



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

JOSENILDA MALVEIRA CAVALCANTI

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DO *Croton zehntneri* E SEU
CONSTITUINTE ANETOL, NA FASE AGUDA DO PROCESSO DE REPARO
TECIDUAL EM CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA
2008**

C376e

Cavacanti, Josenilda Malveira

Efeito do óleo essencial do *Croton zehntneri* e seu constituinte anetol, na fase aguda do processo de reparo tecidual em camundongos / Josenilda Malveira Cavalcanti. — Fortaleza, 2008.

105p.; Il.

Orientadora: Profa. Dra. Andreлина Noronha Coelho de Souza

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.

1. Cicatrização.
2. *Croton zehntneri* Pax et Hoffm.
3. Ferida.
4. Camundongo. I Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde

CDD: 574.1

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DO *Croton zehntneri* E SEU
CONSTITUINTE ANETOL, NA FASE AGUDA DO PROCESSO DE REPARO
TECIDUAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Andrelina Noronha Coelho de Souza

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz

FORTALEZA

2008

JOSENILDA MALVEIRA CAVALCANTI

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DO *Croton zehntneri* E SEU
CONSTITUINTE ANETOL, NA FASE AGUDA DO PROCESSO DE REPARO
TECIDUAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Acadêmico em Ciências
Fisiológicas, da Universidade Estadual do
Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Fisiologia.

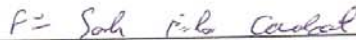
Aprovada em: 08/04/2008

Nota final: 10 Aprovada com louvor

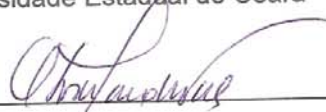
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Andreilina Noronha Coelho de Souza (Orientadora)
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Prof. Dr. Francisco Sales Ávila Cavalcante
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Prof. Dr. Otoni Cardoso do Vale
Universidade Federal do Ceará – UFC

*Agradeço a Deus pelo dom da vida,
pela saúde e pela paz,
pela luz que guiou meus passos nessa caminhada,
e pelas bênçãos em minhas conquistas.*

Aos meus pais
José Pitombeira Malveira (in memoriam)
e Wanilda de Mendonça Malveira,
pelo zelo e dedicação com que me educaram.
Ofereço!

*Às minhas filhas,
Vanessa e Viviane
que são a razão da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente na concretização deste trabalho, e que estiveram juntos nessa caminhada ou parte dela, oferecendo apoio e incentivo. Com certeza sem a ajuda e compreensão de todos seria impossível a realização de tamanha grandeza.

Aos professores da Universidade Estadual do Ceará que colaboraram na formação do conhecimento adquirido nessa caminhada.

Aos funcionários do Instituto Superior de Ciências Biomédicas, e aos funcionários da Secretaria do Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas pela atenção e gentileza dispensada.

Ao Setor de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela preparação das lâminas histológicas.

À amiga e patologista Karuza Maria Alves Pereira, que tão prontamente realizou as análises histológicas.

Ao amigo e veterinário Isaac Neto Goes da Silva pela orientação com o manuseio dos camundongos utilizados, além da valiosa amizade.

Ao Laboratório de Fisiologia Experimental do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará, que sediou os experimentos.

À colega Cybelle Linard que me apresentou a técnica cirúrgica e incentivou essa pesquisa.

Aos colegas de laboratório, aos colaboradores bolsistas Roney e Carol e aos voluntários Renata, Gledson, Ana Carla e Mariana, que contribuíram de forma valiosa para a realização desse estudo.

Ao Laboratório de Física da Universidade Estadual do Ceará, pela colaboração do prof. Dr. Sales Ávila e dos colegas Walber e Daiana.

Ao Laboratório de Eletrofisiologia do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará, em especial ao Pedro Militão, pelo suporte técnico e atenção.

Ao prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso coordenador do Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, pelo apoio e fornecimento do óleo essencial do Croton zehntneri, como também pelo suporte científico.

Aos amigos e colegas da Faculdade Católica Rainha do Sertão, pelo carinho atenção e amizade, o que muito me fortaleceu na conclusão dessa caminhada.

Ao prof. Luís Lacerda, pelas sugestões e contribuição na orientação estatística de dados deste trabalho.

Ao amigo Tiago Olinda, pelos conselhos fitoterápicos, além do incentivo através de sua energia positiva.

Ao colega e amigo Felipe Crescêncio Lima pela dedicação e exemplo de amizade e paciência.

Às amigas especialíssimas Katia Gomes e Rachel Pinho, pelo apoio, amizade, compreensão, dedicação, estímulo constante e exemplo de vida.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa que ajudou a custear essa pesquisa.

Em especial

À professora Doutora Andrelina Noronha orientadora desse trabalho, um exemplo de pessoa, professora e profissional que conduziu esta caminhada com paciência, segurança e competência científica.

Ao Michel Kamimura, que caminhou ao meu lado nesse estudo, pelo suporte científico, pelo seu apoio incondicional, estímulo e companheirismo.

Agradeço!

De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos apenas começando;
A certeza de que é preciso continuar;
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo,
Da queda um passo novo de dança,
Do medo, uma escada,
Do sonho, uma ponte,
Da procura, um encontro.
O homem é do tamanho do seu sonho.
Fernando Pessoa

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fragmento do papiro de Ebers	02
Figura 2. Medicina indígena – o saber dos pajés.....	02
Figura 3. Oficina de Farmácia na Idade Média.....	06
Figura 4. Folhas do <i>Croton zehntneri</i> Pax et Hoffm.....	09
Figura 5. Variação circadiana do óleo essencial do <i>C.zehntneri</i>	10
Figura 6. Estrutura química dos principais constituintes do óleo essencial do <i>C.zehntneri</i> (anetol, estragol) e do eugenol.....	12
Figura 7. Mecanismo simplificado da migração celular.....	18
Figura 8. Efeito tópico do OECz e anetol no edema presente em ferida aberta de camundongos com 3 dias de tratamento.....	38
Figura 9. Efeito tópico do OECz e anetol no exudato presente em ferida aberta de camundongos com 3 dias de tratamento.....	41
Figura 10. Efeito tópico do OECz e anetol no tecido de granulação presente em ferida aberta de camundongos com 7 dias de tratamento.....	44
Figura 11. Efeito tópico do plurônic durante 15 dias sobre a área da ferida aberta em camundongos.....	46
Figura 12. Efeito do tratamento tópico com fibrase e dexametazona durante 15 dias sobre a área da ferida aberta em camundongo.....	47
Figura 13. Efeito do tratamento tópico com anetol, durante 3 dias, sobre a área da ferida aberta em camundongos	48
Figura 14. Efeito do tratamento tópico com OECz, durante 3 dias, sobre a área da ferida aberta em camundongos.....	49
Figura 15. Efeito do tratamento tópico com OECz durante 7 dias sobre a área da ferida aberta em camundongos.....	51
Figura 16. Efeito do tratamento tópico com anetol durante 7 dias sobre a área da ferida aberta em camundongos.....	52
Figura 17. Efeito do tratamento tópico com OECz durante 15 dias sobre a área da ferida aberta em camundongos.....	54
Figura 18. Efeito do tratamento tópico com anetol durante 15 dias sobre a área da ferida aberta em camundongos.....	55
Figura 19. Efeito tópico do anetol e OECz comparado ao efeito tópico da fibrase e dexametazona com 3 dias de tratamento sobre a área da ferida aberta em camundongo.....	57

Figura 20. Efeito tópico do anetol e OECz comparado ao efeito tópico da fibrase e dexametazona com 7 dias de tratamento sobre a área da ferida aberta em camundongos.....	58
Figura 21. Efeito tópico do anetol e OECz comparado ao efeito tópico da fibrase e dexametazona com 15 dias de tratamento sobre a área da ferida aberta em camundongos.....	59
Figura 22. A- Aspecto histológico do grupo controle com 3 dias de pós-operatório.....	60
Figura 23. A- Aspecto histológico do grupo anetol 20% com 3 dias de tratamento.....	61
Figura 24. A- Aspecto histológico do grupo OECzI 20% com 7 dias de tratamento.....	62
Figura 25. A- Aspecto histológico do grupo anetol 20% com 15 dias de tratamento.....	63
Figura 26. A- Aspecto histológico do percentual de colágeno no grupo OECz com 3 dias de tratamento.....	64
Figura 27. Aspecto histológico da proporção de colágeno com 15 dias de PO.....	65
Figura 28. Aspecto das feridas durante as fases da cicatrização.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituintes químicos do óleo essencial do <i>Croton zehntneri</i> Pax et Hoffm.....	30
Tabela 2. Presença de edema em ferida aberta de camundongo animais com 3 dias de tratamento.....	39
Tabela 3. Presença de exudato em ferida aberta de camundongo animais com 3 dias de tratamento.....	42
Tabela 4. Efeito tópico do OECz, anetol, fibrase e dexametazona no tecido de granulação presente em ferida aberta de camundongos com 7 dias de tratamento.....	45
Tabela 5. Efeito do tratamento tópico com anetol e OECz, durante 3 dias, sobre a área da ferida aberta em camundongos.....	50
Tabela 6. Efeito do tratamento tópico com anetol e OECz durante 7 dias sobre a área de ferida aberta em camundongos.....	53
Tabela 7. Efeito do tratamento tópico com anetol e OECz durante 15 dias sobre a área da ferida aberta em camundongos.....	56
Tabela 8. Média do número de células por grupos.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS

OECz – Óleo essencial do *Croton zehntneri*

P 127 – Pluronic

HA – Histamina

5-HT – Serotonina

PO – Pós-operatório

FGFa e b - fator de crescimento de fibroblastos

TGF β - Fator transformador de crescimento

PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

PAF- Fator de Agregação Plaquetária

TNF- α - fator alfa de necrose tumoral

IL-1- interleucina-1

IL-2- interleucina-2

IL-4- interleucina-4

IL-6- interleucina-6

IL-8- interleucina-8

PMN- polimorfonucleares

IFN- γ - interferon

IgE- imunoglobulina E

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1 . INTRODUÇÃO	01
1.1. ÓLEOS ESSENCIAIS.....	03
1.2. <i>Croton zehntneri</i> Pax et Hoffm.....	08
1.3. Anetol, Estragol e Eugenol.....	12
1.4. Resposta Inflamatória e Reparo Tecidual.....	16
2. OBJETIVOS.....	27
3 . IMPORTÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	28
4 . MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Drogas utilizadas.....	29
4.1.1.Preparação das doses.....	29
4.2. Animais de experimentação.....	30
4.4. Experimento in vivo - Modelo de Ferida Aberta.....	31
4.4.1. Grupos experimentais.....	32
4.1.2. Análise macroscópica.....	33
4.1.3. Análise microscópica.....	34
4.5. Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Avaliação macroscópica	36
5.1.1. Coágulo.....	36
5.1.2. Edema.....	36
5.1.3. Exudato.....	39
5.1.4. Crosta.....	42
5.1.5. Tecido de granulação.....	43
5.1.6. Área das feridas.....	45
5.2. Avaliação microscópica.....	59
6. DISCUSSÃO.....	69
7. CONCLUSÃO.....	85
8. REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS	
APÊNDICE	

RESUMO

Atualmente o uso de plantas medicinais tem aumentado mundialmente, assim como a necessidade de conhecer seus possíveis efeitos a fim de estabelecer seu uso correto. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do óleo essencial do *Croton zehntneri* Pax et Hoffm e seu constituinte majoritário anetol na cicatrização de feridas cutâneas. Foram utilizadas 162 fêmeas de camundongos Swiss adultos jovens, com peso médio de 35 gramas. Em cada camundongo foram realizadas duas feridas na região dorsal, com 7,0 mm de diâmetro. Os camundongos foram separados em nove grupos, nomeados de C, F, Dx, OI, OII, OIII, AI, AII e AIII. As feridas cutâneas direitas (D) dos grupos OI, OII e OIII foram tratadas com o OECz 2%, 10% e 20% respectivamente, e as dos grupos AI, AII e AIII foram tratadas com o anetol 2%, 10% e 20% respectivamente. As feridas cutâneas D do grupo C, F e Dx, foram tratadas com solução salina, fibrinolisina desoxirribonuclease e com dexametazona, respectivamente. As feridas cutâneas esquerdas (E) de todos os grupos foram tratadas com pluronic. Aos três dias de pós-operatório (PO), as feridas do grupo OI, OII e OIII apresentavam-se secas e com as bordas regulares. Na avaliação histológica foram encontradas diferenças significativas entre o grupo C, AI, AIII, OI e OIII, onde o grupo AIII apresentava uma porcentagem superior de polimorfonucleares em relação ao grupo OIII. Aos sete dias de PO as feridas do grupo AIII apresentavam-se com aspecto mais úmido, contorno irregular, coloração rósea e presença de crostas que se destacavam facilmente. Aos 15 dias de PO observamos uma predominância de vasos sanguíneos no grupo OII e OIII. Foi observado reepitelização completa após 15 dias de PO na maioria dos animais do grupo OIII e as áreas das feridas dos grupos OI e AI diferiram estatisticamente, em relação aos grupos OIII e AIII. Foi encontrada uma maior porcentagem de colágeno no grupo OIII em relação ao grupo C e AIII, e um tecido de granulação mais organizado em relação aos outros grupos. Conclui-se que o óleo essencial do *Croton zehntneri* Pax et Hoffm 20% promoveu uma reepitelização mais acentuada do que o grupo controle e o grupo AIII, ocorrendo assim uma melhor cicatrização das feridas cutâneas nos camundongos.

Palavras-chaves: camundongo, cicatrização, *Croton zehntneri* Pax et Hoffm, ferida.

ABSTRACT

The use of medicinal plants for the world-wide population has actually increased, consequently it is necessary to know the possible effect in order to establish the correct use. The objective of this study was to evaluate the effects of essential oil of *Croton zehntneri* Pax et Hoffm and their major constituent anethole in the tissue repair of skin wounds. In the present experiment, it was used 162 female of young adults Swiss mice with average weight of 35 g. In each mice it was made two wounds in the dorsal region with 7.0 mm of diameter. The animals were divided in nine groups named C, F, Dx, OI, OII, OIII, AI, AII and AIII. The right skin wounds (D) of the groups OI, OII and OIII were treated using base gel OECz 2%, 10% and 20% respectively, and the groups AI, AII and AIII were treated with anethole 2%, 10% and 20%, respectively. Cutaneous wounds D in groups C, F and Dx were treated with saline solution, commercial fibrase and dexametazona, respectively. Finally, left skin wounds (E) of all groups were treated using pluronic base gel only. In the third day of postoperative (PO), the wounds of group OI, OII and OIII could be observed as dry and with regular borders. In the histological evaluation were found significative differences between groups C, AI, AIII, OI and OIII, where the group AIII presented a higher percentage of neutrophils cells than group OIII. In the seventh day of PO the wounds of group AIII have presented a humid aspect, irregular border, rose coloured and with an scab which could be easily observed. At 15 days of PO it was observed a predominance of blood vessels in group OII and OIII. It was observed a complete reepithelialization after 15 days of PO in most of the animals of group OIII, and the areas of the wounds of the groups OI and AI shows a statistically significant difference in relation to the groups OIII and AIII. It was found a higher collagen percentage in group OIII than in groups C and AIII, and its granulation tissue was more organized than the other groups. The results of this work demonstrated that the essential oil of *Croton zehntneri* Pax et Hoffm 20% performed a better reepitelization than the other groups, promoting a better healing of skin wounds in mice.

Key words: cicatrization, *Croton zehntneri* Pax et Hoffm, mouse, wound healing.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como medicamento remonta às antigas civilizações desde o início da vida na Terra, e foi sofrendo modificações com o decorrer do tempo, pela influência das diversas culturas, produzindo grande conhecimento popular. As práticas indicavam que vegetais que eram utilizados preferencialmente como alimento em alguns países, transformaram-se em aliados no arsenal terapêutico em outras regiões. As plantas medicinais na medicina popular, por suas propriedades terapêuticas, adquiriram fundamental importância dando origem à fitoterapia que é a forma de tratamento e prevenção de doenças através da utilização de plantas. Estas plantas sintetizam, através de seu metabolismo primário, diversos nutrientes e metabólitos ativos e, através do metabolismo secundário, substâncias com ação farmacológica denominadas de princípios ativos (VERDI *et al.*, 2005).

Os primeiros conhecimentos sobre plantas medicinais, remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers, que foi descoberto e publicado por Georg Ebers, sendo traduzido pela primeira vez, em 1890, por H. Joachin. Esse papiro foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, na época da XVIII dinastia. Enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (ROBINSON, 1975).

No famoso papiro decifrado em 1873 pelo egiptólogo alemão Georg Ebers, existe a seguinte afirmação introdutória: “Aqui começa o livro relativo à preparação dos remédios para todas as partes do corpo humano”. Provou-se que o papiro de Ebers representa o primeiro tratado médico egípcio conhecido, da primeira metade do século XVI antes da era cristã, em que parte do seu texto, é destinado ao tratamento das doenças internas e, o restante, dá indicações sobre a constituição dos medicamentos a se empregar, muitos dos quais são plantas aromáticas (Fig. 1) (PINTO *et al.*, 2002).

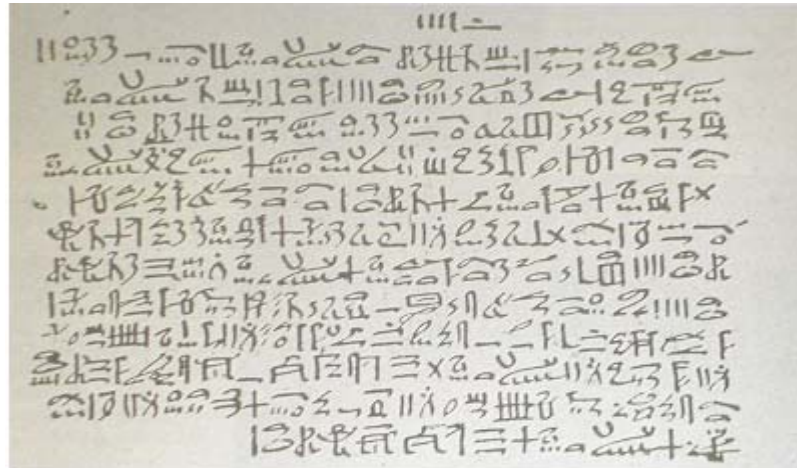


Figura 1. Fragmento do papiro de Ebers -

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2a/Georg_Ebers.jpg/180px-Georg_Ebers.jpg

No Brasil, principalmente pela extensa e diversificada flora, riquíssima em exemplares, o uso de plantas medicinais sempre foi significativo, fazendo parte da cultura popular. Essa prática sofreu as influências da colonização onde inicialmente, o conhecimento das propriedades terapêuticas dos vegetais se deu de forma intuitiva com base em observações de práticas culturais curativas do povo indígena que se utilizava de plantas medicinais para o alívio de suas afecções (Fig. 2) (VEIGA & PINTO, 2002).



Figura 2. Medicina indígena – o saber dos pajés. <http://saudealternativa.org/wp-content/uploads/2007/12/lachamanapormiguelcamargo.jpg>

Os primeiros médicos portugueses que vieram para o Brasil diante da escassez na colônia, de remédios empregados na Europa, precocemente perceberam a importância dos remédios indígenas. Um dos primeiros cronistas da nossa história, Gabriel Soares de Souza, em 1587, denominou os produtos medicinais utilizados pelos índios de “as árvores e ervas da virtude” (VEIGA & PINTO, 2002).

A prática da medicina popular se expandiu de forma que, atualmente, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população já fez uso de algum tipo de erva na busca de alívio de algum sintoma patológico, e menos de 30% deram-se por indicação médica. Esses dados sugerem que o uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos tempos. Com o passar do tempo, tornou-se necessário um estudo sistemático do ponto de vista científico, com o intuito de comprovar as ações farmacológicas, bem como ter conhecimento dos efeitos indesejáveis dessas plantas medicinais, que dentre elas, as denominadas aromáticas, constituem um grupo especial que possuem em comum a presença de óleos essenciais com diversos fins terapêuticos (SILVA & CASALI, 2000).

1.1. Óleos Essenciais

Óleos essenciais são compostos voláteis produzidos pelas plantas para sua sobrevivência em seu ecossistema, como na defesa contra microorganismos e predadores e na atração de insetos e outros agentes fecundadores na atração de polinizadores (LAVABRE, 1993).

A espécie vegetal produz compostos primários, tais como açúcares e nitrogenados, e também compostos secundários que não são utilizados diretamente para sua alimentação e nutrição. Entre os compostos secundários estão os alcalóides, os flavonóides, as saponinas e os óleos essenciais. Os óleos essenciais são líquidos voláteis dotados de aroma forte e quase sempre agradável, provenientes do metabolismo secundário de determinadas espécies (MICHELIN *et al.*, 2005; ARAUJO *et al.*, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2003).

Os óleos essenciais são secretados por estruturas especiais da planta e encapsulados em tricomas, formando uma estrutura semelhante a bolsas. Estes tricomas são rompidos naturalmente pela espécie vegetal, liberando o óleo essencial, que forma uma espécie de “nuvem aromática” ao seu redor. Por isto são denominados como sendo "A alma da planta" ou "A energia vital da planta". Desta forma, podem estar presentes em diversos órgãos da planta, difundido pelas partes aéreas, nas flores, nas folhas, no lenho, nas raízes e nas sementes. Encontram-se na forma de pequenas gotas entre as células e estão associados a funções necessárias à sobrevivência do vegetal (GONÇALVES *et al.*, 2003; MATOS & MATOS, 1989; TISSERAND & BALACS, 1995).

Existem quase duas mil espécies de plantas produtoras de óleos essenciais, distribuídas em sessenta famílias diferentes. Estima-se que aproximadamente 3000 tipos de óleos essenciais são conhecidos, dos quais mais ou menos 300 são comercialmente importantes, destinados principalmente para o mercado de fragrâncias, aromatizantes e condimentos.

Os óleos essenciais não são substâncias quimicamente puras, mas misturas de hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos oxigenados. Do ponto de vista químico um óleo essencial é uma mistura heterogênea e complexa, possuindo de 50 a 300 constituintes voláteis distribuídos principalmente entre: terpenóides (mono e sesquiterpenos), lignóides (alil e propenil derivados), hidrocarbonetos, fenóis, éteres, ésteres, aldeídos, cetonas, álcoois e ácidos (CRAVEIRO *et al.*, 1981). Tal diversidade e complexidade fazem do óleo essencial puro um produto altamente valorizado, com aplicação em diversas áreas. Na área da saúde devido ao seu potencial terapêutico, área da perfumaria e cosmética devido a sua refinada e complexa composição aromática, área alimentícia devido ao seu potencial como aditivo flavorizante, área de aromatização ambiental e produtos domo sanitários e a mais nova área, que é a da moda confeccionando fibras onde os óleos essenciais inicialmente retidos vão sendo liberados na medida da utilização das peças em couro, bolsas, cintos, roupas (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

As substâncias constituintes dos óleos essenciais são produzidas bioquimicamente, através de rotas metabólicas secundárias impulsionadas

energeticamente pela radiação solar, absorvida durante a fotossíntese. As moléculas de estrutura química do tipo aromática como o anetol, são produzidas pela via dos fenilpropanóides (MATOS, 2000). Na mistura, os compostos aparecem em diferentes concentrações. O aroma e ação dos óleos essenciais depende tanto da presença dos componentes majoritários, que estão em alta concentração na mistura total (20% a 80%), como dos minoritários e mesmo os que estão em baixíssimas concentrações (0,01%) (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

A genética determina a composição química dos óleos essenciais de uma planta, podendo aparecer variações pela existência de quimiotipos ou raças químicas. Além disso, outros fatores também podem influenciar na composição dos óleos essenciais (LAVABRE, 1993; SILVA & CASALI, 2000) tais como ciclo vegetativo, (onde o teor de seus constituintes pode ser mais elevado nos frutos maduros do que nos frutos verdes), órgão utilizado para extração (no óleo extraído das folhas do *Zanthoxylum syncarpum* – limãozinho – predominam os hidrocarbonetos, enquanto no das raízes predominam os álcoois sesquiterpênicos, e fatores extrínsecos como temperatura, hora do dia em que é feita a coleta (no óleo do *C. zehntneri* coletado em Viçosa-CE às 06:00 hs, o *E*-anetol apresenta-se em maior percentual o coletado às 13:00 hs no mesmo dia), época do ano e quimiotipos (MATOS & MATOS, 1989; MORAIS *et al.*, 2006).

Os óleos essenciais podem ser obtidos por métodos conhecidos como, fermentação, eflourage, extração, ou impressão, porém o método mais utilizado é o de destilação por arraste de vapor (VAN DE BRAAK & LEIJTEN, 1999; GONÇALVES *et al.*, 2003). Esse método de destilação de óleos essenciais foi primeiramente usado no Egito, Índia e Pércia há mais de 2000 anos, sendo aperfeiçoado no séc. IX pelos árabes (BAUER *et al.*, 2001). O físico catalão Vilanova (ca. 1235–1311), foi quem oficialmente, primeiro descreveu o método de destilação por arraste a vapor (GUENTHER, 1948).

No Egito entre os anos 3000 a 2000 A.C., já se obtinham os óleos essenciais de modo rudimentar. Os médicos dessa época já os utilizavam para tratar os doentes, mas principalmente em práticas mágicas. No séc. XIII, os

óleos essenciais eram produzidos em farmácias (Fig. 3), e seus efeitos farmacológicos eram descritos em farmacopéias (BAUER *et al.*, 2001). O alemão Alam Lonicir publicou em 1551, o “Kraüterburch”, primeira obra contendo referências para o uso médico de ervas e óleos de sementes aromáticas (TISSERAND & BALACS, 1995).



Figura 3. Oficina de Farmácia na Idade Média -

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2a/Georg_Ebers.jpg/180px-Georg_Ebers.jpg

Muitas espécies de plantas produtoras de óleos essenciais são abundantes no Nordeste do Brasil e largamente usadas na medicina e na indústria. São usados como edulcorantes e aromatizantes (CRAVEIRO *et al.*, 1977), componentes de sabões e cosméticos e utilizados na fabricação de doces caseiros, licores, bebidas e aguardente de cana (MATOS & FERNANDES, 1975, 1978; CRAVEIRO *et al.*, 1977).

No Brasil, encontra-se uma flora muito extensa e com potencial terapêutico a ser investigado. No Nordeste, o estudo das plantas odoríferas, muitas usadas como plantas medicinais pela população, resultou na descoberta de vários óleos essenciais, entre eles encontram-se aqueles que são matérias-primas dotadas de propriedades aromáticas, anti-sépticas e farmacológicas. (CRAVEIRO *et al.*, 1981). Os óleos essenciais de algumas plantas aromáticas da região Nordeste foram estudados do ponto de vista químico (CRAVEIRO *et al.*, 1977), e farmacológico (LEAL-CARDOSO e FONTELES, 1999), demonstrando potencialidade de utilização terapêutica.

A complexidade química permite que óleos essenciais tenham uma diversidade de efeitos biológicos, tais como: antimalárico (KLAYMAN, 1985), antiparasitários, antimicrobianos, analgésicos, diuréticos e hipotensores (BEZERRA, 1994; LAHLOU *et al.*, 1999) anti-alérgico (PASSOS, *et al.*; 2006), anti-bacteriano (BURT, 2004), pesticidas (ISMAN *et al.*, 2000), anti-diabético (HITOKATO *et al.*, 1980). Os terpenóides possuem atividade antimicrobiana, anticarcinogênica, anti-inflamatória e inseticida (MURAKAMI *et al.*, 2004; HAN, 2005; GRODNITZKY & COAST, 2002; GRIFFIN *et al.*, 1999; LIMA *et al.*, 2003), e são utilizados como aditivo na indústria alimentícia e cosmética. Estudos demonstraram que óleos essenciais que possuem o eugenol, anetol, e o linalol como constituintes, apresentaram atividade larvicida específica contra larvas das espécies dos mosquitos *Culex pipiens L.* e *Ochlerotatus caspius*, oriundos do Líbano (KNIO *et al.*, 2007).

Recentes pesquisas utilizando medições de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) da região cerebral mostram que o sistema límbico é ativado durante a inalação de óleo essencial de lavanda *Lavandula officinallis*, esclarecendo a influência dos aromas nas emoções, sensações, lembranças e recordações. Óleos essenciais específicos estão sendo utilizados no tratamento de pacientes com problemas na área da memória e mesmo em casos de amnésia total, Mal de Alzheimer e Demência Vasculosa. Em 2004, o Prêmio Nobel de Medicina em Fisiologia foi concedido a dois cientistas, Richard Axel e Linda B. Buck, por suas descobertas sobre os receptores odoríferos e a organização cerebral do sistema olfativo, o que mostra a atual importância desta área para a ciência (WOLFFENBÜTTEL, 2007; AXEL & BUCK, 2004).

Na área da perfumaria cientistas cearenses desenvolveram recentemente no Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará - PADETEC, estudos utilizando a ingestão de cápsulas de óleo essencial de lavanda extraído do coentro, com a finalidade de perfumar o corpo através de sua eliminação na pele pela transpiração.

1.2. *Croton zehntneri* Pax et Hoffm

O *Croton zehntneri* Pax et Hoffm é uma planta do gênero *Croton*, um dos maiores gêneros da família *Euphorbiaceae*. Essa família é composta de cerca de 290 gêneros e milhares de espécies ocorrendo em abundância no mundo inteiro, preferencialmente nas regiões tropicais e temperadas. O gênero *Croton* caracteriza-se por sua variedade de cerca de 1200 espécies, de distribuição neotropical (JUDD *et al.*, 1999), com poucos representantes paleotropicals, a maioria distribuída nas Antilhas e América do Sul, e algumas na América do Norte (WEBSTER, 1994; GOVAERTS *et al.*, 2000).

Suas espécies são árvores, arbustos, ervas e lianas, geralmente monóicas, algumas vezes dióicas, com tricomas de vários tipos, inflorescências com as flores pistiladas na base e estaminadas no ápice, estames dobrados no botão floral e pétalas das flores pistiladas reduzidas ou ausentes (Fig. 4). Apresenta óleos essenciais e constituintes ativos como terpenóides, flavonóides e alcalóides, sendo com freqüência utilizada na medicina popular, possuindo algumas espécies, propriedades terapêuticas já comprovadas (JUDD *et al.*, 1999). Largamente espalhado na flora nordestina brasileira, nas regiões de cerrado, matas dos tabuleiros litorâneos, matas pluviais e, principalmente, nas caatingas nordestinas, o gênero *Croton* é muito importante pela sua utilidade na medicina popular (DUCKE, 1959). De acordo, com as denominações populares, as espécies de *Croton* nativas no Nordeste do Brasil, podem ser agrupadas em quatro categorias: canelas silvestres, marmeleiros, velames e outras espécies de *Croton* (FERNANDES *et al.*, 1971).

O *C. zehntneri* é uma planta do Nordeste brasileiro, encontrada em grandes quantidades no estado do Ceará, conhecida popularmente como canela-de-cunhã. Possui um odor agradável que lembra anis (*Illicium verum*) e cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) ou à mistura de ambos (FERNANDES *et al.*, 1971) que é exalado por todas as partes da planta (COELHO-DE-SOUZA, 1997). Suas folhas e talos são usados como adoçantes de comidas e bebidas, seus extratos são usados na forma de chás e infusões para o alívio de

distúrbios gastrointestinais, como sedativo, estimulador do apetite (CRAVEIRO *et al.*, 1977,1978). Relatos populares, na região de Viçosa no Ceará, onde existe um grande número de exemplares nativos, descrevem a utilização de suas folhas maceradas para a cicatrização de certos tipos de lesões cutâneas.



Figura 4. Folhas do *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. coletado na Serra de Ibiapaba próximo à cidade de Viçosa, Ceará. Uma amostra exsicata sob o número 27477 está depositada no Herbário Prisco Bezerra (UFC).

Seu aroma mostra-se variável entre exemplares desta planta coletados em diferentes localidades do Nordeste. Isto se deve à variação na concentração dos constituintes químicos mais abundantes nos seus óleos essenciais. Assim, distinguem-se para esta espécie quatro tipos químicos como: anetol – para os exemplares coletados em Fortaleza (CE) e Viçosa (CE); eugenol - para os coletados em Areia Branca (RN) e Quixadá (CE); metileugenol - para os coletados em Ipu (CE) e Oeiras (PI) e estragol - para os exemplares coletados em Tianguá (CE) e Granja (CE) (DE MORAIS *et al.*, 2006).

No Ceará o *C. zehntneri* está á sujeito a períodos de Chuva (Janeiro a Maio) e períodos de estiagem. A análise dos constituintes da planta coletada em suas regiões nativas em horários diferentes do dia, revelou uma variação circadiana destes constituintes, apresentando alto teor de óleo essencial (3% v/w) quando cultivada com irrigação tendo o (E)-anetol seu principal constituinte (Fig. 5).

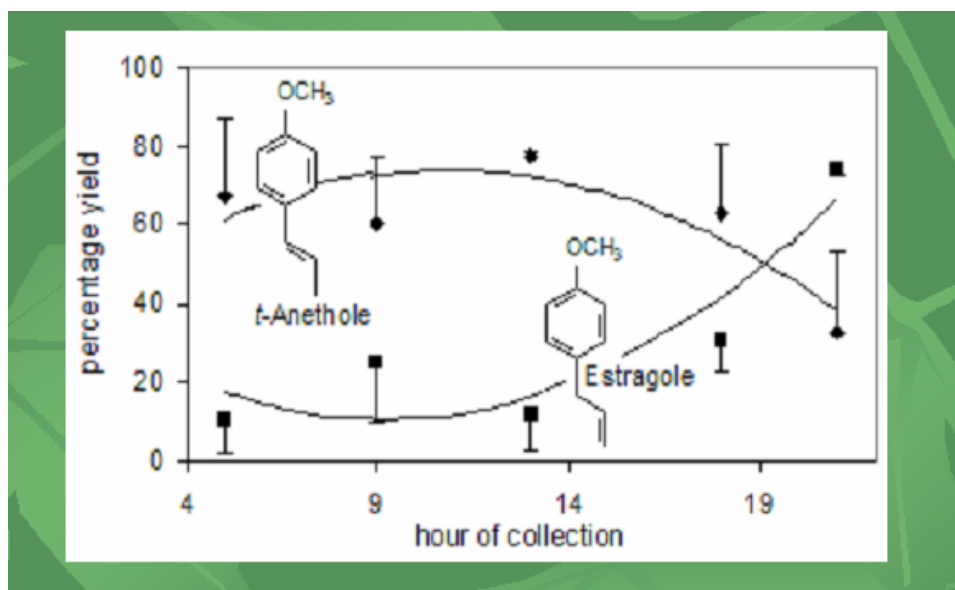


Figura 5. Variação circadiana do óleo essencial do *C. zehntneri* - disponível em www.ivsboe.padetec.ufc.br/palestras/selene.pdf

Os estudos disponíveis com o óleo essencial do *Croton zehntneri* (OECz) e com seus principais constituintes sugerem ações farmacológicas com efeito relaxante em músculo liso intestinal de cobaia, o que justifica seu uso popular como antiespasmódico gastrointestinal (COELHO DE SOUZA *et al.*, 1998). Atividade em músculos esqueléticos foram referidas em experimentos onde a ação do OECz induziu contrações em músculo diafragma de rato, e por outro lado, inibiu contrações evocadas por estimulação nervosa, o que sugere dois mecanismos de ação diferentes em fibras musculares: bloqueando a transmissão neuromuscular na membrana pós-juncional, e incrementando a liberação do cálcio mioplasmático pelo retículo sarcoplasmático (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995).

Efeitos cardiovasculares como hipotensão, seguido de uma ação vasoconstritora, e bradicardia foram observados em estudos experimentais. Estudos demonstraram, que o OECz e seus principais constituintes (anetol e estragol) induziram uma baixa inicial na pressão sanguínea seguida de uma resposta hipertensiva provavelmente devido a uma inibição da produção de

óxido nítrico, em ratos normotensos e conscientes. (SIQUEIRA *et al.*, 2006; LAHLOU *et al.*, 2004)

Estudos documentam que em sistema nervoso, os extratos do *Croton zehntneri* têm efeito tranqüilizante e talvez analgésico (BERNARDI *et al.*, 1991). Por outro lado, efeito anticonvulsivante, elevando o limiar para o surgimento das convulsões mínimas induzidas por PTZ (pentilenotetrazol) um estimulante central, foi observado em estudo experimental posterior (BATATINHA *et al.*, 1995).

Estudos realizados por Oliveira (2001), indicam atividade antinocioceptiva e anti-edematogênica do OECz, por diferentes mecanismos. O efeito antinocioceptivo do OECz foi investigado, em camundongos, utilizando três modelos diferentes de testes nociceptivos: formalina, placa quente ($50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os achados desse estudo sugerem que o OECz foi efetivo como agente antinocioceptivo indicando ações em sítios centrais, sugerindo também atividade anti-inflamatória uma vez que inibiu a formação do edema de pata (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Aliado a isso, estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que o OECz bloqueia os efeitos da histamina em músculo liso intestinal de cobaia (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997) sugerindo que essa, pelo menos em parte, se deva a uma inibição dos efeitos da HA e/ou 5-HT na atividade anti-edematogênica.

Morais e colaboradores 2006, investigaram a atividade antioxidante do OECz utilizando mecanismos que envolvem a geração de radicais livres derivados do oxigênio e peroxidação lipídica, e demonstraram que essa se deve provavelmente à presença entre seus constituintes químicos componentes antioxidantes, já descritos na literatura com ação já relatada como E-anetol (MORAIS *et al.*, 2006).

Estudos recentes mostram propriedades larvicidas através dos hidrolatos referentes ao caule e folha do *C. zehntneri* que causaram 100% de mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* (LIMA *et al.*, 2006), e propriedades anti-helmínticas sobre nematóides intestinais de ratos (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007). Em adição, estudos realizados *in vivo* e *in vitro*,

contra *Microsporium canis*, revelaram a propriedade antifúngica do OECZ como promissora fonte fitoterápica de um novo agente de baixa toxicidade para tratar a dermatofitose (FONTENELLE *et al.*, 2008).

A investigação sobre a atividade do OECz na mucosa gástrica, revelou o efeito antiulcerogênico observado no modelo de lesões induzidas por etanol e sugerem uma ação gastroprotetora devida, em parte ao aumento da secreção de muco no estômago (BARRETO, 2005). As últimas pesquisas realizadas com o OECz, indicam uma atividade hepatoprotetora contra danos causados por uma superdosagem (500_{mg/kg}) de acetaminofeno, de forma dose não dependente. Porém O OECz não foi capaz de proteger o fígado de uma lesão hepática induzida por etanol em excesso (5_{g/kg}) (LIMA *et al.*, 2008).

1.3. Anetol, Estragol e Eugenol

O anetol, o estragol e o eugenol são derivados do fenilpropano que ocorrem com bastante frequência nos óleos essenciais de muitas plantas como no óleo essencial do *C. zehntneri*. Possuem estruturas moleculares semelhantes, e compartilham alguns dos mesmos efeitos biológicos sobre organismos vivos (Fig.6). Alguns efeitos biológicos desses constituintes bem como do óleo essencial e de pseudo-hidrolato obtido do óleo extraído das folhas do *C. zehntneri* já foram descritos (CAUJOLLE & MEYNIER, 1958; ALBUQUERQUE *et al.*, 1995; COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997, 1998).

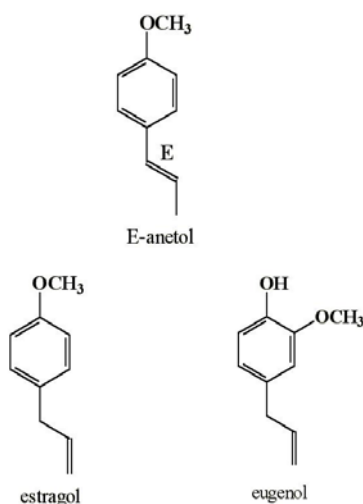


Figura 6. Estrutura química dos principais constituintes do óleo essencial do *C. zehntneri* (anetol, estragol) e do eugenol.

Um dos isômeros do anetol, o estragol que, como este, apresenta odor de anis embora não possua seu sabor adocicado, possui ação depressora sobre o SNC, que incluem diminuição dos reflexos comportamentais como observação e curiosidade (LE BOURHIS & SOENEN, 1973), discreta potencialização do “sleeping time” do pentabarbital (SETO & KEUP, 1969), efeito anestésico, miorelaxante e anticonvulsivante (DALLMEIR, 1981; DALLMEIR & CARLINI, 1981; ALBUQUERQUE *et al.*, 1981).

Estudos realizados a partir de outro isômero do anetol, o eugenol, demonstram que, em altas concentrações, ele é capaz de inibir fortemente a atividade bacteriana, bem como o crescimento de vários microrganismos fúngicos patogênicos, sendo eficaz no tratamento de enfermidades infecciosas oral (ESCOBAR, 2002). Estudos evidenciaram a presença de propriedades anti-inflamatórias, na inibição da expressão da ciclooxygenase-2 em macrófagos de camundongos ativados por lisofosfatidilcolina (LPS) (KIM, *et al.*, 2003). O eugenol também foi capaz de inibir a atividade da lipo-oxigenase-5 em células polimorfonucleares de humanos (RAGHAVENRA *et al.*, 2006). Possui ainda propriedades analgésicas, anestésica local (DALLMEIR & CARLINI, 1981; SIEMONEIT *et al.*, 1966), espasmolítica; antisséptica; reduzindo a febre por ação central, comparando-se ao acetaminofeno (FENG & LIPTON, 1987). Outros estudos revelaram atividade com efeito inibidor da desgranulação mastocitária prevenindo a reação anafilática (KIM *et al.*, 2003).

Anetol (ou trans-anetol) é um composto aromático de origem vegetal responsável pelo aroma e pelo sabor de anis, ou erva-doce. É comercializado em diversos graus de pureza sob vários nomes, entre os quais p-propenilanisol, cânfora de anis, isoestragol, extrato de erva-doce, extrato de anis e óleo de anis. A nomenclatura padrão IUPAC é trans-1-metoxi-4-(prop-1-enil) benzeno sendo classificado quimicamente como um éter insaturado. Seu isômero cis-anetol apresenta características físicas diferentes. A sua fórmula química é $C_{10}H_{12}O$, sendo estreitamente relacionado com o estragol, um composto de ocorrência natural em um grande número de herbáceas, provenientes na maioria de regiões temperadas, com odor característico pela presença de canais oleíferos (aniz, cerefólio, coentro, cominho, endro, salsa, e

salsão). Está presente em grande concentração como constituinte majoritário nos exemplares do *Croton zehntneri* nativos da região de Fortaleza e Viçosa-CE (CRAVEIRO *et al.*, 1981)

O eugenol e o anetol mostraram efeito modulador das concentrações intracelulares de substâncias antioxidantes como o glutathione e a enzima glutathione-N-transferase (DRUKARCH *et al.*, 1997; ROMPELBERG *et al.*, 1996; BOUTHILLIER *et al.*, 1996; STOHS *et al.*, 1986). Essas substâncias, além de antioxidantes, também inibem a peroxidação lipídica (STOHS *et al.*, 1986; NAGABABU & LAKSMAIAH, 1994; MANSUY *et al.*, 1986) e atuam como removedores de radicais hidroxilas (TAIRA *et al.*, 1992). De maneira semelhante ao anetol e ao estragol, o eugenol mostra atividade depressora do SNC apresentando efeito anestésico geral, hipnótico e indutor de hipotermia (SELL & CARLINI, 1976; DALLMEIER & CARLINI, 1981).

O trans-anetol é bastante utilizado, como aromatizante, na fabricação de bebidas (licores, gins, aguardentes da cana etc.) e em formulações farmacêuticas (LE BOURHIS & SOENEN, 1973; ALBUQUERQUE, 1982; COELHO-DE-SOUZA, 1997). Entre os efeitos do anetol podemos citar a inibição reversível da formação de glicogênio (COTE *et al.*, 1951), ação estrogênica em ratos (ZONDEK & BERGMANN, 1938), ação depressiva sobre o sistema nervoso central (BOISSIER *et al.*, 1967), propriedades psicolépticas quando através de altas doses em camundongo (LE BOURHIS & SOENEN, 1973), ligeiro efeito analgésico, anticonvulsivante e hipnótico (LE BOURHIS & SOENEN, 1973) e antimicrobiana (CAPECK, 1956).

Foi sugerido que o OECz, o anetol e o estragol, em músculo esquelético do sapo, parecem agir em dois diferentes sítios: na transmissão neuro-muscular, bloqueando-a, e no retículo sarcoplasmático, aumentando a concentração citoplasmática de cálcio (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995).

Também foram estudados os efeitos do óleo essencial do *C. zehntneri*, do anetol e do estragol em vários músculos lisos de cobaia e em parâmetros cardiovasculares. Em íleo, o OECz e o estragol diminuíram o tônus e induziram movimentos rítmicos espontâneos. (COELHO-DE-SOUZA, 1997).

Existem evidências de que o anetol diminui a produção de IL-2 através de seu efeito em função de células T. O mecanismo de regulação desse efeito

foi determinado pela análise quantitativa / competitiva RT-PCR e ELISA, respectivamente (SU YEA *et al.*, 2006).

Estudos com o anetol demonstraram um aumento dos níveis intracelulares de glutathiona e glutathiona-S-transferase e ainda que o TNF- α induziu a inibição de respostas celulares, bem como a peroxidação lipídica (CHAINY *et al.*, 2000 e DUVOIX *et al.*, 2004). Embora os estudos de CHAINY *et al.*, tenham demonstrado que o anetol inibiu o fatores de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) e proteína ativadora-1 (AP-1) e TNF- α induzido de células leucêmicas ML1- α (CHAINY *et al.*, 2000), DUVOIX *et al* mostraram que o anetol não apresentou nenhum efeito inibitório sobre TNF- α e TPA-induzido, NF- κ B e AP-1, presentes em células leucêmicas K562 (DUVOIX *et al.*, 2004). Por outro lado, o eugenol (1-alil-4-hidroxi-3-metoxibenzeno) e isoeugenol (4-hidroxi-3-metoxi-1-propenilbenzeno), que estão estruturalmente relacionadas com o anetol, foram reconhecidos por modular as respostas imunitárias mediadas através de respostas de células T (SIEBEN *et al.*, 2001).

Devido a sua ampla utilização, o potencial de toxicidade anetol foi estudado *in vivo* e *in vitro*. Com base nas conclusões de vários estudos, o anetol é considerado anti-genotóxico e anti-carcinogênico, e é reconhecido como seguro (GRAS), com base no reconhecimento de desintoxicação metabólica em humanos (ABRAHAM, 2001, CHAINY *et al.*, 2000 e DUVOIX *et al.*, 2004). Alguns trabalhos têm atribuído ao anetol e ao eugenol, atividade anticarcinogênica (REDDY *et al.*, 1993; REDDY, 1996, 1997; AL-HARBI *et al.*, 1995), outros estudos atribuem ao anetol atividades citotóxicas sobre células HeLa (células carcinogênicas de proliferação anormal) (STOJCEV *et al.*, 1967). Estudos sugerem que, em fumantes, ADT (anethole dithiolethione) é um agente químico potencialmente eficaz para o câncer de pulmão (LAM *et al.*, 2002).

Estudos revelaram que o anetol apresentou efeitos sinérgicos sobre a atividade antifúngica de fitoquímicos contra *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (FUJITA *et al.*, 2007). Evidências relatadas a partir da análise da atividade antimicrobiana foi relacionada ao anetol presente em grande concentração no *Illicium verum* Hook. F. (DE M *et al.*, 2001).

Atividade larvicida do anetol contra o mosquito *Ochlerotatus caspius* característico da região do Líbano, foi relatada por KNIO e colaboradores

(2008). O anetol presente em grande concentração no OECz, mostrou potente atividade larvicida (CL50 de 28 ppm), contra o mosquito *Aedes aegypti* o principal vetor da dengue, doença endêmica no Brasil (MORAIS *et al.*, 2006). Foi ainda relatado a ação inseticida do anetol (MARCUS & LICHTENSTEIN, 1979).

Em relação aos aspectos bioquímicos, recentes estudos demonstraram a oxidação seletiva de anetol com peróxido de hidrogênio para anisaldeído através da utilização de um novo e eficiente processo catalítico (XIAO *et al.*, 2008).

Adicionalmente está bem descrito na literatura que o anetol como principal componente do óleo essencial de *Foeniculum vulgare*, apresentou atividade antitrombótica devido a uma ação antiagregante com efeito desestabilizador sobre o coágulo além de uma ação vaso relaxante. Agregado a essa resposta o anetol presente no óleo essencial de *F. vulgare* (100 mg kg⁻¹ administração oral), proporcionou proteção significativa em lesões gástricas induzidas por etanol em ratos (TOGNOLINI *et al.*, 2007).

Ação antioxidante do anetol com atividade neuroprotetora para a doença de Parkinson, foi evidenciada em estudos que avaliaram a inibição da MAO reduzindo o “stress” oxidativo e a neurodegeneração por meio da cultura de astrócitos (DRUKARCH *et al.*, 2006).

1.4. Resposta Inflamatória e Reparo Tecidual

A capacidade auto-regenerativa é um fenômeno necessário para a existência. Nos organismos superiores, ocorre o reparo de tecidos que se dá pela regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido. Essa resposta defensiva e complexa permite ao organismo mamífero destruir, diluir ou imobilizar o agente agressor, sendo este de natureza química (toxinas ou substâncias cáusticas), física (traumas, calor e irradiação) ou biológica (ROCHA & SILVA, 1978).

A cicatrização visa à restauração dos tecidos lesados, a fim de preservar suas funções e consiste em uma série de eventos simultâneos, alguns dos quais continuam por anos após o restabelecimento da integridade física do tecido lesado (FINE & MUSTOE, 2001).

Para a pele caracterizam-se três tipos principais de lesões: lesão superficial, lesão profunda e lesão aberta. A lesão é considerada superficial quando atinge somente o epitélio sem comprometer a camada basal da derme, existe epitelização por deslocamento das células sem resultar em cicatriz. Quando constituída por ferida incisa limpa com perda inapreciável de tecido, mínima hemorragia, ausência de infecção e com bordas bem justapostas, a lesão é considerada profunda. A lesão aberta caracteriza-se por perda de substância, com ou sem infecção, bordas irregulares com ou sem justaposição, havendo preenchimento do espaço por uma massa de vasos e células neoformadas que constitui o tecido de granulação com posterior reorganização e conversão em tecido fibroso (WEISSMAN, 1992).

Em termos clínicos, a cicatrização pode ser classificada em primeira, segunda ou terceira intenção (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000). A cicatrização por primeira intenção advém da sutura por planos anatômicos. Na cicatrização primária não há perda tecidual. O exemplo clássico de cicatrização por primeira intenção é o das feridas cirúrgicas, onde o reparo é mais rápido com um melhor resultado final, visto que a fenda da ferida é mais estreita e a destruição tecidual nas suas bordas é menor. Na cicatrização por segunda intenção a evolução cicatricial da ferida é espontânea, bordos da ferida, ficam afastados, o próprio organismo preenche o espaço necessário à cicatrização. Na cicatrização por terceira intenção ou cicatrização primária tardia, para acelerar o processo de cicatrização secundária pode-se realizar aproximação das bordas da ferida com pontos de sutura simples. Fisiologicamente, o mecanismo de cicatrização é o mesmo, variando na duração do processo e nos resultados estético-funcional, que são melhores na cicatrização primária (WEISSMAN, 1992).

Os eventos relacionados com o processo de cicatrização ocorrem na mesma ordem em tipos diferentes de tecidos, independente do estímulo causador da lesão. Assim, úlceras duodenais, fraturas ósseas, infarto do miocárdio, acidentes cerebrovasculares, incisões cirúrgicas e feridas traumáticas, passam pelo mesmo processo reparador (FINE & MUSTOE, 2001).

As características assumidas pela lesão, ao longo de sua evolução, resultam da sucessão ou sobreposição de eventos celulares e tissulares resultantes da ativação celular por mediadores químicos. Logo a cicatrização de feridas envolve a indução de um processo inflamatório agudo pelo ferimento, a regeneração de células parenquimatosas, a migração e a proliferação de células teciduais parenquimatosas e conjuntivas, a síntese de proteínas da matriz extracelular, o remodelamento do tecido conjuntivo e dos componentes parenquimatosos, a colagenização e a aquisição de força pela ferida (WEISSMAN, 1992). Dessa forma o processo de reparo pode ser dividido em três fases: inflamação, proliferação e remodelação. Na fase da inflamação os principais eventos são: hemostasia, quimiotaxia leucocitária e diapedese, fagocitose e liberação de fatores de crescimento (Fig. 7). Na fase de proliferação há formação de tecido de granulação e deposição de matriz extracelular, com angiogênese, proliferação fibroblástica e epitelização (KOHN, 1992). A fase de remodelação, é basicamente descrita por modificações no tecido conjuntivo, principalmente na matriz extracelular, como o aumento na resistência entre as fibras colágenas, ação das colagenases e diminuição da quantidade de água, devido à diminuição de proteoglicanos e da vascularização (SPRINGER, 1994).

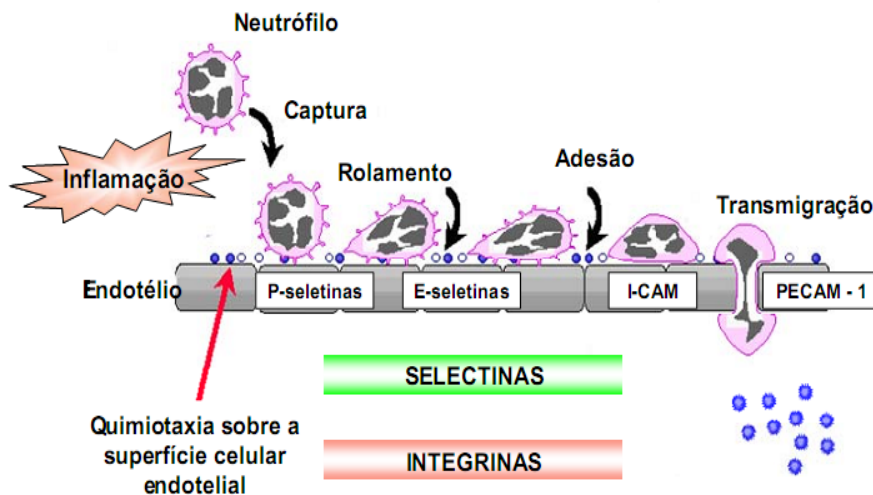


Figura 7. Mecanismo simplificado da migração celular. Interação entre leucócitos e a célula endotelial durante alteração vascular. O passo inicial do recrutamento de leucócitos envolve a ativação de células endoteliais e expressão de selectinas no endotélio. Os leucócitos tornam-se ativados e ocorre o processo de rolamento via interação com P-selectina e selectina expressas no endotélio. Uma forte adesão dos leucócitos envolve sua interação com ICAM. Finalmente, a migração através do endotélio é mediada via PCAM-1 com conseqüente extravasamento celular (Adaptado de SHERWOOD *et al.*, 2004)

Os eventos do processo de reparo estão, nos primeiros momentos, voltados para a hemostasia. Quase concomitante ao estímulo lesivo, ocorre vasoconstrição como resposta inicial. A injúria do endotélio dispara uma seqüência de eventos, iniciando-se com a deposição das plaquetas, prosseguindo com sua ativação e posterior recrutamento de novas plaquetas. O resultado dessa seqüência é a formação de um trombo rico em plaquetas, que provisoriamente tampona a lesão endotelial. Esse trombo rico em plaquetas é rapidamente infiltrado pela fibrina, transformando-se em um trombo fibrinoso. Logo após, os eritrócitos são capturados por essa rede fibrinosa e forma-se então o coágulo, principal responsável pela oclusão do vaso sanguíneo rompido. Este, além de limitar a perpetuação da perda de constituintes circulatórios para o interstício, fornece uma matriz preliminar, que alicerçará a migração das células responsáveis pelo desencadeamento do processo de reparo (Fig. 7) (TOWNSEND, 2005).

Os mediadores liberados pelas plaquetas ativadas, como Fator beta Transformador de Crescimento - TGF- β , Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta -PDGF, tromboxanos e Fator de Agregação Plaquetária - PAF se difundem pela matriz provisória formando um gradiente quimiotático que orienta a migração das células envolvidas com a instalação da resposta inflamatória (SIDDIGI *et al.*, 1995; RIEDEL *et al.*, 2006). As células do tecido conjuntivo envolvidas na resposta inflamatória são mastócitos, fibroblastos, macrófagos e linfócitos residentes; as células circulantes incluem neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas (KOHN, 1992). A inflamação atua no sentido de bloquear, diluir ou destruir o agente agressor, substituindo tecido agredido pela regeneração das células parenquimatosas nativas e pelo preenchimento de tecido fibroblástico, reconstituindo e cicatrizando o tecido lesado (MAJNO, 1992).

Uma vez que os neutrófilos são as células mais abundantes no sangue, um número significativo deles é passivamente coletado pelo trombo provisório durante o rompimento dos vasos. Após este extravasamento passivo, os neutrófilos migram para a superfície da ferida para formar uma barreira contra a invasão de microorganismos e promover o recrutamento ativo de mais

neutrófilos a partir dos vasos adjacentes não lesados (DOROTHY *et al.*, 2007; PORTO *et al.*, 2007) Ao final de um dia após a lesão eles constituirão 50% das células migradas ao local. Os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) entram na ferida no momento da injúria e são o tipo celular inflamatório predominante por três a cinco dias. A principal função de um PMN é a fagocitose das bactérias que contaminam a ferida. Nas primeiras 24 - 48h após a lesão, há um grande afluxo de polimorfonucleares para a ferida, a qual se encontra com tecido desvitalizado, coágulo, bactérias e proteínas séricas extravasadas. Se não há contaminação bacteriana significativa na ferida, os neutrófilos são substituídos pelos macrófagos que passam a ser as células dominantes durante a fase inflamatória (WITTE & BARBUL, 1997; FINE & MUSTOE, 2001).

O macrófago é a principal célula inflamatória presente a partir do terceiro dia após a injúria, além de auxiliar na eliminação das bactérias e no desbridamento do subsequente desenvolvimento do tecido de granulação. Os fatores derivados de macrófagos que são ativos em promover angiogênese são secretados sob condições de hipóxia, que ocorrem no centro da ferida, onde os macrófagos são numerosos (TSUKAMOTO *et al.*, 1981). Presumivelmente, os produtos liberados neste meio ambiente oferecem um importante estímulo para a migração de células endoteliais e para a formação de um tecido de granulação saudável (WEN *et al.*, 2002).

Os linfócitos aparecem na ferida em grande número aproximadamente no sexto e sétimo dias após o dano, mas não são funcionalmente importantes nos eventos iniciais da cicatrização como são os macrófagos (ROSS & BENDITT, 1961), contudo os linfócitos podem aumentar o acúmulo e a proliferação dos fibroblastos através da secreção de linfocinas, como o fator de inibição de migração, interleucina-2, ou o fator de ativação de macrófagos (WAHL *et al.*, 1978). Esses fatores interferem ainda na regulação da proliferação dos queratinócitos. Estudos sugerem que os linfócitos T passam a ter uma influência regulatória sobre as atividades induzidas pelos macrófagos, sendo, portanto, importantes nos estágios posteriores de cicatrização de feridas (BARBUL & REGAN, 1995).

Os fibroblastos surgem na ferida aproximadamente no segundo ou terceiro dia após o trauma, iniciando a fase de fibroplasia e predominam nas

feridas até o final da primeira semana. Com a presença local de macrófagos derivados de monócitos e a produção e liberação dos mediadores químicos produzidos por eles, a migração e ativação de fibroblastos é intensificada. São os responsáveis pela produção do colágeno. Essas células são os principais componentes do tecido de granulação e após a influência dos fatores de crescimento e demais mediadores, são ativadas e migram das margens da ferida para o seu centro (FREYMAN *et al.*, 2001). Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Na cicatriz são dominantes as presenças de colágenos tipo I e III (TOWNSEND, 2005) onde o tecido de granulação é amplamente composto por colágeno tipo III (GABBIANI *et al.*, 1976).

Também na fase de fibroplasia estão presentes os miofibroblastos com características de células musculares lisas (ROBBINS *et al.*, 2008). É sobre a fibronectina sintetizada pelos miofibroblastos que as fibras de colágeno tipo III repousarão (URKINEN *et al.*, 1980).

Após a proliferação vascular é formado tecido de granulação apresentando aspecto granuloso e avermelhado, pela ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, a neovascularização da região que se dá pela ação de fatores de crescimento sobre as células vasculares, induzindo a angiogênese. Sua importância neste estágio, permite a troca de gases e a nutrição das células metabolicamente ativas (ECKERSLEY & DUDLEY, 1988; RIEDEL *et al.*, 2006). Sob estímulo de mediadores, as células endoteliais colagenase e ativador do plasminogênio. Essas substâncias promovem aberturas na membrana basal e permite a migração das células endoteliais que, passam pelo processo de diferenciação para aquisição da capacidade de formação de novos tubos capilares. As células endoteliais migratórias formam no exterior do vaso um broto capilar que em seguida se une ao capilar de onde eram originárias para o restabelecimento do fluxo sanguíneo (RUDOLPH & BALLANTYNE, 1990).

A última fase é a de remodelação, na qual a colagenólise, ou seja, a degradação do colágeno supera a síntese. Essa remodelação do colágeno é a responsável pela mudança de aparência, textura e elasticidade da cicatriz. Há

uma reposição de fibras colágenas onde o colágeno do tipo III é substituído por colágeno tipo I em resposta ao “stress” mecânico até atingir características semelhantes às do tecido anterior à lesão. A neovascularização diminui gradualmente, levando a uma cicatriz final mais avascular esbranquiçada, determinando então o final da fase de remodelagem, e do processo de reparo tecidual (ROBBINS *et al.*, 2008). Um possível desequilíbrio entre a produção e destruição do colágeno ocasiona patologias tanto por excesso de deposição colágena (quelóide) como defeitos na cicatrização (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

A qualidade final do tecido cicatricial e as respostas aos desequilíbrios na produção do colágeno, que podem resultar em cicatrizes mais ou menos resistentes, estão relacionados com mecanismos de síntese, e ativação de fatores descritos como citocinas. As citocinas são fatores de crescimento que exercem funções importantes na angiogênese, na indução ou inibição da diferenciação celular atuando como agentes quimiotáticos na transformação ou indução da síntese de proteínas (FIDDES *et al.*, 1991).

Dentre os fatores de crescimento, os que parecem ter mais destaque na cicatrização das feridas são os fatores de crescimento de fibroblastos (FCF). (FIDDES *et al.*, 1991). Estudos envolvendo o uso tópico do fator beta de crescimento do fibroblasto (FCFb) demonstram que sua ação produz uma epitelização mais rápida, uma intensa neovascularização e uma deposição do colágeno na matriz extracelular, mesmo na presença de infecção (MCGEE *et al.*, 1988), e suas funções proliferativas e angiogênicas, não possuem efeito sistêmico. Intensificando a maturação do colágeno (ONO, 2002; MAZUE *et al.*, 1991).

O fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) é liberado imediatamente após o trauma, atraindo neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, plaquetas e linfócitos, estimulando estas células a se multiplicarem, e sintetizarem o fator beta transformador de crescimento (TGF- β) (ROSS & BENDITT, 1961). Estudos analisando a ação do TGF- β , evidenciaram sua estimulação em funções como quimiotaxia para macrófagos e fibroblastos, estimulação da divisão de fibroblastos quando usado em baixas concentrações, e estimulação da diferenciação de fibroblastos quando utilizado em altas

concentrações. Aliado a esses efeitos, o TGF- β , diminui a síntese de colagenase pelos fibroblastos diminuindo a degradação da matriz, estimulando a angiogênese e a fibrose, além de ser um potente estimulador da produção da matriz conectiva pelos fibroblastos e miofibroblastos (WEN *et al.*, 2002).

As citocinas como mediadores de múltiplas funções, estimulam a iniciação de processos biológicos como a inflamação e a cicatrização. As citocinas pró inflamatórias como, interleucina-1b (IL-1b), interleucina-6 (IL-6) fator α de necrose tumoral (TNF- α), exercem papéis chave importantes, em decorrência de suas interações com outros mediadores. A rápida estimulação através de concentrações mínimas e um pequeno tempo de duração de suas atividades caracterizam a regulação autócrina e parácrina desses peptídeos. São produzidas por uma variedade de tipos celulares como, macrófagos, trombócitos e queratinócitos. As características e a quantidade dessas citocinas presentes no local lesado, servem como parâmetro para a avaliação da vitalidade e do tempo da cicatriz, tanto na fase aguda, como na fase tardia do processo de reparação tecidual (GRELLNER *et al.*, 2000).

O fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), é uma citocina que está envolvida nos componentes celulares da inflamação, sendo importante para o início a resposta ao trauma além de ser quimiotático para a inflamação. Níveis tissulares regulares de TNF- α , exercem efeito parácrino local importante, na resposta apropriada de reparação tecidual. Fisiologicamente, o (TNF- α) está presente na ferida 12hs após o trauma e possui sua concentração mais elevada após 72 hs (FEIKEN *et al.*, 1995). Seus efeitos incluem hemostasia, aumento da permeabilidade vascular e proliferação do endotélio. Por outro lado, a produção excessiva de TNF- α , pode levar a efeitos clínicos como falência multissistêmica de órgãos, e aumento de morbidade em doenças inflamatórias (GIRARDIN *et al.*, 1988). Embora o TNF- α pareça ser essencial na resposta inflamatória aguda exigida para a cicatrização de feridas, em experimentos *in vitro* sua permanência local resultou em alterações na maturação da ferida, aumentando a deposição de colágeno na matriz extracelular, (SCHIRREN *et al.*, 1990). Em contraste, estudos evidenciaram que o TNF- α reduz o crescimento do tecido de granulação após 7 dias de

lesão, de forma dose dependente, embora esse efeito não se mantenha do 14º ao 21º dia pós trauma (RAPALA *et al.*, 1991).

Assim como o TNF- α , a interleucina-1(IL-1), uma citocina pró-inflamatória de fase aguda, promove a ativação de neutrófilos, regula moléculas de adesão e induz quimiotaxia (FONG & LOWRY, 1996). Os níveis dessa citocina são detectáveis nas primeiras 24 hs obtendo seu pico em 72 hs, declinando ao longo da primeira semana. A IL-1 induz a secreção de outras citocinas pró inflamatórias por outros tipos celulares (GORETSKY *et al.*, 1996; FAHEY *et al.*, 1990). Sua ação se estende à fase proliferativa, estimulando a produção de colágeno, o crescimento do fibroblasto e do queratinócito. Por outro lado, estudos demonstraram que a presença de níveis elevados de IL-1 além da primeira semana, pode resultar em deficiência na cicatrização (TRENGOVE *et al.*, 2000; BARONE *et al.*, 1998).

A interleucina-2 (IL-2) é uma importante citocina produzida por linfócitos e envolve a ativação de células T, incrementando o metabolismo do fibroblasto (ZHANG *et al.*, 2007). Estudos recentes sugerem o incremento de moléculas de adesão e o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação através de sua ação (MACEDO *et al.*, 2007)

A interleucina-6 (IL-6) mostrou ser um potente estimulador da proliferação de fibroblastos, através da administração de anticorpos seletivos de anti IL-6, como também ativadora da fosfatase derivada de célula endotelial, uma importante enzima que atua na prevenção de isquemia em feridas agudas (MATEO *et al.*, 1994; GALLO *et al.*, 1997; GUPTA *et al.*, 2007). No interior dessas feridas, a IL-6 também é secretada por polimorfonucleares (PMN) e fibroblastos, estimulando a proliferação dessas células tanto que seu número em protocolos experimentais se iguala ao dos PMN na contagem de células locais produzidas fisiologicamente em resposta ao trauma tecidual. Em feridas experimentais, a IL-6 é detectável em 12 hs, podendo existir em altas concentrações após uma semana (TURNER *et al.*, 2007).

Outra importante interleucina pró inflamatória secretada por macrófagos e fibroblastos, que se segue ao trauma é a interleucina-8 (IL-8). Apresenta concentração máxima nas primeiras 24 hs, produzindo quimiotaxia de monócitos e PMN, aumento na expressão de moléculas de adesão e

desgranulação de mastócitos. *In vivo*, a IL-8 aplicada topicamente em enxertos de pele humana em um modelo experimental, aumentou a reepitelização devido a um aumento do número de queratinócitos mitóticos quando comparada com o controle (RENNEKAMPFF *et al.*, 2000). Em contrapartida, a presença de níveis elevados de IL-8 em feridas retardadas de queimaduras, parecem inibir a replicação de queratinócitos, achados esses que sugerem que a IL-8 pode desempenhar importante papel na maturação de queratinócitos, porém níveis elevados podem ser prejudiciais (IOCOMO *et al.*, 2000).

O interferon (IFN- γ), outra citocina pró inflamatória, é secretada primeiramente por linfócitos T e macrófagos, incrementando a ativação de PMN, e macrófagos. Estudos demonstraram que seu efeito provoca um aumento da citotoxicidade, reduzindo a contração local da ferida porém auxilia a remodelagem tecidual (TREDGET *et al.*, 2000; BROKER 1996). Seu uso é indicado em cicatrizes hipertróficas, pois sua ação aumenta a produção de colagenase. Experimentalmente mostrou ser prejudicial à reepitelização e à resistência da ferida, tanto quando aplicada topicamente como sistemicamente, de maneira dose dependente (MILES *et al.*, 1994; FU *et al.*, 1995).

A interleucina-4(IL-4) é uma citocina produzida tanto por macrófagos residentes, por basófilos, quanto por células T. Seus principais efeitos incluem a inibição de citocinas pró inflamatórias pelos macrófagos (TNF- α , IL-1 e IL-6), e a proliferação de linfócitos B e produção de (IgE) imunoglobulina E. A IL-4 pode estimular a síntese de proteoglicanos e de fibroblastos em feridas (CHOMARAT & BANCHEREAU, 1997; TRAUTMANN *et al.*, 2000; KHALED *et al.*, 2007).

Além das ações mediadas pelas citocinas, outros fatores interferem na cicatrização como a desnutrição uma vez que esta acarreta hipoalbuminemia, caracterizada por uma carência de vitaminas, principalmente A, B e C que além de fortalecer o sistema imunológico contribuem para uma boa cicatrização. A queda do sistema imunológico favorece a infecção, que prejudica a cicatrização por causar morte celular aumentando o grau de lesão tecidual. Patologias tais como diabetes, hipertensão e toda gama de disfunção metabólica também geram má cicatrização, uma vez que comprometem a perfusão dos tecidos,

levando uma menor oferta de oxigênio às células inibindo o metabolismo celular (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

Ainda como fatores prejudiciais à cicatrização, podemos citar os anticoagulantes, glicocorticóides e agentes antineoplásicos. As drogas anticoagulantes promovem sangramentos e formação de hematomas. Os Corticosteróides inibem muitos dos aspectos da cicatrização, pois diminuem a inflamação, a síntese de proteínas e colágeno, e a proliferação epidérmica. Interferem ainda nos mecanismos de defesa do hospedeiro promovendo o catabolismo do colágeno (RANG, 2001). A exposição à radiação é outro fator que impede a divisão celular, além de causar vasculite e fibrose que leva o tecido à má perfusão e hipóxia sendo também fator prejudicial a boa cicatrização das feridas (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

2. Objetivos

OBJETIVO GERAL:

Analisar os efeitos do óleo essencial de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm e seu constituinte o anetol, sobre a resposta inflamatória na fase aguda do processo de cicatrização.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Analisar os efeitos do uso tópico do óleo essencial de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm e seu constituinte o anetol em modelos de ferida aberta.

Analisar os efeitos do óleo essencial de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm e seu constituinte o anetol na reação inflamatória, no tempo de cicatrização, e na qualidade da cicatriz.

Analisar os efeitos do óleo essencial de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm e seu constituinte o anetol na redução da área das feridas.

Comparar os efeitos do óleo essencial de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm e seu constituinte o anetol na resposta inflamatória e na redução da área das feridas.

3. Importância e justificativa

Desde as civilizações antigas, as plantas medicinais têm sido tradicionalmente usadas para promover o alívio de doenças. No decorrer dos anos, os produtos naturais se tornaram amplamente utilizados no desenvolvimento de drogas terapêuticas de importância significativa, na medicina moderna (CRAGG *et al.*, 1997; DE SMET *et al.*, 1997; SHU, 1998), de forma que uma grande parte dessas drogas são derivadas direta ou indiretamente de plantas

A terapêutica farmacológica de algumas afecções, e de processos pós cirúrgicos além de muitas vezes inadequada é ainda inacessível a uma parcela da população, pelo alto custo financeiro, portanto, pesquisas que envolvam possíveis alternativas terapêuticas utilizando matérias-primas locais, são necessárias, por buscarem meios que possibilitem um maior acesso terapêutico à população.

O laboratório de fisiologia experimental, LAFIEX, vem estudando, ao aspectos farmacológicos de óleos essenciais de algumas plantas usadas na medicina popular da nossa região, buscando caracterizar seus efeitos bem como de seus constituintes isolados. O *C. zehntneri*, é uma das plantas em cujo estudo do óleo essencial o laboratório vem investindo. A ação anti-inflamatória (OLIVEIRA, 2001) e anti-ulcerogênica (BARRETO, 2005) já demonstrada do OECz, se associa a sua possível ação cicatrizante difundida pelo uso popular. Essas evidências nos levaram a investigar sua ação como agente cicatrizante no reparo tecidual, uma vez que na literatura, não existem dados a respeito desse efeito terapêutico.

Essa especificidade acima mencionada adquire importância especial uma vez que a resposta ao trauma evidenciada por BARRETO, (2005), é similar à resposta ao trauma tecidual objeto de nosso estudo, existindo ainda a vantagem do OECz ser um agente modulatório da resposta inflamatória como descrito por OLIVEIRA, (2000) ,uma vez que a inflamação é um requisito importante para o reparo tecidual.

4. Material e métodos

4.1. Drogas utilizadas

OECz extraído das folhas de plantas coletadas no dia 16 de maio de 2004 às 05:00 hs na cidade de Viçosa - Ceará, no laboratório de química da UECE, por destilação e arraste a vapor d'água. A amostra do óleo usada neste estudo foi analisada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará (PADETEC), por cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massa (CG-EM), e contém (em % do peso do óleo): anetol, 81,9%; estragol, 2,90%; 1,8-cineol, 0,88%; β -mirceno, 0,83%; trans-cariofileno, 1,48%; ocimeno (E)-beta, 0,23%; beta-elemento, 0,32%; alloaromadendreno, 0,29%; germacreno D, 1,77%; biciclogermacreno, 6,30%; espatulenol, 1,20% e globulol, 0,41%. (Tabela 1). Uma amostra excicata (# 27477) está depositada no Herbário Prisco Bezerra (UFC).

Anetol de pureza analítica, procedente da SIGMA-ALDRICH BRASIL Ltda,

O polímero sintético com propriedade termogel / surfactante não-iônico Pluronic F-127 (óxido polietileno – óxido polipropileno – óxido polietileno) ou (PEO–PPO–PEO), procedente da SIGMA-ALDRICH BRASIL Ltda. (KHALIL *et al.*, 2006).

Foram usados como anestésicos Rompum (cloridrato de xilazina), procedente da Bayer do Brasil. S.A. São Paulo SP, e Dopalen (cloridrato de ketamina), procedente da Agribands Paulínea SP.

Fibrase ® (fibrinolisa, desoxirribonuclease) FCFb 5_{mg}, procedente da Aché Laboratórios Farmacêuticos AS.

Dexametazona (Acetato de dexametazona) creme, procedente do laboratório

4.1.1.Preparação das doses

O gel plurônico foi preparado em água destilada a 10% (w/v).

O OECz e o anetol, foram preparados nas concentrações de 2%, 10% e 20%, por incorporação no gel de plurônico (w/w), o qual serviu como veículo base

para as formulações. Essas misturas foram homogeneizadas por agitação manual seguida de sonificação e acondicionadas em frascos escuros os quais estiveram mantidos fechados e sob refrigeração a 6 °C, antes do uso.

CONSTITUINTE QUÍMICO	CONCENTRAÇÃO NO ÓLEO (%)
Anetol	81,9
Estragol	2,90
1,8-cineol	0,88
β-mirceno	0,83
Ocimeno (E)-beta	0,23
Beta-elemento	0,32
Trans-cariofileno	1,48
Alloaromadendreno	0,29
Germacreno D	1,77
Biciclogermacreno	6,30
Espatulenol	1,20
Globulol	0,30
Total identificado	98,40

Tabela 1: Constituintes químicos do óleo essencial do *Croton zehntneri* Pax et Hoffm.

4.2. Animais de experimentação

No presente estudo foram utilizados 180 camundongos Swiss, fêmeos pesando entre 25-30 g com idade entre 12 a 16 semanas provenientes do Biotério da Universidade Federal do Ceará - UFC e mantidos na sala de quarentena do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da UECE.

Os animais foram mantidos à temperatura de 23 ± 1 °C, em ciclo claro/escuro de 12h e tratados com água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram desenvolvidos durante a fase clara do ciclo e realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e

princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará – UECE, conforme o parecer de nº 07227619-3.

Após a realização dos experimentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e descartados como lixo hospitalar para incineração.

4.4. Experimento *in vivo* - Modelo de Ferida Aberta

Após pesados, os animais foram submetidos à anestesia injetando-se por via intramuscular, na região do músculo bíceps femoral, uma solução constituída pela associação de quetamina (60 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) na dose de 0,2 ml da solução para cada 100g de peso do animal.

Em seguida, os animais foram imobilizados sobre uma prancha cirúrgica, em decúbito ventral mediante a fixação de seus membros craniais e caudais com fita adesiva para a realização da tricotomia da pele da região dorsal e assepsia da mesma com solução degermante de polivinilpirrolidona-iodo.

O ato operatório foi iniciado após o animal atingir plano anestésico, no qual o reflexo de retirada da pata em resposta ao estímulo doloroso esteve abolido.

Para a demarcação da pele a ser retirada, utilizou-se um “punch” metálico com lâmina cortante na sua borda inferior, seguida da retirada de fragmentos cutâneos bilaterais com 0,7_{cm}² de área, a aproximadamente 0,5 cm da linha média na região dorsal inferior atingindo derme e tela subcutânea expondo a fáscia muscular dorsal. A retirada de fragmentos bilaterais possibilitou a análise do efeito sistêmico das drogas utilizadas, onde a ferida de um lado foi usada como controle da ferida contralateral.

A região ficou exposta para que se procedesse ao processo de reparação tecidual, mediante o tratamento com o OECz, o anetol, os controles positivo (fibrase) e negativo (dexametazona) e as observações diárias para a avaliação macroscópica.

4.4.1. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 9 grupos, 1 para cada concentração a ser testada, em igual número (n=6), após identificados com marcações na cauda.

GRUPO I: Controle – Administração de salina (ferida direita - D) e administração isolada do veículo PF127 a10% (w/w) (ferida esquerda - E).

GRUPO II: Animais tratados com OECz 2% incorporado ao veículo PF127 a10% (w/w) (ferida D), e administração isolada do veículo (ferida E)

GRUPO III: Animais tratados com OECz 10% incorporado ao veículo PF127 a10% (w/w) (ferida D), e administração isolada do veículo (ferida E)

GRUPO IV: Animais tratados com OECz 20% incorporado ao veículo PF127 a10% (w/w) (ferida D), e administração isolada do veículo (ferida E)

GRUPO V: Animais tratados com anetol 2% incorporado ao veículo PF127 a10% (w/w) (ferida D), e administração isolada do veículo (ferida E).

GRUPO VI: Animais tratados com anetol 10% incorporado ao veículo PF127 a10% (w/w) (ferida D), e administração isolada do veículo (ferida E).

GRUPO VII: Animais tratados com anetol 20% incorporado ao veículo PF127 a10% (w/w) (ferida D), e administração isolada do veículo (ferida E).

GRUPO VIII: Controle negativo – Animais tratados com dexametazona (ferida D) e administração isolada do veículo PF127 a10% (w/w) (ferida E).

GRUPO IX: Controle positivo – Animais tratados com fibrase 5_{mg} (ferida D) , e administração isolada do veículo PF127 a10% (w/w) (ferida E).

Durante as etapas experimentais, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas em ambiente com controle de temperatura e ciclo noite/dia bem definido, alimentados com ração própria para espécie *ad libitum* e água à vontade.

Após a divisão dos grupos, as feridas foram fotografadas por câmera fotográfica digital, respeitando-se sempre o mesmo ângulo e distância, para o cálculo das suas respectivas áreas no tempo zero. O cálculo das áreas foi feito através do software “Scion image” 4.0.3.2, a partir das fotos das feridas.

Para a aplicação tópica do OECz e anetol sobre as feridas, foi utilizada uma seringa de 1_{ml} como dosador. Em cada animal a ferida do lado direito

serviu como experimental e a ferida do lado esquerdo foi utilizada como controle, sendo tratada apenas como veículo.

Todos os animais envolvidos no experimento foram observados, e tratados diariamente, duas vezes ao dia, obedecendo sempre o mesmo horário, e o volume aplicado sobre as feridas (0,1_{ml}), durante os dias necessários para a realização dos protocolos experimentais. A evolução da cicatrização foi observada na fase inflamatória (3 dias), na fase de fibroplasia (7 dias) e na fase de remodelação (15 dias).

Posteriormente, no 3º, 7º e 15º dias de tratamento, as feridas foram novamente fotografadas para o cálculo de suas áreas.

Os animais foram então anestesiados como no procedimento cirúrgico anterior, com o objetivo de proceder-se a ressecção dos retalhos da região contendo as cicatrizes. Os tecidos retirados foram fixados em formol 10% tamponado para processamento e preparação das lâminas histológicas. Em seguida os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

4.1.2. Análise macroscópica

Alguns critérios foram estabelecidos para a observação dos sinais clínicos da reação inflamatória local, com a finalidade de uma avaliação objetiva e criteriosa para todas as cicatrizações.

A presença de coágulo foi observada nas primeiras 24h após a cirurgia, e estabelecido os seguintes parâmetros analíticos:

Coágulo presente;

Coágulo ausente.

A presença de edema e exsudato foi observada nos 3 primeiros dias de pós-operatório, e estabelecido os seguintes parâmetros analíticos:

-grau 0 = ausência de edema;

-grau 1 = edema leve;

-grau 2 = edema moderado;

-grau 3 = edema intenso.

-grau 0 = ausência de exsudato;

-grau 1 = exsudato leve;

-grau 2 = exsudato moderado;

-grau 3 = exsudato intenso

A presença de crosta foi observada a partir do 3º dia de avaliação e estabelecido os seguintes parâmetros analíticos:

Crosta presente;

Crosta ausente.

A presença de tecido de granulação foi observada nos 7 primeiros dias de pós-operatório e estabelecido os seguintes parâmetros analíticos:

-grau 0 = ausente;

-grau 1 = presença de leve tecido de granulação;

-grau 2 = presença de moderado tecido de granulação;

-grau 3 = presença de intenso tecido de granulação.

Para a análise da área das feridas, foram comparadas as medidas obtidas no tempo zero e nos tempos de 3, 7 e 15 dias. As fotografias foram feitas por câmera digital Mitsuca DS7373BR, respeitando-se sempre a mesma distância e ângulo através da utilização de um suporte apropriado. As medidas das áreas no tempo final de cada protocolo, foram utilizadas como parâmetro para a avaliação da evolução da cicatrização.

4.1.3. Análise microscópica

A parte remanescente de cada fragmento de pele foi fixada em formol a 10%, desidratada em soluções crescentes de álcool etílico e diafanizada em xilol, e posteriormente fundida para impregnação. Em seguida, foi feita inclusão do material em parafina a 56°C apropriadamente orientado para a realização dos cortes. Após seu resfriamento e solidificação, o bloco foi aparado com faca, dando-lhe a forma de retângulo, e identificado. O micrótomo rotativo foi usado para a confecção de cortes do material com 5µm de espessura cada, que foram distendidos sobre lâminas à temperatura de 42°C; cada lâmina foi levada com o respectivo corte à estufa (56°C) para escorrer a parafina e aderí-la (RECIO *et al.*, 2000).

Os cortes assim obtidos de cada bloco foram distintamente corados pelos métodos hematoxilina-eosina (HE), para caracterizar morfológicamente a célula e pelo método Tricrômico de Masson para caracterizar o colágeno.

Os critérios adotados para estudo histológico do processo da cicatrização visaram a regeneração da camada serosa, característica da reação inflamatória e características do infiltrado inflamatório, se do tipo

polimorfonuclear ou mononuclear. O tecido de granulação foi observado em suas características como intensidade de proliferação de pequenos vasos, fibroblastos e macrófagos. Para avaliação da espessura da epiderme foi utilizada lente ocular graduada. A infiltração celular (leucócitos) foi avaliada em áreas representativas em aumento de 100 e/ou 400x.

Nas lâminas coradas com o Tricômio de Masson, foi observado a intensidade e característica da proliferação de fibras colágenas na cicatriz.

Para a avaliação histológica utilizou-se microscópio óptico marca Olympus® modelo CH 30, adaptado com uma ocular histométrica Karl Zeiss Jena® modelo GF – P 10x, nos aumentos de 4, 10 e 40. Em cada lâmina foram observados cinco campos, aleatórios. Contou-se o número de fibroblastos, fibras colágenas e vasos sanguíneos. e leucócitos. Para auxiliar na contagem, utilizou-se um contador eletrônico de células sanguíneas marca KACIL® modelo CCS-01.

4.5. Análise estatística

As diferenças histológicas entre os grupos foram avaliadas estatisticamente, se utilizado a análise de variância (ANOVA). Os resultados dos parâmetros da análise macroscópica, foram expressos em percentual do controle no tempo zero, como média \pm erro padrão da média e comparados através do cálculo das áreas obtidas do grupo controle no tempo zero. Os demais resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média, onde n=6 representa o número de animais por grupo. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 0,05% ($p < 0,05$). Para comparação das médias foram utilizados Análise de Variância - ANOVA e testes paramétricos e não paramétricos. As significâncias estatísticas foram determinadas usando-se o SigmaStat Version 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação macroscópica

5.1.1. Coágulo

A análise macroscópica teve início logo após a realização das feridas, onde as mesmas foram cuidadosamente observadas quanto a presença dos aspectos referentes à fase inicial do reparo tecidual como a formação de coágulo sanguíneo. Durante o procedimento cirúrgico, a técnica utilizada para a confecção das feridas através do “punch”, se deu de forma cuidadosa, objetivando-se a prevenção de sangramentos. Dessa forma a hemostasia ocorreu de forma fisiológica, impedindo a formação de coágulos. A ausência do coágulo, portanto, foi observada nas feridas de todos os grupos experimentais.

5.1.2. Edema

O edema representa um aspecto importante do processo de cicatrização e foi evidenciado inicialmente logo no primeiro dia do pós-operatório, apresentando uma intensidade leve nas lesões de todos os grupos experimentais. De acordo com a figura 8, o tratamento tópico com o anetol 2% durante 3 dias, não teve efeito significativo sobre o edema nas feridas. As feridas tratadas com o anetol 20% apresentaram um aumento gradual na intensidade do edema até o terceiro dia de pós-operatório. Os animais tratados com anetol 20% apresentaram uma maior intensidade no edema em comparação com os demais grupos, embora não tenha sido significativo com relação ao grupo controle e ao grupo tratado com o OECz 10% e anetol 10%. Conforme mostrado na figura 8, ao final do terceiro dia de tratamento, podemos observar uma redução do edema existente, pelo efeito do tratamento com o OECz10% e 20%. Essa diferença se tornou mais evidente no terceiro dia, quando observamos que apenas 33,3% das feridas tratadas com OECz 20% apresentaram edema, com características leve. De forma similar a dexametazona reduziu a intensidade do edema nessa fase do processo cicatricial, o que já era esperado pelo seu efeito anti-inflamatório já amplamente conhecido. Em oposição, 100% das feridas tratadas com anetol 20%

apresentaram edema intenso, sendo essa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle que apresentou edema com características de leve a moderado, $P = < 0,001$ Student-Newman-Keuls Method)

A avaliação macroscópica da intensidade do edema observada do 1° ao 3° dia de tratamento está demonstrada na tabela 2. De acordo com os escores atribuídos, as feridas tratadas com dexametazona, OECz 10% e 20%, apresentaram uma redução significativa do edema, enquanto que as feridas do grupo fibrase apresentaram um edema moderado quando comparadas aos outros grupos. Essa diferença foi estatisticamente significativa no terceiro dia de pós-operatório onde se observa que o OECz 20% diminuiu a intensidade do edema em feridas cutâneas experimentais ($P = < 0,001$ Student-Newman-Keuls Method).

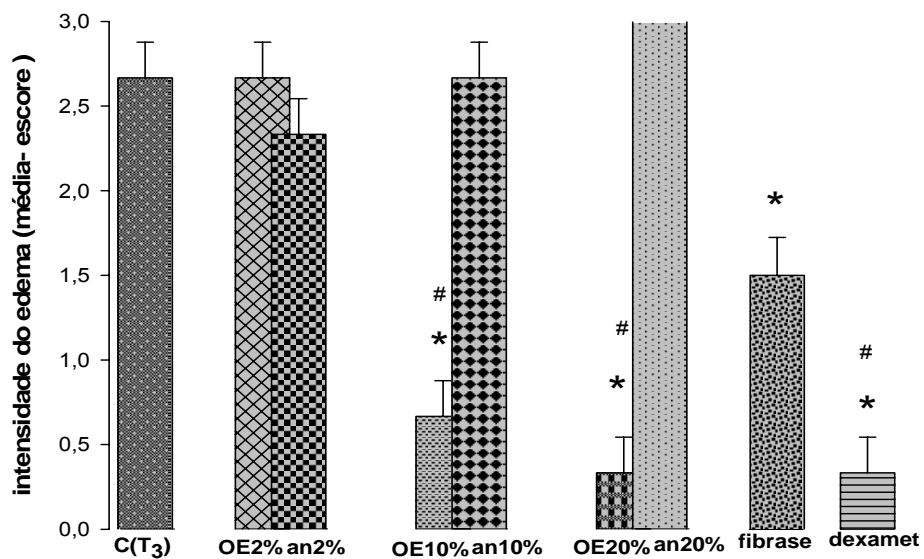


Figura 8 - Efeito tóxico do oecz e anetol no edema presente em ferida aberta de camundongos com 3 dias de tratamento. Gráfico mostrando o efeito do OECz e anetol sobre o edema em ferida aberta tratada por 3 dias. As colunas representam a média dos escores atribuídos à intensidade do volume da lesão tumefeita. As barras verticais representam o erro padrão da média. C(T₃) representa o grupo controle salina. Fibrase representa o controle positivo e dexametazona representa o controle negativo. * P = <0,00, estatisticamente significativo em relação ao controle (CT₃), # P = <0,001 estatisticamente significativo em relação a fibrase, Student-Newman-Keuls Method.

GRUPOS (n=6)	MÉDIA escores	±	ERRO
SALINA 3 dias	2,6	±	0,21
OECz 2% 3 dias	2,6	±	0,21
ANETOL 2 % 3 dias	2,3	±	0,21
OECz 10% 3 dias	0,6	±	0,21* #
ANETOL 10% 3 dias	2,6	±	0,21
OECz 20% 3 dias	0,3	±	0,21 * #
ANETOL 20% 3 dias	3,0	±	0,00
FIBRASE 3 dias	1,5	±	0,22 *
DEXAMETAZONA 3 dias	0,3	±	0,21 * #

Tabela 2- Presença de edema em ferida aberta de camundongo animais com 3 dias de tratamento. Avaliação macroscópica das lesões tratadas topicamente durante 3 dias com 0,1mL de salina (C) , OECz 2%, 10%, 20%, anetol 2%, 10%, 20%, fibrase e dexametazona . Os resultados são reportados pela (média ± erro) dos escores atribuídos à intensidade do volume da lesão tumefeita: Ausência de edema (1) ; Edema leve (2); Edema moderado (3): e Edema intenso (3) (n = 06). * P = <0,001 estatisticamente significativo em relação ao controle (CT₃), # P = <0,001, estatisticamente significante em relação a fibrase, Student-Newman-Keuls Method.

5.1.3. Exsudato

O exsudato se apresentou como um sinal clínico característico da fase inflamatória de forma moderada no início do tratamento. A partir do segundo dia de pós-operatório, os grupos tratados com OECz 10%, OECz 20%, anetol10% e dexametazona já mostraram uma perceptível redução na formação do exsudato inflamatório com relação aos outros grupos experimentais, ao grupo controle salina e às feridas controles correspondentes. No final do 3º dia essa diferença foi estatisticamente significante em relação ao grupo controle que apresentou exsudato com características de leve a moderado Student-Newman-Keuls Method, P = <0,001. As feridas tratadas com OECz 20% e dexametazona foram se tornando secas de forma que ao final do terceiro dia, o exsudato se tornou imperceptível na maioria das feridas desses grupos, como podemos observar na figura 9. A resposta ao tratamento com a dexametazona, já era previsível pelas propriedades anti-inflamatórias já conhecidas da mesma. No terceiro dia de observação os grupos tratados com

fibrase, OECz 2%, OEcz 10%, e o grupo controle salina apresentaram lesões com características exudativas moderadas, quando comparados ao grupo tratado com anetol 20%. Conforme podemos observar, as feridas tratadas com anetol 20%, apresentaram exsudato intenso desde o 1º dia de pós-operatório, prolongando-se até o 3º dia.

As observações diárias nos permitiram perceber que as feridas tratadas com o anetol 10% reduziram a formação do exsudato em comparação com o uso tópico do anetol 2% e 20%, diferença que foi evidenciada ao final do terceiro dia de observação, como demonstrado na figura 9 e figura 28.

Conforme está demonstrado na tabela 3 as feridas tratadas com anetol 2% apresentaram exsudato com características moderadas, enquanto que as feridas tratadas com anetol 10% apresentaram exsudato com característica leve, sendo essa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, Student-Newman-Keuls Method $P = <0,001$.

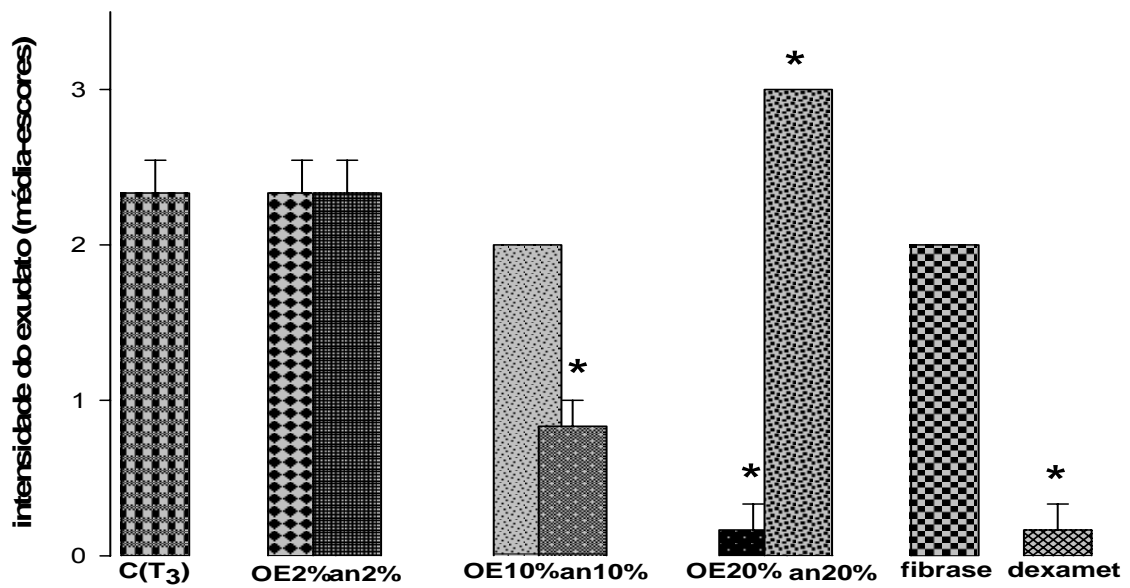


Figura 9 - Efeito tópico do OECz e anetol no exsudato presente em ferida aberta de camundongos com 3 dias de tratamento. Gráfico mostrando o efeito do OECz e anetol sobre o exsudato em ferida aberta tratada por 3 dias. As colunas representam a média dos escores atribuídos à intensidade da presença do exsudato inflamatório. As barras verticais representam o erro padrão da média. C(T₃) representa o grupo controle salina. * significante em relação ao controle, Student-Newman-Keuls Method P = <0,001.

GRUPOS (N=6)	MÉDIA escores ±	ERRO
CTRL (SALINA) 3dd	2,3 ±	0,21
OECZ 2% 3dd	2,3 ±	0,21
ANETOL 2% 3dd	2,3 ±	0,21
OECZ 10% 3dd	2,0 ±	0,00
ANET 10% 3dd	0,8 ±	0,16 *
OECZ 20% 3dd	0,1 ±	0,16 *
ANET 20% 3dd	3,0 ±	0,00 *
FIBRASE 3dd	2,0 ±	0,00
DEXAMET 3dd	0,1 ±	0,16 *

Tabela 3 - Presença de exsudato em ferida aberta de camundongo animais com 3 dias de tratamento. Avaliação macroscópica das feridas com 3 dias de tratamento tópico com 0,1mL de salina (C) , OECz 2%, 10%, 20%, anetol 2%, 10%, 20%, fibrase e dexametazona . Os resultados são reportados por percentual da (média ± erro) dos escores atribuídos à intensidade da presença do exsudato (n = 06): Ausência de exsudato – grau 1; exsudato leve grau 2: exsudato moderado grau 3: e exsudato intenso grau 3. * P = <0,001 significante em relação ao controle Student-Newman-Keuls Method.

5.1.4. Crosta

A crosta começou a ser formada com o exsudato filtrado da ferida que apareceu na superfície da pele em todas as feridas, no entanto, com a ausência do exsudato, foi permitido observar inicialmente que as feridas dos grupos tratados com o anetol 10%, OECz 20% e dexametazona apresentaram bordas mais regulares e as crostas em suas feridas se mostraram em forma de uma fina camada.

Nossa investigação macroscópica mostrou que houve formação de crostas a partir do 3º dia de pós-operatório nas feridas tratadas com OECz 20% e anetol 10%. Entretanto, curiosamente notou-se um prolongamento no tempo de permanência da crosta nas feridas dos demais grupos tanto que no 10º dia de avaliação, em média, 66% dos animais dos grupos experimentais, ainda apresentavam esta fina proteção sobre as lesões, em contraste com a ausência desta sobre as lesões do grupo OECz 20% e Anetol 10%. As observações macroscópicas evidenciaram o desprendimento precoce das crostas no grupo OECz 20% e anetol 10%, e uma visualização precoce e

crescente do tecido cicatricial desde o 3º dia de pós-operatório. Além do aspecto de menor espessura, notou-se também que as crostas do grupo OECz 20% e Anetol 10% apresentavam uma coloração mais avermelhada em comparação ao demais grupos (Fig. 28).

Apesar da presença de edema e exsudato nas feridas tratadas com anetol 20%, ao final do terceiro, dia foi possível observar a presença de uma espessa camada de crosta com característica de umidade e coloração mais pálida, além da presença de tecido de granulação em formação (Fig. 28).

5.1.5. Tecido de granulação

Como demonstrado na figura 10, as feridas tratadas com solução salina apresentaram um menor desenvolvimento do tecido de granulação a partir do 3º dia de observação em relação aos grupos experimentais tratados com OECz e anetol sendo essa diferença estatisticamente significativa ao final do sétimo dia de pós-operatório, $P = <0,001$ Student-Newman-Keuls Method.

Considerando-se os escores obtidos durante a análise macroscópica, observou-se que 100% dos animais tratados com anetol 20% e OECz 20%, apresentaram intenso grau de tecido de granulação desde o 3º dia PO. Os animais tratados com salina, OECz 2% e anetol 2%, apresentaram um tecido de granulação classificado de moderado, enquanto que os animais tratados com OECz 10%, anetol 10%, fibrase e dexametazona, apresentaram um tecido de granulação de moderado a intenso quando comparados ao grupo controle salina (Tabela 4).

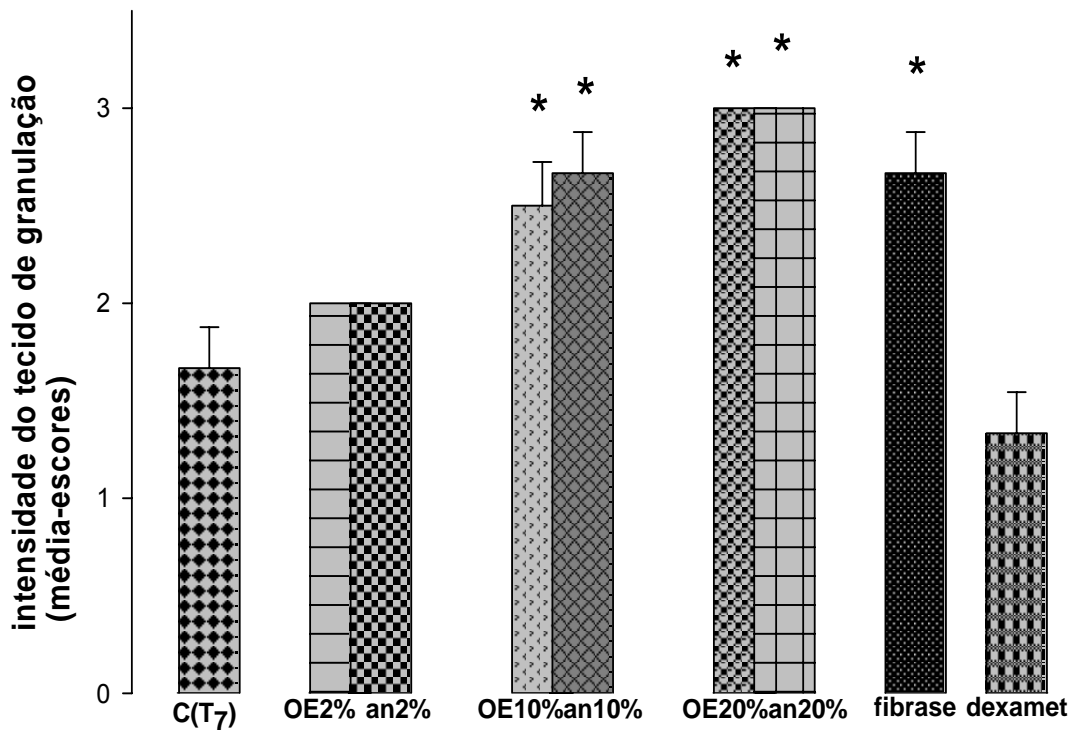


Figura 10 - Efeito tópico do OECz e anetol no tecido de granulação presente em ferida aberta de camundongos com 7 dias de tratamento. Gráfico mostrando o efeito do OECz e anetol sobre a presença do tecido de granulação em ferida aberta tratada por 7 dias. As colunas representam a média dos escores atribuídos à intensidade da presença do exsudato inflamatório. As barras verticais representam o erro padrão da média. C(T₇) representa o grupo controle salina. *(P = <0,001) significativo em relação ao controle (Student-Newman-Keuls Method).

GRUPOS (n=6)	MÉDIA escores ±	ERRO
SALINA 7 dias	1,66 ±	0,21
OECZ 2% 7 dias	2,00 ±	0,00
ANETOL 2 % 7dias	2,00 ±	0,00
OECZ 10% 7 dias	2,50 ±	0,22 *
ANET 10% 7 dias	2,66 ±	0,21 *
OECZ 20% 7dias	3,00 ±	0,00 *
ANET 20% 7 dias	3,00 ±	0,00 *
FIBRASE 7 dias	2,66 ±	0,21 *
DEXAMET 7 dias	2,33 ±	0,21

Tabela 4. Efeito tópico do OECz, anetol, fibrase e dexametazona no tecido de granulação presente em ferida aberta de camundongos com 7 dias de tratamento - Tabela mostrando a avaliação macroscópica das feridas. Os resultados foram reportados pela (média ± erro) dos escores atribuídos à intensidade da presença do tecido de granulação (n = 06): Ausência de tecido de granulação, grau 0; presença de discreto tecido de granulação, grau 1; presença de moderado tecido de granulação, grau 2 e presença de intenso tecido de granulação, grau 3. * P = <0, 001, significativo em relação ao controle Student-Newman-Keuls Method.

5.1.6. Área das feridas

A área média das feridas imediatamente após o procedimento cirúrgico foi de $3,7 \pm 0,03\text{mm}^2$ e foi tomada como controle expressa em 100% no tempo zero (t=0). A área das feridas ao final do 3º, 7º e 15º dias do experimento, foi expressa como percentual do controle no (t=0).

Como demonstrado na Figura 11 não houve diferença estatisticamente significativa em relação à área das feridas tratadas com solução salina e com plurôníc 10% P = 0, 077, t-test. O pluronic não apresentou interferência na resposta inflamatória observada do 1º ao 15º dia do processo de reparo tecidual. Todas as feridas tratadas com solução salina e com plurôníc 10% apresentaram o mesmo comportamento durante a evolução da cicatrização.

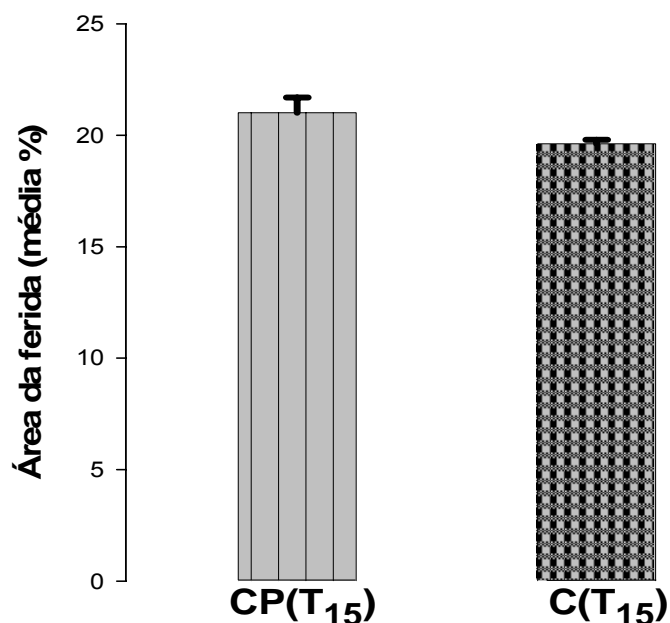


Figura 11. Efeito tópico do plurônic durante 15 dias sobre a área da ferida aberta em camundongos. Gráfico mostrando o efeito do plurônic na área das feridas. As colunas representam a média da área das feridas dos grupos correspondentes, expressa em percentual do grupo controle (salina) no início do tratamento, considerado tempo zero. As barras verticais representam o erro padrão da média. P(T₁₅) significa grupo plurônic com 15 dias de tratamento. C(T₁₅) significa grupo controle salina com 15 dias de tratamento. P = 0,077, t-test.

Conforme observado na Figura 12 o efeito da fibrase e da dexametazona sobre as feridas ao final do 15º dia de tratamento, foi o esperado, tendo em vista a ação clássica desses medicamentos comercialmente conhecidos. A diferença estatisticamente significativa do grupo tratado com fibrase em relação ao grupo controle salina P = <0,001 Student-Newman-Keuls Method, mostrou que a fibrase reduziu a área das feridas aumentando, portanto, a contração das mesmas, acelerando assim a cicatrização. Essa resposta nos deu segurança para a utilização a fibrase como controle positivo. De forma oposta com respeito à dexametazona, a diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle salina P = <0,001 Student-Newman-Keuls Method, evidenciou que seu efeito não reduziu a área

das feridas. Esse resultado nos deu segurança para utilizarmos a dexametazona como controle negativo, uma vez que a mesma retardou a cicatrização das feridas experimentais em camundongos.

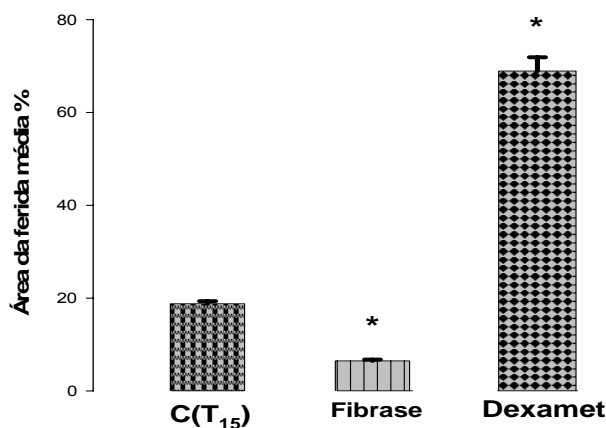


Figura 12. Efeito do tratamento tópico com fibrase e dexametazona durante 15 dias sobre a área da ferida aberta em camundongo. Gráfico mostrando o efeito da fibrase e da dexametazona na área das feridas. As colunas representam a média da área das feridas dos grupos correspondentes, expressa em percentual do grupo controle (salina) no início do tratamento, considerado tempo zero. As barras verticais representam o erro padrão da média. estatisticamente significativo em relação ao controle salina com 15 dias de tratamento C(T₁₅). * P = <0,001 teste de variancia ANOVA - Student-Newman-Keuls Method.

De acordo com a Figura 13 observamos que com 3 dias de tratamento, houve uma diferença significativa na área das feridas tratadas com o anetol em relação ao grupo controle salina. O efeito do anetol, principalmente na dose de 10% e 20%, não reduziu a área das feridas ao final da fase inflamatória no terceiro dia de pós-operatório, e a diferença estatística em relação a dose de 2% não foi significativa P = <0,001, Student-Newman-Keuls Method.

Como demonstrado na Figura 14, não houve diferença estatisticamente significativa no efeito do OECz 2% e 10% sobre a área das feridas quando comparadas ao grupo controle salina, porém o mesmo efeito foi significativo em relação do OECz 20% sobre a área das feridas P = <0,001. Conforme se pode observar na Tabela 5, o efeito do OECz 2%, manteve 62,1 % da área das

feridas, retardando a contração das mesmas. As feridas do grupo tratado com solução salina, mantiveram em média 48,5% da sua área. O efeito do anetol manteve a área das feridas em 65,1%, 77,6% e 78,2%, nas doses de 2%, 10% e 20%, respectivamente, apresentando diferença estatisticamente significativa na dose e 20% quando comparado ao OECz 2% $P = 0,026$ Dunnett's Method.

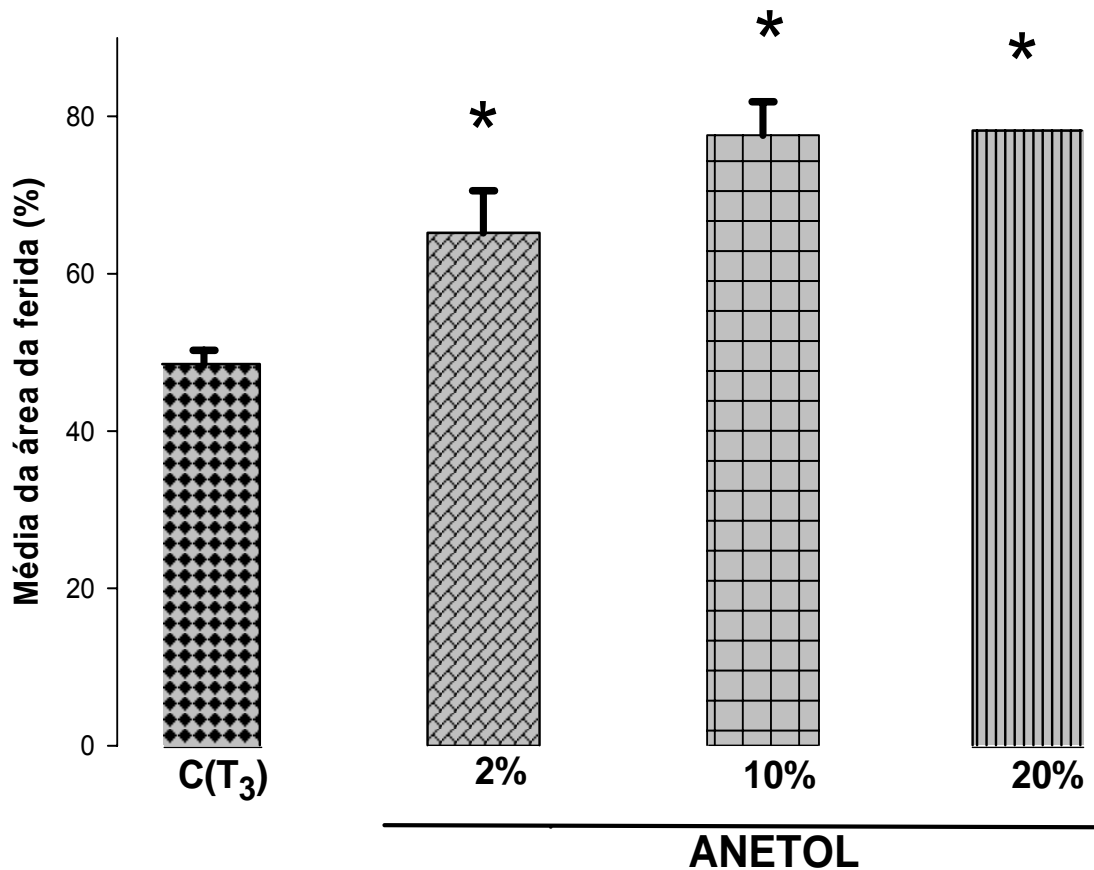


Figura 13. Efeito do tratamento tópico com anetol, durante 3 dias, sobre a área da ferida aberta em camundongos - Gráfico mostrando o efeito do anetol na área das feridas. As colunas representam a média da área das feridas dos grupos correspondentes, expressa em percentual do grupo controle (salina) no início do tratamento, considerado tempo zero. As barras verticais representam o erro padrão da média. * $P < 0,001$, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle salina com 3 dias de tratamento (CT₃), teste de variância ANOVA - Student-Newman-Keuls Method.

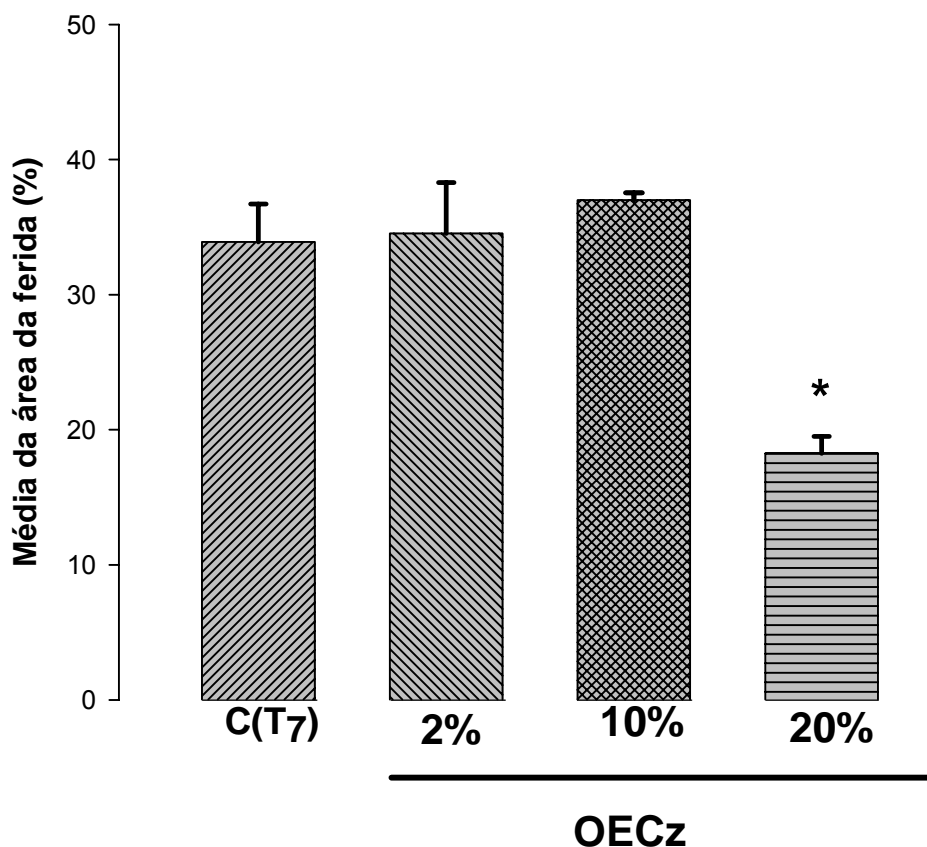


Figura 14 - Efeito do tratamento tópico com OECz, durante 3 dias, sobre a área da ferida aberta em camundongos. Gráfico mostrando o efeito do OECz na área das feridas. As colunas representam a média da área das feridas dos grupos correspondentes, expressa em percentual do grupo controle (salina) no início do tratamento, considerado tempo zero. As barras verticais representam o erro padrão da média. * ($P = <0,001$), diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle salina com 3 dias de tratamento (CT_3). teste de variância ANOVA - Student-Newman-Keuls Method

GRUPOS (N=6)	MÉDIA% ± ERRO
C. SALINA - T = 3	48,5 ± 1,73
ANET 2%- T=3	65,1 ± 5,37 *
ANET10%- T=3	77,6 ± 4,24 *
ANET 20%- T=3	78,2 ± 4,14 *
OECz 2% T= 3	62,1 ± 4,55 *
OECz 10% T=3	44,5 ± 2,67
OECz 20% T=3	45,0 ± 2,75

Tabela 5. Efeito do tratamento tópico com anetol e OECz, durante 3 dias, sobre a área da ferida aberta em camundongos. A tabela mostra a área das feridas após três dias de tratamento em seus grupos correspondentes. Os resultados foram reportados em percentual da (média ± erro) das áreas das feridas do grupo controle (salina) no início do tratamento. * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle salina. P = <0,001 teste de variância ANOVA - Student-Newman-Keuls Method,

De acordo como mostrado na Figura 15, com 7 dias de tratamento, houve uma diferença significativa na redução da área das feridas tratadas com OECz 20%, em relação às feridas tratadas com OECz 2%, OECz 10% e o grupo controle P = <0,001 Dunnett's Method. O efeito do OECz 20% reduziu a área das feridas. A área das feridas tratadas com OECz 2% e OECz 10%, não apresentou diferença significativa com relação ao grupo controle salina.

Como mostra a Figura 16, o efeito do anetol 20%, reduziu a área das feridas em relação ao grupo controle, porém, o efeito do anetol numa concentração duas vezes menor (anetol 10%), durante o mesmo período de tratamento, aumentou a área das feridas, retardando a contração das mesmas, o que foi estatisticamente significativo em relação ao grupo tratado com anetol 20%, P = 0,047 teste de variância ANOVA Dunnett's Method.

Como expresso na Tabela 6, o efeito do OECz 20% no 7º dia de tratamento, manteve a área das feridas numa média de 18,2%. O efeito do anetol 20% manteve a área das feridas numa média de 20,6%, representando uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle P = <0,001 teste de variância ANOVA Student-Newman-Keuls Method.

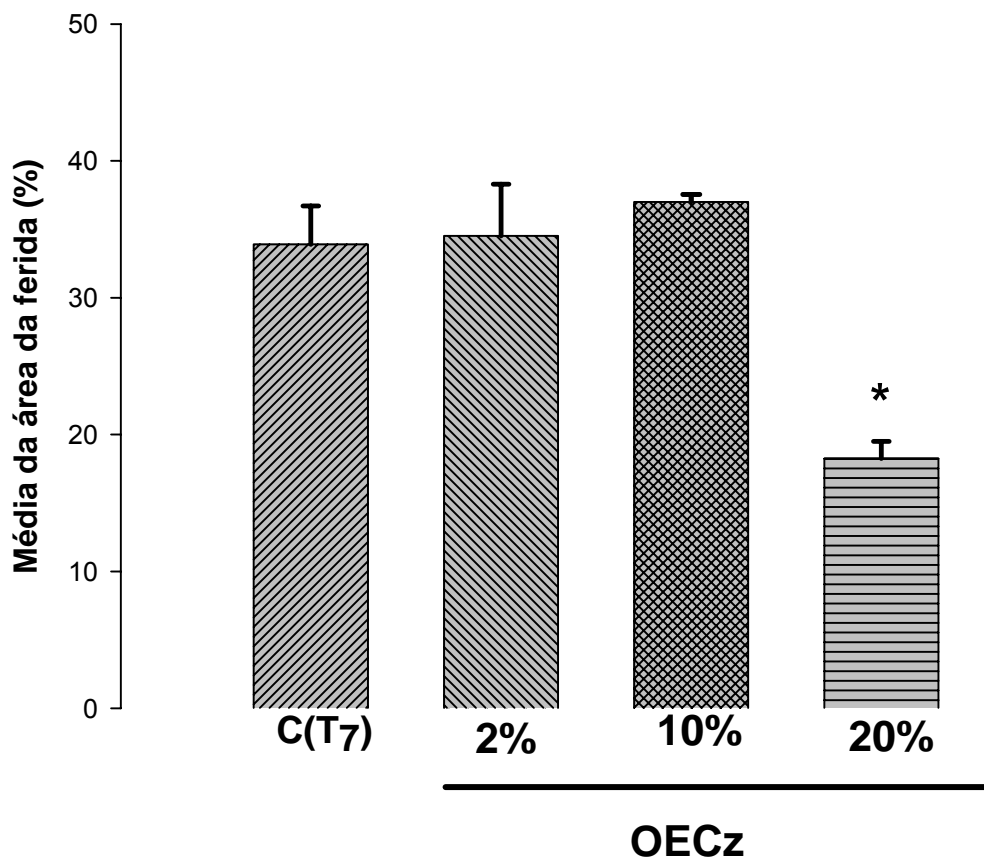


Figura 15. Efeito do tratamento tópico com OECz durante 7 dias sobre a área da ferida aberta em camundongos. Gráfico mostrando o efeito do OECz na área das feridas. As colunas representam a média da área das feridas dos grupos correspondentes, expressa em percentual do grupo controle (salina) no início do tratamento, considerado tempo zero. As barras verticais representam o erro padrão da média. * $P = <0,00$, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle salina com 7 dias de tratamento (CT₇), teste de variância ANOVA Dunnett's Method.

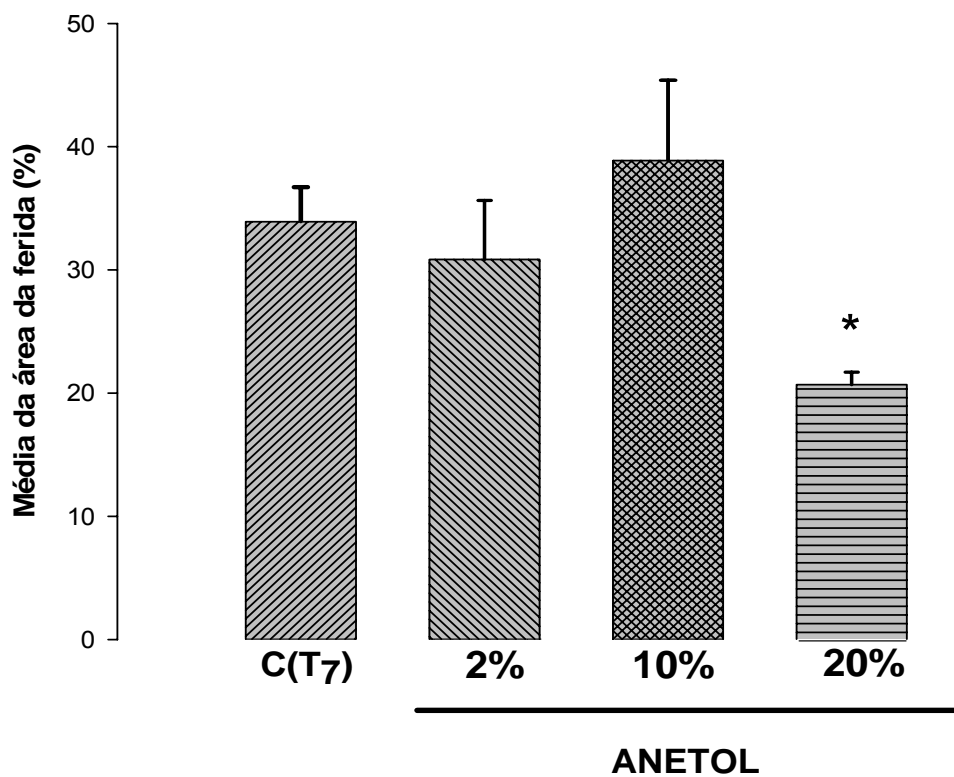


Figura 16. Efeito do tratamento tópico com anetol durante 7 dias sobre a área da ferida aberta em camundongos. Gráfico mostrando o efeito do Anetol na área das feridas. As colunas representam a média da área das feridas dos grupos correspondentes, expressa em percentual do grupo controle (salina) no início do tratamento, considerado tempo zero. As barras verticais representam o erro padrão da média. * $P = 0,047$, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle salina com 7 dias de tratamento (CT₇). teste de variância ANOVA Dunnett's Method.

GRUPOS (N=6)	MÉDIA% ERRO
C. SALINA - T = 7	33,9 ± 2,81
ANET 2%- T=7	30,8 ± 4,79
ANET10%- T=7	38,8 ± 6,51
ANET 20%- T=7	20,6 ± 1,01 *
OECz 2% T= 7	34,5 ± 3,76
OECz 10% T=7	37,0 ± 0,54
OECz 20% T=7	18,2 ± 1,25 *

Tabela 6 - Efeito do tratamento tópico com anetol e OECz durante 7 dias sobre a área de ferida aberta em camundongos. A tabela mostra a área das feridas após sete dias de tratamento em seus grupos correspondentes. Os resultados foram reportados em percentual da (média ± erro) das áreas das feridas do grupo controle (salina) no início do tratamento. * diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle salina (T=7), (P = <0,001) teste de variância ANOVA (Student-Newman-Keuls Method).

Como demonstrado na figura 17, as feridas tratadas com OECz 20% durante quinze dias, tiveram uma redução bastante significativa nas suas áreas em relação a área das feridas dos grupos tratados com OECz 2%, OECz 10% e as do grupo controle salina. Entretanto, não houve diferença significativa do efeito do OECz 2% e 10% em relação ao grupo controle salina P = 0,005 teste de variância ANOVA Dunnett's Method

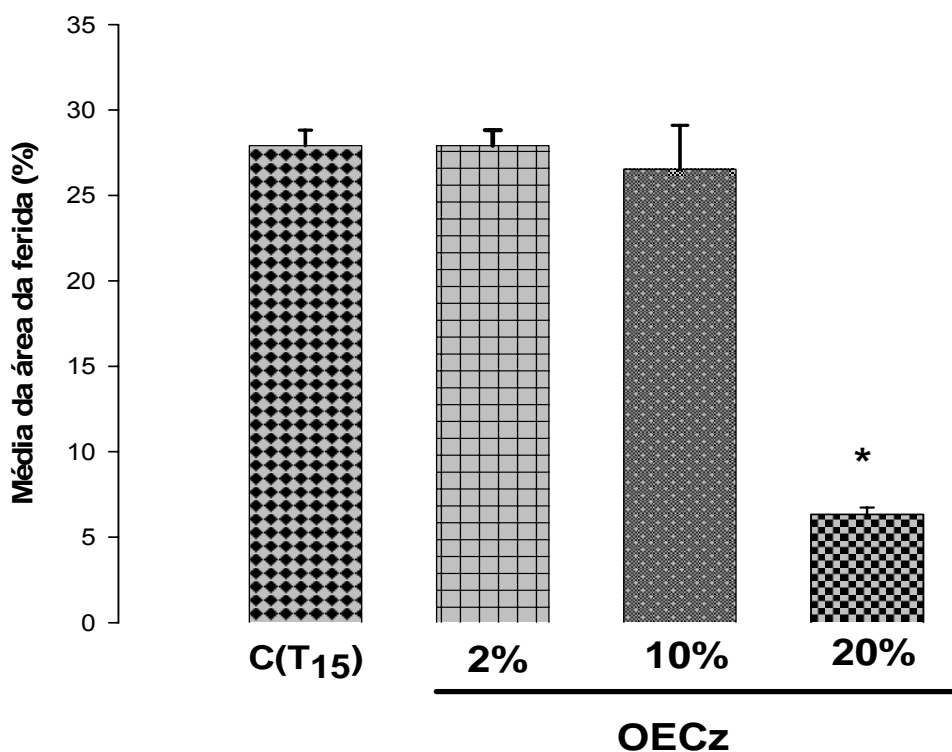


Figura 17. Efeito do tratamento tópico com OECz durante 15 dias sobre a área da ferida aberta em camundongos - Gráfico mostrando o efeito do OECz na área das feridas. As colunas representam a média da área das feridas dos grupos correspondentes, expressa em percentual do grupo controle (salina) no início do tratamento, considerado tempo zero. As barras verticais representam o erro padrão da média. * P = 0,005, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle salina com 15 dias de tratamento (CT₁₅). teste de variância ANOVA Dunnett's Method.

De acordo com a Figura 18, as feridas tratadas com anetol 20% durante 15 dias, apresentaram a área significativamente reduzida em relação às feridas tratadas com anetol 2%, anetol10% e as feridas do grupo controle salina. A ação do anetol 2% e do anetol 10% sobre a redução da área das feridas, não foi significativa em relação à redução da área das feridas do grupo controle, P = < 0,001 teste de variância ANOVA Duncan's Method.

Como demonstrado na Tabela 7, com 15 dias de tratamento, tanto o OECz 20% como o anetol 20%, apresentaram diferença estatisticamente significativa na redução da área das feridas cutâneas em camundongos

quando comparados a todos os grupos experimentais $P = <0,001$. O efeito do OECz 20% reduziu a área das feridas a uma média de 6,3%. O efeito do anetol 20% reduziu a área das feridas a uma média de 16,7%. Essa diferença foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle que reduziu a área das feridas a uma média de 27,9%, ao grupo OECz 2% e 10% que reduziu a área das feridas a uma média de 27,9% e 26,5% respectivamente, e ao grupo anetol 2% e 10% que reduziu a área das feridas a uma média de 26,4% e 24,2% respectivamente $P = <0,001$, teste de variância ANOVA Student-Newman-Keuls Method.

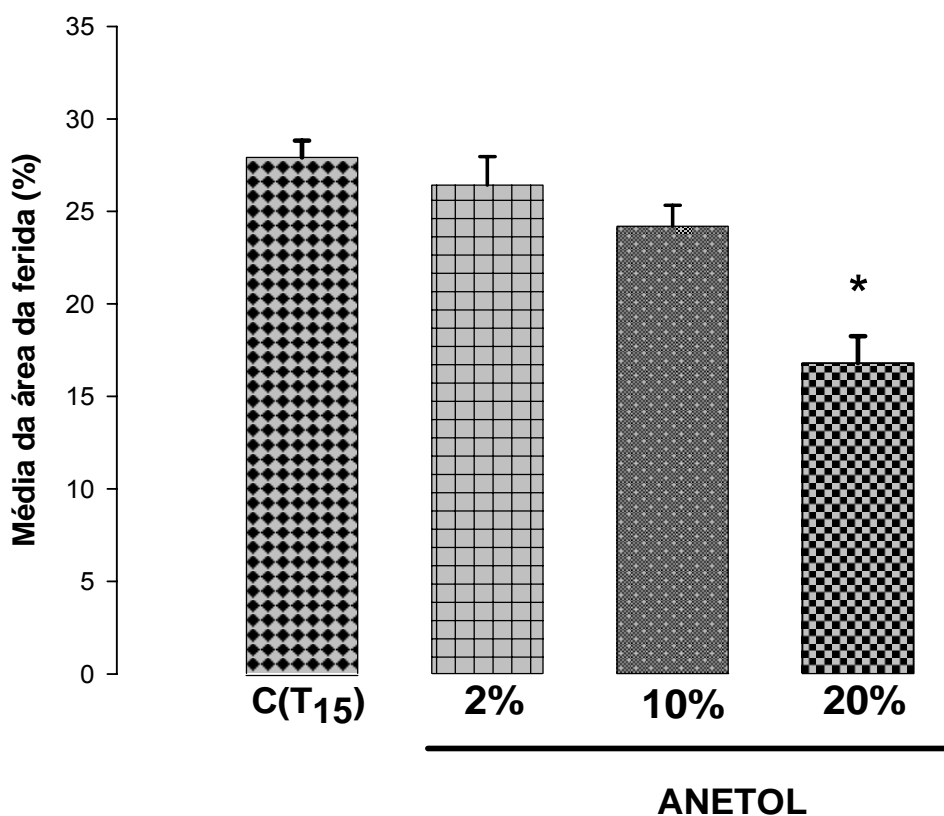


Figura 18. Efeito do tratamento tópico com anetol durante 15 dias sobre a área da ferida aberta em camundongos. Gráfico mostrando o efeito do Anetol na área das feridas. As colunas representam a média da área das feridas dos grupos correspondentes, expressa em percentual do grupo controle (salina) no início do tratamento, considerado tempo zero. As barras verticais representam o erro padrão da média. * $P = <0,001$, diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle salina com 15 dias de tratamento (C_{T15}), teste de variância ANOVA Duncan's Method.

GRUPOS (N=6)	MÉDIA% ERRO
C. SALINA - T = 15	27,9 ± 0,90
ANET 2%- T=15	26,4 ± 1,54
ANET10%- T=15	24,2 ± 1,12
ANET 20%- T=15	16,7 ± 1,45 *
OECz 2% T= 15	27,9 ± 0,90
OECz 10% T=15	26,5 ± 2,57
OECz 20% T=15	6,3 ± 0,38 *

Tabela 7. Efeito do tratamento tópico com anetol e OECz durante 15 dias sobre a área da ferida aberta em camundongos. A tabela mostra a área das feridas após 15 dias de tratamento em seus grupos correspondentes. Os resultados foram reportados em percentual da (média ± erro) das áreas das feridas do grupo controle (salina) no início do tratamento. * diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle **salina (T=15)**, (teste de variância ANOVA (Student-Newman-Keuls Method).

De acordo com a Figura 19, com 3 dias de tratamento, o OECz 10%, OECz 20% e a fibrase, não diminuíram a área das feridas quando comparadas ao grupo controle. O efeito do anetol 2%, 10%, 20% e da dexametazona foi um aumento na área das feridas de forma significativa em relação ao controle $P = <0,001$ Student-Newman-Keuls Method.

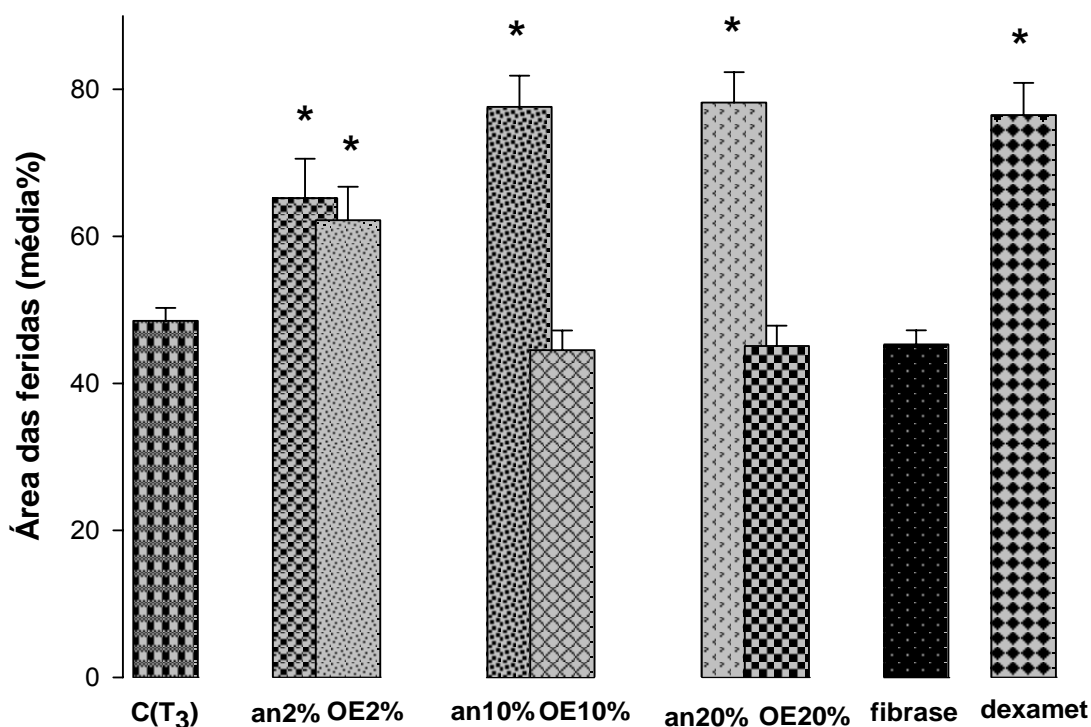


Figura 19. Efeito tóxico do anetol e OECz comparado ao efeito tóxico da fibrase e dexametazona com 3 dias de tratamento sobre a área da ferida aberta em camundongos. Gráfico mostrando o efeito do anetol, OECz, fibrase e dexametazona na área das feridas. As colunas representam a média da área das feridas dos grupos correspondentes, expressa em percentual do grupo controle (salina) no início do tratamento, considerado tempo zero. As barras verticais representam o erro padrão da média. * ($P = <0,001$) significante em relação ao controle, Student-Newman-Keuls Method.

Conforme expresso na figura 20, as feridas tratadas com anetol 2% e 10% e OECz 2% e 10%, não apresentaram redução em suas áreas. O tratamento com o anetol 20%, o OECz 20% e a fibrase, reduziu a área das feridas com 7 dias de pós-operatório. O efeito da dexametazona, aumentou a área das feridas com 7 dias de tratamento de forma significativa, $P = <0,001$ Student-Newman-Keuls Method.

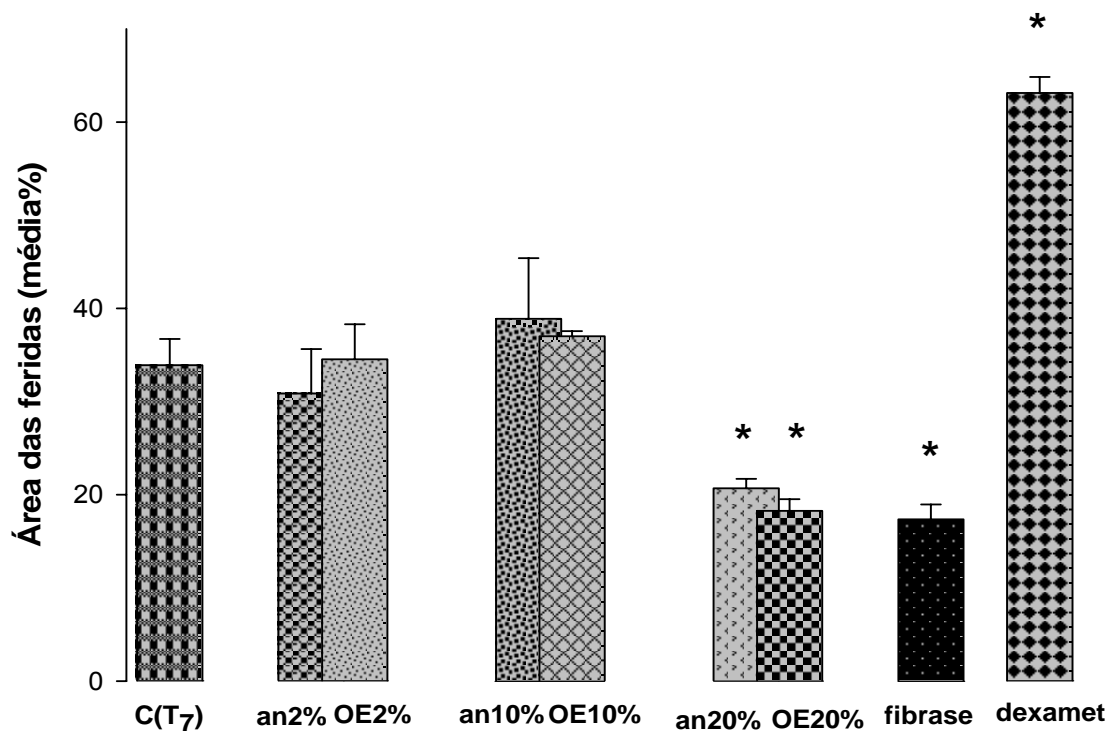


Figura 20. Efeito tópico do anetol e OECz comparado ao efeito tópico da fibrase e dexametazona com 7 dias de tratamento sobre a área da ferida aberta em camundongos. Gráfico mostrando o efeito do Anetol, OECz, fibrase e dexametazona na área das feridas. As colunas representam a média da área das feridas dos grupos correspondentes, expressa em percentual do grupo controle (salina) no início do tratamento, considerado tempo zero. As barras verticais representam o erro padrão da média. * $P = <0,001$ significativa em relação ao controle, Student-Newman-Keuls Method.

Como pode ser visto na Figura 21, o tratamento com OECz 2% e 10% e anetol 2% e 10% por 15 dias, não reduziu a área das feridas. O efeito da fibrase, OECz 20% e anetol 20%, reduziu significativamente a área das feridas com 15 dias de tratamento $P = <0,001$. O efeito da dexametazona aumentou de forma significativa a área das feridas $P = <0,001$ Student-Newman-Keuls Method.

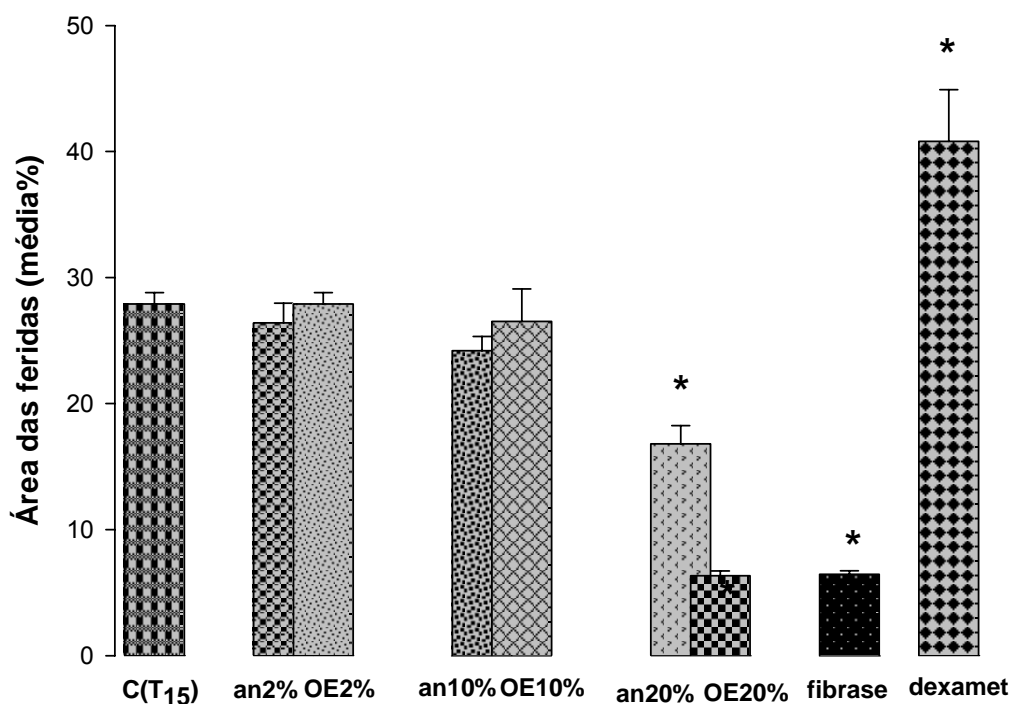


Figura 21. Efeito tópico do anetol e OECz comparado ao efeito tópico da fibrase e dexametazona com 15 dias de tratamento sobre a área da ferida aberta em camundongos. Gráfico mostrando o efeito do anetol, OECz, fibrase e dexametazona na área das feridas. As colunas representam a média da área das feridas dos grupos correspondentes, expressa em percentual do grupo controle (salina) no início do tratamento, considerado tempo zero. As barras verticais representam o erro padrão da média. * P = <0,001 significante em relação ao controle, teste de variância ANOVA, Student-Newman-Keuls Method.

5.2. Avaliação microscópica

Para a avaliação microscópica do processo de reparo tecidual, foram analisados os aspectos presentes nas fases características do processo de cicatrização. A análise da intensidade da reação inflamatória foi feita pela observação histológica das características do infiltrado inflamatório. A regeneração da camada serosa foi observada pelo nível de ceratinização do epitélio neoformado. O tecido de granulação foi observado em suas características estruturais quanto à intensidade de neoformação vascular e presença de fibroblastos e macrófagos, pela hematoxilina/eosina. A fase de remodelação foi analisada em virtude da colagenogênese quanto à intensidade

e característica da proliferação de fibras colágenas na cicatriz, tecido músculo aponeurótico e pele, se do tipo fibrilar, frouxo ou denso, avaliados pelo tricrômico de Masson.

Como demonstrado na Figura 22-A, com 3 dias de tratamento, o aspecto histológico do grupo controle apresentou epitélio queratinizado, com tecido conjuntivo organizado e discreto tecido de granulação. Nas Figuras 22-B e 23-A, podemos observar que com 3 dias de PO o grupo tratado com anetol 20%, apresentou epitélio delgado, tecido conjuntivo frouxo e desorganizado, com intenso infiltrado inflamatório, presença de tecido de granulação e muitos vasos sanguíneos, com presença de hemorragia intercelular. O grupo tratado com OECz 20% apresentou um tecido epitelial mais espesso, com moderado infiltrado de característica mista (neutrófilos e mononucleares). A análise histológica revelou a presença de intensa vascularização, fibroblastos pouco fusiformes e fibras colágenas muito desorganizadas como visto na Figura 23-B.

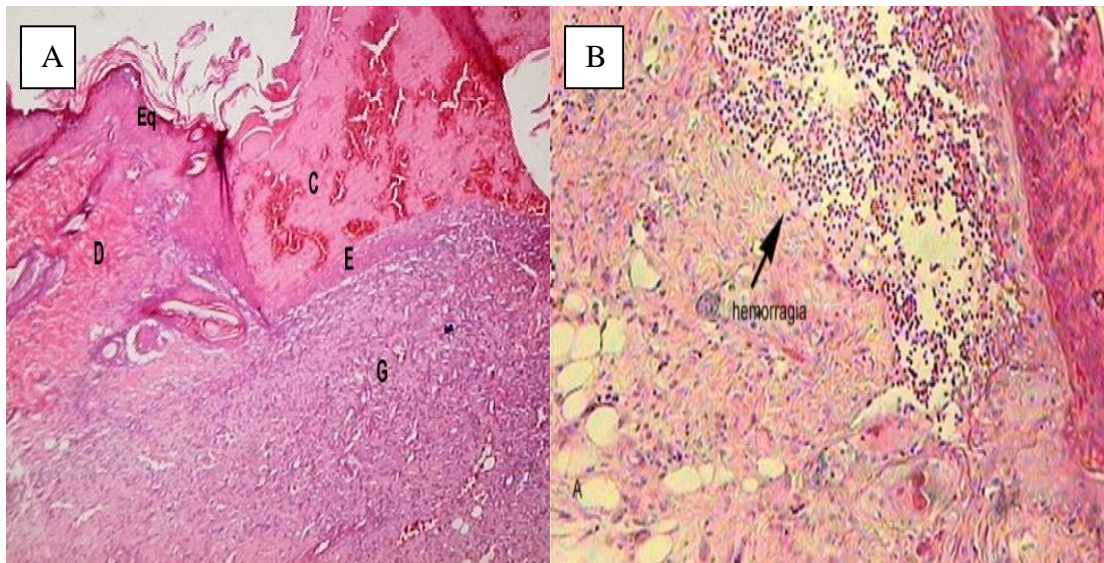


Figura 22. A- Aspecto histológico do grupo controle com 3 dias de pós-operatório. Presença de crosta (C), epitélio neoformado (E), tecido de granulação (G), a pele normal com derme (D) e epitélio pavimentoso estratificado queratinizado (Eq). H. E. 40x; **B- grupo anetol 20% com 3 dias de tratamento.** Presença de intensa hemorragia (hemácias fora dos vasos). H. E. 100x

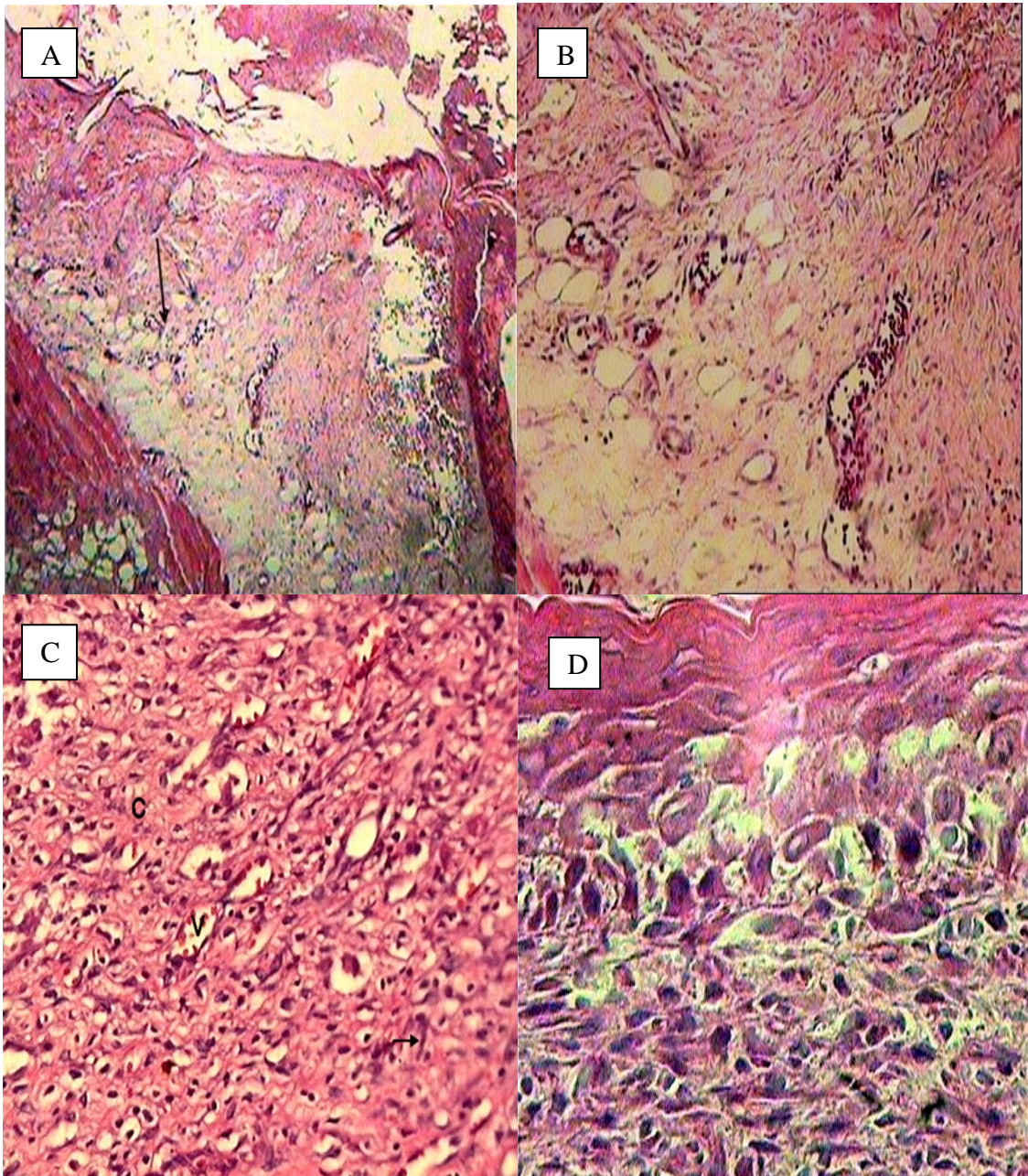


Figura 23. A- Aspecto histológico do grupo anetol 20% com 3 dias de tratamento. Infiltrado inflamatório, edema extracelular. Tecido conjuntivo frouxo e muito desorganizado. H. E. 400x; **B grupo OECz 20% com 3 dias de tratamento.** Vascularização intensa, moderado infiltrado inflamatório, tecido conjuntivo frouxo. H.E. 100x; **C- grupo controle com 7 dias de tratamento.** Fibra colágena (C), fibroblasto (→) e vasos sanguíneos (V). H.E. 200x; **D- grupo anetol 20% com 7 dias de tratamento.** Intenso edema intercelular. tecido conjuntivo frouxo, H.E. 400x.

Com 7 dias de pós-operatório, foi possível observar como mostra a Figura 23-C, que o grupo controle apresentou tecido de granulação com angiogênese, fibroblastos e fibras colágenas organizadas. De acordo com a Figura 23-D, o grupo tratado com anetol 20% apresentou intenso edema intercelular. A análise revelou presença de crosta no epitélio, moderado

infiltrado inflamatório, intenso tecido de granulação com presença de angiogênese. Os fibroblastos se mostraram mais volumosos e pouco fusiformes com poucas fibras colágenas desorganizadas. Como pode ser observado na Figura 24-A, o grupo tratado com OECz 20%, apresentou epitélio queratinizado, com leve infiltrado inflamatório e moderado tecido de granulação com presença de muitos fibroblastos e colágeno desorganizado.

Com 15 dias de tratamento, as observações histológicas do grupo controle, evidenciaram um epitélio neoformado contínuo e queratinizado, com ausência de células inflamatórias. Presença de fibroblastos fusiformes com feixes de fibras colágenas bem organizadas. A análise microscópica do grupo anetol 20% mostrada na Figura 25-A, revelou um epitélio queratinizado, com pouco infiltrado inflamatório, muitos fibroblastos fusiformes com fibras colágenas organizadas e ausência de granulação. No grupo tratado com OECz 20%, podemos observar na Figura 25-B, a presença de um epitélio queratinizado, com pouco infiltrado inflamatório, tecido conjuntivo de densidade variada com presença de fibrócitos e pouca granulação.

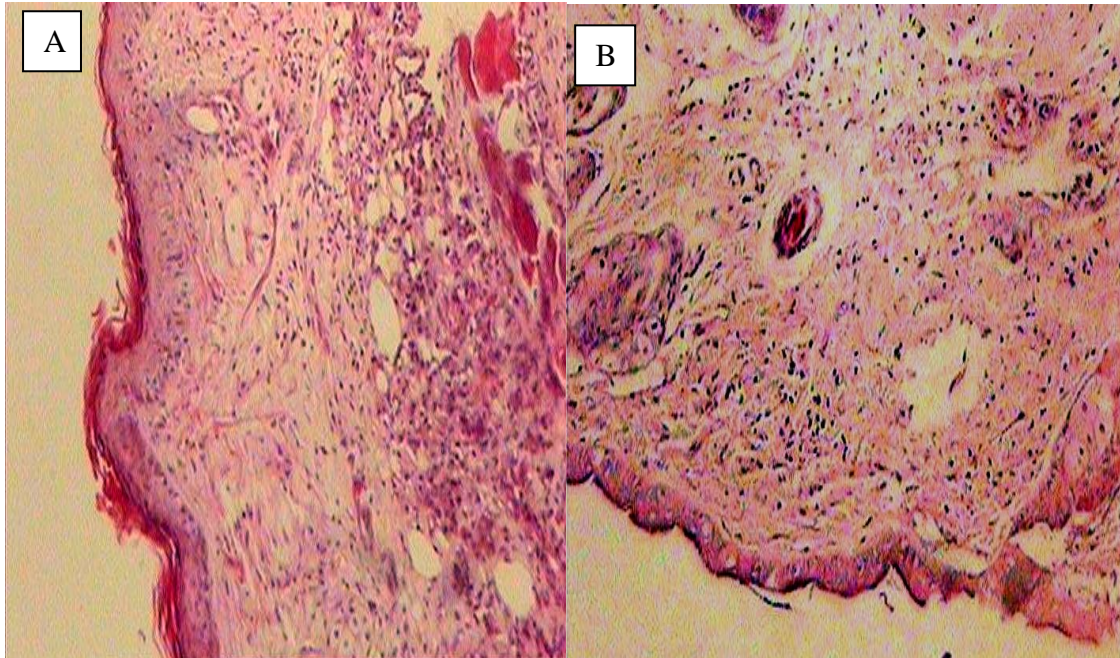


Figura 24. A- Aspecto histológico do grupo OECz 20% com 7 dias de tratamento. Epitélio queratinizado, fibroblastos. H.E. 100x; B- grupo OECz 20% com 7 dias de tratamento. Epitélio queratinizado, fibroblastos. H.E. 100x;

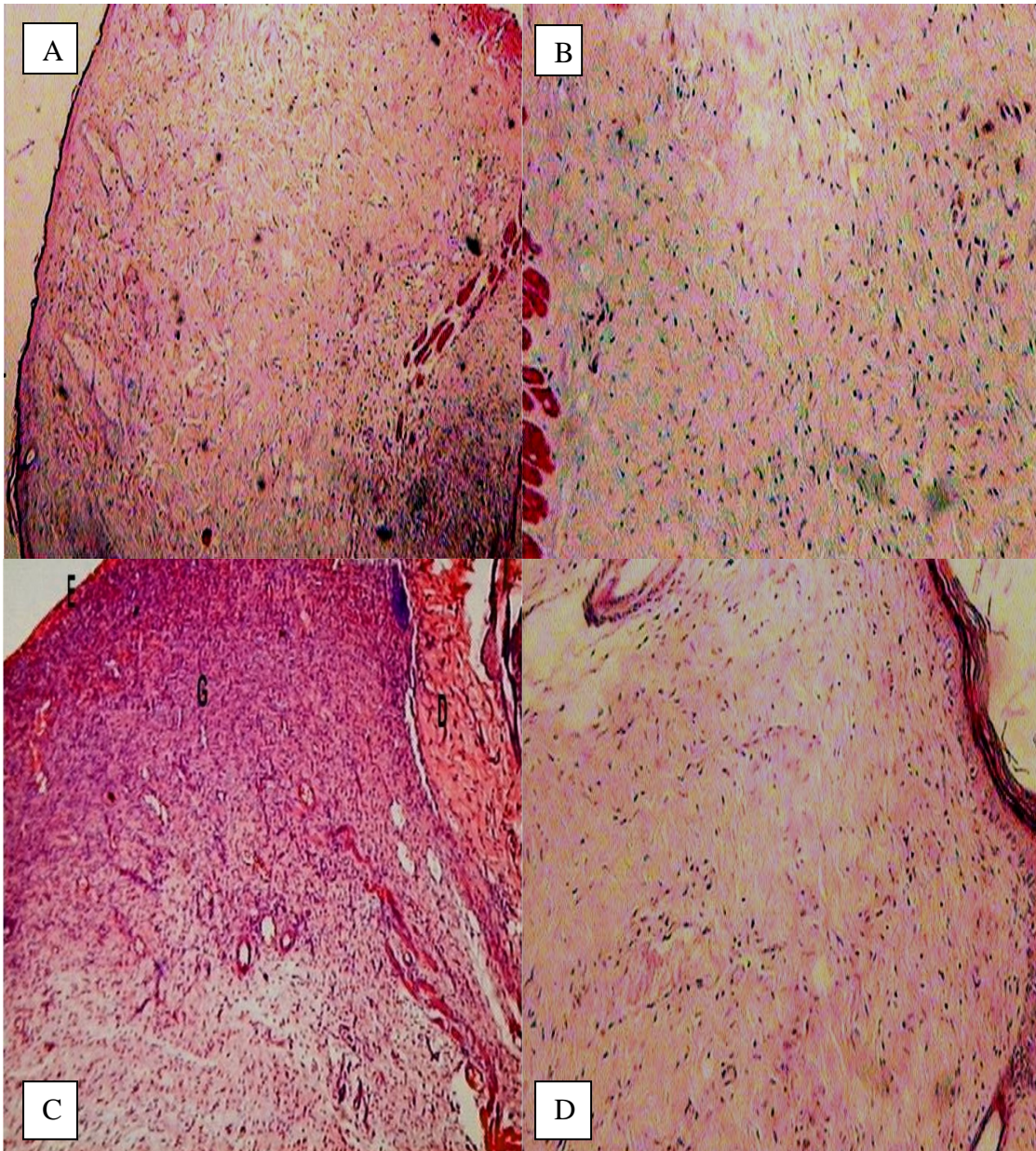


Figura 25. A- Aspecto histológico do grupo anetol 20% com 15 dias de tratamento. Tecido conjuntivo bem organizado, com pouco tecido de granulação. H.E. 100x; **B- grupo OECz 20% com 15 dias de tratamento.** Epitélio delgado e queratinizado, pouco tecido de granulação. H.E. 100x; **C- grupo controle com 15 dias de tratamento.** Epitélio queratinizado epitélio neoformado (E), tecido de granulação (G) e a derme da pele normal (D) H.E. 40x; **D- grupo anetol 20% com 15 dias de tratamento.** Epitélio queratinizado, fibroblastos fusiformes, fibras colágenas organizadas. H.E. 100x.

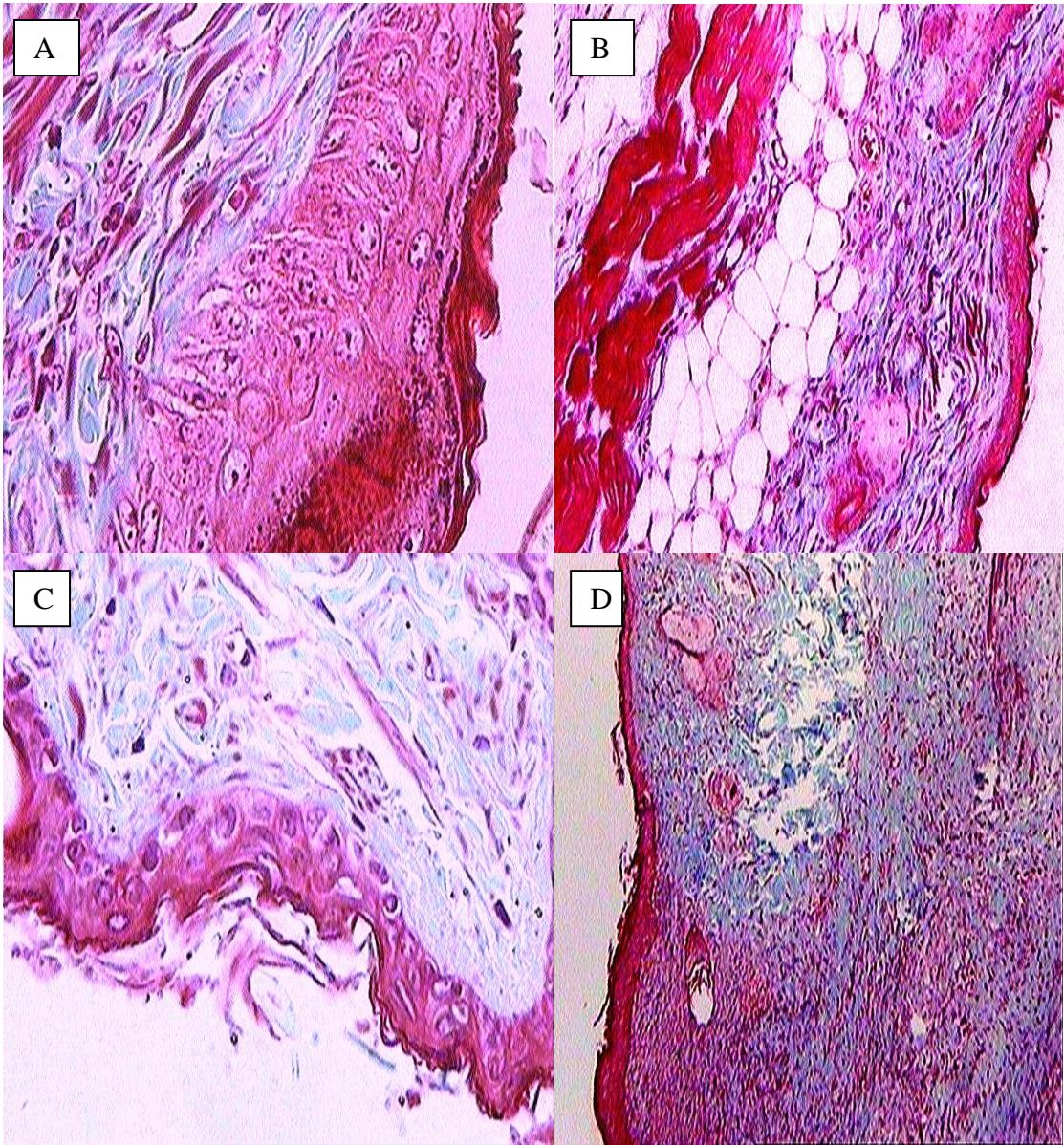


Figura 26. A- Aspecto histológico do percentual de colágeno no grupo OECz com 3 dias de tratamento TM 400x; **B-** Grupo anetol 20% com 3 dias de PO, TM 100x; **C-** Grupo anetol 20% com 7 dias de tratamento, TM 400x; **D-** Grupo OECz 20% com 7 dias de tratamento, TM 100x.

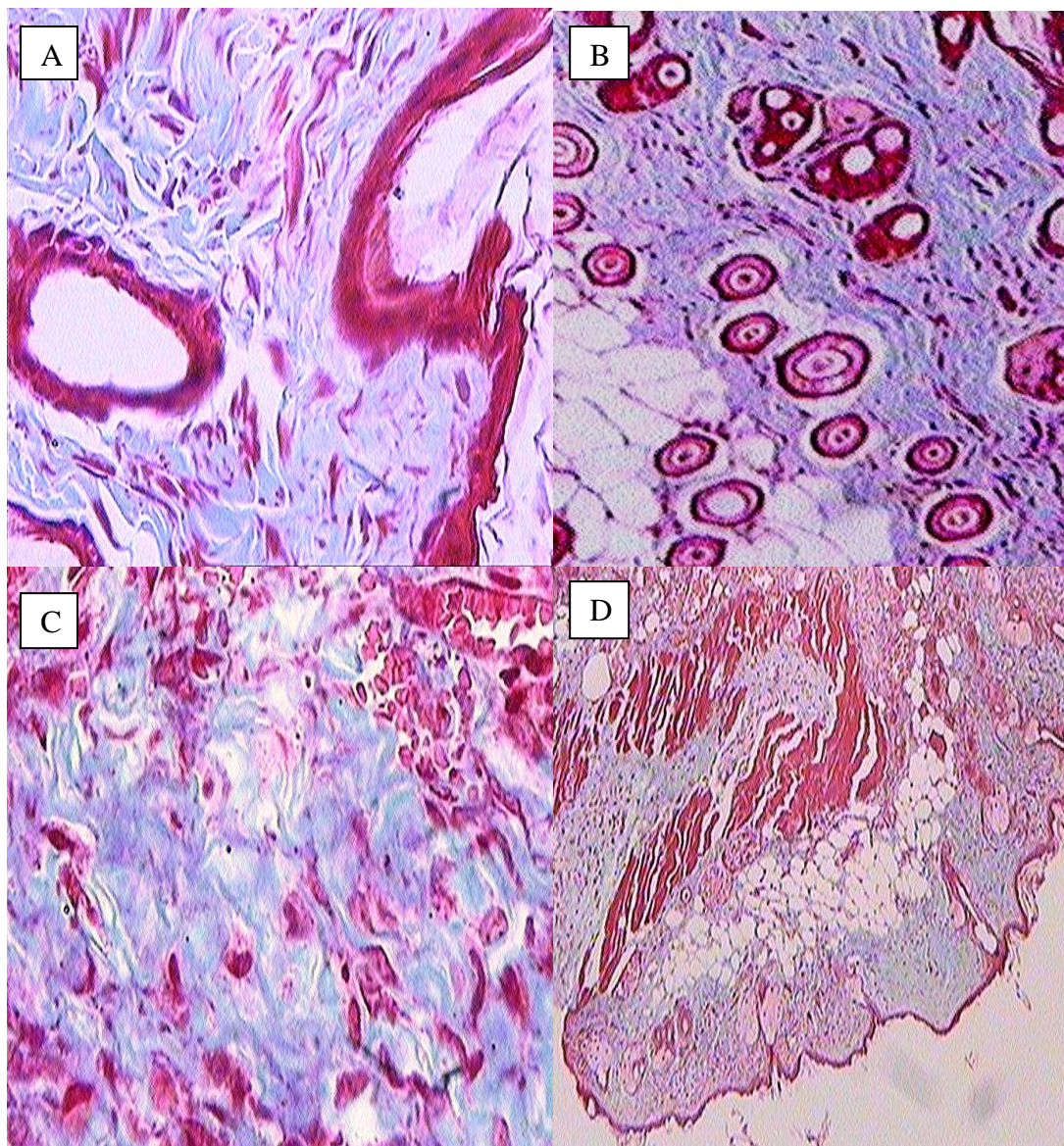


Figura 27. Aspecto histológico da proporção de colágeno com 15 dias de PO. As fibras colágenas estão são visualizadas em azul. **A-** OECz 20%, TM 400x; **B-** Anetol 20%, TM 100x; **C-** Fibrase, 400x; **D-** Grupo controle, TM 40x

A avaliação histométrica permitiu observar que com 15 dias de tratamento o grupo controle apresentou em média 28,83 fibroblastos e 35,33 fibras colágenas pelos campos observados; o grupo OECz 20% apresentou em média 25,50 fibroblastos e 44,83 fibras colágenas; o grupo anetol 20% apresentou em média 24,33 fibroblastos e 39,33 fibras colágenas; o grupo fibrase apresentou em média 21,67 fibroblastos e 42,83 fibras colágenas; o grupo dexametazona apresentou em média 22,17 fibroblastos e 20,17 fibras colágenas. A análise estatística para o número de fibroblastos mostrou que houve uma diferença significativa dos grupos tratados com anetol 2% e 10% e

OECz 2% em relação ao grupo OECz 20% e anetol 20%, $p < 0,001$, teste de variância ANOVA, Holm-Sidak method (Tab. 8).

Com 15 dias de tratamento, a análise estatística para o número de fibras colágenas mostrou que houve uma diferença significativa dos grupos controle, OECz 2%, anetol 2% e 10% e dexametazona em relação ao grupo OECz 20%. Os grupos dexametazona e anetol 10% tiveram uma diferença significativa em relação ao grupo anetol 20%, $p < 0,001$, teste de variância ANOVA, Holm-Sidak method (Tab. 8).

Os dados nos mostram o efeito cicatrizante do OECz 20% e do anetol 20% em relação às demais doses testadas. A diferença estatisticamente significativa em relação ao número de fibras colágenas, e a análise histológica qualitativa (Fig. 27), demonstra uma cicatriz de melhor qualidade e resistência pela proporção de fibras colágenas depositadas na matriz extracelular e estrutura de organização do tecido de granulação.

Grupos	Conc.	Dias	Fibroblastos	Fibras colágenas	Vasos sanguíneos	Leucócitos
Controle		3	11,50 ± 0,76	10,17 ± 0,40	2,17 ± 0,17	19,67 ± 0,99
		7	24,50 ± 1,69	29,00 ± 2,31	3,69 ± 0,79	15,83 ± 0,79
		15	22,83 ± 1,35	35,33 ± 1,63**	5,83 ± 0,70	9,83 ± 1,19
	2%	3	11,50 ± 0,85	10,67 ± 0,88	2,00 ± 0,37	17,67 ± 1,05
		7	22,33 ± 1,54	28,17 ± 2,70	3,67 ± 1,02	10,67 ± 2,12
		15	18,50 ± 1,80 +	34,67 ± 1,91**	5,00 ± 0,86	7,67 ± 1,63
OECz	10%	3	10,67 ± 0,88	9,50 ± 0,76	1,67 ± 0,33	20,67 ± 0,67
		7	24,00 ± 1,24	29,67 ± 1,05	4,00 ± 0,86	15,50 ± 1,26
		15	20,17 ± 0,79	38,17 ± 0,70**	5,83 ± 0,79	8,50 ± 0,99
	20%	3	14,33 ± 0,95	9,33 ± 0,71	1,50 ± 0,22	20,67 ± 0,61
		7	27,00 ± 1,44	32,50 ± 1,38	5,00 ± 0,86	12,83 ± 0,79
		15	25,50 ± 1,12	44,83 ± 1,51	7,17 ± 0,60	5,67 ± 1,05
Anetol	2%	3	11,67 ± 0,49	9,83 ± 0,60	1,67 ± 0,33	23,67 ± 1,02
		7	20,83 ± 0,95	28,17 ± 2,21	3,17 ± 0,48	17,50 ± 0,99
		15	17,00 ± 1,21 *+	28,17 ± 2,21	5,50 ± 0,50	9,17 ± 0,87
	10%	3	11,67 ± 0,71	9,67 ± 0,49	1,33 ± 0,21	22,50 ± 0,67
		7	20,50 ± 0,99	28,17 ± 2,15	2,67 ± 0,33	19,50 ± 0,76
		15	17,00 ± 0,97 *+	30,83 ± 1,72 #	5,00 ± 0,37	9,17 ± 1,14
Fibrase	20%	3	11,17 ± 0,60	9,50 ± 0,34	1,50 ± 0,22	24,83 ± 0,48
		7	26,83 ± 1,85	28,33 ± 2,06	4,33 ± 0,84	19,83 ± 0,98
		15	24,33 ± 1,41	39,33 ± 1,12	5,67 ± 0,67	6,83 ± 1,08
		3	12,67 ± 0,33	9,33 ± 0,49	1,50 ± 0,22	19,17 ± 0,60
		7	23,33 ± 1,94	30,33 ± 1,02	4,00 ± 0,68	15,17 ± 1,35
		15	21,67 ± 2,11	42,83 ± 1,58	6,67 ± 0,49	9,17 ± 0,87
Dexamet.		3	11,50 ± 0,43	8,00 ± 0,45	1,17 ± 0,17	17,67 ± 0,49
		7	24,17 ± 2,41	15,33 ± 1,74	3,67 ± 0,76	8,33 ± 0,95
		15	22,17 ± 1,89	20,17 ± 1,78 **#	5,83 ± 0,31	6,50 ± 0,92

Tabela 8. Média do número de células por grupos. Tabela mostrando a média do número de células contadas nos grupos tratados com OECz, anetol, fibrase, dexametazona e grupo controle. * diferença do número de fibroblastos estatisticamente significativa com 15 dias de tratamento em relação ao grupo anetol 20%; + significante em relação ao grupo OECz 20%, p< 0,001 teste de variância ANOVA, Holm-Sidak method. ** diferença do número de fibras colágenas estatisticamente significativa em relação ao grupo OECz 20%; # diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo anetol 20%, p< 0,001 teste de variância ANOVA, Holm-Sidak method.

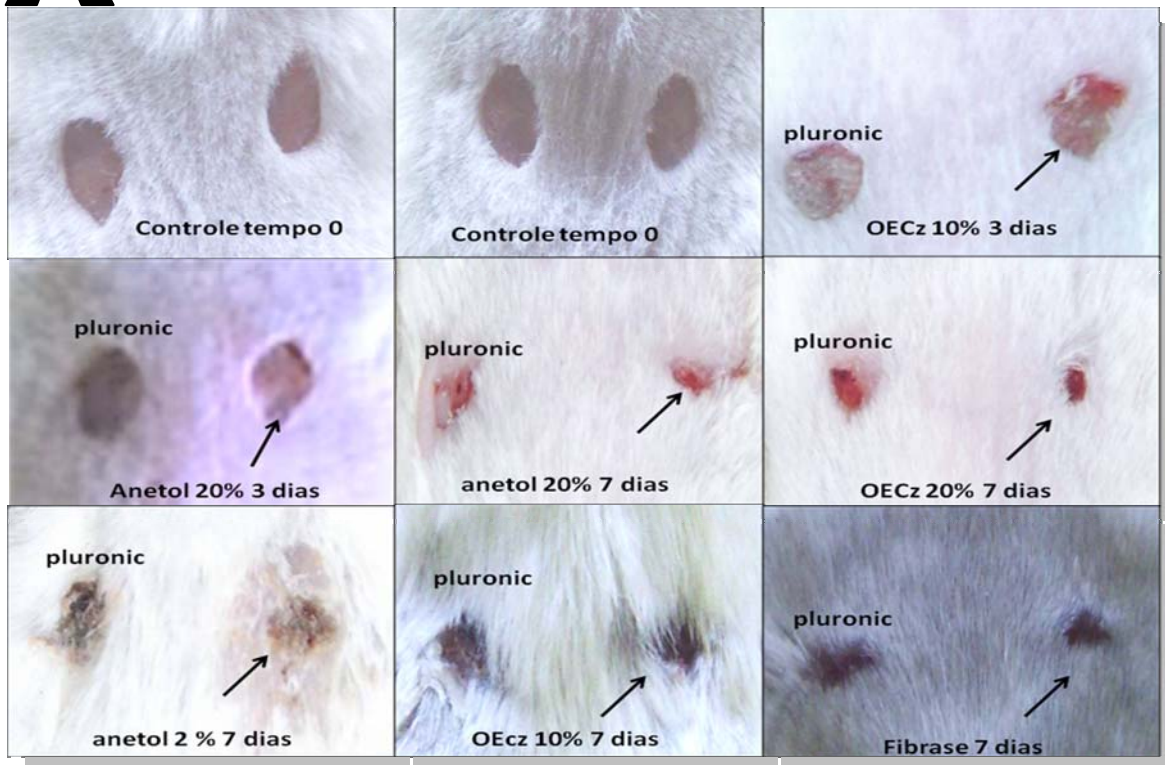
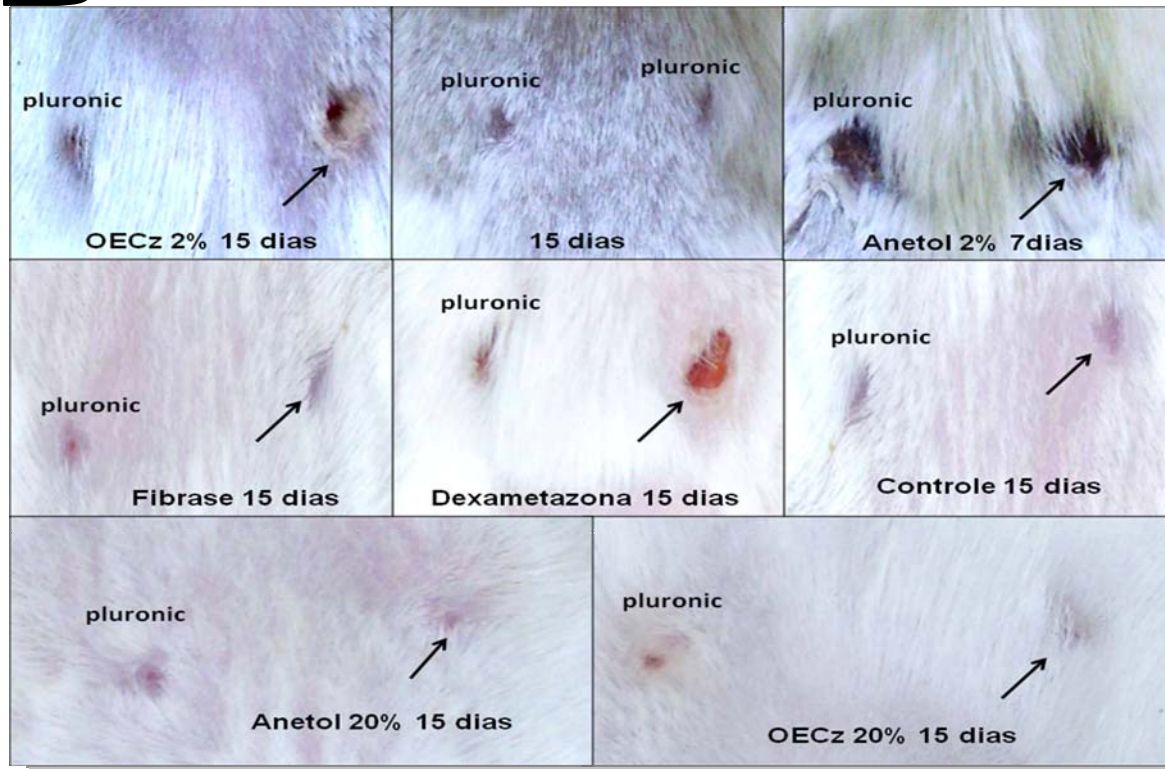
A**B**

Figura 28. Aspecto das feridas durante as fases da cicatrização. A- grupos com 3 e 7 dias de tratamento; B- grupos com 7 e 15 dias de tratamento

6. DISCUSSÃO

Este é um estudo pioneiro que comprovou a eficácia da atividade cicatrizante do óleo essencial do *Croton zehntneri* Pax at Hoffm (OECz) e do seu constituinte majoritário o Anetol, em feridas cutâneas de camundongos. O presente estudo observou os aspectos macroscópicos da evolução clínica do processo de reparo tecidual em suas respectivas fases, envolvendo a análise microscópica de fragmentos do tecido contendo as cicatrizes.

A capacidade de reparação tecidual é um fenômeno observado nos seres vivos de grande importância para sua sobrevivência quando ocorrem lesões acidentais ou cirúrgicas. A resposta fisiológica ao trauma de qualquer tipo é, o edema e a inflamação um fator importante para a cicatrização.

O processo de cicatrização envolve a migração de células inflamatórias, a síntese de tecido de granulação, a deposição de colágeno e de proteoglicanos e a maturação da cicatriz, estando associada à intensa remodelação e reposição do colágeno. A medicina complementar vem sendo utilizada como alternativa para o seu tratamento, como a utilização de produtos naturais extraídos de plantas medicinais. Os óleos essenciais que apresentam substâncias com hidroxilas fenólicas possuem atividade anti-séptica e bactericida podendo ser utilizadas, topicamente, no tratamento de ferimentos (MENDONÇA, 2006; DÁRIO, 2008).

Algumas plantas medicinais largamente utilizadas de forma empírica ao longo dos anos, passaram a receber atualmente, uma maior atenção científica, como o *C. zehntneri* Pax at Hoffm, popularmente conhecido como canela-de-cunhã. O *C. zehntneri* é amplamente utilizado na medicina popular como agente antiespasmódico e ganha agora validação científica como agente cicatrizante. Estudos realizados em nosso laboratório, com o OECz em camundongos, evidenciaram sua atividade anti-inflamatória e anti-edematogênica (OLIVEIRA, 2001). O estudo de Oliveira dentre outros, amparou nossa investigação sobre a ação do OECz na fase aguda do processo de reparo tecidual, visto que a literatura não refere trabalhos

experimentais com o OECz que avaliem os aspectos histológicos e morfológicos da cicatrização.

Os trabalhos encontrados na literatura científica que estudam as plantas medicinais relacionadas ao processo de cicatrização utilizam, na sua grande maioria, ferimentos na região dorso-costal em tegumento de camundongos. O mesmo modelo foi utilizado neste experimento. A região dorso costal é indicada para este tipo de experimento, pois evita o trauma local pelo próprio animal, (FACURY, 2001) permanecendo aberta para que possa ocorrer uma cicatrização por segunda intenção, proporcionando uma maior quantidade de tecido de granulação.

Para proporcionar uma boa resposta ao tratamento, foram tomados cuidados com o manejo dos animais e sua acomodação adequada no pós operatório, evitando a interferência do “stress” no tratamento. Os níveis de “stress” foram avaliados antes e durante o experimento, através de observações como peso corporal, consumo de alimento e água, alterações comportamentais, fezes e urina. O “stress” psicológico prejudica a cicatrização de feridas em roedores devido ao aumento no nível de cortisol (UEZ, 2005). Durante todo o período experimental não foram observados sinais de “stress” como auto-agressão ou canibalismo de outros animais sobre a área da ferida exposta. A manipulação dos animais foi a mesma em todos os grupos, e não produziu “stress” que interferisse no processo de cicatrização.

Durante a observação clínica ficou constatado que, durante os dias experimentais, os animais dos grupos tratados com anetol e OECz, tiveram o mesmo comportamento no que diz respeito à manutenção do peso, alimentação e atividade motora quando comparados ao grupo controle, porém foi observada uma restrição na ingestão de água por todos os animais tratados com anetol e OECz nessa fase da cicatrização.

A utilização de animais adultos jovens nesse tipo de estudo, oferece uma boa resposta tecidual uma vez que minimiza a ação do hormônio do crescimento impedindo a formação de cicatrizes hipertróficas (BIONDO, *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2002). Considerando esse aspecto, priorizamos a

utilização de camundongos com oito semanas de vida, os quais após o procedimento cirúrgico permaneceram em gaiolas metabólicas individuais a fim de que não houvesse alteração no desenvolvimento normal da cicatrização pela ação traumática de outro camundongo, como também para prevenção de contaminação pelo contato com resíduos de excreção metabólica como fezes e urina. A observação pós-operatória dos animais não foi levada a períodos mais prolongados do que duas semanas, pois segundo RIBEIRO *et al.*, 2003 é justamente nessa fase que os eventos e as diferenças entre animais tratados e não tratados são mais evidentes.

A resposta inflamatória consiste em dois componentes principais: uma reação vascular e uma reação celular. Edema e hiperemia são sinais característicos do processo inflamatório, diretamente relacionado com o efeito de mediadores vasoativos que alteram o calibre vascular (BADYLAK, 2002). No nosso estudo o edema se apresentou de forma moderada em todos os grupos experimentais, desde o 1º dia PO, prolongando-se até o 3º dia de forma evidente no grupo cujas feridas foram tratadas com anetol 20%. Na avaliação macroscópica, a intensidade do edema observado do 1º ao 3º dia PO como demonstrado na tabela 1 se manteve constantemente discreto nos grupos tratados com dexametazona, OECz 10% e OECz20%, enquanto que as feridas tratadas com fibrase apresentaram um edema moderado quando comparado com as feridas dos outros grupos. Este aspecto pode ser evidenciado no 3º dia PO, quando a diferença foi mais marcante, observando-se que 66,6% das feridas tratadas com solução salina, OECz 2% e anetol 2% apresentaram edema de intenso a moderado, frente a 33,3% das lesões tratadas com OECz 20% e dexametazona que apresentaram edema leve. De forma similar, 100% das feridas tratadas com anetol 20% apresentaram edema intenso.

Oliveira (2001) demonstrou em seu estudo que o OECz possui atividade antinociceptiva e anti-edematogênica, sendo a ação anti-edematogênica mais eficiente. Ambos os efeitos ocorrerem com doses muito abaixo das tóxicas, sugerindo um índice terapêutico seguro. Em sua análise, o estudo da toxicidade aguda através da determinação da DL₅₀, revelou uma DL₅₀ de 3,5 g/kg, para o OECz, administrado por via oral. Este fato o classifica como óleo essencial de

baixa toxicidade, o que nos padrões da aromoterapia, pode ser enquadrado na categoria C. Os óleos com essa classificação são considerados seguros em termos de toxicidade aguda. Nossos resultados corroboram com os de Oliveira (2001), mostrando a eficiência do OECz em inibir o edema local através do uso tópico em feridas cutâneas. O estudo de Oliveira sugere a potencialização terapêutica do uso tópico do OECz, e recomenda cautela no uso dos óleos essenciais por via oral, pois a administração por essa via é provavelmente maior condutora de problemas de toxicidade sistêmica em comparação ao uso tópico. Em virtude desse amparo científico não achamos necessário a determinação da DL₅₀ em nosso estudo, uma vez que em nenhum grupo foi observado efeito adverso às doses do OECz utilizadas.

Estudos analisando a resposta na cicatrização através de drogas anti-inflamatórias administradas por vias não tóxicas, foi demonstrado por Martins *et al.* (2006) através de uma análise comparativa da cicatrização da pele de ratos com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Acreditando na fundamental importância da modulação da fase inflamatória no processo de cicatrização de feridas em nosso estudo avaliamos o efeito tópico de uma droga com propriedade anti-inflamatória comprovada através de sua administração por via oral.

Apesar do tratamento por via tópica, acreditamos ainda que o OECz tenha alcançando os vasos sanguíneos locais, promovendo seu efeito antiedematogênico, pois segundo RIBEIRO *et al.* (2008), o trauma tecidual favorece uma exposição da rede capilar, facilitando assim uma melhor absorção do óleo. Desde o início do tratamento, nas feridas tratadas com o OECz 20%, foi observado uma menor intensidade do edema em relação às feridas dos outros grupos. Posteriormente na fase seguinte, pelo alcance dos vasos delgados em neo-formação que compõe o tecido de granulação, observou-se o desaparecimento do edema após o 3º dia de pós-operatório (Figura 8), e a intensa presença de tecido de granulação no 7º dia de pós-operatório (Figura 10).

O OECz nas doses testadas por Oliveira 2001, foi eficaz em inibir a formação do edema induzido por dextrana durante todo o período

experimental. Além disso, o OECz também inibiu a formação do edema induzido por carragenina durante a primeira hora. Analisados juntos os resultados de inibição de edema induzido por dextrana e por carragenina sugerem que a atividade anti-edematogênica do OECz se deve predominantemente a uma inibição da liberação e/ou efeitos de HA e/ou 5-HT. No entanto, os dados mostraram que o OECz na dose de 100 mg/kg inibiu significativamente o edema de pata induzido por HA e 5-HT sugerindo que o OECz apresenta uma inibição da ação desses mediadores na resposta inflamatória. Além disso, outros estudos realizados em nosso laboratório mostraram que o OECz bloqueia os efeitos da HA em músculo liso intestinal de cobaia (COELHO-DE-SOUZA, 1997) reforçando assim um possível efeito do OECz, numa inibição dos efeitos da HA e/ou 5-HT na atividade anti-edematogênica.

Em adição o efeito anti-nociceptivo e ou analgésico do OECz (OLIVEIRA *et al.*, 2001), permite que o reparo tecidual ocorra de forma confortável sem a presença de dor e sem ocorrência de infecções oportunistas decorrente da atividade antifúngica e antimicrobiana presente no anetol (FUGITA *et al.*, 2007; DE M *et al.*, 2001).

Neste trabalho, demonstramos que o tratamento tópico com OECz modulou a fase inflamatória do processo de cicatrização de feridas em camundongos, uma vez que os sinais flogísticos edema e hiperemia ocorreram no grupo tratado com OECz 20% por um menor período de tempo, de forma menos intensa, quando comparado ao grupo controle e aos demais grupos, com exceção do grupo tratado com a dexametazona que já é classicamente conhecida pelo seu poderoso efeito anti-inflamatório, .

De forma significativa, o grupo tratado com fibrase, OECz 2%, OECz 10%, anetol 2%, anetol 10% e o grupo controle salina apresentou nesta fase um menor percentual de lesões com características exudativas (Fig. 28). Por outro lado o grupo tratado com anetol 20%, apresentou acentuado exsudato desde o 1º dia de tratamento, prolongando-se até o 3º dia. Com exceção das feridas tratadas com anetol 20%, observou-se no terceiro dia de pós-operatório

que as mesmas se apresentaram secas, com ausência de exsudato, bordas regulares e presença de crostas menos espessas que no grupo OECz 20%.

A crosta começa a ser formada naturalmente a partir do exsudato filtrado na ferida que aparece na superfície da pele. Ela proporciona uma proteção limitada contra a contaminação externa, uma manutenção da hemostasia interna e uma superfície sob a qual pode ocorrer a migração de células e o movimento das bordas da lesão (PEACOCK, 1985). As observações mostraram que houve formação de crostas a partir de 72 horas de PO nas feridas tratadas com OECz 20% e anetol 20%. Entretanto, notou-se um prolongamento no tempo de permanência da crosta nas feridas dos demais grupos tanto que no 10º dia de avaliação, em média, 66% dos animais dos grupos experimentais, ainda apresentavam esta fina proteção sobre as lesões, em contraste com a ausência desta sobre as lesões do grupo OECz 20% e anetol 20%. As observações macroscópicas evidenciaram o desprendimento precoce das crostas no grupo OECz 20% e anetol 20%, e uma visualização precoce e crescente do tecido cicatricial desde o 3º dia de pós-operatório. Além de menos espessas, notamos também que as crostas do grupo OECz 20% e Anetol 20% apresentavam uma coloração mais avermelhada em comparação ao demais grupos (Fig. 28)

Vários trabalhos têm relatado e difundido a utilização de um sistema Red/Yellow/Black - RYB, proposto por Cuzzel (1988), para classificação de feridas que cicatrizam por segunda intenção. Segundo tal sistema, as feridas são classificadas de acordo com a coloração que, segundo o autor, freqüentemente reflete o balanço entre tecidos novos e tecidos necrosados. De acordo com o sistema RYB as feridas de coloração avermelhada incluem feridas pós-desbridamento, e feridas em cicatrização, em que predomina o tecido de granulação e o novo epitélio. Nesse tipo de ferida, a preservação do ambiente úmido, protege os tecidos neoformados e previne a infecção (CUZZEL, 2002). É evidente que a coloração não constitui um parâmetro preciso de avaliação da ferida e não deve ser o único, pois normalmente as feridas apresentam combinações de diversas colorações, de acordo com a

profundidade da lesão, da ação terapêutica usada e das condições locais e gerais.

A técnica utilizada para realização das feridas através do “punch”, se deu de forma cuidadosa, evitando-se a ruptura do tecido que recobre a musculatura, a fáscia muscular, objetivando prevenir o rompimento de vasos sanguíneos com conseqüente extravasamento dos mesmos. Dessa forma, não se fez necessário o procedimento de medidas para contenção de sangramentos, uma vez que a hemostasia se deu de forma fisiológica, impedindo a formação de coágulos. A prevenção de sangramento no ato cirúrgico, em feridas cutâneas experimentais, evita o aparecimento precoce de crostas, as quais podem se apresentar mais espessas diminuindo a ação e absorção do produto a ser aplicado sobre as mesmas, deixando-as mais secas. Popularmente há a crença de que "ferida seca cura mais rápido", porém estudos demonstram que feridas abertas formam crosta e epitelizam mais lentamente (MANDELBAUM *et al.*, 2003). No presente estudo, observamos que o desprendimento precoce das crostas, acelerou a velocidade da cicatrização, pois proporcionou uma maior absorção das doses aplicadas, aliada a utilização de uma base gel como veículo a qual permitiu um maior tempo de contato com o óleo sobre as feridas incrementando uma maior e mais rápida absorção do produto pela pele.

Ainda em relação ao ambiente da lesão, VOGT e colaboradores (1995), em um trabalho realizado com suínos, observaram que a cicatrização em meios líquido e úmido foi significativamente mais rápida comparada com feridas secas. No presente trabalho, o fato do veículo gel PF- 127 permanecer por algum tempo nas feridas favoreceu a umidade do meio em contraste com a solução salina que, depois de colocada nas feridas, evaporou ou escorreu em pouco tempo, porém nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos controle salina e plurônic PF-127, contrariando as observações feitas no estudo acima citado, o que nos garantiu a segura utilização do pluronic F-127 como veículo, sem a influencia do mesmo na cicatrização.

A lesão endotelial na área da ferida cutânea compromete o aporte de oxigênio em função da formação do trombo hemostático, ativando o influxo de

macrófagos para a área da lesão. Estas células no intuito de conferir uma ação antimicrobiana local liberam radicais de oxigênio, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (LI *et al*, 2007; BALBINO *et al.*, 2005). Em nosso estudo pudemos observar o controle de contaminação infecciosa em 100% dos animais, tratados com o OECz e com o anetol, o que nos sugere a possível ação antimicrobiana característica dos terpenóides presentes nas doses administradas (MURAKAMI *et al.*, 2004). Neste contexto, postulamos que as alterações no meio da lesão possam ser modificadas pela ação vasoconstritora local promovida pela inibição da produção de óxido nítrico provocada pelo OECz através de seu constituinte o anetol, conforme estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* observados na aorta de ratos (SIQUEIRA *et al.*, 2006; LAHLOU *et al.*, 2004). Com sete dias, os camundongos tratados com OECz 10% e 20%, assim como os tratados com anetol 10% e 20% apresentaram maior quantidade de fibroblastos provavelmente em função baixa concentração de óxido nítrico (Tab, 8) os quais apresentaram ao final do estudo um maior grau de cicatrização, provavelmente devido a um aumento na proliferação de fibroblastos. Após análise histológica constatou-se, que no sétimo dia o número de fibroblastos e a angiogênese foi maior nos animais tratados com OECz 20% e anetol20% em relação aos demais grupos (Fig. 24).

Estudos realizados por Sanchez Neto e colaboradores (1993), mostraram que o 7º dia pós-operatório corresponde ao período de maior número de fibroblastos presentes no tecido de granulação e que partir deste dia há um decréscimo no número de fibroblastos enquanto que as fibras colágenas vão aumentando com a progressão do processo de cicatrização. Nosso estudo corrobora com o estudo acima citado, e mostra em nossas análises histológicas grande quantidade de fibroblastos presentes no 7º e 15º dia (Fig. 25; Tab. 8).

O exsudato inflamatório, o sangue e o tecido necrótico sofrem ação de enzimas secretadas por neutrófilos promovendo a liquefação e posterior remoção através de vasos linfáticos. As diminutas partículas sólidas remanescentes são fagocitadas por macrófagos. Em seguida, fibroblastos e células endoteliais ocupam a área lesada e proliferam. Dentro de 3 a 5 dias

formam um tipo especializado de tecido denominado tecido de granulação (RIEDEL *et al.*, 2006; COTRAN *et al.*, 2000). Além dos fibroblastos, os capilares neoformados, juntamente com as células inflamatórias residuais, passam a constituir o tecido de granulação. Macroscopicamente o tecido de granulação é mole, carnosos, de um vermelho intenso, com superfície extremamente irregular, assumindo um aspecto granuloso o que determina o nome desse tecido (RIEDEL *et al.*, 2006). Em nosso estudo foi observado a presença de tecido de granulação a partir do 4º dia de tratamento, com mais ênfase nos grupos tratados com OECz 20% e anetol 20% (Fig. 28).

Como descrito na literatura, foi observado em nosso estudo que a formação de tecido de granulação se iniciou no terceiro ou quarto dia após a injúria tecidual e se manteve até a completa reepitelização. O fibroblasto é uma célula crítica para a formação do tecido de granulação. Ele não apenas produz colágeno fibrilar como também sintetiza elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, como a colagenase, importante para o desbridamento e remodelamento da matriz extracelular. Na fase de remodelamento, os fibroblastos residentes da pele e as células mesenquimais perivasculares se diferenciam em uma célula fenotipicamente alterada chamada de miofibroblasto que possui capacidade de contração exercendo papel fundamental na contração da ferida (ROBBINS, 2008; ANDERSON *et al.*, 2008; STRUTZ *et al.*, 2008; PELLEGRIN & MELLOR, 2007).

A riqueza de capilares no tecido de granulação propicia condições adequadas para os fibroblastos sintetizarem abundante material intercelular. A tensão de oxigênio é um fator crítico para a atividade fibroblástica. A deposição do colágeno inicia-se pelas bordas da ferida onde os níveis de oxigênio são mais favoráveis e progredem para o centro da lesão, acompanhando a proliferação dos capilares (Ribeiro *et al.*, 2008). Em nossa análise macroscópica e histológica observamos que as fibras colágenas se depositaram nas feridas de todos os grupos experimentais seguindo uma direção centrípeta, contudo o colágeno depositado nas feridas tratadas com o anetol 20% apresentou uma fraca organização estrutural ao 15º dia de pós-operatório (Fig. 27-B).

Segundo Ribeiro e colaboradores (2008), o primeiro colágeno se deposita, de 3 a 5 dias após a lesão e possui fibras mais finas correspondente ao colágeno do tipo III. Progressivamente, esse colágeno é substituído pelo colágeno tipo I, que é mais resistente. Em duas semanas as fibras colágenas tipo I são predominantes. No 4º dia, a lesão apresenta quantidades máximas de proteoglicanas e glicoproteínas, estas vão diminuindo gradativamente até atingirem, no 12º dia, a proporção normal. As proteoglicanas, dotadas de capacidade hidrófila, agregam água em torno de sua molécula determinando a formação de edemas localizados que favorecem o deslocamento celular auxiliando no processo cicatricial. Eventos como esses acima citados provavelmente podem justificar a presença de tecido de granulação bem formado observados no 7º PO nas feridas tratadas com OECz 20% e anetol 20% (Fig 24, 26-D).

O aumento da densidade de fibras colágenas leva a uma diminuição do fluxo sanguíneo que determina uma redução dos constituintes do tecido de granulação. Arteríolas e vênulas surgem então na área lesada por diferenciação de células mesenquimais em células musculares que envolvem os capilares, passando a constituir a parede desses novos vasos. Estas alterações fazem com que o tecido de granulação mude sua estrutura constituindo um tecido conjuntivo típico. A deposição de colágeno atinge o pico em torno do 80º dia e a resistência ao estiramento continua a crescer após vários meses. Após um ano, somente 70% da resistência original da derme é readquirida. O colágeno é constantemente renovado pela ação da colagenase e de proteases extracelulares que fazem sua degradação final (NITZ, 2005; ANDERSON *et al.*, 2008; STRUTZ *et al.*, 2008; PELLEGRIN E MELLOR, 2007). As observações feitas em nosso estudo não ultrapassaram a fase aguda do processo de reparo tecidual, porém com 15 dias de PO, pudemos observar a grande densidade de fibras colágenas depositadas nas feridas tratadas com o OECz 20% e anetol 20% (Fig. 27-A, 27-B).

A real evolução do processo cicatricial foi demonstrada pela redução da área das lesões, representada pelo percentual de contração. Nossos resultados mostraram que o grupo OECz 20% e anetol 20%, apresentaram

retração das lesões de forma superior ao grupo controle. As diferenças entre os percentuais de contração dos grupos pode ser atribuída à ação anti-edematogênica nas feridas tratadas com OECz 20%, reduzindo assim o volume da lesão, como também ao surgimento de maior quantidade de fibras colágenas fornecida pelos fibroblastos, o que contribuiu para a contração das feridas tratadas com anetol 20% e OECz 20%. Nas análises histológicas do 7º dia de pós-operatório o principal aspecto verificado foi o predomínio de um tecido de granulação fibrovascular, composto de densas fibras colágenas, enquanto que no grupo controle apenas indícios destas fibras estavam presentes, o que nos leva a acreditar em uma menor quantidade dos fibroblastos nessas feridas.

No 15º dia de tratamento, as análises histológicas mostraram re-epitelização completa na maioria das feridas tratadas com OECz 20%; a derme se mostrou com fibroblastos, fibrócitos e fibras colágenas tendendo a organização, a qual foi menos evidente no grupo tratado com anetol 20%, além da ausência de infiltrado inflamatório e presença de mononucleares (Fig.28, Tab. 8).

Como expresso na Tabela 6, com 15 dias de tratamento, o OECz 20% assim como o anetol 20% estimularam a fase de fibroplasia do processo de reparo tecidual, uma vez que o efeito de ambos foi capaz de contrair as feridas em 81,74% e 79,32% respectivamente, contra 66% do grupo controle, acelerando assim de forma significativa a cicatrização, enquanto que o anetol 10% de forma contrária aumentou a área das feridas por ele tratadas em 61,1%, retardando a cicatrização. A área das feridas tratadas com anetol 20% apresentou uma diferença significativa em relação aos grupos experimentais ($P = 0,047$).

Como demonstrado na figura 17, as feridas tratadas com OECz 20% durante quinze dias, tiveram uma redução bastante significativa nos seus áreas em relação a área das feridas do grupos tratados com OECz 2%, OECz 10% e as do grupo controle salina. Entretanto, não houve diferença significativa do efeito do OECz 2% e 10% em relação ao grupo controle salina. Essa resposta nos mostra que o OECz 20% quando administrado topicamente em

feridas cutâneas de camundongos acelera o reparo das mesmas. Através das análises diárias foi possível perceber que a partir do 10º dia de pós-operatório, algumas feridas do grupo tratado com o OECz 20%, já apresentavam uma vasta epitelização, tanto que ao final do 15º dia a cicatriz já era imperceptível nessas feridas (Fig. 28)

Conforme demonstrado na Figura 18, a resposta ao tratamento tópico com o anetol 20% na área das feridas, mostrou que ele exerceu um efeito cicatrizante, aumentando a contração das feridas na fase de remodelação do processo de reparo tecidual. Como ocorreu com o grupo anetol 20%, já no 10º dia de tratamento, se pode observar um certo grau de epitelização sobre algumas feridas, de forma que no 15º dia de pós-operatório, uma total epitelização foi percebida, porém a proporção de cicatrizes imperceptível foi menor em relação ao grupo tratado com o OECz 20% (Fig. 28).

Comparando-se o efeito das drogas usadas como controles positivos e negativos, observamos que a aplicação tópica da dexametazona inibiu o edema das feridas na fase inflamatória, reduzindo a migração de polimorfonucleares para o local da inflamação, aspecto que foi observado na avaliação microscópica com 3 dias de tratamento. De acordo com a análise macroscópica observada na Figura 8 o efeito do OECz 10% e 20% foi eficaz em reduzir o edema simultaneamente ao efeito da dexametazona. Em adição a esses resultados, a análise histológica confirma de forma qualitativa, a redução do edema e a migração leucocitária promovida pelo OECz bem como pela dexametazona. Estes dados sugerem, em parte, que assim como a dexametazona o OECz pode interferir na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , inibindo a síntese ou atividade da COX-2 e conseqüentemente a inibição da síntese/liberação de prostaglandinas ou ainda estar agindo diretamente na via da COX-2 e LOX. Porém em relação a área da ferida com 3 dias de tratamento como demonstrado na Figura 19, o OECz 10% e 20% não se comportaram como a dexametazona e sim como a fibrase que foi usada como controle positivo reduzindo a área das feridas.

Na fase proliferativa do reparo tecidual, o efeito da fibrase sobre o tecido de granulação esteve mais próximo do efeito exercido pelo anetol10% e pelo

OECz 10% favorecendo um tecido de granulação um pouco menos intenso que o apresentado pelo efeito do anetol 20% e do OECz 20%. O uso tópico da dexametazona, reduziu a intensidade do tecido de granulação presente com 7 dias de tratamento, conforme Figura 9. De acordo como demonstrado pela Figura 20, o efeito do anetol 20% e do OECz 20%, foi tão eficiente quanto o da fibrase em reduzir a área das feridas com 7 dias de tratamento. O efeito da dexametazona, usada como controle negativo, aumentou a área das feridas quando comparada ao grupo controle e ao grupo tratado com a fibrase.

O efeito da fibrase com 15 dias de tratamento, reduziu significativamente a área das feridas podendo ser comparado ao efeito do OECz 20%, que de todas as doses testadas foi a que apresentou melhor resposta na cicatrização influenciando a reepitelização e especialmente a angiogênese.

Essas evidencias mostram uma maior proliferação dos fibroblastos presente nas lesões tratadas com OECz 20%. O uso tópico da dexametazona com 15 dias de tratamento evidenciou um aumento significativo na área das feridas, quando comparada com todas as doses testadas. As avaliações histológicas mostram um tecido conjuntivo frouxo, com poucos fibroblastos e fibras colágenas mal organizadas, ausência de infiltrado inflamatório e de reepitelização, tanto que ao final do 15º dia de tratamento, todas as feridas tratadas com dexametazona não haviam cicatrizado. Estudos experimentais mostram que a expressão genética do TNF- α se encontrava reduzida na cicatrização anormal de ferimentos tratados com corticóides em camundongos, uma vez que esses inibem a atividade do fibroblasto em sintetizar o colágeno (HUBNER *et al.*, 1996).

Como demonstrado na Tabela 7, com 15 dias de tratamento, tanto o OECz 20% como o anetol 20%, apresentaram diferença estatisticamente significativa na redução da área das feridas cutâneas em camundongos quando comparados a todos os grupos experimentais ($P = <0,001$). Podemos perceber ainda a significativa diferença do efeito do OECz 20% em relação ao anetol 20% na média da área das feridas, onde com 15 dias de pós-operatório, em relação ao tempo zero (quando as feridas apresentavam 100% de área), as feridas do grupo tratado com OECz 20% apresentaram uma média de área equivalente a 6,3%, contra uma média de 16,7% do grupo Anetol 20%. Essa

diferença nos mostrou que o uso tópico do OECz 20% acelerou o processo de cicatrização em feridas cutâneas de camundongos com 15 dias de tratamento.

A retirada de fragmentos bilaterais, direito e esquerdo, possibilitou a análise do efeito sistêmico das drogas utilizadas, onde a ferida de um lado foi usada como controle da ferida contralateral. Essa análise revelou uma influência de cada dose testada nas feridas correspondentes em cada animal, o que provavelmente pode ser justificado em razão da proximidade de 1cm entre as duas feridas.

O efeito cicatrizante do OECz e do anetol pode estar relacionado com relatos constantes na literatura que associam os óleos essenciais que apresentam substâncias com hidroxilas fenólicas em sua composição com a presença de atividade anti-séptica e bactericida indicando seu uso tópico, no tratamento de ferimentos (FREIRE, 2008). O eugenol é um isômero do anetol e portanto compartilham alguns efeitos biológicos, que incluem atividade bactericida, fungicida, anti-inflamatória, antinocioceptiva e cicatrizante (ESCOBAR, 2002; KIM, *et al*, 2003; RAGHAVENRA, *et al*, 2006; FENG & LIPTON, 1987). Considerando-se a importância da fase inflamatória no processo de reparo tecidual, embora o eugenol possua ação anti-inflamatória eficaz, o efeito cicatrizante do anetol/OECz é eficiente em acelerar a cicatrização e pode ser usado em qualquer dose uma vez que de acordo com estudos, apresentou propriedade hepatoprotetora provavelmente através do anetol como constituinte majoritário (LIMA *et al.*, 2008), enquanto que o eugenol apresentou toxicidade hepática em baixas doses, causando insuficiência hepática em crianças (EISENHUT, 2007; JAMES *et al.*, 2005). A segurança e benefício do uso tópico do OECz como agente cicatrizante pode ser vantajoso em relação a outras plantas que apresentam a mesma ação visto que, estudos realizados por ARTEAGA *et al.*, 2005, demonstraram atividade cicatrizante em plantas com propriedades antifúngicas, anti-inflamatórias, antinocioceptivas e antioxidantes como a *Larrea tridentata* (*Creosote bush*), porém evidenciaram risco de lesão hepática e renal pela alta toxicidade apresentada.

Existem evidências de que o anetol diminui a produção de IL-2 envolvendo a ativação de células T que desempenha um papel funcional na

potencialização de uma variedade de respostas imunitárias (SU YEA *et al.*, 2006),

Estudos realizados por CHAINY *et al.*, 2000, relataram que o anetol inibiu os fatores transcricionais nuclear κ B (NF- κ B) e proteína ativadora-1 (AP-1), e TNF- α induzido de células leucêmicas ML1- α , porém, DUVOIX *et al.*, em seu estudo subsequente, mostrou que o anetol não apresentou nenhum efeito inibitório sobre TNF- α , NF- κ B e AP-1, presentes em células leucêmicas K562 (DUVOIX *et al.*, 2004). Apesar dessas evidências em nosso estudo, o efeito do OECz modulou a resposta inflamatória, provavelmente devido a ação sinérgica de seus constituintes minoritários que parecem possuir alguma atividade cicatrizante, a qual não é determinada essencialmente pela presença do anetol, uma vez que o efeito deste isoladamente sobre as feridas não apresentou redução na resposta inflamatória.

Um desses constituintes minoritários, o composto biciclogermacreno um sesquiterpenóide com atividade antifúngica, tem sido identificado em outras espécies. O óleo essencial de *Piper cernuum* e *P. regnellii* cuja composição contém entre outros compostos, biciclogermacreno, mostrou atividade antimicrobiana (Constantin *et al.*, 2001; Cysne *et al.*, 2005). O óleo essencial de *Calea clematidea*, contendo o composto germacreno B, outro constituinte minoritário do OECz, também mostrou atividade fungitóxica indicando a possível relação da influência dessas ações no processo cicatricial (Fach *et al.*, 2002).

Vários compostos provenientes de plantas têm demonstrado possuir atividade cicatrizante. Estudos atuais apontam alguns polissacarídeos como agentes eficientes na cicatrização de feridas, (SENEL & McCLURE, 2004). O uso do OECz como cicatrizante é vantajoso em relação aos polissacarídeos, pois foi demonstrado que a utilização de polissacarídeos causou perda da atividade biológica, por desenvolvimento de tolerância ao princípio ativo, quando testada *in vivo* frente ao Sarcoma 180 (STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002). Deve-se ainda ressaltar que o uso de alguns polissacarídeos fica limitado, pelo efeito estimulante dose dependente da fixação do complemento em humanos, além de possuírem efeito mitogênico *in vitro* (NERGARD *et al.*, 2004). O anetol presente em grande concentração no OECz, assegura sua

utilização uma vez que é considerado anti-genotóxico e anti-carcinogênico, reconhecido como seguro (GRAS), com base no reconhecimento de desintoxicação metabólica em humanos (ABRAHAM, 2001, CHAINY *et al.*, 2000 e DUVOIX *et al.*, 2004).

Plantas da família *Euforbiaceae*, produzem óleos essenciais com propriedades cicatrizantes como o óleo essencial do *Croton cajucara* Benth que apresenta ação gastroprotetora, antiulcerogênica em modelos experimentais de “stress”, ligadura do piloro, indometacina e Hcl/etanol (COSTA *et al.*, 2007; PERAZZO *et al.*, 2007). Esses estudos justificam a relação do efeito tópico cicatrizante do OECz, uma vez que o *C. zehntneri* da família *Euforbiaceae* também possui atividade cicatrizante na mucosa gástrica pelo aumento do trânsito gastrointestinal podendo contribuir para a prevenção de lesões bem como para acelerar a cicatrização das já existentes (BARRETO, 2005). Levando-se em consideração que a resposta fisiológica ao trauma tecidual é a mesma em todos os tipos de tecidos, podemos associar o efeito antiulcerogênico com o efeito tópico em feridas cutâneas.

Comparando-se o efeito do OECz com o efeito de óleos essenciais produzidos por outras espécies, os resultados apresentados em camundongos demonstram que, a utilização do óleo de *Copaifera langsdorffii* no tratamento de feridas cirúrgicas, gerou um efeito deletério em tratamentos cutâneos. As feridas cirúrgicas com cicatrização de primeira intenção tratadas com o óleo de *C. langsdorffii* apresentaram retardo no processo de reepitelização, permanência de crostas e ainda a persistência das alterações vasculares e inflamatórias (VIEIRA *et al.*, 2008).

A limitação ao uso de produtos fitoterápicos pode se justificar pela falta de conhecimento dos efeitos adversos como por exemplo reações alérgicas. Os estudos realizados com o OECz até agora, o colocaram como produto seguro em termos toxicos. Sua análise de toxicidade aguda, revelou uma $DL_{50} > 3,5$ g/kg, quando administrado por via oral. Este fato o coloca como óleo essencial de baixa toxidade. Sua utilização tópica não apresentou reações adversas, o que sugere um baixo potencial de risco a saúde e seu efeito cicatrizante ocorreu com doses muito abaixo da DL_{50} (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

7. CONCLUSÃO

O óleo essencial do *C. zehntneri* foi capaz de promover o efeito anti-edematogênico quando administrado topicamente em Ferida aberta de camundongos;

O óleo essencial do *C. zehntneri* foi capaz de promover o efeito anti-inflamatório quando administrado topicamente em ferida aberta de camundongos;

O óleo essencial do *C. zehntneri* e seu constituinte anetol, foram capazes de estimular a formação do tecido de granulação quando administrado topicamente em ferida aberta de camundongos;

O óleo essencial do *C. zehntneri* e seu constituinte anetol modularam a fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas em camundongos, favorecendo uma antecipação da cicatrização;

O óleo essencial do *C. zehntneri* e seu constituinte anetol, foram capazes de reduzir a área das feridas quando administrado topicamente em ferida aberta de camundongos;

O óleo essencial do *C. zehntneri* 20% e o anetol 20% foram eficientes em acelerar a cicatrização uma vez que reduziram significativamente a área das feridas tratadas por 15 dias.

O óleo essencial do *C. zehntneri* 20% foi eficiente em acelerar a cicatrização por reduzir significativamente a área das feridas tratadas por 15 dias e essa ação é em grande parte devido ao anetol presente 81,9% em sua composição.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. K., 2001. Anti-genotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. *Food and Chemical Toxicology* 39, 493-498.
- AGRA, M. F., BARACHO G. S., NURIT, K., BASILIO, I. J. L. D., COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil (2007) *Journal of Ethnopharmacology*, 111 (2), pp. 383-395.
- AGRA, M. F., BARACHO, G. S., NURIT, K., BASILIO, I. J. L. D., COELHO, V. P. M., 2007. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil *Journal of Ethnopharmacology* 111 (2), 383-395.
- ALBUQUERQUE, A. A. C., SORENSON, A. L., LEAL-CARDOSO, J. H., 1995. Effects of oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. *Journal of Ethnopharmacology* 49, 41-49.
- AL-HARBI, M. M.; QURESHI, S.; RAZA, M.; AHMED, M. M.; GIANGRECO, A. B.; SHAH, A. H., 1995. Influence of anethole treatment on the tumour induced by Ehrlich ascites carcinoma cells in paw of Swiss albino mice. *Eur. J. Cancer. Prev.* 4 (4), 307-18.
- ANDERSON T. W., VAUGHANA N., AND CRAMER L. P., 2008. Retrograde Flow and Myosin II Activity within the Leading Cell Edge Deliver F-Actin to the Lamella to Seed the Formation of Graded Polarity Actomyosin II Filament Bundles in Migrating Fibroblasts *Mol. Biol. Cell*, 19(11): 5006 - 5018.
- ARAÚJO J. C. L. V., LIMA E. O., CEBALLOS B. S., FREIRE K. R. L., SOUZA E. L., SANTOS-FILHO L., 2004. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. *Rev. Patol. Trop.* 33: 55-64.
- ARTEAGA, S., ANDRADE-CETTO, A., ARDENAS, R., 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 231-239.
- AXEL, RICHARD AND BUCK, LINDA B., 2004. odorant receptors and the organization of the olfactory system. Kongl Carolinska Medico Chirurgiska Inatitutet, The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2004.

- BADYLAK, S. F., 2002. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 13, 377-383.
- BALBINO, C. A., PEREIRA, L. M., CURI, R., 2005. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 41, 28-51.
- BARBUL, A., REGAN, M. C., 1995. Immune involvement in wound healing, *Otolaryngol Clin North Am.* 28, 955-968.
- BARONE, E. J., YAGER, D. R., POZEZ, A. L., 1998. Interleukin-1 alpha and collagenase activity are elevated in chronic wounds. *Plast. Reconstr. Surg.* 102, 1023.
- BARRETO, JOÃO ERIVAN FAÇANHA, 2005. Efeito gastroprotetor do óleo essencial do *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará.
- BATATINHA, M. J. M., SOUZA-SPINOSA, H., BERNARDI, M. M., 1995. *Croton zehntneri*, Possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 45, 53-57.
- BAUER, K., GARBE, D., SURBURG, H., 2001. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses. Wiley-VCH, Weinheim, p. 293.
- BERNARDI M. M., DE SOUZA-SPINOSA H., BATATINHA M. J. M., GIORGI, R., 1991. *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects in rodents, *Journal of Ethnopharmacology* 33, 285-287.
- Best pract&Res Clin Anaesthesiol, v. 18(3), p. 385-405.
- BEZERRA, M. A. C. *Alpinia speciosa* Shum: Estudo das frações fixas e do óleo essencial. Fortaleza, 1994. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.
- BIGLIOLO, B. F. G., 2004. Patologia geral. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 75-80.
- BIONDO-SIMÕES, M. L. P., PANTE, M. L., MACEDO, V. L., GARCIA, R. F., BOELL, P., MORAES, T. H. C., 2000. O hormônio de crescimento e a concentração de colágeno na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Acta Cir Bras.* 15 (3), 78-82.

- BOISSIER, J. R., SIMON, P., LE BOURHIS, B., 1967. Experimental psychotropic effect of isomeric cis-and-trans anetholes. *Thérapie* 22, 309-323.
- BOTSARIS, A. S., MACHADO, P. V., 1999. *Memento terapêutico de fititerapia*. Rio de Janeiro: Flora Medicinal.
- BOUTHILLIER, L., CHARBONNEAU, M., BRODEUR, J., 1996. Assessment of the role of glutathione conjugation in the protection afforded by anethol dithiolthione against hexachloro-1,3-butadiene-induced nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139 (1), 177-185.
- BROKER, B. J., ROSEN, D., AMSBERRY, J., 1996. Keloid excision and recurrence prophylaxis via intradermal interferon-gamma injections: A pilot study. *Laryngoscope* 106, 1497.
- BURT, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food microbiology* 94, 223-253.
- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F., BEVILAQUA, C. M. L., MORAIS, S. M., MACIEL, M. V., COSTA, C. T. C., MACEDO, I. T. F., OLIVEIRA, L. M. B., BRAGA, R., SILVA, R. A., VIEIRA, L. S., 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology* 148 (3-4), 288-294.
- CAPEK, A., 1956. Phytoncides of anise and fennel. *Prumysl. Potravin.* 7, 260-262.
- CAUJOLLE, M. F. & MEYNIER, D., 1958. Toxicite de l'estragole et des anétholes (cis at trans). *C. R. Acad. Sci.* 246, 1465-1958.
- CHAINY, G. B., MANNA, S. K., CHATURVEDI, M. M., AGGARWAL, B. B., 2000. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF-kappaB, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis, *Oncogene* 19, 2943-2950.
- CHOMARAT, P. & BANCHEREAU, J., 1997. An update on interleukin- 4 and its receptor. *Eur. Cytokine Netw* 8, 33.
- CLARDY JON; WALSH CHRISTOPHER, 2004. *Lessons from natural molecules*. Nature PublishingGroup, VOL 432: 829-837.
- COELHO-DE-SOUZA, A. N., CRIDDLE, D.N. e LEAL-CARDOSO, J.H., 1998. Selective Modulatory Effects of the Essential Oil of *Croton zehntneri* on Isolated Smooth Muscle Preparations of the Guinea-pig. *Phytotherapy Research* 12, 189-194.

- COELHO-DE-SOUZA, A. N., BARATA, E. L., MAGALHÃES, P. J. C., LIMA, C. C. & LEAL-CARDOSO, J. H., 1997. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. *Phytotherapy Research* 11, 299-304.
- COSTA, M. P., MAGALHAES, D. A., SANTOS, N. S. S., GOMES, F. E. S., MACIEL, M. A. M., 2007. Uma revisão das atividades biológicas da trans-desidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*. *Rev. bras. farmacogn.* 17, (2) 275-286. ISSN 0102-695X. doi: 10.1590/S0102-695X2007000200024.
- COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S. L., 1996. *Inflamation and repair*. w.b. Saunders Company.
- COTRAN, R. S., KUMAR, R., COLLINS, T., 2000. *Patologia estrutural e funcional* 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A.
- CRAVEIRO, A. A., AFRÂNIO, G. A., ANDRADE, H. S., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W. e MACHADO, M. I. L., 1981. *Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste*. Edições UFC, Fortaleza, CE.
- CRAVEIRO, A. A., ANDRADE, C. H. S., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W. , 1978. Anise-like flavour of *Croton zehntneri* Pax. Et Hoffm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 772-773.
- CRAVEIRO, A. A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C. H. S., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W., 1977. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. *Ciência e Cultura* 29, 445.
- CUZZEL J. Z., 1988. The new RYB color code. *American Journal of Nursing*, 88 (10): 1342-1346.
- CUZZELL J. Z., 2002. Wound Healing: Translating theory into clinical practice. *Dermatology Nursing* 14 (4), 257-261.
- DALLMEIR, K. & CARLINI, E. A., 1981. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivates. *Pharmacology* 22, 113-127.
- DALLMEIR, K. R. Z., 1981. Central nervous system effects of synthetic eugenol derivates and natural analogues. São Paulo, P. 1-77. Tese (doutorado), Escola Paulista de Medicina.

- DÁRIO, G. M., 2008. Avaliação da atividade cicatrizante de formulação contendo argila medicinal sobre feridas cutâneas em ratos 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2008.
- DE, M., DE, A. K., MUKHOPADHYAY, R., MIRE, M., ANERJEE, A. B., 2001. Actividad antimicrobiana de *Illicium verum* Hook. *Ars Pharmaceutica*, 42 (3-4), 209-220.
- DORMAN, H. J. D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88 (2) 308-316.
- DOROTHY, V., ROCOURT, M. D., VEELA, B., DAN, W., GAIL, E., BESNER, M. D. 2007. Heparin-Binding EGF-like Growth Factor Decreases Neutrophil-Endothelial Cell Interactions. *Journal of Surgical Research* 14, article in press.
- DRUKARCH, B., FLIER, J., JONGENELEN, C. A. M., ANDRINGA, G., SCHOFFELMEER, A. N. M., 2006. The antioxidant anethole dithiolethione inhibits monoamine oxidase-B but not monoamine oxidase A activity in extracts of cultured astrocytes, *Journal of Neural Transmission* 113, 593-598. DOI 10.1007/s00702-005-0350-0.
- DRUKARCH, B., SCHEPENS, E., STOOFF, J.C., LANGEVELD, C.H., 1997. Anethole dithiolethione prevents oxidative damage in glutathione-depleted astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 329 (2-3), 259-262.
- DUCKE, A., 1959. Estudos botânicos no Ceará. *An. Acad. Brasil. Cienc.*, v. 31, p. 231,
- DUVOIX, A., DELHALLE, S., BLASIUS, R., SCHNEKENBURGER, M., MORCEAU, F., FOUGERE, M., HENRY, E., GALTEAU, M.M., DICATO, M., DIEDERICH, M., 2004. Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor kappaB inhibition, *Biochemical Pharmacology* 68, 1101-1111.
- ECKERSLEY, J. R. T., DUDLEY, H. A. F., 1988. Wound and wound healing. *British Medical Bulletin* 44 (2), 423-436.
- EISENHUT, M., 2007. The toxicity of essential oils. *International Journal of Infectious Diseases* 11, 365-375; doi:10.1016/j.ijid.2006.07.004.
- ESCOBAR, R. G., 2002. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso / Eugenol: pharmacological & toxicological properties. Advantages and disadvantages of use. *Rev Cubana Estomatol* 39 (2).

- FACURY NETO, M. A., 2001. Uso sistêmico da arnica (*Solidago microglossa* DC) em cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos [tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina.
- FAHEY, T. J., SHERRY, B., TRACEY, K. J., 1990. Cytokine in a model of wound healing: The appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1. *Cytokine* 2, 92.
- FEIKEN, E., ROMER, J., ERIKSEN, J., AND LUND, L. R., 1995. Neutrophils express tumor necrosis factor-alpha during mouse skin wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 105, 120.
- FENG, J. & LIPTON, J. M., 1987. Eugenol: antipyretic activity in rabbits. *Neuropharmacology* 26 (12), 1775-1778.
- FERNANDES, A. G.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A. Canelas silvestres nordestinas: aspectos botânicos, químicos e farmacológicos. *Cienc. Cult.*, v.32, p. 26-33, 1971.
- FIDDES, J. C, HEBDA, P. A., HAYWARD, P., ROBSON, M. C., ABRAHAM, J. A., KLINGBEIL, C. K., 1991. Preclinical wound-healing studies with recombinant human basic fibroblast growth factor. *Ann N Y Acad Sci* 638, 316-328.
- FINE, N., MUSTOE, T. A., 2001. Wound healing. In: Greenfield, L. J., Mulholland, M. W., Oldham, K. T., Zenelock, G.B., Lillemoe, K.D. *Surgery: scientific principles and practice*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins. p 69-85.
- FONG, Y., AND LOWRY, S. F., 1996. Cytokines and the cellular response to injury and infection. In D. W. Wilmore, L. Y. Cheung, A. H. Harken, J. W. Holcroft, and J. L.
- FONTENELLE, R.O.S.; MORAIS, S.M., BRITO, E.H.S., BRILHANTE, R.S.N., CORDEIRO, R.A., NASCIMENTO, N.R.F., KERNTOPF, M.R., SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G., 2008. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1383-1390.
- FOWLER, E. B., CUENIN, M. F., HOKETT, S. D., PEACOCK, M. E., MCPHERSON III, J. C., DIRKSEN, T. R., SHARAWY, M., BILLMAN, M. A., 2002. Evaluation of pluronic polyols as carriers for grafting materials: study in rat calvaria defects. *Journal of Periodontology* 73, 191-197.

- FREIRE, JULIANA MESQUITA, 2008. Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Agroquímica.
- FREYMAN, T. M., YANNAS, I. V., YOKOO, R., GIBSON, L. J., 2001. Fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix. *Biomaterials* 22, 2883-2891.
- FU, X., CHANG, G., WANG, Y., 1995. Systemic and local administration of interferon-gamma impairs wound healing. *Chung Hua Cheng Hsing Shao Shang Wai Ko Tsa Chih* 11, 209.
- FUJITA, K., FUJITA, T., KUBO, I., 2007. Anethole, a potential antimicrobial synergist, converts a fungistatic dodecanol to a fungicidal agent. *Phytotherapy Research*. 21(1), 47-51.
- GABBIANI, G., LELOUS, M., BAILEY, A. J., 1976. Collagen and myofibroblasts of granulation tissue. A chemical, ultrastructural and immunologic study, *Cell Pathol* 21, 133.
- GALLO, R., DORSCHNER, R. A., TAKASHIMA, S., KLAGSBRUN, M., ERIKSSON, E., BERNFIELD, M., 1997. Endothelial cell surface alkaline phosphatase activity is induced by IL-6 released during wound repair. *J. Invest. Dermatol.* 109, 597.
- GERALD, S. L., DIANE, M. C., DAVID, R. K., DAVID, J. M., ROGER, E. P., GEORGE, R., MARTIN, C., 1994. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair and Regeneration* 2, 165-170.
- GIRARDIN, E., GRAU, G. E., DAYER, J. M., ROUX-LOMBARD, P., LAMBERT, P. H., 1988. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the serum of children with severe infectious purpura. *N. Engl. J. Med.* 319, 397.
- GONÇALVES L. A., BARBOSA L. C. A., AZEVEDO A. A, CASALI V. W. D., NASCIMENTO E. A., 2003. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 6:8-14.
- GORETSKY, M. J., HARRIGER, M. D., SUPP, A. P., GREENHALGH, D. G., BOYCE, S. T., 1996. Expression of interleukin- 1 alpha, interleukin-6, and basic fibroblast growth factor by cultured skin substitutes before and after grafting to full-thickness wounds in athymic mice. *J. Trauma* 40, 894.

- GOVAERTS, R., FRODIN, D. G. & RADCLIFFE-SMITH, A., 2000. World checklist of Euphorbiaceae (and Pandaceae). v.2. Euphorbiaceae: *Croton* to Excoecariopsis. Royal Botanic Gardens, Kew.
- GRELLNER, W., GEORG, T., WILSKE, J., 2000. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1b, IL-6, TNF-a) in human skin wounds, Forensic Science International 113, 251-264.
- GRIFFIN, J. E., TOUCHSTONE, J. C., 1968. Low intensity phonophoresis of cortisol in swine. Phys. Ther. 48, 1336-1344.
- GRIFFIN, J. E., ECHTERNACH, J. L., RICHARD, M. S., PRICE, M. D., TOUCHSTONE, J. C., 1967. Patients treated with ultrasonic driven hydrocortisone and with ultrasound alone. Physical Therapy 47 (7), 594-601.
- GRIFFIN, J. E., TOUCHSTONE, J. C., LIU, A. C. Y., 1965. Ultrasonic movement of cortisol into pig tissues, II: movement into paravertebral nerve. Phys. Med. 44, 20-25.
- GRODNITZKY, J. A., COAST, J. R. Q., 2002. Evaluation of monoterpenoids insecticidal activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 4576-4580.
- GUENTHER, E., 1948. The Essential Oils. D. Van Nostrand, New York.
- GUPTA, A., KUMAR, R., UPADHYAY, N. K., PAL, K., KUMAR, R., SAWHNEY, R. C., 2007. Effects of *Rhodiola imbricata* on Dermal Wound Healing. Planta Med.
- HAN, Y. 2005. Ginkgo terpene component anti-inflammatory effect on *Candida albicans* caused arthritic inflammation. International immune pharmacology 5, 1049-1056.
- HITOKATO, H.; MOROZUMI, S.; WAUKE, S.; SAIKI, S.; KURATA, H. 1980. App. Environ. Microbiol. 39, 818.
- HU, Z. H., 1988. Application of glycyrrhizin as drugs. Acta Pharmacologica Sinica 23, 553-560.
- HUBNER, G., BRAUCHLE, M., SMOLA, H., MADLENER, M., FASSLER, R., WERNER, S., 1996. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. Cytokine., v. 8, p.548-556.
- IOCOMO, J. A., KOLERAN, K. R., REMICK, D. G., 2000. Interleukin -8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds. Wound Repair Regen 8, 216-255.

- ISMAN, M. B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19, 603-608.
- JAMES, L. P., MAYEUX, P. R., HINSON, J. A., 2003. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metabolism Disposition* 31, 499-506.
- JAMES, S. E., PRICE, C. S., THOMAS, D., 2005. Essential oil poisoning: N-acetylcysteine for eugenol-induced hepatic failure and analysis of a national database. *Eur J Pediatr* 164, 520-522.
- JUDD, W. S., 1999. *Plant Systematics – A Phylogenetic Approach*. Sunderland, MA. Sinauer Associates. Inc., 464.
- KHALED, W. T., READ, E. K., NICHOLSON, S. E., BAXTER, F. O., BRENNAN, A. J., CAME, P. J., SPRIGG, N., MCKENZIE, A. N., WATSON, C. J., 2007. The IL-4/IL-13/Stat6 signalling pathway promotes luminal mammary epithelial cell development. *Development*.
- KIM, S. S., OH, O. J., MIN, H. Y., 2003. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Sci.* 73, 337– 48.
- KLAYMAN, D. L., 1985. Qinghaosu (artemisinin) an antimalarial drug from China. *Science* 228, 1049-1055.
- KNIO, K. M., USTA, J., DAGHER, S., ZOURNAJIAN, H., KREYDIYYEH, S., 2008. Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*, *Bioresour. Technol.* 99 (4), 763-768.
- KOEHN, F. E., CARTER, G. T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4: 206-220.
- KOHN, S., 1992. Structural basis of hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab. Invest.* 67, 596.
- LAHLOU, S., INTERAMINENSE, L. F. L., LEAL-CARDOSO, J. H., MORAIS, S. M., DUARTE, G. P., 2004. Cardiovascular effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves in rats: Role of the autonomic nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31, 215 -219.

- LAHLOU, S., LEAL-CARDOSO, J. H., MAGALHÃES, P. J. C., COELHO-DE-SOUZA, A. N., DUARTE, G. P., 1999. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* in rats: Role of the Autonomic Nervous System. *Planta Médica* 65, 553-557.
- LAM, S., MACAULAY, C., LE RICHE, J.C., DYACHKOVA, Y., COLDMAN, A., GUILLAUD, M., HAWK, E., CHRISTEN, M.O., GAZDAR, A.F., 2002. A Randomized Phase IIb Trial of Anethole Dithiolethione in Smokers with Bronchial Dysplasia. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 94 (13), 1001-1009. doi:10.1093/jnci/94.13.1001.
- LAVABRE, M., 1993. *Aromatoterapia*, Rio de Janeiro, Ed. Record.
- LE BOURHIS, B., 1968. Recherches préliminaires sur le métabolisme du trans-anéthole. *Ann. Biol. Clin.* 26, 711-715.
- LEAL-CARDOSO, J. H., FONTELES, M. C., 1999. Pharmacological Effects of Essential Oils of Plants of the Northeast of Brazil. *An. Acad. Bras. Ci.* 71(2), 207-213.
- LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R., 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology* 25, 9-18.
- LIMA E. O., FARIAS N. M. P., SOUZA E. L., SANTOS B. H. C., 2003. Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde* 7: 251-258.
- LIMA F. C., SOUSA D F., FERREIRA J M., LIMA Jr R C. P., TOMÉ A. R., L. CARDOSO J. H., QUEIROZ M. G. R., CAMPOS A. R., 2008. *Croton zehntneri* Essential oil prevents acetaminophen-induced acute hepatotoxicity in mice. *Rec. Nat. Prod.* 2:4 135-140.
- LIMA, M. G. A., MAIA, I. C. C., SOUSA, B. D., 2006. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48, 211-214.
- LIU, J., LIU, Y., PARKINSON, A., KLAASSEN, C. D., 1995. Effect of oleanolic acid on hepatic toxicant-activating and detoxifying systems in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 275, 768-774.

- LOWRY, O. H., GILLIGAN, D.R., KATERSKY. E.M., 1941. The determination of collagen and elastin in tissues, with results obtained in various normal tissues from different species. J Biol Chem. 139, 795-804.
- MACEDO, J. A., HESSE, J., TURNER, J. D., AMMERLAAN, W., GIERENS, A., HELLHAMMER, D. H., MULLER, C. P., 2007. Adhesion molecules and cytokine expression in fibromyalgia patients: Increased L-selectin on monocytes and neutrophils, J Neuroimmunol.
- MAGALHÃES, P. J. C., 1998. Intestinal Myorelaxant and Antispasmodic Effects of the Essencial Oil of *Croton nepetaefolius* and its Constituents Cineole, Methyl-eugenol and Terpineol. Phytotherapy Research. 12, 172-177.
- MAJNO, G., 1992. The capillary then and now: An overview of capillary pathology. Mod. Pathol. 5, 9.
- MANDELBAUM, S. H., DI SANTIS, E. P., SANT'ANA MANDELBAUM, M. H., 2003. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I, An bras Dermatol 78 (4), 393-410.
- MANSUY, D., SASSI, A., DANSETTE, P. M., PLAT, M., 1986. A new potent inhibitor of lipid peroxidation in vitro and in vivo, the hepatoprotective drug anisyldithiolthione. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28,135(3), 1015-1021.
- MARCUS & LICHESTENSTEIN, P., 1979. Biologically active components of anise: Toxicity and interactions with insecticides in insets. J. Agric. Food Chem. 27, 1217-1223.
- MARTINS, N. L. P., MALAFAIA, O., RIBAS-FILHO, HEIBEL, J. M. M., BALDEZ R. N., VASCONCELOS, P. R. L., MOREIRA, H., MAZZA, M., NASSIF, P. A. N., WALLBACH, T. Z., 2006. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. Acta Cir. Bras. 21(3).
- MATEO, R. B., REICHNER, J. S., ALBINA, J. E., 1994. Interleukin- 6 activity in wounds. Am. J. Physiol. 266 (6 Pt. 2): R1840.
- MATOS, F. J. A., 2000. Plantas medicinais aromáticas do nordeste do Brasil. XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil, Recife.
- MATOS, J. M. D. & MATOS, M. E. O.,1989. Farmacologia – Curso teórico-prático. Fortaleza, Ed. UFC.

- MATOS, M. J. A. & FERNANDES, A., 1978. Relatórios de excursões do programa estudo químico de óleos essenciais de plantas nativas e cultivadas no nordeste 1975-1978. Convênio BNB- CNPq-UFC.
- MAZUE, G., BERTOLERO, F., JACOB, C., 1991. Preclinical and clinical studies with recombinant human basic fibroblast growth factor. *Ann N Y Acad Sci* 638, 329-340.
- MCGEE, G., DAVIDSON, J., BUCKLEY, A., 1988. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J Surg Res.* 45, 145-153.
- MENDONÇA, A. C., FERREIRA, A. S., BARBIERE, C. H., THOMAZINI, J. A., MAZZER, N., 2006. Efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. *Acta ortop. bras.* 14 (3). Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo>>
- MICHELIN D.C., MORESCHI P. E., LIMA, A.C, NASCIMENTO G. G. F., PAGANELLI M.O., CHAUD M.V., 2005. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Rev Bras Farmacogn* 15: 316-320.
- MILES, R. H., PAXTON, T. P., ZACHEIS, D., DRIES, D. J., GAMELLI, R. L., 1994. Systemic administration of interferongamma impairs wound healing. *J. Surg. Res.* 56, 288.
- MORAIS, S. M., CATUNDA, F. E. A., SILVA, A. R. A., NETO, J.S.M., RONDINA, D., CARDOSO J. H. L., 2006. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. *Quim. Nova* 29 (5), 907-910.
- MURAKAMI, A., TANAKA, T., LEE, J. Y., SURH, Y. J., KIM, H. W., KAWABATA, K., NAKAMURA, Y., JIWAJINDA. S., OHIGASHI, H., 2004. A sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *International Journal of Cancer* 110, 481-490.
- MUSTOE, T. A., CUTLER, N. R., ALLMAN, R. M., 1994. A phase II study to evaluate recombinant platelet derived growth factor- BB in the treatment of stage 3 and 4 pressure ulcers, *Arch Surg.* 129, 213-219.
- NAGABABU, E., LAKSHMAIAH, N., 1994. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxygenase activities by eugenol. *Free Radic Res.* 20 (4), 253-266.
- NEERMAN MICHAEL F. Sesquiterpene lactones: A diverse class of compounds found in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties. 2003, *The international journal of aromatherapy* 13: 2-3.

- NERGARD, C. S., DIALLO D., MICHAELSEN, T. E., MALTERUD, K. E., KIYOHARA, H., MATSUMOTO, T., YAMADA, H., PAULSEN, B. S., 2004. Isolation, partial characterization and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 141-152.
- NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. & SNADER, K. M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J. Nat. Prod.* **66**, 1022–1037
- NITZ, A. C., 2005. Estudo morfométrico na cicatrização de feridas Cutâneas em ratos, utilizando *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. Dissertação de mestrado, Curso de Mestrado em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,. 63 p.
- NITZ, ANTÔNIO CARLOS; ELY JORGE BINS; D'ACAMPORA ARMANDO JOSÉ; TAMES DAVID RIVERO; CORRÊA BEATRIS PACHECO, 2005. Estudo morfométrico na cicatrização de feridas Cutâneas em ratos, utilizando *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. *Arquivos Catarinenses de Medicina* Vol. 35, no. 4.
- OLIVEIRA, A. C., LEAL-CARDOSO, J. H., SANTOS, C. F., MORAIS, S. M., COELHO-DE-SOUZA, A. N., 2001. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34 (11) 1471-1474.
- OLIVEIRA, S. T., 1993. Formulações de confrei (*Symphytum Officinale* L.) Na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. *Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro. Uruguaiana* 7/8 (1), 18-23.
- OLSEN, D. R., PELTONEN, I., JAAKKOLA, S., 1989. Collagen gene expression by cultured human skin fibroblasts. Abundant steady-state levels of type VI ,procollagen messenger RNAs, *Clin Invest.* 83, 791-795.
- ONO I., 2002. The effects of basic fibroblasts growth factor on the breaking strength of acute incisional wounds. *J Dermatol Sci.* 29,104-113.

- PASSOS, G. F., FERNANDES, E. S., CUNHA, F. M., FERREIRA, J., PIANOWSKI, L. F., CAMPOS, M. M., CALIXTO, J. B., 2006. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology*,
- PEACOCK JR, E. E., 1985. *The wound repair*. Philadelphia: W B Saunders, 76-85.
- PELLEGRIN, STÉPHANIE; MELLOR, HARRY, 2007. Actin stress fibres. *Journal of Cell Science* 120, 3491-3499, doi:10.1242/jcs.018473.
- PERAZZO, F. F., CARVALHO, J. C. T., RODRIGUES, M., MORAIS, E. K. L., MACIEL, M. A. M., 2007. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17(4), 521-528.
- PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZAN, V. S., LOPES, N. P., EPIFANIO, R. A., 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas, *Quim. Nova*, Vol. 25, Supl. 1, 45-61.
- POLAT, O., OTLES, S., 1999. Determination of volatile components of essential oil obtained from *Laurus nobilis* L. collected from provenances of Aegean region. *Kozmetika* 48 (1), 23–25.
- PORTO, B. N., ALVES, L. S., FERNANDEZ, P. L., DUTRA, T. P., FIGUEIREDO, R.T., GRACA-SOUZA, A. V., BOZZA, M. T., 2007. Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemoattractant receptors. *J Biol Chem.*, article in press.
- PRABHAKAR, K. R., SRINIVASAN, K. K., RAO, P. G. M., 2002. Chemical investigation, anti-inflammatory and wound healing properties of *Coronopus didymus*. *Pharm Biol* 40 (7). 490-493.
- RAGHAVENRA, H., DIWAKR, B. T., LOKESH, B. R., 2006. Eugenol—the active principle from cloves inhibits 5-lipoxygenase activity and leukotriene-C4 in human PMNL cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 74, 23-7.
- RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., 2001. *Drug Dependence and Drug Abuse*. In *Pharmacology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 614-633.
- RAPALA, K., LAATO, M., NIINIKOSKI, J., 1991. Tumor necrosis factor alpha inhibits wound healing in the rat. *Eur. Surg. Res.* 23, 261.

- RECIO, M. C., GINER, R. M., URIBURU, L., MANEZ, S., CERDA, M., FUENTE, J. R., RÍOS, J. L., 2000. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene Lactones in Acute and Chronic Inflammation. *Life Sciences* 66 (26), 2509-2518.
- REDDY, B. S., 1996. Chemoprevention of colon cancer by minor dietary constituents and their synthetic analogues. *Prev. Med.* 25 (1), 48-50.
- REDDY, B. S., 1997. Chemoprevention of colon cancer by dietary administration of naturally-occurring and related synthetic agents. *Adv. Exp. Med. Biol.* 400 (B), 931-936.
- REDDY, B. S., RAO, C. V., RIVENSON, A., KELLOFF, G., 1993. Chemoprevention of colon carcinogenesis by organosulfur compounds. *Cancer Res.* 153 (15), 3493-3498.
- RENNEKAMPFF, H. O., HANSBROUGH, J. F., KIESSIG, V., 2000. Bioactive Interleukin-8 Is Expressed in Wounds and Enhances Wound Healing. *Journal of Surgical Research* 93, 41–54.
- RIBEIRO FERNANDO DE ANDRADE QUINTANILHA, BORGES JANAÍNA DE PÁDUA, GUARALDO LUSIELE, VIANNA MARIA REGINA, 2008. Avaliação da cicatrização de feridas em dorso de ratos tratados com mitomicina C tópica e posterior reforço com injetável. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 74(3):328-330.
- RIBEIRO, F. A. Q. M. D., GUARALDO, L., BORGES, J. P. B. S., VIANNA, M. R. M. D., ECKLEY, C. A. M. D., 2008. Study of wound healing in rats treated with topical and injected mitomycin-C. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 74 (3). Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992008000300003&lng=pt&nrm=iso>.
- RIEDEL, K., RIEDEL, F., GOESSLER, U. R., HOLLE, G., GERMANN, G., SAUERBIER, M., 2006. Current status of genetic modulation of growth factors in wound repair. *Int J Mol Med.* Feb 17 (2), 183-93.
- ROBBINS, S. L., KUMAR VINAY; ABBAS K. ABUL; FAUSTO NELSON; MITCHEL RICHARD N, 2008. *Patologia básica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- ROBINSON, R., 1975. *The Structural Relations of Natural Products*, Clarendon Press: Oxford.
- ROCHA e SILVA, M., 1978. A brief survey of the history of inflammation. *Agents Actions* 8 (1-2), 45-9.

- ROMPELBERG, C. J., PLOEMEN, J. H., JESPERSEN, S., VAN DER GREEF, J., VERHAGEN, H., VAN BLADEREN, P. J., 1996. Inhibition of rat, mouse and human glutathione S-transferase by eugenol and its oxidation products. *Chem. Biol. Interact.* 5, 99 (1-3), 85-97.
- ROSS, R., 1968. The fibroblasts and wound repair. *Bio Rev.* 43, 51-96.
- ROSS, R., BENDITT, E. R., 1961. Wound healing and collagen formation. Sequential changes in components, of guinea pig skin wounds observed in the electron microscope, *J Biophys Biochem Cool* 11, 677.
- RUDOLPH, R., BALLANTYNE, J. R., D. L., 1990. Skin grafts. In: McCARTHY, J. G., MAY JR., J. W., LITTLER, J. W. *Plastic surgery* 1, 221-267.
- SANCHEZ NETO, R., BARONE, B., TEVES, D. C., SIMÕES, M. J., NOVO, N., JULIANO, Y., 1993. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. *Acta Cir Bras.* 8 (1), 18-23.
- SANTOS, L. O. M., SIMÕES, M. L. P. B., MACHADO, A. P. B., MATIOSKI FILHO, G. R., ENDO, P. C., GRUEN, G. R., 2002. Efeito da somatotropina sobre a cicatrização de feridas cutâneas, em ratos. *Acta Cir Bras.* 17 (4), 220-224.
- SCHIRREN, C. G., SCHARFFETTER, K., HEIN, R., BRAUN-FALCO, O., AND KRIEG, T., 1990. Tumor necrosis factor alpha induces invasiveness of human skin fibroblasts in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 94, 706.
- SELL, A. B., CARLINI, E. A. 1976. Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives. *Pharmacology* 14 (4), 367-377.
- SENEL, S., McCLURE, S.J., 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 1467-1480.
- SETO, T. A. & KEUP, W., 1969. Effects of alkylmethoxybenzene and alkylmethylbenzene essential oils on pentobarbital sleeping-time. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 180, 232-240.
- SHERWOOD, E. R.; KINSKY, T. T., 2004. Mechanism of the inflammatory response.
- SIDDIGI, F., BLINC A., BRAATEN, J., FRANCIS, C., 1995. *Thromb. & Haemost.* 73, 495.
- SIEBEN, S., HERTM, L., MASAUDI, T. A., MERK, H. F., BLOMEKE, B., 2001, Characterization of T cell responses to fragrances. *Toxicology and Applied Pharmacology* 172, 172-178.

- SIEMONEIT, K. D., ZIPF, H. F., DITTMANN, E. C., 1966. Untersuchungen zur endoanästhetischen und hypnotisch narkotischen Wirkung von 2-methoxy-4-allyl-phenoxyessigsäure-N,N-diäthylamid und verwandten Phenolderivaten. Arch Int. Pharmacodyn. 164, 30-46.
- SILVA, F., CASALI, V. W. D., 2000. Plantas medicinais e aromáticas: Pós-colheita e óleos essenciais. Viçosa, MG: UFV, 135.
- SILVA, L. J. H., MORAIS, S. M., 2000. Estudo químico dos óleos essenciais do *Croton zehntneri* de Viçosa (CE) e do *Zanthoxylum syncarpum* de Fortaleza (CE). In: 23a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2000, Poços de Caldas. 23a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química 2, PN003.
- SIMÕES, C. M. O., 2003. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, cap. 18.
- SIQUEIRA, R. J. B., MAGALHÃES, P. G. C., LEAL-CARDOSO, J. H., DUARTE, G., LAHLOU, S., 2006. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats, Life Sciences 78 2365- 2372.
- SIQUEIRA, R. J. B., LEAL-CARDOSO, J. H., COUTURE, R., LAHLOU, S., 2006. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in mediation of the cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves in anaesthetized rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 33, 238-247.
- SOUSA, M. R., MARQUES, R. A. D. F., OLIVEIRA, D. F., MARQUE, L. E., ABREU, K. V., GUEDES, I. F., ALVES, C. R., 2006. Avaliação do potencial antibacteriano de *Croton zehntneri*, *scoparia dulcis*, *turnera ulmifolia*, *sagittifolium schott* e *xanthosoma* frente a microorganismos patogênicos, 46º congresso Brasileiro de Química, Salvador –BA.
- SPRINGER, T. A., 1994. Traffic signal for lymphocyte circulation and leukocyte migration: the multistep paradigm. Cell 76, 301.
- STEWART, R., DULEY, J. A., DEWDNEY, J., 1981. The wound fibroblast and macrophage. Their origin studied in a human after bone marrow transplantation, Br J Surg. 68, 129.
- STOHS, S. J., LAWSON, T. A., ANDERSON, L., BUEDING, E., 1986. Effects of oltipraz, BHA, ADT and cabbage on glutathione metabolism, DNA damage and lipid peroxidation in old mice. Mech Ageing Dev. 37 (2), 137-45.

- STOJCEV, S. T., ZOLOTOVICH, G., NACHEV, T. C. H., SILJANOVSKA, K., 1967. Cytotoxic effect of phenols, phenol ethers, furan derivatives and oxides isolated from essential oils. *C. R. Acad. Bulg. Sci.* 20, 1341-1344.
- STRUTZ, F., 2008. How Many Different Roads May a Cell Walk down in Order to Become a Fibroblast?. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19: 2246-2248.
- STUELP-CAMPELO, P. M. A., OLIVEIRA, M. B. M., LEÃO, A. M. A. C., CARBONERO, E. R., GORIN, P. A. J., IACOMINI, M., 2002. Effect of a soluble alfa-Dglucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. *International Immunopharmacology* 2, 691-698.
- TAIRA, J., IKEMOTO, T., YONEYA, T., HAGI, A., MURAKAMI, A., MAKINO, K., 1992. Essential oil phenyl propanoids. Useful as .OH scavengers? *Free Radic. Res. Commun.* 16 (3), 197-204.
- TESKE, M., TRENTINI, A. M. M., 1997. *Compêndio de fitoterapia*. 3. ed. Curitiba: Herbarium.
- TISSERAND, R., BALACS, T., 1995. *Essential oil safety, a guide for professionals*. Churchill Livingstone, London.
- TOGNOLINI, M., BALLABENI, V., BERTONI, S., BRUNI, R., IMPICCIATORE, M., BAROCELLI, E., 2008. Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. *Pharmacological Research* 56 (3), 254-60.
- TOWNSEND, S., 2005. *Tratado de cirurgia*. 17ed. Elsevier.
- TRAUTMANN, A., TOKSOY, A., ENGELHARDT, E., BROCKER, E. B., GILLITZER, R., 2000. Mast cell involvement in normal human skin wound healing: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. *J. Pathol.* 190, 100.
- TREDGET, E. E., WANG, R., CHEN, Q., SCOTT, P.G., GHAHARY, A., 2000. Transforming growth factor-beta mRNA and protein in hypertrophic scar tissues and fibroblasts: Antagonism by IFN-alpha and IFN-gamma in vitro and in vivo. *J. Interferon Cytokine Res.* 20, 143.
- TRENGOVE, N. J., BIELEFELDT-OHMANN, H., STACEY, M. C., 2000. Mitogenic activity and cytokine levels in nonhealing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 8, 13.

- TSUKAMOTO, Y., HELSEL, W. E., WAHL, S. M., 1981. Macrophage production of fibronectin, a chemo attractant for fibroblasts, *J Immunol.* 127, 673.
- TURNER, N. A., MUGHAL, R. S., WARBURTON, P., O'REGAN, D. J., BALL, S. G., PORTER, K. E., 2007. Mechanism of TNF α -induced IL-1 α , IL-1 β and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: Effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovasc Res.*
- UEZ, Fabiana, Cicatrização de feridas cutâneas e níveis séricos de corticosterona em ratos Wistar submetidos ao enriquecimento ambiental, 2005.. Dissertação de mestrado, Programa de pós graduação em ciências veterinárias, Faculdade de veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- UPJHON, L., 1959. Determination of tensile strength of the healing wound as a clinical test. *Acta Chir Scand.* 05, 252.
- URKINEN, M., VAHERI, A., ROBERTS, P. J., 1980. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue, *Lab. Invest.* 43, 47.
- VAN DE BRAAK, S. A. A. J., LEIJTEN, G. C. J. J., 1999. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, 116.
- VAN WINKLE, W. 1967. The fibroblast in wound healing. *Surg Gynecol Obstet*, 124:369.
- VEIGA JR., V. F., PINTO, A. C., 2002. *Quim. Nova* 25, 273.
- VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G., 2005. The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects *Quím. Nova* 28 (1) p. 85-94.
- VIEIRA RAFAEL C., BOMBARDIERE ETHIANE; OLIVEIRA JULIERME J., LINO-JÚNIOR RUY S., BRITO LUIZ A.B., JUNQUEIRA-KIPNIS ANA P., 2008. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. *Pesq. Vet. Bras.* 28(8):358-366.
- VITTI ANDREA M. SILVEIRA, BRITO OTÁVIO JOSÉ; óleo essencial de eucalipto. 2003, documentos florestais 17: Escola superior de agricultura liiz de Queiroz – Universidade de São Paulo.
- VOGT, P. M., ANDREE, C., BREUING, K. et al. Dry, moist and wet skin wound repair. *Annals of Plastic Surgery*, v. 34, n. 5, p.493-500, 1995.

- WAHL, S. M., WAHL, L. M., McCARTHY, J. B., 1978. Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production, *J Immunol.* 121, 942.
- WEBSTER, G. L., 1994. Systematics of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden.* California, E.U.A., v. 1, n. 81, p. 144.
- WEISSMAN, G. Inflammation: Historical perspectives. In Gallin, J.I., 1992 (eds.): *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2 ed. New York, Raven Press, p 5-13.
- WEN, F. Q., KOHYAMA, T., LIU, X., ZHU, Y. K., 2002. Interleukin-4 and interleukin-13 enhanced transforming growth factor-beta 2 production in cultured human bronchial epithelial cells is attenuated by interferon-gamma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26 (4), 484-91.
- WITTE, M. B., BARBUL, A., 2002. Role of nitric oxide in wound repair. *The American Journal of Surgery* 183, 406-412.
- WOLFFENBÜTTE, ADRIANA NUNES, 2007. Óleos essenciais. Artigo publicado no Informativo CRQ-V, ano XI, n.º105, novembro/dezembro/2007, págs. 06 e 07.
- XIAO, Y., HUANG, H., YIN, D., GUO, D., MAO, L., FU, Z., 2008. Oxidation of anethole with hydrogen peroxide catalyzed by oxovanadium aromatic carboxylate complexes. *Catalysis Communications* 10, 29-32.
- YEA, S. S., JEONG, H. S., CHOI, C. Y., PARK, K. R., OH, S., SHIN, J. G., YUN, C. H., 2006. Inhibitory effect of anethole on T-lymphocyte proliferation and interleukin-2 production through down-regulation of the NF-AT and AP-1. *Toxicology in Vitro* 20, 1098-1105.
- ZHANG, T. L., XIE, Y. H., WANG, Y., LIN, G. W., 2007. Mechanism Underlying IL-2 Inhibition on T cell Specific Immune Response, *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 15 (3), 573-577.
- ZONDEK, B. & BERGMANN, E., 1938. Phenol methyl ethers as oestrogenic agents. *Biochem. J.* 32, 641-645.

ANEXO

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
Comitê de Ética para o Uso de Animais
Av. Paranjana, 1700 - Itaperi
CEP 60740-903 - fone: 3101-9890



PROCESSO N°: 07227619-3

TÍTULO: “Efeito do óleo essencial do *Cróton zehntneri* na fase aguda do processo de reparo tecidual em camundongos”

PRINCIPAL PESQUISADOR: Josenilda Malveira Cavalcanti

O projeto intitulado “Efeito do óleo essencial do *Cróton zehntneri* na fase aguda do processo de reparo tecidual em camundongos”, tem como responsáveis JOSENILDA MALVEIRA CAVALCANTI, aluna de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas da UECE e a orientadora ANDRELINA NORONHA COELHO DE SOUSA. O objetivo geral do projeto é analisar os efeitos do uso tópico, e com estímulo com ultra-som (fonoforese), do óleo essencial, sobre resposta inflamatória durante o processo de cicatrização de ferida.

A pesquisa será desenvolvida no Laboratório de Fisiologia Experimental do Instituto Superior de Ciências Fisiológicas (ISCB)/UECE e serão utilizados camundongos *Swiss* adultos pesando 25 a 35g oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará ou da Faculdade Christus e mantidos no Biotério do ISCB. De acordo com o projeto os animais serão anestesiados antes dos experimentos com éter etílico inalado em câmara adequada ou, em caso cirúrgico, com quetamina e xilazina. Os animais serão observados e tratados diariamente. Ao final dos experimentos os animais serão sacrificados com overdose de éter e o descarte será efetuado como lixo hospitalar para incineração.

Uma vez que os aspectos éticos de bem estar animal apresentam-se de acordo com recomendações vigentes, o CEUA entende que o projeto deva ser categorizado com APROVADO.

Fortaleza, 07 de julho de 2008


José Mário Girão Alencar
CEUA-UECE

APÊNDICE

APENDICE 1 - Escores obtidos pelo efeito tópico do OECz e anetol no edema presente em ferida aberta de camundongos com 3 dias de tratamento.

controle	OECz2%	OECz10%	OECz20%	anetol2%	anetol10%	anetol20%	fibrase	dexamet
2	2	1	0	2	2	3	2	1
2	2	1	0	2	2	3	2	1
3	3	1	0	2	3	3	2	0
3	3	0	0	2	3	3	1	0
3	3	0	1	3	3	3	1	0
3	3	1	1	3	3	3	1	0

APENDICE 2 - Escores obtidos pelo efeito tópico do OECz e anetol no exudato presente em ferida aberta de camundongos com 3 dias de tratamento.

controle	OECz2%	OECz10%	OECz20%	anetol2%	anetol10%	anetol20%	fibrase	dexamet
2	2	2	1	2	1	3	2	1
2	2	2	0	2	1	3	2	0
2	2	2	0	2	1	3	2	0
2	2	2	0	2	0	3	2	0
3	3	2	0	3	1	3	2	0
3	3	2	0	3	1	3	2	0

APENDICE 3 - Escores obtidos pelo efeito tópico do OECz e anetol no tecido de granulação presente em ferida aberta de camundongos com 7 dias de tratamento.

controle	OECz2%	OECz10%	OECz20%	anetol2%	anetol10%	anetol20%	fibrase	dexamet
1	2	2	3	2	2	3	2	1
1	2	2	3	2	2	3	2	1
2	2	2	3	2	3	3	3	1
2	2	3	3	2	3	3	3	1
2	2	3	3	2	3	3	3	2
2	2	3	3	2	3	3	3	2

APENDICE 4 – Efeito tópico do anetol e OECz comparado ao efeito tópico da fibrase e dexametazona com 3 dias de tratamento sobre o diâmetro da ferida aberta em camundongos.

CONTR- T=3	anet 2% t=3	Oecz 2% t=3	anet 10% t=3	OECz10% t=3	anet20% t=3	OECz 20% t=3	Fibrase t=3	Dexamet t=3
47,07	58,75	55,63	83,06	49,23	83,15	50	46,91	85,73
44,13	58,89	62,56	95,79	43,88	95,81	44,1	48,33	81
51,28	91,02	61,27	67,98	48,29	68,45	50	49,62	89,83
55,29	59,11	54,67	70,35	32,35	70,83	50	45,9	72,24
48,71	56,32	55,07	71,82	49,88	72,68	43,64	44,63	63,25
44,61	67,01	83,91	76,69	43,46	78,31	32,74	36,46	67,01

APENDICE 5 - Efeito tópico do anetol e OECz comparado ao efeito tópico da fibrase e dexametazona com 7 dias de tratamento sobre o diâmetro da ferida aberta em camundongos.

CONTR- T=7	anet 2% t=7	Oecz 2% t=7	anet 10% t=7	OECz10% t=7	anet20% t=7	OECz 20% t=7	Fibrase t=7	Dexamet t=7
31,21	16,27	27,93	58,33	38,38	21,64	23,46	23,58	64,86
27,21	26,13	26,21	31,16	36,47	21,8	16,98	16,58	70,73
26,92	33,71	29,62	59,05	38,23	21,08	20,18	19,95	62
33,72	37,42	31,7	21,71	37,78	21,23	17,26	12,3	59,68
42,58	49,11	42,42	28,08	36,11	22,62	16,88	16,49	61,89
41,77	22,42	49,31	34,92	35,03	15,71	14,8	15,22	59,53

APENDICE 6 - Efeito tópico do anetol e OECz comparado ao efeito tópico da fibrase e dexametazona com 15 dias de tratamento sobre o diâmetro da ferida aberta em camundongos.

CONTR- T=15	anet 2% t=15	Oecz 2% t=15	anet 10% t=15	OECz10% t=15	anet20% t=15	OECz 20% t=15	fibrase t=15	dexamet t=15
27,45	27,6	25,8	22,22	30,72	17,5	6,49	5,55	38,38
28,71	29,66	29,12	24,33	34,52	15,21	7,98	6,75	38,57
29,73	29,48	25,01	20,94	24,18	10,35	5,75	7,07	41,24
30,38	28,46	27,38	29,04	27,12	19,27	6,04	5,8	37,33
24,28	22,36	30,7	23,97	26,61	19,96	6,59	6,4	41,56
25,5	20,94	29,44	24,7	16	18,49	5,2	7,2	47,77

APENDICE 7 – Área das feridas (mm²) com 3 dias de tratamento

GRUPOS	GRUPOS	GRUPOS	GRUPOS
LD- OECz 2%- T=0	LE - CONTR- T=0	LD- OECz 2%- T=3	LE - CONTR- T=3
4,17	3,77	2,32	2,17
3,58	3	2,24	2,27
5,19	4,03	3,18	2,7
4,06	3,18	2,22	2,18
3,94	3,56	2,17	2,5
4,04	3,6	3,39	2,82
LD-ANET2%- T=0	LE - CONTR- T=0	LD-ANET2%- T=3	LE - CONTR- T=3
3,2	4,27	1,88	2,2
3,26	5,73	1,92	1,86
3,01	4,38	2,74	2,12
3,4	3,77	2,01	1,7
4,03	4,18	2,27	2,23
3,79	3,92	2,54	1,39
LD- OECz 10%- T=0	LE - CONTR- T=0	LD- OECz 10%- T=3	LE - CONTR- T=3
3,9	3,11	1,92	1,87
4,58	4,16	2,01	2,28
4,1	2,55	1,98	1,78
3,4	4,34	1,1	2,69
4,39	4,18	2,19	2,66
3,98	4,03	1,73	2,48
LD-ANET10%- T=0	LE - CONTR- T=0	LD-ANET10%- T=3	LE - CONTR- T=3
3,78	4,66	3,14	2,57
3,09	3,81	2,96	1,8
3,53	4,08	2,4	1,48
3,07	3,65	2,16	2,28
3,94	4,04	2,83	1,54
4,12	4,2	3,16	2,28
LD- OECz 20%- T=0	LE - CONTR- T=0	LD- OECz 20%- T=3	LE - CONTR- T=3
4,2	4,16	2,1	2,61
4,58	4,15	2,02	2,29
3,98	3,18	1,99	1,96
4,4	4,2	2,2	2,67
4,01	4,05	1,75	2,5
3,42	4,36	1,12	2,7
LD-ANET20%- T=0	LE - CONTR- T=0	LD-ANET20%- T=3	LE - CONTR- T=3
3,8	4,68	3,16	2,6
3,11	3,83	2,98	1,83
3,55	4,1	2,43	1,5
3,12	3,7	2,21	2,33
3,99	4,09	2,9	1,61
4,15	4,23	3,25	2,3

APENDICE 8 – Área das feridas (mm²) com 7 dias de tratamento

GRUPOS	GRUPOS	GRUPOS	GRUPOS
LD- OECz 2%- T=0	LE- CONTR- T=0	LD- OECz 2%- T=7	LE- CONTR- T= 7
5,37	4,76	1,5	1,52
5,15	4,79	1,35	1,33
4,05	4,99	1,2	1,38
3,47	4,35	1,1	1,5
3,63	3,69	1,54	1,6
2,92	2,47	1,44	1,19
LD-ANET2%- T=0	LE- CONTR- T=0	LD-ANET2%- T=7	LE- CONTR- T= 7
4,24	3,84	0,69	0,9
3,98	3,22	1,04	1,17
3,47	3,49	1,17	1,41
3,42	3,95	1,28	1,46
3,38	3,63	1,66	1,53
2,72	2,19	0,61	0,97
LD- OECz 10%- T=0	LE- CONTR- T=0	LD- OECz 10%- T=7	LE- CONTR- T= 7
3,83	3,36	1,47	1,36
5,51	3,78	2,01	1,96
4,42	4,15	1,69	1,76
3,97	4,16	1,5	1,78
3,96	3,83	1,43	1,52
2,94	2,85	1,03	1,08
LD-ANET10%- T=0	LE- CONTR- T=0	LD-ANET10%- T=7	LE- CONTR- T= 7
3,6	3,56	2,1	1,49
3,53	3,76	1,1	1,35
4,25	3,74	2,51	1,96
4,42	4,08	0,96	0,9
3,49	3,83	0,98	1,43
3,98	4,15	1,39	1,26
LD- OECz 20%- T=0	LE- CONTR- T=0	LD- OECz 20%- T=7	LE- CONTR- T= 7
3,92	4,12	0,92	1,39
4,24	3,98	0,72	1,62
4,26	4,12	0,86	1,56
3,65	4,07	0,63	1,39
3,85	3,73	0,65	1,59
4,39	4,59	0,65	1,75
LD-ANET20%- T=0	LE- CONTR- T=0	LD-ANET20%- T=7	LE- CONTR- T= 7
3,65	4	0,79	1,51
3,21	3,17	0,7	1,59
4,79	4,67	1,01	1,95
3,25	3,22	0,69	1,72
3,89	3,93	0,88	1,53
4,39	4,5	0,69	1,48
LD-CONT-PLUR-T=0	LE-CONT-SALIN-T=0	LD-CONT-PLUR-T=7	LD-CONT-SALIN-T=7
5,32	4,71	1,52	1,47
5,1	4,74	1,42	1,29
4	4,94	1,31	1,33
3,42	4,3	1,19	1,45
3,58	3,64	1,62	1,55
2,87	2,42	1,49	1,01

APENDICE 9 – Área das feridas (mm²) com 15 dias de tratamento

LD- OECz 2%- T=0	LE- CONTR- T=0	LD- OECz 2%- T=15	LE- CONTR- T= 15
4,41	7,3	0,7	0,62
3,23	3,56	1,07	1,53
3,08	3,64	1,14	1,41
4,09	4,33	1,12	1,33
3,42	3,4	1,05	0,75
3,53	3,46	1,11	0,76
LD-ANET2%- T=0	LE- CONTR- T=0	LD-ANET2%- T=15	LE- CONTR- T= 15
2,97	3,59	0,82	0,97
2,96	3,18	1,47	1,28
4,54	3,32	0,93	0,98
2,74	3,79	0,78	0,9
3,38	4,48	1,77	1,68
2,96	2,96	0,62	0,53
LD- OECz 10%- T=0	LE- CONTR- T=0	LD- OECz 10%- T=15	LE- CONTR- T= 15
3,84	3,61	1,18	1,05
3,65	3,88	1,26	1,02
3,68	3,72	0,89	0,87
3,65	3,23	0,99	0,73
3,1	3,28	0,67	0,98
3,5	3,58	0,56	0,72
LD-ANET10%- T=0	LE- CONTR- T=0	LD-ANET10%- T=15	LE- CONTR- T= 15
4,32	3,24	0,96	0,24
3,78	3,42	0,92	0,36
4,01	3,78	0,84	0,58
2,72	2,97	0,79	0,6
3,17	2,97	0,76	0,5
3,44	3,84	0,85	0,73
LD- OECz 20%- T=0	LE- CONTR- T=0	LD- OECz 20%- T=15	LE- CONTR- T= 15
3,08	2,56	0,2	0,26
3,13	3,36	0,25	0,39
3,82	3,79	0,22	0,41
3,97	3,65	0,24	0,27
2,88	2,93	0,19	0,26
3,46	2,92	0,18	0,22
LD-ANET20%- T=0	LE- CONTR- T=0	LD-ANET20%- T=15	LE- CONTR- T= 15
3,4	3,37	0,58	0,5
3,22	3,82	0,49	0,39
3,09	3,05	0,32	0,21
2,91	2,85	0,27	0,24
2,44	3,05	0,17	0,2
3,06	3,16	0,26	0,33