

GABRIELLE LÜCK DE ARAÚJO

**ESTUDO DE FORMULAÇÕES DE FITODERIVADOS E  
FLAVONOIDE NA INFLAMAÇÃO E CICATRIZAÇÃO  
DE FERIDAS EM COELHOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A663e  
2010

Araújo, Gabrielle Lück de,  
Estudo de formulações de fitoderivados e flavonoide na  
inflamação e cicatrização de feridas em coelhos / Gabrielle  
Lück de Araújo. – Viçosa, MG, 2010.  
xviii, 114f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Tânia Toledo de Oliveira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Flavonoides. 2. Cicatrização de feridas. 3. Inflamação.  
4. Agentes anti-inflamatórios. 5. Produtos naturais.  
6. Bioquímico. 7. Coelho como animal de laboratório.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 572.592

GABRIELLE LÜCK DE ARAÚJO

**ESTUDO DE FORMULAÇÕES DE FITODERIVADOS E  
FLAVONOIDE NA INFLAMAÇÃO E CICATRIZAÇÃO  
DE FERIDAS EM COELHOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 10 de março de 2010.



Prof. Aloísio da Silva Pinto  
(Coorientador)



Prof.<sup>a</sup> Silvia Ribeiro de Souza e Silva



Prof.<sup>a</sup> Carla de Oliveira Barbosa Rosa



Prof.<sup>a</sup> Virginia Ramos Pizziolo



Prof.<sup>a</sup> Tânia Toledo de Oliveira  
(Orientadora)

*A Deus, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida.*

*Aos meus queridos pais Esther e Gerziel e ao meu irmão André, pelo amor, apoio e incentivo em todas as fases e momentos da minha vida.*

*Ao meu querido marido Jonathan, pelo amor, apoio, incentivo, alegria e companheirismo.*

*Ao meu filho Nathan, pelo amor, pelo carinho e pela paciência quando mamãe precisou se ausentar.*

*À minha querida vovó Mimi, pelo incentivo, amor e carinho.*

*Ao Fernando, pelo apoio, pelo incentivo e pela paciência nesses anos.*

*Aos meus cunhados Milena e Richard, por todos os anos de carinho, amor e incentivo.*

*À minha sogra e sogro, Judy e Thomas, pelo amor, pelo carinho e pela atenção.*

*Aos queridos Tia Eliana, Tio Zé e Caio, pelo amor, incentivo e apoio em toda a minha vida.*

*Aos meus avós que estão junto a Deus, Elce, Dito e Luludi, por acreditarem e sempre torcerem por mim.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica Agrícola, pela oportunidade de realização do curso.

À professora Tânia Toledo de Oliveira, pelo carinho, pela amizade, pelo incentivo pela orientação e pelos ensinamentos durante todos esses anos.

Ao professor Tanus Jorge Nagem, pela amizade, pelo apoio e pelos ensinamentos durante esses anos.

Ao meu coorientador, Aloísio da Silva Pinto, pela orientação e pela atenção.

Aos professores integrantes da banca, por participarem de mais uma etapa da minha formação profissional.

Aos professores Marcelo Rocha da Costa e Marilane Kalyetta Almeida Fonseca, pela contribuição.

Às amigas de Doutorado Priscila e Luciana, pela amizade, pela colaboração e pelo incentivo nesses quatro anos de convívio.

Ao secretário da pós-graduação Eduardo, pelo apoio, pelo incentivo e pela colaboração.

Aos colegas do Laboratório Biofármacos, Eliane, Vanessa, Carla, Ana Paula, Luana, Silvia, Agnaldo e Maria Aparecida, pela colaboração.

Aos amigos de Viçosa, Edmárcia, Fabrício, Túlio, Maria Helena e Cristiane, pela amizade, pelo apoio e pelo companheirismo.

Ao senhor José Geraldo, pelo auxílio técnico na fase experimental deste trabalho.

À querida amiga, Paula, companheira desde o início da chegada em Viçosa.

Aos amigos do Instituto Vital Brazil, Teresa, Antônia, Anibal, Luis Eduardo, Iara, Walter, Luciene, Lordeste, Maria Antônia, Eliene, Dalva, Paula, Joseane, Marquinhos, Tião, Marcinho, Adejair, Wallace e Raimundo, e a todos que contribuíram com o incentivo, apoio e carinho durante esses anos de convivência.

A toda a minha família e a todos os amigos que, de alguma forma, colaboraram para o sucesso deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

GABRIELLE LÜCK DE ARAÚJO, filha de Esther Hermes Luck e de Gerziel Moraes de Araújo, nasceu em 7 de março de 1978, na cidade de Londrina, Estado do Paraná.

Em 1996, concluiu o segundo grau no Colégio Salesiano, em Niterói, RJ.

Em março de 1997, ingressou na Universidade Federal Fluminense, diplomando-se em Farmacêutica Industrial em outubro de 2003.

Em fevereiro de 2004, ingressou no mestrado do programa de pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal Fluminense.

Em fevereiro de 2006, diplomou-se no Mestrado e em maio do mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, em nível de doutorado.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii

### CAPITULO 1

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E CICATRIZANTE DE FITODERIVADOS EM FERIDAS DE COELHOS .....	1
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Inflamação .....	2
2.1.1 Mediadores químicos da inflamação .....	3
2.1.2 Sistema de coagulação .....	6
2.1.3 Metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas) e fator de ativação plaquetária .....	6
2.1.4 Inflamação aguda.....	9
2.1.5 Extravasamento de leucócitos e fagocitose .....	10
2.1.6 Lesão tecidual por oxidação .....	14
2.1.7 Lesão tecidual por ação proteolítica .....	15
2.1.8 Padrão morfológico da inflamação aguda .....	15
2.1.9 Resultados da inflamação aguda.....	16
2.1.10 Inflamação crônica.....	17
2.1.11 Efeitos sistêmicos na inflamação .....	18
2.2 Cicatrização .....	18

	<b>Página</b>
2.2.1 Tipo de feridas .....	18
2.2.2 Mecanismo de regeneração tecidual .....	18
2.2.3 Fatores locais e sistêmicos que influenciam a reconstituição da ferida .....	22
2.2.4 Parâmetros sanguíneos envolvidos na inflamação.....	22
2.3 Plantas utilizadas nas formulações .....	26
2.3.1 Marcela ( <i>Achyrocline satureioides (LAM) D.c</i> ) .....	26
2.3.2 Assa-peixe ( <i>Vernonia polyanthes Less.</i> ).....	28
2.3.3 Tanchagem ( <i>Plantago major L.</i> ) .....	29
2.3.4 Cânfora ( <i>Cinnamomum camphora</i> ) .....	32
2.3.5 Bálsamo-do-peru ( <i>Myroxylon peruiferum</i> ).....	34
3. OBJETIVOS .....	36
3.1 Objetivos gerais .....	36
3.2 Objetivos específicos .....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
4.1 Obtenção das espécies vegetais .....	37
4.2 Preparação dos geis e cremes.....	37
4.3 Animais .....	39
4.4 Indução da ferida .....	39
4.5 Organização dos grupos experimentais .....	40
4.6 Dosagens de parâmetros sanguíneos.....	41
4.7 Análise histológica.....	42
4.8 Estatística .....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Análise dos parâmetros sanguíneos das feridas tratadas com formulações de fitoderivados compostas .....	43
5.2 Análise dos parâmetros hematológicos das feridas tratadas com as formulações de fitoderivados simples .....	53
5.3 Análise histopatológica da pele dos coelhos.....	57
6. CONCLUSÃO .....	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69

## CAPÍTULO 2

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E CICATRIZANTE DO FLAVONOIDE HESPERIDINA EM FERIDAS DE COELHOS.....	78
1. INTRODUÇÃO .....	78
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	80

	<b>Página</b>
2.1 Flavonoides .....	80
2.2 Efeito de flavonoides sobre o metabolismo do ácido araquidônico .....	82
2.3 Composto em estudo: hesperidina .....	88
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>91</b>
3.1 Objetivo geral .....	91
3.2 Objetivos específicos .....	91
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>92</b>
4.1 Preparação do extrato glicólico de hesperidina .....	92
4.2 Animais .....	92
4.3 Indução da ferida .....	93
4.4 Organização dos grupos experimentais .....	94
4.5 Dosagens de parâmetros sanguíneos.....	94
4.6 Análise histológica.....	94
4.7 Análise estatística dos resultados.....	95
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>96</b>
5.1 Efeito da hesperidina nos parâmetros hematológicos dos coelhos tratados	96
5.2 Análise histológica das feridas .....	101
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>108</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>109</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Capítulo 1	
1 Aparência do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Plantago major</i> .....	38
2 Coelho da raça Nova Zelândia.....	39
3 Área depilada de 5 cm <sup>2</sup> na região dorso-cervical.....	40
4 Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo normal (G1). (A) aumento 10X; e (B) aumento de 40X.....	60
5 Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo com ferida, não tratado (G2). (A) aumento de 10X; e (B) aumento de 40X.....	60
6(A) Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com o fitoderivado contendo quatro plantas 2,5% (G3). Aumento de 10X .....	61
6(B) Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com o fitoderivado contendo quatro plantas 3% (G4). Aumento de 10X .....	61
6(C) Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com o fitoderivado contendo quatro plantas 10% (G5). Aumento de 10X.....	61
7(A) Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com o fitoderivado contendo cinco plantas 10% (G6). Aumento de 10X.....	62
7(B) Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com o fitoderivado contendo cinco plantas 1% (G7). Aumento de 10X.....	62

8	Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo com ferida, tratado com Acheflan® (G8). Aumento de 10X.....	63
9	Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo com ferida, tratado com creme de marcela 3% (G3'). (A) aumento de 10X; e (B) aumento de 40X.....	64
10(A)	Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo de coelhos com ferida tratados com tanchagem 1% (G4'). (A) aumento 10X; e (B) aumento de de 40X .....	64
10(B)	Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com tanchagem 2% (G5'). Aumento de 10X .....	64
10(C)	Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com tanchagem 4% (G6'). Aumento de 10X .....	65
11(A)	Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com assa-peixe 1% (G7'). Aumento de 10X.....	65
11(B)	Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com assa-peixe 2% (G8'). Aumento de 10X .....	65
11(C)	Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com assa-peixe 3% (G9') .....	66
12	Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com bálsamo 1% (G10'). (A) aumento de 10X; e (B) aumento de 40X.....	67

## Capítulo 2

1	Estrutura química da hesperitina .....	89
2	Coelho da raça Nova Zelândia.....	93
3	Área depilada de 5 cm <sup>2</sup> na região dorso-cervical.....	93
4	Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo normal (G1). (A) aumento de 10X; e (B) aumento de 40X. Seta preta: epitélio estratificado pavimentoso queratinizado.....	102
5	Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo doente sem tratamento (G2). (A) aumento de 10X; e (B) aumento de 40X. Seta preta: queratina de forma desorganizada .....	103
6	Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo (G3), tratados pela formulação de hesperidina na dose 1. (A) aumento de 10X; e B = aumento de 40X. Setas pretas = queratina escassa e mais aderida à epiderme .....	104

7	Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo (G4), tratados pela formulação de hesperidina na dose 2. (A) aumento de 10X; e B = aumento de 40X. Setas pretas = grande quantidade de queratina de forma desorganizada.....	105
8	Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo (G5), tratados pela formulação de hesperidina na dose 3. (A) aumento de 10X; e (B) aumento de 40X. Seta preta = reconstituição da queratina de forma ordenada.....	106
9	Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo (G6), tratados pela formulação contendo Acheflan <sup>®</sup> .....	107

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
Capítulo 1	
1	Formulação de gel, segundo a Farmacopeia Brasileira IV edição (1988).... 38
2	Formulação de creme, segundo a Farmacopeia Brasileira IV edição (1988) 38
3	Grupos de coelhos utilizados no teste de avaliação da atividade cicatrizante tratados com geis de extratos hidroalcoólicos de fitoderivados contendo marcela, tanchagem, bálsamo-do-peru e assa-peixe (quatro fitoderivados) e geis de extratos hidroalcoólicos de fitoderivados contendo marcela, tanchagem, bálsamo-do-peru, assa-peixe e cânfora (cinco fitoderivados) ..... 41
4	Grupos de coelhos utilizados no teste de avaliação da atividade cicatrizante de cremes dos extratos hidroalcoólicos marcela 3%, tanchagem 1, 2 e 4%, assa-peixe 1, 2 e 3%, bálsamo 1% e Acheflan® ..... 41
5	Valores médios de proteínas totais e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel do fitoderivado contendo extrato de quatro plantas nas concentrações de 2,5, 3 e 10% e do fitoderivado contendo extrato de cinco plantas nas concentrações 1 e 10% em três doses por 30 dias, comparados com os do grupo sem ferida (G1)..... 43
6	Valores médios de proteínas totais e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com fitoderivado contendo extrato de 4 plantas nas concentrações de 2,5%, 3% e 10% e com fitoderivado contendo extrato de 5 plantas nas concentrações de 1% e 10% em três doses por 30 dias, em comparação com o grupo não tratado (G2)..... 46

7	Valores médios de ferro e cálcio em soro sanguíneo de coelhos tratados com o gel do fitoderivado contendo extrato de quatro plantas nas concentrações de 2,5, 3 e 10% e do fitoderivado contendo extrato de cinco plantas nas concentrações de 1 e 10% em três doses por 30 dias, em comparação com o grupo sem ferida (G1).....	48
8	Valores médios de ferro e cálcio em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel do fitoderivado contendo extrato de quatro plantas nas concentrações de 2,5, 3 e 10% e do fitoderivado contendo extrato de cinco plantas nas concentrações de 1 e 10% em três doses por 30 dias, em comparação com o grupo não tratado (G2).....	49
9	Valores médios de TGP, GGT e TGO em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel do fitoderivado contendo extrato de quatro plantas nas concentrações de 2,5, 3 e 10% e do fitoderivado contendo extrato de cinco plantas nas concentrações de 1 e 10% em três doses por 30 dias, em comparação com o grupo sem ferida (G1).....	50
10	Valores médios de TGP, GGT e TGO em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel do fitoderivado contendo extrato de quatro plantas nas concentrações de 2,5, 3 e 10% e do fitoderivado contendo extrato de cinco plantas nas concentrações de 1 e 10% em três doses por 30 dias, em comparação com o grupo não tratado (G2).....	52
11	Valores médios de proteínas totais e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com creme contendo fitoderivados simples em diferentes concentrações. Tratamento em três doses durante 30 dias, comparadas com o grupo sem ferida (G1).....	54
12	Valores médios de proteínas totais e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel do fitoderivado (2,5%, 3% e 10%) contendo extratos de marcela, tanchagem, assa-peixe e bálsamo e do fitoderivado (1% e 10%) contendo extratos de marcela, tanchagem, assa-peixe, bálsamo e cânfora, em três doses por 30 dias, comparadas com o grupo não tratado (G2).....	55
13	Valores médios de cálcio em soro sanguíneo de coelhos tratados com creme contendo fitoderivados simples em diferentes concentrações. Tratamento em três doses durante 30 dias, em comparação com o grupo sem ferida (G1).....	56
14	Valores médios de cálcio em soro sanguíneo de coelhos tratados com creme contendo fitoderivados simples em diferentes concentrações. Tratamento em três doses durante 30 dias, em comparação com o grupo não tratado (G2).....	56

15	Valores médios de TGP, GGT e TGO em soro sanguíneo de coelhos tratados com creme contendo fitoderivados simples em diferentes concentrações. Tratamento em três doses durante 30 dias, em comparação com o grupo sem ferida (G1) .....	58
16	Valores médios de TGP, GGT e TGO em soro sanguíneo de coelhos tratados com creme contendo fitoderivados simples em diferentes concentrações. Tratamento em três doses durante 30 dias, em comparação com o grupo não tratado (G2) .....	59

**Capítulo 2**

1	Grupos, tratamentos e doses aplicadas nas feridas dos coelhos.....	94
2	Valores médios de proteína e albumina em soro sanguíneos de coelhos tratados com gel contendo hesperidina em três doses por 21 dias, comparados com os do grupo sem ferida (G1) .....	96
3	Valores médios de proteína e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel contendo hesperidina em três doses por 21 dias, comparados com os do grupo não tratado (G2) .....	97
4	Valores médios de TGP e $\gamma$ GT em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel contendo hesperidina em três doses por 21 dias comparados com os do grupo sem ferida (G1) .....	98
5	Valores médios de TGP e $\gamma$ GT em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel contendo hesperidina em três doses por 21 dias, comparados com os do grupo não tratado (G2) .....	99
6	Valores médios de cálcio e ferro em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel contendo hesperidina em três doses por 21 dias, comparados com os do grupo sem ferida (G1) .....	101
7	Valores médios de cálcio e ferro em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel contendo hesperidina em três doses por 21 dias, comparados com os do grupo não tratado (G2) .....	101

## RESUMO

ARAÚJO, Gabrielle Luck de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2010.  
**Estudo de formulações de fitoderivados e flavonoide na inflamação e cicatrização de feridas em coelhos.** Orientadora: Tânia Toledo de Oliveira. Coorientador: Aloísio da Silva Pinto, Tanus Jorge Nagem e Aníbal Rafael Melgarejo Gimenez.

A inflamação é uma resposta protetora imediata que ocorre nos tecidos periféricos sempre que há lesão ou destruição celular. O processo inflamatório envolve uma série de fenômenos, que podem ser desencadeados não só por agentes infecciosos, como também por agentes físicos (radiação, queimadura e trauma), químicos (substâncias cáusticas), isquemia e interações antígeno-anticorpo. As úlceras dérmicas causam sérios transtornos para indivíduos com dificuldade de cicatrização e podem ser provocadas por doença, idade avançada, incapacidade motora ou utilização de fármacos. Plantas como marcela, assa-peixe, tanchagem, cânfora e bálsamo são utilizadas comumente na medicina popular como digestivos, antiespasmódicos, anti-inflamatórios, agentes hipoglicêmicos, redutores dos níveis de colesterol sanguíneo, entre outras. Tendo em vista esse uso popular, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dessas plantas quanto à sua ação anti-inflamatória tópica em feridas dérmicas provocadas em coelhos. Foram utilizados 30 coelhos, distribuídos em gaiolas individuais. Para indução das úlceras dérmicas, os animais foram anestesiados com a associação de tiletamina mais zolazepam (zoletil<sup>®</sup> 50) via intramuscular. Ao término dos experimentos, foram retiradas amostras de pele de todos os animais e realizada a histologia. Na análise hematológica, concluiu-se que o tratamento com o fitoderivado

contendo extrato das supracitadas cinco plantas a 10% (grupo G6) foi o que apresentou maior aumento nos níveis plasmáticos de proteína e albumina, elevação considerável na concentração de ferro e provocou a mais alta redução no nível de cálcio. A formulação com o fitoderivado contendo extrato de quatro plantas a 3% teve melhor efeito anti-inflamatório. Em todas as fotomicrografias, observou-se que as plantas isoladamente não tiveram o mesmo efeito anti-inflamatório que as formulações de fitoderivados contendo extrato de quatro ou cinco plantas. Além disso, a presença de grande quantidade de queratina demonstra que a formulação de fitoderivado contendo extrato de cinco plantas numa concentração de 10% conseguiu reconstituir a queratina mais rapidamente e de maneira mais ordenada que a concentração de 1%. Provavelmente, a cânfora, presente apenas na formulação com extrato de cinco plantas, pode estar ajudando no processo de remodelamento da ferida e, assim, uma melhor reconstituição, porém não é possível afirmar isso somente com as análises qualitativas deste trabalho. Seriam necessárias análises histológicas quantitativas e outros testes clínicos para afirmar essa possibilidade. Foi estudado o efeito do flavonoide hesperidina em feridas provocadas em coelhos e o tratamento com formulações de uso tópico em três concentrações distintas do flavonoide. O estudo evidenciou apenas, de forma qualitativa, que a hesperidina tem atividade anti-inflamatória no tratamento e na cicatrização de feridas cutâneas em animais.

## ABSTRACT

ARAÚJO, Gabrielle Luck de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2010.  
**Study of phytoderivatives formulations and flavonoid in the inflammation and scarring of rabbit injuries.** Adviser: Tânia Toledo de Oliveira. Co-Adviser: Aloísio da Silva Pinto, Tanus Jorge Nagem and Aníbal Rafael Melgarejo Gimenez.

Inflammation is an immediate protective response that occurs in the peripheral tissues every time there is a injury or cellular destruction. The inflammatory process involves a series of phenomena that can be triggered not only by infectious agents, but also by physical agents (radiation, burns and trauma), chemical agents (caustic substances, ischemia and antigen and antibody interactions). Skin ulcers cause serious problems to individuals with scarring problems caused by diseases, advanced age, motion problems or using medicines that interfere in the scarring process. Plants such as Marcela, Assa Peixe, Tanchagem, Camphor and Balsam are commonly used in popular Brazilian medicine as digestives, anti spasmodics, anti-inflammatories, hipoglycemic agents, cholesterol reducers etc. The objective of this work is to evaluate the topical anti-inflammatory effect of these plants on rabbits. Thirty rabbits where used, distributed in individual cages. In order to induce the skin ulcers the animals were anesthetized with an association of tyletamin and zolazepan (zoletil 50 R), 30 mg/kg applied intramuscularly. The experiment lasted 21 days, with later sacrifice of the animals using anesthetics. Blood samples were collected by heart punction, and centrifuged to obtain the doses of blood parameters. At the end of the experiment skin samples were taken from all animals and histology was performed. In the hematologic

analysis, it was concluded that 5 plants at 10% treatment (G6 group) presented a great increase in protein and albumin concentration, a considerable elevation in iron concentration and provoked the largest reduction in calcium. Possibly this concentration is toxic to the cells. The 4 plant formulation at 3% had the best anti-inflammatory effect. In treatments with 5 plants the best results were obtained with the extract at 10%. In all the micrographic pictures, it was observed that the plants, individually, did not present the same anti-inflammatory effect than the formulation containing 4 to 5 plants. This suggests that a synergism between the substances present in the plants had occurred, promoting a larger therapeutic effect. Besides, the presence of large amounts of keratin showed that the formulation containing 5 plants in a 10% concentration managed to reconstitute keratin faster and in a more orderly manner than the other concentrations. Probably the camphor present only in the 5 plants formulation could help in the remodeling process of the injury, resulting in a better reconstitution. But it is not possible to claim this evidence only with the qualitative analysis of this work. It would be necessary to do a cytological quantitative analysis and other clinical tests to confirm this evidence. The effects of the hesperidin flavonoid were also studied on rabbit injuries and the treatment using three distinct flavonoid topical formulations. It was possible to conclude that dose 3 was more effective in the reconstitution of the skin injury, demonstrating its effectiveness when compared to non-treated skins. This study evidenced, in a qualitative manner, the anti-inflammatory effect of hesperidins in the scarring of skin injuries on animals.

## **CAPÍTULO 1**

### **EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E CICATRIZANTE DE FITODERIVADOS EM FERIDAS DE COELHOS**

#### **1. INTRODUÇÃO**

A inflamação é uma resposta protetora imediata que ocorre nos tecidos periféricos sempre que há lesão ou destruição celular. O processo inflamatório envolve uma série de fenômenos, que podem ser desencadeados não só por agentes infecciosos, como também por agentes físicos (radiação, queimadura e trauma), químicos (substâncias cáusticas), isquemia e interações antígeno-anticorpo.

As úlceras dérmicas causam sérios transtornos para indivíduos com dificuldade de cicatrização a qual pode ser causada por doença, idade avançada, incapacidade motora ou utilização de fármacos dificultantes do processo de cicatrização.

Plantas como marcela, assa-peixe, tanchagem, cânfora e bálsamo são utilizadas comumente na medicina popular brasileira como digestivos, antiespasmódicos, anti-inflamatórios, agentes hipoglicêmicos, redutores dos níveis de colesterol sanguíneo, entre outras.

Diante desse uso popular, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório tópico dos extratos obtidos a partir dessas plantas, combinados ou não, em feridas dérmicas provocadas em coelhos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Inflamação**

O conceito da inflamação foi primeiro descrito em papiro egípcio, por volta de 2000 a.C., por Celsus, um escritor romano do início do século, que listou os quatro sinais principais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. Esses sinais são tipicamente mais proeminentes na inflamação aguda que na crônica (HUNTER, 1974).

A capacidade de desencadear uma resposta inflamatória é fundamental à sobrevivência, embora em algumas situações e doenças essa resposta possa ser exagerada e persistente, sem qualquer benefício aparente (BARRINGTON, 2001).

A resposta inflamatória apresenta uma série complexa de adaptações teciduais, que envolvem principalmente os vasos sanguíneos, os componentes líquido e celular do sangue e o tecido conjuntivo adjacente, tendo como objetivo a destruição ou encarceramento do agente agressor e das células que este lesou, seguida de uma série de eventos que visam cicatrizar ou reconstruir o tecido lesado e gerar imunidade sistêmica ao microrganismo agressor (WEISSMAN, 1992).

Durante o reparo, o tecido lesado é substituído pela regeneração de células parenquimatosas, por tecidos fibrosos ou pela combinação desses dois processos.

Embora havendo uma sucessão previsível desses fenômenos, as características, extensão e gravidade das alterações teciduais são modificadas por muitos fatores relacionados com o hospedeiro (estado nutricional, hormonal, fatores genéticos) e com a patogenicidade do agente agressor (WEISSMAN, 1992).

Os sinais cardinais da inflamação, como calor, rubor, dor e turgor, são decorrentes ao efeito local induzido por mediadores no fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos e liberação de agentes indutores da dor (WEISSMAN, 1992).

A resposta inflamatória consiste de dois importantes componentes: a reação vascular e a reação celular. Muitos tecidos e células estão envolvidos nessas reações, incluindo fluidos e proteínas plasmáticas, células circulantes, vasos sanguíneos e os constituintes celulares e extracelulares do tecido (BARRINGTON, 2001). As células circulantes são neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. A célula do tecido conectivo é o mastócito, que está intimamente circundado por vasos sanguíneos. A matriz extracelular consiste em proteínas estruturais de fibras (colágenos e elastina), glicoproteínas adesivas (fibronectina, laminina, colágeno não fibroso) e proteoglicanos. A membrana basal é um componente especializado da matriz extracelular, consistindo de glicoproteínas adesivas e proteoglicanas (WEISSMAN, 1992).

A inflamação é dividida em aguda e crônica. A inflamação aguda é rápida no início e tem uma duração relativamente curta, por alguns minutos, horas ou alguns dias. Suas principais características são a exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e a emigração de leucócitos (predominantemente neutrófilos) (WEISSMAN, 1992).

A inflamação crônica tem longa duração e está associada historicamente com a presença de linfócitos e macrófagos e a proliferação de vasos sanguíneos, fibroses e tecido necrosado. Muitos fatores modificam o curso e a aparência morfológica das inflamações crônica e aguda (BARRINGTON, 2001).

As reações vascular e celular de ambas as inflamações (aguda e crônica) são medidas por fatores químicos derivados de proteínas plasmáticas ou células e são produzidas em resposta e ativadas pelo estímulo inflamatório (BARRINGTON, 2001).

A inflamação é terminada quando o agente agressor é eliminado e os mediadores param de ser secretados.

### **2.1.1 Mediadores químicos da inflamação**

O sistema complemento é considerado o maior sistema efetor de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores. São mais de 30 proteínas plasmáticas que, após ativação, elaboram fragmentos de proteínas e complexos proteína-proteína que

interagem com o receptor celular específico ou diretamente com a membrana celular, desencadeando a reação de fase aguda, morte de microrganismos patogênicos e regulação da resposta imune. A atividade do complemento ocorre em forma de cascata, onde peptídeos são gerados por múltiplos passos enzimáticos (BARRINGTON, 2001).

A etapa crítica da elaboração da função biológica do complemento é a ativação do componente  $C_3$  (mais abundante). A clivagem de  $C_3$  pode ocorrer através de três mecanismos: o clássico, pela fixação de  $C_1$  ao anticorpo (IgM ou IgG) combinado com antígeno; o alternativo, pela presença de moléculas na superfície do micróbion (endotoxinas ou LPS), complexos de polissacarídeos, veneno de cobra e outras substâncias na ausência do anticorpo; e o da lecitina, em que a lecitina ligada à manose no plasma se liga a carboidratos no micróbion e ativa  $C_1$  diretamente (LISZEWSKI, 1996).

Qualquer mecanismo que esteja envolvido nas etapas de ativação do complemento depende da enzima ativa chamada  $C_3$  convertase, a qual transforma  $C_3$  em dois fragmentos distintos:  $C_{3a}$  e  $C_{3b}$ . As frações  $C_{3a}$  e  $C_{5a}$  aumentam a permeabilidade vascular, contraem o músculo liso e estimulam a degranulação dos mastócitos.  $C_{5a}$  é uma das principais fontes da atividade quimiotática gerada no soro tratado com complexos imunes ou endotoxinas. É um quimioatratador extremamente potente para leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos que se acumulam e são ativados no local da inflamação (ROBBINS; COTRAN, 2007).

Além do sistema complemento, existem algumas aminas vasoativas que agem como mediadores químicos na inflamação. Dentre elas, destacam-se a histamina e a serotonina (NATHAN, 1997).

A histamina deriva da descarboxilação da histidina pela enzima l-histidina descarboxilase. A maior parte da histamina é armazenada em mastócitos e basófilos, sendo encontrada também nas plaquetas. Exerce várias atividades biológicas, incluindo constrição do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, depressão da quimiotaxia dos leucócitos, bloqueio das funções dos linfócitos T e maior depressão da liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos. É liberada por degranulação de mastócitos a estímulos como: dano físico, trauma, reação imunológica envolvendo ligações de antibióticos com mastócitos, anafilotoxinas ( $C_{3a}$  e  $C_{5a}$ ), proteínas liberadoras de histamina dos leucócitos, neuropeptídeos e citocinas (IL-1 e IL-8) (REPKA-RAMIREZ; BARANIUK, 2002).

Embora existam vários antagonistas dos receptores  $h_1$  da histamina, eles são úteis apenas no tratamento dos fenômenos vasculares da fase transitória inicial da inflamação. Dentre eles, podem-se destacar os anti-histamínicos  $H_1$ , utilizados amplamente no tratamento das desordens alérgicas. São agentes mais eficazes em aliviar os sintomas de rinite e conjuntivite sazonal (p. ex., espirros, rinorréia e prurido dos olhos, nariz e garganta). Na asma brônquica, têm efeitos benéficos limitados e não são úteis como tratamento isolado. São adjuvantes úteis à epinefrina no tratamento de anafilaxia sistêmica ou angioedema grave. Certas dermatoses alérgicas, como urticária aguda, respondem favoravelmente aos antagonistas  $H_1$ , que ajudam a aliviar o prurido na dermatite atópica ou na dermatite de contato, mas não têm efeito no exantema. A urticária crônica responde menos, porém algum benefício pode ocorrer, especialmente quando combinados com antagonistas  $H_2$  (LEURS *et al.*, 2002).

Os efeitos colaterais são mais proeminentes com os anti-histamínicos  $H_1$  de primeira geração (difenidramina, clorfeniramina, doxepina e hidroxizina), que cruzam a barreira hematoencefálica e causam sedação. Alguns dos antagonistas do receptor  $H_1$  de primeira geração também têm propriedades anticolinérgicas, que podem ser responsáveis por sintomas como secura da boca e das passagens respiratórias, retenção de urina, frequência urinária e disúria. Os fármacos de segunda geração (cetirizina, loratadina, desloratadina e fexofenadina) são geralmente desprovidos desses efeitos colaterais porque não penetram no SNC e não têm propriedades antimuscarínicas (GELFAND *et al.*, 2004).

A serotonina é produzida pela descarboxilação de 5-hidroxitriptofano. Mais de 90% das reservas corporais de serotonina são encontradas no trato gastrointestinal e no sistema nervoso central; o restante está presente nos grânulos dentro das plaquetas. Age aumentando a permeabilidade vascular, a resposta quimiotática dos leucócitos e o crescimento *in vitro* de fibroblastos. Produz vasodilatação e, ainda, estimula a formação de colágeno (WAXLER; RABITO, 2003).

Outro sistema que gera peptídeos vasoativos é o sistema cinina. Através da ação de proteases específicas denominadas caliceínas, o sistema renina gera peptídeos vasoativos das proteínas do plasma, chamados de cininogênios. A ativação do sistema cinina resulta na liberação de bradicinina, um nonopeptídeo vasoativo. A bradicinina aumenta a permeabilidade vascular e causa contração do músculo liso, dilatação dos vasos sanguíneos e dor quando injetada na pele. Esses efeitos são similares aos da histamina. A cascata da cinina é realizada pela ativação do fator Hageman (fator XII da

via intrínseca da coagulação) sob contato com superfícies negativamente carregadas, como colágeno e membranas basais. Um fragmento do fator XII (ativador da pré-caliceína) é produzido e, no plasma, a pré-caliceína é convertida a uma forma proteolítica que ativa a enzima caliceína, a qual cliva a bradicinina, liberando então o peptídeo cininogênio (WAXLER; RABITO, 2003).

### **2.1.2 Sistema de coagulação**

O sistema de coagulação e inflamação são processos intimamente conectados. O sistema de coagulação é dividido em duas vias convergentes, resultando na ativação da trombina e formação da fibrina.

A via de coagulação envolve uma série de proteínas plasmáticas, que são ativadas pelo fator Hageman (fator XII), uma proteína sintetizada pelo fígado que circula na forma inativa até encontrar colágeno, membrana basal ou ativação plaquetária. O fator XII sofre mudança conformacional (tornando-se fator XIIa), expondo um centro ativo serina, que pode clivar substratos de proteínas e ativar uma variedade de sistemas mediadores (KAPLAN, 1997).

A trombina protease proporciona uma ligação entre o sistema de coagulação e o de inflamação. A ativação do sistema de coagulação resulta na ativação de trombina (fator IIA) do precursor protrombina (fator II). A trombina é a enzima que cliva fibrinogênio circulante solúvel para gerar um coágulo de fibrina insolúvel e constitui a principal protease de coagulação. Ela se liga aos chamados receptores de proteases ativadas (RPAS), pois se ligam a serina proteases tripsina-like, além da trombina. Estes receptores são grupos de proteínas G transmembranas expressas nas plaquetas, células do músculo liso e endotelial e outros tipos celulares (COUGHLIN, 2000).

Ao mesmo tempo, o fator XII induz a coagulação e também pode ativar o sistema fibrinolítico. Essa cascata contrabalança a coagulação de fibrina. O sistema fibrinolítico contribui para o fenômeno vascular de inflamação de diversas formas.

### **2.1.3 Metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas) e fator de ativação plaquetária**

Quando a célula é ativada por diversos estímulos, sua membrana lipídica é rapidamente remodelada para gerar mediadores de lipídeos biologicamente ativos, que

servem como um sinal intercélular ou extracélular da inflamação e homeostase. Esses mediadores lipídicos são autacoides ou hormônios, que são formados rapidamente, exercem seus efeitos locais e são destruídos enzimaticamente ou decaem espontaneamente.

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poli-insaturado contendo 20 carbonos (ácido 5,8,11,14 – eicosatetraenoico), que é derivado de fonte da dieta ou pela conversão do ácido graxo essencial, ácido linoleico. Normalmente ele é hidrolisado na membrana fosfolipídica pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub>, que aumenta a concentração de íons cálcio no citoplasma e ativa várias quinases em resposta a estímulos externos (MURAKAMI; KUDO, 2003). Os metabólitos do AA, também chamados eicosanoides, são sintetizados por duas principais classes de enzima: as cicloxigenases (prostaglandinas e tromboxanos) e as lipoxigenases (leucotrienos e lipoxinas).

Os eicosanoides se ligam a receptores da proteína G em diversos tipos de células e podem mediar toda a etapa de inflamação.

Eles podem ser encontrados em exsudatos inflamatórios e sua síntese é aumentada no local da inflamação. Agentes estruturalmente distintos que suprimem a atividade da cicloxigenase, como aspirina, anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e inibidores da COX-2, reduzem a inflamação *in vivo* (FLOWER, 2003).

A cicloxigenase existe na forma de duas isoenzimas: a cicloxigenase 1 (COX-1) e a cicloxigenase 2 (COX-2). Essas isoenzimas são necessárias para a produção de prostaglandinas (RYAN; GODSON, 2010). As prostaglandinas são divididas em seis estruturas distintas, as PGD, PGE, PGF, PGG, PGH e PGI e por numerosos subgrupos, que indicam o número de duplas ligações no composto (RYAN; GODSON, 2010). Os mais importantes são a PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) e TXA<sub>2</sub> (tromboxano). Algumas dessas enzimas têm distribuição restrita nos tecidos. Por exemplo, as plaquetas contém a enzima tromboxano sintetase, e, conseqüentemente, TXA<sub>α</sub> é o maior produto dessas células e poderoso agente agregador plaquetário e vasoconstritor, porém é instável e rapidamente convertido em sua forma inativa TXB<sub>2</sub> (RYAN; GODSON, 2010).

O endotélio vascular processa também prostaciclina sintase para a formação de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e seu produto final estável PGF<sub>1α</sub>. A prostaciclina é um vasodilatador, um potente inibidor de agregação plaquetária, e também potencializa o aumento da permeabilidade e efeitos quimiotáticos de outros mediadores (RYAN; GODSON, 2010).

As prostaglandinas também estão envolvidas na patogênese da dor e febre, na inflamação. A PGE<sub>2</sub> é hiperalérgica e torna a pele hipersensível a estímulos dolorosos. Isso promove aumento da concentração de histamina e bradicinina e, consequentemente, de citocinas, induzindo a febre durante infecções. PGD<sub>2</sub> é o principal metabólito da via cicloxigenase nos mastócitos, seguido de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2A</sub>, que causam vasodilatação e aumento da permeabilidade das veias pós-capilares, potencializando a formação do edema (RYAN; GODSON, 2010).

Existe um grande interesse na enzima COX-2, devido à sua indução por uma variedade de estímulos inflamatórios e está ausente na maioria dos tecidos. Já a COX-1 é produzida em resposta ao estímulo inflamatório, sendo expressa na maioria dos tecidos. Essa diferença pode explicar a função da COX-1 na produção de prostaglandinas, que estão envolvidas na inflamação e possuem também função homeostática (balanço eletrolítico e de fluidos, proteção no trato gastrointestinal), porém a COX-2 estimula a produção de prostaglandinas que estão envolvidas apenas nas reações inflamatórias (RYAN; GODSON, 2010).

A enzima predominante nos neutrófilos é a 5-lipoxigenase (5-LO). Seu produto principal, o 5-HETE, que é quimiotático para neutrófilos, é convertido em leucotrienos (CHU; PRATICÒ, 2009). O LTB<sub>4</sub> é o agente quimiotático potente e ativador da função do neutrófilo responsável pela agregação e aderência de leucócitos para o endotélio venoso. Os leucotrienos LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub> causam vasoconstrição e broncoespasmos. Eles regulam sua ação pela ligação a receptores cisteína leucotrieno 1 (CYSLT1) e CYSLT2, sendo importantes na patogênese da asma brônquica (CHU; PRATICÒ, 2009).

As lipoxinas são também produtos gerados do ácido araquidônico. Leucócitos (neutrófilos) produzem intermediários na síntese da lipoxina, e estes são convertidos em lipoxina na plaqueta, interagindo com leucócitos. As lipoxinas A<sub>4</sub> e B<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub> e LXB<sub>4</sub>) são geradas pela ação de 1-2-lipoxigenase de neutrófilos derivada de LTA<sub>4</sub> (CHU; PRATICÒ, 2009).

A principal ação das lipoxinas é inibir o recrutamento de leucócitos e componentes celulares da inflamação. Elas inibem a quimiotaxia dos neutrófilos e a adesão ao endotélio. Uma nova classe de mediadores derivados do AA, chamados de resorvinas, foi identificada em animais experimentais tratados com aspirina (SERHAN, 2002).

Esses mediadores inibem o recrutamento de leucócitos e ativam, em parte, a inibição da produção de citocinas. Assim, a ação anti-inflamatória da aspirina é atribuída à sua habilidade de inibir as cicloxigenases e também estimular a produção de resorvinas (CHU; PRATICÒ, 2009).

Em 1971, Henson demonstrou que um fator solúvel liberado de leucócitos causava agregação das plaquetas (HENSON, 1971). Aissa e colaboradores caracterizaram o fator como um lipídeo polar e o denominaram fator de ativação das plaquetas (AISSA *et al.*, 1996). O fator de ativação plaquetária (PAF) é um outro mediador bioativo derivado de fosfolipídio ligado ao glicerol e a ácido graxo de cadeia longa (AISSA *et al.*, 1996).

Tal como os eicosanoides, o PAF não é armazenado nas células, e sim sintetizado em resposta a estímulos. O PAF é sintetizado por plaquetas, neutrófilos, monócitos, mastócitos, eosinófilos, células mesangiais renais, células medulares renais e células do endotélio vascular. Entre as principais propriedades farmacológicas, o PAF é um potente dilatador da maioria dos leitos vasculares. O estímulo por PAF faz com que os leucócitos polimorfonucleares se agreguem, liberem leucotrienos e enzimas lisossômicas e gerem superóxido (CHU; PRATICÒ, 2009).

#### **2.1.4 Inflamação aguda**

A inflamação aguda é uma resposta rápida aos agentes agressores, enviando mediadores de defesa, como leucócitos e proteínas plasmáticas, para o local da injúria. A inflamação aguda possui três grandes características: alterações no calibre vascular, que levam ao aumento do fluxo sanguíneo; mudança na estrutura microvascular, que permite que as proteínas do plasma e os leucócitos deixem a circulação; e emigração dos leucócitos da microcirculação, seu acúmulo no foco da injúria e sua ativação para eliminar o agente agressor (HENSON, 1971).

Alguns estímulos são peculiares à inflamação aguda, como infecção (bacteriana, viral e parasitológica), toxinas microbianas, trauma, agentes químicos e físicos (queimadura, irradiação), necrose tecidual, corpo estranho, reação imunológica (hiper-sensibilidade), mudanças vasculares e outras (AISSA *et al.*, 1996).

As mudanças no fluxo vascular e no calibre começam logo após a injúria e podem chegar a diversos níveis, dependendo da severidade da injúria. As mudanças ocorrem na seguinte ordem (AISSA *et al.*, 1996):

A) Vasodilatação: a mais rápida manifestação da inflamação aguda. A vasodilatação envolve as arteríolas e resulta numa abertura de novos capilares na área. Também há um aumento no fluxo sanguíneo, que causa calor e vermelhidão. É induzida pela ação de diversos mediadores, como histamina e óxido nítrico, no músculo vascular liso.

B) Aumento da permeabilidade microvascular, com extravasamento de fluido proteico no tecido extravascular.

C) A perda de fluidos resulta na concentração de células vermelhas nos pequenos vasos e aumento de viscosidade sanguínea = estase.

D) A estase agrupa leucócitos (neutrófilos) acumulados em todo o endotélio vascular.

O principal marcador da inflamação aguda é o aumento da permeabilidade vascular, deixando escapar fluidos ricos em proteína (exsudato) para dentro do tecido extravascular.

O endotélio se torna mais poroso na inflamação devido à formação de fendas endoteliais nas veias, provocada pela histamina, bradicinina, leucotrienos, substância P, neuropeptídeo e diversos outros mediadores químicos. Ocorre rapidamente e tem poucos minutos de duração. A injúria diretamente no endotélio resulta em necrose da célula endotelial e destacamento desta (LENTSCH; WARD, 2000).

A injúria endotelial é mediada por leucócitos. Os leucócitos aderem ao endotélio, de forma relativamente rápida na inflamação aguda, e ativam enzimas proteolíticas e espécies de oxigênio tóxico, que causam injúria endotelial, abrindo fendas, resultando em aumento da permeabilidade. Na inflamação aguda, essa forma de injúria é restrita aos sítios vasculares (vênulas capilares glomerulares e pulmonares; AISSA *et al.*, 1996).

Durante o reparo, novos vasos são formados. Esse processo é chamado de angiogênese (AISSA *et al.*, 1996).

### **2.1.5 Extravasamento de leucócitos e fagocitose**

A principal função da inflamação é enviar leucócitos para o local atingido e ativá-los para desempenhar seu papel de defesa. Entretanto, a defesa potencial dos leucócitos também induz danos teciduais e prolonga a inflamação (CICCHETTI *et al.*, 2002).

Os leucócitos percorrem um caminho desde o lúmen do vaso até o tecido intersticial obedecendo a uma sequência de eventos, como a adesão ao endotélio; transmigração para dentro do endotélio (diapedese); e migração para o tecido intersticial através de estímulos quimiotáticos (CICCHETTI *et al.*, 2002).

A adesão e transmigração do leucócito dos vasos sanguíneos para dentro dos tecidos é regulada pela ligação de moléculas de adesão complementar encontradas na superfície do endotélio e mediadores químicos (quimioatratadores) e citocinas. Os receptores envolvidos nessa adesão são selectinas, imunoglobinas, integrinas e glicoproteínas mucina-like (MULLER, 2001).

Existem diversas selectinas, como e-selectina (CD62E), p-selectina (CD62P) e l selectina (CD62L) (REYNOLDS *et al.*, 2009).

As moléculas da família das imunoglobulinas incluem duas moléculas de adesão endotelial: ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) e VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1). Ambas atuam como ligantes para integrinas encontradas nos leucócitos. As integrinas são glicoproteínas transmembranas heterodiméricas feitas por ligações  $\alpha$  e  $\beta$ , que são expressas por muitos tipos de células e ligam-se a ligantes nas células endoteliais, outros leucócitos e matriz extracélular (REYNOLDS *et al.*, 2009).

O primeiro evento no recrutamento leucocitário é a indução de moléculas de adesão na célula endotelial. Mediadores como a histamina, trombina e PAF estimulam a redistribuição da p-selectina de seu estoque intracélular nos grânulos para a superfície celular. Macrófagos teciduais, mastócitos e células endoteliais respondem contra agentes danosos pela secreção das citocinas TNF, IL-1 e quimiocinas. TNF e IL-1 agem na célula endotelial da vênula capilar adjacente à infecção e induzem a expressão de diversas moléculas de adesão. Em uma a duas horas as células endoteliais começam a expressar e-selectina (REYNOLDS *et al.*, 2009).

TNF e IL-1 também induzem expressão endotelial de ligantes para integrinas, como VCAM-1 (ligante para integrina VLA-4) e ICAM-1 (ligante para integrina LFA-1 e MAC-1) (REYNOLDS *et al.*, 2009).

Na transmigração ou diapedese, as quimiocinas agem permitindo a aderência de leucócitos, estimulando-os à migrarem para os espaços interendoteliais, de acordo com o gradiente de concentração química, o local da injúria ou infecção (REYNOLDS *et al.*, 2009).

Certamente moléculas homofílicas de adesão presentes nas junções intercelulares do endotélio estão envolvidas na migração de leucócitos. Uma dessas

moléculas é uma imunoglobulina chamada pecam-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) ou ca31 (MULLER, 2001).

O tipo de emigração leucocitária varia de acordo com o tempo de resposta inflamatória e com o tipo de estímulo. Na maioria das formas de inflamação aguda, os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório durante as primeiras 6 a 24 horas. Os neutrófilos são mais numerosos no sangue, respondem mais rapidamente às quimiocinas e aderem mais firmemente às moléculas de adesão, que são rapidamente induzidas por células endoteliais, como p e e-selectinas. Além disso, após entrarem nos tecidos, os neutrófilos têm vida curta (24 a 48 h) (REYNOLDS *et al.*, 2009).

Após o extravasamento, os leucócitos emigram para os tecidos em direção à injúria, por um processo chamado quimiotaxia (locomoção orientada de acordo com o gradiente químico). Os granulócitos, monócitos e linfócitos respondem ao estímulo quimiotático com velocidades distintas. Substâncias exógenas e endógenas podem atuar como quimioatratores. O mais comum agente exógeno são os produtos bacterianos. Alguns destes são peptídeos contendo n-formil-metionina como aminoácido terminal, outros são lipídeos (REYNOLDS *et al.*, 2009).

Os quimioatratores endógenos são componentes do sistema complemento, particularmente C<sub>5a</sub>; produtos da via lipoxigenase, como leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e citocinas, particularmente da família quimiocina (IL-8) (CICCHETTI *et al.*, 2002).

Nem todas as respostas são conhecidas, porém diversos passos e segundo mensageiros são conhecidos no processo de reconhecimento pelos leucócitos desses agentes químicos (JONES, 2000; CICCHETTI *et al.*, 2002). O sinal é iniciado por receptores na superfície da membrana, como a GPCR (g-protein coupled receptors), resultando no recrutamento de proteína G e ativação de diversas moléculas efetoras, incluindo fosfolipase C (PLC) e fosfoinositol-3quinase (FI3K). Essas duas agem na membrana de fosfolipídeos inositol para gerar segundo mensageiro de lipídeos, que aumentam a concentração de cálcio no citosol e ativam pequenas GTPases, as quais induzem a polimerização de actina às margens da célula (JONES, 2000; CICCHETTI *et al.*, 2002).

Micróbios, produtos de células necróticas, complexo antígeno-anticorpo e citocinas induzem um número de respostas aos leucócitos que fazem parte da defesa destes (neutrófilos e macrófagos). As respostas funcionais induzidas pela ativação de leucócitos são: produção de metabólitos do ácido araquidônico dos fosfolipídeos, como uma resposta à ativação da fosfolipase A<sub>2</sub>, pelo aumento intracélular de cálcio e outros

sinais; degranulação e secreção de enzimas lisossomais e ativação de explosão oxidativa; secreção de citocinas, as quais amplificam e regulam reações inflamatórias – a ativação de macrófagos é o “carro-chefe” das citocinas, que estão envolvidas na inflamação; e modulação de moléculas de adesão de leucócitos por diferentes citocinas e integrinas (JONES, 2000; CICCHETTI *et al.*, 2002).

Alguns receptores de leucócitos estão envolvidos nesses processos, como (JONES, 2000; CICCHETTI *et al.*, 2002):

a) TLRs (toll-like receptors), essenciais para resposta celular contra endotoxinas bacterianas (LPS, lipopolissacarídeos) e outras proteoglicanas bacterianas.

b) Receptores de fagócitos, que promovem opsonização de micróbios: antibióticos, proteínas complementares (C<sub>3</sub>) e lecitinas.

Após todo esse processo, ocorre a fagocitose. A fagocitose e a liberação de enzimas por neutrófilos e macrófagos são responsáveis pela eliminação de agentes danosos e constituem os dois maiores benefícios derivados da acumulação de leucócitos no foco inflamatório.

A fagocitose envolve três etapas distintas (JONES, 2000; CICCHETTI *et al.*, 2002):

a) Reconhecimento e aderência da partícula que será “ingerida” pelo leucócito: é iniciado pelo reconhecimento de partículas por receptores expressos na superfície do leucócito. Receptores de manose e receptores “scavenger” são dois importantes receptores no processo de ingestão de micróbios. As integrinas de macrófagos, como a MAC-1 (CD<sub>11B</sub>/ CD<sub>18</sub>), também se ligam a micróbios para fagocitá-los.

b) Digestão formando um vacúolo fagocitário. Após a ligação com os receptores dos leucócitos, inicia-se o processo de fagocitose das partículas. Durante a ingestão, uma extensão do citoplasma emite pseudópodos para envolver a partícula a ser ingerida. A membrana deste vacúolo fagocitário se funde com a membrana de um grânulo lisossomal, formando então um fagolisossomo.

c) Degradação ou eliminação do material ingerido. Etapa de eliminação do agente infeccioso ou célula necrótica através de enzimas lisossomais por mecanismos oxigênio-dependente.

Esse último processo também pode ocorrer por mecanismos oxigênio-independente, pela ação de substâncias nos grânulos dos leucócitos, como BPI (bactericidal permeability increasing protein), uma proteína catiônica grânulo-associado, que causa ativação de fosfolipase, degradação de fosfolipídeos e aumenta a

permeabilidade na membrana do microrganismo; lisozimas que hidrolisam a ligação do ácido murâmico n-acetil- glicosamina encontrados em todas as bactérias; lactoferrinas, uma proteína com ligação ferro presente em específicos grânulos e grânulos de neutrófilos que contém muitas enzimas, como a elastase, que também contribui para eliminar os microrganismos (JONES, 2000; CICCHETTI *et al.*, 2002).

Outro mecanismo de eliminação microbiana foi identificado mais recentemente, envolvendo a produção de óxido nítrico (NO). O NO é um mediador com diferentes funções celulares, tendo importante papel na inflamação. É sintetizado pelas células endoteliais, leucócitos e sinoviócitos via oxidação da arginina por grupos sintetases, que são ativadas por citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$ ) e lipopolissacarídeos (NATHAN, 1997).

Quando a produção de NO nos neutrófilos é induzida por endotoxinas, aumenta a produção de TNF- $\alpha$  pelos próprios neutrófilos, havendo assim uma autoestimulação. O óxido nítrico pode ser liberado em resposta a quimioatraentes, como peptídeos formilados e PAF, e aumenta a quimiotaxia para os neutrófilos. Reage com o ferro e grupos tióis, levando provavelmente à lise intracélular do patógeno (NATHAN, 1997).

Em situação normal, os produtos da inflamação produzem pequena ou nenhuma destruição no tecido dos hospedeiros, porque os agentes agressores são rapidamente removidos e a produção de mediadores da inflamação é atenuada. Se a resposta inflamatória for direcionada contra o próprio organismo, não efetiva na remoção do agente agressor ou não efetivamente regulada, os tecidos são destruídos pela ativação crônica dos leucócitos. É importante notar que os mediadores derivados dos leucócitos que participam da defesa do hospedeiro são os mesmos envolvidos na destruição dos tecidos nas doenças inflamatórias (NATHAN, 1997).

### **2.1.6 Lesão tecidual por oxidação**

Os mediadores oxidantes primários de citotoxicidade são H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HOCl, capazes de oxidar uma variedade importante de substâncias biológicas. Várias enzimas e importantes compostos biológicos requerem, para sua atividade, grupos sulfídricos livres. A oxidação destes grupos pode contribuir com a citotoxicidade. Os oxidantes derivados dos fagócitos também causam descarboxilação, desaminação e clivagem de proteínas. A peroxidação lipídica está envolvida na lesão da membrana (BABIOR, 2003).

Os radicais de oxigênio podem ser gerados pela célula endotelial submetida a isquemia ou hipoxemia e subsequente processo de reperfusão e oxigenação. Esses radicais podem causar lesão vascular e aumentar a expressão da selectina P e nas células endoteliais, resultando na aderência dos neutrófilos. Essa é uma potente causa de dano vascular (BABIOR, 2003).

### **2.1.7 Lesão tecidual por ação proteolítica**

A matriz extracélular é composta por uma complexa mistura de colágeno, elastina, proteoglicanos e glicoproteínas, localizada abaixo do epitélio envolvendo as células do tecido conjuntivo. Essas proteínas são essenciais para manter a integridade tecidual. A dissolução dessa matriz é um importante mecanismo de dano tecidual e doenças inflamatórias (SEVERINI, 2002).

Quando os neutrófilos estão ativados e as endotoxinas na superfície celular não podem ser ingeridas, liberam o conteúdo dos lisossomas e radicais tóxicos no meio extracélular. As proteases derivadas dos neutrófilos, como a elastina e captetina G, podem causar severo dano tecidual, tendo sua ação potencializada por HOC1, e ser neutralizadas por uma rápida e irreversível formação de complexos com antiproteases plasmáticas. Outras proteases, como as colagenases e gelatinases, são liberadas dos neutrófilos na forma inativa, ativadas após oxidação por HOC1 e, assim, potencializam a atividade da elastase (SEVERINI, 2002).

### **2.1.8 Padrão morfológico da inflamação aguda**

Existem algumas características peculiares na inflamação aguda que resultam em padrões morfológicos distintos, como inflamação serosa, inflamação fibrinosa, inflamação purulenta e úlceras (FERREIRA *et al.*, 2006).

A inflamação serosa é derivada de fluidos do plasma ou secreção de células mesenteliais oriundas do peritônio, pleura e cavidades pericardias (FERREIRA *et al.*, 2006).

A inflamação fibrinosa é resultado do aumento da permeabilidade vascular, em que moléculas grandes, como fibrinogênio, passam a barreira vascular e a fibrina formada é depositada no espaço extracélular. O exsudato fibrinoso aparece quando o vazamento vascular é grande ou há estímulo procoagulante no interstício (células

cancerosas). Um exsudato fibrinoso é característico de inflamação na superfície das cavidades do corpo, como meninges, pericárdio e pleura. Histologicamente, as fibrinas aparecem como uma rede eicosanofílica e, às vezes, como um coágulo amorfo. Exsudatos fibrinosos podem ser removidos por fibrinólise e, ou, ingeridos por macrófagos (FERREIRA *et al.*, 2006).

Na inflamação purulenta há grande produção de pus ou exsudato purulento, constituído de neutrófilos, células necróticas, fluido, edema e bactérias piogênicas. Um exemplo comum de uma inflamação aguda purulenta é a apendicite aguda. O abscesso é formado em tecidos que sofreram inflamação purulenta (FERREIRA *et al.*, 2006).

As úlceras são caracterizadas por um local defeituoso ou extravasamento da superfície de um órgão ou tecido. São produzidas por exposição de um tecido necrótico inflamatório. É comumente encontrada em necrose inflamatória da mucosa da boca, estômago, intestino ou trato gastrointestinal e inflamação cutânea (FERREIRA *et al.*, 2006).

### **2.1.9 Resultados da inflamação aguda**

Após a inflamação aguda, pode ocorrer a neutralização ou decaimento espontâneo de mediadores químicos, com a volta da permeabilidade vascular normal, término da infiltração de leucócitos, morte dos neutrófilos e, finalmente, remoção dos fluidos de edema, leucócitos, agentes danosos e substâncias necróticas do local afetado (FERREIRA *et al.*, 2006).

Outra característica que pode ocorrer após a destruição substancial do tecido é a fibrose, quando o dano inflamatório envolve tecido que está incapaz de regenerar, ou quando há abundante exsudato de fibrina. Quando o exsudato fibroso no tecido ou cavidade serosa não pode ser dissolvido (pleura, peritônio) adequadamente, o tecido conectivo cresce na área do exsudato, convertendo este em uma massa de tecido fibroso – processo conhecido como organização. Em muitas infecções piogênicas há intensa infiltração de neutrófilos, tecido liquefeito e formação de pus. O tecido destruído é recomposto e reposto por fibrose (FERREIRA *et al.*, 2006).

Quando a resposta da inflamação aguda não é suficiente, devido à persistência do agente danoso, pode ocorrer progressão da resposta tecidual à inflamação crônica (FERREIRA *et al.*, 2006).

### **2.1.10 Inflamação crônica**

A inflamação crônica tem duração prolongada, na qual sua ativação promove simultaneamente destruição tecidual e tentativa de reparação. Esse tipo de inflamação é a causa da injúria tecidual de algumas doenças, como artrite reumatoide, aterosclerose, tuberculose e doenças crônicas do pulmão (FERREIRA *et al.*, 2006).

Uma das causas da infecção crônica pode ser a infecção persistente de alguns microrganismos, como *Tubercles bacillus*, *Treponema pallidum*, vírus, fungos e parasitas. A resposta inflamatória leva a um padrão específico, chamado de reação granulomatosa (MAJNO, 1998).

A prolongada exposição a agentes tóxicos exógenos, como, por exemplo, partículas de sílica (quando inaladas por um período longo de tempo), resulta em uma inflamação nos pulmões chamada de silicose (FERREIRA *et al.*, 2006).

A autoimunidade também pode ser um fator que leva à infecção crônica. Sob certas condições, as reações imunológicas se desenvolvem contra seu próprio tecido, produzindo uma doença autoimune. Nesta doença, autoantígenos invocam uma reação imunológica própria, que resulta em inflamação e danos teciduais crônicos, como artrite reumatoide e lúpus eritematoso (MAJNO, 1998).

Morfologicamente, em comparação à inflamação aguda, que é manifestada por mudanças vasculares, edema e infiltração de neutrófilos, a inflamação crônica caracteriza-se pela infiltração por células mononucleares, o que inclui macrófagos, linfócitos e células plasmáticas, destruição tecidual induzida por agentes agressores ou células inflamatórias e a reposição do tecido afetado pelo tecido conjuntivo, acompanhada da proliferação de vasos sanguíneos pequenos (angiogênese) e fibrose (LUSCINSKAS; GILBRONE, 1996).

### **2.1.11 Efeitos sistêmicos na inflamação**

Alguns efeitos sistêmicos são característicos de um processo inflamatório. Entre eles, pode-se observar a presença de febre, dor, aumento da pressão sanguínea, sonolência, mal estar e outros.

A febre é caracterizada pela elevação da temperatura corporal, principalmente quando a inflamação está associada à infecção. É produzida em resposta a substâncias chamadas pirogênicos, que agem estimulando a síntese de prostaglandinas nas células

vasculares e perivasculares do hipotálamo. Substâncias bacterianas, como lipopolissacarídeos (LPS), estimulam leucócitos a liberar citocinas, como IL-1 e TNF, que aumentam as enzimas cicloxigenase, as quais convertem ácido araquidônico em prostaglandinas; no cérebro, estas estimulam a produção de neurotransmissores, os quais levam ao aumento da temperatura (DINARELLO, 1999).

A dor que acompanha a inflamação e a lesão tecidual provavelmente resulta da estimulação local das fibras de dor e do aumento da sensibilidade (hiperalgesia), em parte devido à excitabilidade aumentada dos neurônios centrais da medula espinhal. Eles são particularmente eficazes nas situações em que a inflamação tiver produzido a sensibilização dos receptores da dor aos estímulos mecânicos ou químicos normalmente indolores. A bradicinina e as citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8, também parecem ser particularmente importantes para a produção da dor na inflamação (DINARELLO, 1999).

As proteínas plasmáticas também estão envolvidas no processo inflamatório e são, em sua maioria, sintetizadas no fígado. As três principais proteínas são a proteína C reativa (PCR), fibrinogênio e proteína A do soro (SAA). Elas podem se ligar à parede celular do microrganismo e agir opsonizando e fixando complemento (RIDKER, 2003).

## **2.2 Cicatrização**

### **2.2.1 Tipo de feridas**

Segundo Mandelbaum *et al.* (2003), a perda tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, sendo denominada ferida de espessura parcial; a reparação faz-se pela reepitelização dos anexos epiteliais ou epitélio derivado da pele adjacente não acometida, ou ferida de espessura total, atingindo todo o órgão, chegando ao tecido celular subcutâneo, onde a epitelização acontece apenas nas margens da ferida (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

### **2.2.2 Mecanismo de regeneração tecidual**

Alguns animais, como os anfíbios, podem regenerar suas caudas, membros, retinas, mandíbulas e até partes do coração. Essa capacidade é atribuída a dois fatores: a capacidade de células quiescentes retornarem ao ciclo celular, como miotubos

cardíacos, e a eficiência de células-tronco em se diferenciarem na área da injúria. Essa capacidade de regeneração de todo o tecido e órgãos foi perdida nos mamíferos (TANAKA, 2003).

Os mamíferos reconstituem a capacidade funcional de um órgão sem necessariamente reconstruir sua anatomia original. Essa regeneração inadequada é atribuída a uma rápida resposta de fibroproliferação e formação de cicatriz após um corte.

A epiderme é um epitélio multiestratificado, formado por camadas de células achatadas (epitélio pavimentoso) justapostas. A camada de células mais interna, denominada epitélio germinativo ou basal, é constituída por células que se multiplicam continuamente em direção à superfície. As outras camadas são constituídas de células cada vez mais diferenciadas, que, com o crescimento basal, vão ficando cada vez mais periféricas, até sua descamação. À medida que envelhecem, as células epidérmicas tornam-se achatadas e produzem uma proteína resistente e impermeável – a queratina. As células mais superficiais, com depósitos de queratina, morrem e passam a constituir uma camada resistente ao atrito e altamente impermeável à água, denominada camada queratinizada ou córnea. Na epiderme não existem vasos sanguíneos (VILELA *et al.* 2008).

A derme, localizada imediatamente sob a epiderme, é um tecido conjuntivo que contém fibras proteicas, vasos sanguíneos, terminações nervosas, órgãos sensoriais e glândulas. As principais células da derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de fibras e de uma substância gelatinosa, amorfa, na qual os elementos dérmicos estão mergulhados. Na derme encontram-se, ainda, o músculo eretor do pelo, fibras elásticas, fibras colágenas, vasos sanguíneos e nervos. O tecido subcutâneo ou hipoderme, camada de tecido conjuntivo frouxo localizado sob a derme, é rico em fibras e em adipócitos (VILELA *et al.*, 2008).

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares, que interagem para que ocorra a repavimentação e reconstrução do tecido (MANDELBAUM *et al.*, 2003). Esse evento é um processo dinâmico, que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos, os quais se comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

O processo de cicatrização envolve mecanismos enzimáticos responsáveis pela recuperação de elementos estruturais, como os constituintes do citoesqueleto,

membranas e paredes celulares, e de moléculas de alta complexidade, como proteínas, RNAs, DNA e o processo de reparo de tecidos, que pode se fazer pela regeneração, com a recomposição da atividade funcional do tecido ou pela cicatrização, com restabelecimento da hemostasia do tecido, com perda da sua atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica (BALBINO *et al.*, 2005).

Danos tissulares de qualquer natureza (física, química ou biológica) desencadeiam a ativação de células nervosas, estomacais, vasculares e circulatórias por estímulos físicos ou por sinalização química, feita por estruturas das células rompidas, fragmentos dos elementos inertes dos tecidos (colágenos, elastinas, fibronectinas e outros), proteínas séricas que extravasam dos vasos rompidos e por ação de mediadores inflamatórios pré-formados (liberados principalmente pelos grânulos das plaquetas, mastócitos e terminações nervosas periféricas) ou neossintetizados como eicosanoides e fator de agregação plaquetária (PAF) (BALBINO *et al.*, 2005).

Peerschke e colaboradores, em 2008, descrevem que ocorre a ativação da cascata de coagulação, que faz com que o colágeno exposto faça aderência na superfície interna e externa dos vasos sanguíneos (PEERSCHKE *et al.*, 2008). São liberadas substâncias vasoativas, quimioestáticas e fatores plaquetários. Ocorre a formação de trombo, que, juntamente com os eritrócitos, formam o coágulo que contém o sangramento. Os principais fatores de crescimento plaquetário presentes são PF4, que estimula a migração das células inflamatórias, e prostaglandinas, que atraem os monócitos, neutrófilos e fibroblastos. Esses eventos são chamados de fase hemorrágica, ocorrendo nas primeiras horas após a lesão (PEERSCHKE *et al.*, 2008).

De acordo com Peerschke *et al.* (2008), o processo de reparo que se segue pode ser dividido da seguinte forma:

a) Fase inflamatória: fase de ocorrência dos sinais clínicos da inflamação aguda de dor, calor, rubor e edema. Os macrófagos e granulócitos, chegando ao local afetado, liberam enzimas proteolíticas (as colagenases, elastases e hidrolases ácidas), que, juntamente com a grande concentração de leucócitos polimorfonucleares, lisam os coágulos e promovem a decomposição do tecido necrosado e a limpeza local da lesão. As proteases atuam no remodelamento da matriz extracélular. A histamina, liberada inicialmente, as prostaglandinas, liberadas mais tarde, aumentam a sensação dolorosa e provêm vasodilatação, com extravasamento de plasma. Substâncias vasoativas e fatores de crescimento liberados atuarão nas fases subsequentes, desde o desbridamento da

ferida, angiogênese, proliferação e diferenciação de células epiteliais e a migração celular. Essa fase tem duração de 48 a 72 horas.

b) Fase proliferativa ou de epitelização: ocorre nos primeiros 12 a 14 dias após a lesão. O desenvolvimento do tecido de granulação e a reconstituição da matriz extracélular ocorrem devido à predominância de fibroblastos, com deposição de colágeno, fibronectinas e outros componentes proteicos, formando intensa rede vascular e migração dos queratinócitos, visando à promoção da contração tecidual e da epitelização.

c) Fase de maturação ou fibroplasia ou remodelamento: tem início aproximadamente após 14 dias e pode durar por dois ou mais anos. Ocorre diminuição progressiva da vascularização e dos fibroblastos, aumento da força tênsil e reorganização das fibras de colágeno pela colagenase. Pode haver defeitos cicatriciais, como queloides, cicatrizes hipertróficas ou muito finas, friáveis e hipercrômicas.

O colágeno é a proteína mais comum no mundo animal. Ele é composto por três  $\alpha$ -polipeptídeos tripla hélice. Existem cerca de 30 tipos diferentes de colágeno, codificados por 41 genes dispersados em 14 cromossomos (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2001).

O colágeno fibrilar é sintetizado como protocólagenos, uma molécula precursora derivada de pré-procolágeno. O pró-colágeno é secretado da célula e cliva protease para formar a unidade básica da fibra. A fibra de colágeno é associada com a oxidação de lisina específica e resíduos hidroxilisina pela enzima extracélular lisiloxidase, estabilizando a força tênsil do colágeno (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2001).

A vitamina C é importante para a hidroxilação de pró-colágeno. Defeitos genéticos na produção de colágeno causam muitas síndromes (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2001).

Tecidos como vasos sanguíneos, pele, útero e pulmão necessitam de elasticidade para suas funções. A habilidade desses órgãos é proveniente de fibras elásticas (MILEWICZ *et al.*, 2000). Essas fibras podem se esticar diversas vezes e retornar ao tamanho original após aplicação da tensão. Morfologicamente, as fibras elásticas consistem em elastinas rodeadas por microfibrilas constituídas por fibrilinas (MILEWICZ *et al.*, 2000).

### **2.2.3 Fatores locais e sistêmicos que influenciam a reconstituição da ferida**

Dentre os fatores sistêmicos que podem influenciar na reconstituição de uma ferida, pode-se citar a nutrição, na qual uma deficiência proteica, ou vitamínica, inibe a síntese de colágeno e retarda o reparo (PEERSCHKE *et al.*, 2008).

Doenças como diabetes melito, varizes e arteriosclerose também retardam a drenagem venosa (PEERSCHKE *et al.*, 2008).

Hormônios como os glicocorticoides são anti-inflamatórios que alteram vários componentes da inflamação, podendo agir na inibição da síntese de colágeno (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2001).

Os fatores locais também podem influenciar na reconstituição das feridas, como tamanho, infecções persistentes, movimentos bruscos, podendo abrir a ferida, ou corpos estranhos (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2001).

A formação excessiva de componentes do processo de reparação pode também complicar esse processo. A acumulação de colágeno em excesso pode aumentar a cicatrização, formando a chamada cicatriz hipertrófica. Se o tecido cicatrizado crescer em cima da ferida original e, então, regredir, tem-se a queiloide. A queiloide aparece em indivíduos predispostos e naqueles de pele mais escura. O mecanismo de formação de queiloide ainda é desconhecido (TOMASEK *et al.*, 2002).

Quando ocorre a persistência do estímulo inicial para fibrose ou desenvolvimento de reações imunológicas ou autoimunes, chamamos de fibrose. Nesta doença, as interações linfócito-monócito promovem a síntese e a secreção de fatores de crescimento e citocinas fibrinogênicas, enzimas proteolíticas e outras moléculas biologicamente ativas (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO, 2001).

### **2.2.4 Parâmetros sanguíneos envolvidos na inflamação**

Diversos parâmetros sanguíneos estão envolvidos nos processos inflamatórios, podendo-se destacar cálcio, proteínas, principalmente albumina, ferro, aminotransferases (TGO e TGP) e gamaglutamiltranspeptidase ( $\gamma$ GT).

O cálcio existente no plasma humano normal apresenta-se sob três formas distintas: a) cálcio ligado a proteínas plasmáticas, principalmente na forma de  $\text{Ca}^{2+}$  ligado especialmente à albumina; b) cálcio livre (ionizado), forma biologicamente ativa (45 a 50% do total), que é mantida em níveis constantes por um complexo sistema de

controle envolvendo o paratormônio (PTH) e a 1,25 (OH)<sub>2</sub> D (GAW *et al.*, 2001). No sistema neuromuscular, o cálcio ionizado facilita a condução nervosa, a contração e o relaxamento muscular. A redução da concentração de cálcio ionizado causa aumento da excitabilidade neuromuscular e tetania. O aumento da concentração reduz a excitabilidade neuromuscular; c) cálcio complexado: é constituído por uma variedade de ânions, como citrato, fosfato, lactato, bicarbonato e outros íons (GAW *et al.*, 2001).

Vários compostos estão envolvidos na regulação do cálcio plasmático. Os dois principais controladores da homeostase do cálcio são o paratormônio (PTH) e a vitamina D (GAW *et al.*, 2001).

As variações nos teores de calcemia são detectadas pelo receptor cálcio-sensível (CaSR) um receptor 7 – transmembrana ligado à proteína G. A união do cálcio ao CaSR induz a ativação da fosfolipase C e a inibição da secreção de PTH. Por outro lado, reduções no cálcio estimulam as células principais da glândula paratireoide a secretarem PTH (GAW *et al.*, 2001).

Outro hormônio que regula a concentração de cálcio ionizado no sangue é a calcitonina (CT). A secreção aumenta em resposta a elevações do cálcio ionizado e diminui com reduções nos teores sanguíneos deste íon (GAW *et al.*, 2001).

A hipocalcemia geralmente vem acompanhada da hipoalbuminemia, já que uma fração de cálcio plasmático se encontra ligada à albumina. Na acidose, a protonização de albumina reduz sua capacidade de ligação ao cálcio, elevando o teor de cálcio ionizado (Ca<sup>2+</sup>) sem alteração do cálcio total. Assim, a hiperventilação com alcalose respiratória pode reduzir o Ca<sup>2+</sup> plasmático, com o desenvolvimento de tetania (GAW *et al.*, 2001).

Outro parâmetro sanguíneo envolvido na inflamação são as proteínas totais. As funções das proteínas plasmáticas incluem transporte, manutenção de pressão oncótica, tamponamento de alterações de pH, imunidade humoral, atividade enzimática, coagulação e resposta de fase aguda (GAW *et al.*, 2001).

A maioria das proteínas plasmáticas é sintetizada no fígado, enquanto algumas são produzidas em outros locais, como as imunoglobulinas, pelos linfócitos, as apolipoproteínas, pelos enterócitos, e a β<sub>2</sub>-microglobulina, em vários locais do corpo (GAW *et al.*, 2001).

Normalmente, a concentração de proteínas totais no plasma de humano está em torno de 7 g/dl, e aproximadamente 250 g de proteínas são encontrados no compartimento vascular.

A hipoproteïnemia está relacionada com diversos fatores patológicos, como o aumento do volume plasmático (pela cirrose, hemodiluição por intoxicação hídrica); perda renal; perda de proteínas pela pele (queimaduras); gota; distúrbios da síntese proteica; edema; dermatite esfoliativa; doença de Crohn; úlcera péptica; entre outros (GAW *et al.*, 2001).

A albumina representa cerca de 60% das proteínas presentes no plasma humano. É sintetizada, fundamentalmente, pelas células do parênquima hepático, pela ingestão proteica (MOTTA, 2009).

A síntese é aumentada quando ocorre perda, como na síndrome nefrótica, e reduzida por citocinas inflamatórias (MOTTA, 2009).

A albumina exerce importantes funções, como a regulação osmótica, o transporte e o armazenamento de ácidos graxos, fosfolípídeos, íons metálicos, aminoácidos, hormônios e fármacos (MOTTA, 2009).

A hipoalbuminemia pode ser promovida, entre outros fatores, pela perda proteica extravascular. Em condições normais, menos de 10% da albumina total é perdida no intestino. Quando associada a infecções intestinais, a hipoalbuminemia aumenta devido a fatores periféricos, que inibem a síntese da albumina por mecanismos similares aos encontrados nas queimaduras, nos traumatismos e nas infecções (MOTTA, 2009).

A pele é o principal local de armazenamento de albumina extravascular. Constitui um *pool* para manter os teores de albumina plasmática. As queimaduras resultam na perda direta de albumina, comprometendo o fluxo sanguíneo hepático por redução do volume e por fatores inibidores liberados nos locais das lesões, como fator de necrose tumoral, interleucina-1 e interleucina-6 (MOTTA, 2009).

Em avaliações laboratoriais, as elevações de proteína C reativa sugerem processos inflamatórios que contribuem para a hipoalbuminemia (MOTTA, 2009).

Qualquer anormalidade nas proteínas totais indicará a ocorrência de algum fator responsável, seja ele patológico, fisiológico ou de qualquer outra origem. O estudo do equilíbrio hídrico de um animal pode ser avaliado utilizando a estimativa do total de proteínas totais. Essa prova, juntamente com a determinação do volume globular e, ou, hemoglobina, tem valor na determinação da ausência ou presença de desidratação. Pode ser utilizada na avaliação do estado nutricional. Pode-se observar alteração nos valores de proteínas totais, em associação com hepatopatias e nefropatias, que auxiliam tanto no diagnóstico como no prognóstico. A diminuição nos valores séricos das proteínas

plasmáticas, ou seja, hipoproteinemia, é advinda de ingestão inadequada de nutrientes e perda excessiva de proteínas, resultantes de queimaduras, feridas, proteinúria ou aumento na degradação proteica por gliconeogênese; há alguma evidência do decréscimo de proteínas com a gravidez e lactação (COLES; NAIDOO, 1987).

O ferro é um elemento metálico presente no heme da hemoglobina, na mioglobina, transferrina, ferritina e nas porfirinas. Esse também é considerado um parâmetro sanguíneo para inflamação (MOTTA, 2009).

O ferro hêmico é absorvido como tal pelas células intestinais. O ferro ingerido está na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e deve ser transformado na forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) para ser absorvido. O ferro passa para circulação ligado a uma proteína transportadora, denominada transferrina. Esta glicoproteína, sintetizada no fígado, transporta e cede o ferro aos eritroblastos da medula óssea ou a outros tecidos, onde ficará armazenado.

A deficiência de ferro é encontrada particularmente em crianças, mulheres jovens e idosos. O ferro sérico reflete, principalmente, a quantidade de ferro ligado à transferrina. Os processos mais comuns de diminuição do ferro são: anemias da carência de ferro; ciclo menstrual; infecções agudas; processos inflamatórios, entre outros (MOTTA, 2009).

A capacidade de ligação de ferro à transferrina (CLFT) é uma medida usada para determinar a concentração máxima de ferro que as proteínas séricas, principalmente a transferrina, podem ligar. A CLFT sérica está reduzida nas desordens inflamatórias (MOTTA, 2009).

Outro parâmetro sanguíneo comumente analisado em processos inflamatórios são as aminotransferases. As enzimas aspartato-aminotransferase (AST ou TGO) e alanina-aminotransferase (ALT ou TGP) exercem papéis centrais tanto na síntese como na degradação de aminoácidos (MOTTA, 2009).

As aminotransferases estão amplamente distribuídas nos tecidos, principalmente fígado e músculo esquelético. Aumentos das aminotransferases podem ser devido a doenças hepatobiliares, hepatites, cirrose, mononucleose infecciosa, infarto do miocárdio, embolia pulmonar, pancreatite, gangrena, esmagamento muscular, inflamação dos ductos biliares e infecção por parasitas (MOTTA, 2009).

A  $\gamma$ -glutamiltanspeptidase ( $\gamma$ -GT), outro parâmetro sanguíneo importante na inflamação, está envolvida no transporte de aminoácidos e peptídeos através das membranas celulares, na síntese proteica e na regulação dos níveis de glutatona

tecidual. A  $\gamma$ -GT é encontrada no fígado, nas vias biliares, rins, intestinos, próstata, pâncreas, pulmões, cérebro e coração (MOTTA, 2009).

O aumento desta enzima pode ser causado por doenças hepáticas, hepatites infecciosas, neoplasias, esteatose hepática, fármacos, fibrose cística, câncer prostático e outros (MOTTA, 2009).

## **2.3 Plantas utilizadas nas formulações**

### **2.3.1 Marcela (*Achyrocline satureioides* (LAM) D.c.)**

*Achyrocline satureioides* (Lam.) D.c., popularmente conhecida como “marcela” ou “macela”, é uma erva medicinal pertencente à família Asteraceae distribuída por toda a América do Sul, principalmente Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil (DESMARCHELIER *et al.*, 1998). Infusões de inflorescências de *Achyrocline satureioides* são utilizadas comumente na medicina popular brasileira como digestivo, antiespasmódico, anti-inflamatório, agente hipoglicêmico e como redutor dos níveis de colesterol sanguíneo (SIMÕES *et al.*, 1998).

Kadarian e colaboradores (2002) observaram em análises fitoquímicas a presença de flavonoides, derivados cafeólicos, cumarinas, óleos essenciais e terpenos. Também foram isolados dois polissacarídeos pécnicos com atividade imunológica e sesquiterpenos e monoterpenos.

Os flavonoides, principalmente o grupo dos polifenóis, podem ser encontrados em frutas, vegetais, cereias, flores, chá e vinho (SCHROETER *et al.*, 2002). Esses compostos podem prevenir injúrias oxidativas de várias formas: prevenindo a formação de radicais livres, quelando íons metálicos e inibindo a atividade de diversas enzimas, como lipoxigenase, cicloxigenase, xantina oxidase, fosfolipase A2 e proteína quinase, importantes nas reações inflamatórias (RATTY; DAS, 1988). Devido à grande importância dos flavonoides como protetores de células contra diferentes tipos de agentes químicos, inclusive estresse oxidativo, plantas com altas concentrações desses compostos são de grande interesse para pesquisadores.

Estudos da composição química demonstraram que o extrato etanólico das inflorescências da marcela tem como principais constituintes os flavonoides quercetina, 3-o-metilquercetina e luteolina. No mesmo estudo, análises por cromatografia em

camada delgada (CCD) de *Achyrocline satureioides* revelaram a presença das agliconas livres luteolina, quercetina e 3-o-metilquercetina (ARREDONDO *et al.*, 2004).

Investigações farmacológicas de extratos etanólicos de inflorescências de *Achyrocline satureioides* indicaram que esses flavonoides têm grande importância nos mecanismos e atividades anti-inflamatórias quando administrados intraperitonealmente (SIMÕES *et al.*, 1998).

Morquio *et al.* (2005) constataram que a presença desses flavonoides em protetores solares protegeu a pele contra a agressão oxidativa dos raios UV. Outro estudo avaliou a atividade antivirótica de extratos padronizados de *Achyrocline satureioides* para o vírus da herpes em cultura de células (BETTEGA *et al.*, 2004). De forma similar, estudos fitoquímicos confirmaram a presença de ácido cafeico, clorogênico e isoclorogênico (FERRARO *et al.*, 1981; SIMÕES, 1984).

As propriedades bioquímicas de flavonoides e do ácido cafeico têm atraído muitos pesquisadores da biologia e da medicina. Os flavonoides são descritos como sequestradores do ânion superóxido, de hidroxilas, de radicais peroxi e como inibidores de enzimas-chave na respiração mitocondrial. Eles também são conhecidos como inibidores da oxidação de proteínas de baixa densidade. A quercetina é um dos principais flavonoides presentes na marcela e foi descrita como inibidora da peroxidação lipídica através de sequestradores de espécies reativas ao oxigênio e quelante de íons metálicos – responsáveis pela geração das espécies reativas ao oxigênio (OHSHIMA *et al.*, 1998; DI CARLO *et al.*, 1999; YAMAMOTO *et al.*, 1999; HARBONE, WILLIAMS, 2000; ISHIGE *et al.*, 2001).

Outro estudo constatou que tanto o extrato aquoso quanto o metanólico de marcela reduziram a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em homogeneizados de fígado de ratos (DESMARCHELIER *et al.*, 1998). Em estudo epidemiológico com dietas de antioxidantes na incidência de doenças neurodegenerativas, Arredondo *et al.* (2004) concluíram que os flavonoides quercetina e luteolina, contidos na infusão de *Achyrocline satureioides*, foram responsáveis pelo efeito citoprotetor. O resultado obtido por esses pesquisadores sugere que o extrato de marcela possui significativa capacidade para carrear radicais livres.

Recentemente, um novo composto, denominado “achyrofuran”, foi isolado e descrito por apresentar atividade hipoglicemiante em experimento utilizando ratos com diabetes tipo 2 (CARNEY *et al.*, 2002).

### 2.3.2 Assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.)

Tipicamente brasileiro, esse arbusto cresce espontaneamente em toda a região Sudeste, além dos Estados da Bahia, Mato Grosso e Paraná. Nas terras onde cresce, recebeu várias denominações, como “assa-peixe”, cambará-guassu, cambará-branco e chimarrita. Arbusto de pequena estatura, de 3 a 4 m, pertencente à família Asteraceae, *Vernonia polyanthes* é uma planta utilizada amplamente na medicina tradicional brasileira para o tratamento de malária e febre (ROSSATO, 1996). Multiplica-se com facilidade em terrenos de pastagem e solos pouco férteis, nas beiras de estradas, nos lugares abertos, sendo, por isso, considerada planta daninha nas culturas perenes (ROSSATO, 1996).

A espécie é considerada como fornecedora de bom mel, sendo procurada pelas abelhas, tanto pelo néctar, como pelo pólen (WIESE; KOPPENHOFER, 1983). Suas folhas são empregadas na medicina popular em casos de gripes, resfriados, tosses, bronquite, contusões, hemorroidas e infecções do útero (ANDREÃO, 1999).

Pesquisas fitoquímicas com extratos de *Vernonia polyanthes* relatam a presença de diversos triterpenos e lactonas sesquiterpênicas, entre os quais estão tridecapentaineno, D-germacreno, biciclogermacreno, alfa-humuleno, acetato de lupeila, stigmasterol e hirsutinolídeo. Diversos terpenoides, incluindo carbenoxoleno, ácido oleanólico, ácido ursólico e esteróis presentes nesta planta, têm sido associados à atividade antiúlcera *in vivo*. Parece que os mecanismos de ação dessas substâncias estão ligados ao aumento de fatores defensivos da mucosa gástrica, como o estímulo na síntese de mucinas e também a manutenção em altos níveis de prostaglandinas e na mucosa gástrica (BARBASTEFANO *et al.*, 2007).

Estudos fitoquímicos qualitativos do extrato hidroalcoólico revelaram a presença de hirsutinolídeos (ligninas) e lactonas e que podem exercer atividade relaxante sobre células do músculo liso no trato respiratório. Esse efeito sobre a musculatura lisa e de resistência vascular pode explicar a resposta hipotensiva observada após administração oral crônica em ratos do extrato de *Vernonia polyanthes* (SILVEIRA *et al.*, 2003).

Outros estudos fitoquímicos previamente realizados nas partes aéreas da planta demonstraram alta presença de sesquiterpenos, triterpenos e principalmente flavonoides (BOHLMANN *et al.*, 1981). Nesse estudo foi testado os extratos metanólico e clorofórmico da planta quanto ao seu efeito antiulcerogênico. Foi constatado que ambos os extratos tiveram efeitos sob as úlceras, diminuindo os produtos da inflamação,

sobretudo os relacionados ao ácido araquidônico. Além disso, os terpenos contidos na fração apolar do extrato clorofórmico de *Vernonia polyanthes* protegeram a mucosa gástrica em pequenas doses do composto (BARBASTEFANO *et al.*, 2007).

Pesquisas realizadas com extratos de *Vernonia polyanthes* demonstraram efeitos na infecção e taxa de depuração urinária, nos sintomas gastrointestinais e respiratórios, inclusive efeitos analgésicos e miorreaxantes (FRUTUOSO *et al.*, 1994; ADEBOYE *et al.*, 1994; COSTA-NETO, OLIVEIRA, 2000).

### 2.3.3 Tanchagem (*Plantago major* L.)

A tanchagem pertence à família das Plantaginaceae, que compreende muitas espécies, cinco das quais são comestíveis: *Plantago major* L., *Plantago australis* Lam., var *hirtella* (Hbk) Banhn, *Plantago guilhemiana* Desc., *Plantago catharinae* Desc. e *Plantago tomentosa* Engl. No Brasil, são conhecidas vulgarmente como língua-de-vaca, plantagem, tanchagem ou tansagem (LORENZI; MATOS, 2002).

*Plantago major* é originária da Europa, porém adaptou-se muito bem no Brasil e pode ser encontrada em solos de quase todo o País. É uma planta vivaz, perene, ereta, acaule, que cresce entre 20 e 30 cm de altura. Folhas dispostas em roseta basal, com pecíolo longo e lâmina membranácea com nervuras bem destacadas. Flores muito pequenas, dispostas em inflorescências espigadas eretas sobre haste floral de 20 a 30 cm de comprimento. Estas transformam-se em frutos (sementes), que são facilmente colhidas, raspando-se entre os dedos toda a inflorescência (LORENZI; MATOS, 2002).

As plantas de tanchagem desenvolvem-se melhor em solos arenosos, ricos em matéria orgânica e com boa umidade (FONT QUER, 1993).

O uso de *P. major* no tratamento de feridas é tradicionalmente conhecido. Em 1244, Henrik Harpestreng, da Dinamarca, descreveu em um herbarium, “Harpestreng Herbarum”, que a planta poderia curar todo tipo de ferimento. É sabido que os Vikings já usavam as folhas da tanchagem para curar ferimentos, descrito no *Volsuga Saga* (NIELSEN, 1969).

Estudos com extratos aquosos de *Plantago major* administrados por via oral em camundongos e ratos demonstraram inibição de síntese de prostaglandinas – importante fator na inflamação (SAMUELSEN, 2000). Extratos alcoólicos da folha de *Plantago major* também inibiram o desenvolvimento de edemas nas patas de ratos, injetados com

carragenina, através da inibição da atividade da cicloxigenase (SHIPOCHLIEV *et al.* 1981).

Um estudo etnofarmacológico recente mostrou a dimensão do uso de *P. major* em todo o mundo e para várias doenças. Dentre as indicações para afecções da pele, podem-se destacar o seu emprego no tratamento de abscessos, acne, processos inflamatórios, picada de abelha, queimaduras, leishmaniose cutânea, como desinfetante das feridas, emoliente em exantema e cicatrizante. No tocante a problemas respiratórios, é indicado como expectorante para resfriados, doenças pulmonares, asma e bronquite. Quanto a problemas digestivos, é indicado para constipação, diarreia, aftas e úlcera; a problemas no sistema urogenital, para infecções do trato urinário e vaginites; a problemas circulatórios, para diabetes, edema, hemorroidas; para hipertensão, como diurético. As indicações em relação ao sistema nervoso são ainda como analgésico, antipirético, hipnótico e estimulante. Outras indicações ainda constam, como antineoplásico, antimalárico, anti-helmíntico, contraceptivo, para picada de cobras e abortivo (SAMUELSEN, 2000).

No Brasil é considerada diurética, antidiarréica, expectorante, hemostática e cicatrizante, sendo empregada contra infecções das vias respiratórias superiores, bronquite crônica e como auxiliar no tratamento de úlceras pépticas. Adicionalmente, tem efeito depurativo do sangue. O gargarejo de seu chá tem efeito contra amidalite, faringite, estomatite, entre outros, além de ser desintoxicante das vias respiratórias de fumantes. Na sua composição estão presentes flavonoides, esteroides, mucilagens, taninos, saponinas, ácidos orgânicos e alcaloides (LORENZI; MATOS, 2002).

Os lipídeos são extraídos das sementes; 64,8% deles são constituídos de ácidos graxos insaturados, um ácido saturado; o ácido araquídico é isolado somente das sementes de *P. major*, não sendo encontrado em outras espécies de *Plantago* (LORENZI; MATOS, 2002).

Das folhas frescas de *P. major* pode-se extrair até 0,18% de lipídeos, e nestes são encontrados principalmente os ácidos graxos insaturados linolênico (18:3 ou W2), ácido palmítico (16:0) e um ácido graxo saturado. Na cera das folhas encontram-se principalmente ácidos triterpênicos livres, os ácidos oleanoico e ursólico e hidrocarbonetos alifáticos contendo entre 27 e 33 átomos de carbono (LORENZI; MATOS, 2002).

Diversos flavonoides foram isolados da *P. major*. Entre estes estão a luteolina 7-glicose, hispidulina 7-glicoronil, luteolina 7-diglicose, apigenina 7-glicose, nepetina 7-glicose, luteolina 6-hidroxi, 4'-metoxi 7-galactose, plantaginina, homeoplantaginina,

baicaleína, e a hispidulina, além de outros, que não tiveram suas estruturas elucidadas (SAMUELSEN, 2000).

Muitos flavonoides possuem atividade antioxidante, sendo exemplos destes encontrados na *P. major* a baicaleína, hispidulina e plantaginina. Dois destes, a baicaleína e a hispidulina, possuem atividade anti-inflamatória, comprovada para a baicaleína, pela inibição da formação do edema de pata de rato provocada pela administração de carragenina, 12-lipoxigenase e LPS. Já a hispidulina mostrou-se inibidora da 5-lipoxigenase, e a baicaleína, hepatoprotetora contra lesões induzidas por  $CCl_4$  em ratos (SAMUELSEN, 2000).

Nas sementes encontram-se alguns açúcares, como a glicose, frutose, xilose e ramnose e sucrose, e um trissacarídeo denominado planteose. As folhas possuem polissacarídeos com atividades biológicas, dos quais dois, a galactoarabinan e a galactan, são utilizados no tratamento de úlceras e conhecidos como “plantaglicídeo”. Um outro polissacarídeo, denominado PMII, possui a capacidade de ativar o sistema complemento pela via clássica, atuando profilaticamente contra infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae* em camundongos (SAMUELSEN, 2000).

Foram isolados de diferentes tipos de extrato o etil e o metil éster do ácido cafeico, os ácidos clorogênico e neoclorogênico, além do plantamajosídeo e o acetosídeo, também denominado verbascosídeo. O plantamajosídeo produziu ação antioxidante inibitória sobre o edema de orelha de camundongos, induzido por ácido araquidônico. O acetosídeo apresentou atividade antioxidante, inibiu ainda a aldose redutase e a formação de ácido 5-hidroxi-eicosa-tetra-enoico (5-HETE) e possui outros efeitos, como antibacteriano, imunossupressor, analgésico e anti-hipertensivo (SAMUELSEN, 2000).

Denominados princípios amargos, o principal composto dessa classe encontrado na *P. major* é a aucubina. Sua concentração varia muito com as estações, atingindo maior concentração durante o mês de junho. Ela possui atividade anti-inflamatória comprovada pela inibição do edema de orelha de camundongos induzido pela aplicação de TPA (acetato de 12-o-tetradecanoilforbol), e possui também atividade espasmolítica sobre a concentração uterina induzida por acetilcolina em ratas; é um antídoto para envenenamento por cogumelos amanita ( $\alpha$ -amanitina), hepatoprotetora contra danos causados pelo  $CCl_4$  e possui ainda ação antiviral contra vírus da hepatite B. A genina da aucubina possui atividade antimicrobiana contra bactérias e bolores (SAMUELSEN, 2000).

As folhas frescas de *P. major* contêm teores variados de vitamina C e carotenoides ( $\beta$ -caroteno, principalmente), dependendo da idade da planta. Contêm ainda pequenas quantidades de ácido oxálico, nitratos e ácido erúcido. Terpenos foram isolados da cera das folhas de *P. major*, constituído na sua maioria de triterpenos, sendo os principais os ácidos oleanólico, ursólico e 18b-glicirretínico, além do sitosterol. Os ácidos ursólico e oleaólico inibiram a cicloxigenase 1 e 2 em estudos realizados *in vitro*, tendo como mais efetivo o primeiro. Possuem ainda efeito hepatoprotetor e anti-hiperlipidemia (SAMUELSEN, 2000).

O mecanismo pelo qual os terpenos de *P. major* exercem o efeito anti-inflamatório não é totalmente esclarecido, porém sabe-se que envolve a inibição da liberação de histamina pelos mastócitos, inibição da enzima proteolítica elastase e inibição da atividade do sistema complemento (SAMUELSEN, 2000).

A atividade anti-inflamatória foi demonstrada pelo método experimental de edema de pata de rato induzido por carragenina, em que o tratamento por via oral com o extrato causou inibição. No edema provocado por dextrana, o extrato não foi efetivo. Esses dados sugerem que o mecanismo esteja relacionado com a inibição da síntese de prostaglandinas (bloqueio de cicloxigenase) e não com a atividade histaminérgica. A inibição na formação de exsudato e na mobilização de leucócitos induzida pela aplicação de carragenina intraperitoneal indica ainda que o mecanismo de ação está relacionado aos mesmos desencadeados pelos anti-inflamatórios não esteroidais (CHOU *et al.*, 2003).

A atividade analgésica foi demonstrada para o extrato aquoso, por meio da inibição das contorções abdominais induzidas pela aplicação de ácido acético no peritônio, semelhante ao realizado pelos AINES. O extrato não teve efeito no teste de *tail flick* (nocicepção térmica manifesta por reflexo de retirada da cauda de camundongos), o que indica que ele não tem ação analgésica semelhante à dos opioides (CHOU *et al.*, 2003).

#### **2.3.4 Cânfora (*Cinnamomum camphora*)**

*Cinnamomum camphora* Sieb, popularmente conhecida como cânfora, é uma árvore pertencente à família Lauraceae e ao gênero *Cinnamomum*, nativa de algumas regiões do extremo oriente, particularmente de Taiwan, Japão e China meridional (CHOI, 1997). A cânfora produz uma substância branca, cristalina, com forte odor

característico, obtido a partir da seiva. A extração é feita pela oxidação do pineno, parte principal da essência de terebentina. Apresenta-se em grandes massas brancas, granocristalinas, translúcidas, de cheiro particular penetrante e de um sabor um tanto amargo. É pouco solúvel na água, dissolvendo-se facilmente no álcool, éter e demais solventes orgânicos (CHOI, 1997).

Conhecida desde a antiguidade, a cânfora é utilizada como incenso e no preparo de medicamentos. Dentre os principais tratamentos na medicina tradicional, ela se destaca por sua ação anti-inflamatória, como no tratamento de reumatismo, torção, bronquite, asma, indigestão e dores musculares. A cânfora também é efetiva no tratamento de gripes e resfriados (CHOI, 1997).

A inflamação aguda ou crônica é mediada por uma série de substâncias químicas e células imunológicas. Para isso, os macrófagos desempenham papel importante no fenômeno imunopatológico como a produção de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios (espécies reativas ao oxigênio, óxido nítrico e prostaglandina E2). Em condições inflamatórias, as células imunes são estimuladas por sinais de ativação de adesão molecular de forma a facilitar a migração de substâncias para tecidos inflamados. Além disso, estímulos inflamatórios, como lipopolissacarídeos e citocinas pró-inflamatórias, ativam células imunológicas a regular os estágios da inflamação. Esses marcadores são importantes no desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias e exploração de mecanismos moleculares anti-inflamatórios de uma droga potencial. Este é o caso de um estudo com *Cinnamomum camphora*, que é tradicionalmente utilizado na medicina para o tratamento de doenças relacionadas à inflamação, como reumatismo, bronquite, asma, indigestão e dores musculares. Nesse estudo, observou-se o efeito modulador da *Cinnamomum camphora* nos processos celulares inflamatórios examinados, para que se pudesse entender seus mecanismos anti-inflamatórios potenciais dentro dos limites de concentrações farmacológicas não citotóxicas (LEE *et al.*, 2006).

Eigler *et al.* (1997) demonstraram que substâncias químicas presentes na planta cânfora têm múltiplas atividades biológicas em processos inflamatórios crônicos e artrite reumatoide e regulam a produção de citocinas IL1  $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Estas são conhecidas como citocinas pró-inflamatórias (EIGLER *et al.*, 1997).

De acordo com estudos fitoquímicos, foi observado que a cânfora continha alcaloides e óleos essenciais, como o cânfor (MIYAZAWA *et al.*, 2001), e proteínas que inativam ribossomos tipo II, como cinnamomina e canforina (HE; LIU, 2003).

He e Liu relatam os efeitos da cinamomina, uma glicoproteína presente no extrato da cânfora e nas sementes maduras e que exibe efeitos sobre as proteínas inativadoras do ribossomo (RIPS) (HE; LIU, 2003). Estas são proteínas inativadoras do ribossomo, um grupo de proteínas tóxicas que podem inativar irreversivelmente ribossomos e então inibir a síntese proteica. Muitos RIPS contêm a RNA N-glicosidase, que pode remover uma adenina dos loops altamente conservados (domínio sarcina ricina) do RNA, mais largamente encontrados de ribossomos eucarióticos. Esse domínio é responsável pela interação de fatores de alongamento com ribossomos (XU; LIU, 2000). A cinamomina pode também clivar ligações n-glicosídicas e liberar a base adenina de AMP, ADP, dAMP e adenosina e, ainda, retirar a adenina de moléculas do DNA. Isso se correlaciona com proteína da seguinte forma: ocorre a formação do gene - --- DNA----- RNA ----- proteína (HE; LIU, 2003).

### **2.3.5 Bálsamo-do-peru (*Myroxylon peruiferum*)**

O bálsamo-do-peru é um óleo-resina extraído pela incisão ou queimadura da superfície das cascas do tronco da espécie *Myroxylon peruiferum* L.F., constituindo-se de um líquido xaroposo, límpido, de coloração pardo-negra, com odor agradável e aromático, lembrando a baunilha e o benjoim, além de apresentar sabor amargo e acre. Esta espécie é uma árvore que mede de 4 a 20 m de altura, possuindo casca cinzenta-claro ou pardo-amarelada, íntegra e rugosa (RIZZINI; MORS, 1995). Alguns nomes pelos quais é conhecido popularmente são: óleo-bálsamo, bálsamo-de-tolu, pau-bálsamo, bálsamo-índico-seco, bálsamo-de-cartagena, resina-de-tolu, bálsamo-toluano, bálsamo-da-américa, bálsamo-de-cheiro-eterno, bálsamo-de-são-tomaz, bálsamo-do-peru, bálsamo-de-são-salvador, benjoim-do-norte, opobálsamo, óleo-vermelho, coroiba, resina-de-tabu (RIZZINI; MORS, 1995).

No Brasil, sua distribuição inclui uma vasta gama de regiões de floresta do país, muito comum nos Estados da Bahia, Paraná e Mato Grosso (RIZZINI; MORS, 1995). É usado na medicina popular como anti-inflamatório e expectorante peitoral em casos de asma, bronquite asmática, cistite, doença pulmonar, dor de cabeça, ferida externa, fraqueza, garganta, tosse e vias aéreas (RIZZINI; MORS, 1995). É também empregado para aromatizar chocolate, como sucedâneo da baunilha, e na perfumaria, onde os perfumes adotam notas balsâmicas e vaniladas. Quanto em contato com a derme, comporta-se como rubefaciente, dermoprotetor, antisséptico, escabicida e vulnerário, sendo aplicado sob a

forma de soluções alcoólicas. Também são preparados supositórios para os casos de hemorroidas (RIZZINI; MORS, 1995).

Quimicamente, o bálsamo é uma mistura de ácidos, principalmente os ácidos benzoico e cinâmico e benzoato de benzila. Além disso, em sua fração resinosa contém monoterpenoides, sesquiterpenoides, álcoois e fenilpropanoides, sesquiterpenoides, álcoois e derivados de fenilpropanoides (OLIVEIRA *et al.*, 1978; MARANDUBA *et al.*, 1979). É irritante das mucosas quando administrado por via oral, recomendando-se assim o uso tópico. Contudo, até mesmo o uso tópico pode originar uma dermatite de contato, sendo o ácido benzoico o componente tóxico majoritário (OLIVEIRA *et al.*, 1978).

O composto bioativo foi identificado como uma isoflavona denominada cabrevina. Este composto foi obtido pela metilação da 3,4,7-tri-hidroxi isoflavona. A cabrevina é o composto mais importante do extrato de *M. peruiferum*, com atividade antibiótica contra *H. pylori* (OHSAKI *et al.*, 1999).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Avaliar os efeitos farmacológicos curativos de formulações de fitoderivados contendo plantas medicinais (assa-peixe, bálsamo-do-peru, cânfora, marcela e tanchagem) em coelhos com feridas induzidas por ácido clorídrico.

#### **3.2 Objetivos específicos**

a) Induzir feridas em coelhos da raça Nova Zelândia com administração cutânea de ácido clorídrico.

b) Tratar as feridas produzidas em coelhos com formulações de fitoderivados contendo plantas medicinais (assa-peixe, bálsamo-do-peru, cânfora, marcela e tanchagem) em diferentes concentrações.

c) Avaliar os dados hematológicos dos animais, após tratamento com diferentes concentrações das formulações de fitoderivados contendo plantas medicinais (assa-peixe, bálsamo-do-peru, cânfora, marcela e tanchagem).

d) Avaliar as lâminas histológicas das peles feridas e tratadas com as formulações contendo as plantas medicinais estudadas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção das espécies vegetais**

As partes aéreas floridas das espécies vegetais foram gentilmente cedidas da fazenda em Brumadinho/MG do sr. Dario Moreira Dinis para o desenvolvimento do projeto e requerimento de patente pelo laboratório Biofármacos/UFV. Essas plantas eram utilizadas por sr. Dario na comunidade onde morava para o tratamento de feridas cutâneas. Exsicatas representativa dos materiais botânicos foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de Viçosa.

### **4.2 Preparação dos geis e cremes**

O extrato utilizado nos ensaios foi preparado, pelo método de percolação, segundo processo A da Farmacopeia Brasileira IV edição (1988), usando solução hidroalcoólica a 30%. O extrato foi evaporado inicialmente em rotaevaporador e posteriormente em banho-maria com temperatura inferior a 60 °C até consistência pastosa, com rendimento de aproximadamente 0,22 g/mL de cada extrato (Figura 1).

Com o extrato de cada espécie vegetal foram preparados geis e cremes (Tabelas 1 e 2).

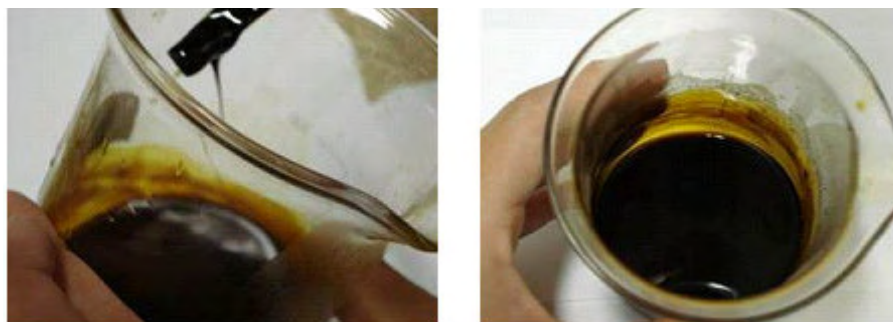


Figura 1 – Aparência do extrato hidroalcoólico das folhas de *Plantago major*.

Tabela 1 – Formulação de gel, segundo a Farmacopeia Brasileira IV edição (1988)

Carbopol 940 <sup>®</sup>	0,65% (p/v)
Solução de NaOH 10%	qs pH 6,5 – 7,0
Propilenoglicol	5 mL (v/v)
Metilparabeno	0,2% (p/v)
Extrato glicólico	Concentração desejada
Água deionizada qsp	100 mL

Tabela 2 – Formulação de creme segundo a Farmacopeia Brasileira IV edição (1988)

Lanette N <sup>®</sup>	15%
Cetiol V <sup>®</sup>	3%
Óleo mineral	2%
Propilenoglicol	5%
Nipagin <sup>®</sup>	0,15%
Nipazol	0,05%
Extrato hidroalcoólico	Concentração desejada
Água destilada	100%

Foram preparados cremes do extrato de marcela numa concentração final de 3%. Para a formulação contendo tanchagem, foram obtidos cremes nas concentrações finais respectivas de 1, 2 e 4%. Já para as formulações com assa-peixe, foram manipulados cremes nas concentrações de 1, 2 e 3%, respectivamente. O creme contendo o extrato de bálsamo foi preparado apenas em uma única concentração de 1%.

As formulações contendo a mistura de quatro e cinco fitoderivados foram preparadas a partir de extratos hidroalcoólicos 30% de cada fitoderivado. Para a mistura de quatro fitoderivados, suas concentrações finais foram, respectivamente, de 2,5, 3 e 10%. Já para a formulação contendo cinco fitoderivados, as concentrações finais foram de 1 e 10%.

O Acheflan<sup>®</sup> (alfa-humuleno) foi o medicamento fitoterápico controle do experimento. Esse medicamento foi desenvolvido pela Unicamp como primeiro anti-inflamatório feito com base no extrato de uma planta nativa brasileira: a erva-baleeira (*Cordia verbenacea*). Em forma de creme, o Acheflan<sup>®</sup> possui propriedades anti-inflamatórias tópicas (MEDEIROS *et al.*, 2007).

### 4.3 Animais

Os animais utilizados foram fornecidos pelo setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Utilizaram-se 42 coelhos da raça Nova Zelândia, albinos, com idade de 55 dias (Figura 2).



Figura 2 – Coelho da raça Nova Zelândia.

Durante o experimento, os coelhos foram mantidos na área experimental do Laboratório de Biofármacos da UFV. Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais, com fornecimento de água *ad libitum* e 120 g de ração comercial Purina por dia. Após a adaptação de cinco dias, os mesmos foram divididos em cinco grupos aleatoriamente, de forma que cada grupo tivesse seis animais.

### 4.4 Indução da ferida

Para indução das úlceras dérmicas (feridas), os animais foram anestesiados com a associação de tiletamina e zolazepam (zoletil 50<sup>®</sup>), dosagem de 30 mg.kg<sup>-1</sup>, por via

intramuscular. Cerca de 15 minutos depois da aplicação do anestésico, os animais tiveram uma área depilada de 5 cm<sup>2</sup> na região dorso-cervical, o que limitou o acesso do animal à área de indução e/ou tratamento. Após a depilação (Figura 3), foi aplicada uniformemente uma solução de HCl 2N 1 mL/cm<sup>2</sup> (JORGE; DANTAS, 2003). Esse procedimento foi realizado num intervalo de 24 horas durante cinco dias.



Figura 3 – Área depilada de 5 cm<sup>2</sup> na região dorso-cervical.

#### 4.5 Organização dos grupos experimentais

Após a indução da ferida, os animais foram separados aleatoriamente em grupos experimentais. Cada grupo foi composto por seis animais.

A frequência do tratamento, o veículo utilizado (gel ou creme) e a divisão dos grupos foram estabelecidos de acordo com as Tabelas 3 e 4.

Após cinco dias de indução da ferida, o tratamento dos grupos foi iniciado, sendo aplicadas quantidades padronizadas por marcação na espátula (suficiente para cobrir, uniformemente, a ferida por completo) dos geis sobre as feridas, duas vezes ao dia. O experimento teve duração de 30 dias, com posterior sacrifício dos animais utilizando associação de tiletamina e zolazepam (Zoletil 50<sup>®</sup>), na dosagem de 30 mg.kg<sup>-1</sup>, por via intra-venosa (BERNATCHEZ *et al.*, 1998).

Tabela 3 – Grupos de coelhos utilizados no teste de avaliação da atividade cicatrizante tratados com géis de extratos hidroalcoólicos de fitoderivados contendo marcela, tanchagem, bálsamo-do-peru e assa-peixe (quatro fitoderivados) e géis de extratos hidroalcoólicos de fitoderivados contendo marcela, tanchagem, bálsamo-do-peru, assa-peixe e cânfora (cinco fitoderivados)

Grupos	Tratamento	Dose
G1	Ração	-
G2	Ração + ferida	-
G3	Ração + ferida + gel FE4 2,5%	2/dia
G4	Ração + ferida + gel FE4 3,0%	2/dia
G6	Ração + ferida + gel FE4 10%	2/dia
G5	Ração + ferida + gel FE5 10%	2/dia
G7	Ração + ferida + gel FE5 1%	2/dia

FE4 2,5% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 2,5%; FE4 3% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 3%; FE4 10% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 10%; FE5 10% = fitoderivado com extrato de cinco plantas 10%; e FE5 1% = fitoderivado com extrato de cinco plantas 1%.

Tabela 4 – Grupos de coelhos utilizados no teste de avaliação da atividade cicatrizante de cremes dos extratos hidroalcoólicos marcela 3%, tanchagem 1, 2 e 4%, assa-peixe 1, 2 e 3%, bálsamo 1% e Acheflan<sup>®</sup>

Grupos	Tratamento	Dose
G1	Ração	-
G2	Ração + ferida	-
G3	Ração + ferida + marcela 3% creme	2/dia
G4	Ração + ferida + tanchagem 1% creme	2/dia
G5	Ração + ferida + tanchagem 2% creme	2/dia
G6	Ração + ferida + tanchagem 4% creme	2/dia
G7	Ração + ferida + assa-peixe 1% creme	2/dia
G8	Ração + ferida + assa-peixe 2% creme	2/dia
G9	Ração + ferida + assa-peixe 3% creme	2/dia
G10	Ração + ferida + bálsamo 1% creme	2/dia
G11	Ração + ferida + acheflan	2/dia

#### 4.6 Dosagens de parâmetros sanguíneos

Amostras de 5 mL de sangue foram coletadas por punção cardíaca em tubos heparinizados e centrifugadas a 7.100 xg durante 15 minutos.

Os parâmetros sanguíneos proteínas totais, cálcio, ferro, TGO (AST), TGP (ALT),  $\gamma$ GT e albumina foram dosados utilizando-se o ALIZÉ (equipamento automático de análises bioquímicas).

#### **4.7 Análise histológica**

Ao término dos experimentos foram retiradas amostras de pele de todos os animais. Cada parte de pele de cada animal foi armazenada em pote de vidro individual contendo solução de formol MERCK a 10% e foram realizadas as confecções das lâminas. As peles foram cortadas em fragmentos de 2 cm e desidratadas em banhos sucessivos em uma série crescente de álcoois (70%, 80%, 90% e álcool absoluto) ficando em repouso durante uma hora. Para completar a desidratação, as peles foram retornadas ao álcool absoluto por mais meia hora. Para diafanização, os tecidos (peles) foram mergulhados em Xilol 100% (dois banhos de 30 minutos). Em seguida, procedeu-se à inclusão das peles em parafina líquida 58 a 60 °C por quatro horas. Concluída a inclusão, os blocos foram mantidos em uma placa de gelo, para solidificar. Os cortes obtidos em micrótomo, com lâmina de aço na espessura de 5 µm, foram corados com hematoxilina-eosina. Para isso, o material primeiramente foi desparafinado em Xilol 100% (cinco minutos), hidratado em uma série crescente de álcool absoluto a 90% por 5 minutos e lavado em álcool. Em seguida, os tecidos foram corados com hematoxilina por um minuto. Para coloração em eosina (20 segundos), as lâminas foram previamente lavadas em H<sub>2</sub>O (cinco minutos), diferenciadas rapidamente em HCl 1% e banhadas em álcool 90%. Finalmente, gotejou-se uma gota de bálsamo-do-canadá para aderir à lamínula. As análises das lâminas foram realizadas em microscópio (Labomed® 1500) acoplado à câmera fotográfica, para análise e diagnóstico das lâminas.

#### **4.8 Estatística**

Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA, seguido pelos testes de Tukey e Dunnet.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análise dos parâmetros sanguíneos das feridas tratadas com formulações de fitoderivados compostas

Junto com a avaliação do processo de cicatrização, foi realizada as dosagens de alguns parâmetros sanguíneos e análise histopatológica da pele dos coelhos.

Tabela 5 – Valores médios de proteínas totais e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel do fitoderivado contendo extrato de quatro plantas nas concentrações de 2,5, 3 e 10% e do fitoderivado contendo extrato de cinco plantas nas concentrações 1 e 10% em três doses por 30 dias, comparados com os do grupo sem ferida (G1)

Tratamentos	Proteína (mg/dL)			Albumina (g/ dL)		
	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	86,6	± 0,81 A	0,0	4,4	± 0,04 A	0,0
G2 ração + ferida	73,5	± 1,98 B	-15,2	4,3	± 0,09 A	-0,8
G3 ração + ferida + FE4 2,5%	65,8	± 1,98 B	-24,0	4,1	± 0,09 A	-5,2
G4 ração + ferida + FE4 3%	66,0	± 1,98 B	-23,8	4,1	± 0,09 A	-6,8
G5 ração + ferida + FE4 10%	70,1	± 1,98 B	-19,0	4,3	± 0,09 A	-2,0
G6 ração + ferida + FE5 10%	63,5	± 1,98 B	-26,6	3,9	± 0,09 B	-10,7
G7 ração + ferida + FE5 1%	66,5	± 1,98 B	-23,2	4,1	± 0,09 A	-6,1
G8 ração + ferida + Acheflan®	66,8	± 1,98 B	-22,9	3,4	± 0,09 B	-21,2

Acheflan® (fitoterápico da Aché/Phytomédica); n = seis animais por grupo. Obs.: letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo sem ferida (G1). FE4 2,5% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 2,5%; FE4 3% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 3%; FE4 10% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 10%; FE5 10% = fitoderivado com extrato de cinco plantas 10%; e FE5 1% = fitoderivado com extrato de cinco plantas 1%.

De acordo com os resultados, observou-se que todos os tratamentos foram estatisticamente significativos quando comparados com o grupo 1 no que se refere a proteínas. O grupo 6, tratado com cinco plantas a 10%, teve a maior redução (26,6%) em proteínas totais (Tabela 5).

Pode-se dizer que aparentemente nenhuma substância presente nas formulações influenciou os parâmetros proteína total e albumina, uma vez que estas encontram-se diminuídas no processo inflamatório. Geralmente, em processos inflamatórios, proteínas totais e albumina apresentam níveis baixos (GAW *et al.*, 1999). Os parâmetros proteína e albumina estão intimamente relacionados, já que a albumina representa cerca de 60% das proteínas totais. Os outros 40% são imunoglobulinas, apolipoproteínas e  $\beta_2$ -microglobulinas (MOTTA, 2009).

Durante os processos inflamatórios há aumento na atividade de colagenase elastase, entre outras proteases que hidrolisam proteínas teciduais. É possível que alguma substância participante dos processos de reconstrução do colágeno requeira mais proteína da corrente sanguínea para os tecidos (SAMUELSEN, 2000).

As folhas de tanchagem contêm ácidos triterpênicos, ácido oleanólico e ácido ursólico. Além disso, alcaloides indicaína e plantagonina, e diversos flavonoides, como 7-apigeninaglicosidase, baicaleína, hispidulina, 7-glicuronoide, homoplantagenina, luteolina, nepetina, plantaginina, escutelareína e iridoideglicosídeos, asperulosídeo, aucubina, catapol, gardosídeo, ácido geniposídico, majorosídeo, 10-actosimajorosídeo, 10-hidroximajorosídeo e melitosídeo. Todos esses compostos em sinergismo apresentam efeitos anti-inflamatórios e sobre atividades enzimáticas, entre outros (SAMUELSEN, 2000). A aucubina, um dos iridoide, exibe atividade anti-inflamatória e espasmolítica e serve como antídoto para venenos de cogumelo (SAMUELSEN, 2000).

Os flavonoides 3-O-metilquercetina e luteolina, presentes em extratos hidroalcoólicos de marcela, têm papel importante sobre a atividade anti-inflamatória. Esses compostos apresentam atividade anti-inflamatória e diferentes efeitos sobre proteínas e enzimas (POLYDORO *et al.*, 2004).

A cânfora possui alcaloides, óleos essenciais, proteínas cinamomina e canforina, que inativam ribossomos tipo II (HE; LIU, 2003). Eigler *et al.* (1997) demonstraram que substâncias químicas presentes na planta cânfora, como cinamomina e canforina, têm múltiplas atividades biológicas em processos inflamatórios crônicos e artrite reumatoide e regulam a produção de citocinas IL1  $\beta$ , IL-6 e TN  $\alpha$ . Estas são conhecidas como citocinas pró-inflamatórias.

He e Liu (2003) relatam os efeitos da cinamomina, uma glicoproteína presente no extrato da cânfora e nas sementes maduras que exibe efeitos sobre as proteínas inativadoras de ribossomo (RIPS). Estas formam um grupo de proteínas tóxicas, que podem inativar irreversivelmente ribossomos e inibir a síntese proteica. Muitos RIPS contêm a RNA N-glicosidase, que pode remover uma adenina dos *loops* altamente conservados do RNA, mais largamente encontrados em ribossomos eucarióticos. Esse domínio é responsável pela interação de fatores de alongamento com ribossomos (XU; LIU, 2000). Daí, possivelmente se explica a redução das proteínas nos coelhos tratados com as formulações contendo os fitoderivados nas diferentes concentrações.

O assa-peixe presente na formulação testada neste estudo possui triterpenoides, como carbenoxoleno, ácido oleanólico, ácido ursólico e esteróis. Essas substâncias têm sido associadas à atividade antiúlcera *in vivo*. Parece que os mecanismos de ação estão ligados ao aumento dos fatores defensivos da mucosa gástrica, como o estímulo na síntese de mucinas e também a manutenção em altos níveis de prostaglandinas e na mucosa gástrica (BARBASTEFANO *et al.*, 2007).

Com relação à albumina, observou-se que o grupo tratado com Acheflan® foi o que apresentou a maior redução desse parâmetro, seguido do grupo 6.

Um dos objetivos da dosagem de albumina é pesquisar a quantidade de substâncias que ela pode transportar no plasma. Se ela se encontra reduzida no plasma, provavelmente uma menor quantidade de substâncias será transportada. A síntese de albumina geralmente é reduzida por citocinas inflamatórias (MOTTA, 2009). A pele é o principal local de armazenamento de albumina extravascular. Ela se constitui em um *pool* para manter os teores de albumina plasmática. As lesões ou queimaduras resultam na perda direta de albumina, comprometendo o fluxo sanguíneo (GAW *et al.*, 2001). Aparentemente, nenhuma das substâncias conseguiu minimizar essa perda de albumina pela lesão nos coelhos. Além disso, como os níveis de proteínas também estão diminuídos, a albumina também se comporta da mesma forma (GAW *et al.*, 2001).

A hipoalbuminemia nem sempre é identificada, pois os processos hemostáticos operam no sentido de minimizar as alterações na sua concentração plasmática. Pode ser consequência de absorção deficiente de proteínas, síntese deficiente de albumina, excessiva degeneração proteica ou perda de albumina (COLES; NAIDOO, 1987).

A hipoalbuminemia pode alterar o metabolismo de outras substâncias devido ao papel da albumina como transportador, além de causar queda da pressão osmótica do

plasma e levar à ascite – geralmente quando a concentração de albumina cai para menos de 20 g/L (GONZÁLEZ *et al.*, 2002).

A albumina pode estar diminuída no dano hepático crônico, no déficit alimentar de fontes proteicas, no parasitismo gastrointestinal, doença renal (síndrome nefrótica, glomerulonefrite crônica, diabetes), na síndrome da má absorção, em hemorragias e na sobre-hidratação (GONZÁLEZ *et al.*, 2002).

No processo de cicatrização, diversas proteínas têm sua concentração plasmática aumentada ou diminuída. Essa resposta é estimulada pela liberação de citocinas, como interleucina 1 e 6 e o fator de necrose tumoral, e pelo aumento das concentrações dos hormônios cortisol e glucagon. As principais proteínas da fase de cicatrização que estão aumentadas são as inibidoras de proteases ( $\alpha_1$ -antitripsina e  $\alpha_2$ -macroglobulina), proteínas da coagulação (fibrinogênio, protrombina, fator VIII e plasminogênio), proteínas do complemento (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, B, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>56</sub> e C<sub>1</sub>INH), haptoglobina, ceruloplasmina, proteína C-reativa e proteína amiloide A do soro. As proteínas que se apresentam diminuídas nessa fase são properdina, albumina, HDL e LDL (GAW *et al.*, 2001). Essa diminuição também pode ser confirmada nos resultados das dosagens plasmáticas de albumina e proteínas totais dos coelhos tratados com os fitoderivados.

Tabela 6 – Valores médios de proteínas totais e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com fitoderivado contendo extrato de 4 plantas nas concentrações de 2,5%, 3% e 10% e com fitoderivado contendo extrato de 5 plantas nas concentrações de 1% e 10% em três doses por 30 dias, em comparação com o grupo não tratado (G2)

Tratamentos	Proteína (mg/dL)			Albumina (g/dL)		
	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	86,6	± 0,81 B	+17,9	4,4	± 0,12 A	+0,8
G2 ração + ferida	73,5	± 4,01 A	0,0	4,3	± 0,16 A	0,0
G3 ração + ferida + FE4 2,5%	65,8	± 4,09 A	-10,4	4,1	± 0,22 A	-4,4
G4 ração + ferida + FE4 3%	66,0	± 6,81 A	-10,2	4,1	± 0,31 A	-6,1
G5 ração + ferida + FE4 10%	70,1	± 1,62 A	-4,5	4,3	± 0,14 A	-1,3
G6 ração + ferida + FE5 10%	63,5	± 5,02 B	-13,5	3,9	± 0,37 B	-10,0
G7 ração + ferida + FE5 1%	66,5	± 6,82 A	-9,5	4,1	± 0,30 A	-5,4
G8 ração + ferida + Acheflan®	66,8	± 6,83 A	-9,1	3,4	± 0,39 B	-20,6

Acheflan® (fitoterápico da Aché/Phytomédis); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo não tratado (G2). FE4 2,5% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 2,5%; FE4 3% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 3%; FE4 10% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 10%; FE5 10% = fitoderivado com extrato de cinco plantas 10%; e FE5 1% = fitoderivado com extrato de cinco plantas 1%.

Da mesma forma que na Tabela 5, na Tabela 6 todos os grupos apresentaram reduções nos parâmetros proteína e albumina se comparados com o grupo não tratado (G2). No grupo G6, contendo fitoderivado com extrato de cinco plantas (10%), observou-se a maior redução de proteína sanguínea. Possivelmente a cinamomina, presente na cânfora que faz parte da formulação contendo o fitoderivado do extrato de cinco plantas, pode estar aumentando a produção de citocinas inflamatórias, e estas, por sua vez, estão inibindo a síntese de albumina.

As principais proteínas plasmáticas são a albumina, as globulinas e o fibrinogênio. Elas estão envolvidas em múltiplas funções, como a manutenção da pressão osmótica e viscosidade do sangue, o transporte de nutrientes, metabólitos, hormônios e produtos de excreção, a regulação do pH sanguíneo e a participação na coagulação sanguínea. As proteínas sanguíneas são sintetizadas principalmente pelo fígado, e a taxa de síntese está diretamente relacionada com estado nutricional do animal, especialmente com os níveis de proteína e de vitamina A, e com a funcionalidade hepática (GONZÁLEZ *et al.*, 2002).

Proteínas totais e suas frações assumem extraordinária importância clínica, uma vez que a concentração proteica total no plasma é responsável pela sua pressão coloidosmótica e as variações observadas nas diversas frações podem refletir doenças específicas e trazer valiosos subsídios para o seu diagnóstico (MILLER *et al.*, 1999).

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 7, os níveis de ferro dos animais dos grupos 3, 5, 6 e 7 aumentaram depois de tratados com as formulações, quando comparados ao grupo normal. Isso demonstra que as substâncias presentes nas formulações podem estar aumentando a capacidade de ligação de ferro a proteínas, permitindo sua maior ligação aos grupos Heme da hemoglobina. Isso pode promover maior oxigenação nos tecidos, favorecendo o processo de cicatrização.

A capacidade total de ligação do ferro (CTLF), que também é utilizada para avaliar o ferro circulante, diminui na inflamação (PAIVA *et al.*, 2000). Diversas proteínas encontram-se ligadas a ferro nos tecidos, como, por exemplo, hemoglobina, ferritina, hemociderina, mioglobina e várias proteínas contendo grupo Heme, dentre as quais destacam-se as enzimas metabolizadoras de drogas (PAIVA *et al.*, 2000).

Geralmente, mudanças na concentração de albumina do soro em pacientes, produzem mudanças na concentração total de cálcio (GAW *et al.*, 2001). Os níveis baixos de cálcio observados na Tabela 7 foram acompanhados da diminuição da albumina, porque a fração de cálcio ligada à albumina também diminui. Contudo, não

Tabela 7 – Valores médios de ferro e cálcio em soro sanguíneo de coelhos tratados com o gel do fitoderivado contendo extrato de quatro plantas nas concentrações de 2,5, 3 e 10% e do fitoderivado contendo extrato de cinco plantas nas concentrações de 1 e 10% em três doses por 30 dias, em comparação com o grupo sem ferida (G1)

Tratamentos	Ferro ( $\mu\text{g/dL}$ )			Cálcio ( $\text{mg/dL}$ )		
	Média	$\sigma$	%Var.	Média	$\sigma$	%Var.
G1 ração	157,5	$\pm 23,05$ A	0,0	15,7	$\pm 1,46$ A	0,0
G2 ração + ferida	120,2	$\pm 18,83$ B	-23,7	12,1	$\pm 0,38$ B	-22,6
G3 ração + ferida + FE4 2,5%	193,0	$\pm 25,09$ B	+22,6	10,7	$\pm 0,34$ B	-31,5
G4 ração + ferida + FE4 3%	165,4	$\pm 6,83$ A	+5,0	10,8	$\pm 0,57$ B	-31,4
G5 ração + ferida + FE4 10%	200,0	$\pm 32,73$ B	+27,0	10,8	$\pm 0,52$ B	-31,4
G6 ração + ferida + FE5 10%	190,8	$\pm 11,81$ B	+21,1	10,5	$\pm 0,50$ B	-32,9
G7 ração + ferida + FE5 1%	229,4	$\pm 6,65$ B	+45,6	10,2	$\pm 0,51$ B	-35,1
G8 ração + ferida + Acheflan <sup>®</sup>	124,4	$\pm 19,01$ B	-21,0	13,3	$\pm 1,10$ B	-15,0

Acheflan<sup>®</sup> (fitoterápico da Aché/Phytomédis); n = seis animais por grupo o. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo não tratado (G1). FE4 2,5% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 2,5%; FE4 3% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 3%; FE4 10% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 10%; FE5 10% = fitoderivado com extrato de cinco plantas 10%; e FE5 1%: fitoderivado com extrato de cinco plantas 1%.

se pode afirmar que houve hipocalcemia, pois o cálcio livre pode estar normal. Isso pode indicar que algum componente da formulação que esteja favorecendo a reconstituição do tecido epitelial promova a utilização de cálcio do sangue para os tecidos, diminuindo sua concentração no plasma.

Observou-se que as maiores reduções de cálcio ocorreram nos grupos 6 e 7. De 40 a 50% do cálcio plasmático está sob a forma solúvel, ionizada, ao passo que 40 a 45% dele está ligado à proteína, principalmente à albumina, e a outras proteínas plasmáticas. O restante (5%) forma complexo com elementos inorgânicos não ionizados, de acordo com o pH do sangue. O cálcio plasmático é fundamental para a coagulação sanguínea. Ele também é necessário para a permeabilidade de membranas, a excitabilidade neuromuscular, a transmissão dos impulsos nervosos e a ativação de determinados sistemas enzimáticos. A redução do cálcio sanguíneo aumenta a irritabilidade do tecido nervoso (GAW *et al.*, 2001).

Durante o tratamento, todos os grupos tiveram seus níveis de cálcio diminuídos. Estudos realizados por Samuelsen (2000) indicaram que o assa-peixe é indicado na dissolução de sais de cálcio, sendo usado em litíases e no tratamento de infecção urinária. Portanto, substâncias contidas nesse extrato podem aumentar a eliminação de cálcio em algumas patologias.

Na Tabela 8, os resultados demonstram que os grupos tratados tiveram os níveis de ferro aumentados quando comparados ao do grupo doente, em todos os tratamentos. Entretanto, o grupo 7 foi o que apresentou a maior percentagem de aumento. O incremento da concentração de ferro na circulação sanguínea significa uma resposta à inflamação com o aumento da ferritina (GAW *et al.*, 2001).

Tabela 8 – Valores médios de ferro e cálcio em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel do fitoderivado contendo extrato de quatro plantas nas concentrações de 2,5, 3 e 10% e do fitoderivado contendo extrato de cinco plantas nas concentrações de 1 e 10% em três doses por 30 dias, em comparação com o grupo não tratado (G2)

Tratamentos	Ferro ( $\mu\text{g/dL}$ )			Cálcio ( $\text{mg/dL}$ )		
	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	157,5	$\pm 3,09$ B	+ 31,1	15,7	$\pm 1,46$ B	+29,1
G2 ração + ferida	120,2	$\pm 7,58$ A	0,0	12,1	$\pm 0,38$ A	0,0
G3 ração + ferida + FE4 2,5%	193,0	$\pm 7,58$ B	+ 60,6	10,7	$\pm 0,34$ A	-11,5
G4 ração + ferida + FE4 3%	165,4	$\pm 7,58$ B	+ 37,6	10,8	$\pm 0,57$ A	-11,4
G5 ração + ferida + FE4 10%	200,0	$\pm 7,58$ B	+ 66,4	10,8	$\pm 0,52$ A	-11,4
G6 ração + ferida + FE5 10%	190,8	$\pm 7,58$ B	+ 58,8	10,5	$\pm 0,50$ A	-13,4
G7 ração + ferida + FE5 1%	229,4	$\pm 7,58$ B	+ 90,9	10,2	$\pm 0,51$ A	-16,1
G8 ração + ferida + Acheflan®	124,4	$\pm 7,58$ A	+ 3,5	13,3	$\pm 1,10$ A	+9,7

Acheflan® (fitoterápico da Aché/Phytomédisca); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo não tratado (G2). FE4 2,5% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 2,5%; FE4 3% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 3%; FE4 10% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 10%; FE5 10% = fitoderivado com extrato de cinco plantas 10%; e FE5 1%: fitoderivado com extrato de cinco plantas 1%.

A ferritina é uma proteína globular que se localiza essencialmente no fígado. É a mais importante proteína de reserva do ferro, sendo encontrada em todas as células, especialmente naquelas envolvidas na síntese de compostos férricos e no metabolismo e na reserva do ferro. A ferritina é uma reserva rapidamente disponível e só é dosada quando está ligada ao ferro. Contudo, por fazer parte do grupo de proteínas de fase aguda, a ferritina se eleva em resposta a infecções, traumatismos e inflamações agudas (THEIL, 2003).

Provavelmente, nenhuma substância presente nos fitoderivados afetou os níveis de ferro no sentido de diminuir esse parâmetro.

Na Tabela 9 observa-se que houve aumento na atividade da enzima TGP em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo normal, e esses valores foram estatisticamente significativos. O grupo 8 tratado com Acheflan teve aumento de 146,5% na atividade desta enzima, e o grupo 5, aumento de 123,5%. O incremento nos

Tabela 9 – Valores médios de TGP, GGT e TGO em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel do fitoderivado contendo extrato de quatro plantas nas concentrações de 2,5, 3 e 10% e do fitoderivado contendo extrato de cinco plantas nas concentrações de 1 e 10% em três doses por 30 dias, em comparação com o grupo sem ferida (G1)

Tratamentos	TGP (U/L)			$\gamma$ GT (U/L)			TGO (U/L)		
	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	66,0	± 2,79 A	0,0	14,7	± 1,01 A	0,0	113,4 A	± 5,21 A	0,0
G2 ração + ferida	113,8	± 10,11 B	+72,4	43,0	± 8,47 B	+192,1	154,1 A	± 51,00 A	+35,9
G3 ração + ferida + FE4 2,5%	114,0	± 10,18 B	+72,7	13,8	± 3,66 A	-6,0	227,8 A	± 118,11 A	+100,9
G4 ração + ferida + FE4 3%	117,5	± 15,22 B	+78,0	12,5	± 2,43 A	-15,1	200,8 A	± 105,91 A	+77,1
G5 ração + ferida + FE4 10%	147,5	± 28,57 B	+123,5	16,2	± 2,32 A	+9,8	194,7 A	± 38,73 A	+71,7
G6 ração + ferida + FE5 10%	143,7	± 29,90 B	+117,7	13,3	± 1,37 A	-9,4	179,8 A	± 52,03 A	+58,6
G7 ração + ferida + FE5 1%	123,8	± 15,43 B	+87,6	14,5	± 1,05 A	-1,5	118,2 A	± 5,85 A	+4,2
G8 ração + ferida + Acheflan <sup>®</sup>	162,7	± 31,01 B	+146,5	30,8	± 9,91 A	+250,0	203,7 A	± 108,00 A	+79,6

Acheflan<sup>®</sup> (fitoterápico da Aché/Phytomédisa); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo sem ferida (G1). FE4 2,5% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 2,5%; FE4 3% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 3%; FE4 10% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 10%; FE5 10% = fitoderivado com extrato de cinco plantas 10%; e FE5 1% = fitoderivado com extrato de cinco plantas 1%.

níveis de TGO são observados em doenças hepatobiliares, hepatites, cirrose, mononucleoses infecciosas, infarto do miocárdio, embolia pulmonar, pancreatite, gangrena e processos inflamatórios (GAW *et al.*, 2001).

A ALT, anteriormente denominada TGP (MEYER *et al.*, 1995), é uma enzima que catalisa a transferência do grupamento amina de um aminoácido para um cetoácido. Estudos realizados por Cadarian e colaboradores demonstraram que extratos de marcela (*Achyrocline satureioides*) na dose de 300 mg por quilo, por via oral, provocaram aumento na atividade de ALT e AST (TGP e TGO). Os autores parecem atribuir essa ação aos flavonoides presentes nesse extrato (KADARIAN *et al.*, 2002). Essa planta faz parte da formulação dos fitoderivados testados no experimento. Possivelmente, as substâncias contidas no extrato de marcela podem elevar os níveis de TGO e TGP no sangue dos coelhos tratados.

Com relação à atividade da  $\gamma$ GT, observou-se que apenas os grupos 2 e 8 tiveram os níveis dela aumentados. É possível que algum componente da formulação contendo os fitoderivados esteja diminuindo a produção desta enzima, reduzindo os níveis de  $\gamma$ GT no sangue dos coelhos.

Os níveis de TGO (AST) foram aumentados em todos os animais tratados, comparando-os com o grupo normal. O TGO é encontrado em altas concentrações no citoplasma e nas mitocôndrias das células do fígado, rins, pâncreas, músculos esquelético e cardíaco e também nos eritrócitos. Não é um indicador altamente específico de dano ao fígado (GAW *et al.*, 2001). Provavelmente nenhuma substância presente na formulação deve exercer qualquer efeito sobre os níveis de TGO nos coelhos tratados.

De acordo com os resultados da Tabela 10, observou-se que os grupos 8, 5 e 6 apresentaram maior aumento na atividade da TGP; no entanto, todos os tratamentos reduziram a atividade da  $\gamma$ GT, com exceção do grupo 8, que aumentou em 252,9% a atividade desta enzima. A gama glutamiltransferase ( $\gamma$ GT) está presente, principalmente, nas células epiteliais dos ductos renais e biliares (COLES; NAIDOO, 1987). A elevação de sua atividade sérica está relacionada com doenças hepáticas, especialmente aquelas que afetam o sistema de ductos biliares (COLES; NAIDOO, 1987).

Com relação à TGO, todos os tratamentos aumentaram a atividade desse parâmetro, com exceção do grupo 7, que reduziu em 23,3%.

Tabela 10 – Valores médios de TGP, GGT e TGO em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel do fitoderivado contendo extrato de quatro plantas nas concentrações de 2,5, 3 e 10% e do fitoderivado contendo extrato de cinco plantas nas concentrações de 1 e 10% em três doses por 30 dias, em comparação com o grupo não tratado (G2)

Tratamentos	TGP (U/L)			$\gamma$ GT (U/L)			TGO (U/L)		
	Média	$\Sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	66,0	± 2,79 B	-42,0	14,7	± 1,01 B	-65,8	113,4	± 5,21 A	-26,4
G2 ração + ferida	113,8	± 10,11 A	0,0	43,0	± 8,47 A	0,0	154,1	± 51,00 A	0,0
G3 ração + ferida + FE4 2,5%	114,0	± 10,18 A	0,2	13,8	± 3,66 B	-67,8	227,8	± 118,11 A	+47,8
G4 ração + ferida + FE4 3%	117,5	± 15,22 A	+3,3	12,5	± 2,43 B	-70,9	200,8	± 105,91 A	+30,3
G5 ração + ferida + FE4 10%	147,5	± 28,57 B	+29,6	16,2	± 2,32 B	-62,4	194,7	± 38,73 A	+26,3
G6 ração + ferida + FE5 10%	143,7	± 29,90 B	+26,2	13,3	± 1,37 B	-69,0	179,8	± 52,03 A	+16,7
G7 ração + ferida + FE5 1%	123,8	± 15,43 A	+8,8	14,5	± 1,05 B	-66,3	118,2	± 5,85 A	-23,3
G8 ração + ferida + Acheflan®	162,7	± 31,01 B	+43,0	151,8	± 9,91 B	+252,9	203,7	± 108,00 A	+32,2

Acheflan® (fitoterápico da Aché/Phytomédica); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo não tratado (G2). FE4 2,5% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 2,5%; FE4 3% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 3%; FE4 10% = fitoderivado com extrato de quatro plantas 10%; FE5 10%: fitoderivado com extrato de cinco plantas 10%; e FE5 1% = fitoderivado com extrato de cinco plantas 1%.

A AST, anteriormente denominada TGO (MEYER *et al.*, 1995), é uma enzima que catalisa a transaminação reversível da L-aspartato e  $\alpha$ -cetogluturato a oxalacetato e glutamato. Suas mais elevadas concentrações estão localizadas nas células musculares esqueléticas e nos hepatócitos (MEYER *et al.*, 1995).

A AST é uma enzima citoplasmática e mitocondrial presente em vários tecidos, como fígado, músculo esquelético e cardíaco (MEYER *et al.*, 1995). Os mesmos autores salientam que em todas as espécies domésticas a atividade de AST é alta no fígado; portanto, na lesão hepática aguda ou crônica a atividade sérica de AST está elevada.

## **5.2 Análise dos parâmetros hematológicos das feridas tratadas com as formulações de fitoderivados simples**

De acordo com os resultados da Tabela 11, todos os grupos apresentaram redução nos valores medidos de proteínas. Não se pode afirmar que as plantas foram as responsáveis por essa redução, pois isso pode ter ocorrido devido à hidrólise das proteínas quando os animais foram submetidos às feridas.

Com relação à albumina, pequenas reduções são consideradas importantes, uma vez que estas podem estar ligadas, transportando compostos bioativos presentes nas formulações. Estatisticamente, nenhuma das substâncias conseguiu minimizar essa perda de albumina pela lesão nos coelhos, se comparadas às do grupo normal. Além disso, como os níveis de proteínas também estão diminuídos, a albumina também teve seus níveis reduzidos.

Conforme os resultados obtidos na Tabela 12, os grupos G8' e G9', contendo em sua fórmula assa-peixe (30%) na concentração de 2 e 3% respectivamente, aumentaram os níveis de proteínas, em comparação com o grupo doente. Isso demonstra que a formulação contendo assa-peixe (2 e 3%), isolado das outras plantas (Tabela 12), pode conter substâncias que favoreçam o aumento dos níveis de proteínas totais no sangue.

Esse aumento não é observado na Tabela 6, mesmo contendo assa-peixe na sua formulação. Provavelmente, alguma substância, presente na formulação dos fitoderivados compostos, pode estar inibindo a substância ativa do assa-peixe quando este se encontra associado a outros fitoderivados (Tabela 6).

Tabela 11 – Valores médios de proteínas totais e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com creme contendo fitoderivados simples em diferentes concentrações. Tratamento em três doses durante 30 dias, comparadas com o grupo sem ferida (G1)

Tratamentos	Proteína (mg/dL)			Albumina (g/ dL)		
	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	86,6	± 5,02 A	0,0	4,4	± 0,12 A	0,0
G2 ração + ferida	71,2	± 4,01 A	-17,8	4,3	± 0,16 A	-2,3
G3' ração + ferida + marcela (30%) 3% creme	63,2	± 7,82 A	-27,0	4,0	± 0,54 A	-9,1
G4' ração + ferida + tanchagem 1% creme	66,5	± 17,56 A	-23,2	4,3	± 0,21 A	-2,3
G5' ração + ferida + tanchagem (30%) 2% creme	64,9	± 6,01 A	-25,1	3,8	± 0,96 A	-13,6
G6' ração + ferida + tanchagem 4% creme	70,0	± 3,99 A	-19,2	4,0	± 0,39 A	-9,1
G7' ração + ferida + assa-peixe (30%) 1% creme	64,0	± 1,91 A	-26,1	4,1	± 0,52 A	-6,8
G8' ração + ferida + assa-peixe (30%) 2% creme	72,5	± 7,33 A	-12,8	4,3	± 0,57 A	-2,3
G9' ração + ferida + assa-peixe (30%) 3% creme	72,3	± 7,33 A	-16,5	3,7	± 1,19 A	-15,9
G10' ração + ferida + bálsamo (30%) 1% creme	69,8	± 10,84 A	-19,4	4,3	± 0,36 A	-2,3
G11' ração + ferida + Acheflan®	66,8	± 7,51 A	-22,9	3,4	± 1,12 A	-22,7

Acheflan® (fitoterápico da Aché/Phytomédica); n = seis animais por grupo: Obs.: letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo sem ferida (G1).

Tabela 12 – Valores médios de proteínas totais e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel do fitoderivado (2,5%, 3% e 10%) contendo extratos de marcela, tanchagem, assa-peixe e bálsamo e do fitoderivado (1% e 10%) contendo extratos de marcela, tanchagem, assa-peixe, bálsamo e cânfora, em três doses por 30 dias, comparadas com o grupo não tratado (G2)

Tratamentos	Proteína (mg/dL)			Albumina (g/ dL)		
	Média	$\sigma$	%Var.	Média	$\sigma$	%Var.
G1 ração	86,6	± 5,02 A	+21,6	4,4	± 0,12 A	+2,3
G2 ração + ferida	71,2	± 4,01 A	0,0	4,3	± 0,16 A	0,0
G3' ração + ferida + marcela (30%) 3% creme	63,2	± 7,82 A	-11,2	4,0	± 0,54 A	-7,0
G4' ração + ferida + tanchagem 1% creme	66,5	± 17,56 A	-6,6	4,3	± 0,21 A	0,0
G5' ração + ferida + tanchagem (30%) 2% creme	64,9	± 6,01 A	-8,8	3,8	± 0,96 A	-11,6
G6' ração + ferida + tanchagem 4% creme	70,0	± 3,99 A	-1,7	4,0	± 0,39 A	-7,0
G7' ração + ferida + assa-peixe (30%) 1% creme	64,0	± 1,91 A	-10,1	4,1	± 0,52 A	-4,7
G8' ração + ferida + assa-peixe (30%) 2% creme	72,5	± 7,33 A	+1,8	4,3	± 0,57 A	0,0
G9' ração + ferida + assa-peixe (30%) 3% creme	72,3	± 7,33 A	+1,5	3,7	± 1,19 A	-14,0
G10' ração + ferida + bálsamo (30%) 1% creme	69,8	± 10,84 A	-2,0	4,3	± 0,36 A	0,0
G11' ração + ferida + acheflan	66,8	± 7,51 A	-6,2	3,4	± 1,12 A	-21,0

Acheflan® (fitoterápico da Aché/Phytomédis); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo não tratado (G2).

Apesar das variações nos níveis de albumina encontradas na Tabela 12, esses resultados não foram estatisticamente significativos.

Observa-se na Tabela 13 que as formulações contendo tanchagem (G5'e G6') e assa-peixe (G8'e G9') nas maiores concentrações apresentaram grande redução de cálcio.

O cálcio está relacionado ao processo de coagulação sanguínea. Numa lesão tecidual, o cálcio pode estar sendo solicitado pelas plaquetas para o processo de coagulação sanguínea. Possivelmente, algum componente presente na formulação dos fitoderivados pode estar facilitando a cicatrização, utilizando mais cálcio. Isso pode explicar um dos motivos pelos quais os níveis de cálcio dos grupos com feridas estão reduzidos nas Tabelas 13 e 14.

Além disso, proteínas como colágeno se ligam ao cálcio (BOGGIO *et al.*, 2009). Durante a formação de feridas a hidrólise de colágeno e elastina aumenta, devido à maior atividade da collagenase e elastase (BOGGIO *et al.*, 2009). Logo, menor quantidade de cálcio é demandada por essas proteínas.

Tabela 13 – Valores médios de cálcio em soro sanguíneo de coelhos tratados com creme contendo fitoderivados simples em diferentes concentrações. Tratamento em três doses durante 30 dias, em comparação com o grupo sem ferida (G1)

Tratamentos	Cálcio (mg/dL)		
	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	15,7	$\pm 0,25$ A	0,0
G2 ração + ferida	11,3	$\pm 0,38$ A	-28,0
G3' ração + ferida + marcela (30%) 3% creme	4,3	$\pm 3,48$ B	-72,6
G4' ração + ferida + tanchagem 1% creme	4,1	$\pm 4,37$ B	-73,9
G5' ração + ferida + tanchagem (30%) 2% creme	2,5	$\pm 2,93$ B	-78,0
G6' ração + ferida + tanchagem 4% creme	2,0	$\pm 3,50$ B	-87,3
G7' ração + ferida + assa-peixe (30%) 1% creme	5,7	$\pm 4,54$ B	-63,7
G8' ração + ferida + assa-peixe (30%) 2% creme	1,5	$\pm 2,89$ B	-90,4
G9' ração + ferida + assa-peixe (30%) 3% creme	1,0	$\pm 1,01$ B	-93,6
G10' ração + ferida + bálsamo (30%) 1% creme	3,5	$\pm 2,32$ B	-77,7
G11' ração + ferida + acheflan	13,3	$\pm 0,30$ A	-15,3

Acheflan® (fitoterápico da Aché/Phytomédica); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo sem ferida (G1).

Tabela 14 – Valores médios de cálcio em soro sanguíneo de coelhos tratados com creme contendo fitoderivados simples em diferentes concentrações. Tratamento em três doses durante 30 dias, em comparação com o grupo não tratado (G2)

Tratamentos	Cálcio (mg/dL)		
	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	15,7	$\pm 0,25$ A	+ 39,0
G2 ração + ferida	11,3	$\pm 0,38$ A	0,0
G3' ração + ferida + marcela 3% creme	4,3	$\pm 3,48$ B	-61,9
G4' ração + ferida + tanchagem 1% creme	4,1	$\pm 4,37$ B	-73,9
G5' ração + ferida + tanchagem 2% creme	2,5	$\pm 2,93$ B	-77,9
G6' ração + ferida + tanchagem 4% creme	2,0	$\pm 3,50$ B	-87,3
G7' ração + ferida + assa-peixe 1% creme	5,7	$\pm 4,54$ B	-63,7
G8' ração + ferida + assa-peixe 2% creme	1,5	$\pm 2,89$ B	-90,4
G9' ração + ferida + assa-peixe 3% creme	1,0	$\pm 1,01$ B	-91,2
G10' ração + ferida + bálsamo 1% creme	3,5	$\pm 2,32$ B	-69,0
G11' ração + ferida + acheflan	13,3	$\pm 0,30$ A	-15,3

Acheflan® (fitoterápico da Aché/Phytomédica); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente não tratado (G2).

Nas Tabelas 15 e 16 é possível observar que todos os grupos apresentaram aumento significativo nas atividades de TGP,  $\gamma$ GT e TGO. Isso pode indicar que as substâncias presentes em cada fitoderivado analisado tinham uma ação farmacológica, aumentando a produção dessas enzimas na corrente sanguínea. Da mesma forma que os níveis dessas enzimas apresentaram elevações no tratamento utilizando mistura dos fitoderivados (Tabelas 9 e 10), nas Tabelas 15 e 16 também houve esse aumento, demonstrando que, possivelmente, cada fitoderivado isoladamente testado foi capaz de produzir um efeito nos níveis enzimáticos (TGP,  $\gamma$ GT e TGO) no sangue dos coelhos.

### **5.3 Análise histopatológica da pele dos coelhos**

Para avaliação do processo de cicatrização, foram analisadas lâminas com cortes histológicos de pele da região da ferida. As lâminas foram confeccionadas a partir de corte transversal da epiderme dos coelhos, com 5  $\mu$ m de espessura, e coradas com hematoxilina-eosina.

No grupo normal, sem ferida (Figura 4), observou-se epiderme (a) constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, com graus de diferenciação dos queratinócitos. A derme (b) é formada de tecido conjuntivo, onde se distinguem duas camadas sem limites precisos: papilar e reticular. Ainda na derme, estão presentes glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos.

No grupo com ferida, não tratado (Figura 5), observou-se grande número de hemácias e aumento de neutrófilos; presença de edema significativo, infiltrado inflamatório misto, ocasionais focos de hemorragia e vasos hiperemiados; presença do tecido de granulação com fibrose, ectasia capilar e infiltrado inflamatório mononuclear difuso. É possível observar também uma desorganização da queratina (a) na parte mais externa (Figura 5(A)).

No grupo com ferida, tratado com o fitoderivado contendo 4 plantas 2,5% G3; (Figura 6 (A)), observou-se grande número de hemácias, aumento de neutrófilos e perda expressiva de queratina (a).

Na Figura 6 (B), grupo com ferida tratado pela formulação com o fitoderivado contendo quatro plantas 3%, observou-se a presença do tecido de granulação com fibrose, ectasia capilar e infiltrado inflamatório mononuclear difuso. Foi possível observar a presença de grande quantidade de queratina (b) provavelmente pela rápida reconstituição da ferida, possivelmente devido ao aumento da concentração da formulação, se comparada com a Figura 6 (A).

Tabela 15 – Valores médios de TGP, GGT e TGO em soro sanguíneo de coelhos tratados com creme contendo fitoderivados simples em diferentes concentrações. Tratamento em três doses durante 30 dias, em comparação com o grupo sem ferida (G1)

Tratamentos	TGP (U/L)			γGT (U/L)			TGO (U/L)		
	Média	σ	% Var.	Média	σ	% Var.	Média	σ	% Var.
G1 ração	135,7	± 51,2 A	0,0	8,8	± 0,90 A	0,0	113,4	± 5,21 A	0,0
G2 ração + ferida	152,3	± 56,1 A	+ 12,2	13,3	± 6,02 B	+51,1	154,1	± 51,0 A	+35,9
G3' ração + ferida + marcela 3% creme	188,5	± 75,35 B	+38,9	21,8	± 11,44 A	+147,7	230,0	± 117,1 A	+102,8
G4' ração + ferida + tanchagem 1% creme	190,3	± 139,65 B	+40,2	29,0	± 14,46 A	+229,5	118,1	± 5,87 A	+4,1
G5' ração + ferida + tanchagem 2% creme	220,7	± 72,90 B	+62,6	17,7	± 5,75 A	+101,1	201,5	± 105,9 A	+77,7
G6' ração + ferida + tanchagem 4% creme	162,7	± 49,85 B	+19,9	16,2	± 10,70 A	+84,1	199,1	± 105,0 A	+75,6
G7' ração + ferida + assa-peixe 1% creme	142,2	± 53,29 B	+4,8	17,5	± 7,82 A	+98,9	117,8	± 5,85 A	+3,8
G8' ração + ferida + assa-peixe 2% creme	207,2	± 7,20 B	+50,7	30,8	± 9,91 A	+250,0	193,4	± 37,1 A	+70,5
G9' ração + ferida + assa-peixe 3% creme	175,8	± 65,52 B	+29,5	46,2	± 54,33 B	+425,0	195,0	± 38,7 A	+71,9
G10' ração + ferida + bálsamo 1% creme	232,2	± 140,23 B	+71,1	27,7	± 18,09 A	+214,8	179,9	± 52,0 A	+58,6
G11' ração + ferida + acheflan	162,7	± 49,85 B	+19,9	30,8	± 9,91 A	+250,0	108,0	± 108,0 A	-4,8

Acheflan® (fitoterápico da Aché/Phytomédis); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo sem ferida (G1).

Tabela 16 – Valores médios de TGP, GGT e TGO em soro sanguíneo de coelhos tratados com creme contendo fitoderivados simples em diferentes concentrações. Tratamento em três doses durante 30 dias, em comparação com o grupo não tratado (G2)

Tratamentos	TGP (U/L)			$\gamma$ GT (U/L)			TGO (U/L)		
	Média	$\sigma$	%Var.	Média	$\sigma$	%Var.	Média	$\sigma$	%Var.
G1 ração	135,7	± 51,2 A	-10,9	8,8	± 0,90 A	-33,8	113,4	± 5,21 A	-26,4
G2 ração + ferida	152,3	± 56,1 A	0,0	13,3	± 6,02 B	0,0	154,1	± 51,0 A	0,0
G3 ração + ferida + marcela 3% creme	188,5	± 75,35 B	+23,8	21,8	± 11,44 A	+63,9	230,0	± 117,1A	+49,2
G4 ração + ferida + tanchagem 1% creme	190,3	± 139,65 B	+25,0	29,0	± 14,46 A	+118,0	118,1	± 5,87 A	-23,4
G5 ração + ferida + tanchagem 2% creme	220,7	± 72,90 B	+45,0	17,7	± 5,75 A	+33,1	201,5	± 105,9 A	+30,8
G6 ração + ferida + tanchagem 4% creme	162,7	± 49,85 B	+6,8	16,2	± 10,70 A	+21,8	199,1	± 105,0 A	+29,2
G7 ração + ferida + assa-peixe 1% creme	142,2	± 53,29 B	-6,6	17,5	± 7,82 A	+31,6	117,8	± 5,85 A	-23,6
G8 ração + ferida + assa-peixe 2% creme	207,2	± 7,20 B	+36,0	30,8	± 9,91 A	+131,6	193,4	± 37,1 A	+25,5
G9 ração + ferida + assa-peixe 3% creme	175,8	± 65,52 B	+15,4	46,2	± 54,33 B	+247,3	195,0	± 38,7 A	+26,5
G10 ração + ferida + bálsamo 1% creme	232,2	± 140,23 B	+52,4	27,7	± 18,09 A	+108,3	179,9	± 52,0 A	+16,7
G11 ração + ferida + acheflan	162,7	± 49,85 B	+6,8	30,8	± 9,91 A	+131,6	108,0	± 108,0 A	-29,9

Acheflan® (fitoterápico da Aché/Phytomédica); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo não tratado (G2).

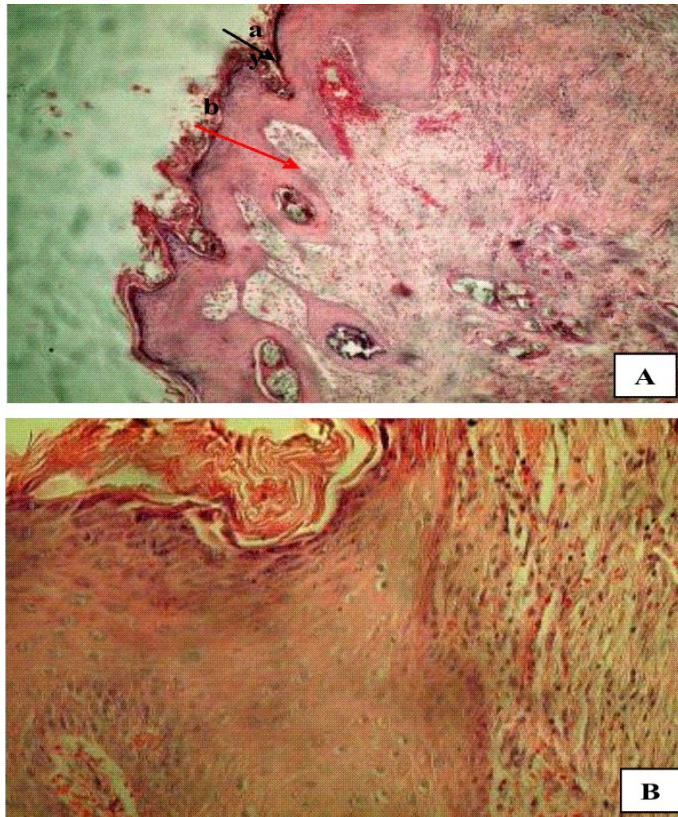


Figura 4 – Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo normal (G1). (A) aumento 10X; e (B) aumento de 40X.

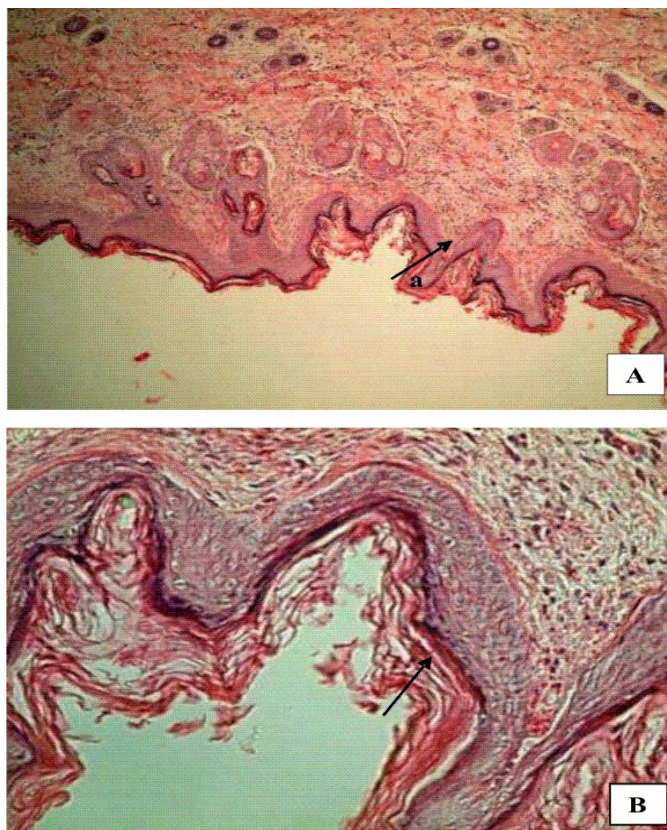


Figura 5 – Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo com ferida, não tratado (G2). (A) aumento de 10X; e (B) aumento de 40X.

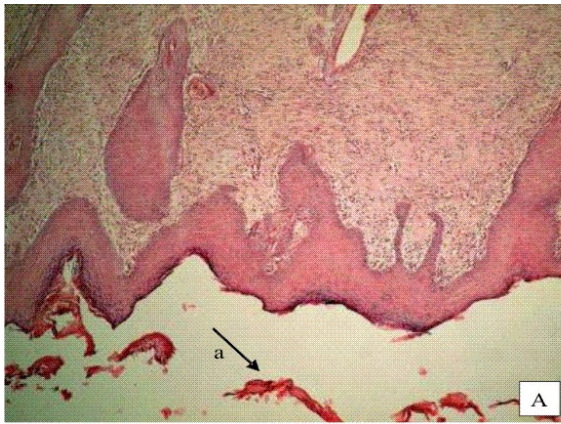


Figura 6 (A) – Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com o fitoderivado contendo quatro plantas 2,5% (G3). Aumento de 10X.

Figura 6B – Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com o fitoderivado contendo quatro plantas 3% (G4). Aumento de 10X.

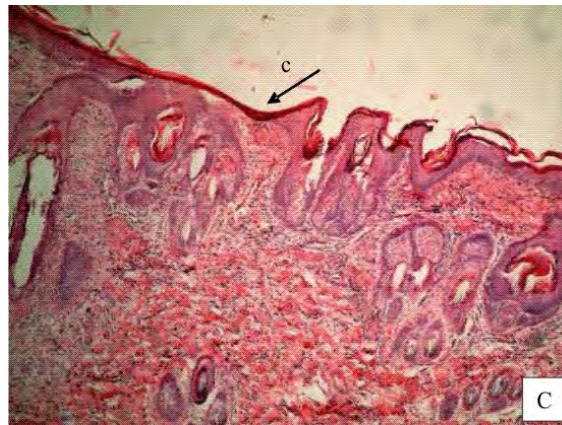


Figura 6 (C) – Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com o fitoderivado contendo quatro plantas 10% (G5). Aumento de 10X.

Na Figura 6 (C), grupo com ferida tratado pela formulação com o fitoderivado contendo quatro plantas 10%, observou-se a presença do tecido de granulação com fibrose, ectasia capilar e infiltrado inflamatório mononuclear difuso. Foi possível observar também a reconstituição da queratina mais aderida à epiderme (c), demonstrando possivelmente uma reconstituição mais rápida, se comparada à das Figuras 6 (A) e 6 (B).

Na Figura 7 (A), grupo com ferida tratado pela formulação com o fitoderivado contendo cinco plantas 10%, observou-se a presença do tecido de granulação com fibrose, ectasia capilar e infiltrado inflamatório mononuclear difuso. Constatou-se grande quantidade de queratina mais próxima à epiderme (a), demonstrando que a formulação



Figura 7 (A) – Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com o fitoderivado contendo cinco plantas 10% (G6). Aumento de 10X.

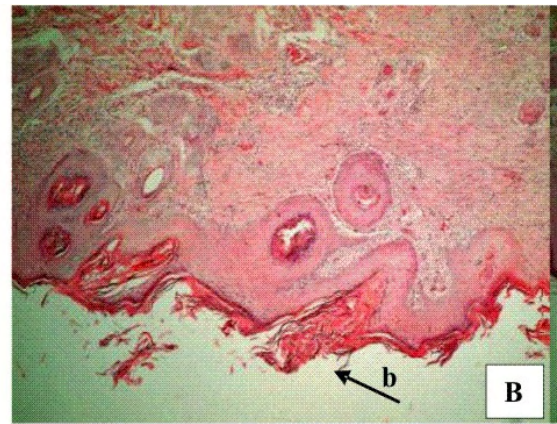


Figura 7 (B) – Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com o fitoderivado contendo cinco plantas 1% (G7). Aumento de 10X.

com o fitoderivado contendo cinco plantas numa concentração mais elevada conseguiu reconstituir a queratina mais rapidamente e de maneira mais ordenada que as outras concentrações. Provavelmente a cânfora, presente apenas na formulação com o fitoderivado contendo cinco plantas, pode estar ajudando no processo de remodelamento da ferida e, assim, numa melhor reconstituição.

Na Figura 7 (B), grupo com ferida tratado pela formulação com o fitoderivado contendo cinco plantas 1%, observou-se a presença do tecido de granulação com fibrose, ectasia capilar e infiltrado inflamatório mononuclear difuso. A baixa concentração da formulação com o fitoderivado contendo cinco plantas 1% foi capaz de produzir queratina, ainda que de forma desordenada (b). Isso pode estar relacionado com a presença da cânfora na formulação.

Na Figura 8, representativa do grupo 8, tratado com Acheflan®, observou-se predomínio de fibras colágenas em detrimento do elemento celular na derme, fibras colágenas adjacentes ao epitélio e alguns leucócitos esparsos. No epitélio, verificou-se maior formação de fibras colágenas e algumas células mononucleadas difusamente distribuídas, bem como hiperqueratose, inúmeros vasos congestos e focos de infiltrado inflamatório distribuídos na derme. A queratina estava aderida à epiderme de forma desordenada (a).

Na Figura 9, grupo com ferida tratado pela formulação com creme de marcela 3%, observou-se a presença do tecido de granulação com fibrose, ectasia capilar e infiltrado inflamatório mononuclear difuso. Também é possível observar a formação de queratinas, ainda que escassas e mais concentradas na epiderme (a).

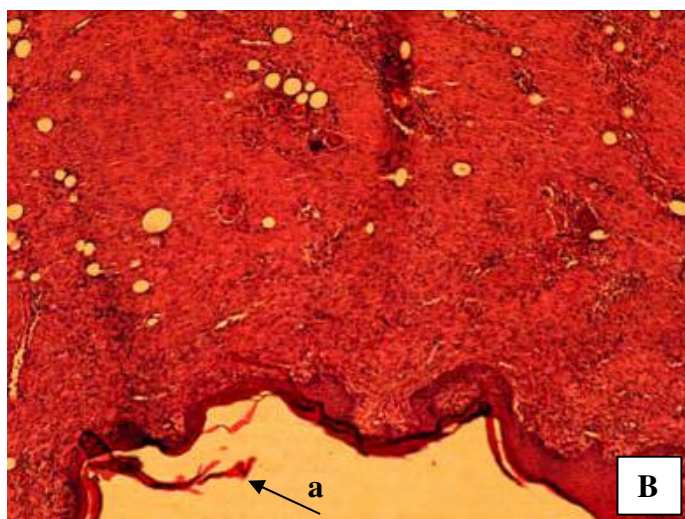


Figura 8 – Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo com ferida, tratado com Acheflan<sup>®</sup> (G8). Aumento de 10X.

Na Figura 10 (A), grupo com ferida tratado pela formulação com creme de tanchagem 1%, observou-se a presença do tecido de granulação com fibrose, focos de hemorragia, áreas de necrose, vários vasos sanguíneos hiper-hemiados e pequena quantidade de queratina de forma desordenada (a).

Na Figura 10 (B), grupo com ferida tratado pela formulação com creme de tanchagem 2%, foram observados tecido de granulação com fibrose, focos de hemorragia, áreas de necrose, vários vasos sanguíneos hiper-hemiados e um pequeno aumento na quantidade de queratina de forma mais organizada (b), se comparada à da Figura 16.

Na Figura 10 (C), grupo com ferida tratado pela formulação com creme tanchagem 4%, observou-se a presença do tecido de granulação com fibrose, focos de hemorragia, áreas de necrose, vários vasos sanguíneos hiper-hemiados e aumento na quantidade de queratina (c) se comparada à das Figuras 10 (A) e 10 (B). Isso pode estar relacionado ao aumento na concentração da formulação contendo tanchagem (4%).

Na Figura 11 (A), grupo com ferida tratado pela formulação de assa-peixe 1%, observou-se a presença do tecido de granulação com fibrose, focos de hemorragia, áreas de necrose, vários vasos sanguíneos hiper-hemiados e presença de queratina de forma desordenada (a).

Na Figura 11 (B), grupo com ferida tratado pela formulação com assa-peixe 2%, foram observados tecido de granulação com fibrose, focos de hemorragia, áreas de necrose, vários vasos sanguíneos hiper-hemiados e aumento da quantidade de queratina

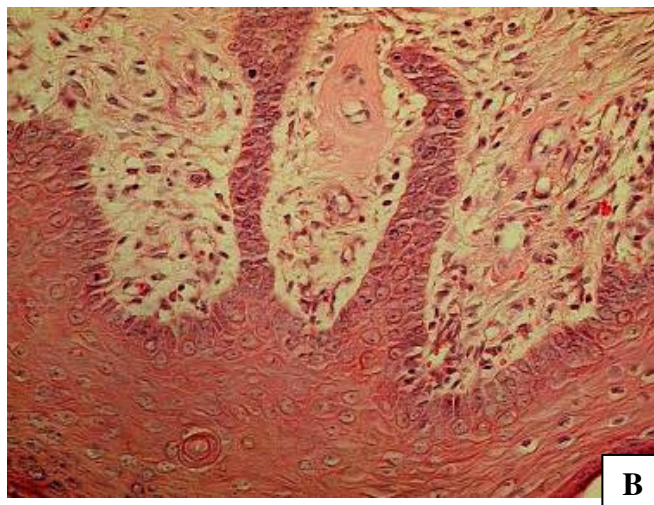
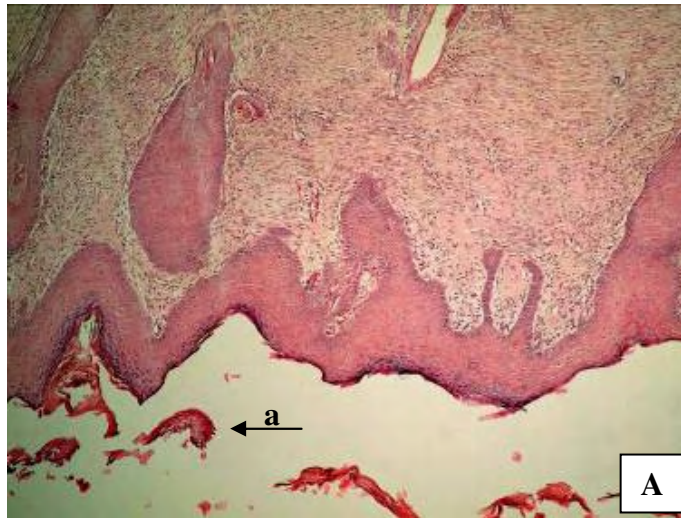


Figura 9 – Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo com ferida, tratado com creme de marcela 3% (G3'). (A) aumento de 10X; e (B) aumento de 40X.

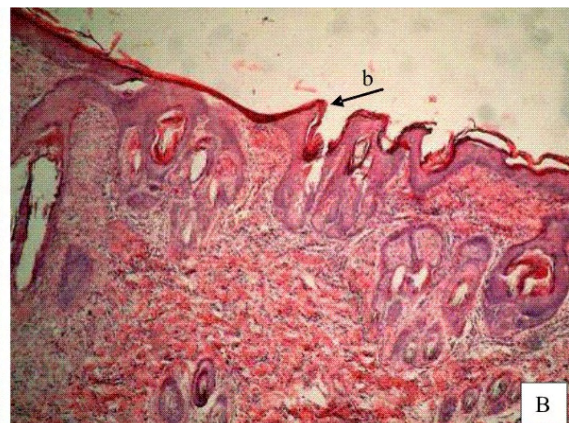
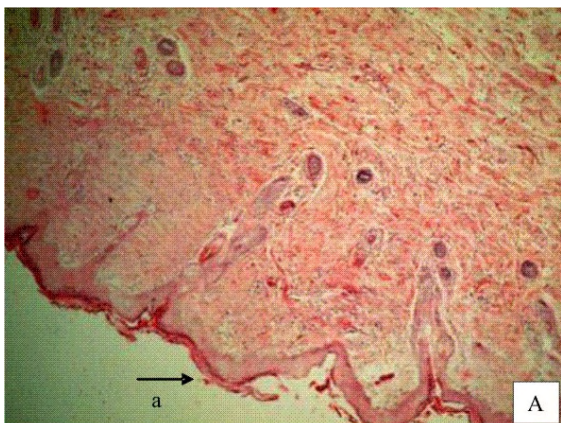


Figura 10 (A) – Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo de coelhos com ferida tratados com tanchagem 1% (G4'). (A) aumento 10X; e (B) aumento de de 40X.

Figura 10 (B) – Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com tanchagem 2% (G5'). Aumento de 10X.

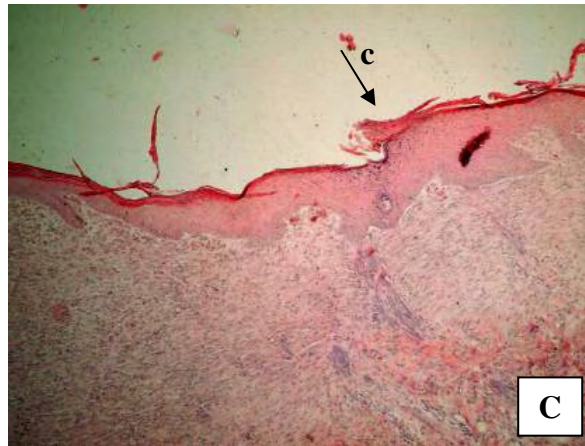


Figura 10 (C) – Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com tan-chagem 4% (G6'). Aumento de 10X.

(b) de forma mais organizada do que na Figura 11A e 11C. Isso pode estar relacionado ao aumento na concentração da formulação contendo assa-peixe.

Na Figura 11 (C), grupo com ferida tratado pela formulação de assa-peixe 3%, verificou-se a presença de tecido de granulação com fibrose, focos de hemorragia, áreas de necrose, vários vasos sanguíneos hiper-hemiados, bem como de queratina de forma desordenada (c). Isso pode estar relacionado com o aumento da concentração da formulação contendo assa-peixe, possivelmente pela produção de um efeito tóxico da planta para os tecidos.

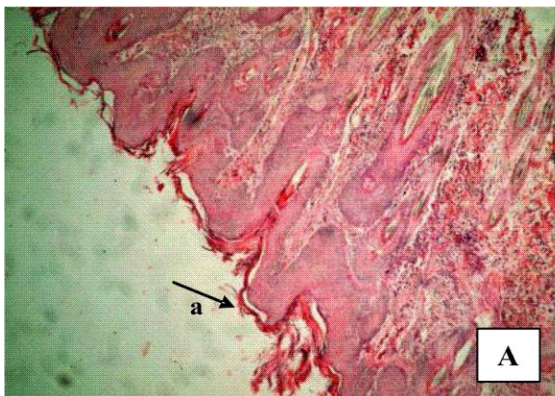


Figura 11 (A) – Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com assa-peixe 1% (G7'). Aumento de 10X.

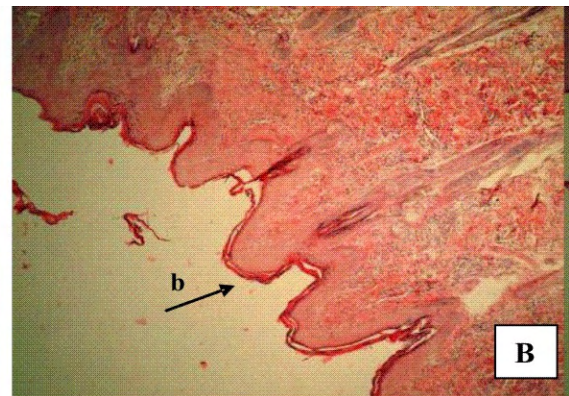


Figura 11 (B) – Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com assa-peixe 2% (G8'). Aumento de 10X.

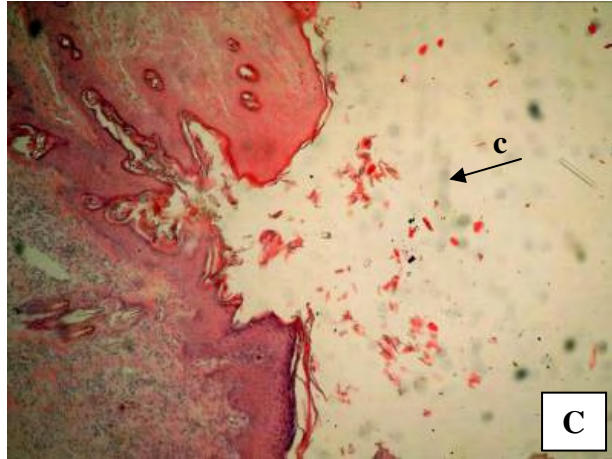


Figura 11 (C) – Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com assapeixe 3% (G9').

Na Figura 12, grupo com ferida tratado pela formulação de bálsamo 1%, observou-se a presença do tecido de granulação com fibrose, focos de hemorragia, áreas de necrose, vários vasos sanguíneos hiper-hemiados, bem como de queratina próxima à epiderme (a).

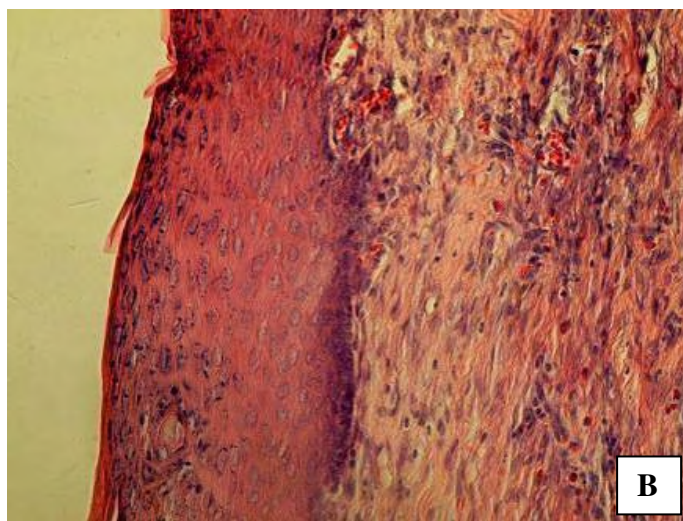
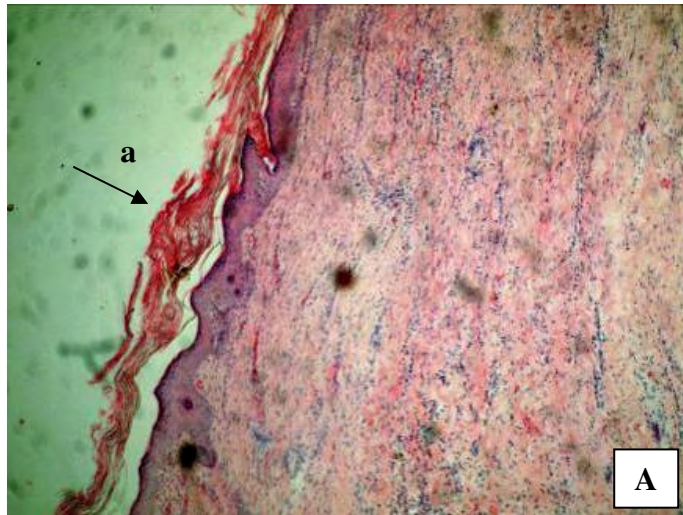


Figura 12 – Fotomicrografia de epiderme de coelhos com ferida tratados com bálsamo 1% (G10'). (A) aumento de 10X; e (B) aumento de 40X.

## 6. CONCLUSÃO

Na análise hematológica, conclui-se que o tratamento com o fitoderivado contendo cinco plantas 10% (grupo G6) foi o que apresentou aumento na concentração de proteína e albumina, elevação considerável na concentração de ferro e provocou a mais alta redução no nível de cálcio. Possivelmente essa concentração pode estar sendo tóxica para célula. Nesse tratamento também houve um aumento considerável em TGP e TGO e redução em GGT.

Nas formulações contendo as plantas isoladamente, as reduções nas proteínas foram menores que naquelas contendo quatro ou cinco extratos de plantas; no entanto, os níveis de cálcio apresentaram grande redução.

A formulação do fitoderivado contendo quatro plantas 3% teve melhor efeito anti-inflamatório. No tratamento com a formulação de fitoderivado contendo cinco plantas, os melhores resultados foram obtidos com o extrato a 10%, mostrados através da histologia.

A formulação de marcela 3% apresentou histologicamente melhor efeito anti-inflamatório (menor presença de células mortas). Em todas as fotomicrografias, observou-se que as plantas isoladamente não tiveram o mesmo efeito anti-inflamatório que a formulação de fitoderivados contendo quatro ou cinco plantas. Isso pode sugerir a ocorrência de um sinergismo entre as substâncias presentes nas plantas, as quais, em conjunto, promovem maior efeito terapêutico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBOYE, J. O.; ASIJE, W.; AWE, S. O. Diuretic and antidiuretic activity of the leaf extracts of *Vernonia cinerea* (less). **Phytoter. Res.**, v. 11, n. 6, p. 454-456, 1994.

AISSA, J.; HARRAN, H.; RABEAU, M.; BOUCHERIE, S.; BROUILHET, H. Tissue levels of histamine, PAF-acether and lysopaf-acether in carrageenan-induced granuloma in rats. **J. Inter. Arch. Allergy Immunol.**, v. 110, n. 2, p. 182-186, 1996.

ANDREÃO, A. Estudo do óleo essencial de *vernonia polyanthes*. In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA-MG, 8., 1999, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SBQ, 1999. p. 149.

ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; LAFON, L.; DAJAS, F. Cytoprotection by *achyrocline satureioides* (lam) d.c. and some of its main flavonoids against oxidative stress. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, n. 1, p. 13-20, 2004.

BABIOR, B. M. The leukocyte NADPH oxidase. **Israel Med. Assoc. J.**, v. 4, n. 11, p. 1023-1024, 2003.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **R. Bras. Ci. Farmac.**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BARBASTEFANO, V.; COLA, M.; LUIZ-FERREIRA, A.; FARIAS-SILVA, E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; SOUZA-BRITO, A. R. M. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs. **Fitoterapia**, v. 78, n.7/8, p. 545-551, 2007.

BARRINGTON, R. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. **Immunol. Rev.**, v. 180, p. 5-15, 2001.

BETTEGA, J. M.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V. L.; BARARDI, C. R.; SIMÕES, C. M. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. **Phyther. Res.**, v. 18, n. 10, p. 819-823, 2004.

BERNATCHEZ, S. F.; PARKS, P. J.; GRUSSING, D. M. Histological characterization of a delayed wound healing model in pig. **Wound Repair Reg.**, v. 6, n. 3, p. 223-333, 1998.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; GUPTA, R. K.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Hirsutinolides and other sesquiterpene lactones from *Vernonia species*. **Phytochemistry** v. 20, p.695-699, 1981.

BOGGIO, R F.; FREITAS, V. M.; PAGGIARO, A. O.; HERSON, M. R.; FERREIRA, M. C.; MACHADO, G. M. Estudo *in vitro* dos efeitos do bloqueador do canal de cálcio (verapamil) sobre a biossíntese e contração da matriz extracélular. **R. Bras. Cir. Plást.**, v. 24, n. 1, p. 91-95, 2009.

CARNEY, J. R.; KRENISKY, J. M.; WILLIAMSON, R. T.; LUO, J. Achyrofuran, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the South American medicinal plant *Achyrocline satureioides*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, n. 2, p. 203-205, 2002

CHEEKE, P. R. **Natural toxicants in feeds forages and poisonous plants**. 2.ed. London: Interstate Pubs., 1998.

CHOI, J. K. **Longevity way with traditional ethnopharmacology in Korea (tojong yakcho jangsubeob)**. Seoul: Taeil Publication, 1997. 255 p.

CHOU, T. C.; CHANG, L. P.; LI, C. Y.; WONG, C. S.; YANG, S. P. The antiinflammatory and analgesic effects of baicalin in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. **Anesth. Analg.**, v. 97, n. 6, p. 1724-1729, 2003.

CHU, J.; PRATICÒ, D. The 5-lipoxygenase as a common pathway for pathological brain and vascular aging. **Cardiovasc. Psychiatry Neurol.**, 2009:[online] Article ID 174657. p. 74-657.

CICCHETTI, G.; ALLEN, P. G.; GLOGAUER, M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 13, n. 3, p. 220-228, 2002.

COLES, P.; NAIDOO, D. The amicon ultrafiltration device evaluated for detection of myoglobinuria. **Clinical Chem.**, v. 33, n. 6, p. 1074-1075, 1987.

COSTA-NETO, E. M.; OLIVEIRA, M. V. M. The use of medicinal plants in the county of tanquinho, state of Bahia, northeastern Brazil. **R. Bras. Plantas Medic.**, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2000.

COUGHLIN, S. Thrombin signaling and protease-activated receptors. **Nature**, v. 407, p. 258-269, 2000.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical Scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (lam.) D.c. ("marcela"). **Bras. J. Medical Biol. Res.**, v. 31, n. 9, p. 1163-1170, 1998.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutics drugs. **Life Sci.**, v. 65, n. 4, p. 337-53, 1999.

DINARELLO, C. A. Cytokines as endogenous pyrogens. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. 294, 1999 (Suppl., 2).

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunol. Today**, v. 18, n. 10, p. 487-492, 1997.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Generalidades e métodos**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

FERRARO, G. E.; NORBEDO, C.; COUSSIO, J. D. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2053-2054, 1981.

FERREIRA, A. S.; MOREIRA, V. B.; RICARDO, H. M.; COUTINHO, R.; GABETTO, J. M.; MARCHIORI, E. Progressive massive fibrosis in silica-exposed workers. High-resolution computed tomography findings. **J. Bras. Pneumol.**, v. 32, n. 6, p. 523-528, 2006.

FLOWER, R. J. The development of COX<sub>2</sub> inhibitors. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 179-191, 2003.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales: el dioscórides renovado**. Madri: Editorial Labor, 1993. v. 3.

FRUTUOSO, V. S.; GURJÃO, M. R.; CORDEIRO, R. S.; MARTINS, M. A. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. **Planta Med.**, v. 60, n. 1, p. 21-25, 1994.

GAW, A.; COWAN, R. A.; O'REILLY, D. S. J.; STEWART, M. J.; SHEPHERD, J. **Bioquímica clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001.

GELFAND, G.; EWAPPAJOSYULA, S. L.; MEEVES, S. Antiinflammatory activity of h<sub>1</sub>-receptor antagonists: review of recent experimental research. **Curr. Med. Res. Opin.**, v. 20, n. 1, p. 73-81, 2004.

GONZALEZ, C. F.; PROVIN, E. M.; ZHU, L.; EBBOLE, D. J. Independent and synergistic activity of synthetic peptides against thiabendazole-resistant fusarium sambucinum. **Phytopathology**, v. 92, n. 8, p. 917-24, 2002.

HE, W. J.; LIU, W. Y. Cinnamomin: a multifunctional type II ribosome-inactivating protein. **Inter. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 35, n. 7, p. 1021-1027, 2003.

HENSON, P. M. The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. II. Mechanisms of release during phagocytosis, and adherence to nonphagocytosable surfaces. **J. Immunol.**, v. 107, n. 6, p. 1547-1557, 1971.

HUNTER, J. **A treatise of blood, inflammation, and gunshot wounds**. London: J. Nicoli, 1974. v. 1.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical Biol. Med.**, v. 30, n. 4, p. 433-446, 2001.

JORGE, S. A.; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2003. 351 p.

JONES, G. E. Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 68, n. 5, p. 593-602, 2000.

KADARIAN, C.; BROUSSALIS, A. M.; MINO O., J.; LOPEZ, P.; GORZALCZANY, S.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C. Hepatoprotective activity of *achyrocline satureioides* (lam) D. C. **Pharmacol. Res.**, v. 45, n. 1, p. 56-60, 2002.

KAPLAN, A. P. The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation. **Adv. Immunol.**, v. 66, p. 225-272, 1997.

KLEINIG, H. The role of plastids in isoprenoid biosynthesis. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.**, v. 40, n. 1, p. 39-59, 1989.

LEE, H. J.; HYUN, E.; YOON, W. J.; KIM, B. H. In vitro anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Cinnamomum camphora* extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 103, n. 2, p. 208-216, 2006.

LENTSCH, A. B.; WARD, P. A. Regulation of inflammatory vascular damage. **J. Pathol.**, v. 190, n. 3, p. 343-348, 2000.

LEURS, R.; CHURCH, M. K.; TAGLIALATELA, M. H<sub>1</sub> antihistamines: inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. **Clinical Exper. Allergy**, v. 32, p. 489-498, 2002.

LIMA, S. R. M.; CASCON, V.; PEREIRA, N. A. **Estudo dos efeitos da óleo-resina de copaíba sobre células de melanoma em camundongos**. REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 13., 1998. Caxambu. **Anais...** Caxambu: 1998. p. 391-392.

LISZEWSKI, M. K. Control of the complement system. **Adv. Immunol.**, v. 61, p. 201-283, 1996.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LUSCINSKAS, F. W.; GIMBRONE, M. A. J. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. **Ann. Rev. Med.**, v. 47, p. 234-247, 1996.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Educação Médica continuada. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte 1. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MAJNO, G. Chronic inflammation: links with angiogenesis and wound healing. **Am. J. Pathol.**, v. 153, n. 4, p. 1035-1039, 1998.

MARANDUBA, A.; OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, G. G.; REIS, J. E. P.; GOTTLIEB, O. R. Isoflavonoids from *Myroxylon peruiferum*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 815-817, 1979.

MEDEIROS, R.; PASSOS, G. F.; VITOR, C. E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T. L.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **Br. J. Pharmacol.**, v. 151, n. 5, p. 618-627, 2007.

MEYER, O.; KAISER, P.; HAIM, T., EDGELL, C. J.; PASQUIER, C.; DE BANDT, M.; BRIDEY, F.; SELLA, H.; LANSAMAN, J, KAHN, M. F. Anti-vascular endothelial cell antibodies (AECA): comparison of two assay methods and clinical applications. **Rev. Rhum. Engl. Ed.**, v. 62, n. 11, p. 737-747, 1995.

MIYAZAWA, M.; HASHIMOTO, Y.; TANIGUCHI, Y.; KUBOTA, K. Headspace. Constituents of the tree remain of *Cinnamomum camphora*. **Nat. Prod. Letters**, v. 15, n. 1, p. 63-69, 2001.

MILEWICZ, D. M.; URBÁN, Z.; BOYD, C. Genetic disorders of the elastic fiber system. **Matrix Biol.**, v. 19, n. 6, p. 471-480, 2000.

MILLER, M. C.; SOOD, A.; SPIELVOGEL, B. F.; HALL, I. H. The Hypolipidemic and anti-inflammatory activity of boronated aromatic amino acids in CF(1) Male Mice. **Met Based Drug**, v. 6, n. 6, p. 337-344, 1999.

MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens and collagen-related diseases. **Ann Med.**, v. 33, n. 1, p. 7-21, 2001.

MORQUIO, A.; RIVERA-MEGRET, F.; DAJAS, F. Photoprotection by topical application of *achyrocline satureioides* (marcela). **Phytother. Res.**, v. 19, n. 6, p. 486-490, 2005.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório – princípios e interpretações**. 5.ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.

MULLER, W. A. Migration of leukocytes across endothelial junctions: some concepts and controversies. **Microcirculation**, v. 8, n. 3, p. 181-193, 2001.

MURAKAMI, M.; KUDO I. Cellular arachidonate-releasing functions of various phospholipase A<sub>2</sub>. **Adv. Exper. Med. Biol.**, v. 525, p. 87-91, 2003.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 10, p. 2417-2423, 1997.

NIELSEN, H. **Lægeplanter og trolddomsurter**. København: Politikens Forlag, 1969. p. 321-324.

OHSHIMA, H.; YOSHIE, Y.; AURIOL, S.; GILIBERT, I. Antioxidant and prooxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, 75 peroxy nitrite and nitroxyl anion. **Free Radical Biol. Med.**, v. 25, n. 9, p. 1057-1065, 1998.

OHSAKI, A.; JUNKO TAKASHIMA, B.; NORIKO CHIBA, B.; KAWAMURA, M. Microanalysis of a selective potent *anti-helicobacter pylori* compound in a Brazilian Medicinal Plant, *Myroxylon peruiferum* and the activity of Analogues Bioorganic & Medicinal. **Chem. Letters**, v. 9, n. 8, p. 1109-1112, 1999.

OLIVEIRA, A. B.; MADRUGA, M. I. L. M.; GOTTLIEB, O. R. A new pentacyclic triterpene isolated from *Myroxylon balsamum*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 593-596, 1978.

PAIVA, A. A.; RONDO, P. H. C.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **R. Saúde Pública**, v. 34, n. 4, p. 421-426, 2000.

PEERSCHKE, E. I.; YIN, W.; GHEBREHIWET, B. Platelet mediated complement activation. **Adv. Exper. Med. Biol.**, v. 632, n. 1, p. 81-91, 2008.

POLYDORO, M.; DE SOUZA, K. C. B.; ANDRADES, M. E.; DA SILVA, E. G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOLA, F.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sci.**, v. 74, n. 23, p. 2815-2826, 2004.

RATTY, A. K.; DAS, N. P. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. **Biochem. Med. Metab. Biol.**, v. 39, n. 1, p. 69-79, 1988.

REPKA-RAMIREZ, M. S.; BARANIUK, J. N. Histamine in health and disease. **Clin. Allergy Immunol.**, v. 17, n.1, p.1-25, 2002.

REYNOLDS, H. R.; BUYON, J.; KIM, M.; RIVERA, T.; IZMIRLY, P.; TUNICK, P.; CLANCY, R. M. Association of plasma soluble E-selectin and adiponectin with carotid plaque in patients with systemic lupus erythematosus. **Atherosclerosis**, [online] 2009. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009

RIDKER, P. M. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. **Circulation**, v. 107, p. 363, 2003.

RISO, P.; VISIOLI, F.; GARDANA, C.; GRANDE, S.; BRUSAMOLINO, A.; GALVANO, F.; GALVANO, G.; PORRINI, M. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 941-947, 2005.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. 2.ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 156 p.

ROSSATO, S. C. **Utilização de plantas por populações do litoral norte do estado de São Paulo**. 1996. 198 f.. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

ROBBINS, V. K.; COTRAN, N. R. **Pathologic basis of disease**. 7.ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. p. 253-259.

RYAN, A.; GODSON, C. Lipoxins: regulators of resolution. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 10, n. 2, p. 166-72, 2010.

SAMUELSEN, A. B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of plantago major L. A review. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, n. 1, p. 1-21, 2000.

SHIPOCHLIEV, T.; DIMITROV, A.; ALEKSANDROVA, E. Anti-inflammatory action of a group of a group of plant extracts. **Vet. Med. Nauki**, v. 18, n. 1, p. 87-94, 1981.

SILVEIRA, R. R.; 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, p.127–131, 2003.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J. P.; WILLIAMS, R. J.; CADENAS, E.; RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiol. Aging**, v. 23, n. 5, p. 861-880, 2002.

SERHAN, C.N. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. **J. Exper. Med.**, v. 196, n. 8, p. 1.025-1037, 2002.

SEVERINI, C. The tachykinin peptide family. **Pharmacol. Rev.**, v. 54, n.2, p. 285-322, 2002.

SILVA, I.; FRANCO, S. L.; MOLINARI, S. L.; CONEGERO, C. I.; MIRANDA NETO, M. H.; CARDOSO, M. L. C.; SANTANA, D. M. G.; IWANKO, N. S. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. 3.ed. Cascavel: Assoeste, 1995. 203 p.

SIMÕES, C. M. O. **Investigação químico-farmacológica de achyrocline Satureioides (lam.) Dc. Compositae (marcela)**. 1984. 186 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1984.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (lam.) D.c. Compositae. **J. Ethnopharmacol.**, v. 22, n. 3, p. 281-293, 1998.

TANAKA, I. Glucocorticoid-induced osteoporosis, up to date. **Clin Calcium**, v. 13, n. 8, p. 1043-1046, 2003.

TOMASEK, J. J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat. Rev. Molec. Cell. Biol.**, v. 3, n. 5, p. 349-363, 2002.

THEIL, E. C. Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism. **J. Nutr.**, v. 133, p. S1549-S1553, 2003.

VILELA, B. J.; CARVALHO, L. C.; AMÂNCIO, S. Integration of stress produced reactive oxygen species in the stomatal regulation of micropropagated *Vitis vinifera* L. plantlets impaired in aba signaling. **Plant Signal Behav.**, v. 3, n. 8, p. 558-559, 2008.

WAXLER, B.; RABITO, S. F. Aprotinin: a serine protease inhibitor with the therapeutic actions: its interaction with ace inhibitors. **Curr. Pharm. Design**, v. 9, n. 9, p. 777-787, 2003.

WEISSMAN, G. **Inflammation**: historical perspectives. New York: Raven Press, 1992. 2 p.

WIESE, H.; KOPPENHOFER, E. On the capacity current in myelinated nerve fibres. **Gen. Physiol. Biophys**, v. 2, n. 4, p. 297-312, 1983.

YAMAMOTO, N.; MOON, J.; TSUSHIDA, T.; NAGAO, A.; TERAOKA, J. Inhibitory effect of quercetin metabolites and their related derivatives on copper ion- Induced lipid peroxidation in human low-density lipoproteins. **Arch. Biochem. Biophysics**, v. 372, n. 2, p. 347-54, 1999.

XU, Y. Z.; LIU, W. Y. Effects of the active aldehyde group generated by RNA *N*-glycosidase in the Sarcin/Ricin domain of rat 28S ribosomal RNA on peptide elongation. **Biol. Chem.**, v. 381, n. 2, p. 113-119, 2000.

## **CAPÍTULO 2**

### **EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E CICATRIZANTE DO FLAVONOIDE HESPERIDINA EM FERIDAS DE COELHOS**

#### **1. INTRODUÇÃO**

A inflamação é um complexo de alterações sequenciais no tecido e ocorre em resposta à lesão. Ela costuma ter três fases: inflamação aguda, resposta imune e inflamação crônica. A inflamação aguda refere-se à resposta inicial à lesão tecidual; é mediada pela liberação de substâncias como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos e, em geral, precede o desenvolvimento da resposta imune. Essas substâncias, em especial a histamina, aumentam o fluxo sanguíneo local e também a permeabilidade dos capilares venosos, o que permite que grandes quantidades de líquido e de proteína sejam transportadas da circulação para os tecidos, resultando em edema localizado (KATZUNG, 1998).

A resposta imune aparece quando as células imunologicamente competentes são ativadas em resposta a organismos estranhos ou substâncias antigênicas e liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica. A inflamação crônica envolve a liberação de diversos mediadores que não são proeminentes na resposta imune, entre os quais estão o interferon e interleucinas. Uma das condições mais importantes, associada a esses mediadores, é a artrite reumatoide, em que a inflamação crônica resulta em dor e destruição do osso e da cartilagem (GUYTON; HALL, 1997). Muitos dos efeitos anti-inflamatórios e cardiovasculares propostos por flavonoides e compostos fenólicos interferem no metabolismo final do araquidonato. Os produtos da ação das enzimas

cicloxygenase e lipoxigenase são as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, também denominados eicosanoides. Esses compostos são agentes homeostáticos, envolvidos na manutenção da integridade dos sistemas inflamatório, cardiovascular e renal. O desequilíbrio na homeostase de leucotrienos pode resultar em respostas inflamatórias com distúrbios respiratórios, como asma e rinite alérgica, artrite e desordens inflamatórias no intestino. Similarmente, um desequilíbrio na síntese de prostaglandinas pode levar a doenças cardiovasculares e renais, resultando em aterosclerose e derrames (FORMICA; REGELSON, 1995; HARBORNE; WILLIAMS, 2000.).

O ácido araquidônico é um constituinte dos fosfolipídeos de membrana e, por isso, a síntese dos eicosanoides inicia-se com a liberação desse ácido graxo, através de hidrólise, catalisada por fosfolipases específicas (GUYTON; HALL, 1997). Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos aos flavonoides, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídeos e a agregação de plaquetas, bem como de ativar sistemas de enzimas, incluindo cicloxygenases e lipoxigenases.

Grande parte dos efeitos biológicos protetores dos flavonoides pode ser atribuída às suas habilidades sequestradoras de radicais livres e sua capacidade de transferir elétrons para radicais livres através da formação de radicais fenoxil de baixa reatividade (ZHOU, ZENG, 1991; COTELLE *et al.*, 1992; FERRALI *et al.*, 1997; ARORA *et al.*, 1998). Outra propriedade importante de alguns flavonoides é a de quelar metais de transição, como o ferro, suprimindo a geração de radicais hidroxila por meio da reação de Fenton (ARORA *et al.*, 1998). Flavonoides também podem inibir a lipoperoxidação através da restrição do acesso de oxidantes às membranas (VERSTRAETEN *et al.*, 2003).

Um estudo avaliou a capacidade antioxidante de diferentes compostos, entre eles a hesperidina, naringina, naringenina, quercetina e rutina, frente aos danos causados pelo alcaloide apomorfina, utilizando como sistema biológico células eucarióticas da levedura *S. cerevisiae* (SOARES *et al.*, 2005).

A investigação dos efeitos anti-inflamatórios da hesperidina torna-se importante no presente estudo, já que existem poucas pesquisas realizadas com o composto para esse efeito farmacológico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Flavonoides

Os flavonoides foram descobertos em 1930 por Szent-György (prêmio Nobel), que extraiu a citrina da casca do limão, possuindo esta substância a capacidade de regulação da permeabilidade dos capilares. Assim, essa classe de produtos naturais foi inicialmente denominada de vitamina P (de permeabilidade) e também de vitamina C<sub>2</sub>, visto que algumas das substâncias apresentavam propriedades semelhantes às da vitamina C. Contudo, dada a não confirmação dessas substâncias como vitaminas, essa classificação foi abandonada em 1950 (MARTINEZ-FLORES *et al.*, 2002).

São compostos polifenólicos de origem bio-sintética, com o mesmo núcleo fundamental: um esqueleto benzopirâmico. De acordo com as características estruturais os dividem em flavonas, flavononas, dihidroflavonois, chalconas, antocianosídeos, isoflavonoides e derivados flavonoicos. Alguns autores preferem separar os derivados flavônicos em antocianosídeos e isoflavonoides e, assim, conservar o nome flavonoide para o resto dos grupos. Trata-se de metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal. Até o momento já foram descritas mais de 8.000 moléculas pertencentes a esse grupo, entretanto anualmente novas estruturas têm sido identificadas (SETCHELL; CASSIDY, 1999).

Esses compostos podem ser definidos como uma classe de metabólitos secundários de plantas, que derivam da condensação de uma molécula de ácido cinâmico com três grupos malonil-CoA (YILMAZ; TOLEDO, 2004).

Os flavonoides são pigmentos naturais presentes nos vegetais e desempenham um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, como, por exemplo, raios ultravioleta, poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, entre outros, e atuam também como agentes terapêuticos num elevado número de patologias, como arteriosclerose e câncer (MARTINEZ-FLORES *et al.*, 2002).

Em meados dos anos de 1980 ressurgiu o interesse por essas substâncias, empregando-se algumas de origem semissintética, obtidas a partir de flavonoides contidos em frutas cítricas (WANG, 2000). Assim, foram introduzidos na terapêutica compostos como diosmina, hidrosmina, troxrrutina, hesperidina-metil-chalcona, etc., indicados para o tratamento de insuficiências venosas causadoras de varizes, hemorroidas e outras patologias vasculares (WANG, 2000).

Pesquisas também descrevem outras atividades dos flavonoides cítricos em modelos experimentais e humanos, que incluem anticarcinogênicos, anti-hipertensivos, antiaterogênicos, antivirais e antialérgicos. Muitos desses efeitos resultam da modulação na formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO). Vários tipos de flavonoides são estudados, a fim de diminuir a produção de EROs, inibir enzimas associadas à formação de EROs: NADPH oxidase e mieloperoxidase (EDWARDS, 1996). Essas atividades antioxidantes dos flavonoides devem-se à sua capacidade de inibir o ácido araquidônico liberado pela membrana, inibir ciclooxigenase e lipoxigenase, inibir proteína quinases e diminuir a liberação de enzimas quinase dos lisossomos (SARTOR *et al.*, 2002).

Um importante contribuidor para as reações anti-inflamatórias são os neutrófilos polimorfonucleares (NPMs), pois estão envolvidos na formação das citocinas, na produção das enzimas lisossomais e formação dos EROs na cadeia respiratória. Quando os NPMs são recrutados aos tecidos inflamatórios fagocitários, uma cadeia de reações metabólicas começa nos receptores de membrana da bactéria e outros patógenos, seguidos pela ativação de proteína quinase C e indução de NADPH oxidase para reduzir o oxigênio em radicais superóxidos, na qual dentro das células irá metabolizar outros EROs. A apoptose de neutrófilos é modulada por diversos fatores, como lipopolissacarídeos de bactérias ou TNF- $\alpha$ , que atuam nas proteínas envolvidas na eliminação de células mortas (AKGUL *et al.*, 2001).

Estudos demonstraram que plantas contendo flavonoides têm um papel proapoptótico em células humanas, animais e cancerosas. Liu *et al.* (2005) afirmaram que a atividade antioxidante da quercetina deve ser responsável pela diminuição da atividade antiapoptótica de lipopolissacarídeos nos NPMs. Em outro estudo, Kuntz *et*

*al.* (1999) testaram vários flavonoides quanto as suas habilidades de induzir apoptose em células de câncer de cólon e descobriram que a flavona baicaleína e o flavonoide mircetina são capazes de induzir apoptose.

Os flavonoides constituem um dos maiores grupos de fitonutrientes que apresentam efeitos benéficos à saúde. Sabe-se que o suco de laranja natural possui quantidades apreciáveis desses compostos, como os flavonoides cítricos (quercetina, luteolina, mircetina, apigenina e rutina) ou as flavononas (hesperidina, naringenina e naringina), além da vitamina C, que apresentam ação antioxidante, vasoprotetora e hipocolesterolêmica (ERLUND, 2004; RISO *et al.*, 2005; USDA, 2006). Muitas das propriedades dos flavonoides cítricos podem estar relacionadas à habilidade de seus compostos inibirem enzimas que estão envolvidas na ativação celular. Estudos, *in vitro*, demonstraram a capacidade dessas substâncias de modificar a atividade de sistemas enzimáticos em mamíferos, como quinases, fosfoquinases, atpase, lipoxigenase, cicloxigenase e fosfodiesterases (LE MARCHEND, 2002).

## **2.2 Efeito de flavonoides sobre o metabolismo do ácido araquidônico**

Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos aos flavonoides, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídeos e a agregação de plaquetas e de ativar sistemas de enzimas, incluindo cicloxigenases e lipoxigenases. Esses efeitos são devido à sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions divalentes (BRODY, 1994).

Pesquisas realizadas por Lale e Herbert (1996) demonstraram que os flavonoides daidzeína, daidzina, pseudobaptigenina, karangina, himokiflavona e silibina apresentaram habilidade em inibir a atividade procoagulante de monócitos humanos. A produção deles é estimulada por endotoxina e interleucina e é possível realizar tais estudos *in vitro*. O fator tissular de coagulação sanguínea é uma glicoproteína, que inicia a coagulação sanguínea por formar um complexo com os fatores VII e VIIa. Em condições normais, as células endoteliais e monócitos não expressam atividade do fator tissular, embora este expresse a atividade da trombomodulina, que acelera a ativação de trombina catalisada pela proteína C, contribuindo, assim, para as propriedades anticoagulantes do endotélio. Em algumas situações patológicas, quando o endotélio ou os monócitos são expostos a mediadores inflamatórios, eles podem adquirir propriedades pró-coagulantes. Quando as células são estimuladas por compostos

inflamatórios, como endotoxina ou interleucina, podem alterar as propriedades antitrombóticas do endotélio, por reduzir a expressão do fator tissular e a regulação da trombomodulina, promovendo a coagulação sanguínea e trombose.

Flavonoides afetam uma grande variedade de enzimas, possuem atividade antioxidante, quelam alguns cátions metálicos, afetam a fosforilação de proteínas celulares, apresentam efeito inibitório na agregação plaquetária e nas funções dos leucócitos e possuem efeito protetor sobre as células endoteliais, o que sugere que são substâncias de grande interesse no desenvolvimento de inibidores e nas interações entre o sangue e as paredes dos vasos, que estão intimamente relacionadas com o processo de trombose (KATZUNG, 1998).

Além disso, investigações bioquímicas dos mecanismos da ação dos flavonoides têm mostrado que esses compostos inibem uma ampla variedade de sistemas enzimáticos. O ácido araquidônico é um importante ácido graxo que serve como precursor de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano e leucotrienos, os quais são potentes mediadores intracelulares, que controlam uma variedade de processos complexos no organismo. No passo intermediário da formação desses compostos, prostaglandina endoperóxidos (PGH<sub>2</sub> e PGG<sub>2</sub>) são formados pela ação da enzima prostaglandina endoperóxido sintetase, uma enzima com atividade de cicloxigenase (produzindo PGG<sub>2</sub> a partir de ácido araquidônico) e peroxidase (produzindo PGH<sub>2</sub> a partir de PGG<sub>2</sub>). Durante a atividade de peroxidase, radicais livres e orgânicos são produzidos, os quais dão origem à formação de intermediários reativos de oxigênio e peroxidação lipídica patológica (GALVEZ *et al.*, 1995).

A propriedade apresentada pelos flavonoides em inibir tanto a via da cicloxigenase quanto da 5-lipoxigenase no metabolismo do araquidonato pode contribuir para propriedades anti-inflamatórias.

Além disso, estudos têm mostrado que flavonoides aumentam a permeabilidade capilar e exercem efeito inibitório na exsudação de proteínas e migração de leucócitos. Flavonoides são conhecidos por mostrar propriedades antioxidantes, incluindo eliminação de radicais livres e prevenindo peroxidação de lipídeos (LANDOLFI *et al.*, 1984). Sabe-se que a peroxidação lipídica está intimamente relacionada com processos inflamatórios. A atividade antioxidante das antocianinas cianidina 3-O-β-n-glicosil-cianidina e cianidina foi testada por Tsudat *et al.* (1994), que usaram auto-oxidação do ácido linoleico, lipossomos, membranas de eritrócitos de coelho e sistemas microsossomais de fígado de rato. Essas substâncias apresentaram atividade antioxidante

em todos os sistemas avaliados. Os dados sugeriram que esses compostos podem exercer importante papel na peroxidação de membranas celulares, induzidas por radicais de oxigênio, ativos em sistemas vivos.

Motilva *et al.* (1994) estudaram o efeito protetor do flavonoide naringenina sobre lesões de mucosa gástrica, produzidas por etanol, e o envolvimento de prostaglandinas endógenas com tais lesões. As prostaglandinas parecem preservar a integridade microvascular e reduzir a subjacente congestão dos vasos sanguíneos.

Entretanto, nem todos os eicosanoides exercem efeito protetor sobre a mucosa gástrica. Os leucotrienos, potentes vasoconstritores, são gerados pela mucosa gástrica e têm sido ali identificados, particularmente, após o aparecimento de lesões causadas por etanol. Os leucotrienos exercem vários efeitos biológicos, como efeito vasoconstritor, que pode contribuir para o seu papel como mediador de lesões e isquemia dos tecidos (HOMMAM *et al.*, 2000).

Pesquisas recentes têm mostrado que inibição da síntese de leucotrienos foi acompanhada por diminuição de lesões da mucosa gástrica em diferentes modelos experimentais, incluindo úlceras gástricas, induzidas por etanol. Flavonoides podem interferir na produção de metabólitos do ácido araquidônico, por meio da inibição da enzima lipoxigenase, e reduzir a concentração de leucotrienos em diferentes sistemas biológicos. O efeito de proteção da mucosa gástrica, exercida pela naringenina, pode ser devido à regulação da liberação de substâncias vasoativas, como os leucotrienos. Ademais, radicais livres podem estar envolvidos na patogênese de lesões agudas da mucosa gástrica. Vários estudos têm mostrado que a naringenina atua como antioxidante, inibindo peroxidação lipídica (KAWAGUCHI *et al.*, 2004).

Os flavonoides extraídos de frutos cítricos (nobiletina) apresentaram efeito de supressão, na produção, e na expressão do gene responsável pela síntese de metaloproteínase 9/gelatinase em fibroblastos de coelhos (ISIHAWA *et al.*, 2000). Os ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas membranas das células, podem ser oxidados por peroxidação enzimática ou auto-oxidativa, mediante reações que envolvam radicais livres. Um excesso de radicais livres pode levar à reação em cadeia incontrolada e à peroxidação lipídica, resultando em patologias, que incluem aterosclerose e câncer. A peroxidação lipídica ocorre em três estágios: iniciação, propagação e terminação. No estágio de iniciação da peroxidação lipídica, ocorre interação do ácido graxo insaturado com o oxigênio, formando um radical lipídico. No estágio de propagação, o radical lipídico reage com oxigênio molecular, formando o

radical peroxila, que pode atacar outra molécula de lipídeo, formando mais radicais livres. No estágio de terminação, os radicais livres reagem com antioxidantes, formando produtos inertes. A peroxidação lipídica pode ser suspensa por inativação enzimática dos radicais livres pelos antioxidantes, que inibem o estágio de iniciação e, ou, aceleram o estágio de terminação (COOK; SAMMAN, 1996).

Pesquisas têm demonstrado que os flavonoides inibem a peroxidação lipídica, *in vitro*, no estágio de iniciação, por atuar como antioxidante, eliminando ânion superóxido e radicais hidroxilas. Tem sido proposto que flavonoides interrompem a reação em cadeia dos radicais livres, doando átomos de hidrogênio ao radical peroxila, formando um radical de flavonoide. O radical flavonoide, então, reage com o radical livre, terminando, assim, a propagação da reação em cadeia (COOK; SAMMAN, 1996).

Estudo realizado para avaliar o efeito de quercetina, rutina e cianidol sobre a peroxidação lipídica não enzimática demonstrou uma correlação positiva entre a atividade antitrombocítica dos flavonoides e a sua propriedade antioxidante. Os resultados mostraram, também, que esses compostos inibem a atividade da lipoxigenase, cicloxigenase e da fosfolipase A2 (PELZER *et al.*, 1998; GRYGLEWSKI *et al.*, 1987).

Galvez *et al.* (1995) avaliaram a atividade antiperoxidativa de vários flavonoides sobre a peroxidação de membrana de células de fígado de rato induzidas pelo sistema não enzimático (sistema ácido ascórbico-Fe<sup>2+</sup>) e pelo sistema enzimático (ácido araquidônico). Todos os flavonoides testados foram capazes de inibir a peroxidação lipídica induzida pelos dois sistemas (GALVEZ *et al.*, 1995). Com relação à peroxidação lipídica induzida pelo sistema ácido ascórbico-Fe<sup>2+</sup>, os flavonoides que apresentaram melhores resultados na inibição da peroxidação lipídica, em ordem decrescente, foram: epicatequina, luteolina, quercetina, catequina, delphinidina, kaempferol, apigenina e naringenina. Entretanto, quando a peroxidação lipídica foi induzida por ácido araquidônico, os flavonoides que mostraram melhores resultados, em ordem decrescente, foram: delphinidina, epicatequina, catequina, kaempferol, quercetina, luteonina, naringenina e apigenina.

O efeito anti-inflamatório de flavonoides, incluindo aqueles encontrados no chá, é explicado, em parte, pelo seu efeito inibitório sobre o metabolismo do ácido araquidônico. Os constituintes do chá, responsáveis pelas propriedades anti-inflamatórias e fortalecimento de capilares, incluem as catequinas e a rutina. Estudos mostraram que os flavonoides quercetina e catequina inibiram três aspectos da função

de neutrófilos humanos *in vitro*, que são considerados por contribuírem para o processo inflamatório: a liberação de enzimas lisossomais, a resposta à quimioluminescência e a produção de radicais livres (TIJBURG *et al.*, 1997; O'REILLY *et al.*, 2000). A atividade plaquetária está aumentada em pacientes com fatores de riscos coronarianos, como elevado nível de colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade), hipertensão, diabetes, consumo de cigarro. Os flavonoides quercetina e miricetina apresentaram forte efeito inibidor da agregação de plaquetas humanas, induzidos por ácido araquidônico e ADP (adenosina difosfato), mas não foram efetivos, quando a agregação plaquetária foi induzida por colágeno. Em um modelo de agregação *in vitro*, quercetina e rutina foram capazes de dispersar trombos plaquetários pré-formados, que foram aderidos ao endotélio da aorta de coelho (HOMMAM *et al.*, 2000).

O efeito antioxidante dos flavonoides parece estar relacionado, neste estudo, com sua ação antitrombótica. A ação antitrombótica e vasoprotetora de quercetina, rutina e outros flavonoides tem sido atribuída à sua habilidade de ligar-se à membrana de plaquetas e eliminar radicais livres. Por sua ação antioxidante, os flavonoides restabelecem a biossíntese e ação de prostaciclina endotelial e fator de relaxamento derivado do endotélio, os quais são inibidos pelos radicais livres (LALE; HERBERT, 1996). Um dos mais potentes mecanismos, pelo qual os flavonoides inibem a agregação plaquetária, é mediar o aumento dos níveis de AMPc (adenosina de monofostato cíclico) plaquetário através da estimulação da atividade da enzima adenilatociclase ou por inibição da fosfodiesterase do AMPc (COOK; SAMMAN, 1996). Estudos têm mostrado que algumas flavonas atuam como um agente antiagregante, inibindo a atividade da enzima cicloxigenase de plaquetas humanas. Landolfi *et al.* (1984) descreveram o efeito de vários flavonoides sobre a agregação plaquetária, bem como sobre adenosina<sup>3'</sup>, 5'-monofosfato cíclico e metabolismo do ácido araquidônico. As flavonas crisina, apigenina e fioretina inibiram a agregação plaquetária, por inibirem a via da cicloxigenase. A inibição da cicloxigenase pode ser devida a um aumento do AMPc. Em adição, crisina e apigenina reduziram o AMPc plaquetário em resposta a PGI<sub>2</sub>, efeito, provavelmente, mediado pela inibição da adenilatociclase. Contudo, os flavonoides miricetina e quercetina aumentaram o AMPc plaquetário – aumento este induzido por PGI<sub>2</sub> (prostaglandina). A potencialização do efeito da PGI<sub>2</sub> sobre os níveis de AMPc pela quercetina pode ser devido à inibição da fosfodiesterase. O efeito oposto, exercido por diferentes flavonoides sobre a resposta do AMPc, induzida por PGI<sub>2</sub>, pode ser em decorrência da inibição preferencial da fosfodiesterase ou adenilato

ciclase. É possível sugerir que a inibição da cicloxigenase desempenha um papel importante sobre o efeito da inibição da agregação plaquetária exercido pelos flavonoides apigenina, crisina e floretina – inibição devida a um aumento do AMPc (COOK; SAMMAN, 1996).

Outra ação dos flavonoides está relacionada com a liberação de ácido araquidônico dos fosfolípídeos, presentes nas membranas celulares, por ação da fosfolipase A2. Alguns trabalhos têm mostrado que a quercetina inibe a fosfolipase A2 de leucócitos, em coelhos e humanos (LANDOLFI *et al.*, 1984). Os flavonoides inibem, também, a síntese de eicosanoides por meio da inibição da atividade das enzimas lipoxigenase e cicloxigenase, bem como pela inibição da peroxidação não enzimática de ácidos graxos, poli-insaturados, que também atuam na ativação dessas oxigenases (KINSELLA, 1991).

As antocianinas, um dos tipos de flavonoides, também possuem eficácia anti-inflamatória, e o seu consumo tem demonstrado ação farmacológica em artrites e gotas. Essas antocianinas foram testadas, assim como suas agliconas, cianidinas por sua habilidade em inibir a enzima prostaglandina endoperóxido de hidrogênio sintase 1 e 2 (WANG *et al.*, 1999).

Pesquisas têm demonstrado que flavonoides ligados a grupos prenila também apresentam efeito inibidor sobre as enzimas cicloxigenase e lipoxigenase, demonstrando, assim, seu mecanismo de ação como anti-inflamatório (CHI *et al.*, 2001).

Também os efeitos de flavonoides e lignanas, presentes em Saiboku-to, uma planta da medicina chinesa, demonstraram ação sobre inibição da asma e liberação de leucotrienos (HOMMAM *et al.*, 2000). O flavonóide quercetina exibe efeito sobre o endotélio, liberação de prostaciclina e ativadores do plasminogênio em culturas de células endoteliais humanas (ZHAO *et al.*, 1999). O flavonoide gnafohina (flavonol produzido pela planta *Helichrysum picardii*) tem efeito inibidor sobre a geração de eicosanoides de leucócitos (PUERTAR *et al.*, 1999). Plantas como *Tanacetium parthenium* e *T. vulgare* possuem flavonoides com ação anti-inflamatória (WILLIAMS *et al.*, 1999). Também a planta *Scutellaria radix* possui o flavonoide wogonina, que atua na supressão da cicloxigenase 2 e na indução da síntese da oxidonitricossintase em culturas de células (CHI *et al.*, 2001).

Flavonoides, como a apigenina e a quercetina, exibem atividade anti-inflamatória e apresentam inibição no crescimento de fibroblastos em concentrações

variando de 0,01 a 100 mg/mL. Durante os processos inflamatórios, os fibroblastos têm papel importante na granulação e formação do tecido e interagem com o sistema imune. A inibição de crescimento de fibroblastos por flavonoides, como, por exemplo, a apigenina, pode ser benéfica para o tratamento de injúrias (KOGANOV *et al.*, 1999).

### **2.3 Composto em estudo: hesperidina**

A hesperidina, encontrada quase que exclusivamente nos sucos cítricos, reduz o colesterol e os triglicérides do plasma, inibe a taxa de oxidação da LDL e o crescimento da placa ateromatosa, tanto em animais experimentais como no ser humano (MONFORTE *et al.*, 1995; COOK, SAMMAN, 1996; KUROWSKA *et al.*, 2000a, b).

Os compostos fenólicos de origem vegetal têm sido alvo de muitas pesquisas atuais por causa de suas ações biológicas associadas à prevenção de doenças e com potencial curativo. Foram descritas propriedades anticarcinogênicas, antimutagênicas, antiaterogênicas, mas também inibidoras da digestão e absorção de certos nutrientes, bem como sua eficiência em converter os nutrientes absorvidos em metabólitos ativos (AMEER *et al.*, 1996; MATSUMOTO, 2004). Entre eles, os flavonoides cítricos ou flavanonas são apontados como redutores da hipercolesterolemia, hipertensão, obesidade e processos inflamatórios (KUROWSKA *et al.*, 2000b; MANTHEY, 2001; KUROWSKA; MANTHEY, 2004; FUJIOKA, 2007).

A ingestão média de flavonas/flavononas é de cerca de 25 mg/dia em muitos países da Europa, com variações em função dos hábitos alimentares. O consumo de flavonoides pela população do Estado de São Paulo foi estimado em cerca de 60 a 106 mg/dia, representado por alimentos comuns na dieta brasileira típica (ARABBI *et al.*, 2004).

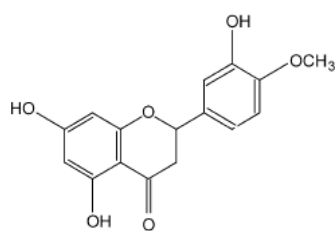
As laranjas e seus sucos são boas fontes desses flavonoides e contêm cerca de 40 mg/100g do alimento, porém perdas consideráveis ocorrem com a remoção da casca, antes do consumo ou no processo industrial (ALIMENTOS..., 2001).

Em geral, as concentrações de flavonoides nos alimentos processados são aproximadamente 50% menores do que nos produtos frescos e sua absorção é mais eficiente quando se encontram conjugados com a glicose (ANDALAUER *et al.*, 1998; WISEMAN, 1999). De modo geral, os flavonoides podem ocorrer em sua forma livre (aglicona) ou então conjugada a açúcares (glicosídeos). Nos alimentos, esses compostos estão na forma glicosídica, e, após serem ingeridos e chegarem ao intestino grosso, a

molécula de açúcar é degradada e os flavonoides passam para a forma aglicona. Os açúcares mais comuns conjugados aos flavonoides são: glicose, galactose, ramnose, xilose e arabinose, e, menos frequentemente, alguns dissacarídeos (LEE *et al.*, 1999; HARBORNE, WILLIAMS, 2000; KIM *et al.*, 2003). Mais de 80 espécies de açúcares têm sido descritas como ligadas aos flavonoides (LIU, 2004). A grande variedade de compostos pode ser explicada pelas modificações estruturais na composição básica da molécula, como reações de hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras. A glicosilação pode ocorrer nos grupos hidroxilas, ligando o flavonoide à molécula de açúcar através de um átomo de oxigênio, ou diretamente no núcleo do flavonoide, através de um átomo de carbono (AMEER *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2003; YAMADA *et al.*, 2006).

Os flavonoides das frutas cítricas hesperidina (Figura 1) e naringina são resistentes ao suco gástrico do estômago, sendo absorvidos no trato gastrointestinal (AMEER *et al.*, 1996; HOLLMAN, KATAN, 1997; KUROWSKA *et al.*, 2000a,b), após deglicosilação por enzimas de bactérias intestinais (HAVSTEEN, 1983). A baixa solubilidade da hesperidina em água dificulta sua absorção, que é menor que 0,01%; entretanto, um derivado da hesperidina, a glicosil hesperidina (g-hesperidin), é marcadamente mais solúvel em água que a hesperidina (YAMADA *et al.*, 2006). Alguns tipos de flavonoides podem ser dissolvidos em carboximetil celulose sódica ou em propileno glicol para elevar sua absorção no organismo (YAMADA *et al.*, 2006).

Previamente, outros autores reportaram que o metabólito hesperitina (Figura 1), da hesperidina, inibe a HMG-COA redutase e reduz a concentração plasmática do colesterol em ratos (LEE *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2003).



Hesperitina

Fonte: Kim *et al.* (2003).

Figura 1 – Estrutura química da hesperitina.

A análise dos produtos de excreção urinária, após a ingestão de flavanonas isoladas (naringina e hesperidina), de suco de laranja ou *grapefruit*, evidenciou a

presença de metabólitos desses compostos na urina, comprovando sua absorção pelo organismo (AMEER *et al.*, 1996). Foi verificada ainda uma variação considerável na taxa de absorção entre os indivíduos, possivelmente devido às diferenças da ação da microflora gastrintestinal na deglicosilação das flavanonas (ERLUND, 2004). Alguns estudos têm mostrado que as concentrações plasmáticas máximas de hesperitina e naringenina variam após o consumo de sucos cítricos (ERLUND, 2004). Após a ingestão de cerca de 500 ml de suco de laranja, essas concentrações variaram entre  $0,46 \pm 0,07 \mu\text{mol/l}$  e  $2,20 \pm 1,58 \mu\text{mol/l}$  para hesperitina, e de  $0,06 \pm 0,02 \mu\text{mol/l}$  a  $0,64 \pm 0,40 \mu\text{mol/l}$  para a naringenina (ERLUND, 2004). No entanto, ainda não foi observado o acúmulo de flavanonas no plasma (ERLUND, 2004). O tempo de meia-vida plasmática desses compostos é de cerca de uma a duas horas após a ingestão, e a excreção urinária é dose-dependente, isto é, proporcional à ingestão de flavanonas. Após 24 horas da ingestão, as flavanonas são quase totalmente eliminadas pela urina, indicando que esses compostos não atuam como biomarcadores de ingestão em longo prazo (ERLUND, 2004).

No intestino delgado, a absorção dos flavonoides parece ocorrer através da especificidade das enzimas intestinais pela molécula de açúcar ligada ao composto (ERLUND, 2004). Sabe-se que os flavonoides conjugados são levados pelo sistema porta dos enterócitos ao fígado, onde sofrem outras reações, como metilação, sulfatação e glicuronidação, resultando numa variedade de formas conjugadas. Os flavonoides conjugados podem ser excretados pela bile (HOLLMAM; KATAN, 1997; LIU, 2004).

Estudos avaliaram a capacidade antioxidante de diferentes compostos, entre eles a hesperidina, naringina, naringenina, quercetina e rutina, frente aos danos causados pelo alcaloide apomorfina, utilizando como sistema biológico células eucarióticas da levedura *S. cerevisiae* (SOARES *et al.*, 2005).

Pesquisas com o modelo de infecção por endotoxina de *Salmonella typhimurium* intraperitoneal, comparado com o efeito dos antibióticos fosfomicina e imipenem, constataram que o pré-tratamento com hesperidina foi capaz de reduzir tanto as LPS quanto a produção de TNF- $\alpha$  e o choque tóxico (KAWAGUCHI *et al.*, 2004).

Em estudos realizados por Garner e colaboradores utilizando o medicamento Daflon 500®, que contém 90% p/p de diosmina e 10% p/p de hesperidina, usado clinicamente no tratamento da insuficiência venosa crônica e de desordens da hemorroida, a diosmina foi incorporada com carbono 14 e foram analisadas suas concentrações na urina e nas fezes em estudos farmacocinéticos (GARNER *et al.*, 2002).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os possíveis efeitos do flavonoide hesperidina em coelhos com feridas induzidas por ácido.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Induzir feridas em coelhos da raça Nova Zelândia com administração cutânea de ácido clorídrico.
2. Tratar as feridas com as formulações contendo o flavonoide hesperidina nos grupos específicos.
3. Avaliar os dados hematológicos dos animais, após tratamento com diferentes administrações de hesperidina por dia.
4. Avaliar as lâminas histológicas das peles feridas e tratadas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Preparação do extrato glicólico de hesperidina

O extrato utilizado nos ensaios foi preparado, pelo método de percolação, segundo processo A da Farmacopéia Brasileira IV edição (1988), usando solução glicólica 30%. O extrato foi evaporado inicialmente em rotaevaporador e posteriormente em banho-maria com temperatura inferior a 60 °C até consistência pastosa, com rendimento de aproximadamente 0,30 g/mL.

O Acheflan<sup>®</sup> (alfa-humuleno) foi o medicamento fitoterápico controle do experimento. Esse medicamento foi desenvolvido pela Unicamp como primeiro anti-inflamatório feito com base no extrato de uma planta nativa brasileira, a erva-baleeira (*Cordia verbenacea*). Em forma de creme, o Acheflan<sup>®</sup> possui propriedades anti-inflamatórias tópicas (MEDEIROS, 2007).

### 4.2 Animais

Os animais utilizados foram fornecidos pelo setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Utilizaram-se 42 coelhos da raça Nova Zelândia, albinos, com idade de 55 dias (Figura 2).

Durante o experimento, os coelhos foram mantidos na área experimental do Laboratório de Biofármacos da UFV. Os animais foram distribuídos em gaiolas individuais, com fornecimento de água *ad libitum* e 120 g de ração comercial purina por



Figura 2 – Coelho da raça Nova Zelândia.

dia. Após a adaptação de cinco dias, eles foram divididos em cinco grupos aleatoriamente, de forma que cada grupo tivesse seis animais.

#### 4.3 Indução da ferida

Para a indução das úlceras dérmicas (feridas), os animais foram anestesiados com a associação de tiletamina e zolazepam (Zoletil<sup>®</sup> 50), na dosagem de  $30 \text{ mg kg}^{-1}$ , por via intramuscular. Cerca de 15 minutos depois da aplicação do anestésico, os animais tiveram uma área depilada de  $5 \text{ cm}^2$  na região dorso-cervical, o que limitou o seu acesso à área de indução e/ou tratamento. Após a depilação (Figura 3), foi aplicada uniformemente uma solução de HCl 2N  $1 \text{ mL/cm}^2$  (JORGE; DANTAS, 2003). Esse procedimento foi realizado num intervalo de 24 horas, durante cinco dias.



Figura 3 – Área depilada de  $5 \text{ cm}^2$  na região dorso-cervical.

#### 4.4 Organização dos grupos experimentais

A frequência do tratamento, os tipos de pomada e a divisão dos grupos foram estabelecidos da seguinte forma (Tabela 1).

Tabela 1 – Grupos, tratamentos e doses aplicadas nas feridas dos coelhos

Grupos	Tratamento	Dose
G1	Ração	-
G2	Ração + úlcera	-
G3	Ração + úlcera + extrato glicólico de hesperidina 30%	1/dia
G4	Ração + úlcera + extrato glicólico de hesperidina 30%	2/dia
G5	Ração + úlcera + extrato glicólico de hesperidina 30%	3/dia

Após cinco dias de indução da ferida, o tratamento dos grupos foi iniciado, sendo aplicadas quantidades padronizadas por marcação na espátula (suficiente para cobrir, uniformemente, a ferida por completo) dos geis sobre as feridas, duas vezes ao dia. O experimento teve duração de 30 dias, com posterior sacrifício dos animais, utilizando associação de tiletamina e zolazepam (Zoletil® 50), na dosagem de 30 mg kg<sup>-1</sup> por via intravenosa.

#### 4.5 Dosagens de parâmetros sanguíneos

Amostras de 5 mL de sangue foram coletadas por punção cardíaca em tubos heparinizados e centrifugadas a 7.100 xg durante 15 minutos.

Os parâmetros sanguíneos proteínas totais, cálcio, ferro, TGO (AST), TGP (ALT),  $\gamma$ GT e albumina foram dosados utilizando-se o ALIZÉ (equipamento automático de análises bioquímicas).

#### 4.6 Análise histológica

Ao término dos experimentos foram retiradas amostras de pele de todos os animais. Cada parte de pele de cada animal foi armazenada em pote de vidro individual contendo solução de formol Merck a 10% e foram realizadas as confecções das lâminas. As peles foram cortadas em fragmentos de 2 cm e desidratadas em banhos sucessivos

em uma série crescente de álcoois (70, 80, 90% e álcool absoluto), ficando em repouso durante uma hora, respectivamente. Para completar a desidratação, as peles foram retornadas ao álcool absoluto por mais meia hora. Para diafanização, os tecidos (peles) foram mergulhados em Xilol 100% (dois banhos de 30 minutos). Em seguida, submeteu-se à inclusão das peles em parafina líquida 58 a 60 °C por quatro horas. Concluída a inclusão, os blocos foram mantidos em uma placa de gelo para solidificar. Os cortes obtidos em micrótomo, com lâmina de aço na espessura de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina. Para isso, o material primeiramente foi desparafinado em Xilol 100% (cinco minutos), hidratado em uma série crescente de álcool absoluto a 90% por cinco minutos e lavado em álcool. Em seguida, os tecidos foram corados com hematoxilina por um minuto. Para coloração em eosina (20 segundos) as lâminas foram previamente lavadas em H<sub>2</sub>O (5 minutos), diferenciadas rapidamente em HCl 1% e banhadas em álcool 90%. Finalmente, gotejou-se uma gota de bálsamo-do-canadá, para aderir à lamínula. As análises das lâminas foram realizadas em microscópio (Labomed® 1500) acoplado à câmera fotográfica, para análise e diagnóstico das lâminas.

#### **4.7 Análise estatística dos resultados**

Os dados plasmáticos bioquímicos foram analisados por teste de Dunnett e Tukey separadamente. Os dados hematológicos foram analisados apenas por Dunnett.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito da hesperidina nos parâmetros hematológicos dos coelhos tratados

De acordo com os resultados da Tabela 2, observou-se que para o parâmetro proteína total os valores não foram estatisticamente significativos. O grupo 5 tratado com a dose 3 teve redução de 4,80% em proteínas totais.

Tabela 2 – Valores médios de proteína e albumina em soro sanguíneos de coelhos tratados com gel contendo hesperidina em três doses por 21 dias, comparados com os do grupo sem ferida (G1)

Tratamentos	Proteína (mg/dL)			Albumina (g/dL)		
	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	71,2	2,24 A	+0,0	5,56	0,12 A	0,0
G2 ração+ ferida	73,1	4,48 A	+2,6	5,95	0,23 A	+6,5
G3 ração+ ferida + hesperidina (dose 1)	72,6	4,48 A	+1,9	6,03	0,23 A	+8,1
G4 ração+ ferida + hesperidina (dose 2)	72,2	4,48 A	+1,4	5,91	0,23 A	+5,8
G5 ração+ ferida + hesperidina (dose 3)	67,8	4,48 A	-4,8	7,00	0,23 B	+25,4
G6 ração+ ferida +acheflan	66,8	4,48 A	-6,2	3,40	0,23 B	-39,1

Acheflan<sup>®</sup> (fitoterápico da Aché/Phytomédica); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo sem ferida (G1). Dose 1 = uma vez ao dia; Dose 2 = duas vezes ao dia; e Dose 3 = três vezes ao dia.

Estudos experimentais realizados por Kawaguchi *et al.* (2004) demonstram atividades inibitórias da hesperidina na inflamação, efeito hipotensor, analgesia, inibição da enzima óxido nítrico sintase e eficácia antiapoptótica. Alguns desses efeitos

estão relacionados com efeitos de proteínas. Esse mesmo pesquisador determinou que a hesperidina promove redução dos níveis do fator alfa de necrose tumoral e um grupo de proteínas cromossomais (HMGB-1), alta mobilidade de proteínas cromossomais, decréscimo de células apoptóticas e normalização dos fatores de coagulação sanguínea, bem como do tempo de protrombina e número de plaquetas durante uma infecção e inflamação (KAWAGUCHI *et al.*, 2004). Essa é mais uma correlação do efeito desses flavonoides em algumas proteínas.

Em estudos realizados por Garner e colaboradores (2002) utilizando o medicamento Daflon 500, que contém 90% p/p de diosmina e 10% p/p de hesperidina, usado clinicamente no tratamento da insuficiência venosa crônica e hemorroida, a diosmina foi incorporada com carbono 14 e foram analisadas suas concentrações na urina e nas fezes em estudos farmacocinéticos (GARNER *et al.*, 2002).

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que o grupo 5, tratado com hesperidina dose 3, teve maior aumento de albumina (+25,37%). Essa proteína transportadora de nutrientes e ácido graxo principalmente, bem como de medicamentos e compostos bioativos, tem sua concentração aumentada quando precisa transportar maior quantidade de compostos bioativos. É importante lembrar, no entanto, que grandes aumentos na sua concentração poderão modificar a osmolaridade do sangue.

Tabela 3 – Valores médios de proteína e albumina em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel contendo hesperidina em três doses por 21 dias, comparados com os do grupo não tratado (G2)

Tratamentos	Proteína (mg/dL)			Albumina (g/dL)		
	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	71,2	2,24 A	-2,5	5,56	0,12 A	-6,1
G2 ração + ferida	73,1	4,48 A	0,0	5,95	0,23 A	0,0
G3 ração + ferida + hesperidina (dose 1)	72,6	4,48 A	-0,7	6,03	0,23 A	+1,5
G4 ração + ferida + hesperidina (dose 2)	72,2	4,48 A	-1,1	5,91	0,23 A	-0,6
G5 ração + ferida + hesperidina (dose 3)	67,8	4,48 A	-7,2	7,00	0,23 B	+17,7
G6 ração + ferida + acheflan	66,8	4,48 A	-8,6	3,40	0,23 B	-42,8

Acheflan<sup>®</sup> (fitoterápico da Aché/Phytomédica); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo doente (G2). Dose 1 = uma vez ao dia; Dose 2 = duas vezes ao dia; e Dose 3 = três vezes ao dia.

Os níveis de proteínas totais e, conseqüentemente, de albumina podem se encontrar aumentados na artrite reumatoide, no lúpus, em neoplasmas, queimaduras extensas, infarto do miocárdio e diabetes (MOTTA, 2003).

De acordo com os resultados da Tabela 3, observa-se que para o parâmetro proteína total os valores não foram estatisticamente significativos. Estes valores foram comparados aos do grupo com úlcera não tratada (G1), pelo teste de Dunnett. O grupo 5 tratado com a dose 3 teve uma redução de 7,2% em proteínas totais.

Observou-se que o grupo 5, tratado com hesperidina dose 3, teve maior aumento de albumina (+17,7%). Essa proteína, transportadora de nutrientes e sobretudo de ácido graxo, bem como de medicamentos e compostos bioativos, tem sua concentração aumentada quando precisa transportar maior quantidade de compostos bioativos. É importante lembrar, no entanto, que grandes aumentos na sua concentração poderão modificar a osmolaridade do sangue.

Vários flavonoides, entre eles a hesperidina, narigenina e naringina, possuem potente ação antioxidante (HALLIWELL, 1994). Essa ação é importante em um processo inflamatório, uma vez que dentre os mediadores pró-inflamatórios forma-se o ácido nítrico em grandes quantidades, que geram várias lipases de radicais livres, levando a alterações teciduais.

Tabela 4 – Valores médios de TGP e  $\gamma$ GT em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel contendo hesperidina em três doses por 21 dias comparados com os do grupo sem ferida (G1)

Tratamentos	TGP(U/L)			$\gamma$ GT (U/L)		
	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	135,7	4,5 A	0,0	9,3	0,40 A	0,0
G2 ração+ ferida	152,3	9,05 A	+12,3	13,3	0,81 B	+42,5
G3 ração+ ferida +hesperidina (dose 1)	213,7	9,05 B	+57,5	11,9	0,81 A	+28,1
G4 ração+ ferida +hesperidina (dose 2)	143,0	9,05 A	+5,4	13,7	0,81 B	+47,0
G5 ração+ ferida +hesperidina (dose 3)	197,3	9,05 B	+45,5	11,2	0,81 A	+20,4
G6 ração+ ferida +acheflan	162,7	9,05 A	+19,9	15,8	0,81 B	+53,3

Acheflan<sup>®</sup> (fitoterápico da Aché/Phytomédis); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo sem ferida (G1). Dose 1 = uma vez ao dia; Dose 2 = duas vezes ao dia; Dose 3 = três vezes ao dia.

Na Tabela 4, verifica-se que os grupos 3 e 5 tiveram os maiores aumentos na atividade da TGP. Em lesões teciduais ocorre hidrólise de proteínas teciduais, como colágeno e elastina, catalisada pelas enzimas colagenase e elastase; havendo portanto, maior disponibilidade de aminoácidos, a atividade da enzima deve aumentar para metabolizar os aminoácidos. As comparações foram feitas com o grupo normal.

De acordo com os resultados obtidos com  $\gamma$ GT na mesma tabela, observa-se que o grupo 2 com feridas não tratadas apresentou aumento considerável na atividade dessa enzima, e esse valor foi significativo em relação ao grupo 1. Pode-se deduzir que durante o período em que o animal apresenta feridas ocorre maior proteólise; conseqüente-mente, mais aminoácidos livres estão disponíveis para que essa enzima os transporte para o interior da célula. O grupo 5 apresentou aumento na atividade de  $\gamma$ GT bem menor (+20,43) que o dos demais grupos; isso pode ser um indicativo de que nessa dose o flavonoide hesperidina tenha proporcionado aumento na síntese proteica, o que favorece a cicatrização. Durante a cicatrização, colágeno e elastina são sintetizados em maior quantidade.

Tabela 5 – Valores médios de TGP e  $\gamma$ GT em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel contendo hesperidina em três doses por 21 dias, comparados com os do grupo não tratado (G2)

Tratamentos	TGP (U/L)			$\gamma$ GT (U/L)		
	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	135,7	4,5 A	-10,9	9,3	0,40 B	-29,8
G2 ração+ ferida	152,3	9,05 A	0,0	13,3	0,81 A	0,0
G3 ração+ ferida +hesperidina (dose 1)	213,7	9,05 B	+40,3	11,9	0,81 A	-10,1
G4 ração+ ferida +hesperidina (dose 2)	143,0	9,05 A	-6,1	13,7	0,81 A	+3,1
G5 ração+ ferida +hesperidina (dose 3)	197,3	9,05 B	+29,5	11,2	0,81 A	-15,5
G6 ração+ ferida +acheflan	162,7	9,05 A	+6,8	15,8	0,81 B	+15,7

Acheflan<sup>®</sup> (fitoterápico da Aché/Phytomédis); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo não tratado (G2). Dose 1 = uma vez ao dia; Dose 2 = duas vezes ao dia; e Dose 3 = três vezes ao dia.

As transaminases são enzimas que catalisam a transferase reversível de um grupo alfa-amino de um aminoácido para um alfacetoácido, com a formação de novos alfacetoácidos. Em lesões dos hepatócitos e na hepatite aguda ocorrem aumentos na atividade dessa enzima. Qualquer lesão tecidual provoca aumento dessas enzimas no sangue. A atividade delas também é aumentada no infarto do miocárdio e em traumatismos musculares (LIMA *et al.*, 2005).

Conforme os resultados obtidos na Tabela 5, os grupos 3 e 5 tiveram os maiores aumentos na atividade da TGP. Em lesões teciduais ocorre hidrólise de proteínas, como colágeno e elastina, catalisada pelas enzimas colagenase e elastase; assim, havendo maior disponibilidade de aminoácidos, a atividade da enzima deve aumentar para metabolizar os aminoácidos. As comparações foram feitas com o grupo 1 de feridas não tratadas.

De acordo com os resultados obtidos com  $\gamma$ GT na mesma tabela, observa-se que o grupo 2 com feridas não tratadas teve um aumento considerável na atividade dessa enzima, e esse valor foi significativo em relação ao grupo 1. Pode-se deduzir que durante o período em que o animal apresenta feridas ocorre maior proteólise; consequentemente, mais aminoácidos livres estão disponíveis para que essa enzima os transporte para o interior da célula. O grupo 4 apresentou aumento na atividade de  $\gamma$ GT bem maior que o dos demais grupos; isso pode ser indicativo de que nessa dose o flavonoide hesperidina tenha proporcionado aumento na síntese proteica, o que favorece a cicatrização.

O aumento de  $\gamma$ GT pode significar aumento no transporte de aminoácidos. Ela é uma enzima indicadora sensível de doenças hepáticas, sendo seus níveis frequentemente elevados nas disfunções.

O aumento de cálcio plasmático nos animais feridos pode ser atribuído à perda tecidual para o plasma, ocasionada pela lesão do tecido (LIMA *et al.*, 2005).

Na Tabela 6, os valores obtidos para cálcio não foram estatisticamente significativos, embora o grupo com feridas tenha apresentado a maior percentagem de redução desse parâmetro (-4,87%); o grupo 5, tratado com a dose 3 de hesperidina, teve uma redução menor (-2,66%). É importante lembrar que o *turnover* do cálcio, visto que ele participa do metabolismo do tecido ósseo, tecido nervoso, tecido muscular, entre outros, e também muitas enzimas do ciclo de Krebs tem como cofator cálcio.

A elevação dos níveis plasmáticos de ferro pode ser observada em hemólises em lesões teciduais, levando a mioglobina muscular a perder ferro para o sangue. Isso ocorre também na hemocromatose primária, envenenamento agudo por ferro dano hepático agudo e anemia hemolítica (LIMA *et al.*, 2005).

De acordo com os resultados obtidos para o parâmetro ferro (Tabela 6), observa-se que o grupo 4 tratado com a dose 2 foi o que apresentou maior percentagem desse parâmetro (+20,4%), sendo inferior apenas ao grupo 2. O ferro faz parte da molécula da hemoglobina, mioglobina, proteínas transportadoras dos gases oxigênio e gás carbônico; portanto, quando o nível de ferro aumenta na circulação, a oxigenação dos tecidos é menor, o que favorece a proliferação de microrganismos anaeróbios. Também proteínas contendo grupo HEME são afetadas na ausência de ferro, alterando a cadeia respiratória.

Tabela 6 – Valores médios de cálcio e ferro em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel contendo hesperidina em três doses por 21 dias, comparados com os do grupo sem ferida (G1)

Tratamentos	Cálcio (mg/dL)			Ferro (µg/Dl)		
	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	11,3	4,5 A	0,0	234,3	5,64 A	0,0
G2 ração+ ferida	10,7	9,05 A	-4,9	288,6	11,27 B	+23,2
G3 ração+ ferida +hesperidina (dose 1)	10,9	9,05 A	-3,5	270,9	11,27 A	+15,6
G4 ração+ ferida +hesperidina (dose 2)	10,8	9,05 A	-4,1	282,1	11,27 B	+20,4
G5 ração+ ferida +hesperidina (dose 3)	11,0	9,05 A	-2,7	233,2	11,27 A	-0,5
G6 ração+ ferida +acheflan	13,3	9,05 B	+17,9	124,4	11,27 B	-46,9

Acheflan<sup>®</sup> (fitoterápico da Aché/Phytomédica); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo sem ferida (G1). Dose 1 = uma vez ao dia; Dose 2 = duas vezes ao dia; Dose 3 = três vezes ao dia.

Na Tabela 7, os valores obtidos para cálcio e ferro não foram estatisticamente significativos. Mesmo havendo uma variação entre o grupo 1 e 6 para o parâmetro ferro, não foi suficiente para a comparação estatística.

Tabela 7 – Valores médios de cálcio e ferro em soro sanguíneo de coelhos tratados com gel contendo hesperidina em três doses por 21 dias, comparados com os do grupo não tratado (G2)

Tratamentos	Cálcio (mg/dL)			Ferro (µg/dL)		
	Média	$\sigma$	% Var.	Média	$\sigma$	% Var.
G1 ração	11,3	4,5 A	+5,1	234,3	5,64 B	-18,8
G2 ração+ ferida	10,7	9,05 A	0,0	288,6	11,27 A	0,0
G3 ração+ ferida +hesperidina (dose 1)	10,9	9,05 A	+1,4	270,9	11,27 A	-6,1
G4 ração+ ferida +hesperidina (dose 2)	10,8	9,05 A	+0,8	282,1	11,27 A	-2,3
G5 ração+ ferida +hesperidina (dose 3)	11,0	9,05 A	+2,3	233,2	11,27 B	-19,2
G6 ração+ ferida +acheflan	13,3	9,05 B	+23,9	124,4	11,27 B	-56,9

Acheflan<sup>®</sup> (fitoterápico da Aché/Phytomédica); n = seis animais por grupo. Obs.: Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett a 5% de significância do grupo não tratado (G2). Dose 1 = uma vez ao dia; Dose 2 = duas vezes ao dia; e Dose 3 = três vezes ao dia.

## 5.2 Análise histológica das feridas

No grupo normal, sem ferida (Figura 4), observou-se epiderme constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado com diferentes graus de diferenciação dos queratinócitos. A derme é formada de tecido conjuntivo, onde se distinguem duas

camadas, sem limites precisos: papilar e reticular. Ainda na derme, estão presentes glândulas sudoríparas, sebáceas e folículos pilosos.

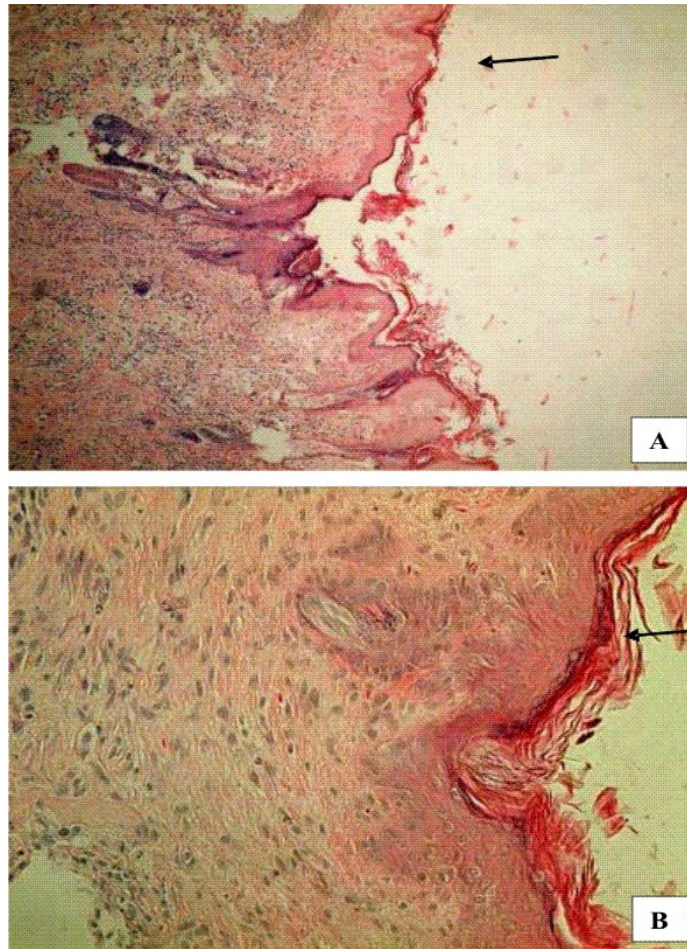


Figura 4 – Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo normal (G1). (A) aumento de 10X; e (B) aumento de 40X. Seta preta: epitélio estratificado pavimentoso queratinizado.

No grupo com ferida, não tratado (Figura 5), observou-se grande número de hemácias e aumento de neutrófilos. Houve edema significativo, infiltrado inflamatório misto, ocasionais focos de hemorragia e vasos hiperemiados; presença do tecido de granulação com fibrose, ectasia capilar e infiltrado inflamatório mononuclear difuso; denso infiltrado inflamatório na periferia da lesão, vários vasos sanguíneos hiperemiados contendo hemácias em seu interior, fibras colágenas escassas, tecido de granulação em grande quantidade; infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear; grandes focos de hemorragia e necrose; e presença de queratina próxima à epiderme de forma desorganizada.

Na Figura 6, grupo com ferida tratado pela formulação de hesperidina (dose 1), observou-se a presença do tecido de granulação com fibrose, ectasia capilar e infiltrado

inflamatório mononuclear difuso; e presença de pequena quantidade de queratina mais próxima à epiderme.

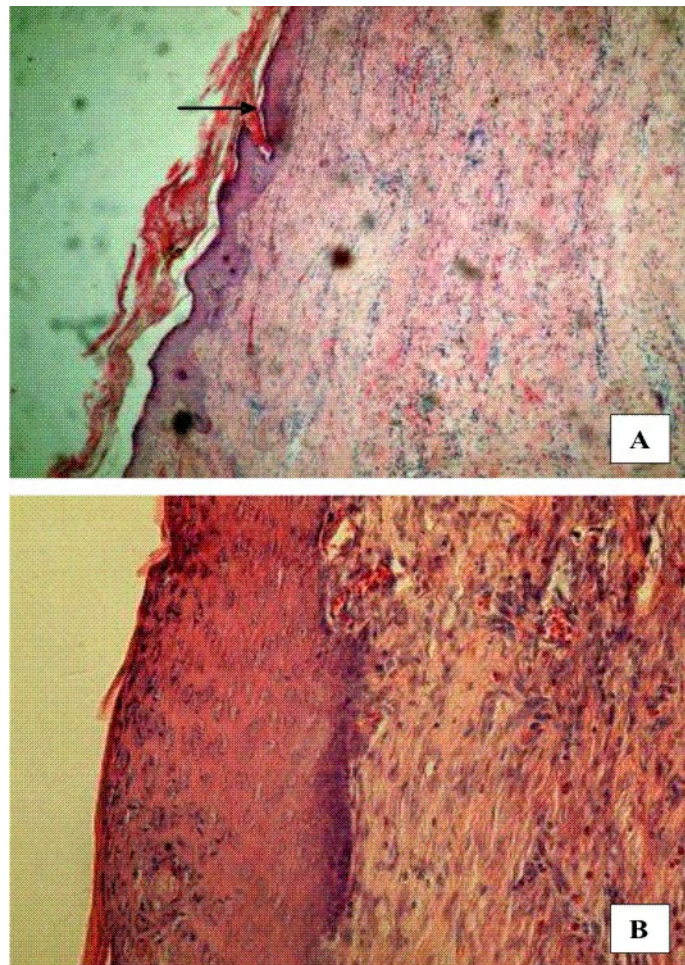


Figura 5 – Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo doente sem tratamento (G2). (A) aumento de 10X; e (B) aumento de 40X. Seta preta: queratina de forma desorganizada.

Na Figura 7, grupo com ferida tratado pela formulação de hesperidina (dose 2), observou-se a presença do tecido de granulação com fibrose, ectasia capilar e infiltrado inflamatório mononuclear difuso; presença de grande quantidade de queratina, porém de forma desorganizada.

Na Figura 8, grupo com ferida tratado pela formulação de hesperidina (dose 3), observou-se a presença do tecido de granulação com fibrose, ectasia capilar e infiltrado inflamatório mononuclear difuso; e presença de grande quantidade de queratina mais próxima à epiderme, demonstrando que a formulação na dose 3, numa concentração mais elevada, conseguiu reconstituir a queratina mais rapidamente e de maneira mais ordenada que as outras concentrações. Provavelmente, essa dosagem seria o suficiente

para ajudar no processo de remodelamento da ferida e, assim, proporciona melhor reconstituição.

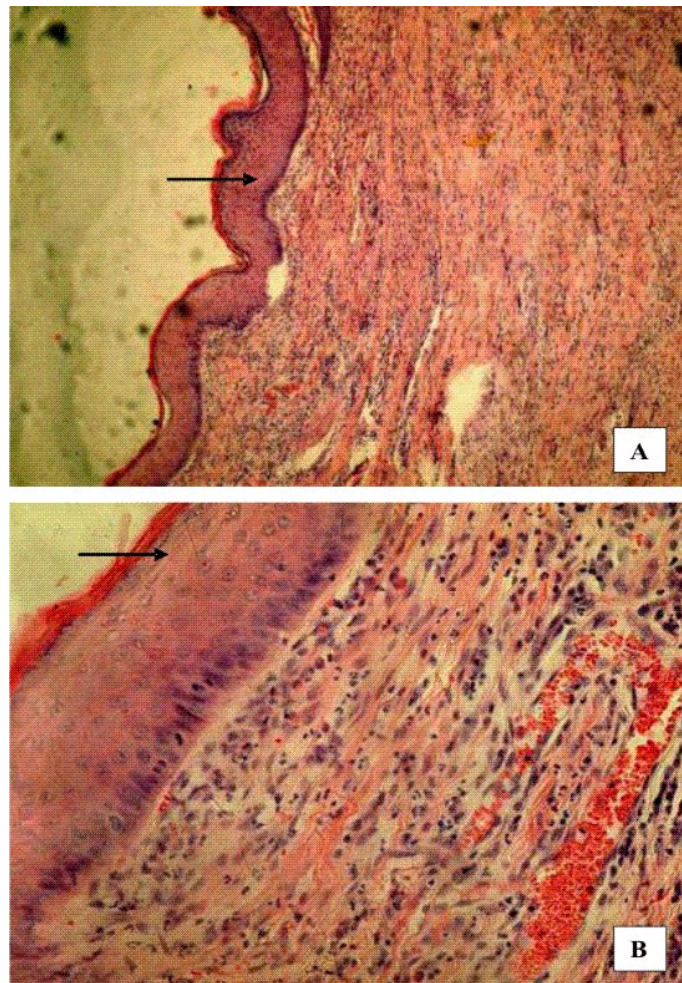


Figura 6 – Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo (G3), tratados pela formulação de hesperidina na dose 1. (A) aumento de 10X; e B = aumento de 40X. Setas pretas = queratina escassa e mais aderida à epiderme.

Na Figura 9, representativa do grupo 6, tratado com Acheflan®, observou-se predomínio de fibras colágenas em detrimento do elemento celular na derme, fibras colágenas adjacentes ao epitélio e alguns leucócitos esparsos. No epitélio, verificou-se maior formação de fibras colágenas e algumas células mononucleadas difusamente distribuídas.

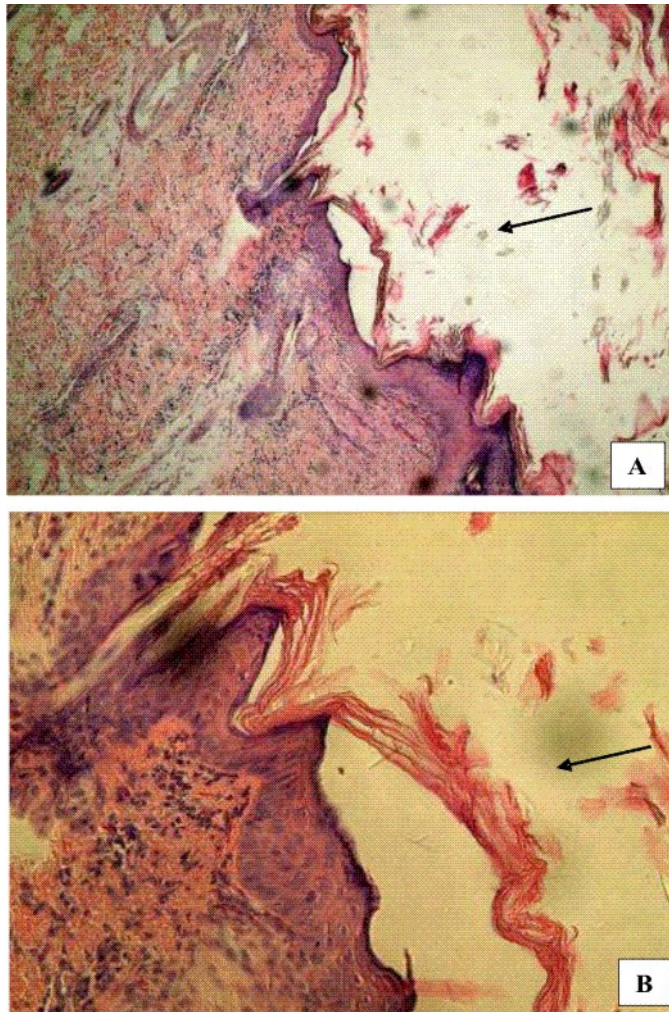


Figura 7 – Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo (G4), tratados pela formulação de hesperidina na dose 2. (A) aumento de 10X; e B = aumento de 40X. Setas pretas = grande quantidade de queratina de forma desorganizada.

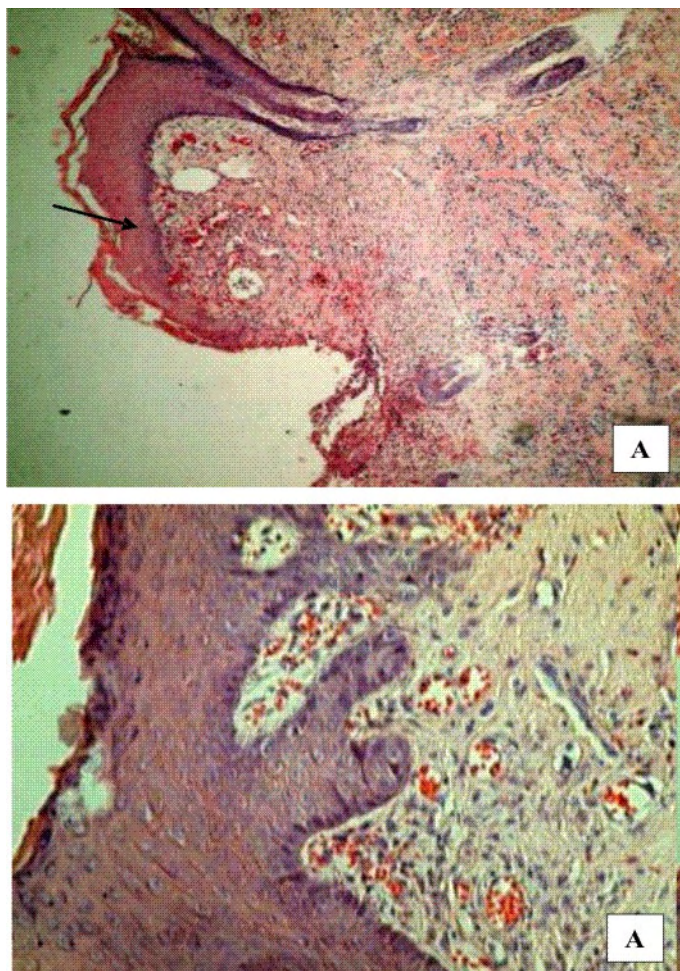


Figura 8 – Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo (G5), tratados pela formulação de hesperidina na dose 3. (A) aumento de 10X; e (B) aumento de 40X. Seta preta = reconstituição da queratina de forma ordenada.

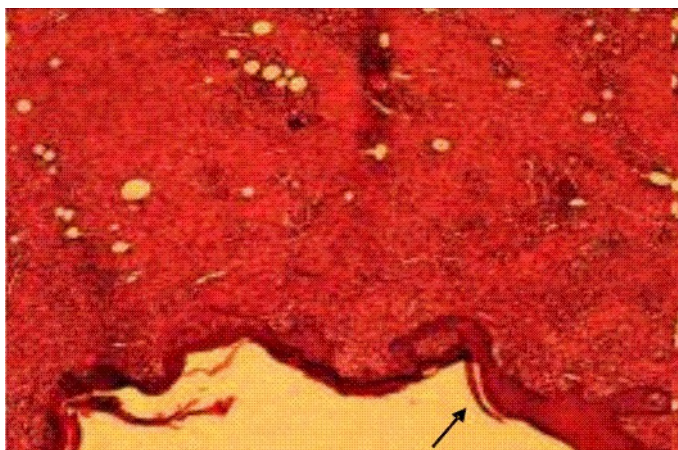


Figura 9 – Fotomicrografia de epiderme de coelhos do grupo (G6), tratados pela formulação contendo Acheflan<sup>®</sup>.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitiram aprofundar a avaliação da eficácia das diferentes concentrações dos extratos glicólicos de hesperidina.

Ocorreram pequenas variações nos níveis de proteína total e albumina, podendo-se concluir que apenas o grupo 6 reduziu os níveis plasmáticos de albumina.

Quanto às atividades de TGP e GGT, houve variações dentro da normalidade nas diferentes doses, demonstrando que, como a hidrólise de proteínas foi menor, a atividade dessas enzimas, que catalisam aminoácidos, foi menor.

Quanto à análise histológica, houve maior organização das fibras colágenas da derme dos animais submetidos ao tratamento com o extrato do flavonoide hesperidina, porém os melhores resultados foram expressos pela dose 3 (três vezes ao dia), por proporcionar melhor formação da epiderme e diferença na quantidade de queratina de forma ordenada visualmente melhor. Provavelmente, essa dosagem seria o suficiente para ajudar no processo de remodelamento da ferida e, assim, proporciona melhor reconstituição.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKGUL, C.; MOULDING, D. A.; EDWARDS, S. W. Molecular control of neutrophil apoptosis. **Febs Letters**, v. 487, p. 318-322, 2001.

ALIMENTOS funcionais. O maravilhoso mundo dos nutracêuticos. **Aditivos Ingrid.**, n. 17, p. 38-56, 2001.

AMEER, B.; WEINTRAUB, R. A.; JOHNSON, J. V.; YOST, R. A.; ROUSEFF, R. L. Flavone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 60, n.1, p. 34-40, 1996.

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the brazilian population. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 5, p. 1124 -1131, 2004.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a serie of flavonoids in a liposomal system. **Free Radicals Biol. Med.**, v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998.

BRODY T. **Nutritional biochemistry**. Efeito de flavonoides no metabolismo do ácido araquidônico. San Diego: Academic Press, 1994. v. 133. 658 p.

CHI, Y.; CHEON, B. S.; KIM, H. P. Effect of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 2647 cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 61, n. 10, p. 1195-1203, 2001.

CHI, Y. S.; JONG, H. G.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KONG, S. S.; KIM, H. P. Effects of on occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid:cyclooxygenases and lipoxygenases. **Biochem. Pharmacol.**, v. 69, p. 1185-1191, 2001.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **J. Nutr. Biochem.**, v. 7, n. 1, p. 66-76, 1996.

COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; HENICHART, J. P.; CATTEAU, J. P.; GAYDOU, E.; WALLET, J. C. Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. **Free Radical Biol. Med.**, v. 13, n.3, p. 211-219, 1992.

EDWARDS, S. W. The O<sub>2</sub>- generating NADPH oxidase of phagocytes: structure and methods of detection. **Methods Enzymol.**, v. 9, p. 563-577, 1996.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutr. Res.**, v. 24, n. 10, p. 851-874, 2004.

FERRALI, M.; SIGNORINI, B.; CACIOTTI, B.; SUGHERINI, L.; CICCOLI, L.; GIACHETTI, D.; COMPORTI, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. **FEBS Letters**, n. 416, p. 123-129, 1997.

FORMICA, J. V.; REGELSON W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem Toxicol.**, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

FUJIOKA, K.; LEE, M. W. Pharmacologic treatment options for obesity: Current and potential medications. **Nutr. Clin. Pract.**, v.22, n.1, p. 50-54, 2007.

GALVEZ, J.; DE LA CRUZ, J. P.; ZARZUELO, A.; DE LA CUESTA, F. S. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 127-133, 1995.

GARNER, R. C.; GARNER, J. V.; GREGORY, S.; WHATTAM, M.; CALAM, A.; LEONG, D. Comparison of the absorption of micronized (Daflon 5001 mg) and nonmicronized <sup>14</sup>C-diosmin tablets after oral administration to healthy volunteers by accelerator mass spectrometry and liquid scintillation counting. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, n. 1, p. 32-40, 2002.

GRYGLEWSKI, J. R.; KORBUT, R.; ROBAK, J.; SWIES, J. On mechanism of antithrombotic action of flavonoids. **Biochem Pharmacol.**, v. 36, n. 3, p. 317-322, 1987.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014 p.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721-724, 1994.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.**, v. 32, p. 1141-1148, 1983.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed. Pharmacother.**, v. 51, n. 8, p. 305-310, 1997.

HOMMAM, M. V.; MINAMI, M.; TANIGUCHI, O.; OKAK, G. T.; MORITAS, N.I.; SUMA, T. Inhibitory effects of lignans and flavonoids in saibokuto, a herbal medicine for bronchial asthma, on the release of leukotrienes from human polymorphonuclear leukocytes. **Planta Med.**, v. 66, p. 88-91, 2000.

ISIIHIWA, J.; SATO, T.; MINAKI, Y.; SASCHIDA, Y.; YANO, M.; ITO, A. A citrus flavonoid, nobiletin, suppresses production and gene expression of matrix metalloproteinase 9/gelatinase B in rabbit synovial fibroblasts. **J. Rheumatol.**, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2000.

JORGE, S. A.; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2003. 351 p.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia: básica e clinica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 854 p.

KAWAGUCHI, K.; KIKUCHI, S.; HASUNUMA, R.; MARUYAMA, H.; YOSHIKA, W. A.T.; KUMAZAWA, Y. A citrus flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 5, p. 67-683, 2004.

KIM, H. K.; JEONG, T. S.; LEE, M. K.; PARK, Y. B.; CHOI, M. S. Lipidlowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats **Clin. Chim. Acta**, v. 327, p. 129-137, 2003.

KINSELLA, J. E. A.  $\alpha$ -Linolenic acid: functions and effects on linolenic acid metabolism and eicosanoid-mediated reactions. **Adv. Food Nutr. Res.**, v. 35, n. 1, p. 89-101, 1991.

KOGANOV, M. M.; DUEVA, O. V.; TSORIN, B. L. Activities of plant derived phenols in a fibroblast cell culture model. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 3, p. 481-483, 1999.

KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in human colon cancer lines. **Eur. J. Nutr.**, v. 38, n. 1, p. 133-142, 1999.

KUROWSKA, E.M.; MANTHEY, J.A. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamster with diet-induced hypercholesterolemia. **J.Agric. Food Chem.**, v.52, p2879-2886, 2004.

KUROWSKA, E. M.; BORRDAILE, N. M.; SPENCE, J. D.; CARROEL, K. K. Hypocholesterolemic effects of dietary citrus juices in rabbits. **Nutr. Res.**, v. 20, n. 1, p.121-129, 2000a.

KUROWSKA, E. M.; SPENCE, J. D.; JORDAN, J.; WETMORE, S.; FREEMAN, D. J.; PICHE, L. A.; SERRATORE, P. HDL-cholesterol- raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 72, n. 5. p. 1095-1100, 2000b.

LALE, A.; HERBERT, J. M. Ability of different flavonoids to inhibit the procoagulant activity of adherent human monocytes. **J. Nat. Prod.**, v. 59, n. 3, p. 273-276, 1996.

LANDOLFI, R.; MOWER, R.L.; STEINER, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, n. 9, p. 1525-1530, 1984.

LE MARCHEND, L. Cancer preventive effects of flavonoids. Review. **Biomed. Pharmacother.**, v. 56, n. 6, p. 296-301, 2002.

LEE, S. H.; JEONG, T. S.; PARK, Y. B.; KWON, Y. K.; CHOI, M. S.; KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity and apoptosis in human colon cancer lines. **Eur. J. Nutr.**, v. 38, n. 1, p. 133-142, 1999.

LIMA, M. J.; TÓTH, I. V.; RANGEL, A. O. A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity. **Talanta**, v. 68, n. 2, p. 207-213, 2005.

LIU, J.J.; SONG, C.W.; YUE, Y. Quercetin inhibits LPS-induced delay in spontaneous apoptosis and activation of neutrophils. **Inflamm. Res.**, v. 54, n. 12, p. 500-507, 2005.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism action. **J. Nutr.**, v. 134, n. 12, p. S3479-S3485, 2004.

MATSUMOTO, H. et al. Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered hesperidin in rat plasma. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 6653-6659, 2004.

MANTHEY, J.A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, n. 2, p. 135-153, 2001.

MARTINEZ-FLORES, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp.**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MEDEIROS, R.; PASSOS, G. F.; VITOR, C. E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T. L.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **Br. J. Pharmacol.**, v. 151, n. 5, p. 618-27, 2007.

MONFORTE, M. T.; TROVATO, A.; KIRJAVAINEN, S.; FORESTIERI, A. M.; GALATI, E. M.; LO CURTO, R. B. Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid. (note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. **Farmaco**, v. 50, n. 9, p. 595-599, 1995.

MOTTA, V. T. Bioquímica Clínica para o Laboratório: princípios e interpretações. 4 ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, 2003. 419 p.  
MOTILVA, V.; DE LA LASTRA, C. A.; MARTIN, M. J. Ulcer-protecting effects of naringenin on gastric lesions induced by ethanol in rat: role of endogenous prostaglandins. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 46, n. 1, p. 91-94, 1994.

O'REILLY, J. D.; MALLET, A. J.; MCANLIS, G. T.; YOUNG, I. S.; HALLIWELL, B.; SANDERS, T. A.; WISEMAN, H. Consumption of flavonoids in onions and black tea lack of effect on flavonoids from *Stachys chrysantha* and *Stachys candida*. **Biol. Pharm. Bul.**, v. 23, n. 1, p. 47-53, 2000.

PELZER, L. E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, O. A.; GUERREIRO, E. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. **IL Farmaco**, v. 53, p. 421-424, 1998.

PUERTAR, G. R.; FORDER, R. A.; HOULT, J. R. Inhibition of leukocyte eicosanoid generation and radical scavenging activity by gnaphalin, a lipophilic flavonol isolated from *Helichrysum pycnanthum*. **Planta Med.**, v. 65, p. 507-511, 1999.

RISO, P.; VISIOLI, F.; GARDANA, C.; GRANDE, S.; BRUSAMOLINO, A.; GALVANO, F.; GALVANO, G.; PORRINI, M. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 4, p. 941-947, 2005.

SARTOR, L.; PEZZATO, E.; GARBISA, S. (-)Epigallocatechin-3-gallate inhibits leukocyte elastase: potential of the phyto-factor in hindering inflammation, emphysema, and invasion. **J. Leukoc Biol.**, v. 71, n. 1, p. 73-79, 2002.

SETCHELL, K. D. R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. **J. Nutr.**, v. 129, n. 3, p. 758-767, 1999.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *saccharomyces cerevisia*. **R. Bras. Ci. Farm. – Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 41, n. 1, p. 95-100, 2005.

TIJBURG, L. B. M.; MATTERN, T.; FOLTS, J. D.; WEISGERBER, U. M.; KATAN, M. B. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 37, n. 8, p. 771-785, 1997.

TSUDAT, M.; WATANABE, M.; OHSHIMAK, S.; NORINOBU, S.; CHOL, S. W.; KAWAKISHI, S.; OSAWA T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-b-D-glucoside and cyanidin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 42, n. 11, p. 2407-2410, 1994.

USDA. **Database for the flavonoid content of selected foods release 2**, 2006. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6231>>. Acesso em: 10 Nov. 2007.

VERSTRAETEN, S. V.; KEEN, C. L.; SCMITZ, H. H.; FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. **Free Radical Biol. Med.**, v. 34, n. 1, p. 84-92, 2003.

WANG, H.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M.; CHANG, Y. C.; BOOREN, A. M.; GRAY, J. L.; DEWIT, D. L. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycone, cyaniding from art cherries. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 294-296, 1999.

WANG, H. K. The therapeutic potential of flavonoides. **Expert Opin. Invet. Drugs**, v. 9, n. 9, p. 2103-2119, 2000.

WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B.; GEIGER, H.; HOULT, J. R. The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. **Phytochemistry**, v. 51, n. 3, p. 417-423, 1999.

WISEMAN, H. The bioavailability of non-nutrient plant factors: dietary flavonoids and phytoestrogens. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 58, p. 139-146, 1999.

YAMADA, M.; TANABE, F.; ARAI, N.; MITSUZUMI, H.; MIWA, Y.; KUBOTA, M.; CHAEM, H.; KIBATA, M. Bioavailabilty of glucosyl hesperidim em rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70, n. 6, p. 1386-1394, 2006.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Health aspects of functional grape seed constituents. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 15, n. 9, p. 422-433, 2004.

ZHAO, X.; GU, Z.; ATELLE, A. S.; YUAN, C. S. Effects of quercetin on the release of endothelin, prostacyclin and tissue plasminogen activator from human endothelial cells in culture. **J. Ethnopharmacol.**, v. 30, n. 3, p. 279-285, 1999.

ZHOU, Y. C.; ZHENG, R. L. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and antioxidants. **Biochem. Pharmacol.**, v. 42, n. 6, p. 1177-1179, 1991.