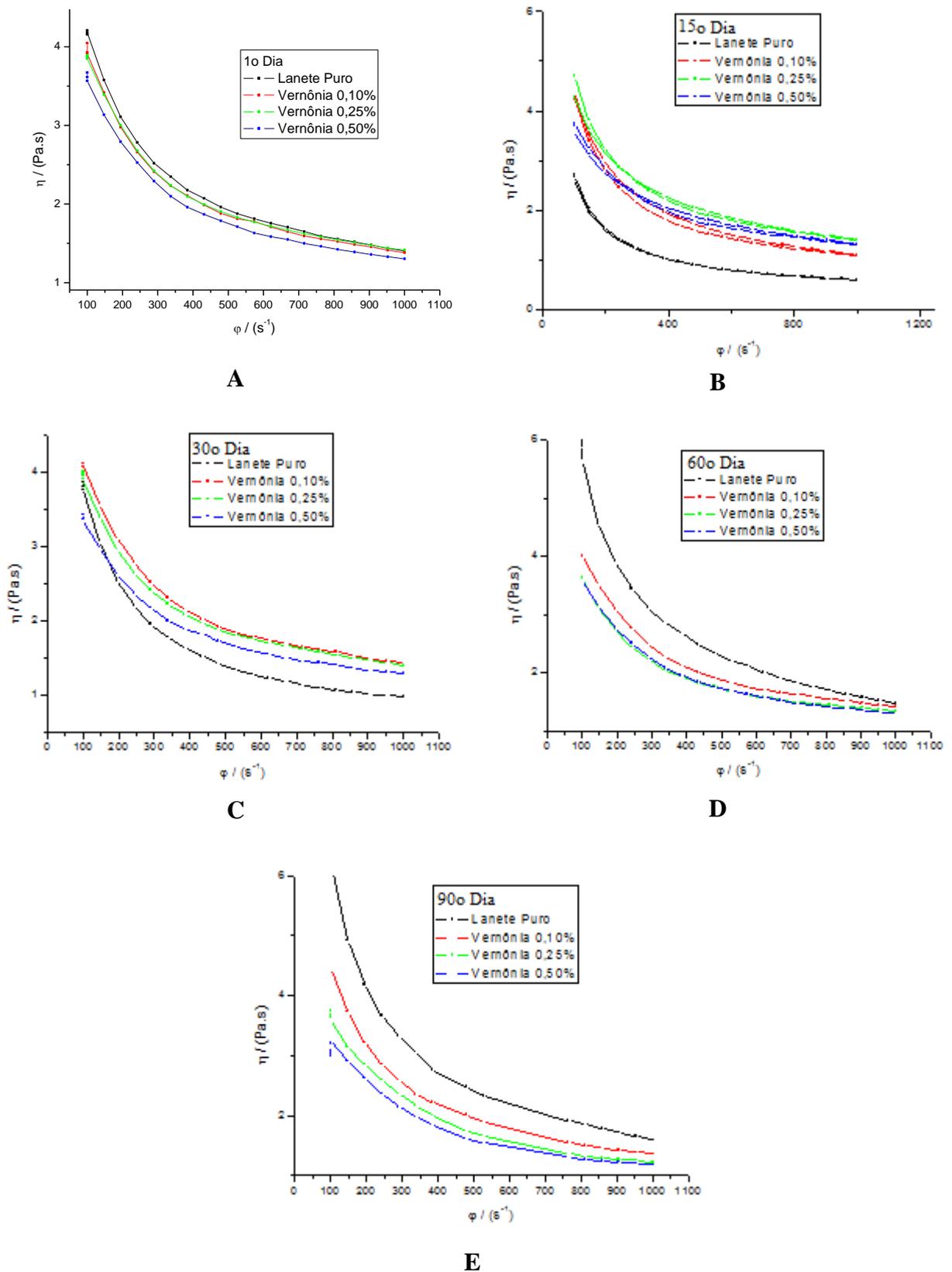
Fonte: O autor (2015).

5.2.2.4 Avaliação reológica

A identificação de características newtonianas e/ou não-newtonianas de um fluido pode ser realizada através de um estudo de tensão de cisalhamento *versus* deformação, utilizando-se um reômetro.

No Gráfico 10, estão demonstradas curvas de viscosidade para o creme lanette e cremes contendo 0,10, 0,25 e 0,50% do extrato etanólico de *V. polyanthes* em diferentes intervalos de tempo (1, 15, 30, 60 e 90 dias).

Gráfico 10 - Curva de viscosidade de 100 a 1000 s^{-1} a 30 °C em intervalos de tempo.



η = viscosidade; $\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento.
Fonte: O autor (2015).

Considerando os Gráficos 10A, 10B, 10C, 10D e 10E, a viscosidade diminui exponencialmente com o aumento da taxa de cisalhamento (velocidade de rotação), mostrando que o fluido é não-newtoniano do tipo pseudoplástico. A maior queda na viscosidade (aproximadamente 50%) ocorre aproximadamente entre 100 e 400 s⁻¹. Acima de 400 s⁻¹, a queda não é tão acentuada. Assim, os dados mostram que a taxa de cisalhamento ideal para processamento da amostra é em torno de 400 s⁻¹ que, por sua vez, é um valor típico de operações de mistura, agitação e transporte em tubulações.

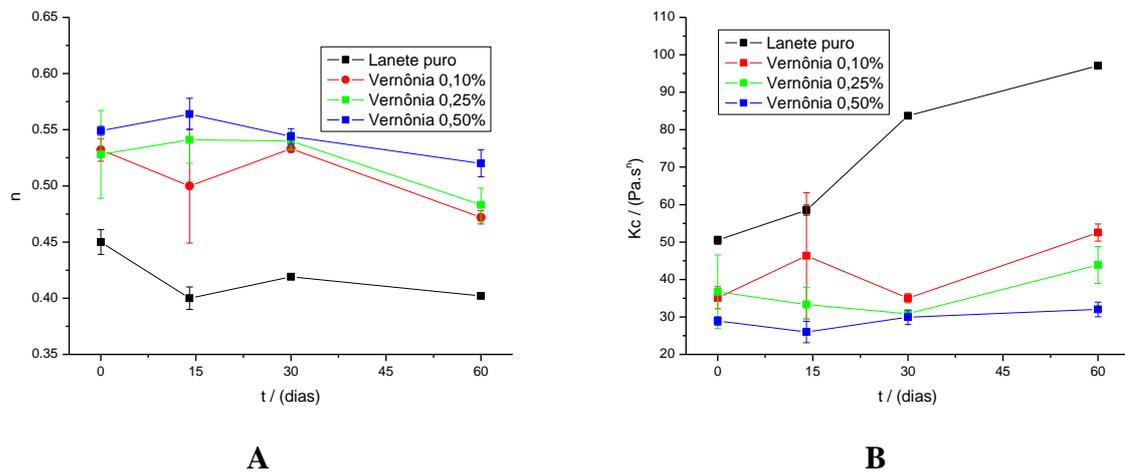
Com o intuito de avaliar a consistência e o comportamento dos fluidos em estudo, as curvas de viscosidade foram modeladas pela equação de Ostwald de Waale:

$$\eta = K_c \dot{\gamma}^{n-1} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde K_c é o índice de consistência, parâmetro similar à viscosidade que mede para o fluido não newtoniano a resistência ao escoamento. “n” é o índice de comportamento, que mede o quanto o comportamento do fluido se aproxima do newtoniano ($n = 1$ newtoniano, $n < 1$ pseudoplástico e $n > 1$ dilatante).

Os valores de K_c e n , obtidos pela equação 3, foram elaborados em função do tempo e apresentados no Gráfico 11.

Gráfico 11 - Análises da consistência e comportamento das formulações.



A. Consistência; B. Comportamento.

Fonte: O autor (2015).

5.2.2.5 Avaliação microbiológica

Os resultados da avaliação da estabilidade microbiológica das amostras, empregando o método de contagem microbiana por profundidade, estão representados nas Tabelas 16 e 17. A primeira ilustra a contagem microbiana para bactérias, onde se verificou a presença de

unidades formadoras de colônias na diluição 10^{-1} dentro dos limites aceitáveis para formulações não estéreis em todos os produtos analisados no dia zero, sendo que na diluição 10^{-2} não houve crescimento. O mesmo foi verificado no dia 90 para as formulações submetidas à temperatura ambiente e ao freezer. No entanto, houve crescimento bacteriano acima dos valores aceitáveis nas formulações submetidas à estufa nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} (Figura 18). Estes resultados foram observados também na contagem de fungos nos dias 0 e 90, como apresentado na Tabela 17 e ilustrado na Figura 19, porém a contagem fúngica das formulações contendo EEVP nas concentrações 0,10, 0,25 e 0,50% submetidas à estufa está dentro dos limites aceitáveis, apesar de alta.

Tabela 16 - Contagem bacteriana (UFC/g) das formulações de cEEVP.

Formulações	Dia 0	Dia 90		
		$25 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$	$40 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Lanette	2,5	38,0	38,0	$>10^3$
cEEVP 0,10%	3,0	26,0	15,0	$>10^3$
cEEVP 0,25%	1,0	4,0	4,0	$>10^3$
cEEVP 0,50%	1,0	4,0	1,0	$>10^3$

cEEVP: creme contendo extrato etanólico de *Vernonia polyanthes*.

Fonte: O autor (2015).

Figura 18 – Crescimento bacteriano das formulações.

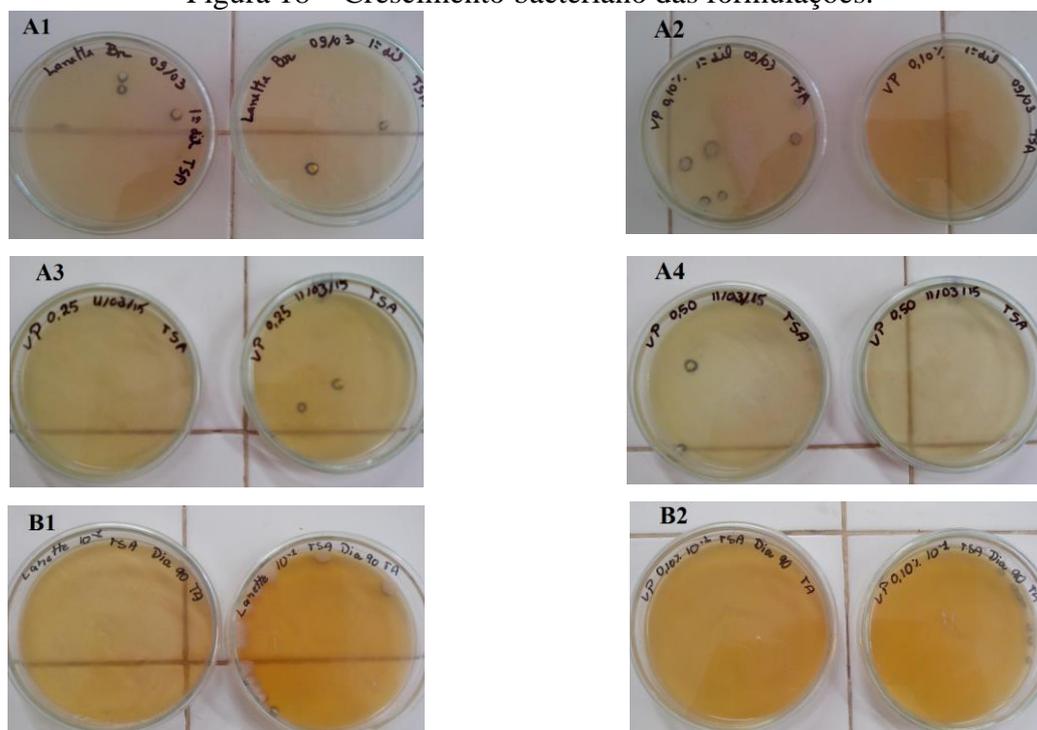
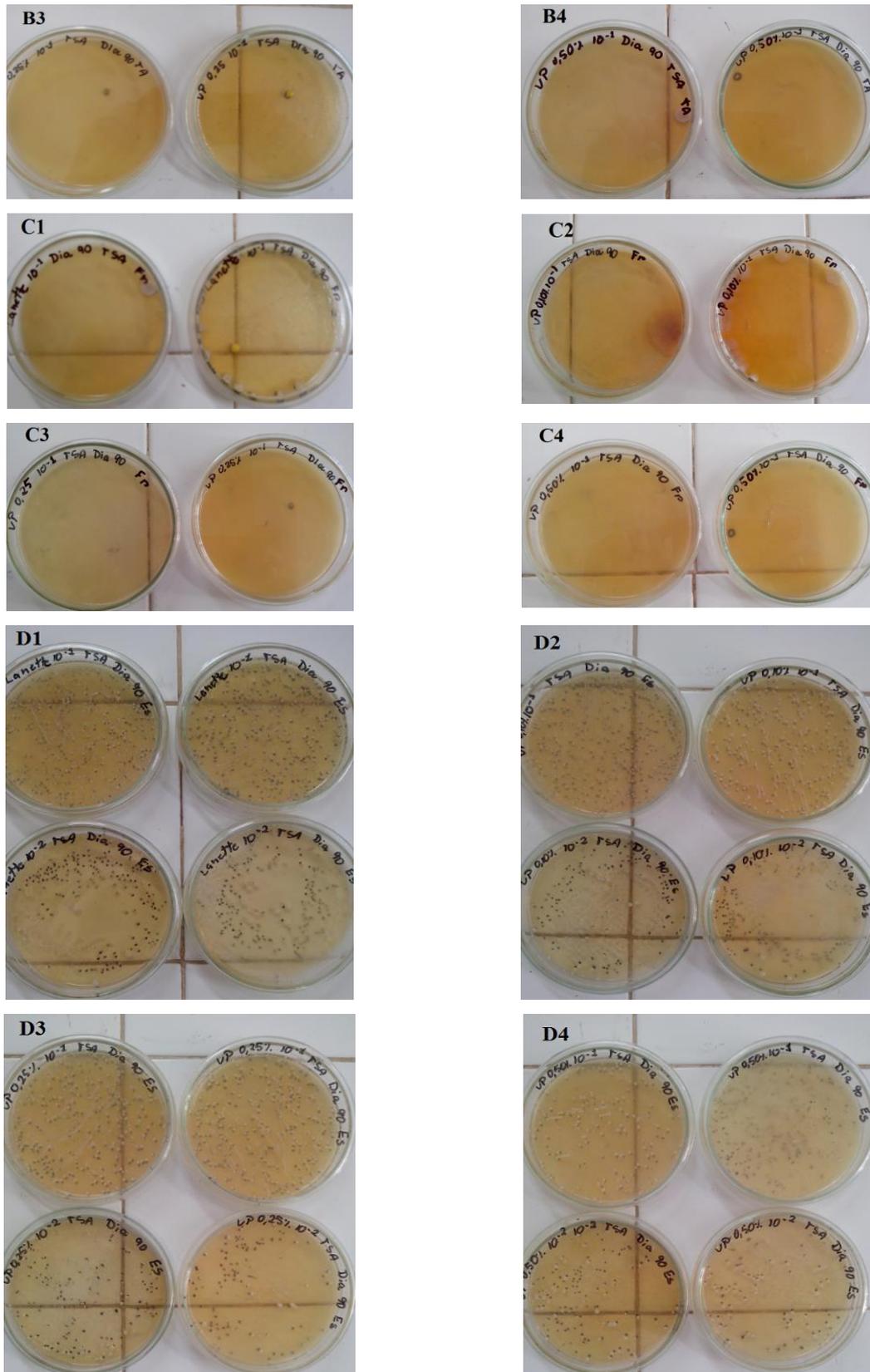


Figura 18: Continuação



A. Análise no dia zero; **B.** Análise no dia 90 - temperatura ambiente; **C.** Análise no dia 90 - freezer; **D.** Análise no dia 90 - estufa. **1:** Lanette; **2:** cEEVP 0,10%; **3:** cEEVP 0,25%; **4:** cEEVP 0,50%. cEEVP: creme contendo extrato etanólico de *Vernonia polyanthes*.

Fonte: O autor (2015).

Tabela 17 - Contagem fúngica (UFC/g) das formulações de cEEVP.

Formulações	Dia 0	Dia 90		
		25 ± 2°C	-5 ± 2°C	40 ± 2°C
Lanette	6,0	18,0	11,0	>10 ³
cEEVP 0,10%	10,0	12,0	12,0	920
cEEVP 0,25%	3,0	8,0	9,0	690
cEEVP 0,50%	3,0	4,0	8,0	680

cEEVP: creme contendo extrato etanólico de Vernonia polyanthos.

Fonte: O autor (2015).

Figura 19 – Crescimento fúngico das formulações.

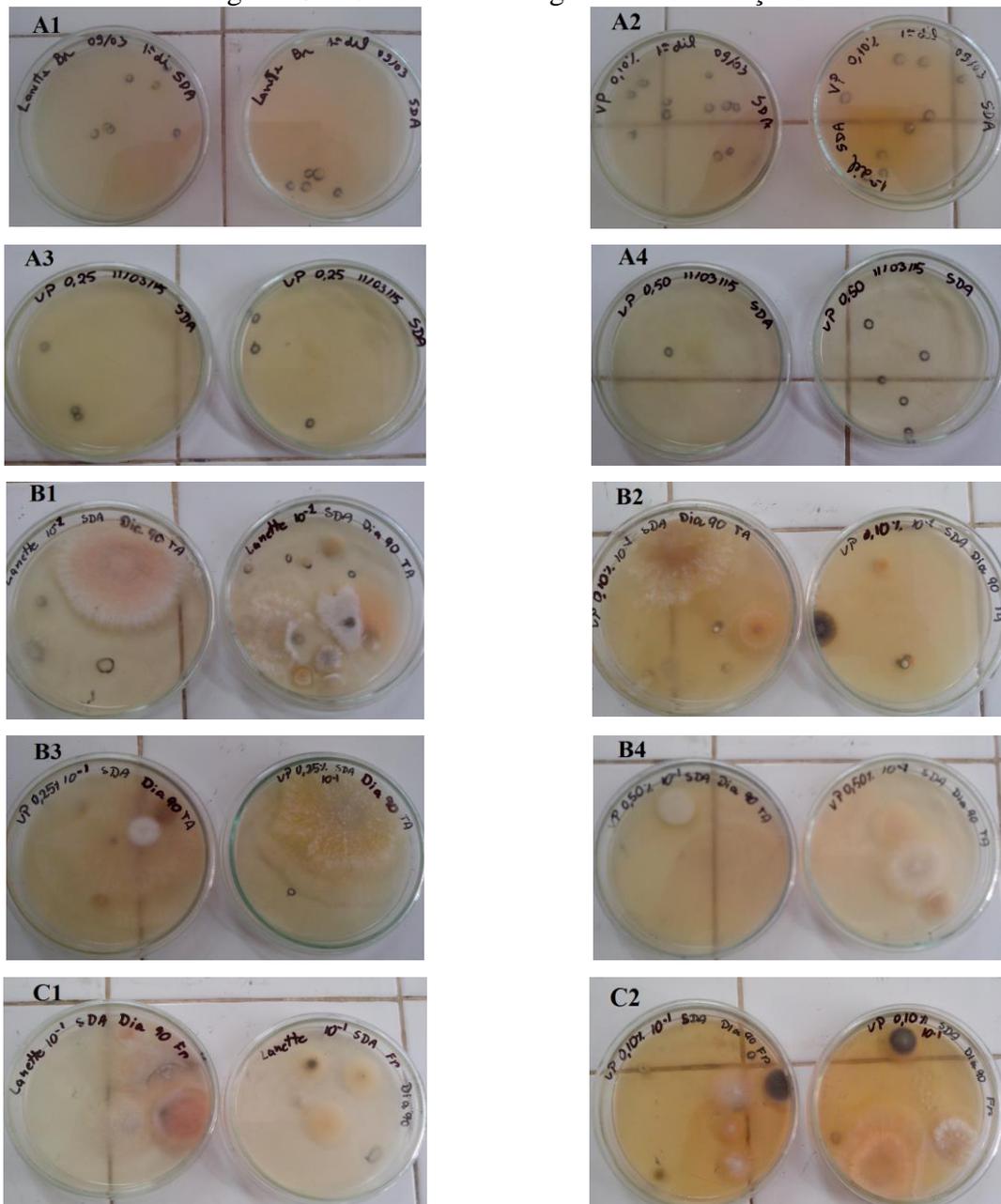
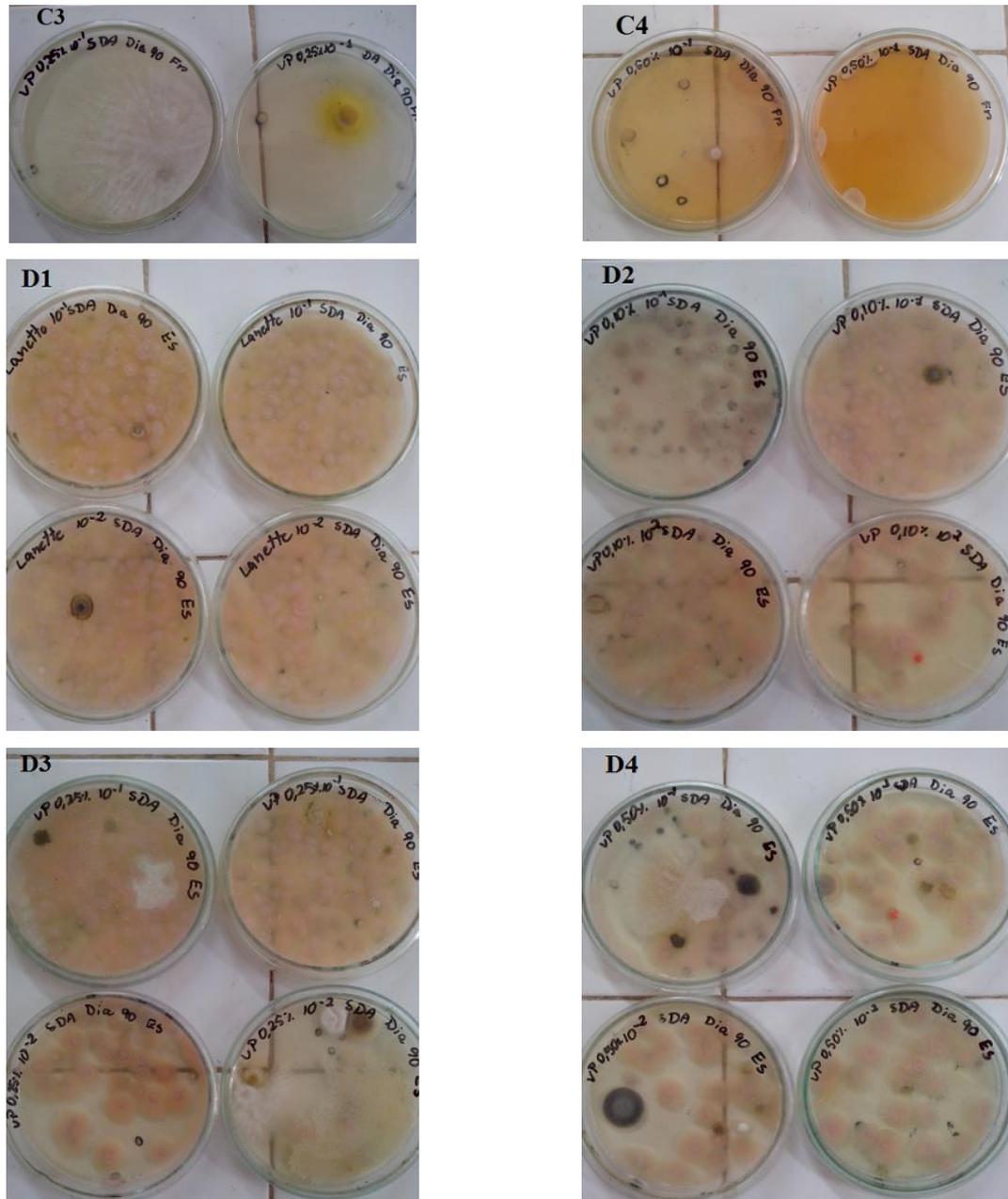


Figura 19: Continuação



A. Análise no dia zero; B. Análise no dia 90 - temperatura ambiente; C. Análise no dia 90 – freezer; D. Análise no dia 90 – estufa. 1: Lanette; 2: cEEVP 0,10%; 3: cEEVP 0,25%; 4: cEEVP 0,50%. cEEVP: creme contendo extrato etanólico de *Vernonia polyanthes*.

Fonte: O autor (2015).

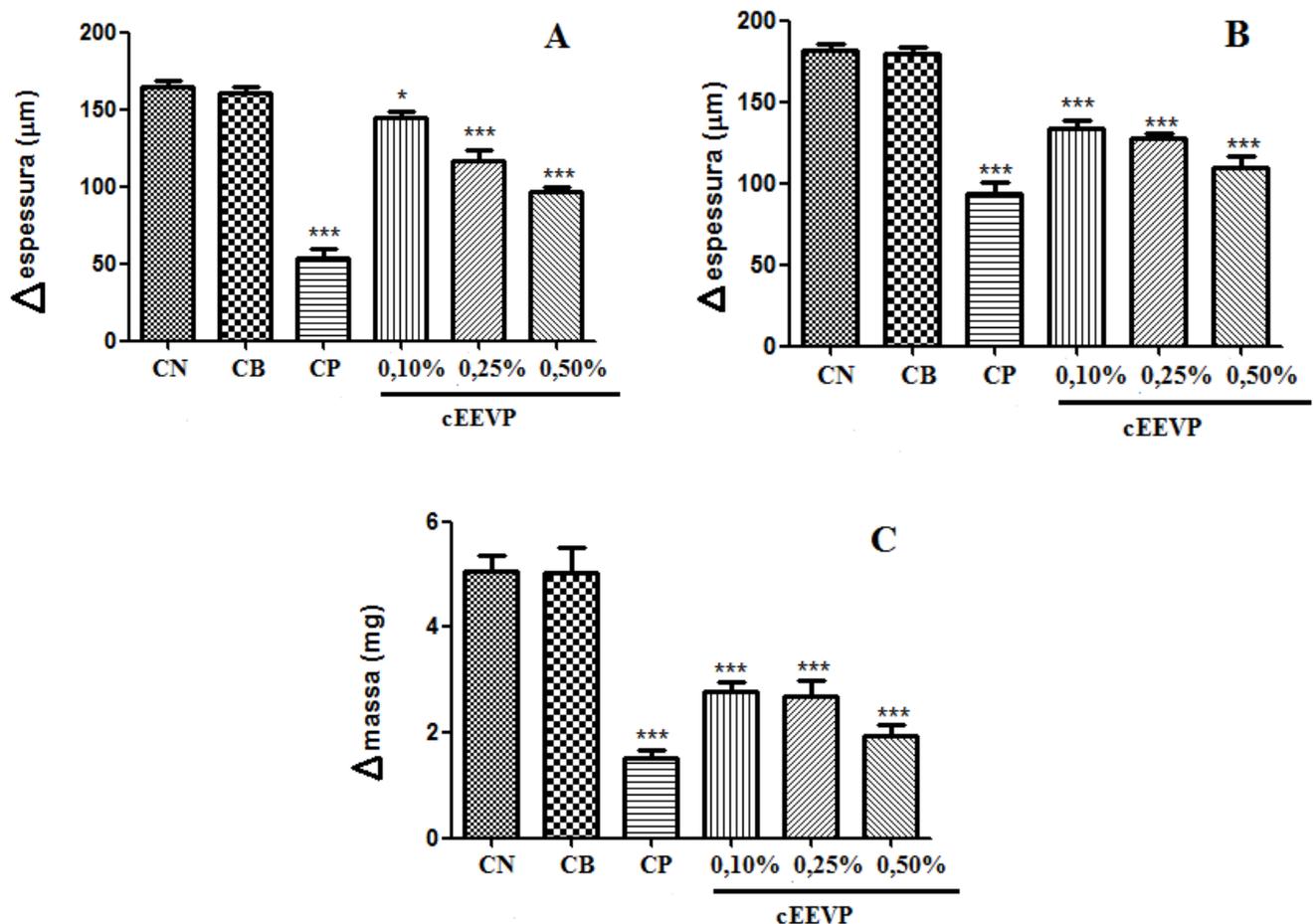
5.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DE cEEVP

5.3.1 Efeito do cEEVP sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton

A aplicação tópica do óleo de cróton promoveu um aumento da espessura da orelha do camundongo após 6 e 24 horas (Gráficos 12A e 12B) e elevou a massa do edema após 24

horas de indução da inflamação (Gráfico 12C). cEEVP reduziu a espessura do edema em 12,63% ($p < 0,05$), 29,19% ($p < 0,001$) e 41,51% ($p < 0,001$) nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, respectivamente, após 6 horas de tratamento (Gráfico 12A). Após 24 horas, a redução da espessura foi de 26,25, 29,84 e 39,40% na ordem crescente das concentrações de cEEVP ($p < 0,001$). Concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% de cEEVP também inibiu a massa do edema em 45,37% ($p < 0,001$), 47,15% ($p < 0,001$) e 61,54% ($p < 0,001$), respectivamente. Dexametasona, controle positivo, inibiu o edema em 67,68% (espessura após 6 horas), 48,30% (espessura após 24 horas) e 70,02% (massa). O creme base lanette, controle negativo, não ocasionou redução do processo inflamatório.

Gráfico 12 - Efeito do cEEVP sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.



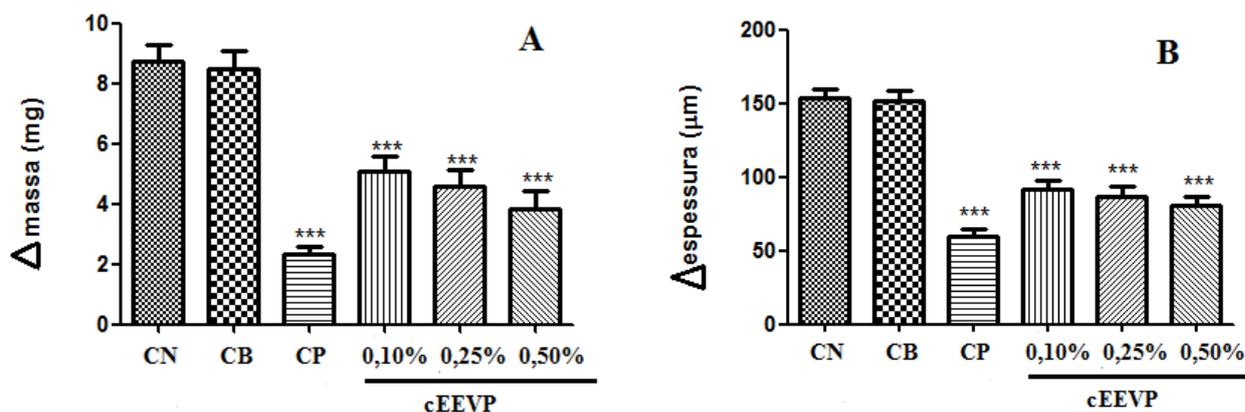
A. Valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de espessura (μm) entre as orelhas após 6 horas ($n = 6$).
B. Valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de espessura (μm) entre as orelhas após 24 horas ($n = 6$).
C. Valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de massa (mg) após 24 horas ($n = 6$). CN: controle negativo; CB: creme base lanette; CP: controle positivo (dexametasona); cEEVP: creme contendo EEVP. As médias diferem em relação ao controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. Valores significativos: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo.

Fonte: O autor (2015).

5.3.2 Efeito do cEEVP sobre o edema de orelha induzido por fenol

Após 2h, a aplicação tópica de fenol induziu a formação do edema através do aumento da massa e da espessura da orelha (Gráficos 13A e 13B). cEEVP foi capaz de inibir em 41,94% ($p < 0,001$), 47,77% ($p < 0,001$) e 56,23% ($p < 0,001$) a massa do edema nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, respectivamente, em relação ao grupo controle. A espessura foi também reduzida em 40,00, 43,33 e 47,34% nas concentrações crescentes aplicadas. A dexametsona, controle positivo, reduziu a massa do edema em 73,14%, enquanto a espessura foi diminuída em 61,35%. O creme base lanette (CB) não foi efetivo na redução do edema.

Gráfico 13 - Efeito do cEEVP sobre o edema de orelha induzido por fenol.



A. Valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de massa (mg) entre as orelhas ($n = 6$). **B.** Valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de espessura (μm) entre as orelhas ($n = 6$). CN: controle negativo; CB: creme base lanette; CP: controle positivo (dexametsona); cEEVP: creme contendo EEVP. As médias diferem em relação ao controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls Student. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo.

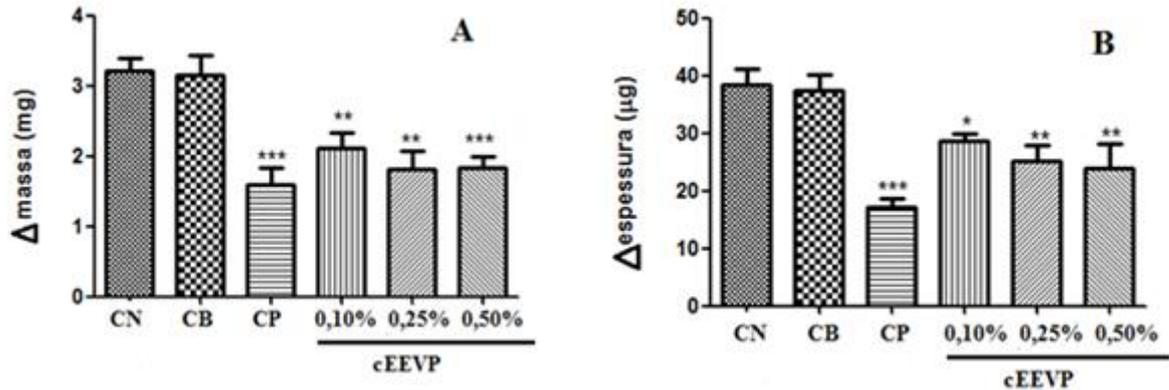
Fonte: O autor (2015).

5.3.3 Efeito do cEEVP sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico

Após 1h de aplicação do ácido araquidônico, ocorreu a formação do edema que foi avaliado pelo aumento da massa e da espessura da orelha do grupo controle (acetona) (Gráficos 14A e 14B). Nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, o cEEVP inibiu significativamente ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$) a formação do edema em 34,16, 43,17 e 43,48%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. A espessura foi reduzida em 19,92, 28,57 e 37,66% nas concentrações crescentes citadas. A indometacina, controle positivo,

reduziu a massa edematosa em 50,31% e a espessura em 54,02%. A aplicação do creme base lanette (CB) não ocasionou redução dos parâmetros inflamatórios avaliados.

Gráfico 14 - Efeito do cEEVP sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico.



A. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de massa (mg) entre as orelhas ($n = 6$). B. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da diferença de espessura (μm) entre as orelhas ($n = 6$). CN: controle negativo; CB: creme base; CP: controle positivo; cEEVP: creme contendo EEVP. As medidas diferem em relação ao controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. Valores significativos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo (acetona).

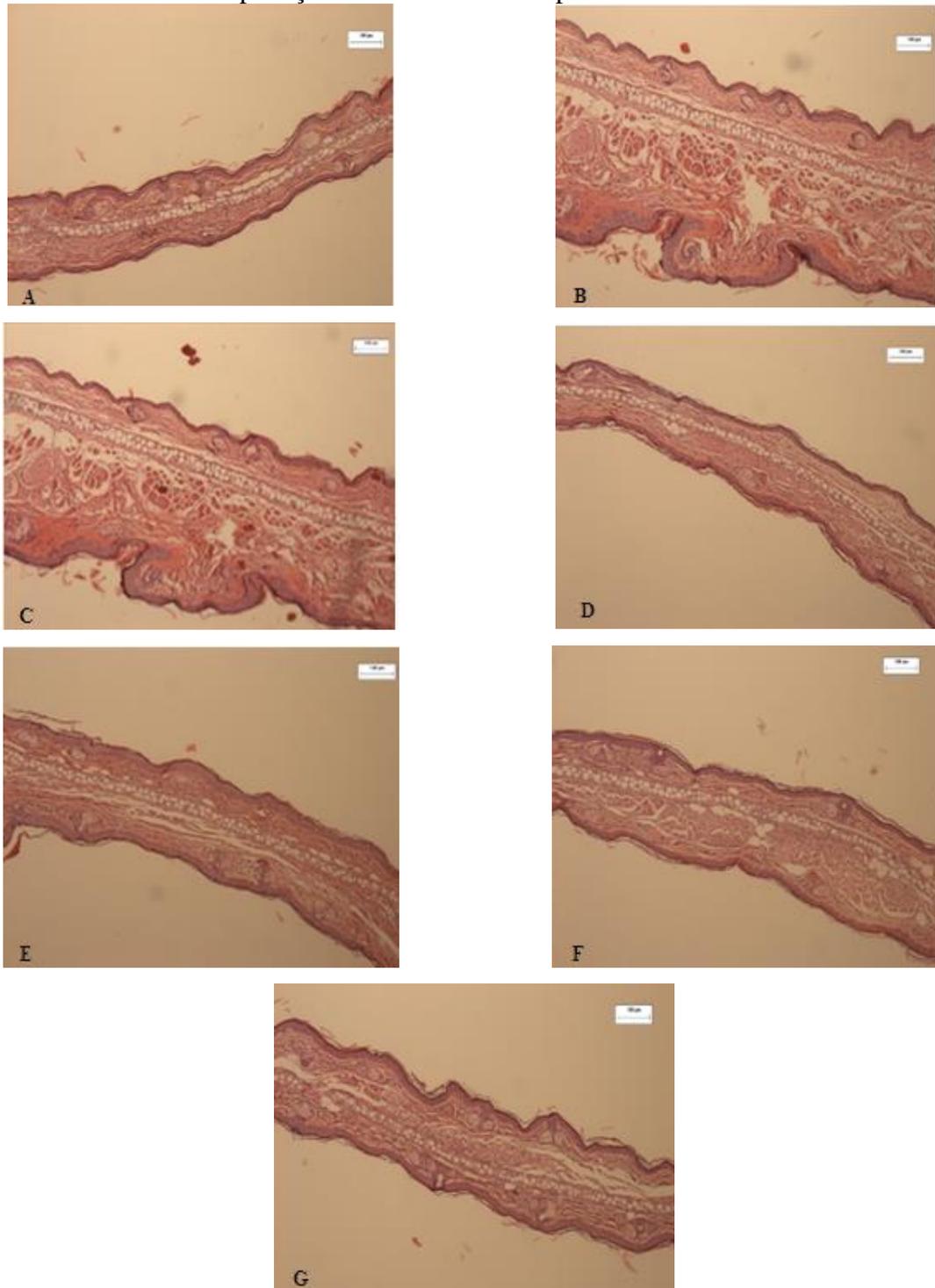
Fonte: O autor (2015).

5.3.4 Perfil histopatológico de fragmentos de orelhas após tratamento com cEEVP

Com a finalidade de confirmar e compreender melhor o efeito anti-inflamatório das formulações de cEEVP sobre o modelo de edema de orelha induzido pela aplicação do óleo de cróton, foi realizado a análise histológica de parâmetros da inflamação. Na Figura 20 são apresentadas fotos dos cortes representativos (10x, escala 100 μm) de orelhas de camundongos dos grupos avaliados: controle negativo (sem tratamento), controle negativo (base lanette), controle positivo (dexametasona) e grupos que receberam cEEVP (0,10, 0,25 e 0,50%). Além disso, um corte da orelha esquerda (não inflamada) foi adicionado nesse painel.

O grupo sem inflamação (Figura 20A) não apresentou nenhum indício de processo inflamatório, enquanto no grupo sem tratamento (Figura 20B) é verificado um aumento acentuado da espessura da orelha (derme), acompanhado pela ruptura do tecido conjuntivo e desorganização das fibras da matriz extracelular que foi induzido pelo óleo de cróton. O grupo tratado com creme base lanette (Figura 20C) produziu características semelhantes ao grupo controle negativo (Figura 20B), mostrando ausência de efeito. O tratamento com cEEVP nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% reduziu a formação do edema com redução da espessura da derme (Figuras 20E, 20F e 20G). A dexametasona (0,1%), controle positivo, inibiu a formação do edema de modo expressivo (Figuras 20D).

Figura 20 - Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação de óleo de cróton após tratamento com cEEVP.



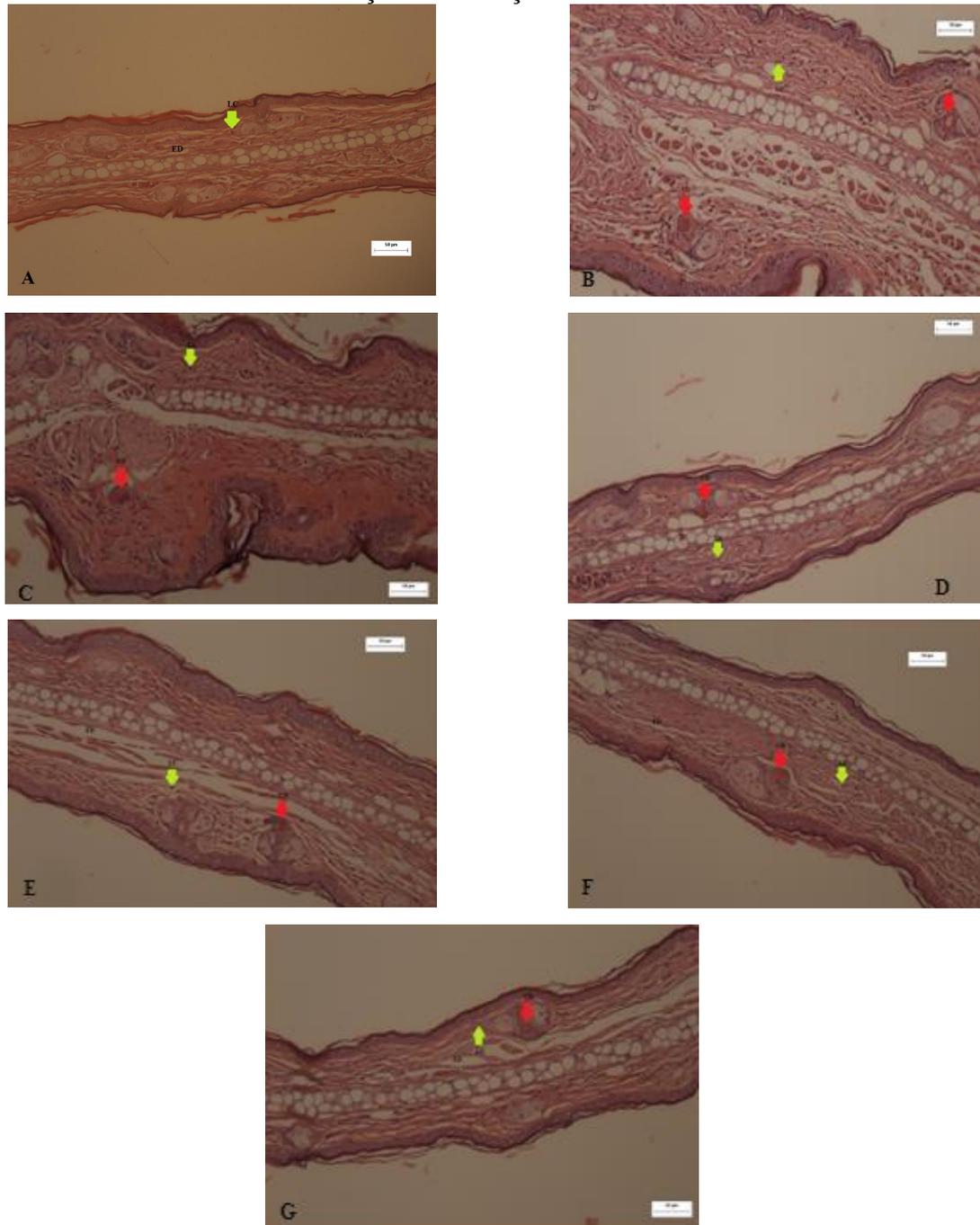
Cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (10x, escala de 100 μm). (A) Basal (sem inflamação); (B) Controle (acetona); (C) Creme base lanette; (D) Dexametasona 0,1%; (E) cEEVP 0,10%; (F) cEEVP 0,25%; (G) cEEVP 0,50%.

Fonte: O autor (2015).

Ao analisar os parâmetros de inflamação nas amostras das orelhas através da Figura 21 (cortes histológicos em aumento de 20x, escala 50 μm), observa-se que o óleo de cróton, além

dos efeitos citados inicialmente, causou também vasodilatação e infiltração de leucócitos na derme, os quais foram reduzidos pelo tratamento tópico com a formulação de cEEVP nas três concentrações estudadas, assim como pela dexametasona (0,1%).

Figura 21 - Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação de óleo de cróton após tratamento com cEEVP mostrando vasodilatação e infiltração de leucócitos.



Cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (200x, escala de 50 µm). (A) Basal (sem inflamação); (B) Controle (acetona); (C) Creme base lanette; (D) Dexametasona 0,1%; (E) cEEVP 0,10%; (F) cEEVP 0,25%; (G) cEEVP 0,50%; (ED) edema/espessamento da derme; (VD) vasodilatação; (LC) leucócitos; leucócitos (seta verde); vasos sanguíneos (seta vermelha).

Fonte: O autor (2015).

O efeito inibitório de cEEVP sobre a formação de edema a partir da análise histológica foi corroborado pela avaliação da medida da espessura do tecido edematoso (μm) nos cortes teciduais examinados através do programa Imagepro-plus[®]. Nesta análise, nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, cEEVP reduziu a espessura do tecido em 41,12, 48,60 e 52,83%, respectivamente. Após a aplicação de dexametsona, controle positivo, o edema foi reduzido para $138,29 \pm 4,36$ (μm), o que corresponde a 58,90% de inibição. A aplicação da base lanette não apresentou resposta na redução do edema e a acetona (veículo) não interferiu na atividade dos ensaios, uma vez que não foi constatado processo inflamatório (Tabela 18).

Tabela 18 - Efeito do cEEVP sobre o tamanho do edema de orelha induzido por óleo de cróton nos cortes histológicos analisados através do programa Imagepro-plus[®].

Grupo	Concentração	Tamanho do edema	Inibição do edema
		(μm)	(%)
Controle	-----	$336,49 \pm 16,14$	-
Basal	Sem tratamento	$197,12 \pm 5,99$	-
Creme base	-----	$316,08 \pm 28,74$	6,06
	0,10%	$207,93 \pm 10,27^{***}$	41,12
	0,25%	$181,53 \pm 5,50^{***}$	48,60
Creme EEVP	0,50%	$166,58 \pm 5,44^{***}$	52,83
	0,10%	$138,29 \pm 4,36^{***}$	58,90

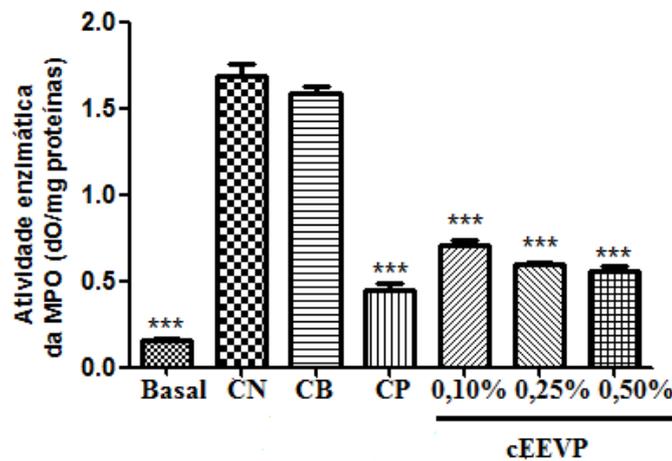
Medidas da espessura do tecido edematoso (μm) em cinco regiões aleatórias de cada corte histológico. Cada grupo foi representado por quatro cortes histológicos ($n = 4$). Os valores correspondem à média \pm E.P.M. $***p < 0,001$, diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls.

Fonte: O autor (2015).

5.3.5 Efeito do cEEVP sobre a atividade da mieloperoxidase

Utilizando o modelo do óleo de cróton, foi avaliada a ação do cEEVP sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A aplicação tópica do óleo de cróton promoveu aumento da atividade da enzima MPO após 24 horas do desafio (Gráfico 15). Esse aumento foi revertido pela aplicação tópica de cEEVP em 58,00 ($p < 0,001$), 64,82 ($p < 0,001$) e 67,01% ($p < 0,001$) nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, respectivamente. De maneira semelhante, a dexametasona, controle positivo, inibiu a atividade da enzima em 73,52% ($p < 0,001$). A base lanette não apresentou inibição da atividade da enzima pesquisada, enquanto o grupo basal (não inflamado) produziu baixa atividade da MPO devido à falta do desenvolvimento de processo inflamatório.

Gráfico 15 - Efeito do cEEVP sobre a atividade da MPO em fragmentos de orelhas de camundongos.



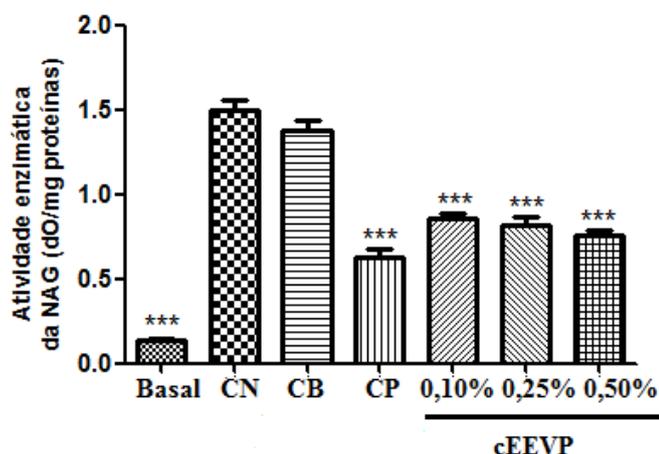
Os valores correspondem à média \pm E.P.M. As medidas diferem em relação ao controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. CN: controle negativo; CB: creme base; CP: controle positivo; cEEVP: creme contendo EEVP. Valores significativos: $***p < 0,001$ vs grupo controle negativo (acetona).

Fonte: O autor (2015).

5.3.6 Efeito do cEEVP sobre a atividade da N-acetil- β -D-glicorominidase

O creme com EEVP (cEEVP) foi também avaliado frente a atividade da enzima N-acetil- β -D-glicorominidase (NAG) usando o modelo de óleo de cróton. Após aplicação tópica, o óleo de cróton promoveu um aumento da atividade da NAG após 24 horas do desafio no grupo controle negativo (Gráfico 16). Essa atividade foi inibida em 41,77% ($p < 0,001$), 44,58% ($p < 0,001$) e 48,78% ($p < 0,001$) após tratamento com cEEVP nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, respectivamente. De maneira semelhante à dexametasona, controle positivo, que inibiu a atividade da enzima em 57,37% ($p < 0,001$). A base lanette não apresentou inibição significativa, enquanto o grupo basal (não inflamado) produziu baixa atividade enzimática devido ao não desenvolvimento do processo inflamatório.

Gráfico 16 - Efeito do cEEVP sobre a atividade da NAG em fragmentos de orelhas de camundongos.



Os valores correspondem à média \pm E.P.M. As medidas diferem em relação ao controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls. CN: controle negativo; CB: creme base; CP: controle positivo; cEEVP: creme contendo EEVP. Valores significativos: *** $p < 0,001$ vs grupo controle negativo (acetona).

Fonte: O autor (2015).

5.4 ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EEVP E cEEVP

5.4.1 Efeitos do EEVP e cEEVP sobre a massa corporal e consumo de água e ração

As Tabelas 19 e 20 mostram os valores da massa corporal, consumo de água e de alimento dos animais submetidos ao modelo de cicatrização cutânea durante sete e 14 dias de tratamento com EEVP e cEEVP, respectivamente. Não houve diferença significativa entre grupos avaliados (Tabelas 19 e 20). Além disso, não foram verificadas alterações comportamentais e morte de animais durante os períodos analisados.

Tabela 19 - Média da massa corporal e do consumo de água e ração durante sete e 14 dias de tratamento com EEVP.

Grupo	Massa corporal (g)		Água (mL)		Ração (g)	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
CN	183,46 \pm 12,04	169,25 \pm 20,92	203,63 \pm 8,00	171,60 \pm 6,62	128,38 \pm 9,02	118,87 \pm 6,86
CP	182,39 \pm 12,14	159,24 \pm 17,03	202,50 \pm 9,83	174,20 \pm 5,48	122,50 \pm 9,21	118,13 \pm 12,45
EEVP 0,10%	191,35 \pm 10,42	175,74 \pm 17,81	206,25 \pm 10,82	170,20 \pm 11,22	126,38 \pm 8,98	117,73 \pm 7,06
EEVP 0,25%	185,56 \pm 24,06	167,94 \pm 24,59	207,75 \pm 10,44	169,28 \pm 8,50	125,13 \pm 10,38	115,87 \pm 10,07
EEVP 0,50%	193,11 \pm 12,61	163,28 \pm 23,08	206,50 \pm 8,45	165,67 \pm 9,62	127,25 \pm 9,69	118,20 \pm 9,20

Os valores correspondem à média \pm E.P.M. (n = 6). Análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls para $p < 0,05$ não produziu diferença entre os grupos em relação ao controle negativo (CN).

Fonte: O autor (2015).

Tabela 20 - Média da massa corporal e do consumo de água e ração durante sete e 14 dias de tratamento com cEEVP.

Grupo	Massa corporal (g)		Água (mL)		Ração (g)	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
CN	174,81 ± 10,21	185,35 ± 18,18	210,86 ± 11,54	193,71 ± 11,86	142,81 ± 13,47	149,59 ± 9,19
CP	177,45 ± 12,54	179,44 ± 21,52	205,13 ± 13,95	199,32 ± 9,98	138,85 ± 15,04	152,71 ± 14,92
cEEVP 0,10%	182,92 ± 11,25	187,31 ± 13,43	214,03 ± 9,55	201,05 ± 10,81	144,58 ± 9,48	145,49 ± 17,45
cEEVP 0,25%	172,98 ± 15,17	182,72 ± 22,91	211,67 ± 13,72	191,66 ± 12,59	137,83 ± 12,79	155,13 ± 12,18
cEEVP 0,50%	181,14 ± 18,54	191,94 ± 19,99	203,92 ± 13,97	197,48 ± 10,15	147,18 ± 17,21	153,77 ± 13,41

Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n = 6). Análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls para $p < 0,05$ não produziu diferença entre os grupos em relação ao controle negativo (CN).

Fonte: O autor (2015).

5.4.2 Análise macroscópica

Após o procedimento cirúrgico, todos os animais recuperaram-se da anestesia, apresentando um estado geral e atividades física e comportamental normais de acordo com as conformidades estabelecidas para a espécie. Na análise macroscópica das feridas tratadas com extrato etanólico de *V. polyanthes* (EEVP) durante sete dias, observou-se discreto edema em todas as feridas até o terceiro dia do pós-operatório, correspondendo às fases iniciais da resposta inflamatória. No entanto, não foi observado exsudato purulento nas feridas cutâneas induzidas, mas constatou-se exsudação serosa nos animais dos grupos tratados com EEVP e Dersani[®] até o 2º dia de tratamento, e no grupo controle até o 4º dia. A formação das crostas iniciou a partir do 3º dia, sendo que nos grupos tratados com EEVP e Dersani[®] apresentaram-se mais delgadas e umedecidas em relação ao grupo controle, que demonstraram espessas e ressecadas. No 5º dia, iniciou-se, espontaneamente, o desprendimento das crostas, mostrando sinais de reepitelização. Macroscopicamente, no sétimo dia, o processo de cicatrização ficou destacado nos grupos avaliados (Quadro 4). O tratamento de 14 dias com EEVP apresentou as mesmas características do tratamento de sete dias, entretanto, promoveu uma completa cicatrização das feridas nos grupos analisados (Quadro 5).

O tratamento com a formulação cEEVP apresentou características semelhantes ao do EEVP no que se refere exsudação serosa, formação de crostas, desprendimento das crostas, reepitelização e cicatrização. No entanto, foi observada uma aceleração do processo de cicatrização dos grupos tratados com o creme com EEVP tanto no estudo de sete (Quadro 6) quanto no de 14 dias (Quadro 7). No entanto, após 14 dias de tratamento, uma completa cicatrização das feridas foi verificada em todos os grupos.

Quadro 4 - Efeito do EEVP durante sete dias sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar.

Grupo	Dia 0	Dia 4	Dia 7
Controle negativo (salina)			
Controle positivo (Dersani®)			
EEVP 0,10%			
EEVP 0,25%			
EEVP 0,50%			

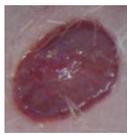
Fonte: O autor (2015).

Quadro 5 - Efeito do EEVP durante 14 dias sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar.

Grupo	Dia 0	Dia 4	Dia 7	Dia 14
Controle negativo (salina)				
Controle positivo (Dersani®)				
EEVP 0,1%				
EEVP 0,25%				
EEVP 0,50%				

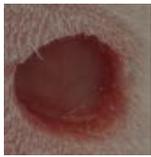
Fonte: O autor (2015).

Quadro 6 - Efeito do cEEVP durante sete dias sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar.

Grupo	Dia 0	Dia 4	Dia 7
Controle negativo (creme lanette)			
Controle positivo (Dexametasona)			
cEEVP 0,1%			
cEEVP 0,25%			
cEEVP 0,50%			

Fonte: O autor (2015).

Quadro 7 - Efeito do cEEVP durante 14 dias sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar.

Grupo	Dia 0	Dia 4	Dia 7	Dia 14
Controle negativo (creme lanette)				
Controle positivo (Dexametasona)				
cEEVP 0,1%				
cEEVP 0,25%				
cEEVP 0,50%				

Fonte: O autor (2015).

Para uma melhor análise do tamanho das lesões induzidas em ratos submetidos ao modelo de cicatrização cutânea, foi realizada a medição destas feridas durante ambas as fases do estudo (sete e 14 dias). No tratamento por sete dias pode ser observada uma redução significativa na área das lesões dos ratos que foram tratados com 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP quando comparado ao grupo controle (salina) (dias quatro e sete). Nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP, o grau de contração foi de 38,44, 49,22 e 63,50% maior que o grupo controle negativo, respectivamente. Dersani[®] (controle positivo) apresentou aumento do grau de contração de 71,80% (Tabela 21) maior que o grupo controle negativo. Essa redução dose-dependente da área das lesões pode ser observada também com a aplicação da formulação cEEVP. Neste caso, o aumento do grau de contração para os grupos tratados com 0,10, 0,25 e 0,50% de cEEVP foi de 44,23, 56,17 e 67,70%, respectivamente. Dexametasona (controle positivo) apresentou grau de contração de 77,80% maior quando comparada ao grupo negativo (creme lanette) (Tabela 22).

Tabela 21 - Efeito do EEVP sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar durante sete dias de tratamento.

Grupo	Concentração	Área da ferida (mm ²)			Grau de contração (%)
		Dia 0	Dia 4	Dia 7	
CN (salina)	0,9%	47,85±3,43	33,36±3,41	26,24±2,77	45,18±3,97
CP (Dersani [®])	-----	46,64±1,57	23,34±2,32 ^{***}	10,43±1,79 ^{***}	77,62±3,90 ^{***}
	0,10%	46,13±3,57	29,25±1,40 ^{**}	17,20±1,42 ^{***}	62,55±4,00 ^{***}
EEVP	0,25%	47,73±3,65	26,70±1,28 ^{***}	15,43±2,26 ^{***}	67,42±5,88 ^{***}
	0,50%	47,08±2,32	25,10±2,56 ^{***}	12,29±1,80 ^{***}	73,87±3,85 ^{***}

Os valores correspondem à média ± E.P.M. de seis ratos. ^{**} $p < 0,01$; ^{***} $p < 0,001$, diferente do grupo controle negativo (salina) após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN: controle negativo; CP: controle positivo; EEVP: extrato etanólico de *Vernonia polyanthes*.

Fonte: O autor (2015).

Tabela 22 - Efeito do cEEVP sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar durante sete dias de tratamento.

Grupo	Concentração	Área da ferida (mm ²)			Grau de contração (%)
		Dia 0	Dia 4	Dia 7	
CN (lanette)	-----	47,55 ± 2,05	33,80±1,60	25,35±2,64	46,66±5,24
CP (Dexa)	0,10%	47,10±2,21	21,29±1,03 ^{***}	7,98±1,57 ^{***}	82,96±3,84 ^{***}
	0,10%	47,20± 3,66	28,92±2,04 ^{***}	15,20±2,50 ^{***}	67,30±7,83 ^{***}
cEEVP	0,25%	46,53±2,67	25,90±2,22 ^{***}	12,60±0,99 ^{***}	72,87±2,53 ^{***}
	0,50%	45,91±3,27	23,22±2,72 ^{***}	9,92±1,12 ^{***}	78,25±3,32 ^{***}

Valores correspondem à média ± E.P.M. de seis ratos. ^{***} $p < 0,001$, diferente do grupo controle negativo (salina) após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN: controle negativo; CP: controle positivo; Dexa: Dexametasona; cEEVP: creme contendo extrato etanólico de *Vernonia polyanthes* (EEVP).

Fonte: O autor (2015).

No estudo de 14 dias, pode ser observada também uma redução dose-dependente na área das lesões tratadas com EEVP nas três concentrações em todos os dias de medição (dias quatro, sete e 14). As concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP apresentaram um aumento no grau de contração de 20,71, 34,19 e 43,08%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo (salina). A aplicação de Dersani[®] (controle positivo) apresentou aumento de 48,55% (Tabela 23). Em relação às lesões tratadas com cEEVP, a redução na área da ferida também foi dose-dependente, sendo que os grupos tratados com 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP mostraram contração de 24,66, 39,22 e 48,23% maior que o grupo controle negativo (base lanette). A dexametasona produziu aumento de 54,94% (Tabela 24).

Tabela 23 - Efeito do EEVP sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar durante 14 dias de tratamento.

Grupo	Concentração	Área da ferida (mm ²)				Grau de Contração (%)
		Dia 0	Dia 4	Dia 7	Dia 14	
CN (Salina)	0,9%	46,28±1,91	32,31±1,72	23,18±1,70	18,81±0,99	59,28±2,78
CP (Dersani®)	-----	48,11±3,38	21,03±2,73 ^{***}	10,91±1,70 ^{***}	5,78±3,09 ^{***}	88,06±6,44 ^{***}
	0,10%	44,08±4,36	28,74±2,42 ^{**}	17,07±2,98 ^{***}	12,43±1,70 ^{***}	71,56±5,00 ^{***}
EEVP	0,25%	46,61±2,32	25,15±1,90 ^{**}	14,13±2,56 ^{***}	9,53±1,60 ^{***}	79,55±3,28 ^{***}
	0,50%	45,53±2,52	22,99±1,26 ^{***}	12,61±2,03 ^{***}	6,95±3,72 ^{***}	84,82±8,36 ^{***}

Os valores correspondem à média ± E.P.M. de seis ratos. ^{**} $p < 0,01$; ^{***} $p < 0,001$, diferente do grupo controle negativo (salina) após análise de variância seguida do teste de Student- Newman-Keuls. CN: controle negativo; CP: controle positivo; EEVP: extrato etanólico de *Vernonia polyanthes*.

Fonte: O autor (2015).

Tabela 24 - Efeito do cEEVP sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar durante 14 dias de tratamento.

Grupo	Concentração	Área da lesão (mm ²)				Grau de contração (%)
		Dia 0	Dia 4	Dia 7	Dia 14	
CN (lanette)	-----	45,89±2,36	34,93±3,25	25,09±2,91	18,53±1,29	59,61±2,21
CP (Dexa)	0,10%	45,90±2,11	20,96±3,71 ^{***}	10,64±1,40 ^{***}	3,57±3,16 ^{***}	92,36±6,61 ^{***}
	0,10%	45,98±3,38	28,09±3,92 ^{**}	14,97±2,44 ^{***}	11,80±1,24 ^{***}	74,31±2,39 ^{***}
cEEVP	0,25%	45,67±1,78	24,36±2,83 ^{***}	13,30±2,47 ^{***}	7,79±1,54 ^{***}	82,99±3,11 ^{***}
	0,50%	45,62±2,83	22,52±2,97 ^{***}	11,49±2,44 ^{**}	5,33±3,06 ^{***}	88,36±6,67 ^{***}

Valores correspondem à média ± E.P.M. de seis ratos. ^{**} $p < 0,01$; ^{***} $p < 0,001$, diferente do grupo controle negativo (salina) após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN: controle negativo; CP: controle positivo; Dexa: Dexametasona; cEEVP: creme contendo extrato etanólico de *Vernonia polyanthes* (EEVP).

Fonte: O autor (2015).

5.4.3 Efeito do EEVP e cEEVP sobre o perfil histopatológico de tecidos cicatrizados

Após sete e 14 dias de tratamento foi realizada eutanásia seguida de necropsia. A porção do tecido avaliado foi removida e submetida ao processamento histológico com intuito de observar prováveis alterações morfológicas microscópicas. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia ótica nas objetivas de 10x e 20x.

Após sete dias de tratamento com extrato etanólico de *V. polyanthes* (EEVP), o grupo controle (tratado com solução de NaCl 0,9%) apresentou uma epiderme (E) acentuadamente espessa com hiperplasia, maior intensidade de mononucleares (Mn), colágeno (Co) mais condensado e presença de fibroblasto (Figura 22A1) quando comparado ao grupo controle de 14 dias (Figura 22A2). O tratamento com Dersani® (controle positivo) reduziu a espessura da epiderme, o processo inflamatório (pouca presença de mono e polimorfonucleares) e produziu

uma maior proliferação de colágeno e fibroblastos, mostrando um melhor processo de cicatrização (Figuras 22B1 e 22B2) em ambas as fases do estudo (sete e 14 dias). Em relação ao tratamento com EEVP (0,10, 0,25 e 0,50%) verificou-se uma redução progressiva da epiderme e do processo inflamatório de forma dependente da concentração após sete (Figuras 22C1 a 22E1) e 14 dias de tratamento (Figuras 22C2 a 22E2). Nestes períodos, ocorreu um aumento da proliferação de colágeno e fibroblastos, mostrando uma completa cicatrização, especialmente na concentração de 0,50%. Além disso, foram também observados outros tecidos e anexos, tais como tecido adiposo, folículos pilosos e tecidos glandulares (glândulas sebácea e sudorípara).

Figura 22 - Fotomicrografia do tecido cicatrizado de ratos Wistar após sete e 14 dias de tratamento com EEVP.

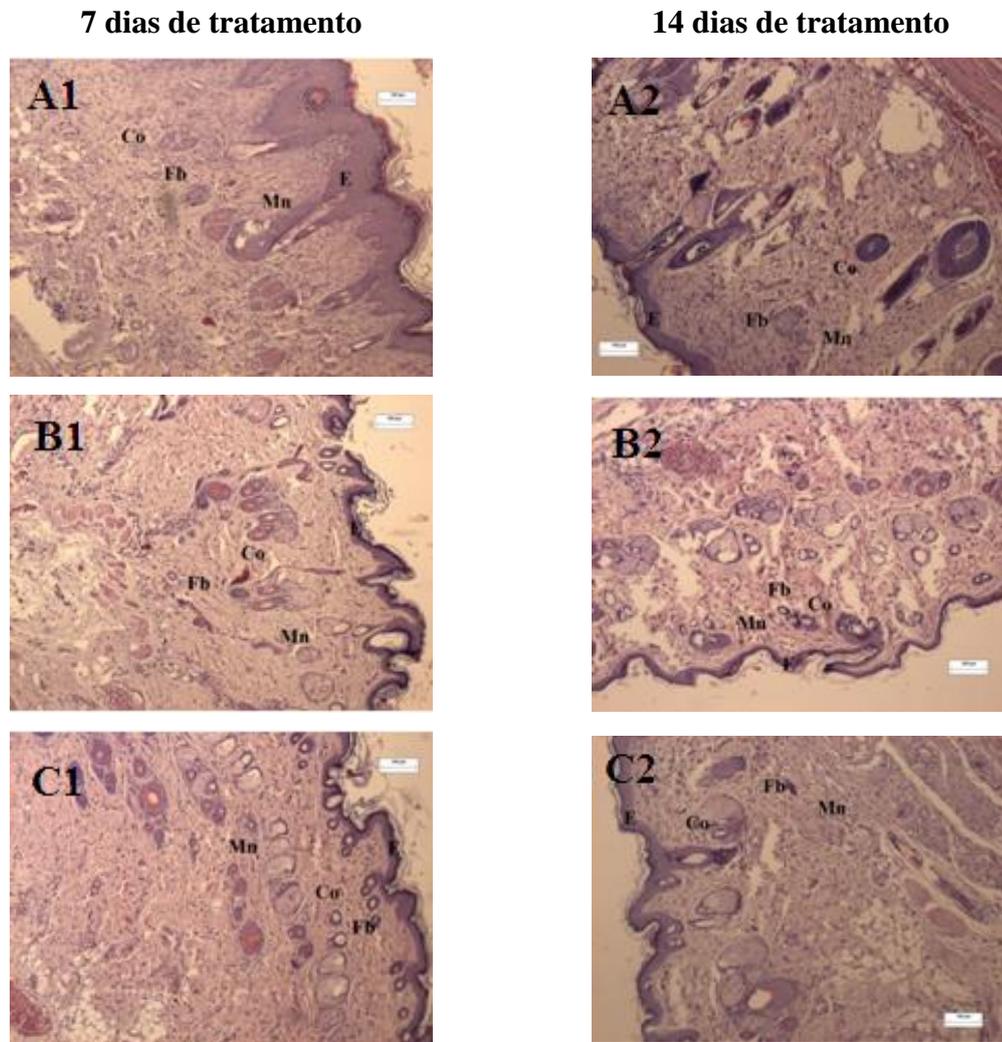
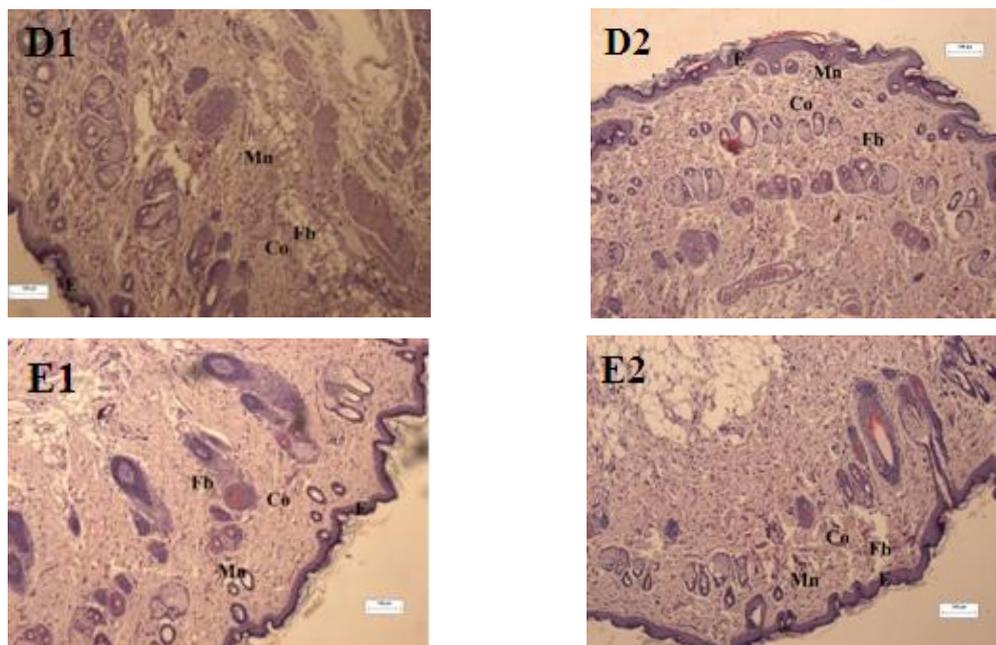


Figura 22: Continuação



Cortes histológicos de feridas de ratos corados com hematoxilina-eosina. (A1) Controle negativo (salina) – sete dias; (A2) Controle negativo (salina) – 14 dias; (B1) Controle positivo (Dersani[®]) – sete dias; (B2) Controle positivo (Dersani[®]) – 14 dias; (C1) EEVP 0,10% – sete dias; (C2) EEVP 0,10% – 14 dias; (D1) EEVP 0,25% – sete dias; (D2) EEVP 0,25% – 14 dias; (E1) EEVP 0,50% – sete dias; (E2) EEVP 0,50% – 14 dias; E = Epiderme; Mn = Mononucleares; Co = Colágeno; Fb = Fibroblasto.

Fonte: O autor (2015).

Em relação à aplicação das formulações semissólidas: creme lanette (controle negativo), dexametasona (controle positivo) e cremes contendo EEVP (cEEVP) nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP, durante sete e 14 dias de tratamento, verificou-se que todos os animais apresentaram, no local da ferida, uma cicatrização bem definida (Figura 23). A aplicação da base lanette (Figuras 23A1 e 23A2) produziu uma resposta semelhante à produzida quando se aplicou solução salina (Figuras 23A1 e 23A2), porém com as propriedades descritas um pouco menos acentuadas, entretanto, ao compararmos com os grupos que receberam tratamento (cEEVP e dexametasona) verificamos um maior espessamento da epiderme, intensidade de mononucleares, colágeno mais condensado e presença de fibroblastos. A dexametasona reduziu a espessura da epiderme, aumentou a quantidade de colágeno e mostrou presença de fibroblastos e menor quantidade de células mononucleares, demonstrando completa cicatrização após ambas as fases do estudo (Figuras 23B1 e 23B2). Nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, o creme com EEVP também promoveu uma redução da epiderme, aumentou a quantidade de colágeno, mostrou presença de fibroblastos e menor quantidade de células mononucleares quando comparado ao controle negativo nos períodos de sete (Figuras 23C1, 23D1 e 23E1) e 14 dias (Figuras 23C2,

23D2 e 23E2). Tecido adiposo, tecidos glandulares (glândulas sebácea e sudorípara) e folículos pilosos foram também visualizados na análise histológica.

Figura 23 - Fotomicrografia do tecido cicatrizado de ratos Wistar após sete e 14 dias de tratamento com cEEVP.

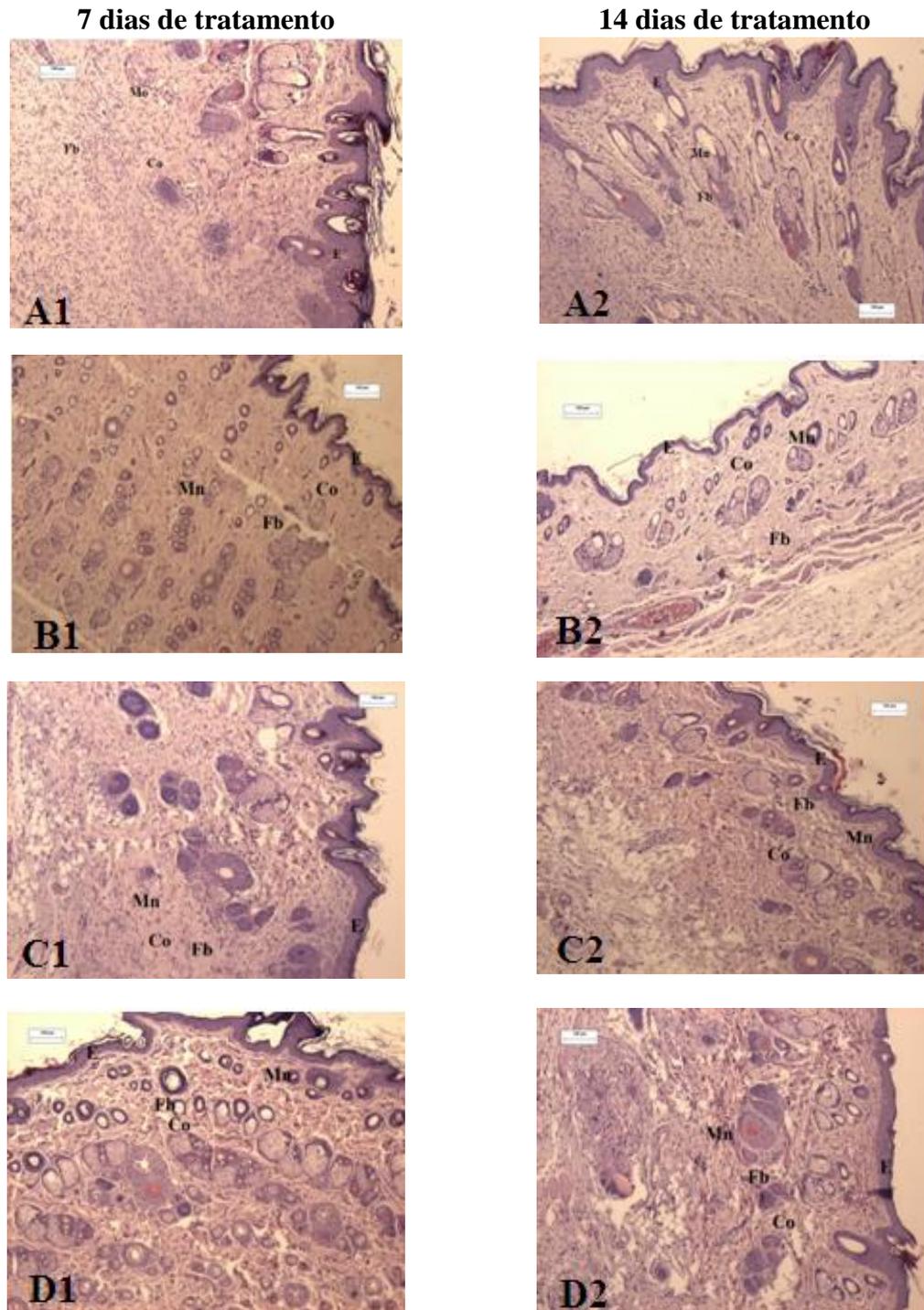
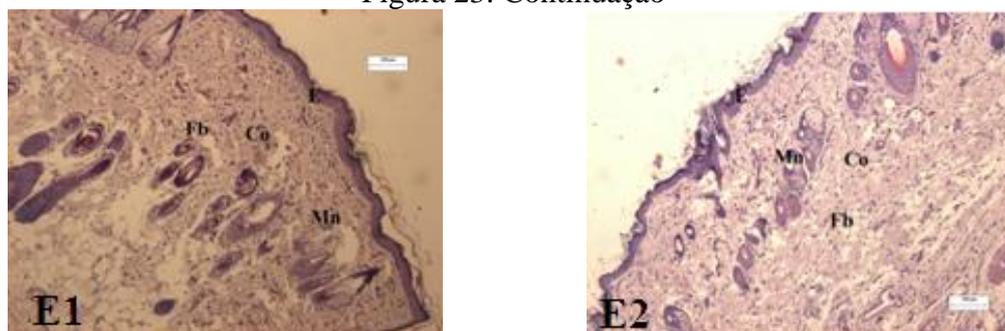


Figura 23: Continuação

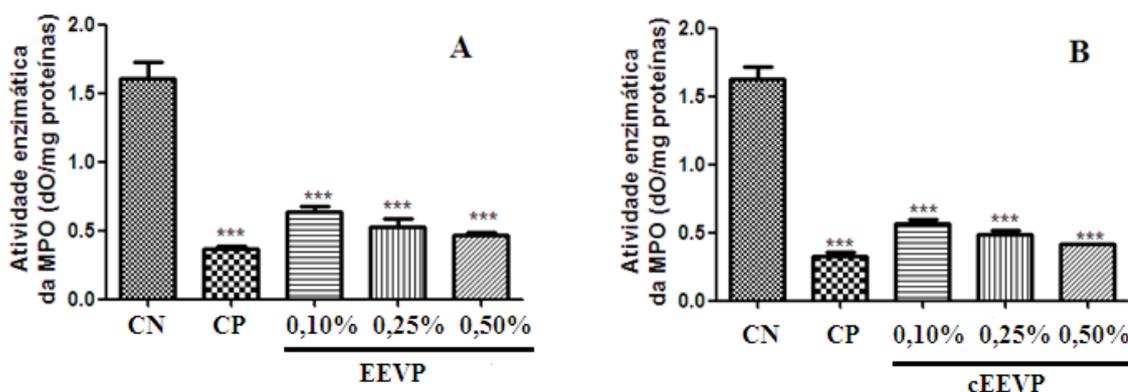


Cortes histológicos de feridas de ratos corados com hematoxilina-eosina. (A1) Controle negativo (lanette) - sete dias; (A2) Controle negativo (lanette) - 14 dias; (B1) Controle positivo (dexametasona) - sete dias; (B2) Controle positivo (dexametasona) - 14 dias; (C1) cEEVP 0,10% - sete dias; (C2) cEEVP 0,10% - 14 dias; (D1) cEEVP 0,25% - sete dias; (D2) cEEVP 0,25% - 14 dias; (E1) cEEVP 0,50% - sete dias; (E2) cEEVP 0,50% - 14 dias; cEEVP: creme contendo EEVP; E = Epiderme; Mn = Mononucleares; Co = Colágeno; Fb = Fibroblasto. Fonte: O autor (2015).

5.4.4 Efeito do EEVP e cEEVP sobre a atividade da mieloperoxidase em tecidos cicatrizados

De forma a complementar a análise microscópica, foi avaliada a ação do EEVP e cEEVP sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) que é indicativa da presença de leucócitos polimorfonucleares. A aplicação tópica do EEVP promoveu uma redução significativa ($p < 0,001$) de 60,10, 67,21 e 71,09% da atividade da enzima MPO após sete dias da indução da cicatrização cutânea nos tratamentos de 0,10, 0,25 e 0,50%, respectivamente, quando comparada ao grupo controle negativo (salina) (Gráfico 17A). Neste mesmo período de tratamento, a aplicação do cEEVP também promoveu uma redução significativa ($p < 0,001$) dose-dependente da atividade da MPO de 65,27, 69,81 e 74,67% para os grupos tratados com cEEVP nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, respectivamente, quando comparada com o controle negativo (base creme lanette) (Gráfico 17B). Como esperado, os controles positivos (Dersani[®] e dexametasona) reduziram significativamente ($p < 0,001$) a atividade de MPO em 77,25% e 80,04%, respectivamente.

Gráfico 17 - Efeito do EEVP e cEEVP sobre a atividade de MPO de tecido cicatrizado de ratos Wistar após sete dias de tratamento.

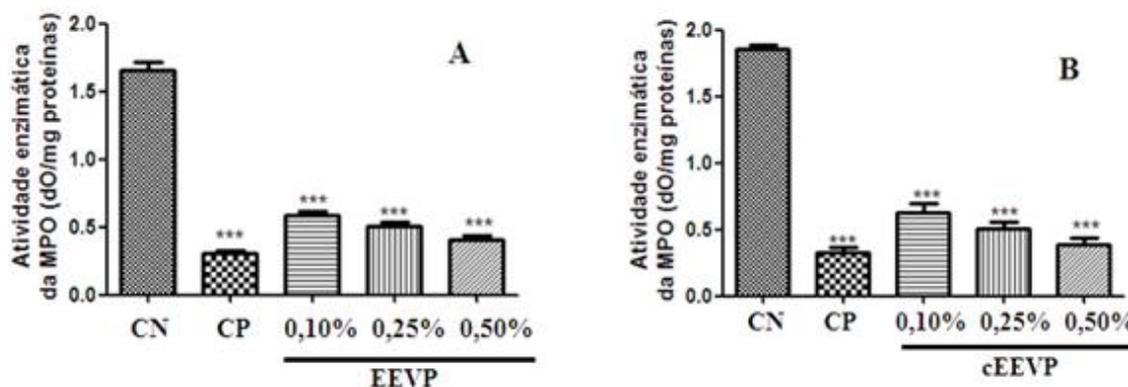


A. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da atividade de MPO após tratamento com EEVP. **B.** Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da atividade de MPO após tratamento com cEEVP. CN: controle negativo (A: salina e B: creme lanette); CP: controle positivo (A: Dersani[®] e B: dexametsona); cEEVP: creme contendo EEVP. *** $p < 0,001$, diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls.

Fonte: O autor (2015).

Considerando o período de 14 dias, pode ser observado que também houve uma redução dose-dependente significativa ($p < 0,001$) da atividade da MPO de tecido cicatrizado após tratamento com EEVP (Gráfico 18A) e cEEVP (Gráfico 18B). O tratamento com 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP reduziu em 64,44, 69,26 e 75,71% a atividade de MPO, respectivamente, comparado ao grupo controle negativo (salina), enquanto Dersani[®] (controle positivo) foi efetivo em 81,77%. As concentrações 0,10, 0,25 e 0,50% de cEEVP diminuiu a atividade da enzima em 66,21, 72,74 e 79,17%, respectivamente, quando comparado ao controle negativo (base creme lanette). A dexametasona (controle positivo) reduziu a atividade de MPO em 82,51%.

Gráfico 18 - Efeito do EEVP e cEEVP sobre a atividade de MPO de tecido cicatrizado de ratos Wistar após 14 dias de tratamento.



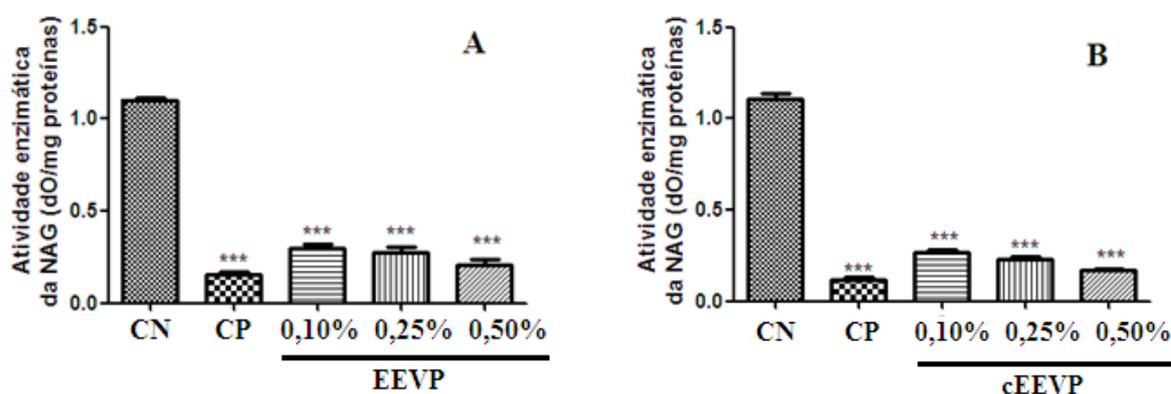
A. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da atividade de MPO após tratamento com EEVP. **B.** Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da atividade de MPO após tratamento com cEEVP. CN: controle negativo (A: salina e B: creme lanette); CP: controle positivo (A: Dersani[®] e B: dexametsona); cEEVP: creme contendo EEVP. *** $p < 0,001$, diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls.

Fonte: O autor (2015).

5.4.5 Efeito do EEVP e cEEVP sobre a atividade da N-acetil- β -D-glicorominidase em tecidos cicatrizados

A enzima N-acetil- β -D-glicorominidase (NAG) é indicativa da presença de leucócitos mononucleares no tecido. Após a excisão dos fragmentos de lesão dos ratos submetidos ao modelo de cicatrização cutânea foi realizada a dosagem da atividade desta enzima, de forma complementar a análise microscópica. Em relação à aplicação tópica do EEVP durante sete dias de tratamento foi verificada uma redução significativa ($p < 0,001$) na atividade da enzima em 72,72, 75,13 e 81,34% para os grupos tratados com EEVP nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, respectivamente, em comparação ao grupo controle negativo (salina), enquanto o Dersani[®] produziu 86,22% ($p < 0,001$) de inibição (Gráfico 19A). Neste estudo, o tratamento de sete dias com cEEVP provocou uma inibição dose-dependente de 75,96, 79,45 e 84,96% da atividade de NAG nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% de EEVP, respectivamente, quando comparada ao grupo controle negativo (creme base lanette) (Gráfico 19B). Dexametasona (controle positivo) reduziu a atividade de NAG em 89,96% ($p < 0,001$).

Gráfico 19 - Efeito do EEVP e cEEVP sobre a atividade de NAG de tecido cicatrizado de ratos após sete dias de tratamento.

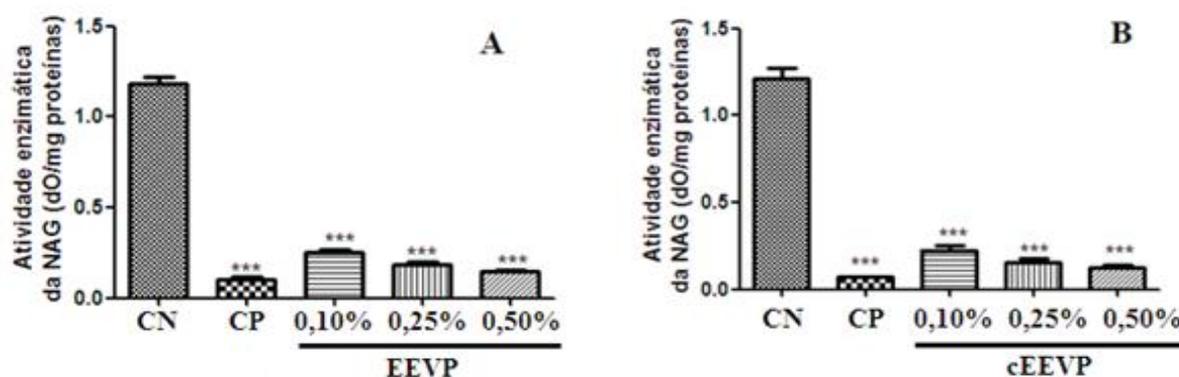


A. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da atividade de NAG após tratamento com EEVP. **B.** Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da atividade de NAG após tratamento com cEEVP. CN: controle negativo (A: salina e B: creme lanette); CP: controle positivo (A: Dersani® e B: dexametsona); cEEVP: creme contendo EEVP. *** $p < 0,001$, diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls.

Fonte: O autor (2015).

Após 14 dias da aplicação tópica de EEVP, houve uma redução significativa ($p < 0,001$) dose-dependente de 78,78, 86,16 e 87,64% da atividade de NAG nos grupos tratados com 0,10, 0,25 e 0,50%, respectivamente, em comparação ao grupo controle negativo (salina) (Gráfico 20A). Dersani® (controle positivo) inibiu 91,18% ($p < 0,001$) da atividade de NAG. Nesse período de avaliação, em relação ao controle negativo (creme base lanette), cEEVP nas concentrações 0,10, 0,25 e 0,50% produziu uma inibição significativa ($p < 0,001$) de 81,41, 87,09 e 89,68%, respectivamente, na atividade de NAG (Gráfico 20B). O tratamento com dexametasona (controle positivo) reduziu a atividade de NAG em 94,23% ($p < 0,001$).

Gráfico 20 - Efeito do EEVP e cEEVP sobre a atividade de NAG de tecido cicatrizado de ratos após 14 dias de tratamento.



A. Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da atividade de NAG após tratamento com EEVP. **B.** Os valores correspondem à média \pm E.P.M. da atividade de NAG após tratamento com cEEVP. CN: controle negativo (A: salina e B: creme lanette); CP: controle positivo (A: Dersani® e B: dexametsona); cEEVP: creme contendo EEVP. *** $p < 0,001$, diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Student Newman-Keuls.

Fonte: O autor (2015).

6 DISCUSSÃO

Vernonia polyanthes Less, conhecida como assa-peixe, tem sido largamente consumida pela população de diversas partes do mundo para tratar diferentes alterações orgânicas, como inflamação, hipertensão, hemorragia, entre outras, sem evidências científicas sobre os seus efeitos tóxicos. Considerando esse aspecto, quando se trata de toxicidade de produtos originados de plantas medicinais, a maioria das pessoas associa os efeitos tóxicos quando surgem imediatamente após consumo. Esse pensamento é decorrente da natureza intrínseca desses produtos que possuem uma variedade de substâncias com baixas concentrações que exercem efeitos benéficos e, muitas vezes, mascaram os efeitos nocivos ao organismo (GEORGE, 2011; NASRI; SHIRZAD, 2014). Além disso, a população tem acreditado ao longo do tempo que os produtos naturais não fazem mal e não apresentam efeitos colaterais e/ou tóxicos. Ao contrário, os produtos sintéticos são mais propensos a produzir toxicidade de forma aguda (FÉRES *et al.*, 2006). Nesse sentido, os estudos de doses múltiplas são necessários para garantir a segurança de produtos naturais através de ensaios pré-clínicos (SILVA *et al.*, 2002; ALVAREZ *et al.*, 2004; HASUMURA *et al.*, 2004). Esses ensaios avaliam parâmetros de toxicidade através de perfis hematológicos, bioquímicos e histopatológicos que podem auxiliar no fornecimento de valiosos subsídios sobre os efeitos tóxicos e/ou terapêuticos de determinados produtos (ORLANDINI, 2012).

Com intuito de obter evidências sobre a segurança de preparações de *V. polyanthes* usadas na medicina tradicional, ensaios pré-clínicos de toxicidade do extrato etanólico das folhas desta espécie foram realizados no presente estudo. Para isto, foram utilizados ratos Wistar por possuírem características fisiológicas e genéticas semelhante aos dos humanos, possibilitando a compreensão *in vivo* de eventos relacionados ao desenvolvimento de doenças e de tratamentos (MELO *et al.*, 2012). Além disso, foi escolhido o extrato etanólico devido a sua composição relacionada a substâncias mais polares e por ter sido caracterizado por Rodrigues (2013) em dissertação de Mestrado do nosso grupo de pesquisa. Essa composição mimetiza preparações como infusões, decocções ou garrafada, permitindo uma melhor validação do conhecimento tradicional (BARBASTEFANO *et al.*, 2007). Além disso, as doses administradas (100, 200 e 400 mg/kg) foram baseadas na dissertação desenvolvida por Temponi (2012) que estabeleceu a dose farmacológica máxima de 400 mg/kg a partir da DL₅₀ de 2,78 g/kg.

Nas doses administradas (100, 200 e 400 mg/kg), o ensaio toxicológico pré-clínico de EEVP não revelou morte dos ratos, nem alterações comportamentais, tais como ereção de

cauda, redução da atividade locomotora, taquipneia, tremor generalizado, piloereção e sedação durante o tratamento de 15 e 30 dias. Também, EEVP não influenciou na coordenação motora, nos reflexos e nem alterou as atividades relacionados com o sistema nervoso central (SNC) ou sistema nervoso autônomo (SNA), o que poderia ser indício de uma ação sedativa ou relaxante muscular (KANJANAPOTHI; PANTHONG; LERTPRASERTSUKE, 2004; OLIVEIRA, 2007). Além disso, esses resultados corroboram com o estudo de toxicidade aguda de EEVP demonstrado por Temponi e colaboradores (2012).

Considerando a massa corporal, o consumo de água e ração, também não houve variações significativas nos períodos investigados. No entanto, é importante destacar que alteração na massa corporal de animais em um estudo toxicológico é indicativa de efeitos adversos do produto testado, principalmente quando a perda da massa for maior do que 10% do valor inicial (SUBRAMANION et al., 2011). Também, a avaliação da ingestão de ração e água em uma experimentação animal é fundamental para investigar a segurança de um produto com finalidade terapêutica (MUKINDA; EAGLES, 2010), uma vez que a redução no consumo de água e ração pode ser indício de toxicidade sistêmica (MELLO, 2001).

Do ponto de vista macroscópico, os órgãos não mostraram alterações e as massas relativas não apresentaram diferença significativa entre os grupos tratados com EEVP e grupo controle (água). Barbastefano e colaboradores (2007) demonstraram resultados semelhantes ao estudar a atividade antiulcerogênica da fração metanólica de *V. polyanthes* (FMVP) em ratos submetidos a doses diárias de 3 mg/kg. Nesse estudo, FMVP não produziu alterações significativas da massa corporal e dos órgãos (coração, fígado, rins e pulmão). Portanto, esses resultados preliminares do EEVP são sugestivos de baixa toxicidade.

O conhecimento dos parâmetros hematológicos e bioquímicos é critério importante para a avaliação das modificações induzidas por processos patológicos ou influência de substâncias sobre as principais funções fisiológicas do organismo. Entre essas funções, são destacadas a cardiovascular, hepática, renal, pancreática e hematopoiética que, uma vez alteradas, é indicativa de efeitos adversos e tóxicos da substância em análise. Os valores obtidos desses parâmetros têm norteado as pesquisas experimentais na busca de fornecer informações sobre a relação entre organismos saudáveis, doentes e tratados, o que pode confirmar a eficácia ou não de determinada terapia ou intervenção clínica (PINHEIRO et al., 2003). No entanto, é verificado que ainda não foi estabelecido um consenso entre os valores de referência citados na literatura em animais de laboratório, especialmente em ratos. Isso pode ser devido à inexistência de uma padronização sobre os aspectos como dosagens, linhagens,

dieta, sexo, idade, metodologia, latitude geográfica, método de coleta de sangue e anestésico utilizado, entre outros (LILLIE; TEMPLE; FLORENCE, 1996). Por exemplo, Duncan e Prasse (1982) salientam que valores discrepantes são comumente encontrados após realização dos métodos enzimáticos. Portanto, para efeito de comparação de estudos, deve-se considerar a linhagem animal, a procedência, os substratos, pH e temperatura de reação.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial (CLSI) definem valor de referência como um resultado obtido pela observação ou mensuração quantitativa de um analito em indivíduo selecionado, com base em critérios bem definidos (LIMA et al., 2014). Os valores de referência hematológicos e bioquímicos em ratos não tratados são de grande importância e servem de ponto de partida para diversos estudos, tais como as avaliações de efeitos farmacológicos e toxicológicos (DANTAS et al., 2006).

No presente estudo, não houve diferença significativa entre os valores hematológicos dos animais que receberam o extrato etanólico de *Vernonia polyanthes* (EEVP) em relação ao grupo controle (água), demonstrando que o número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas não foi alterado, preservando a função hematopoietica. Caso esta função fosse alterada, poderia ser indício de anemia, infecções, inflamações, traumatismos, imunossupressão e problemas na hemostasia primária (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2008). No entanto, considerando os valores de referência, os resultados mostraram uma conformidade com aqueles descritos por Lima et al. (2014), o que pode ser devido à utilização do mesmo método de coleta (punção cardíaca) e anestésicos (xilazina e cetamina). Ao contrário, o Laboratório Charles River (CLIFFORD; GIKNIS, 2008) coletou o sangue através da aorta abdominal e Melo et al. (2012) realizou a coleta através da artéria mesentérica superior, usando éter etílico 50% como anestésico.

Os parâmetros bioquímicos permitem avaliar diversas funções fisiológicas do organismo, tais como cardiovascular, hepática, renal e pancreática. A dosagem de ureia e creatinina, por exemplo, avalia possíveis interferências na função renal, pois são produtos do metabolismo que têm os rins como principal órgão de excreção. Para complementar a análise da função renal, dosagem da amilase, enzima presente no pâncreas e duodeno, com eliminação pela urina, deve ser realizada. Sobre esse aspecto, a hiperamilasemia é indicativa da diminuição da função renal e lesão pancreática (KERR, 1989). Os níveis de ácido úrico, produto do metabolismo das purinas, entre outros, serve também para verificar alteração da função renal, enquanto elevados valores de glicose são indicativos de distúrbios pancreáticos. Já o cálcio participa dos processos de coagulação sanguínea, estabilidade do músculo cardíaco

e esquelético, equilíbrio ácido básico, preservação da integridade da membrana celular e na sua permeabilidade, sendo sua quantificação utilizada para avaliar a função da paratireoide, assim como níveis baixos podem estar relacionados com insuficiência renal ou pancreatite (GARCIA; KANAAN, 2014). Baseado nos resultados descritos neste trabalho, as dosagens de ureia, creatinina, amilase, ácido úrico, glicose e cálcio nos grupos tratados com EEVP durante 15 e 30 dias não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, demonstrando que EEVP não promoveu alterações nas funções renais e pancreáticas. Além disso, é importante destacar que os exames laboratoriais se complementam e não devem ser interpretados de forma independente.

LDH é uma enzima presente em vários tecidos, em especial no músculo esquelético, músculo cardíaco, fígado, rins, ossos e pulmão, sendo utilizada para investigar cardiomiopatias diversas. No presente estudo, não houve alteração dos níveis de LDH nos grupos tratados com EEVP quando comparados ao grupo controle negativo (água). Esse resultado demonstrou que EEVP não causou alteração fisiológica na musculatura cardíaca com ausência de cardiotoxicidade (CHAPELLE, 1994).

Para investigar a função hepática, os níveis de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), fosfatase alcalina, Gama-GT (gama glutamil transferase), globulinas, albumina e proteína total foram quantificados. A enzima AST é encontrada no fígado, músculos e outros órgãos, enquanto a ALT está localizada no citoplasma do fígado, apresentando maior especificidade para detectar hepatotoxicidade. A fosfatase alcalina e a Gama-GT interferem no fluxo biliar e lesão de vias biliares. Níveis elevados dessas enzimas podem evidenciar a ocorrência de alterações reversíveis ou irreversíveis na permeabilidade da membrana celular do hepatócito, na indução enzimática microsomal ou lesão estrutural de isquemia hepatobiliar, necrose ou colestase (WILLS; ASHA, 2006). Além dessas enzimas, os níveis de proteínas totais, globulinas e a albumina servem para avaliar a capacidade do fígado em realizar síntese ou metabolismo de substâncias (BOBAN; NAMBISAN; SUDHAKARAN, 2006). Também, a bilirrubina indireta e direta, produto final da destruição da porção heme da hemoglobina e de outras hemoproteínas e principal componente dos pigmentos biliares, é utilizada para investigar distúrbios hepáticos (GARCIA; KANAAN, 2014).

No presente estudo, após aplicação de 100, 200 e 400 mg/kg por via oral, EEVP não causou diferença significativa ($p < 0,05$) nos níveis de albumina, globulinas e proteínas totais quando comparados ao grupo controle. Então, considerando esse resultado e a ausência de alterações nos níveis de ureia, creatinina, glicose, entre outros, pode-se afirmar que EEVP não

prejudicou as propriedades funcionais hepáticas, uma vez que esses parâmetros estão relacionados com a síntese e metabolismo de substâncias no fígado (SHIH et al., 2005). Aliado a esses dados, animais com lesões hepáticas podem apresentar alterações funcionais no número e função das plaquetas. Segundo Shih et al. (2005), em casos de desvios circulatórios intra e extra-hepáticos, os pacientes podem apresentar esplenomegalia congestiva, resultante da hipertensão portal, levando a quadros de trombocitopenia. Entretanto, não foi verificada alteração no número de plaquetas, na análise macroscópica e no peso do fígado entre os grupos que receberam EEVP e o grupo controle (água). Por outro lado, como descrito por Center (1992), alterações no metabolismo energético geralmente estão presentes em casos de insuficiência hepática aguda que poderia ser verificada através do aumento da gliconeogênese resultante do aumento da biodisponibilidade de ácidos graxos livres provenientes da quebra de triglicérides (FELDMAN, 2004). Este fato não foi confirmado pelos parâmetros analisados neste estudo. Além do que através da análise histológica, pode-se verificar que os tecidos do fígado, assim como dos outros órgãos (cérebro, coração, pulmão, baço, rim e testículo) mantiveram estrutura preservada, confirmando ausência de toxicidade.

Considerando ainda a função hepática, os parâmetros bioquímicos encontrados nas Tabelas 7 e 8 mostraram que os valores de AST, ALT e fosfatase alcalina estão em conformidade com aqueles descritos por Cubas e colaboradores (2007), onde os níveis de AST podem variar de 39.0 a 92.0 U/L, ALT de 17.0 a 50.0 U/L e fosfatase alcalina de 39.0 a 216.0 U/L. Desse modo, de acordo com os valores de referência indicados, EEVP não produziu alterações na função hepática durante 15 e 30 dias de tratamento. No entanto, quando comparado ao grupo controle, ocorreu uma elevação significativa ($p < 0,05$ ou $p < 0,01$ ou $p < 0,001$) dos níveis dessas enzimas após tratamento com 100, 200 e 400 mg/kg de EEVP. Embora estejam dentro da normalidade dos diferentes valores de referência descritos na literatura (LIM et al., 2014; CLIFFORD; GIKNIS, 2008; MELO et al., 2012), alterações em AST, ALT e fosfatase alcalina podem constituir um alerta de uma possível toxicidade hepática em doses superiores a 400 mg/kg de EEVP.

Alterações do perfil lipídico nos animais tratados com 200 e 400 mg/kg de EEVP foram observadas após 15 e 30 dias de experimento. Os valores de colesterol total, triglicérides, VLDL e LDL-c foram reduzidos ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$), enquanto os níveis de HDL-c aumentaram ($p > 0,01$ ou $p > 0,001$) quando comparados ao grupo controle (água). No entanto, os níveis quantificados estão em conformidade com os valores de referência citados na literatura (CUBAS et al., 2007; SILVA, CATÃO-DIAS, 2007; CLIFFORD; GIKNIS, 2008; MELO et al., 2012; LIM et al., 2014). Com base nesses resultados, pode-se sugerir que

EEVP é uma possível fonte de substâncias com atividade hipolipemiante e pode ser uma importante ferramenta para o tratamento de dislipidemias. Para um melhor entendimento, as dislipidemias são fatores determinantes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares ateroscleróticas, constituindo modificações do metabolismo das gorduras que refletem sobre os níveis das lipoproteínas – ricas em triglicérides e VLDL (densidade muito baixa), e as ricas em colesterol: a LDL-c (baixa densidade), a IDL-c (densidade intermediária) e a HDL-c (alta densidade) – e as concentrações de seus diferentes componentes presentes na circulação sanguínea (FAGHERAZZI; DIAS; BORTOLON, 2008).

Do ponto de vista de ação de substâncias do metabolismo especial, o efeito hipolipemiante de EEVP pode ser atribuído, em parte, à presença de constituintes fenólicos, especialmente os flavonoides identificados por Rodrigues (2013) e Igual e colaboradores (2013). Os flavonoides têm sido usados na prevenção e tratamento de hiperlipidemia, hipercolesterolemia e aterosclerose devido as suas ações antioxidante, antiaterosclerótica e cardioprotetora. Os mecanismos de ação pelo qual essas substâncias reduzem os níveis séricos de triglicérides e colesterol e suas lipoproteínas ainda não estão completamente elucidados. No entanto, vários mecanismos têm sido propostos para explicar a atividade hipolipidêmica, sendo provavelmente resultado de várias ações complementares de diferentes vias bioquímicas. Entre os possíveis mecanismos envolvidos na atividade hipolipemiante (GONÇALVES et al., 2000; LIMA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; COVAS et al., 2006; NUNES; MOREIRA, 2007; DUDLEY et al., 2008; APOLINÁRIO et al., 2008; EL-SABBAN; ABOUAZRA, 2008; KHOO; AZIZ, 2009; PINTO, 2013) pode-se citar:

- a) Aumento da atividade da enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), enzima presente na superfície do HDL-c, que realiza a conversão do colesterol presente em quilomícrons, VLDL-c, LDL-c e tecidos periféricos em ésteres de colesterol, transportando-os para o fígado para serem metabolizados, reduzindo desse modo os níveis de colesterol sanguíneo;
- b) Inibição da atividade da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG CoA redutase), a qual está envolvida na via metabólica de formação do colesterol;
- c) Aumento da atividade da enzima lipase lipoproteica (LPL), que é responsável pela remoção dos ácidos graxos dos triglicérides presentes nos quilomícrons e VLDL-c para o tecido adiposo, resultando em diminuição dos níveis plasmáticos de triglicérides;
- d) Aumento nos níveis de ácidos biliares hepáticos e fecais, assim como esteróis neutros fecais, indicando uma alta taxa de degradação de colesterol e redução na reabsorção

intestinal de ácidos biliares. Este mecanismo ocorre principalmente no fígado, através da conversão de colesterol em ácidos biliares pela ação da enzima 7 α -hidroxilase;

e) Aumento da atividade dos receptores de LDL-c.

Além desses mecanismos, a atividade hipolipemiante de flavonoides está também associada com a proteção contra a aterosclerose através da ação antioxidante, neutralizando radicais livres, e anti-inflamatória (TEMPONI et al., 2012; RODRIGUES, 2013) através da inibição das enzimas da via do ácido araquidônico, inibindo a resposta inflamatória que precede a formação das células espumosas que se desenvolvem no vaso sanguíneo durante o processo aterosclerótico (OLSZANECKI et al., 2002; LUFT, 2003; AFONSO, 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

Um terceiro mecanismo proposto está relacionado ao aparecimento da LDL-c, uma vez que os flavonoides evitam o aparecimento dessa lipoproteína oxidada, a qual se liga a macrófagos no endotélio vascular e dá início à formação da placa aterosclerótica. Essa inibição da LDL-c ocorre através de mecanismos, como sequestro de radicais livres, atuando como agentes redutores, eliminação da doação de moléculas como átomos de hidrogênio e oxigênio *singlet*, quelação de íons metais de transição e conservação da vitamina E e carotenoides nas partículas de LDL-c (FUHRMAN; ROSEMBLAT; HAYEK, 2000; FUHRMAN; AVIRAM, 2001; YOKOZAWA; NAKAGAWA; KITANI, 2002; SILVA; LUIS; CALGAROTTO, 2004).

Com intuito de dar continuidade ao estudo com o extrato etanólico de *V. polyanthes* (EEVP), uma segunda fase foi iniciada com o objetivo de avaliar as atividades anti-inflamatória e cicatrizante a partir de um creme desenvolvido com EEVP (cEEVP). EEVP foi incorporado ao creme base lanette que possui uma consistência branca viscosa, apresenta caráter aniônico e hidrofílico e facilita a absorção de substâncias através da pele. Para isto, inicialmente, foi realizado um estudo de estabilidade do creme cEEVP, de modo a assegurar a qualidade e o comportamento das formulações ao longo do tempo.

A estabilidade mostra o tempo pelo qual o produto bioativo retém sua integridade ao ser exposto a fatores ambientais, como temperatura, pH, luminosidade e ar (FERREIRA, 2007) e a fatores relacionados ao próprio produto, como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005). Os fatores relacionados aos produtos podem protegê-los da exposição à luz, da umidade e dos gases atmosféricos, apesar de não evitar o efeito da variação da temperatura do ambiente (BABY, 2005). Neste sentido, foi necessária a realização de um estudo de estabilidade

preliminar para verificar alterações no produto no decorrer de 12 dias de observação. Considerando a formulação cEEVP, os parâmetros apresentaram conformidades satisfatórias, pois as preparações não apresentaram sinais de instabilidade, como separação de fases, nem alteração da cor, odor, aparência e homogeneidade, podendo seguir uma nova etapa do estudo.

Após aprovação preliminar de estabilidade, prosseguiu-se para o teste de estabilidade acelerada, o qual objetiva antecipar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas e normais de armazenamento (BRASIL, 2005), visando à rápida detecção da deterioração em diferentes formulações iniciais, sendo utilizada para selecionar a melhor formulação, além de verificar o prazo em que o produto permanecerá válido para uso. Quando o teste é realizado pelo armazenamento do produto sob condições esperadas ou específicas, fornece informações que asseguram que nenhuma alteração inesperada ocorrerá no produto acabado (AULTON, 2005).

Primeiramente, foi realizado o teste de centrifugação no dia zero para mostrar ausência da separação de fases da base da formulação (creme lanette) e das formulações cEEVP. Após 90 dias, este teste foi realizado novamente com as mesmas formulações para determinar o comportamento apresentado ao término das condições de estocagem, permitindo assim a obtenção de parâmetros iniciais e finais (FRIEDRICH et al., 2007). Após este período, as formulações cEEVP submetidas à baixa temperatura demonstraram separação de fases, enquanto as formulações cEEVP submetidas à temperatura ambiente e à estufa permaneceram estáveis. A instabilidade de cEEVP à baixa temperatura pode ser atribuída ao processo de congelamento/descongelamento, no qual a água pertencente ao produto é transformada em cristais de gelo, sendo necessária a aproximação de algumas moléculas, de modo a formar um núcleo cristalino. Logo, nessa etapa prevalecem forças atrativas para aproximar as partículas, ocorrendo floculação (LIEBERMAN; RIEGER; BANKER 1988), podendo levar à separação de fases. E ao descongelar, nem sempre a água retoma suas propriedades originais. Por isso, o método de descongelamento é fundamental, principalmente em produtos que podem apresentar alterações na textura. O descongelamento lento em temperaturas de refrigeração é preferencial, já que nestas condições a água pode retornar lentamente à posição original, anterior ao congelamento. No presente estudo, o descongelamento foi realizado de forma rápida em temperatura ambiente ao final da análise para executar os testes de centrifugação e microbiológico. Não foram evidenciadas outras alterações na estabilidade das formulações submetidas ao freezer, como pH e características organolépticas durante os 90 dias de avaliação (COLLA; PRENTICE-HERNÁNDEZ, 2003).

Deste modo, as formulações (creme lanette e cEEVP nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%) submetidas à temperatura ambiente, além de não apresentarem separação de fases, também não produziram alterações nas características organolépticas (aspecto, cor, odor e formação de precipitado) nos dias das análises. Ao contrário, após 90 dias, o creme lanette e as formulações cEEVP colocadas na estufa apresentaram mudanças nas características organolépticas que foram visualizadas através do endurecimento da superfície. Possivelmente, ocorreu perda de componentes hidrofílicos por evaporação, aumentando a concentração dos componentes menos voláteis e mais consistentes. A referida constatação foi reforçada pelo acúmulo de pequenas gotículas condensadas de água na superfície interna das tampas dos recipientes, sugerindo que, apesar dos cremes apresentarem umectantes em sua formulação, as suas concentrações não foram suficientes para evitar a perda de água por evaporação na temperatura avaliada (FERREIRA, 2000).

O valor do pH das formulações foi também determinado, pois alterações podem ocorrer em função de impurezas, hidrólise, decomposição e erro do processo; além de tempo de estocagem e/ou condições inadequadas de transporte e armazenamento (FERREIRA, 2000; ANSEL, POPOVICH, ALLEN-JÚNIOR, 2000). Os resultados do creme base lanette e das formulações cEEVP demonstraram que, após submeter as formulações à temperatura ambiente e ao freezer, não ocorreram variações relevantes do pH, o que é indicativo da não formação de substâncias de degradação em meios ácidos ou básicos. Todas as formulações apresentaram valores de pH compatíveis com as matérias-primas utilizadas e biocompatíveis com o valor do pH fisiológico da pele. No entanto, redução dos valores de pH ocorreu nas formulações submetidas à estufa após 60 e 90 dias de armazenamento que pode ser resultado da oxidação da fase oleosa com formação de hidroperóxidos ou mesmo a hidrólise de triglicerídeos levando à formação de ácidos graxos (MASMOUDI et al., 2005; DRISCOLL et al., 2001). Além disso, é importante destacar que esta variação de pH pode ser decorrente da degradação de algum componente da formulação, uma vez que o EEVP aparentemente apresenta caráter ácido. Para Aulton (2005), o comportamento verificado após submeter as formulações à altas temperaturas são esperados devido às condições drásticas de armazenamento, que acarreta na decomposição acelerada dos componentes da formulação, uma vez que o aumento da temperatura em 10°C produz elevação de dois a cinco vezes na degradação de fármacos (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003; BRASIL, 2004b).

Nas preparações de uso tópico, a viscosidade é um parâmetro importante e essencial para avaliar a suavidade e a consistência desejáveis, fazendo com que o produto seja facilmente aplicável, permaneça em contato com a área afetada e produza sensação agradável

ao indivíduo (THOMPSON, 2006). Além disso, as formulações tópicas devem produzir um espalhamento fácil com suavidade, sem resíduos detectáveis e que sejam aderentes à área tratada sem tornar-se pegajosa ou de difícil remoção (BARRY, 2002). Para isto, foram avaliados os parâmetros reológicos das formulações (creme lanette e cEEVP), os quais constituem uma importante ferramenta na descrição de interações intermoleculares dos componentes de um sistema, principalmente se estes apresentam dimensões coloidais, como é o caso de cremes, pastas, pomadas, loções, etc. Tal conhecimento permite o dimensionamento dos componentes de fluxo (bombas, tubulações), a previsão do comportamento do fluido durante o escoamento, além de serem bons indicadores de espalhabilidade e difusão de produtos sobre a pele (SPADA et al., 2013).

Através do estudo de tensão de cisalhamento *versus* deformação, utilizando-se um reômetro, pode-se classificar o creme lanette e as formulações cEEVP como não-Newtoniano do tipo pseudoplástico, ou seja, apresentam viscosidade decrescente (BARNES, 1997). A explicação para esse comportamento é dada em termos da destruição de agregados coloidais (SODERHJELM; SAGFORS, 1994; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009) dos surfactantes componentes do lanette (alcoóis graxos superiores e alquil sulfatos), mediante a aplicação do estímulo mecânico.

As formulações semissólidas possuem propriedades adequadas para o uso tópico, pois se deformam facilmente quando aplicadas (CHORILLI et al., 2007). No caso das formulações testadas, uma pequena tensão é capaz de diminuir acentuadamente a viscosidade, permitindo uma melhor fluidez sobre a superfície. Após aplicação, a tensão é retirada e rapidamente o material se reestrutura e retorna a viscosidade anterior, permanecendo no ambiente sem escorrer. A incorporação de extrato no creme base lanette pode afetar as interações entre as partículas da formulação, tendo seus reflexos nos parâmetros reológicos, de modo que o cisalhamento de suas camadas durante o escoamento poderá ser diferente do esperado para o solvente puro (HOLDE, 1975; HONG et al., 2008).

De modo geral, as seguintes observações podem ser feitas:

- a) Tanto a viscosidade (η) quanto o índice de consistência (Kc) do creme lanette tendem a ser maiores do que das formulações. Além disso, o índice de comportamento (n) aumenta com o aumento da concentração de extrato (os fluidos se tornam mais newtonianos). Este comportamento sugere que os componentes do extrato atuam no sentido de favorecerem a desagregação das estruturas presentes no lanette, aumentando a fluidez, o que pode influenciar a espalhabilidade, que é uma das

características essenciais dessas formas farmacêuticas, pois está intimamente relacionada com sua aplicação no local de absorção ou ação.

- b) Quanto ao comportamento temporal, apesar de alguns desvios no perfil, pode-se observar que o índice de comportamento tende a diminuir e o índice de comportamento tende a aumentar com o envelhecimento da amostra, como consequência de fenômenos de desidratação e reorganização de estruturas. Entretanto, na presença de EEVP, pode-se observar que a variação no índice de consistência (viscosidade não-newtoniana) é bem menor do que para o creme lanette, sugerindo que os componentes do extrato auxiliam no controle da viscosidade e do envelhecimento da amostra, o que pode ser atribuído ao poder antioxidante do EEVP, o qual foi confirmado nos estudos de Rodrigues (2013) e Temponi (2012). Estes autores confirmaram a atividade antioxidante do EEVP pelo método de determinação do poder de redução do ferro, pela técnica da bioautografia com DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) e pelo método de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico, além do teste com TBA (ácido tiobarbitúrico) realizado por Temponi (2012), demonstrando que o EEVP apresenta substâncias doadoras de elétrons e prótons, capazes de neutralizar radicais livres e torná-los produtos mais estáveis, além da capacidade em reduzir intermediários oxidativos dos processos de peroxidação lipídica, e correlacionou estas substâncias aos compostos fenólicos, como os flavonoides, principalmente a luteolina e a rutina.

Para complementar o estudo de estabilidade, foi realizada a análise microbiológica das formulações, a qual permite verificar se a escolha do sistema conservante é adequada, ou se possíveis interações entre os componentes da formulação poderá prejudicar-lhe a eficácia. Deve-se ressaltar que a carga microbiana elevada pode comprometer a estabilidade do produto, podendo haver perda da eficácia terapêutica, por degradação do princípio ativo ou por alteração de parâmetro físico fundamental para sua atividade, como o pH (PINTO et al., 2002). Sobre este aspecto, em relação ao controle de qualidade microbiológico de produtos não estéreis, os quais se admite a presença de carga microbiana limitada (10^2 para bactérias e 10^3 para fungos), o objetivo imediato é comprovar a ausência de micro-organismos patogênicos e determinar o número de micro-organismos viáveis em função da utilização do produto para uso tópico (ANVISA, 2010).

A análise microbiológica das formulações (creme lanette e cEEVP nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%) foi realizada nos dia zero (início do teste) e dia 90 (último dia de análise), de modo a investigar o desenvolvimento de micro-organismos no decorrer do estudo.

No dia zero, a carga microbiana encontrou-se dentro dos limites aceitáveis para produtos não estéreis para todas as formulações, sendo que as formulações com 0,25 e 0,50% de EEVP apresentaram contagem tanto de bactérias quanto de fungos menor que a formulação incorporada com 0,10% de EEVP e creme base lanette. Esse dado pode ser indicativo de ação antibacteriana do EEVP, o que foi descrito no estudo de Rodrigues (2013) e ação antifúngica dos constituintes fenólicos presentes no EEVP, os quais apresentam grupos carboxílicos capazes de formar ligação por hidrogênio com enzimas do metabolismo microbiano, desativando-as e inibindo o desenvolvimento da biomassa fúngica (PORTE; GODOY, 2001; JUGLAL; GOVINDEN; ODHAV, 2002). O mesmo resultado foi observado no dia 90 para as formulações submetidas à temperatura ambiente e ao freezer, demonstrando estabilidade microbiológica. Ao contrário, as formulações submetidas à estufa por 90 dias produziram um aumento do crescimento bacteriano e fúngico acima daquele permitido para produtos não estéreis. Provavelmente, a elevação da temperatura favoreceu o desenvolvimento da maioria dos micro-organismos, os quais apresentam multiplicação rápida à 40°C (JAY, 2005).

A estabilidade das formulações submetidas à temperatura ambiente, verificada pela análise das características organolépticas, pH, centrifugação, comportamento reológico e microbiológico, pode ser atribuída à propriedade antioxidante do EEVP, o qual atua como sequestrador de espécies reativas de oxigênio (SADIK; LAND; WANG, 2003). Além disso, esta propriedade pode ser devido à presença de substâncias fenólicas em emulsão lipídica que gera micelas pelo equilíbrio entre a água emulsionada e o tensoativo e aumenta a propriedade hidrofílica, tornando-se mais efetivos os antioxidantes solúveis em lipídeos (PORTER, 1993; FRANKEL et al., 1994).

Considerando os resultados obtidos neste estudo, pode-se destacar a importância do estudo de estabilidade das formulações tópicas, bem como o correto armazenamento para obtenção de um produto de qualidade a ser utilizado pela população. No entanto, são necessários estudos complementares, como estabilidade de prateleira, estabilidade frente a diferentes embalagens e doseamento de substâncias ativas, os quais são imprescindíveis para evidenciar informações sobre a vida útil dos produtos contendo EEVP.

De posse dos resultados do estudo de estabilidade do creme contendo EEVP (cEEVP), foi iniciado a terceira fase do estudo que se refere aos ensaios farmacológicos, de modo a comprovar as atividades anti-inflamatória tópica, cicatrizante de EEVP e evidenciar cientificamente as propriedades terapêuticas de *V. polyanthes*, uma vez que o uso tradicional não é suficiente para validar uma planta medicinal como um produto eficaz para o tratamento de determinada afecção do organismo (SIMÕES et al., 2004).

A atividade anti-inflamatória foi investigada através do efeito redutor do processo inflamatório cutâneo pela ação do creme contendo EEVP em modelos de edema de orelha. Apesar da atividade anti-inflamatória da espécie *V. polyanthes* já ter sido relatada na literatura (TEMPONI et al., 2012; RODRIGUES, 2013), ainda não havia sido descrita a ação tópica de formulações dermatológicas semissólidas. A utilização do modelo de edema de orelha permite avaliar o potencial anti-inflamatório tópico de substâncias sintéticas e naturais, extratos vegetais e formulações farmacêuticas (DE YOUNG et al., 1989; GÁBOR, 2003) através da indução de um processo inflamatório por agentes irritantes. Esse modelo, além de necessitar de pouca quantidade de amostras e apresentar agilidade na obtenção de resultados e boa reprodutibilidade, identifica produtos ou substâncias que apresentam uma absorção cutânea apropriada de maneira a atingir concentrações adequadas na pele para exercer um efeito farmacológico. Portanto, constitui um método importante para a investigação de novos medicamentos para doenças inflamatórias que acometem a pele (BOUCLIER et al., 1990; GÁBOR, 2003).

O óleo de cróton, obtido da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae), é um dos agentes flogísticos mais largamente utilizados nos modelos de edema de orelha. Sua composição engloba uma mistura de lipídeos e o acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) é o principal constituinte irritante. É utilizado para induzir inflamação (MARSON et al., 2011) que está associada ao estresse oxidativo, proliferação e ativação de oncogenes nucleares (GARG; RAMCHANDANI; MARU, 2008), gerando vasodilatação, migração leucocitária e edema (SARAIVA et al., 2010). Esses efeitos estão relacionados à ativação da proteína quinase C (PKC) que aumenta a atividade da enzima fosfolipase A2 (PLA2) seguida da liberação do ácido araquidônico (AA) presente nos fosfolipídios de membrana. A ação da cicloxigenase ou lipoxigenase converte AA em metabólitos como prostaglandinas (PG) e leucotrienos, respectivamente, que são importantes mediadores da inflamação (GARG; RAMCHANDANI; MARU, 2008). Esses mediadores agem em receptores específicos causando vasodilatação com extravasamento de plasma para os tecidos, formação do edema e infiltração leucocitária, bem como hiperproliferação celular (DE YOUNG et al., 1989; DE BERNARDIS et al., 1994; NAKAMURA et al., 2003; MURAKAWA et al., 2006). O TPA também induz a produção de óxido nítrico (NO) e citocinas inflamatórias, como IL-1 e TNF- α , que estão envolvidos na patogênese da inflamação (GUSLANDI, 1998; RITCHLIN et al., 2003; LEE et al., 2009; MURAKAWA et al., 2006; KUNDU et al., 2009). Essas vias de síntese e liberação de mediadores são inibidas por drogas tais como corticosteroides (ROMANO et al., 1997; WALLACE; CHAPMAN; MCKNIGHT, 1999).

Após a indução do processo inflamatório por óleo de cróton, a aplicação do creme cEEVP inibiu a formação do edema de forma dose-dependente, semelhante à redução produzida pela dexametasona (controle positivo), um anti-inflamatório corticosteroide. Este fármaco age em receptores nucleares e estimula a expressão de proteínas anti-inflamatórias, como a lipocortina, que inibe a PLA2 e, conseqüentemente, a síntese de PGs. Além disso, inibe a síntese de COX, potencializando o efeito (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). A aplicação da base lanette e da acetona (controle negativo) revelou ausência de interferência dos veículos, demonstrando que a redução do edema é ocasionada pelo EEVP. Estes resultados foram corroborados com a análise histopatológica de amostras das orelhas, onde o cEEVP diminuiu, de maneira marcante, a espessura da derme e da epiderme, o edema, a vasodilatação e o número de leucócitos após 24 horas da indução do edema por óleo de cróton. Desse modo, a atividade anti-inflamatória tópica de cEEVP pode ser atribuída à redução da permeabilidade vascular e ao efeito antiedematogênico.

O efeito anti-inflamatório tópico de cEEVP pode estar associado à presença de triterpenos e flavonoides (PRICE et al., 1987; MAHATO; SARKAR; PODDAR, 1988), os quais foram detectados em EEVP por Temponi e colaboradores (2012). Flavonoides como luteolina e rutina, identificados no estudo de Rodrigues (2013), podem justificar o efeito anti-inflamatório tópico por inibição das vias do TNF- α -NO e COX-2-PGE2 e através do estresse oxidativo induzido pelo óleo de cróton (MUZITANO et al., 2011; MAJAZ et al., 2011; BALAMURUGAN; KARTHIKEYAN, 2012; GOKBULUT et al., 2013; LEE et al., 2013). Rodrigues (2013) associou a atividade anti-inflamatória de EEVP à presença dos triterpenos, os quais podem inibir a enzima cicloxigenase 2 (COX-2), a produção de NO e a modulação da expressão de moléculas de adesão via inibição de NF- κ B e, ainda por serem capazes de reduzir a atividade da fosfodiesterase, um importante alvo intracelular na pesquisa de drogas com capacidade anti-inflamatória (WEE et al., 2005; ZHANG et al., 2009). Além disso, devido às semelhanças estruturais com a dexametasona, a interação dos triterpenos pentacíclicos com receptores de glicocorticoides tem apresentado ações e efeitos parecidos em vários modelos de inflamação (*in vivo* e *in vitro*) (RECIO et al., 1995).

A migração de leucócitos envolve uma interação complexa com o endotélio através da expressão de moléculas de adesão de superfície (selectinas, ICAM- moléculas de adesão intercelular e integrinas), sendo também facilitado pela ação de agentes quimiotáticos como a IL-8, C5a e LTB4 (RANG et al., 2007; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; ARNHOL, 2003). Uma vez no local inflamado, os neutrófilos liberam diversas substâncias, tais como ERO (espécies reativas de oxigênio), mediadores pró-inflamatórios e enzimas

iproteolíticas, como a mieloperoxidase (MPO), e os monócitos liberam N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) em uma fase mais tardia, contribuindo de maneira significativa na manutenção do processo inflamatório (BRADLEY et al., 1982).

A enzima mieloperoxidase (MPO) é encontrada principalmente em leucócitos polimorfonucleares, estando presente em grande quantidade nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. É considerada como uma importante enzima pró-oxidante e microbicida, liberada e ativada durante o processo de fagocitose dos neutrófilos, cuja atividade é essencial para uma efetiva resposta imune inata, funcionando como mecanismo de defesa contra micro-organismos patogênicos, além de apresentar participação em diversos processos fisiológicos e deletérios. O produto primário da ação da MPO, o ácido hipocloroso, gerado a partir de H_2O_2 e íons cloro, é considerado um oxidante altamente tóxico, levando à formação de produtos secundários com amplas ações biológicas em eventos como apoptose. Acredita-se que esse sistema MPO- H_2O_2 -Cl₂ seja a principal ferramenta utilizada pelos neutrófilos para destruir os micro-organismos, além de está envolvido na citotoxicidade do dano tecidual gerado em locais inflamados. Este dano tecidual pode aumentar caso a enzima MPO se internaliza nas células endoteliais, havendo produção de oxidantes intracelulares (ARATANI, et al., 1999; GUILPAIN, et al., 2008, SILVA, 2009). Além disso, existem fortes evidências que alguns produtos gerados a partir de reações catalisadas por MPO tenham papel na sinalização celular. Dentre estes produtos, chama atenção o oxigênio singlete. Em fagócitos, esta espécie reativa de oxigênio (ERO) pode participar tanto do processo de morte de patógenos, quanto da sinalização de eventos da inflamação (PEREIRA et al., 2000; CAMPA, 2009). Desse modo, a MPO vem sendo freqüentemente associada a diversas situações patológicas, principalmente naquelas que existe um processo inflamatório mediado por neutrófilos (BRADLEY et al., 1982), podendo ser usada como um índice de infiltração de neutrófilos nos tecidos (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984).

A N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) é uma enzima lisossomal produzida por monócitos ativados, principalmente os macrófagos, estando relacionada à fase inflamatória tardia, sendo sua atividade considerada um indicador da presença de células mononucleares no foco inflamatório (BAILEY, 1988; BARCELOS et al., 2004). Uma vez ativados, os macrófagos sofrem degranulação, liberando inúmeros mediadores inflamatórios, como as aminas bioativas (histamina e serotonina), citocinas, quimiocinas, além de mediadores lipídicos (LAWRENCE; GILROY, 2007). Esses mediadores promoverão o recrutamento e a ativação de outras células inflamatórias, dando sustentação ao processo, o qual é reduzido a partir da inibição da migração das células mononucleares, principalmente em um processo

inflamatório crônico (BAILEY, 1988). Portanto, ao inibir a migração dessas células, o extrato pode contribuir para o alívio de sintomas desencadeados pelas células inflamatórias e mediadores, um mecanismo bastante importante na resolução de doenças inflamatórias crônicas.

A aplicação do creme cEEVP apresentou inibição da atividade das enzimas MPO e NAG no modelo de inflamação cutânea induzida pela aplicação tópica de óleo de cróton, promovendo resposta semelhante a dexametasona (controle positivo). Ao passo que a aplicação da base lanette e acetona (controle negativo) não apresentaram redução da atividade das enzimas, confirmando que a inibição apresentada pelos grupos tratados é devida ao EEVP. Assim, pode-se afirmar que as formulações em estudo possuem ação inibitória sobre a migração de leucócitos, observado adicionalmente na análise histológica, quando utilizada topicamente, demonstrando que há redução dos danos causados nos tecidos por enzimas hidrolíticas e espécies reativas (GARRIDO et al., 2004). A redução da atividade de MPO foi verificada também no estudo de Barbastefano e colaboradores (2007), no qual avaliou-se a atividade desta enzima após aplicação de lupeol (triterpeno pentacíclico da família dos lupanos), substância ativa de *V. polyanthes*, objeto de diversos estudos biológicos e pedidos de patente, demonstrando assim uma importante atividade antiúlcera.

O modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA) tem sido normalmente usado para explicar a ação de substâncias, extratos e produtos sobre a via metabólica que envolve este ácido no processo inflamatório. Após aplicação sobre a pele, AA sofre ação das cicloxigenase (COX) e/ou lipoxigenase (LOX) dando origem aos metabólitos prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) que são importantes mediadores inflamatórios. A ação desses mediadores, especialmente PGE₂, LTC₄ e LTD₄, produzem uma resposta com intenso eritema e edema, mas com menor migração de leucócitos quando comparado ao óleo de cróton (YOUNG; WAGNER; SPIRES, 1983; HUMES; OPAS; BONNEY, 1986; CRUMMEY et al., 1987). O creme cEEVP mostrou-se efetivo na redução do edema induzido por AA de forma dose-dependente. Este efeito foi semelhante à indometacina (controle positivo), um anti-inflamatório não-esteroidal (AINE), inibidor da COX, que impede a síntese de PGs (RANG et al., 2007). Portanto, os resultados indicam que um dos mecanismos de ação do cEEVP envolve a inibição da via do AA, por inibição da formação de prostaglandinas e/ou leucotrienos.

O modelo de inflamação cutânea aguda induzida por fenol produz edema em 2h e mimetiza a dermatite de contato que ocorre em humanos (LIM; PARK; KIM, 2004). O fenol induz a inflamação por diversos mecanismos, os quais, na maioria das vezes, são decorrentes

da sua ação sobre os queratinócitos, promovendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como IL-1 α , TNF- α e IL-8, metabólitos do AA e espécies reativas de oxigênio (ERO) (WILMER et al., 1994; MURRAY et al., 2007). A liberação e a produção dos mediadores pró-inflamatórios podem ser atribuídas ainda à oxidação do fenol por ação das peroxidases e tirosinases, gerando radicais fenoxila (LIM; PARK; KIM, 2004; MURRAY et al., 2007). Considerando os resultados descritos anteriormente, após aplicação do creme cEEVP, ocorreu uma redução do edema que foi semelhante à dexametasona (controle positivo). Um dos mecanismos pode envolver a inibição de radicais livres no processo inflamatório por substâncias presentes no extrato, tais como flavonoides e terpenos (TEMPONI et al., 2012; RODRIGUES. 2013), que também justificam outras ações anti-inflamatórias (GOKBULUT et al., 2013).

Com base nos achados da atividade anti-inflamatória tópica, o creme contendo extrato etanólico de *V. polyanthes* (cEEVP) demonstrou que sua ação envolve diferentes mecanismos, pois foi efetivo nos modelos adotados na presente pesquisa. Portanto, a inibição está relacionada, no mínimo, com a via do AA, a formação de radicais reativos ao oxigênio (ERO) e a síntese de citocinas pró-inflamatórias (WILMER et al., 1994).

Após ter sido comprovada sua ação anti-inflamatória e sendo uma das etapas da cicatrização a fase inflamatória, é de se esperar uma ação positiva do EEVP e cEEVP sobre o processo de cicatrização, o que pode corroborar com o uso popular de *V. polyanthes*. O modelo utilizado foi baseado em Pachaly (2006) que consiste na indução de uma lesão na região dorsal dos animais. Este modelo é prático, de baixo custo, reprodutivo e confiável (MARTINS et al., 2006) e o local da lesão é de difícil manipulação pelos animais, evitando irritação por contato e autocanibalismo (KASHYAP; BEEZHOLD; WISEMAN, 1995). Para isto, foi escolhido rato da linhagem Wistar devido à facilidade de manuseio, acomodação, resistência à agressão cirúrgica e a baixa mortalidade apresentada frente aos processos infecciosos (SIMÕES et al., 1985). Foi selecionado macho e adulto para evitar a interferência das variações hormonais do ciclo estral de fêmeas que poderiam interferir no mecanismo de reparação tecidual (HARRIS, STOPAK; WILD, 1981; GOLDENBERG).

Como já descrito neste trabalho, após ruptura do tecido epitelial e conjuntivo, o processo de cicatrização inicia com o crescimento de micro-organismo e surgimento da resposta inflamatória bem caracterizada. A inflamação promove um aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, ativação de plaquetas e migração de leucócitos para a região lesionada, ocorrendo extravasamento de plasma e conseqüentemente formação do exsudato inflamatório, o qual, juntamente com a fibrina e o coágulo, forma a crosta, que

recobre a ferida (SIMÕES et al., 1986). As primeiras células a migrarem para a região lesada são os neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, as quais são produtoras de substâncias quimiotáticas, destacando o papel dos eicosanoides (leucotrienos, TX e PGs) e quimiocinas (IL-1 e TNF- α) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

No presente estudo, não foram observados sinais de infecção nos grupos tratados com EEVP e cEEVP, o que pode ser explicado pelas ações anti-inflamatória e antimicrobiana demonstrada neste estudo e por Rodrigues (2013). Desta forma, a inibição do processo infeccioso e do evento inflamatório propiciou uma reparação mais rápida do tecido lesado, pois favoreceu o surgimento de uma crosta que isolou o tecido do meio ambiente (FALEIRO et al., 2009).

A formação de crostas é considerada um sinal positivo no reparo do tecido, pois neste momento há deposição de tecido de granulação, que será posteriormente, substituído por tecido conjuntivo denso (GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ et al., 2007), havendo maior proliferação de fibroblastos e produção de colágeno. Este processo ocasiona diminuição da ferida, através da contração (RIBEIRO et al., 2004), a qual é mediada por citocinas, em particular pelo fator de crescimento transformador- β (TGF- β), além de promover a redução de sinais e efeitos quimiotáticos do infiltrado inflamatório (JORGE; DANTAS, 2005). Ao passo que a permanência de mediadores inflamatórios no local da lesão pode dificultar sua cicatrização. Os resultados mostraram que a crosta formou-se inicialmente nos grupos que receberam tratamento (EEVP e cEEVP), assim como nos controles positivos (Dersani[®] e dexametasona), em comparação aos grupos controles negativos (salina e creme base lanette), produzindo um fechamento da lesão de forma mais rápida. Dessa forma, EEVP e cEEVP induziram a formação e maturação do tecido de granulação, além de promover uma maior organização das fibras no tecido.

Considerando o dia zero, embora não significativo, foi observado uma pequena variação na medida do diâmetro das lesões em todos os grupos que pode ser devido à mobilidade da pele, à tensão elástica da pele circunjacente pela retração centrífuga das bordas e a perda de aderência da fáscia profunda (TEO; NAYLOR, 1995; CROSS; THOMPSON; ROBERTS, 1996). No entanto, essa variação não interferiu na avaliação da área da lesão, visto que foi utilizado também o valor do grau de contração, o qual depende da diferença entre as áreas iniciais e a área medida no dia da eutanásia, sendo feito individualmente. Isso possibilitou uma comparação mais precisa, eliminando possíveis diferenças causadas por feridas de diferentes tamanhos imediatamente após a cirurgia.

A área da ferida diminuiu progressivamente e declinou em direção ao 12º ou 14º dia se aproximando de zero com fechamento completo. EEVP, cEEVP, Dersani[®] e dexametasona em ambas as fases do estudo (sete e 14 dias), em comparação aos grupos controle negativo (administração de salina e creme base lanette), promoveram um aumento do grau de contração, evidenciando uma ação pontual no processo de cicatrização. O Dersani[®], uma loção a base de ácidos graxos essenciais, com vitaminas A e E, rica em ácido linoleico, por exemplo, auxilia na prevenção da formação de escaras e contribui para o restabelecimento da integridade da pele, além de revitalizar e manter o equilíbrio hídrico, melhorando a elasticidade da pele (MANDELBAUM, DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003b; FRANCO; GONÇALVES, 2008). A aplicação do creme base lanette (utilizado como controle negativo) não apresentou propriedades cicatrizantes, confirmando os achados de Batista e colaboradores (2010) e Borges (2011) que utilizaram também como controle negativo esta base. Além disso, os grupos tratados (EEVP e cEEVP) produziram crostas mais delgadas e úmidas, o que pode estar relacionada com uma ação direta do extrato sobre as lesões.

No trabalho, o fato do creme (cEEVP) permanecer sobre as lesões por mais tempo, mantém o meio úmido, em comparação ao uso de EEVP em solução, pois esta se espalha mais rapidamente e o solvente tende a evaporar no decorrer do tempo. Este resultado está de acordo com Silveira e Raiser (1995) que utilizaram própolis no tratamento de feridas contaminadas em cães e a formulação semissólida foi mais eficiente do que a tintura. Conforme esperado, no 14º dia, o grau de contração foi maior que o verificado no sétimo dia. No entanto, a diferença no 14º dia entre grupos tratados com EEVP e cEEVP e o grupo controle foi reduzida, provavelmente, devido ao processo natural da cicatrização.

A avaliação histológica dos fragmentos de pele retirados dos grupos mostrou diferenças detectáveis na coloração pela Hematoxilina-Eosina. No sétimo e 14º dia a presença de mononucleares, fibroblastos e fibras colágenas tiveram efeitos positivos nos grupos tratados. Também verificou-se diminuição progressiva dos neutrófilos e intensa proliferação capilar na reparação tecidual e angiogênese, formando brotos endoteliais em continuidade com vasos sanguíneos, permitindo, deste modo, o fluxo sanguíneo através dos cordões sólidos e sinuosos, formados a partir da proliferação celular (SANCHEZ-NETO et al., 1993). Essa proliferação capilar pode ser atribuída à estimulação da hipóxia tecidual crônica.

A atividade cicatrizante do EEVP e cEEVP pode ser atribuída a um importante papel modulador sobre o metabolismo dos fibroblastos e síntese de colágeno, levando à formação de angioblastos, que acarreta a formação de vasos sanguíneos, o que pode ser visto pela formação precoce de crostas. Não obstante, nenhuma superprodução de colágeno foi

evidenciada, o que levaria à formação de cicatriz hipertrófica, ou seja, essa não estimulação de fibroblastos em longo prazo pode ser benéfica (RIBEIRO et al., 2004).

A proliferação de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares pode ser melhor analisada nos testes que quantificam as enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG), respectivamente, com consequente demonstração do seu percentual de inibição. Foi verificada uma maior inibição destas enzimas pelos grupos tratados com EEVP e formulação de EEVP (cEEVP), semelhante à inibição apresentada pelos controles positivos (Dersani[®] e dexametasona) em comparação aos grupos controles negativos (salina e creme base lanette). Esta inibição foi mais expressiva no estudo de 14 dias, devido a menor presença de leucócitos no tecido, se comparado ao estudo de sete dias. Além disso, os grupos tratados com cEEVP foram mais eficientes do que os grupos de EEVP em inibir MPO e NAG. Provavelmente, a medida da área e grau de contração e a maior permanência do creme sobre a lesão tenham contribuído para este efeito. A inibição da atividade da enzima NAG foi mais evidente que a MPO, uma vez que os mononucleares aparecem no local lesionado a partir de 24 horas após o dano (KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984; BAILEY, 1988).

Com base nestes resultados, EEVP e cEEVP contribuíram para o reparo de lesões induzidas em ratos, evidenciando o efeito cicatrizante que pode estar associado as suas atividades anti-inflamatória e antibacteriana, bem como a presença de substâncias flavonoídicas e terpênicas, entre outras, detectadas em *V. polyanthes* (TEMPONI et al., 2012; RODRIGUES, 2013). Além disso, os dados confirmam o uso tradicional de *V. polyanthes* como cicatrizante e os produtos obtidos (EEVP e cEEVP) podem ser uma alternativa terapêutica para o tratamento de distúrbios da pele.

7 CONCLUSÃO

Considerando os resultados descritos no presente estudo, foi possível obter as seguintes conclusões:

Nas doses administradas de 100, 200 e 400 mg/kg, o extrato etanólico de *V. polyanthes* apresentou baixa toxicidade evidenciada por parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. Além de revelar uma importante atividade hipolipidêmica e um possível risco de toxicidade hepática, que merece atenção nas futuras investigações clínicas;

O creme dermatológico desenvolvido a partir do extrato etanólico de *V. polyanthes* nas concentrações 0,10, 0,25 e 0,50% demonstrou conformidades apropriadas no estudo de estabilidade, que assegura sua qualidade, podendo ser um ponto de partida para novos estudos terapêuticos;

O extrato etanólico e o creme dermatológico de *V. polyanthes* apresentaram atividades anti-inflamatória tópica e cicatrizante e constitui um produto promissor a ser testado em ensaios clínicos.

Desta forma, os resultados da pesquisa indicam que o extrato etanólico das folhas de *Vernonia polyanthes* é fonte de substâncias ativas com atividades hipolipidêmicas, anti-inflamatória tópica e cicatrizante que justificam o uso tradicional do assa-peixe e evidenciam que a espécie possui potencialidades terapêuticas com geração de produtos inovadores para a saúde humana e animal.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, Milessa da Silva. **Avaliação do Efeito do Extrato Aquoso e da Fração Fenólica Livre do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o Estado Antioxidante e o Perfil Lipídico em Ratos com Hipercolesterolemia Induzida pela Dieta**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. 109 p.
- ALAWA, C.B.I.; ADAMU, A.M.; GEFU, J.O.; AJANUSI, O.J, ABDU, P.A.; CHIEZEY, N.P.; ALAWA, J.N.; BOWAN, D.D. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vernonia amygdalina* and *Annona sengalensis*) for anthelmintic activity. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 78-81, 2003.
- ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R. M.; SNYDERMAN, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. **Advances in Rheumatology**, v. 81, n.1, p. 1-28, 1997.
- ALMEIDA, A.M.; FONSECA, C.R.; PRADO, P.M.; ALMEIDA-NETO, M.; DINIZ, S.; KUBOTA, U.; BRAUN, M.R.; RAIMUNDO, R.L.G.; ANJOS, L.A.; MENDONÇA, T.G.; FUTADA, S.M.; LEWINSOHN, T.M. Diversidade e ocorrência de Asteraceae em Cerrados de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 2, p. 1-17, 2005.
- ALON, R.; FEIGELSON, S. From rolling to arrest on blood vessels: leukocyte tap dancing on endothelial integrin ligands and chemokines at sub-second contacts. **Seminars in Immunology**, v. 14, n.2, p. 93-104, 2002.
- ALVAREZ, L.; GIL, A.G.; EZPELETA, O.; JALÓN-GARCÍA, J.A.; LÓPEZ, C.A. Immunotoxic effects of ochratoxin A in Wistar rats after oral administration. **Food Chemical Toxicology**, v. 42, n. 5, p. 825-834, 2004.
- ALVES, V.F.G.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Vernonia polyanthes* LESS (Asteraceae). **Revista da Universidade Rural, Série Ciência da Vida**, v. 22, n. 2, p. 01-08, 2003.
- ALVES, N.D.C.; SANTOS, T.C.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C.; LIRA, L.M.; DORNELAS, C.B.; CABRAL, L.M. Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do Estado do Rio de Janeiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, suppl. 0, p. 745-753, 2008.
- AMORIM, E.; MATIAS, J.E.F; COELHO, J.C.U.; CAMPOS, A.C.L.; STAHLKE Jr H.J.; TIMI, J.R.R.; ROCHA, L.C.A.; MOREIRA, A.T.R.; RISPOLI, D.Z; FERREIRA, L.M. Efeito do uso tópico do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (bagaço) na cicatrização de feridas cutâneas: estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p.67-76, 2006.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN-JÚNIOR, L.V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6. ed., São Paulo: Editorial Premier, 2000.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN-JÚNIOR, L.V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 775 p.

ANVISA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, 2004. 1 v.

ANVISA. **Farmacopéia Brasileira**, 5. ed., 2010. 1 v.

APOLINÁRIO, A.C.; MONTEIRO, M.M. DE. O; PACHÚ, C.O.; DANTAS, I.C. *Allium sativum* L. como agente terapêutico para diversas patologias: uma revisão. **Revista de Biologia e Farmácia**, v.2, n. 1, p. 01-06, 2008.

ARATANI, Y.; KOYAMA, H.; NYUI, S.; SUZUKI, K.; KURA, F.; MAEDA, N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 4, p. 1828-1836, 1999.

ARAÚJO, E. L.; RANDAU, K. P.; SENA-FILHO, J. G.; PIMENTEL, R. M. M.; XAVIER, H. S. *Acanthospermum hispidum* DC (Asteraceae): perspectives for a phytotherapeutic product. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, suppl. 0, p. 777-784, 2008.

ARAÚJO, C.A.C.; LEON, L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n. 5, p.723-728, 2001.

ARNHOL, D. J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 4-9, 2003.

ARNOLD Jr.; HARRY L; ODOM, R.B; JAMES, W.D. **Doenças da pele de Andrews: Dermatologia Clínica**. 8 ed., São Paulo: Manole, 1994.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

AZULAY, R.D.; AZULAY, D.R. **Dermatologia**. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTEJUNIOR, C.R.; PINTO, C.A.S.O.; ZAGUE, V.; AREAS, E.P.G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 233-238, 2008.

BABY, A. R. **Desenvolvimento e Avaliação da Estabilidade de Formulações Cosméticas Anticelulíticas contendo o Extrato Vegetal Comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth, Padronizado em Flavonóides Totais**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação FÁRMACOS e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. 159 p.

BADKE, M.R.; BUDÓ, M.L.D.; ALVIMN, A.T.; ZANETTI, G.D.; HEISLER, E.V. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Revista Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363-370, 2012.

BAILEY, P.J. Sponge implants as models. **Methodology in Immunology**. v. 162, p. 327-334, 1988.

BALAMURUGAN, K.; KARTHIKEYAN, J. Evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory nature of luteolin in experimentally induced hepatocellular carcinoma. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 86-90, 2012.

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

BALICK, M.; COX, P.A. **Plants, People and Culture: the Science of Ethnobotany**; M Scientific American Library, W.H. New York, NY, USA: Freeman and Company, 1996.

BANGERT, C.; BRUNNER, P.M.; STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v. 29, n. 4, p. 360-376, 2011.

BARBASTEFANO, V.; COLA, M.; FERREIRA, A.L.; SILVA, E.F.; LIMA, C.A.H.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; BRITO, A.S. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs. **Fitoterapia**, v. 78, n. 9, p. 545-551, 2007.

BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, T.H.C.; ALENCAR, A.A.; BATISTA, L.M.; OLIVEIRA, R.A.G.; GUEDES, D.N.; FALCÃO, H.S.; MOURA, M.D.; DINIZ, M.F.F.M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 4, p. 392-413, 2005.

BARCELOS, L.S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A.S.; CASSALI, G.D.; ANDRADE, S.P.; TEIXEIRA, M.M. Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL-2 in model of inflammatory angiogenesis in mice. **Inflammation Research**, v. 53, n. 10, p. 576-584, 2004.

BARNES, H.A. Thixotropy - A review. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 70, n. 1-2, p. 1-33, 1997.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p.679-688, 2009.

BARRY, B. Transdermal drug delivery. In: ALTON, M. E. **Pharmaceutics the Science of Dosage Form Design**. London: Churchill Livingstone, 2002.

BARZOTTO, I.L.M.; OLIVEIRA, S.M.M.; TAVARES, B.; DALLABRIDA, S. Stability of emulsions front of different techniques of Homogenization and cooling. **Visão Acadêmica**, v. 10, n. 2, p. 36-42, 2009.

BATISTA, J.S.; SILVA, A.E., RODRIGUES, C.M.F.; COSTA, K.M.F.M.; OLIVEIRA, A.F. PAIVA, E.S.; NUNES, F.V.A.; OLINDA, R.G. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.441-447, 2010.

BECHELLI, L.M. **Compêndio de Dermatologia**. 6. ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

BENNETT, C.O.; MYERS, J.E. **Fenômenos de Transporte**: quantidade de movimento, calor e massa: Ed. Mcgraw-Hill do Brasil, 1978.

BERNARD, J.J. **Manual de Hematologia**. 3. ed. São Paulo: Masson do Brasil, 1986.

BOBAN, P.T.; NAMBIAN, B.; SUDHAKARAN, P.R. Hypolipidaemic effect of chemically different mucilages in rats: a comparative study. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 6, p. 1021-1029, 2006.

BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L.; STERN, J.D.; GERSHWIN, E. Inflammation and native American medicine: the role of botanicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2, p. 339-347, 2000.

BORGES, E.L. **Tratamento Tópico de Úlcera Venosa**: proposta de uma diretriz baseada em evidências. 2001. Tese (Doutorado em Enfermagem) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BORGES, R.A.X.; SAAVEDRA, M.M; NAKAJIMA, J.N.; FORZZA, R.C. The Asteraceae flora of the Serra do Ibitipoca: analyses of its diversity and distribution compared with selected areas in Brazilian mountain ranges. **Systematics and Biodiversity**, v. 8, n. 4, p. 471-479, 2010.

BORGES, M.D. **Avaliação dos Extratos da *Cassia occidentalis* na Cicatrização de Feridas Cutâneas causadas por Indução de Veneno de *Bothrops moojeni* em Camundongos**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2011.

BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**, v. 42, n. 2, p. 127-154, 1990.

BOULLATA, J.I.; NACE, A.M. Safety issues with herbal medicine. **Pharmacother**, v. 20, n. 3, p. 257-269, 2000.

BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal Investigative of Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.M.; FABRI, R.L.; MATOS, M.O.; MOREIRA, F.O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS/GM nº 3916, de 30 de outubro de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual de Condutas para Úlceras Neurotróficas e Traumáticas**. Caderno de Reabilitação em Hanseníase, 1. ed, n. 2, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2004a.

BRASIL. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Anvisa, Brasília, DF, v. 1, p.52, 2004b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial União**, Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Secretaria de Atenção a Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia em Insumos Estratégicos. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Brasília, DF, 2006a.

BRASIL. Ministério da saúde. Portaria nº 971 de 3 de maio de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2006b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008 - Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2014.

BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117, n. 7, p.12S-34S, 2006.

BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANNA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu -Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 17, p. 2675-2685, 2012.

BUCKLE, D.R., HEDGECOCK, C.J.R. Drug targets in inflammation and immunomodulation. **Drug Discovery Today**, v. 2, n. 8, p. 325-332, 1997.

BUNWONG, S.; CHANTARANOTHAI, P.; KEELEY, S.C. Revisions and key to the Vernonieae (Compositae) of Thailand. **PhytoKeys**, v. 1, n. 37, p. 25–101, 2014.

BURBACH, G.J; ANSEL, J.C.; ARMSTRONG, C. A. Cytokines in the skin. In: **The Biology of the Skin**. 1. ed., The New York: Parthenon Publishing Group, 2000.

BUTCHER, E.C.; WILLIAMS, M.; YOUNGMAN, K.; ROTT, L.; BRISKIN, M. Lymphocyte trafficking and regional immunity. **Advances in Immunology**, v. 72, p. 209-253, 1999.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p.179-89, 2000.

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

CAMPA, A. **Atividade de Mieloperoxidase e Formação de Oxigênio Singlete em Monócitos, Macrófagos e Células Dendríticas**: localização versus atividade. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CAMPBELL, J.J.; HEDRICK, J.; ZLOTNIK, A.; THOMPSON, D.A., BUTCHER, E.C. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. **Science**, v. 279, n. 5349, p. 381-384, 1998.

CAMPBELL, J.J.; BUTCHER, E.C. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 3, p. 336-341, 2000.

CAMPOS, A.C.L.; GROTH, A.K.; BRANCO, A.B. Assessment and nutritional aspects of wound healing. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 11, n. 3, p.281-288, 2008.

CAMPOS, M.; OROPEZA, M.; PONCE, H.; FERNANDEZ, J.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; TORRES, H.; REYES-CHILPA, R. Relaxation of uterine and aortic smooth muscle by glaucolides D and E from *Vernonia liatroides*. **Biological e Phamaceutical Bulletin**, v. 26, n. 1, p. 112-115, 2003.

CARNEIRO, S.C.M.C.C.; FONSECA-ALVES, C.E.; VICENTE, I.S.T.; MARTINS, A.F.; FIORAVANTI, M.C.S. Efeitos do meloxicam sobre as avaliações hematológica e bioquímica renal de cães adultos sadios. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 001-007, 2014.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos Anti-Inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.

CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V.; POSSEBON, L.S.; MORIMOTO, M.S.S.; CARDOSO, L.G.V.; KAPLAN, M.A.C.; GILBERT, G. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 11, p. 946-950, 2005.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do Registro de Medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, A.C.B.; PERFEITO, J.P.S.; SILVA, L.V.C.; RAMALHO, L.S.; MARQUE, R.F.O.; SILVEIRA, D. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. **Journal Brazilian Phamachemistry Scienses**, v. 47, n. 3, p. 467-473, 2011.

CAVALHEIRO, R.C.R. O tratamento jurídico-econômico aos medicamentos fitoterápicos no Brasil e na comunidade europeia. **Pensamento e Realidade**, n. 19, p. 119-132, 2006.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CENTER, S.A. 1992. Fisiopatologia e Diagnóstico laboratorial das moléstias hepáticas, In: **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992, p.1487-1546.

CHAPELLE, J.P. Diagnóstico Bioquímico del infarto de miocárdio. In: SASTRE, F.G. **Bioquímica Clínica**. Barcelona: Barcanova, p. 235-256, 1994.

CHIVIAN, E.; BERNSTEIN, A. **How Human Health Depends on Biodiversity**. 3. ed., New Yoirk: Oxford University Press, 2008.

CHORILLI, M.; ZAGUE, V.; SCARPA, M.V.; LEONARDI, G.R. Influência da viscosidade do veículo na liberação in vitro da cafeína. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4; n 1; p. 52-60; 2007.

CHUONG, C.M.; NICKOLOFF, B.J.; ELIAS, P.M.; GOLDSMITH, L.A.; MACHER, E.; MADERSON, P.A.; SUNDBERG, J.P.; TAGAMI, H.; PLONKA, P.M., THESTRUP-PEDERSON, K.; BERNARD, B.A.; SCHRODER, J.M.; DOTTO, P.; CHANG, C.M.; WILLIAMS, M.L.; FEINGOLD, K.R.; KING, L.E.; KLIGMAN, A.M.; REES, J.L.; CHRISTOPHERS, E. What is the 'true' function of skin? **Experimental Dermatology**, v. 11, n. 2, p. 159-187, 2002.

CLARK, R.; KUPPER, T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, p. 629–637, 2005.

CLIFFORD, C.B.; GIKNIS, M.L.A. **Clinical Laboratory Parameter for Crl: WI (Han)**, 2008. Disponível em: <<http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm>> Acesso em: 29 jan. 2015.

COLLA, L.M.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Congelamento e Descongelamento – Sua influência sobre os alimentos. **Vetor**, v. 13, p. 53-66, 2003.

COUTINHO, M.R. Partial purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* (red cabbage). **Separation Science and Technology**, v. 39, n. 16, p. 3769-3782, 2004.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

COVAS, M.I.; MIRÓ-CASAS, E.; FITÓ, M.; FARRÉ-ALBADALEJO, M.; GIMENO, E.; MARRUGAT, J.; DE LA TORRE, R. Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 29, n. 5-6, p. 203-206, 2006.

CROSS, S.E.; THOMPSON, M.J.; ROBERTS, M.S. Distribution of systemically administered ampicillin, benzylpenicillin, and flucloxacillin in excisional wounds in diabetic and normal rats and effects of local topical vasodilator treatment. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.40, n.7, p.1703-1710, 1996.

CRUMMEY, A.; HARPER, G.P.; BOYLE, E.A.; MANGAN, F.R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, n. 1-2, p. 69-76, 1987.

CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. 5. ed. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária**. São Paulo: Roca, p.432-474, 2007.

CUCÉ, L.C.; NETO, C.F. **Manual de Dermatologia**. 1. ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 1990.

CZELUSNIAK, K.E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G.B.L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 12, p. 400-409, 2012.

DALAZEN, P; MOLON, A.; BIAVATTI, M.W., KREUGER, M.R.O. Effects of the topical application of the extract of *Vernonia scorpioides* on excisional wounds in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 82-87, 2005.

DANTAS, J.A.; AMBIEL, C.R.; CUMAN, R.K.N.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R.F. Immune functions of the skin. **Clinics of Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 573-585, 2001.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, v. 42, n. 1-2, p.29-33, 1994.

DECLAIR, V. The importance of growth factors in wound healing. **Ostomy/Wound Management**, v. 45, n. 4, p. 64-72, 1999.

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

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents & Actions**, v. 26, n. 3, p. 335-341, 1989.

DRISCOLL, D.F.; GIAMPIETRO, K.; WICHELHAUS, D.P.; PETERSS, H.; NEHNE, J.; NIEMANN, W.; BISTRIAN B.R. Physicalchemical stability assessments of lipids emulsions of varying oil composition. **Clinical Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 151-157, 2001.

DUDLEY, J. I.; LEKLI, I.; MUKHERJEE, S.; DAS, M.; BERTELLI, A. A.; DAS, D. K. Does white wine qualify for French paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wines and their constituents: resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56,n. 20, p. 9362-9373, 2008.

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K.W. **Patologia Clínica Veterinária**. Apêndice I. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1982.

ECKES, B.; KRIEG, T. Regulation of connective tissue homeostasis in the skin by mechanical forces. **Clinical and Experimental of Rheumatology**, v. 22, n. 33, p. S73-S76, 2004.

EL-SABBAN, F.; ABOUAZRA, H. Effect of garlic on atherosclerosis. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v.14, n, 7-8, p.195-205, 2008.

FAGHERAZZI, S.; DIAS, R.L.; BORTOLON, F. Impacto do exercício físico isolado e combinado com dieta sobre os níveis séricos de HDL, LDL, colesterol total e triglicérides. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 4, p. 381-386, 2008.

FALCÃO, H.S.; LIMA, I.O.; SANTOS, V.L.; DANTAS, H.F.; DINIZ, M.F.F.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 15, n. 4, p. 381-391, 2005.

FALEIRO, C.C.; ELIAS, S.T.H.; CAVALCANTI, L.C.; CAVALCANTI, A.S.S. O extrato das folhas de babosa, *Aloe vera* na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. **Natureza on line**, v.7, n.2, p.56- 60, 2009.

FAZAL, H.; AHMAD, N.; ABBASI, B.H. Identification, Characterization, and Palynology of High-Valued Medicinal Plants. **Scientific World Journal**, v. 10, p. 1-9, 2013.

FAZIO, M. J.; ZITELLI, J. A.; GOSLEN, J. B. Cicatrização de feridas. In: COLEMAN, W.P.; HANKE, C.W.; ALT, T.H.; ASKEN, S. **Cirurgia Cosmética – Princípios e Técnicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

FELDMAN, E.C. Hyperadrenocorticism. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 1539-1568 p.

FÉRES, C.A.; MADALOSSO, R.C.; ROCHA, O.A.; LEITE, J.P.V.; GUIMARÃES, T.M.D.P.; TOLEDO, V.P.P.; TAGLIATI, C.A. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. **Journal Ethnopharmacology**, v. 108, n. 3, p. 450-456, 2006.

FERREIRA, A.O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 4. ed., v. 2. São Paulo: Pharmabooks, 2000.

FERREIRA, A.O.; SOUZA, G.F. **Preparações Orais Líquidas**. 2. ed., São Paulo: Pharmabooks, 2007.

FONSECA, P.G. **Qualidade Fisiológica de Sementes de Assa-Peixe (*Vernonia polyanthes* Less)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Minas Gerais, 2008.

FOX, R.W.; McDONALD, A.T. **Introdução à Mecânica dos Fluidos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1998. 662 p.

FRANÇA, I.S.X.; SOUZA, A.; BAPTISTA, J.S.; BRITTO, R.S.; ROSSANA, V. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

FRANCO, L.L. **Doenças Tratadas com Plantas Mediciniais**. 2. ed., Rio de Janeiro: Vozes, 2003.

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

FRANKEL, E.N.; HUANG, S-W.; KANNER, J.; GERMAN, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1054-1059, 1994.

FRIEDRICH, M.; PRIMO, F.T.; FUNCK, J.A.B.; LAPORTA, L.V.; ALVES, M.P.; BITTENCOURT, C.F.; ESCARRONE, A.L.V. Avaliação da estabilidade físico-química de creme não iônico inscrito no Formulário Nacional. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 4, p. 558-562, 2007.

FUHLBRIGGE, R. C.; WEISHAUP C. Adhesion molecules in cutaneous immunity. **Seminars Immunopathology**, v. 29, n. 1, p. 45-57, 2007.

FUNK, V.A.; BAYER, R.J.; KEELEY, S., CHAN, R., WATSON, L., GEMEINHOLZER, B., SCHILLING, E., PANERO, J.L., BALDWIN, B.G., GARCIA, N., SUSANNA, A.; JANSEN, R.K. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biologiste Skrifter**, v. 55, p. 343-374, 2005.

FUHRMAN, B.; ROSEMBLAT, M.; HAYEK, T. Dietary consumption of ginger extract attenuates development of atherosclerosis in the atherosclerotic apolipoprotein E deficient mice: hypocholesterolemic and antioxidative effect. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1124-1131, 2000.

FUHRMAN, B.; AVIRAM, M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology**, v.12, n. 1, p. 41-48, 2001.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation Protocols**, New Jersey: Humana Press, p. 129-131, 2003.

GAMONAL, A. **Dermatologia Elementar**: compêndio de dermatologia. 2. ed., Juiz de Fora: Aloísio Gamonal, 2002.

GARCIA, M.A.T; KANAAN, S. **Bioquímica Clínica**. 2. ed., São Paulo: Atheneu, 2014.

GARG, R.; RAMCHANDANI, A. G.; MARU, G. B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 6, p. 1249-1257, 2008.

GARLE, M.J.; FRY, J.R. Sensory nerves, neurogenic inflammation and pain: missing components of alternative irritation strategies? A review and a potential strategy. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 31, n. 3, p. 295-316, 2003.

GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCÍA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; DELGADO, R. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). **Pharmacological Research**, v. 50, n. 2, p. 143-149, 2004.

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

GEORGE, P. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants - An overview. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 6, p. 40-44, 2011.

GOKBULUT, A.; OZHAN, O.; SATILMIS, B.; BATCIOGLU, K.; GUNAL, S.; SARER, E. Antioxidant and antimicrobial activities and phenolic compounds of selected *Inula* species from Turkey. **Natural Product Communications**, v. 8, n.4, p. 475-478, 2013.

GOLDENBERG, S.; BEVILACQUA, R.G. **Manual de Cirurgia**. 2. ed. São Paulo: EPU/Springer, 1981. 99-116 p.

GONÇALVES, M.C.R.; GONÇALVES, M.C.R.G.; MOURA, L.S.A.; RABELO, L.A.; FILHO, J.M.B.; CRUZ, H.M.M.; CRUZ, J. Produtos naturais inibidores da enzima HMG CoA redutase. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 81, n. 3/4, p. 63-71, 2000.

GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v.66, n. 1, p.89-98, 2005.

GONÇALVES, J.M. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Triagem Fitoquímica dos Extratos de Espécies da Família Asteraceae encontradas no Semi-Árido Baiano**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2010.

GOODWIN, A.W.; WHEAT, H.E. Sensory signals in neural populations underlying tactile perception and manipulation. **Annual Review Neurosciense**, v. 27, p. 53-77, 2004.

GROTE, K.; SCHÜTT, H.; SCHIEFFER, B. Toll-Like Receptors in Angiogenesis. **The Scientific World Journal**, v.19, n. 11, p. 981-991, 2011.

GUILPAIN, P.; SERVETTAZ, A.; BATTEUX, F.; GUILLEVIN, L.; MOUTHON, L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, n. 6, p. 421-425, 2008.

GUIRRO, E.C.O.; GUIRRO, R.. **Fisioterapia Dermatofuncional: fundamentos, recursos, patologias**. 3. ed., São Paulo: Manole, 2002.

GURBUZ, I.; USTUN, O.; YESILADA, E.; SEZIK, E.; AKYUREK, N. *In vivo* gastroprotective effects of five Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 241-244, 2002.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

GUSLANDI, M. Nitric oxide and inflammatory bowel diseases. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 28, n. 11, p. 904-907, 1998.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A.; INADA, M.; BALBÍN, M.; FUEYO, PITIOT, A.S.; ASTUDILLO, A.; HIROSE, K.; HIRATA, M.; SHAPIRO, S.D.; NOEL, A.; WERB, Z.; KRANE, S.M.; LÓPEZ-OTÍN, C.; PUENTE, X.S. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). **The FASEB Journal**, v. 21, n. 10, p. 2580-2591, 2007.

HARRIS, A.K.; STOPAK, D.; WILD, P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. **Nature**, v. 290, p. 249-251, 1981.

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

HASUMURA, M.; YASUHARA, K.; TAMURA, T.; IMAI, T.; MITSUMORI, K.; HIROSE, M. Evaluation of the toxicity of enzymatically decomposed rutin with 13-weeks dietary administration to Wistar rats. **Food Chemical Toxicology**, v. 42, n. 3, p. 439-444, 2004.

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

HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 20. ed., Barueri: Manole, 2008.

HILÁRIO, M.O.E.; TERRERI, M.T.; LEN, C. A. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 206-212, 2006.

HIR, A.L. **Noções de Farmácia Galênica**. 6. ed. São Paulo: Ed. Organização Andrei, p. 174-184, 1997.

HOFFBRAND, A.V.; MOSS, P.A.; PETTIT, J.E. **Fundamentos em Hematologia**. 5. ed., Porto Alegre: Artmed, 2008.

HOLDE, K.E.V. **Bioquímica Física**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. 194 p.

HONG, R.Y.; FENG, B.; CHEN, L.L.; LIU, G.H.; LI, H.Z.; ZHENG, Y.; NEI, D.G. Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 3, p. 290-300, 2008.

HORDEGEN, P.; HERTZBERG, H.; HEILMANN, J.; LANGHANS, W.; MAURER, V. The anthelmintic efficacy of live plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. ½, p. 51-60, 2003.

HUMES, J.L.; OPAS, E.E.; BONNEY, R.J. Arachidonic acid metabolites in mouse ear oedema. LEWIS, A. e CAPETOLA, R. In: **Advances in Inflammations Research I**. New York: Raven Press, p. 57-65, 1986.

HWANG, S.T. Mechanisms of T cell homing to skin. **Advances in Dermatology**, v.17, p. 211-241, 2001.

IGUAL, M.O.; MARTUCCI, M. E. P.; COSTA, F. B; NETO; L. G. Sesquiterpene lactones, chlorogenic acids and flavonoids from leaves of *Vernonia polyanthes Less* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 94-97, 2013.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JORGE, S.A.; DANTAS, R.S.P.E. **Abordagem Multidisciplinar no Tratamento de Feridas**. São Paulo: Atheneu, 2005.

JORGETTO, G.V.; BORIOLO, M.F.G.; SILVA, L.M.; NOGUEIRA, D.A.; JOSÉ, T.D.S.; RIBEIRO, G.E.; OLIVEIRA, N.M.S.; FIORINI, J.E. Ensaio de atividade antimicrobiana in vitro e mutagênica in vivo com extrato de *Vernonia polyanthes Less*. (Assa-peixe). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n.1, p. 53-61, 2011.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spice oils for the control of co-occurring micotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 4, p. 683-687, 2002.

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

KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A.; LERTPRASERTSUKE, N. Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga L.* (Proh Hom). **Journal Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 359-365, 2004.

KASHYAP, A.; BEEZHOLD, D.; WISEMAN, J. Effect of povidone iodine dermatologic ointment on wound healing. **The American Surgeon**, v. 61, n. 6, p. 486-491, 1995.

KERR, M.G. **Veterinary Laboratory Medicine: clinical biochemistry and haematology**. Oxford: Blackwell Scientific, 1989.

KHOO, Y.S.K.; AZIZ, Z. Garlic supplementation and serum cholesterol: a meta-analysis. **Journal Of Clinical Pharmacy And Therapeutics**, v.34, n.2, p.133-145, 2009.

KIM, L.R.; WHELPDALE, K.; ZUROWSKI, M.; POMERANZ, B. Sympathetic denervation impairs epidermal healing in cutaneous wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 6, n. 3, p. 194-201, 1998.

KINGHORN, A. D. The role of pharmacognosy in modern medicine. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 3, n. 2, p. 77-79, 2002.

KOKANE, D.D.; MORE, R.Y.; KALE, M.B.; NEHETE, M.N.; MEHENDALE, P.C.; GADGOLI, C.H. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 311-315, 2009.

KOSTER, M.I.; ROOP, D.R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **European Journal of Cell Biology**, v. 83, n. 11, p.625-629, 2004.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87, n. 6, p. 1344-1350, 1984.

KUNDU, J.K.; HWANG, D.M.; LEE, J.C.; CHANG, E.J.; SHIN, Y.K.; FUJII, H.; SUN, B.; SURH, Y.J. Inhibitory effects of oligonol on phorbol esterinduced tumor promotion and COX-2 expression in mouse skin: NFkappaB and C/EBP as potential targets. **Cancer Letters**, v. 273, n. 1, p. 86-97, 2009.

KUNKEL, E.J.; BOISVERT, J.; MURPHY, K.V.; GENOVESE, M.C.; WARDLAW, A.J.; GREENBERG, H.B.; HODGE, M.R.; WU, L.; BUTCHER, E.C.; CAMPBELL, J.J. Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 1, p. 347-355, 2002.

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

LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 1, p. 335-359, 1983.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 787-795, 2002.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, n. 2, p. 85-94, 2007.

LEE, Y.; CHOO, B.K.; YOON, T.; CHEON, M.S.; LEE, H.W.; LEE, A.Y.; KIM, H.K. Anti-inflammatory effects of *Asparagus cochinchinensis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 28-34, 2009.

LEE, C. C.; SHEN, A. R.; LAJ, Y. J.; WU, S. C. Rutin and quercetin, bioactive compounds from tartary buckwheat, prevent liver inflammation injury. **Food & Function**, v. 4, n. 5, p. 794-802, 2013.

LEITE, S.N.; PALHANO,G.; ALMEIDA,S.; BIAVATTI,M.W. Wound healing activity and systemic effects of *Vernonia scorpioides* extract in guinea pig. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 496-500, 2002.

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo: Medfarma, 2004. 51 v.

LEONARDI, G.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estabilidade de formulações cosméticas. **International Journal Pharmaceutical Compounding**, v. 3, n. 4, p.1 54-156, 2001.

LI, Y.; OHIZUMI, Y. Search for constituents with neurotrophic factor-potentiating activity from the medicinal plants of Paraguay and Thailand. **Yakugaku Zasshi**, v. 124, n. 7, p.417-424, 2004.

LIEBERMAN, H.A.; RIEGER, M.M.; BANKER, G.S. **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems**. New York: Marcel Dekker, 1988. 1 v.

LIEW, F.Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunology Letters**, v. 85, n. 2, p. 131-134, 2003.

LILLIE, L.E.; TEMPLE, N. J.; FLORENCE, L.Z. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: weight gain, hematology and clinical chemistry. **Human & Experimental Toxicology**, v. 15, n. 8, p. 612-616, 1996.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacological Research**, v. 27, n. 4, p. 442-448, 2004.

LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGHETA, P.C.; TINOCO, A.L.A.; SILVA, J.F. Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

LIMA, C.M.; LIMA, A.K.; MELO, M.G.D.; DÓRIAS, G.A.A.; LEITE, B.L.S.; SERAFINI, M.R.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R.L.C.; ARAÚJO, A.A.S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, p. 1-9, 2014.

LONGUI, C.A. Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, p. 163-171, 2007.

LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p.265-72, 2005.

LORENZI, T. **Manual de Hematologia: propedêutica e clínica**. 2. ed., São Paulo: Medsi, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais no Brasil Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, 265-275, 1951.

LUCAS, T.I.; BISHARA, R.H.; SEEVERS, R.H. A Stability program for the distribution of drug products. **Pharmaceutical Technology**, n. 2, p. 68-73, 2004.

LUFT, N. **Efeitos dos Flavonoides Narigina e Rutina no Metabolismo Lipídico em Cobaias e Aves**. 2003. Tese (Doutorado em Ciência da Nutrição) - Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2003.

LUNA, L.G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed., New York: McGraw-Hill, 1968.

MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-38, 2002.

MAHATO, S.B.; SARKAR, S.K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3037-3067, 1988.

MAIA, A.I.V.; TORRES, M.C.M.; PESSOA, O.D.L.; MENEZES, J.E.S.A.; COSTA, S.A.O.; NOGUEIRA, V.L.R.; MELO, V.M.M.; SOUZA, E.B.S.; CAVALCANTE, M.G.B.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliana*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 584-586, 2010.

MAJAZ, A.Q., TATIYA, A.U.; KHURSHID, M.; NAZIM, S.; SIRAJ, S. The miracle plant (*Kalanchoe pinnata*): a phytochemical and pharmacological review. **International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**, v. 2, n. 5, p. 1478-1482, 2011.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 394-410, 2003a.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S.A. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003b.

MARSON, C.V.; BOAS, E.V.; ZAMUNER, S.; SALVADOR, M.J. Preparo de uma formulação tópica e avaliação antiinflamatória do extrato *Blutaparon portulacoides*. In: **XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação**. Universidade do Vale do Paraíba, 2011.

MARTINS, N.L.P.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J.M.; HEIBEL, M.; BALDEZ, R.N.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, H.; MAZZA, M.; NASSIF, P.A.N.; WALLBACH, T.Z. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 66-75, 2006.

MARTUCI, M.E.P. **Análise da Interação Ecoquímica entre a Lagarta-do-Girassol *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) e as Asteraceae *Tithonia diversifolia* e *Vernonia polyanthes* utilizando Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto – São Paulo, 2012.

MARTUCI, M.E.P.; VOS, R.C H; Carollo, C.A.; NETO, L.G. Metabolomics as a potential chemotaxonomical tool: application in the Genus *Vernonia schreb.* **Plos One**, v. 9, n. 4, p. 93-149, 2014.

MASMOUDI, H.; LE DRÉAU, Y.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, n. 1-2, p. 117-131, 2005.

MATTHEWS, B.R. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 1, p. 831-856, 1999.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. 3. ed., Fortaleza: EUFC, 1998.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C.A. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, n. 1, p. 4-9, 1997.

MELLO, F.B. **Estudo dos Efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a Fertilidade e Reprodução de Ratos**. 2001. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2001. 120 p.

MELO, R.R. Características farmacobotânicas, químicas e biológicas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & I. M. Perry. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 298-302, 2009.

MELO, M.G.D.; DÓRIA, G.A.A.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A.A.S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 9, p. 1-6, 2012.

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

MEYER, S.; VOGT, T.; LANDTHALER, M.; KARRER, S. Use of phytopharmaceutical agents in dermatology. Indications, therapeutic approaches and side effects. **Hautarzt**, v. 56, n. 5, p. 483-502, 2005.

MORA, J.R.; VON ANDRIAN, U.H. T cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. **Trends in Immunology**, v. 27, n. 5, p. 235–243, 2006.

MUELLER, M. M. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 6, p. 735-744, 2006.

MERFORT, I. Arnica: new insights on the molecular mode of action of a traditional medicinal plant. **Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.** v. 10, p. 45- 48, 2003.

MUKINDA, J.T.; EAGLES, P.F.K. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 236-240, 2010.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1331-1336, 2006.

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

MURRAY, A. R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINEMI, C.; GUNTHER, M. R.; SHVEDOVA, A. A. Phenol-induced *in vivo* oxidative stress in Skin: Evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemistry Research in Toxicology**, v. 20, n. 12, p. 1769-1777, 2007.

MUZITANO, M.F.; BERGONZI, M.C.; MELO, G.O.D., LAGE, C.L.S.; BILIA, A.R.; VINCIERI, F.F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. Influence of cultivation conditions, season of collection and extraction method on the content of antileishmanial flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 132-137, 2011.

NAKAJIMA, J.N.; SEMIR, J. Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira Botânica**, v. 24, n. 4, p. 471-478, 2001.

NAKAMURA, Y.; KOZUKA, M.; NANIWA, K.; TAKABAYASHI, S.; TORIKAL, K.; HYASHI, R.; SATO, T.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 9, p. 997-1007, 2003.

NASRI, H.; SHIRZAD, H. Toxicity and safety of medicinal plants. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 21-22, 2014.

NAYAK, B.S.; RAJU, S.S.; EVERSLEY, M.; RAMSUBHAG, A. Evaluation of wound healing activity of *Lantana camara* L. – A preclinical study. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 2, p. 241-245, 2009.

NERGARD, C.S.; DIALLO, D.; MICHAELSEN, T.E.; MALTERUD, K. E.; KIYOHARA, H.; MATSUMOTO, T.; YAMADA, H.; PAULSEN, B.S. Isolation, partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. Ex Walp. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 141-152, 2004.

NUNES, P.P.; MOREIRA, A.L. **Fisiologia Hepática**. Portugal: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, v. 8, p. 1-26, 2007.

OKAMOTO, M.K.H. **Estudo das Atividades Cicatrizante e Antimicrobiana do Extrato Glicólico e do Gel de *Psidium guajava* L. e Estudo da Estabilidade do Gel**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OLGUIM, C.F.A.; HARMESKI, L.; PERCIO, M.R.; SOMENSI, A. Avaliação do potencial biológico alelopático dos extratos fracionados da raiz da *Vernonia tweediana* Baker. **Revista Varia Scientia**, v. 5, n. 10, p. 137-143, 2005.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. 2. ed., São Paulo: Atheneu, 1998.

OLIVEIRA, S.T.; LEME, M.C.; PIPPI, N.L.; RAISER, A.G.; MANFRON, M.P. Formulações do confrei (*Symphytum officinalis* L.) na cicatrização de feridas cutâneas emratos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 7-8, n. 1, p. 65-74, 2000/2001.

OLIVEIRA, T.T.; GOMES, S.M.; NAGEM, T.J.; COSTA, N.M.B.; SECOM, P.R. Efeito de diferentes doses de flavonoides em ratos hiperlipidemicos. **Revista de Nutrição**, v. 15, n.1, p.45-51, 2002.

OLIVEIRA, R.B. **Avaliação das Atividades Antinociceptiva, Antiinflamatória e Depressora do Sistema Nervoso Central do Extrato Etanólico e de Frações Purificadas Obtidos das Folhas do *Synadenium umbellatum* Pax (cola-nota)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007. 118 p.

OLIVEIRA, D.G.; PRINCE, K.A.; HIGUCHI, C.T.; SANTOS, A.C.B.; LOPES, L.M.X.; SIMÕES, M.J.S.; LEITE, C.Q.F. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 165-169, 2007.

OLIVEIRA, T.T.; SILVA, R.R.; DORNAS, W.C.; NAGEM, T.J. Flavonoides e Aterosclerose. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 1, p. 49-54, 2010.

OLIVEIRA, A.C.B.; OLIVEIRA, A.P.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, R.A.; SILVA, F.S.; REIS, S.A.G.B.; RIBEIRO, L.A.A.; ALMEIDA, J.R.G.S. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 244-249, 2013.

ORLANDINI, L.F. **Avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratos wistar expostos à amônia por inalação**. 2012. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2012.

OLSZANECKI, R.; GEBSKA, A.; KOZLOVSKI, V.I.; GRYGLEWSKI, R.J.; Flavonoids and nitric oxide synthase. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 53, n. 4, p. 571-84, 2002.

PACHALY, J.R. Terapêutica por extrapolação alométrica. In: Cubas, Z.S.; Silva, J.C.R.; Catão-Dias, J.L. (Orgs.). **Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.

PANTHONG, A.; NORKAEW, P.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTIKUL, T.; ANANTACHOKE, N. E REUTRAKUL, V. Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of the extract of gamboges from *Garcinia hanburyi* Hook f. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 335-340, 2007.

PEREIRA, C.C.; FONSECA, L.F.; SANTOS, M.V.; RODRIGUES, P.H.M.; BORELLI, P. Avaliação da atividade da mieloperoxidase neutrofílica em bovinos da raça Holandesa e sua correlação com níveis plasmáticos de ácido ascórbico. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 7, n. 3, p. 148-152, 2000.

PEREIRA, F.L.; FERNANDES, J.M.; LEITE, J.P.V. Ethnopharmacological survey: a selection strategy to identify medicinal plants for a local phytotherapy program. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 2, p. 299-313, 2012.

PICKER, L.J.; MICHIE, S.A.; ROTT, L.S.; BUTCHER, E.C. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in human. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. **American Journal of Pathology**, v. 136, n. 5, p. 1053-1068, 1990.

PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

PINHEIRO, D.C.S.N., FAVALI, C.B.F., FILHO, A.A.S., SILVA, A.C.M., FILGUEIRAS, T.M.; LIMA, M.G.S. **Parâmetros Hematológicos de Camundongos e Ratos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará**. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). 2003. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/artigos5.htm>>. Acesso em: 25 jan. 2015.

PINTÉR, E.; HELYES, Z.; PETHÖ, G.; SZOLCSÁNYI, J. Noradrenergic and peptidergic sympathetic regulation of cutaneous microcirculation in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 325, n. 1, p. 57-64, 1997.

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

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2. ed., São Paulo: Atheneu, 2003.

PINTO, J.T. **Atividade Farmacológica do Extrato Hidroalcoólico dos Frutos de *Hovenia dulcis* Thunberg e da Dihidromiricetina na Hipercolesterolemia Induzida em Ratos**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2013.

PITZALIS, C.; PIPITONE, N.; SMITH, C.; BARKER, J.; MARCHESONI, A.Y. Cutaneous lymphocyte antigen positive T lymphocytes preferentially migrate to the skin but not to the joint in psoriatic arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 39, n. 1, p. 137-145, 1996.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinallis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

PORTER, W.L. Paradoxical behavior of antioxidants in food and biological systems. **Toxicology and Industrial Health**, v. 9, n. 1-2, p. 93-122, 1993.

PRICE, K.R.; JOHNSON, I.T.; FENWICK, G.R.; MALINOW, M.R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. **Food Science and Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 27-135, 1987.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J.M.; JANSEN, J.M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, 2008.

QUEIROZ, M.B.R., MARCELINO, N.B., RIBEIRO, M.V., ESPINDOLA, L.S., CUNHA, F.R., SILVA, M.V. Development of Gel with *Matricaria recutita* L. Extract for topic application and evaluation of physical-chemical stability and toxicity. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 4, p. 574-9, 2009.

RAINSFORD, K.D.; WHITEHOUSE, M.W. Anti-inflammatory/anti-pyretic salicylic acid esters with low gastric activity. **Agents Action**, v. 10, n. 5, p. 451-455, 1980.

RAGHOW, R. The role of extracellular matrix in post-inflammatory wound healing and fibrosis. **FASEB Journal**, v. 8, n. 11, p. 823-831, 1994.

RANG, H. P.; DALE, M.M; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RATES, S.M. Plants as source of drugs. **Journal Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RECIO, M.C.; GINER, R.M.; MANEZ, S.; RIOS, J.L. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 182-185, 1995.

REIS, G.H. **Avaliação de Diversidade de Asteraceae dos Campos e Cerrados Rupestres das Serras da Bocaina e de Carrancas, Minas Gerais, Brasil**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada, Área de Concentração em Ecologia e Conservação de Recursos em Paisagens Fragmentadas e Agrossistemas da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2013.

RIBEIRO, F.A.Q.; GUARALDO, L.; BORGES, J.P.; ZACCHI, F.F.S.; ECKLEY, C.A. Clinical and histological healing of surgical wounds treated with mitomycin C. **Laryngoscope**, v.114, n. 1, p.148-152, 2004.

RIELLA, K.R.; MARINHO, R.R.; SANTOS, J.S.; PEREIRA-FILHO, R.N.; CARDOSO, J.C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.C.; THOMAZZI, S.M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656-663, 2012.

RITCHLIN, C.T.; HAAS-SMITH, S.A.; LI, P.; HICKS, D.G.; SCHWARZ, E.M. Mechanisms of TNF- α - and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 6, p. 821-831, 2003.

RODRIGUES, K.C.M. **Caracterização Química e Investigação das Atividades Antibacteriana e Anti-inflamatória Tópica de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2013.

ROMANO, M.; FAGGIONI, R.; SIRONI, M.; SACCO, S.; ECHTENACHER, B.; DI SANTO, E.; SALMONA, M.; GHEZZI, P. Carrageenan induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor. **Mediators of Inflammation**, v. 6, n. 1, p. 32-38, 1997.

ROMANEZI, R.S.; FOGLIO, M.A.; GONTIJO, J.A.R. Effect of the crude extract of *Vernonia polyanthes* Less on blood pressure and renal sodium excretion in unanesthetized rats. **Phytomedicine**, v.10, n. 2, p. 127-131, 2003.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

RYAN, T. The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. **Journal Micron**, v. 35, n. 3, p. 161-171, 2004.

RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SADIK, O.A.; LAND JR, W.H.; WANG, J. Targeting Chemical and Biological Warfare Agents at the Molecular Level. **Electroanalysis**, v. 15, n. 14, p. 1149-1159, 2003.

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annual Review Immunology**, v. 22, p. 745-763, 2004.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia**. 2. ed., São Paulo: Artmed, 2001.

SANCHEZ-NETO, R.; BARONE, B.; TEVES, D.C.; SIMÕES, M.J.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. **Acta Cirurgica Brasileira** v. 8, p. 18-23, 1993.

SANCHEZ, T.; MORENO, J.J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 877-879, 1999.

SANCTIS, D.S. **Emulsões para Uso Externo**. São Paulo: Revista Racine, v. 9, n.53, p.53-62, 1999.

SANDHYA, S.S.; SAI, K.; VINOD, K.R.; DAVID, B.; KUMAR, K. Plants as potent anti diabetic and wound healing agents- a review. **Hygeia Journal for Drugs and Medicines**, v. 3, n. 1, p. 11-19, 2011.

SANTOS, R.L.; GUIMARÃES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. F.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOME, A. R.; CAMPOS, A.R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 504-510, 2010.

SARGENT, M.G. Fiftyfold amplification of the Lowry protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 163, n. 2, p. 476-489, 1987.

SARWAR, B.; SWAIN, S.; HASAN, H.; BARKAT, M.A.; HUSSAIN, M.S. Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspectives. **Pharmacognosy Review**, v. 5, n. 10, p. 120-137, 2011.

SATO, M.; SAWAMURA, D.; INAS, S.; YAGUCHI, T.; HANADA, K.; HASHIMOTO, I. In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocyte: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but, not by the alternatively spliced form. **Dermatological Research**, v. 291, n. 7-8, p. 400-404, 1999.

SAUERSTEIN, K.; KLEDE, M.; HILLIGES, M.; SCHMELZ, M. Electrically evoked neuropeptide release and neurogenic inflammation differ between rat and human skin. **Journal of Physiology**, v. 529, n. 3, p. 803-810, 2000.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Drug Research**, v. 32, n. 3, p. 230-235, 1982.

SEGRE, J.A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **Journal of Clinical Investigation**, v. 16, n. 5, p. 1150-1158, 2006.

SETTY, A.R.; SIGAL, L.H. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy and side effects. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 34, n. 6, p.773-784, 2005.

SCHIMDIT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E.M.M.; BITTENCOURT, C.M.; ZANETTI, G.D.; HEINZMANN, B.M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 523-532, 2009.

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

SHIH, C.C.; WU, Y.W.; LIN, W.C. Aqueous extract of *Anoectochilus formosanus* attenuate hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Phytomedicine*, v.12, n. 6-7, p.453-460, 2005.

SILVA, J.; HERRMANN, S.M.; HEUSER, V.; PERES, W.; MARRONI, N.P.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic affect of rutin and quercetina by comet assay and micronucleus test. **Food Chemical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 941-947, 2002.

SILVA, A.K.; LUIS, S.; CALGAROTTO, A.K. Aspectos quimicos e biologicos associados aos flavonoides de origem natural: uma revisao de literatura. **Acta Ambiental Catarinense**, v. 3, n. 2, p. 35-54, 2004.

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Inflamação. In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos Anti-inflamatórios – Aspectos Químicos, Farmacológicos e Aplicações Terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480 p.

SILVA, C.D. **Combretum leprosum Mart (Combretaceae) – Avaliação da Atividade Anti-inflamatória Tópica em Modelos de Inflamação de Pele Agudo e Crônico em Camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009. 97 p.

SILVA, N.C.C. **Estudo Comparativo da Ação Antimicrobiana de Extratos e Óleos Essenciais de Plantas Medicinais e Sinergismo com Drogas Antimicrobianas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração biologia de parasitas e micro-organismos, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.

SILVA, A.A.; ANDRADE, L.H.C. Utilização de espécies de Asteraceae por comunidades rurais do nordeste do Brasil: relatos em Camocim de São Félix, Pernambuco. **Biotemas**, v. 26, n. 2, p. 93-104, 2013.

SILVEIRA, I.; RAISER, A.G. Controle microbiológico dos efeitos in vivo de duas apresentações da própolis em feridas contaminadas de cães. **Veterinária Notícias**, v. 1, n. 1, p. 11-17, 1995.

SILVEIRA, R.R.; FOGLIO, M.A.; GONTIJO, A.R. Effect of the crude extract of *Vernonia polyanthes* Less. on blood pressure and renal sodium excretion in unanesthetized rats. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2, p. 127-131, 2003.

SIMÕES, M.J.; UZUNIAN, A.; MORA, A.O.; SASSO, W.S. Aspectos ultra-estruturais do processo de reparação da pele de ratos albinos. **Revista Paulista de Medicina**, v. 103, n. 3, p. 103-123, 1985.

SIMÕES, M.J.; CABRAL, A.C.V.; BOYACIYAN, K.; KULAY, JR. L; SASSO, W.S. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. **Revista Paulista de Medicina**, v. 104, n. 3, p. 132-135, 1986.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2004.

SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J. Neuroendocrinology of the skin. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 5, p. 457-487, 2000.

SMITH, E.W.; MALBACH, H.I.; SUBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. **Pharmaceutical Emulsions and Suspensions**, New York: Marcel Dekker, 2000.

SODERHJELM, L.; SAGFORS, P.E. Factors Influencing the Viscosity of Kraft Black Liquor. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 20, n.4, p. J106-J110, 1994.

SOUZA, D.W.; MACHADO, T.S.L.; ZOPPA, A.L.V.; CRUZ, R.S.F.; GÁRAGUE, A.P.; SILVA, L.C.L.C. Ensaio da aplicação de creme a base de *Triticum vulgare* na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em eqüinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 3, p. 9-13, 2006.

SOUZA, F. A.; SENA, J.; MARONHO, L.T.; OLIVEIRA, C.M.R.; GUIMARÃES, A.T. Caracterização fitoquímica preliminar de infusões populares obtidas das partes aéreas das espécies *Apium leptophyllum* (Pers.) F. Muell. ex Benth.(Apiaceae), *Elvira biflora* L. (DC.) e *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 89, n. 1, p. 24-27, 2008.

SPADA, G.; GAVINI, E.; COSSUN, M.; RASSU, G.; CARTA, A.; GIUNCHEDI, P. Evaluation of the effect of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on topical administration of milk thistle extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 40-47, 2013.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel – A holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, n. 5, p. 477-502, 2000.

STADELMANN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **American Journal of Surgery**, v. 176, n. 2, p. 26S-38S, 1998.
STEINMAN, R.M.; HEMMI, H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 311, p. 17-58, 2006.

STULZER, H.K.; SILVA, M.A. Estudo de estabilidade de grânulos revestidos e comprimidos contendo Captopril. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 497-504, 2006.

SUBRAMANION, L.J.; ZURAINI, Z.; YENG, C.; YEE, L.L.; LACHIMANAN, Y.L.; SREENIVASAN, S. Acute oral toxicity of methanolic seed extract of *Cassia fistula* in mice. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 5268-5282, 2011.

TABORIANSKI, A.M. **Validação de Métodos para Análise e Estudos de Estabilidade de Anti-Retrovirais em Preparações Farmacêuticas**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Fármaco e Medicamento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

TAGLIATI, C.A.; SILVA, R.P.; FÉRES, C.A.O.; JORGE, R.M.; ROCHA, O.A.; BRAGA, F.C. Acute and chronic toxicological studies of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina[®]. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 676-682, 2008.

TAMURA, E.K.; JIMENEZ, R.S.; WAISMAM, K.; GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P.; MALPEZZI-MARINHO, E.A.L.; MARINHO, E.A.V.; FARSKY, S.H.P. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 478-485, 2009.

TAS, Ç.; ÖZKAN, Y.; SAVASER, A.; BAYKARA, T. *In vitro* release studies of chlorpheniramine maleate from gels prepared by different cellulose derivates. **II Farmaco**, v. 4, n. 58, p. 605- 611, 2003.

TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.A.M.V.A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina**, v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.

TEMPONI, V.S. **Investigação Química e Atividades Farmacológicas de *Vernonia polyanthes* Less.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2012.

TEMPONI, V.S.; SILVA, J.B.; ALVES, M.S.; RIBEIRO, A.; PINHO, J.J.R.G.; YAMAMOTO, C.H.; PINTO, M.A.O.P.; VIEIRA, G.D.; SOUSA, O.V. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Vernonia polyanthes* leaves in rodents. **International Journal of Moleculas Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3887-3899, 2012.

TEO, T.C.; NAYLOR, I.L. Modifications to the rate of wound contraction by allopurinol. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 48, n. 4, p. 198-202, 1995.

THOMPSON, J.E. **A Prática Farmacêutica na Manipulação de Medicamentos.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapeuta. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-21, 2006.

TREML, T.L. **O Uso da Dexametasona e a Fertilidade do Touro.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) - Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, 2010. 54 p.

VARELLA, M.D. Biodiversidade: o Brasil e o quadro internacional. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v. 40, n. 1, p. 123-141, 1997.

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

VEHABOVIC, M.; HADZOVIC, S.; STAMBOLIC, F.; HADZIC, A.; VRANJES, E.; HARACIC, E. Stability of ranitidine in injectable solutions. **International Journal Pharmaceutics**, v. 256, n. 1-2, p. 109-115, 2003.

VIEIRA, S.C.; KRAUSE, G.A.; ZAMPIROLO, J.A.; LUCINDA, R.M.; SCHLEMPER, V.; SCHLEMPER, S.R.M. Efeito cicatrizante da pomada de *Persea cordata* Mez (Lauraceae) em feridas cutâneas de cobaias. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, n. 3, p. 31-35, 2001.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 9-15, 2000.

VON ANDRIAN, U.H.; MACKAY, C.R. T cell function and migration. Two sides of the same coin. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 14, p. 1020-1034, 2000.

VON ANDRIAN, U.H.; MEMPEL, T.R. Homing and cellular traffic in lymph nodes. **Native Review Immunology**, v. 3, p. 867-878, 2003.

WALLACE, J.L.; CHAPMAN, K.; MCKNIGHT, W. Limited antiinflammatory efficacy of cyclo-oxygenase-2 inhibition in carrageenan-airpouch inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, n. 5, p. 1200-1204, 1999.

WALTERS, K.A.; ROBERTS, M.S. **Dermatological and Transdermal Formulations**. New York: Informa Healthcare, 2007. 119 v.

WAYNFORTH, B.H. Injection techniques. In: **Experimental and Surgical Techniques in the Rat**. London: Academic Press, 1980.

WEE, S.S.; SHIN, Y.W.; BAE, E.A.; KIM, D.H. Effect of chunghyuldan in chronic oxazolone-induced mouse dermatitis. **Biological Pharmacy Bulletin**; v. 28, n. 6, p. 1079-1082, 2005.

WELSS, T.; BASKETTER, D.A.; SCHRODER, K.R. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicology In Vitro**, v. 18, n. 3, p. 231-243, 2004.

WILLS, P.J.; ASHA, V.V. Protective effect of *Lygodium flexuosum* (L.) Sw. extract against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, p. 320-326, 2006.

WILLIAMS, I. R.; KUPPER, T. S. Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. **Life Sciences**, v. 58, n. 18, p. 1485-1507, 1996.

WILLOUGHBY, D.A. *In vivo* models of Inflammation. In: WINYARD, P.G.; WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation Protocols**, New Jersey: Humana Press, p. 129-131, 2003.

WILMER, J. L.; BURLESON, F. G.; KAYAMA, F.; KANNO, J.; LUSTER, M. I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, p. 915-922, 1994.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healinh. **Wound Healing**, v.77, n. 3, p. 509-528, 1997.

WYNGAARDEN, J.B.; SMITH, L.H.J.R.; BENETT, J.C. **Tratado de Medicina Interna**. 19. ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1993. 2 v. 1338 p.

YOKOZAWA, T.; NAKAGAWA, T.; KITANI, K. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3549-3552, 2002.

YOUNG, J.M.; WAGNER, B.; SPIRES, D.A. Tachyphylaxis in 12-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid ear edema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 48-52, 1983.

YOUNG, J.M.; SPIRES, D.A.; BEDORD, C.J.; WAGNER, B.; BALLRON, S.J.; DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, n. 4, p. 367-371, 1984.

ZANCANARO, C.; MERIGO, F., CRESCIMANNO, C.; ORLANDINI, S.; OSCULATI, A. Immunohistochemical evidence suggests intrinsic regulatory activity of human eccrine sweat glands. **Journal of Anatomy**, v. 194, n. 3, p. 433-444, 1999.

ZANIN, S.M.W. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 47-58, 2001.

ZANON, R.B.; PEREIRA, D.F; BOSCHETTI, T.K.; SANTOS, M.; ATHAYDE, M.L. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 226-229, 2008.

ZHANG, G.; GHOSH. S. Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, p. 13-19, 2001.

ZHANG, Z.; JIANG, J.; YU, P.; ZENG, X.; LARRICK, J.W.; WANG, Y. Hypoglycemic and beta cell protective effects of andrographolide analogue for diabetes treatment. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, n. 62, p. 1-13, 2009.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 121-127, 2000.