

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

**Rafael Pimentel Pinheiro**

**Caracterização química e efeitos farmacológicos de produtos derivados de *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae)**

**Juiz de Fora**  
**2015**

**Rafael Pimentel Pinheiro**

**Caracterização química e efeitos farmacológicos de produtos derivados de *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos naturais bioativos.

Orientador: Dr. Orlando Vieira de Sousa.

Coorientador: Dr. Rodrigo Luiz Fabri.

**Juiz de Fora**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pinheiro, Rafael Pimentel.

Caracterização química e efeitos farmacológicos de produtos derivados de *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae) / Rafael Pimentel Pinheiro. -- 2015.

112 f.

Orientador: Orlando Vieira de Sousa

Coorientador: Rodrigo Luiz Fabri

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

1. *Palicourea rigida*. 2. inflamação. 3. cicatrização. 4. flavonoides. 5. cromatografia. I. Sousa, Orlando Vieira de, orient. II. Fabri, Rodrigo Luiz, coorient. III. Título.


**Caracterização química e efeitos farmacológicos de produtos derivados de *Palicourea rigida*  
Kunth (Rubiaceae)**

**Rafael Pimentel Pinheiro**

**Orlando Vieira de Sousa**

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

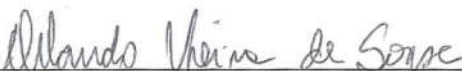
Aprovada em 30/07/2015



\_\_\_\_\_  
Leandro Machado Rocha  
(Universidade Federal Fluminense – UFF)



\_\_\_\_\_  
Fernanda Maria Pinto Vilela  
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)



\_\_\_\_\_  
Orlando Vieira de Sousa  
(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

*Dedico*

*Aos meus familiares e companheiros de jornada.*

*À natureza, verdadeira fonte de saber e de vida,*

*E que dela tiremos apenas o que nos for necessário.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, força maior que nos move e nos motiva todos os dias.

Ao meu pai Luiz, ombro amigo, pelo apoio nos estudos, palavras de incentivo e pelo exemplo que procuro seguir.

À minha mãe, Ana Luiza pelo acolhimento, palavras de conforto, apoio em minhas decisões e pelo zelo neste tempo em que estive fora.

Ao meu irmão Luiz Henrique, anjo de Deus, pelos telefonemas diários, pela saudade, pelo carinho e exemplo de perseverança e superação!!

À minha família, base de tudo: avôs e avós, tios e tias e todos os primos, obrigado por entenderem minha ausência.

À minha namorada Lorena pelas ajudas, apoio, incentivo e por estar ao meu lado, mesmo quando estive mais distante...

Ao co-orientador Prof. Rodrigo Fabri pelos conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos mestrandos de turma e de bancada: Elisa Gomes Lanna, Fabrini Luiz Alves de Almeida e Milene Machado Minateli, pelas horas de estudos, ajuda, conselhos e risadas! “Que não percamos o contato”.

Aos técnicos do laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais: Jésus e Eder, pela amizade e auxílios prestados.

Aos amigos de iniciação científica do laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais pela troca de conhecimentos e auxílios prestados.

Aos amigos do Instituto de Ciências Biológicas, à Prof<sup>a</sup>. Elita por compartilhar seu laboratório e materiais, à Prof<sup>a</sup>. Antônia pelos conhecimentos compartilhados, aos doutorandos Nicolas e Jucélia e o mestrando Jonatas por dividirem seu tempo e disponibilidade em partilhar experiências.

Ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFJF, à coordenadora deste Prof.<sup>a</sup> Maria Silvana pela solicitude em todas as horas e pela oportunidade e condições de desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e financiamento dos projetos e também à Universidade Federal de Juiz de Fora, pela oportunidade e infraestrutura.

## RESUMO

*Palicourea rigida* Kunth, pertencente à família Rubiaceae, tem sido utilizada na medicina popular para o tratamento de inflamações e infecções do trato urinário, do aparelho reprodutor feminino e para doenças da pele. Do ponto de vista químico, triterpenos, iridoides, flavonoides e alcaloides têm sido identificados na espécie. O objetivo do presente trabalho foi realizar uma caracterização química e avaliar as atividades anti-inflamatória tópica e cicatrizante de *P. rigida*. Folhas secas e pulverizadas foram extraídas em etanol P.A. por maceração estática seguida de rota-evaporação para obtenção do extrato etanólico (EEPR). EEPR foi submetido à partição líquido/líquido, adquirindo as frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica. EEPR foi analisado por CLUE-UV-EM, enquanto a fração hexânica por CG-EM. A fração em acetato de etila foi fracionada por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 e a substância isolada foi elucidada por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massas. A partir de EEPR, foi desenvolvido uma formulação de creme à base Lanette<sup>®</sup> (cEEPR). A atividade anti-inflamatória tópica de EEPR foi avaliada pelos modelos de edema de orelha em camundongos Swiss empregando óleo de cróton, ácido araquidônico, capsaicina e fenol. A atividade cicatrizante de EEPR e cEEPR foi investigada em ratos Wistar através do modelo de lesões por excisão cutânea. Análises histopatológicas e as atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -d-glucuronidase (NAG) foram também determinadas. Loganina e quercetina 3-6-*O*-acetil- $\beta$ -glicosídeo foram identificadas no EEPR por CLUE-UV-EM, enquanto ácido palmítico, fitol, ácido linoleico, esqualeno, gama tocoferol, vitamina E, campesterol, estigmasterol e gama sitosterol foram caracterizadas na fração hexânica por CG-EM. A partir da fração em acetato de etila, o flavonoide quercetina 3-*O*- $\beta$ -D-glicosídeo foi isolado e sua estrutura elucidada. EEPR apresentou atividade anti-inflamatória tópica nos diferentes modelos através da redução da massa e espessura do edema, assim como pela diminuição do processo inflamatório observado pelas análises histopatológicas e inibição das atividades de MPO e NAG. EEPR e cEEPR demonstraram atividade cicatrizante pela diminuição da área da lesão e aumento do grau de contração, bem como pela estimulação do processo de cicatrização e redução das atividades de MPO e NAG. Os resultados indicam que *P. rigida* é rica em substâncias bioativas que podem ser responsáveis pelas atividades anti-inflamatória e cicatrizante.

Palavras-chave: *Palicourea rigida*; inflamação; cicatrização; flavonoides; preparações farmacêuticas; cromatografia.

## ABSTRACT

*Palicourea rigida* Kunth, belonging to the Rubiaceae family, has been used in folk medicine for the treatment of inflammation and infections of the urinary tract, female reproductive tract and skin conditions. From the chemical point of view, triterpenes, iridoids, flavonoids and alkaloids have been identified in species. The aim of this study was to perform a chemical characterization and evaluate the topical anti-inflammatory and wound healing activities of *P. rigida*. Dried and powdered leaves were extracted in ethanol PA by static maceration followed by rota-evaporation for obtaining ethanol extract (EEPR). EEPR was subjected to partition liquid/liquid to obtain the hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol fractions. EEPR was analyzed by UPLC-UV-MS, while the hexane fraction by GC-MS. The ethyl acetate fraction was separated by column chromatography with Sephadex LH-20 and the isolated compound was elucidated by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and mass spectrometry. From the EEPR, a dermatological formulation was developed using the cream-based Lanette<sup>®</sup> (cEEPR). The topical anti-inflammatory activity of EEPR was evaluated by the ear edema models in mice Swiss using croton oil, arachidonic acid, capsaicin and phenol. The wound healing activity of EEPR and cEEPR was investigated in Wistar rats through the model of skin lesions. Histopathological analysis and activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) and N-acetyl- $\beta$ -D-glucuronidase (NAG) were also determined. Loganin and quercetin 3-6-O-acetyl- $\beta$ -glucoside were identified in EEPR by UPLC-UV-MS, while palmitic acid, phytol, linoleic acid, squalene, gamma tocopherol, vitamin E, campesterol, stigmasterol and sitosterol were characterized in the hexane fraction by GC-MS. From the fraction in ethyl acetate, the flavonoid quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucoside was isolated and its structure elucidated. EEPR showed topical anti-inflammatory activity in different models by reducing the the mass and thickness of the edema, as well as through the decrease in the inflammatory process observed by histopathological analysis and inhibition of the MPO and NAG activities. EEPR and cEEPR demonstrated wound healing activity by decrease the area of lesion and increase the contraction degree, as well as stimulate the healing process and reduce the MPO and NAG activities. The results indicate that *P. rigida* is rich in bioactive substances which may be responsible for the anti-inflammatory and wound healing activities.

Keywords: *Palicourea rigida*; inflammation; wound healing; flavonoids; pharmaceutical preparations; chromatography



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspectos morfológicos de <i>P. rigida</i> Kunth.....	22
Figura 2 - Estrutura floral de <i>P. rigida</i> .....	22
Figura 3 - Substâncias isoladas de <i>P. rigida</i> Kunth.....	24
Figura 4 - Representação das vias e produtos do metabolismo secundário.....	26
Figura 5 - Estrutura simplificada da pele.....	31
Figura 6 - Fluxograma do processo de cicatrização.....	32
Figura 7 - Esquema de fracionamento líquido-líquido.....	35
Figura 8 - Processo de fracionamento da partição em acetato de etila.....	37
Figura 9 - Perfil cromatográfico do EEPR por UPLC-UV-EM.....	48
Figura 10 - Perfil cromatográfico do EEPR por CLUE-UV-EM.....	49
Figura 11: Representação dos compostos identificados por CLUE-UV-EM.....	50
Figura 12 - Perfil cromatográfico da fração hexânica das folhas de <i>P. rigida</i> obtido por CG-EM.....	51
Figura 13: Representação dos compostos 1 a 5 identificados por CG-EM.....	53
Figura 14: Representação dos compostos 6 a 9 identificados por CG-EM.....	54
Figura 15 - Cromatografia líquida de alta eficiência do composto C2F2.....	55
Figura 16: Estrutura básica de um flavonoide glicosilado.....	55
Figura 17 - Espectro RMN <sup>1</sup> H da substância C2F4.....	56
Figura 18 - Espectro RMN <sup>13</sup> C da substância C2F4.....	57
Figura 19 - Mapa de contornos HSQC da substância C2F4.....	57
Figura 20 - Espectro de fragmentação da substância C2F4.....	59
Figura 21 - Cortes histológicos de orelhas com edema induzido por óleo de cróton após tratamento com EEPR.....	66
Figura 22 - Cortes histológicos de orelhas com edema induzido por óleo de cróton após tratamento com EEPR.....	67
Figura 23 - Fotomicrografia do tecido cicatrizado de ratos Wistar nos tratamentos de 7 e 14 dias com EEPR.....	76
Figura 24 - Fotomicrografia do tecido cicatrizado de ratos Wistar nos tratamentos de 7 e 14 dias com cEEPR.....	85

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito anti-inflamatório tópico de EEPR sobre edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	60
Gráfico 2 - Efeito de EEPR sobre as atividades de MPO e NAG após indução do edema de orelha por óleo de cróton.....	61
Gráfico 3 - Efeito anti-inflamatório tópico de EEPR sobre edema de orelha induzido por fenol.....	62
Gráfico 4 -Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO após indução do edema de orelha por fenol.....	62
Gráfico 5 - Efeito anti-inflamatório tópico de EEPR sobre edema de orelha induzido por capsaicina.....	63
Gráfico 6 - Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO após indução do edema de orelha por capsaicina.....	64
Gráfico 7 - Efeito anti-inflamatório tópico de EEPR sobre edema de orelha induzido por ácido araquidônico.....	64
Gráfico 8 - Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO após indução do edema de orelha por ácido araquidônico.....	65
Gráfico 9 - Efeito do EEPR sobre o tamanho do edema de orelha induzido por óleo de crótonnos cortes histológicos analisados através do programa Imagepro-Plus®.....	68
Gráfico 10 - Efeito de EEPR sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar no tratamento de 7 dias.....	72
Gráfico 11 - Efeito de EEPR sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar no tratamento de 14 dias. ....	73
Gráfico 12 - Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO no processo cicatrização em ratos Wistar nos tratamentos de 7 e 14 dias.....	74
Gráfico 13 - Efeito de EEPR sobre a atividade de NAG no processo cicatrização em ratos Wistar nos tratamentos de 7 e 14 dias.....	75
Gráfico 14 - Efeito de cEEPR sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar no tratamento de 7 dias.....	81
Gráfico 15 - Efeito de cEEPR sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar no tratamento de 14 dias.....	82
Gráfico 16 - Efeito de cEEPR sobre a atividade de MPO no processo cicatrização em ratos Wistar nos tratamentos de 7 e 14 dias.....	83
Gráfico 17 - Efeito de cEEPR sobre a atividade de NAG sobre o processo cicatrização em ratos Wistar nos tratamentos de 7 e 14 dias.....	84

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais.....	44
Quadro 2 - Efeito de EEPR sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar no tratamento de 7 dias.....	70
Quadro 3 - Efeito de EEPR sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar no tratamento de 14 dias.....	71
Quadro 4 - Efeito de cEEPR sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar no tratamento de 7 dias.....	79
Quadro 5 - Efeito de cEEPR sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar no tratamento de 14 dias.....	80

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Classificação botânica de <i>Palicourea rigida</i> Kunth.....	21
Tabela 2 - Substâncias isoladas da espécie <i>Palicourea rigida</i> Kunth.....	23
Tabela 3 - Composição da fase aquosa do creme.....	39
Tabela 4 - Composição da fase oleosa do creme.....	39
Tabela 5 - Divisão dos grupos experimentais.....	47
Tabela 6 - Compostos identificados por CLUE-UV-MS.....	49
Tabela 7 - Compostos identificados por CG-EM.....	52
Tabela 8 - Valores dos sinais de $^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}$ e constantes de acoplamento.....	58
Tabela 9 - Média da massa corporal e do consumo de água e ração durante 7 e 14 dias de tratamento com EEPR e cEEPR.....	69
Tabela 10 - Média da massa corporal e do consumo de água e ração durante 7 e 14 dias de tratamento com cEEPR.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA.....	Ácido araquidônico
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	Ácido fosfórico
ANVISA....	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
$\alpha$ .....	Alfa
a.C.....	Antes de Cristo
$\beta$ .....	Beta
ButOH.....	Butanol
BHT.....	Butil-hidroxi-tolueno
cm.....	Centímetros
CBR.....	Centro de Biologia da Reprodução
CEEA.....	Comitê de Ética na Experimentação Animal
CN .....	Controle negativo
CP.....	Controle positivo
cEEPR.....	Creme contendo extrato etanólico de <i>Palicourea rigida</i> .
CG.....	Cromatografia Gasosa
CLAE.....	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE.....	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
COX.....	Enzimas ciclo-oxigenase
ERO.....	Espécie reativa a oxigênio
EE.....	Extrato etanólico
EEPR.....	Extrato etanólico de <i>Palicourea rígida</i>
PAF.....	Fator de ativação palquetária
TNF- $\alpha$ .....	Fator de necrose tumoral alfa
g.....	Gramas
GC.....	Grau de contração da área
°C.....	Graus celcius
Hz.....	Hertz
NaOH.....	Hidróxido de sódio
IL-1.....	Interleucina 1
IL-1 $\alpha$ .....	Interleucina 1-alfa
IL-1 $\beta$ .....	Interleucina 1-beta
IL-8.....	Interleucina 8
LT.....	Leucotrieno
LTB <sub>4</sub> .....	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub> .....	Leucotrieno C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub> .....	Leucotrieno D <sub>4</sub>
LOX.....	Lipooxigenase
m/v .....	Massa / volume
m/m .....	Massa/massa
MHz.....	Mega Hertz
$\mu$ g.....	Micrograma
$\mu$ L.....	Microlitro
$\mu$ m.....	Micrometro

MPO.....	Mieloperoxidase
mg.....	Miligramas
mL.....	Mililitro
mm.....	Milímetros
mm <sup>2</sup> .....	Milímetros cúbicos
MS.....	Ministério da Saúde
Min.....	Minuto
NAG.....	N-acetil-β-d-glucoronidase
Nm.....	Nanômetros
PMN.....	Neutrófilos polimorfonucleares
ONU.....	Organização das Nações Unidas
OMS.....	Organização Mundial da Saúde
O <sub>2</sub> .....	Oxigênio
LPO.....	Peroxidação lipídica
TMB.....	P-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina
PEG.....	Polietilenoglicol
pH.....	Potencial de hidrogênio
PN.....	Produto natural
PGE <sub>2</sub> .....	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PG.....	Prostaglandinas
q.s. ....	Quantidade suficiente
q.s.p. ....	Quantidade suficiente para
UV.....	Radiação ultravioleta
RPM.....	Rotações por minuto
s.c. ....	Sub cutânea
v.o. ....	Via oral
v/v .....	Volume/volume

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
2.1 PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS .....	18
2.2 FAMÍLIA RUBIACEAE .....	19
2.3 GÊNERO <i>Palicourea</i> .....	20
2.4 ESPÉCIE <i>Palicourea rigida</i> KUNTH.....	20
2.5 METABOLISMO VEGETAL .....	25
2.6 PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E PRODUTOS NATURAIS .....	27
2.7 CICATRIZAÇÃO .....	30
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	34
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1 MATERIAL VEGETAL .....	35
4.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO.....	35
4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA .....	36
4.3.1 Análise de EEPR por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência .....	36
4.3.2 Análise da fração hexânica por CG-EM.....	36
4.3.3 Isolamento de C2F4 da fração em acetato de etila .....	36
4.4 PREPARO DA SUSPENSÃO DO EXTRATO ETANÓLICO .....	38
4.5 PREPARO DO CREME DERMATOLÓGICO.....	38
4.6 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS.....	40
4.6.1 Animais .....	40
4.6.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica.....	40
4.6.2.1 Edema de orelha induzido por óleo de <i>Cróton</i> .....	41
4.6.2.2 Edema de orelha induzido por fenol .....	41
4.6.2.3 Edema de orelha induzido por capsaicina .....	42
4.6.2.4 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de Ácido Araquidônico .....	42
4.6.3 Avaliação da atividade cicatrizante .....	42
4.6.3.1 Aplicação do tratamento .....	43
4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	44
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MIELOPEROXIDASE E N-ACETIL- $\beta$ -D-GLUCOSAMINIDASE .....	45
4.8.1 Obtenção do sobrenadante .....	45
4.8.2 Dosagem de proteínas totais.....	45
4.8.3 Ensaio da atividade enzimática da mieloperoxidase .....	46

4.8.4 Ensaio da atividade enzimática da N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase .....	46
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	46
<b>5. RESULTADOS</b> .....	47
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA .....	47
5.1.2 Caracterização química por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detector de ultravioleta e espectrofotômetro de massas .....	47
5.2.3 Perfil cromatográfico e caracterização química por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. ....	49
5.2.4 Purificação, isolamento e identificação de constituintes a partir da fração em acetato de etila. ..	53
5.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DE EEPR .....	59
5.2.1 Efeito de EEPR sobre o edema de orelha induzido por óleo de Cróton.....	59
5.2.1.1 <i>Efeito de EEPR sobre as atividades de MPO e NAG após indução do edema de orelha por óleo de Cróton</i> .....	59
5.2.2 Efeito de EEPR sobre o edema de orelha induzido por fenol .....	60
5.2.2.1 <i>Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO após indução do edema de orelha por fenol</i> . ....	61
5.2.3 Efeito de EEPR sobre o edema de orelha induzido por capsaicina.....	62
5.2.3.1 <i>Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO após indução do edema de orelha por capsaicina</i> .....	62
5.2.4 Efeito de EEPR sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico .....	63
5.2.4.1 <i>Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO após indução do edema de orelha por ácido araquidônico</i> .....	64
5.2.5 Análise histopatológica do edema de orelha induzido por óleo de cróton .....	64
5.3 ATIVIDADE CICATRIZANTE DE EEPR.....	68
5.3.1 Efeito de EEPR sobre a massa corporal e consumo de água e ração .....	68
5.3.2 Efeito de EEPR sobre a análise macroscópica do processo de cicatrização nos tratamentos de 7 e 14 dias .....	68
5.3.3 Efeito de EEPR sobre a área da lesão nos tratamentos de 7 e 14 dias .....	70
5.3.4 Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO nos tratamentos de 7 e 14 dias .....	72
5.3.5 Efeito de EEPR sobre a atividade de NAG nos tratamentos de 7 e 14 dias .....	73
5.4 ATIVIDADE CICATRIZANTE DE cEEPR .....	76
5.4.1 Efeito de cEEPR sobre a massa corporal e consumo de água e ração .....	76
5.4.2 Efeito de cEEPR sobre a análise macroscópica do processo de cicatrização nos tratamentos de 7 e 14 dias.....	77
5.4.3 Efeito de cEEPR sobre a área da lesão nos tratamentos de 7 e 14 dias.....	79
5.4.4 Efeito de cEEPR sobre a atividade de MPO nos tratamentos de 7 e 14 dias .....	81
5.4.5 Efeito de cEEPR sobre a atividade de NAG nos tratamentos de 7 e 14 dias .....	82
5.4.6 Análise histopatológica de tecido cicatrizado nos tratamentos de 7 e 14 dias com cEEPR.....	83
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	86
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	95
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96



## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo, os seres humanos têm contado com a natureza para atender suas necessidades básicas e as plantas medicinais, em particular, têm sido uma das bases dos sistemas tradicionais da medicina. Os primeiros registros que documentaram este fato destacam o uso de aproximadamente 1.000 substâncias derivadas de plantas na Mesopotâmia. O "Papiro de Ebers", registro datado de 1.500 a.C., relata o uso de mais de 700 drogas, principalmente de origem vegetal (NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2008). Desse modo, durante milhares de anos, as plantas medicinais têm representado um importante papel na saúde das populações.

Estima-se que cerca de 25 a 30% de todas as drogas empregadas como agentes terapêuticos são derivadas de produtos naturais e, mesmo com os grandes avanços das ciências e da medicina moderna nas últimas décadas, as plantas medicinais continuam sendo utilizadas no tratamento das enfermidades humanas e animais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR; MELLO, 2008). Neste sentido, a expansão do uso de plantas medicinais pode ser atribuída ao seu fácil acesso e, em geral, aos baixos efeitos adversos quando comparadas aos fármacos sintéticos, o que tem proporcionado a busca dos denominados tratamentos "naturais". Outros fatores importantes que têm contribuído para as aplicações medicinais nas últimas décadas são a crescente validação científica das propriedades farmacológicas das espécies vegetais, as políticas nacionais de saúde, o desenvolvimento de novas formas de preparações e administração dos produtos e o relativo "baixo custo" do tratamento (CAÑIGUERAL; DELLACASSA; BANDONI, 2003; MELO et al., 2007). No entanto, no Brasil, as plantas medicinais da flora nativa ainda têm sido consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, sendo estas propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes, essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos nativos (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursoras de fármacos semissintéticos (WHO, 1998). A diferença entre planta medicinal e fitoterápico consiste no preparo da planta medicinal para uma formulação específica, o que a caracteriza um fitoterápico. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio de sua portaria nº 26, de 13 de maio de 2014, define que medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais e são utilizados com finalidade profilática, curativa ou paliativa (BRASIL, 2014).

Diante da importância sobre o uso de plantas medicinais, uma das etapas do estudo de suas propriedades químicas e terapêuticas é a seleção. A seleção consiste da escolha da espécie vegetal que pode ser feita de várias maneiras: através de informações sobre uso tradicional, dos componentes químicos, da seleção randomizada ou da combinação de mais de um critério. A abordagem que tem prevalecido entre os pesquisadores é o estudo de espécies que têm propriedades terapêuticas estabelecidas na medicina tradicional, o qual é conhecido como etnofarmacologia, tendo como base a etnobotânica (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Considerando os princípios abordados, a espécie escolhida para realização do presente estudo foi a *Palicourea rigida* Kunth. Esta espécie pertence à família Rubiaceae, conhecida popularmente como douradão, sendo amplamente distribuída na América do Sul, em especial no bioma cerrado brasileiro. O decocto de suas folhas e raízes é utilizado pela população para doenças da pele, como para o tratamento de sífilis, enquanto as folhas e cascas do caule em decocção são empregadas como depurativo, em doenças renais e para inflamações do ovário (GRANDI et al., 1989, SILVA-JÚNIOR, 2005). Com base nesses usos tradicionais e em estudos que evidenciaram os aspectos fitoquímicos e farmacológicos com potencial terapêutico, o presente trabalho teve como objetivo aprofundar a pesquisa sobre os constituintes químicos e atividades farmacológicas das folhas de *P. rigida*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Desde os primórdios da humanidade, os seres humanos têm contado com as plantas para as necessidades básicas como a alimentação, confecção de roupas, abrigos e para fins adicionais como a caça. Muitas plantas também são usadas devido as suas ações biológicas, em rituais religiosos, para aumentar a resistência e, principalmente, na promoção da saúde da população (RAMAWAT; MÉRILLON, 2008). Até o século passado, por exemplo, a maioria dos medicamentos era derivada diretamente de fontes vegetais ou animais e os sistemas tradicionais de medicina que se utilizam das plantas medicinais se tornaram tema de importância global nas últimas décadas (HALBERSTEIN, 2005). No entanto, mesmo com a medicina moderna presente, muitos países, em especial os em desenvolvimento, ainda dependem das preparações a base de plantas para os cuidados primários de saúde. Essas preparações são muitas vezes empregadas por razões históricas e culturais, sendo descritas como medicina complementar ou alternativa (WHO, 1999).

Um importante conceito de plantas medicinais é aquele que descreve como espécies de origem vegetal que possuem tradição de uso em uma população ou comunidade e são utilizadas com a finalidade de prevenir, aliviar ou curar enfermidades. Além disso, após coleta e operações de secagem, o processamento das plantas medicinais pode resultar na obtenção de fitoterápicos (CARVALHO et al., 2008) que, segundo a legislação sanitária brasileira, são medicamentos produzidos a partir de matérias-primas vegetais que apresentam atividades farmacológicas e podem ser usados no tratamento de enfermidades. Esses medicamentos são caracterizados por oferecerem garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população (ANVISA, 2012; BRASIL, 2014).

Em 1978, a Organização Mundial da Saúde reconheceu oficialmente o uso de fitoterápicos. No Brasil, a política de plantas medicinais e fitoterápicos teve início no ano de 1981 por meio da Portaria n.º 212/MS, de 11 de setembro, que em seu item 2.4.3 estabeleceu o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica. Em 1982, o Ministério da Saúde lançou o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos para promover o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico, pelo estabelecimento de medicamentos fitoterápicos, fundamentada no real valor farmacológico de preparações de uso popular à base de plantas medicinais (ANVISA, 2011).

Por meio do Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006, foi aprovada a Política Nacional

de Plantas Medicinais com o intuito de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Também teve como objetivo ampliar as opções terapêuticas aos usuários, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde tendo em vista o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais (BRASIL, 2006).

Considerando o segmento acadêmico, a convicção da importância dos recursos naturais para o desenvolvimento vem de longa data. Afinal, as plantas fazem parte da vida do homem desde seus primórdios e sua participação nos diversos estágios de desenvolvimento da sociedade é inegável. Muitas patentes, que originaram medicamentos comercializados por empresas multinacionais, tiveram origem em universidades brasileiras, pois o país apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta (SIMÕES; SCHENCKEL, 2002). Já no segmento industrial, é nítido o interesse em produtos naturais como fonte de modelos para fármacos tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos. Estes servem como fonte de matérias-primas farmacêuticas, obtenção de substâncias ativas isoladas e medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais (KINGSTON, 1996; SHU, 1998, HARVEY, 2000).

## 2.2 FAMÍLIA RUBIACEAE

Inicialmente descrita por Antoine Laurent de Jussieu, em 1789, a família Rubiaceae Juss. tem seu nome derivado do gênero *Rubia* L., do latim *rubium*, fazendo referência à tinta vermelha produzida pelas raízes de plantas deste gênero utilizada para tingir tecidos (CRONQUIST, 1981). Essa família é a maior da ordem Gentianales e contempla 650 gêneros com cerca de 13.000 espécies, representando aproximadamente 66% das espécies desta ordem, o que a torna uma das maiores famílias pertencentes às Angiospermas (BREMER, 1996; ROVA et al., 2002). De acordo com a classificação de Robbrecht (1988), as Rubiaceae dividem-se em quatro subfamílias: Cinchonoidae, Ixoroideae, Rubioideae e Antirheoidae. São principalmente plantas lenhosas tropicais e consistem de árvores e arbustos e menos frequentemente de ervas perenes anuais. Sua maior diversidade é encontrada nas regiões tropicais e subtropicais do novo mundo, porém a família apresenta distribuição global (SOUZA; LORENZI, 2008; JUDD et al., 2009). No Brasil, ocorrem aproximadamente 130 gêneros e 1.500 espécies com maior incidência no bioma Cerrado. Neste bioma, são encontradas 376 espécies, sendo considerada a sétima família mais rica em espécies e uma das principais famílias da flora brasileira (CONSOLARO, 2008; SOUZA; LORENZI, 2008; BARBOSA et al., 2010).

Diversas espécies de Rubiaceae detêm grande importância econômica e farmacêutica, sendo também utilizadas com finalidade alimentícia e ornamental, podendo apresentar propriedades tóxicas. Onze espécies de Rubiaceae são quimicamente ricas em metabólitos secundários com atividade biológica e são caracterizadas como bioprodutoras de metabólitos, em especial os pertencentes à classe dos iridóides, terpenóides, flavonoides, taninos, quinonas e alcaloides. Essas substâncias já foram detectadas em diversas espécies, com significativas variações estruturais entre as diferentes subfamílias (Rubioideae, Cinchonoideae, Antirheoideae e Ixoroideae) (INOUYE et al., 1988).

No Brasil, são estimados 38 gêneros de Rubioideae, plantas lenhosas ou herbáceas, com estípulas inteiras ou divididas, frequentemente bifidas ou fimbriadas, ovário com um ou muitos óvulos por lóculo, e frutos carnosos ou secos. A subfamília é caracterizada pela presença generalizada de ráfides e deiscência valvar da corola (BARROSO et al., 1986).

### 2.3 GÊNERO *Palicourea*

O gênero *Palicourea* Aubl., pertencente à tribo Psychotriae da família Rubiaceae, está taxonomicamente relacionado ao gênero *Psychotria* L. que contém o maior número de espécies desta tribo. Existem três centros de riqueza de espécies de *Palicourea*, todos na América do Sul, sendo um deles a região do Planalto Centro Sul do Brasil (TAYLOR, 1989). Segundo Silva (1995), no Distrito Federal, ocorrem cinco espécies de *Palicourea*: *P. coriacea* (Cham) Schum; *P. crocea* (SW) R & S; *P. maregravii* St. Hil; *P. officinalis* Mart e *P. rigida* Kunth.

*Palicourea* inclui aproximadamente 230 espécies que se apresentam como arbustos ou árvores de pequeno porte. De acordo com a literatura, um número significativo de *Palicoureas* apresenta potencial citotóxico para seus extratos e frações (CRAGG; NEWMAN; YANG, 2006). Uma grande variedade de metabólitos já foi relatada para o gênero, incluindo terpenos, cumarinas (EL-SEEDI, 1999), alcaloides (NASCIMENTO et al., 2006) e substâncias fenólicas (INÁCIO et al., 2013), como os flavonoides (ROSA et al., 2010).

### 2.4 ESPÉCIE *Palicourea rigida* KUNTH

*Palicourea rigida* Kunth é conhecida popularmente como “gritadeira”, “bate-caixa” (nomes que fazem referência ao som emitido pelas folhas rígidas quando tocadas), “douradão”, “douradinha”, “erva matadeira” e “erva de rato”, podendo ser encontrada desde o México até a Argentina (SILVA-JÚNIOR, 2005). No Brasil, ocorre particularmente nas regiões do cerrado brasileiro sendo catalogada em 13 estados (BOLZANI; TREVISAN; YOUNG, 1992;

MEDEIROS, 2011). De acordo com Engler (1964), a classificação botânica da *P. rigida* encontra-se conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação botânica de *P. rigida* Kunth

<b>Classificação</b>	
Divisão	Angiosperma
Classe	Dicotiledônea
Ordem	Gentianales
Família	Rubiaceae
Subfamília	Rubioideae
Tribo	Psychotriae
Gênero	Palicourea
Espécie	<i>Palicourea rigida</i>

Fonte: ENGLER (1964)

A espécie se apresenta como arbustos de coloração verde, tem sua floração predominante entre os meses de setembro e março e sua frutificação ocorre entre novembro e abril. Suas folhas são grandes, podendo atingir até 25cm de comprimento e 15cm de largura apresentando característica coriácea (Figura 1). As flores são pentâmeras e de coloração amarelo-avermelhada (MACHADO et al., 2010). Certas características peculiares a esta planta, como a arquitetura de seu caule, ramos e folhas e a presença marcante de suas flores, evidenciam o potencial para que seja indicada como ornamental (Figura 2) (SILVA, 1995).

Entretanto, *P. rigida* é uma planta bastante conhecida na medicina popular e seu uso terapêutico está registrado em publicações sobre plantas medicinais. O decocto de suas folhas e hastes é utilizado em doenças do sistema urinário apresentando também ação diurética (VENCATO et al., 2006). Grandi e colaboradores (1989), em um estudo de campo em Minas Gerais, constataram que a população faz uso das folhas e raízes para doenças da pele como antissifilítico e das folhas e casca do caule, em decocção como depurativo, em doenças renais e para inflamações do ovário.

Figura 1 - Aspectos morfológicos de *P. rigida* Kunth.



Fonte: MORAES, 2013

Figura 2 - Estrutura floral de *P. rigida*.



Fonte: MORAES, 2013.

Atividades citotóxica (SILVA et al., 2006), antimicrobiana (VENCATO et al., 2006), antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória têm sido descritas para constituintes e extratos de *P. rigida* (ROSA et al., 2010; MORAES, 2013). Do ponto de vista químico, triterpenos

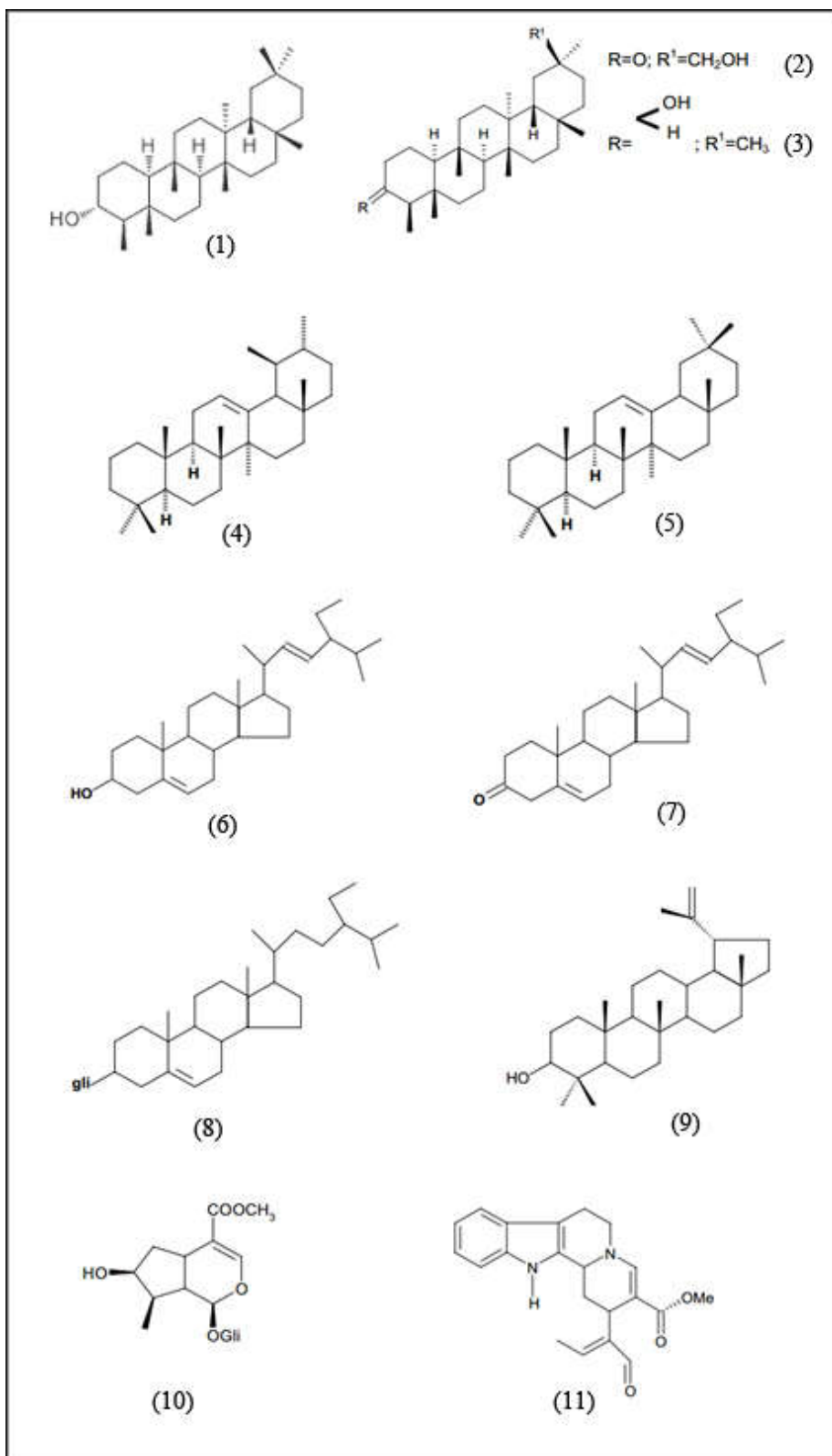
derivados da friedelanona (BOLZANI; TREVISAN; YOUNG, 1992), do iridóide loganina (LOPES et al., 2004) e do alcaloide indólico vallesiachotamina (VENCATO et al., 2006) têm sido isolados e identificados na espécie. Entre os constituintes identificados, destacam-se os descritos na Tabela 2 e representados na Figura 3.

Tabela 2 - Substâncias isoladas da espécie *Palicourea rigida* Kunth.

<b>Substâncias</b>	<b>Referência</b>
3-friedelanona (1)	BOLZANI et al., 1992
30-hidroxifriedelan-3-ona (2)	
3 $\beta$ -hidroxifriedelanona (3)	
$\alpha$ -amirina (4)	
$\beta$ -amirina (5)	
estigmasterol (6)	
estigmastenona (7)	
3 $\beta$ -D-glicose-sitosterol (8)	
lupeol (9)	
loganina (10)	LOPES et al.; 2004
vallesiachotamina (11)	VENCATO et al.; 2006

Fonte: Adaptado de Rosa, 2009.



Figura 3 - Substâncias isoladas de *P. rigida* Kunth.

Fonte: Adaptado de Rosa (2009).

## 2.5 METABOLISMO VEGETAL

Em habitat natural, os vegetais estão cercados por um grande número de inimigos potenciais e, pela sua natureza, as plantas não conseguem evitar os herbívoros e patógenos simplesmente deslocando-se, necessitando, assim, dispor de outras formas de proteção. Através de seu metabolismo produzem uma enorme variedade de substâncias que não apresentam função aparente nos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo, portanto classificadas como metabólitos secundários (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Metabolismo é o nome dado a um conjunto de reações químicas que ocorrem de forma contínua em cada célula. A presença de enzimas específicas garante um direcionamento a estas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Os constituintes químicos que são formados, degradados ou simplesmente alterados por estas reações são denominados de metabólitos (SANTOS, 2010).

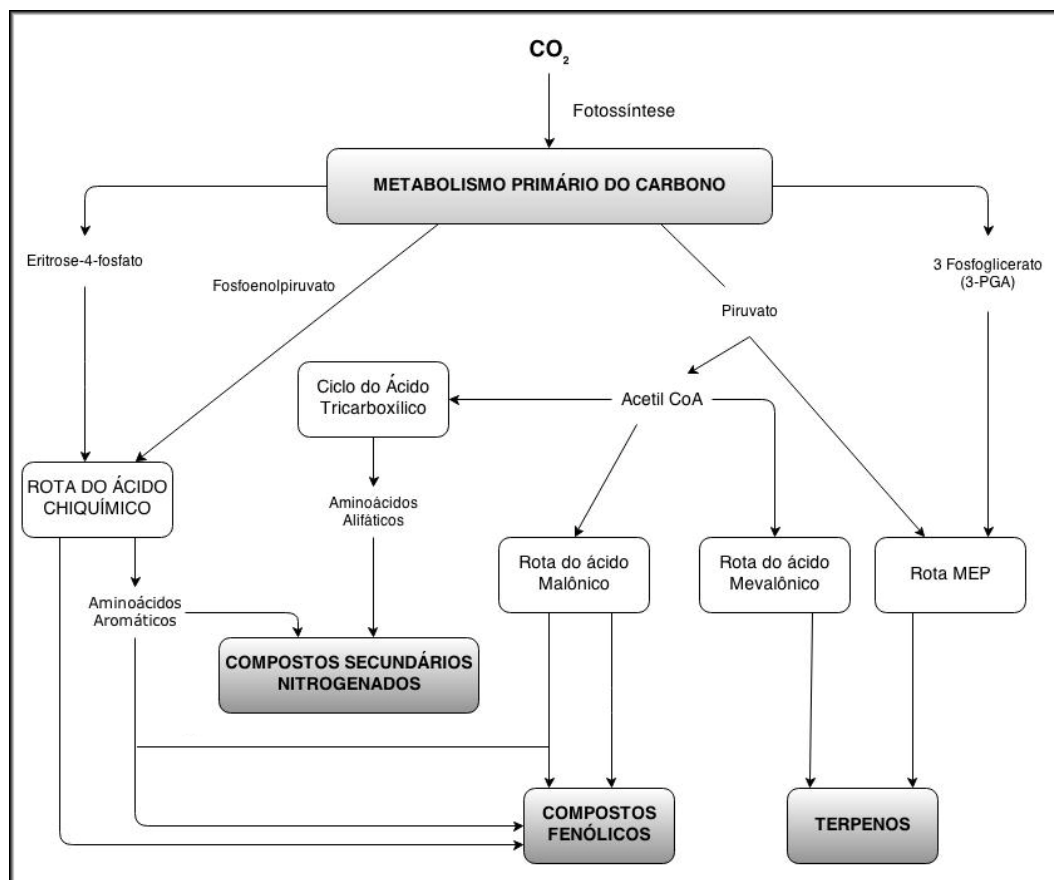
As macromoléculas (carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos) são componentes do metabolismo primário, e, conseqüentemente, os produtos de suas reações são classificados como metabólitos primários, os quais são imprescindíveis para a sobrevivência e desenvolvimento dos organismos (DEWICK, 2009). Os metabólitos primários também são responsáveis pela produção de precursores químicos para o metabolismo secundário (ou especial) nos vegetais, sendo as substâncias geradas no metabolismo secundário responsáveis pela adaptação, diferenciação e especialização dos vegetais no meio em que estão inseridos. Durante muito tempo, o metabolismo secundário e seus metabólitos foram considerados apenas produtos de excreção dos vegetais, e dessa forma, cientificamente irrelevantes (VERPOORTE, 1998; SANTOS, 2010). Porém, posteriormente, foi descoberto que este metabolismo produz a maior parte dos produtos naturais (PN) farmacologicamente ativos (DEWICK, 2009; SANTOS, 2010).

Com o surgimento da metabolômica, termo designado para o estudo quantitativo e qualitativo do metaboloma, ou seja, os metabólitos primários e especiais, foi observado que os metabólitos primários são comuns a todas as espécies, porém os produtos oriundos do metabolismo especial variam de acordo com a espécie, sendo caracterizados como espécie-específicos. Ficou demonstrado através de estudos quimiosistemáticos que espécies do mesmo gênero e/ou família apresentam constituintes semelhantes (GOTTLIEB, 1990).

Os metabólitos secundários não apresentam efeitos diretos sobre os processos vegetais primários, como fotossíntese, respiração, transporte de solutos e água, síntese de proteínas e assimilação de nutrientes. Entretanto, apresentam grande utilidade na defesa dos vegetais contra

patógenos e herbívoros, sendo divididos em três principais grupos: os terpenos, as substâncias fenólicas e as substâncias nitrogenadas (Figura 4) (VICKERY; VICKERY, 1981).

Figura 4 - Representação das vias e produtos do metabolismo secundário



Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger, 2006.

Os terpenos são, em geral, insolúveis em água e representam o maior grupo de constituintes naturais. Muitas plantas produzem terpenos voláteis a fim de atrair insetos específicos para polinização ou para repelir certos animais do uso dessas plantas na alimentação. Alguns terpenos voláteis conferem sabor amargo, atividade tóxica e atuam como sinalizadores e reguladores de crescimento (fitormônios) de plantas (TAIZ; ZEIGER, 2006; SIMÕES; SPITZER, 2010).

Os fenóis constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 substâncias, alguns solúveis apenas em solventes orgânicos, outros em água e há, ainda, aqueles que são grandes polímeros insolúveis. Devido à sua diversidade química, os constituintes fenólicos apresentam uma variedade de funções nos vegetais, entre elas atividades antioxidantes. Essa característica pode ser vista como resultado de um processo de evolução

das espécies para promover sua proteção contra os radicais livres formados pela radiação ultravioleta (UV). Estes constituintes são antioxidantes primários, pois são capazes de neutralizar a reatividade radicalar por meio da doação de um átomo de hidrogênio, impedindo as reações em cadeia (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os compostos nitrogenados representam uma grande variedade de metabólitos secundários vegetais que possuem um nitrogênio na sua estrutura. Incluem-se nessa categoria algumas substâncias bem conhecidas na defesa das plantas contra a herbivoria, como os alcaloides e os glicosídeos cianogênicos. Essas substâncias são de considerável interesse devido ao seu efeito tóxico para humanos, mas também por suas propriedades medicinais (TAIZ; ZEIGER, 2006).

## 2.6 PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E PRODUTOS NATURAIS

Diversos produtos naturais têm demonstrado promissora atividade anti-inflamatória seja pela composição do fitocomplexo ou por apresentarem efeito em ensaios *in vivo* e *in vitro*. O fitoterápico Acheflan<sup>®</sup> é um exemplo disto, apresenta ação anti-inflamatória e é indicado no tratamento local de processos inflamatórios. Ele se destaca por ser proveniente de pesquisas nacionais, podendo ser encontrado comercialmente nas formas farmacêuticas de creme e aerossol, apresentando em sua composição o óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*) (Acheflan). As mais diversas substâncias de origem vegetal, possuem atividade anti-inflamatória comprovada cientificamente. Dentre elas, destacam-se terpenos, taninos, alcaloides, saponinas e flavonoides (SIMÕES et al., 2010).

O processo inflamatório é a resposta de um tecido a um estímulo lesivo. Este estímulo pode ser provocado por uma vasta variedade de agentes nocivos. A capacidade de estabelecer uma resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência ao se enfrentar patógenos do meio ambiente e lesões. Em algumas situações e doenças, a resposta inflamatória pode ser exagerada e sustentada sem benefício aparente e até mesmo com consequências adversas graves. Não importa qual é o estímulo inicial, os sintomas inflamatórios clássicos incluem: calor, dor, rubor e tumor. A resposta inflamatória é caracterizada mecanicamente por uma vasodilatação local transitória e aumento da permeabilidade capilar, infiltração de leucócitos e células fagocíticas e degeneração tecidual e fibrose (GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012).

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória em modelos *in vivo* têm sido utilizados modelos como edema de pata e edema de orelha, induzidos por agentes flogísticos (WILLOUGHBY, 2003). O modelo de edema de orelha se mostra extremamente útil na

avaliação da atividade anti-inflamatória tópica por ser uma metodologia prática e rápida que requer uma amostra pequena, boa reprodutibilidade, fornecendo resultados rápidos e com elevado grau de confiança (GÁBOR, 2003).

O óleo de cróton é um potente agente flogístico e promotor de tumor capaz de induzir uma resposta inflamatória e hiperproliferativa de maneira intensa, assemelhando-se com algumas doenças cutâneas (GÁBOR, 2000; GÁBOR, 2003). Este óleo, obtido da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae), permite identificar substâncias capazes de inibir a biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos (GÁBOR, 2000). A aplicação tópica do óleo de cróton gera resposta inflamatória aguda com vasodilatação, infiltração de leucócitos e edema (SARAIVA et al., 2011).

A indução do edema de orelha pelo fenol é um modelo animal que mimetiza a dermatite de contato, produzindo irritação imediata (LIM; PARK; KIM, 2004). Diversos mecanismos estão associados à inflamação causada pelo fenol devido, principalmente, a sua ação sobre os queratinócitos. Esta ação induz a liberação de mediadores pró-inflamatórios como a IL-1 $\alpha$  (interleucina 1 alfa), espécies reativas de oxigênio (ERO) e metabólitos do AA (ácido araquidônico) (WILMER et al., 1994; MURRAY, 2006).

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é um alcaloide encontrado na pimenta vermelha e, quando aplicada topicamente, induz a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios responsáveis por efeitos irritantes e pungentes na pele. Essa substância induz resposta inflamatória neurogênica com propagação de estímulos dolorosos, assim como vasodilatação reflexa, extravasamento de plasma e sensibilização nociceptiva (HOLZER, 1991).

O ácido araquidônico, bem como seus metabólitos, está envolvido na patogênese de várias doenças inflamatórias da pele, como verificada na dermatite atópica e psoríase (GÁBOR, 2000). É um ácido graxo que serve de substrato das enzimas ciclo-oxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX), que produzem mediadores da inflamação como prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT). Esses produtos são responsáveis pela promoção e formação do edema, vasodilatação e migração leucocitária. Nesse modelo, é possível identificar substâncias que inibem as vias de seu metabolismo, impedindo a formação dos mediadores inflamatórios (HUMES; OPAS; BONNEY, 1986).

Após aplicação dos agentes flogísticos citados, a migração leucocitária constitui um importante evento que está relacionado à expressão de moléculas de superfície (selectinas, ICAM-moléculas de adesão intercelular e integrinas) nas células endoteliais facilitando a passagem de leucócitos para o meio intersticial. Neste meio, as células leucocitárias liberam

agentes quimiotáticos, como a IL-8, PAF, C5a, LTB<sub>4</sub> e várias quimiocinas, que promovem o recrutamento de mais leucócitos para os espaços intersticiais (MULLER, 2013; NOURSHARGH; ALON, 2014). Nesses espaços, os polimorfonucleares (neutrófilos) liberam substâncias, tais como ROS, mediadores pró-inflamatórios e enzimas proteolíticas (mieloperoxidase), que caracterizam a inflamação aguda (KLEBANOFF, 2005). Os mononucleares produzem a enzima N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG) que mantém o processo inflamatório durante a fase tardia da inflamação (LEONI; DEAN, 1983).

A enzima mieloperoxidase (MPO) é encontrada principalmente em leucócitos polimorfonucleares, estando presente em grande quantidade nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. É considerada como uma importante enzima pró-oxidante e microbicida, liberada e ativada durante o processo de fagocitose dos neutrófilos, cuja atividade é essencial para uma efetiva resposta imune inata, funcionando como mecanismo de defesa contra micro-organismos patogênicos, além de apresentar participação em diversos processos fisiológicos e deletérios (KLEBANOFF, 2005). O produto primário da ação da MPO, o ácido hipocloroso, gerado a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e íons cloro, é considerado um oxidante altamente tóxico, levando à formação de produtos secundários com amplas ações biológicas em eventos como apoptose. Acredita-se que esse sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sub>2</sub> seja a principal ferramenta utilizada pelos neutrófilos para destruir os micro-organismos, além de estar envolvido na citotoxicidade do dano tecidual gerado em locais inflamados. Este dano tecidual pode aumentar caso a enzima MPO se internalize nas células endoteliais, havendo produção de oxidantes intracelulares (ARATANI, et al., 1999; GUILPAIN, et al., 2008, SILVA, 2009). Além disso, existem fortes evidências que alguns produtos gerados a partir de reações catalisadas por MPO tenham papel na sinalização celular. Dentre estes produtos, chama atenção o oxigênio singlete. Em fagócitos, esta espécie reativa de oxigênio pode participar tanto do processo de morte de patógenos, quanto da sinalização de eventos da inflamação (CAMPA, 2009; PEREIRA et al., 2000). Desse modo, a MPO vem sendo freqüentemente associada a diversas situações patológicas, principalmente naquelas que existe um processo inflamatório mediado por neutrófilos (BRADLEY et al., 1982), podendo ser usada como um indicio de infiltração de neutrófilos nos tecidos (KRAWISZ et al., 1984).

A N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG) é uma enzima lisossomal produzida por monócitos ativados, principalmente os macrófagos, estando relacionada à fase inflamatória tardia, sendo sua atividade considerada um indicador da presença de células mononucleares no foco inflamatório (BAILEY, 1988; APPLETON et al., 1993; BARCELOS et al., 2004). Uma vez ativados, os macrófagos sofrem degranulação, liberando inúmeros mediadores inflamatórios, como as aminas bioativas (histamina e serotonina), citocinas, quimiocinas, além

de mediadores lipídicos (LAWRENCE; GILROY, 2007). Esses mediadores promoverão o recrutamento e a ativação de outras células inflamatórias, dando sustentação ao processo, o qual é reduzido a partir da inibição da migração das células mononucleares, principalmente em um processo inflamatório crônico (BAILEY, 1988). Portanto, ao inibir a migração dessas células, o extrato pode contribuir para o alívio de sintomas desencadeados pelas células inflamatórias e mediadores, um mecanismo bastante importante na resolução de doenças inflamatórias crônicas.

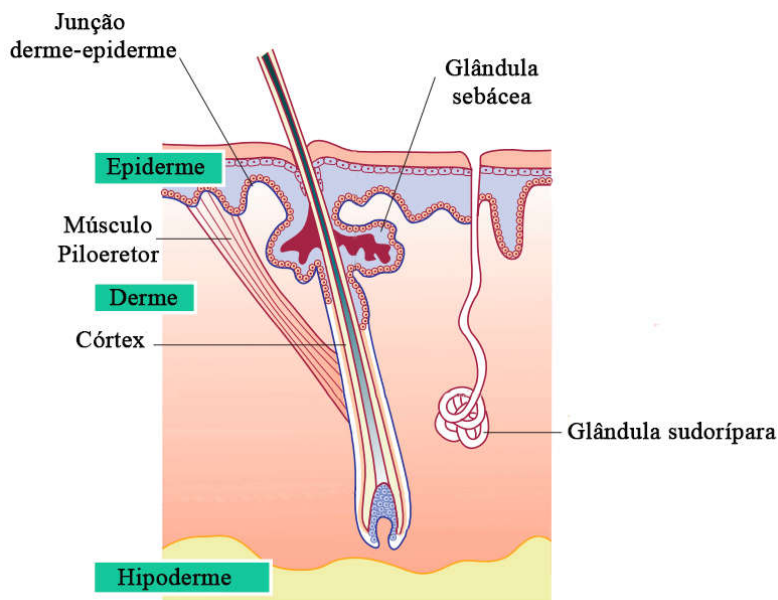
Diversas plantas já têm seu uso consolidado na Medicina Tradicional no tratamento de infecções e controle da inflamação da pele. Como exemplo, podemos citar o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), arnica (*Arnica montana* e *Lynchnophora passerina*), bardana (*Arctium minus*) e sucupira (*Pterodon emarginatus*) (ABRÃO, 2010; CAPELARI-OLIVEIRA et al., 2011). No Brasil, várias espécies também têm apresentado potencial anti-inflamatório, como *Bouchea fluminensis* (COSTA et al., 2003), *Gochnatia polymorpha* (MOREIRA et al., 2000), *Hyptis pectinata* (BISPO et al., 2001), *Sida cordifolia* (FRANZOTTI et al., 2000), *Vernonia polyanthes* (TEMPONI et al., 2012) e *Bryophyllum pinnatum* (CHIBLI et al., 2014).

Observa-se que as principais classes de metabólitos especiais que atuam sobre a inflamação são produzidas a partir da via do chiquimato, podendo também serem oriundos da via mista acetato-chiquimato, como flavonoides, fenóis simples, ácidos fenilcarboxílicos, derivados fenilpropanoídicos, taninos e cumarinas, terpenos, saponinas, esteroides, lignanas e alcaloides (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

## 2.7 CICATRIZAÇÃO

A pele dos mamíferos é um órgão complexo, com tecidos de várias naturezas, dispostos e inter-relacionados para exercer suas distintas funções (SAMPAIO; RIVITI, 2001). Este órgão apresenta diversas camadas com propriedades particulares, sendo as principais: a epiderme, camada mais superficial; a derme, camada intermediária e a camada mais profunda, hipoderme, como disposto na Figura 5 (CHUONG et al., 2002).

Figura 5 - Estrutura simplificada da pele.



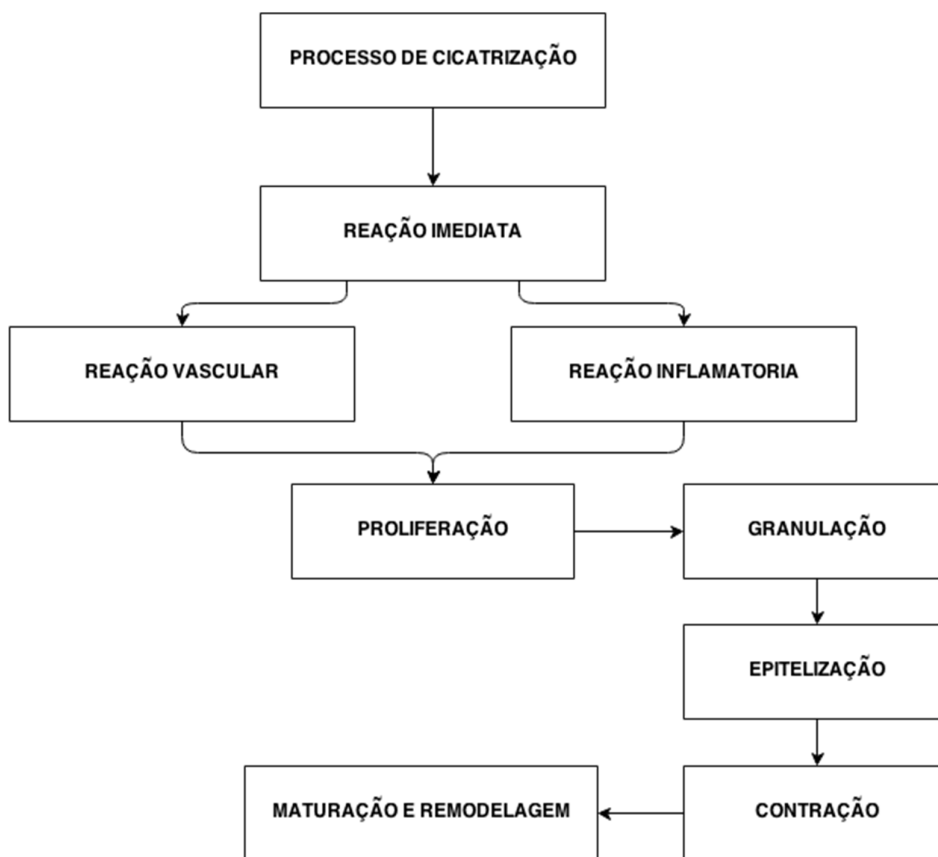
Fonte: Adaptado de Mcgrath, Eady e Pope (2008).

O tecido epitelial possui funções sensoriais, metabólicas, termorreguladoras, proteção contra radiação ultravioleta, reservatório para eletrólitos, água, lipídios, carboidratos e proteínas, além de excretar substâncias por meio das glândulas sudoríparas, protegendo o corpo contra meios adversos, criando uma barreira física contra traumas, invasão de bactérias, patógenos virais e outras substâncias estranhas. Quando essa barreira é rompida, é dado início ao processo de cicatrização. Este processo é o resultado de um conjunto de fenômenos celulares, moleculares, fisiológicos e bioquímicos, sucessivos e inter-relacionados que, através da quimiotaxia, neovascularização, proliferação, depósito e reorganização da matriz extracelular, levam à cicatrização da injúria (ALBUQUERQUE, 2005).

Como mostrado na Figura 6, alguns autores dividem o processo de cicatrização em três estágios principais: reação imediata, proliferação e maturação e remodelagem.



Figura 6 - Fluxograma do processo de cicatrização.



Fonte: Adaptado de Brasil, 2002.

#### a) Reação imediata

Também conhecida como fase inflamatória, é uma resposta inicial do organismo ao trauma, sendo essencial para a cura. É caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia de células a partir da circulação para a ferida e liberação local de citocinas e fatores de crescimento. Ocorre com uma reação vascular e inflamatória que conduz à remoção de restos celulares e de micro-organismos. Imediatamente após o trauma, ocorre a vasoconstrição que leva à contenção do sangramento. Este processo envolve a presença de plaquetas e coágulos de fibrina que ativam a cascata da coagulação, resultando na liberação de substâncias para formação da matriz extracelular provisória que constitui o suporte para a migração de células inflamatórias. Em seguida, ocorre a ativação dos mecanismos de proteção e preparação dos tecidos para o desenvolvimento da cicatrização. A inflamação leva às conhecidas manifestações clínicas de calor, dor, edema e perda da função, sinais que podem ser mínimos, transitórios ou duradouros. A infecção é um fator que pode intensificar e prolongar a inflamação (WITTE; BARBUL, 1997; BRASIL, 2002).

### **b) Proliferação**

A proliferação ocorre após a reação inflamatória inicial e compreende os seguintes estágios: granulação, epitelização e contração. A granulação é a formação de um tecido novo, composto de novos capilares (angiogênese), da proliferação e da migração dos fibroblastos responsáveis pela síntese de colágeno. Com a produção do colágeno, ocorre um aumento da força da úlcera, denominada força de tração, caracterizada como a habilidade da úlcera resistir às forças externas e não se romper. Ao final desta fase, ocorre a epitelização que constitui a etapa que levará ao fechamento das superfícies da úlcera por meio da multiplicação das células epiteliais da borda, caracterizando-se pela redução da capilarização e do aumento do colágeno. Neste ponto, a contração reduz o tamanho das úlceras com a ação especializada dos fibroblastos (WITTE; BARBUL, 1997; BRASIL, 2002; MANDELBAUM; DI-SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

### **c) Maturação e remodelagem**

Maturação e remodelagem é a terceira etapa do processo de cicatrização. Trata-se de um processo lento que se inicia com a formação do tecido de granulação e da reorganização das fibras de colágeno proliferado, podendo se estender por meses após a re-epitelização. É responsável pelo aumento da força de tração. Durante a remodelagem ocorre a diminuição da atividade celular e do número de vasos sanguíneos, perda do núcleo dos fibroblastos, levando à maturação da cicatriz. Nesta fase, ocorre a reorganização do processo de reparação da lesão, com depósito de colágeno. Inicialmente, a cicatrização tem aspecto plano; posteriormente, enrijece-se e se eleva. Após um determinado tempo, a cicatriz se torna mais clara, menos rígida e mais plana, ocorrendo sua redução (WITTE; BARBUL, 1997; BRASIL, 2002; MANDELBAUM et al., 2003).

Distúrbios na cicatrização de feridas representam um sério problema clínico e tendem a cada vez mais aumentar, uma vez que estão associados com doenças como diabetes, hipertensão e obesidade.

Diversas plantas já tiveram seu potencial cicatrizante investigado e apresentaram resultados promissores como: *Calendula officinalis* (PARENTE et al., 2009), *Caesalpinia ferrea* (OLIVEIRA et al., 2010), *Mauritia flexuosa* (BATISTA et al., 2011), *Sideroxylon obtusifolium* (LEITE et al., 2015) dentre outras.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar e identificar substâncias bioativas e avaliar as atividades anti-inflamatória tópica e cicatrizante do extrato etanólico e de um creme dermatológico das folhas de *Palicourea rigida* Kunth com intuito de legitimar cientificamente o uso popular e contribuir com o desenvolvimento de políticas direcionadas ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar, isolar e identificar substâncias bioativas nas folhas de *Palicourea rigida* Kunth
- Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica do extrato etanólico das folhas de *Palicourea rigida* usando diferentes agentes flogísticos;
- Avaliar a atividade cicatrizante do extrato etanólico e de uma formulação fitofarmacêutica a partir das folhas de *Palicourea rigida* usando modelo animal;
- Realizar análises histopatológicas dos fragmentos de orelha de camundongos e do tecido cicatrizado da pele de ratos obtidos após procedimentos experimentais;
- Determinar as atividades das enzimas mieloperoxidase e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase de fragmentos de orelha e de tecidos cicatrizados da pele obtidos após procedimentos experimentais.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

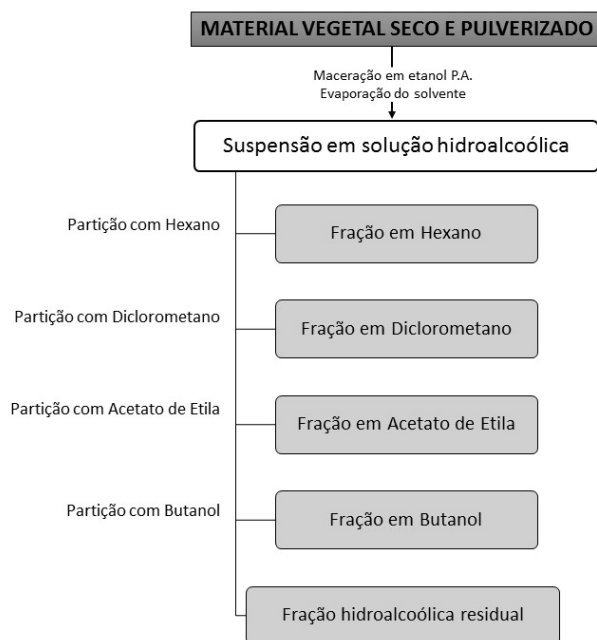
*Palicourea rigida* Kunth foi coletada em São João Del-Rei, Minas Gerais, em maio de 2012. A coleta e identificação foram realizadas pela Dra. Glauciemar Del-Vechio Vieira e uma exsicata (CESJ nº42677) está depositada no Herbário Professor Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Após coleta, as folhas foram submetidas à secagem em estufa sob ventilação forçada até a perda da umidade entre 90 a 96%. Posteriormente à desidratação, o material vegetal foi pulverizado em moinho com granulação definida (*tamis* nº18) para a preparação do extrato.

### 4.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à extração por maceração estática em etanol (P.A.), sob temperatura ambiente, seguida de rotaevaporação para remoção do solvente. O extrato etanólico de *Palicourea rigida* (EEPR) foi, então, colocado em dessecador contendo sílica gel dessecante para retirada da umidade. Parte do extrato etanólico seco sofreu partição líquido/líquido com solventes de polaridades crescentes para obtenção das frações hexânica, diclorometânica, em acetato de etila e butanólica (Figura 7) (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Figura 7 - Esquema de fracionamento líquido-líquido.



Fonte: O autor (2014)

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

#### 4.3.1 Análise de EEPR por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

Para a caracterização química, o extrato etanólico de *Palicourea rigida* foi analisado pela técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), sendo o cromatógrafo acoplado ao detector de ultravioleta (UV) e ao espectrômetro de massas (EM), sendo a análise realizada na plataforma analítica de Farmanguinhos (FIOCRUZ – Rio de Janeiro, Brasil), utilizando o cromatógrafo Nexera (Shimadzu®). Para a análise, foram injetados 2 µL da amostra sendo a fase móvel composta por água (A) e acetonitrila (B) em concentração de gradiente. A condição de eluição aplicada foi de 0-7 min 5-80% de B e de 7-10 min, 80-90% de B utilizando a coluna Shim-pack ODSII (75mm x 2mm x 2,2µm). Por se tratar de uma técnica hifenada, a CLUE-UV-EM alia o poder de separação das moléculas através da interação destas com a fase móvel e fase estacionária (coluna cromatográfica) com a detecção por ultravioleta e fragmentação de massas, permitindo a aquisição de dois perfis cromatográficos, sendo um oriundo da análise pelo detector de UV e outro do espectrômetro de massas, ambos gerando um espectro das substâncias. Estes dados foram analisados e comparados com os descritos na literatura.

#### 4.3.2 Análise da fração hexânica por CG-EM

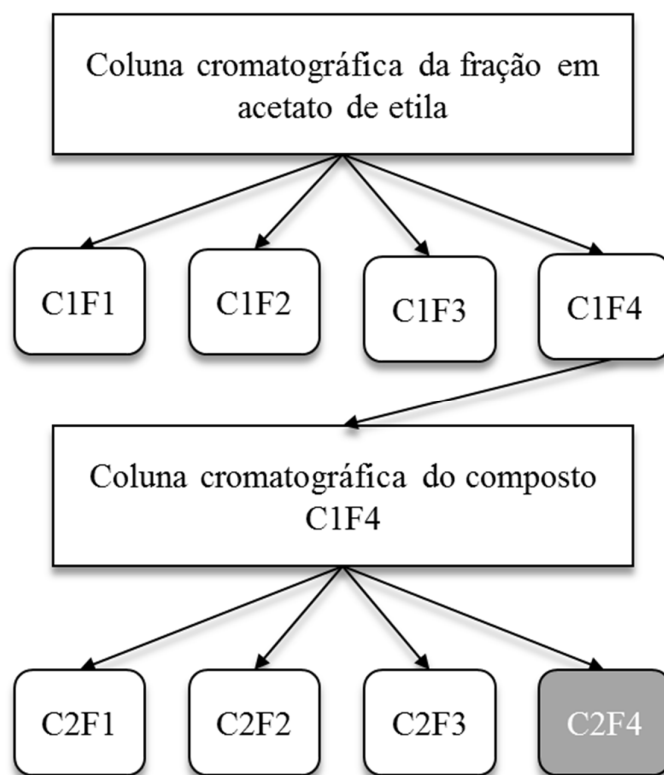
A fração hexânica foi submetida à análise por Cromatografia com Fase Gasosa (CG) acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). As análises foram realizadas na plataforma analítica da Farmanguinhos utilizando o cromatógrafo a gás Hewlett-Packard® 6890 acoplado ao espectrômetro HP® 5972 com banco de dados Wiley® 275. O cromatógrafo foi equipado com coluna capilar de sílica fundida (BD-5 MS, espessura do filme: 30 m x 250µm, 0,25 µm), a corrida teve 60 minutos de duração, sendo utilizado como gás carreador o gás hélio com fluxo de 8,2 mL/min, a temperatura mínima do forno foi de 70 °C e máxima de 350 °C. A detecção foi realizada pelo espectrômetro de massa (Hewlett-Packard® 5972), acoplado ao CG, com ionização eletrônica (IE) de 70 eV e fonte de íon a 280 °C.

#### 4.3.3 Isolamento de C2F4 da fração em acetato de etila

A investigação química da fração em acetato de etila, escolhida por apresentar maior quantidade de flavonoides (MORAES, 2013), se deu pela separação dos componentes da fração sendo empregada uma coluna cromatográfica de vidro com fase estacionária de Sephadex LH-20® e fase móvel metanol. As amostras foram coletadas a cada 5 mL e foram analisadas por

Cromatografia de Camada Delgada (CCD) composta por fase estacionária de sílica gel e fase móvel de diclorometano (85%) e metanol (15%). As substâncias eluídas nas placas cromatográficas foram visualizadas através do uso de reveladores como vanilina sulfúrica e NP-PEG e observadas na luz UV em 254 e 366 nm. Os solventes orgânicos (metanol e diclorometano), utilizados como eluentes nas cromatografias, apresentavam grau de pureza P.A. A coluna realizada com a fração em acetato de etila de *P. rigida* originou 4 frações, sendo a fração C1F4 submetida a uma nova coluna nas mesmas condições. A coluna cromatográfica da fração C1F4 gerou mais quatro frações como demonstra a Figura 8.

Figura 8 - Processo de fracionamento da partição em acetato de etila



Fonte: O autor (2015)

Para a prospecção das frações foi realizada análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Agilent®, 1200 series) com detector UV/DAD. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (25 cm x 4,6 mm x 5 µm). A eluição foi realizada em modo de gradiente de solventes, composta por A (água pH ajustado para 4,0 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e B (acetonitrila). As condições de eluição aplicadas: 0-20 min, 5-80% de B, e de 20-30 min, 80-95% de B. O volume da amostra foi de 20 µL a uma concentração de 1 mg/mL, a taxa de fluxo

de 1 mL/min e a temperatura foi preservada a 25 °C durante a análise. A detecção foi realizada simultaneamente a 210, 230, 254 e 330 nm e os espectros UV por varredura no UV (190 a 400 nm).

Para a elucidação estrutural da substância isolada (C<sub>2</sub>F<sub>4</sub>), foram utilizados os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C obtidos em espectrômetro Bruker DRX<sup>®</sup> operando a 300 MHz para <sup>1</sup>H e 75 MHz para <sup>13</sup>C. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm, tendo como referência interna o tetrametilsilano ( $\delta = 0,0$  ppm). Os solventes deuterados utilizados foram CDCl<sub>3</sub> e CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. Além dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, também foi realizada a análise de HSQC e da fragmentação de massas por infusão direta em modo positivo (70 eV) da substância isolada pelo espectrômetro Hewlett-Packard<sup>®</sup> 5973 MSD.

#### 4.4 PREPARO DA SUSPENSÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

Para o preparo da suspensão aquosa, proporções de 0,10, 0,25 e 0,50 (%) do extrato etanólico (EEPR) foram pesadas em balança analítica (SHIMADZU<sup>®</sup>, IP40), previamente calibrada, com o auxílio de um becker. Posteriormente, para permitir uma melhor solubilidade, foram adicionados 100 µL dimetilsulfóxido (DMSO) e 10 mL de água destilada. O becker foi levado ao ultrassom por 10 minutos, foi adicionado q.s.p. 30 mL de água destilada, sendo o volume aferido em balão volumétrico. As suspensões foram, então, acondicionadas em frascos de vidro âmbar devidamente rotuladas e mantidas sob refrigeração para realização dos estudos farmacológicos.

#### 4.5 PREPARO DO CREME DERMATOLÓGICO

O creme Lanette<sup>®</sup> é uma base para cremes utilizada em formulações cosméticas e farmacêuticas do tipo óleo/água (O/A). É uma cera auto-emulsionante de natureza aniônica, muito utilizada em farmácia magistral (ZANIN et al., 2001). As Tabelas 3 e 4 mostram a composição das fases aquosa e oleosa do creme Lanette<sup>®</sup>.

Tabela 3 - Composição da fase aquosa do creme.

<b>Insumo</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Estudo crítico da formulação</b>
<b>EDTA 0,1%</b>	0,5 g	Emulsificante
<b>Nipazol<sup>®</sup> 0,05%</b>	0,25 g	Conservante
<b>PEG 5%</b>	25 mL	Emulsificante
<b>Água destilada 68,65%</b>	343,25 mL	Veículo

Fonte: O autor (2015)

Tabela 4 - Composição da fase oleosa do creme.

<b>Insumo</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Estudo crítico da formulação</b>
<b>Lanette<sup>®</sup> 20%</b>	100g	Fase Oleosa
<b>Vaselina líquida 6%</b>	30 mL	Emulsificante
<b>BHT 0,05%</b>	0,25 g	Antioxidante
<b>Nipagin<sup>®</sup> 0,15%</b>	0,75 g	Conservante

Fonte: O autor (2015)

Inicialmente, para o preparo do creme base, os componentes sólidos (fase oleosa e aquosa) da fórmula foram pesados em papel manteiga, usando em balança analítica (SCHIMADZU<sup>®</sup>, IP40). Em seguida, os componentes líquidos foram medidos com auxílio de uma proveta graduada e adicionados em béqueres individuais.

A fase aquosa da emulsão foi preparada após solubilização de 0,75g de Nipazol<sup>®</sup> e 0,5g de EDTA em 25 mL de propilenoglicol. Em seguida, foi adicionada água destilada e a mistura foi vertida para uma caneca de aço inox, sendo submetida ao banho maria em temperatura máxima de 75°C.

No preparo da fase oleosa, foi utilizado um gral de porcelana, onde 0,75g de Nipagin<sup>®</sup> e 0,25g de BHT foram adicionados em 30 mL de vaselina e, posteriormente, acrescentado 100g de creme. A fase oleosa foi transferida para outra caneca de aço inox e submetida ao aquecimento até 75°C. A mistura, então, foi mantida sob constante agitação manual com auxílio de um bastão de vidro.

Após o preparo das duas fases separadamente, verteu-se vagarosamente a fase aquosa sobre a fase oleosa, fazendo agitação manual constante por um minuto. Em seguida, foi levada a um misturador do tipo *mixer* por um período de 15 minutos para completa homogeneização. Após a homogeneização, o creme base foi devidamente armazenado e rotulado em recipientes



plásticos para, posterior, incorporação do extrato (PRISTA; ALVES; MORGATO, 1990; THOMPSON, 2006; BARZOTTO et al., 2009).

O creme contendo EEPR foi preparado a partir de 3 concentrações 0,10, 0,25 e 0,50%, sendo, previamente, solubilizado com propilenoglicol. Em seguida, o creme base foi adicionado em quantidades suficientes para 50 g, misturando até completa homogeneização. Dessa forma, o creme de EEPR (cEEPR) foi preparado com as devidas concentrações, sendo acondicionado em recipientes e mantido sob refrigeração.

#### 4.6 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Nesta etapa do estudo, foram realizados procedimentos experimentais em animais para avaliação das atividades anti-inflamatória tópica e cicatrizante através da aplicação do extrato etanólico de *P. rigida* e do creme dermatológico.

##### 4.6.1 Animais

Para realização dos testes de atividade anti-inflamatória tópica, foram utilizados camundongos Swiss (25-30g), machos, entre 30 a 45 dias de idade, enquanto ratos Wistar (200-240g), machos, com 45 a 60 dias de idade, foram usados nos ensaios de atividade cicatrizante. Os animais foram provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF e foram mantidos em gaiolas de polipropileno (30x20x13 cm ou 49x34x16 cm) com ração e água *ad libitum* sob temperatura ambiente ( $25\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo controlado em ciclos de 12 horas claro/escuro. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) desta instituição (protocolo n°47/2012).

##### 4.6.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica

A atividade anti-inflamatória tópica de EEPR foi investigada pelo método de indução aguda do edema de orelha por diferentes agentes flogísticos. O edema foi expresso pela diferença da espessura (mm) das orelhas dos camundongos e pela diferença da massa entre discos de 6 mm extraídos das orelhas dos animais após eutanásia.

Os agentes flogísticos (Sigma-Aldrich®), extrato etanólico da *P. rigida*, dexametasona (Sigma-Aldrich®) e indometacina (Sigma-Aldrich®) foram dissolvidos em um volume de 20 µL de acetona (Synth®) e, posteriormente, foram aplicados na face interna da orelha direita de cada camundongo. Na orelha esquerda, foi aplicado 20 µL de acetona (veículo). Em cada ensaio, os animais foram divididos em 5 grupos, cada um com oito indivíduos (n=8), sendo os

grupos: controle negativo (sem tratamento), controle positivo (dexametasona ou indometacina) e os grupos experimentais extrato etanólico nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%/orelha.

Após a indução do processo inflamatório e aplicação dos tratamentos, os animais foram submetidos à anestesia geral por injeção intraperitoneal de cetamina/xilazina na concentração de cetamina 10% (75mg/kg) e xilazina 2% (10mg/kg), e eutanasiados por aprofundamento da anestesia seguida de deslocamento cervical. A espessura da orelha foi medida próxima à extremidade medial da orelha com o auxílio de um micrômetro externo digital (DIGIMESS®). O aumento da espessura da orelha foi obtido pela diferença entre a orelha direita (sob indução da inflamação) e a orelha esquerda (estado basal). Posteriormente, com o auxílio de um *punch* (Richter®) de 6 mm de diâmetro, foram extraídos da região medial de ambas as orelhas discos e pesados em balança analítica (SCHIMADZU®, IP40) para determinação da diferença entre a massa da orelha direita e esquerda. Amostras das orelhas foram conservadas em formol 10% e submetidas à análise histológica.

#### *4.6.2.1 Edema de orelha induzido por óleo de Cróton*

A atividade anti-inflamatória tópica de EEPR foi avaliada usando o método de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton conforme procedimento descrito por Schiantarelli e colaboradores (1982).

Para a avaliação da atividade do extrato neste modelo experimental, o edema de orelha foi induzido através da aplicação tópica, na face interna da orelha direita dos camundongos, 20 µL de solução de óleo de cróton 2,5% (v/v) dissolvido em acetona. Após 15 minutos, foram administrados os tratamentos com as amostras (EEPR nas três concentrações solubilizado em 20 µL de acetona), dexametasona (0,1 mg em 20 µL de acetona/orelha) e acetona (20 µL/orelha esquerda). Seis horas após o desafio com o agente flogístico, os animais foram submetidos à eutanásia e o edema foi avaliado quanto ao aumento da espessura (mm) e da massa (mg) da orelha.

#### *4.6.2.2 Edema de orelha induzido por fenol*

Como descrito por Lim; Park; Kim (2004), uma solução de 10% (v/v) de fenol em acetona (20 µL/orelha) foi aplicada na face interna da orelha direita de camundongos. Em seguida, foram administrados o extrato (0,10; 0,25 e 0,50 % em 20 µL de acetona/orelha), a dexametasona (0,1 mg em 20 µL de acetona/orelha) e a acetona (20 µL/orelha). Duas horas após a aplicação do agente flogístico, os animais foram eutanasiados e o aumento da espessura (mm) e da massa (mg) das orelhas foram avaliados.

#### 4.6.2.3 Edema de orelha induzido por capsaicina

Neste ensaio, objetivou-se avaliar a atividade anti-inflamatória tópica do extrato frente à indução do edema por capsaicina como descrito por Gábor e Rázga (1992). Singularmente, neste ensaio, o agente flogístico é aplicado posteriormente à administração dos tratamentos. Trinta minutos após a tratamento com EEPR (concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50 % em 20 µL de acetona/orelha), da dexametasona (0,1 mg em 20 µL de acetona/orelha) e da acetona (20 µL/orelha), procedeu-se a aplicação do agente flogístico, capsaicina (200 µg em 20µL de acetona/orelha). Após 30 minutos da indução do processo inflamatório com capsaicina (uma hora após a aplicação do tratamento), os animais foram eutanasiados e o aumento da espessura (µm) e da massa (mg) das orelhas foram avaliados.

#### 4.6.2.4 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de Ácido Araquidônico

A atividade anti-inflamatória tópica de EEPR foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por ácido araquidônico (GÁBOR, 2003). O AA (2 mg/20 µL) foi administrado topicamente na orelha direita dos camundongos. Em seguida, foram aplicados EEPR (0,1; 0,25 e 0,50 % em 20 µL de acetona/orelha), indometacina (2 mg em 20 µL de acetona/orelha) e acetona (20 µL/orelha). O edema foi avaliado 1 h após o desafio com o agente flogístico. Os animais foram eutanasiados e o aumento da espessura (mm) e da massa (mg) das orelhas foram avaliados (YOUNG et al., 1984; CRUMMEY et al., 1987).

### 4.6.3 Avaliação da atividade cicatrizante

A modelo de lesão e cicatrização cutânea em animais foi descrito previamente por Muscará e colaboradores (2000). Com este modelo é possível avaliar a capacidade anti-inflamatória e cicatrizante de diferentes tratamentos. Após anestesia com xilazina (10mg/Kg) e cetamina (70mg/Kg), por via intraperitoneal, os reflexos foram checados e, após constatar estado de anestesia profunda, o procedimento foi iniciado (PACHALY, 2006).

Os animais foram posicionados em decúbito ventral, imobilizados em prancha com contenção dos membros por tensores elásticos. Com auxílio de tesoura e lâmina, foi realizada a tricotomia por tração manual de uma área de 5 mm<sup>2</sup> na região dorsocostal. A incisão para a remoção da camada de pele foi realizada com um *punch* de aço inoxidável (Ricther®) de 6 mm de diâmetro até a exposição da fáscia muscular dorsal, removendo assim a pele. A hemostasia foi realizada com gaze através da compressão digital (AMORIM et al., 2006; GARROS et al., 2006). Após remoção da pele, os animais foram tratados com analgésico opióide (morfina, 2,5mg/kg, via SC, a cada 4 horas por 5 dias) para evitar sofrimento doloroso. Em seguida, os

animais foram acondicionados novamente em gaiolas individuais, identificadas de acordo com seu subgrupo e monitorados até retornarem do estado anestésico. No dia seguinte, iniciou-se o tratamento através da aplicação tópica do extrato e do creme dermatológico.

Para a análise morfométrica, as lesões foram medidas nos dias 0, 4, 7 e 14, e fotografadas no primeiro e último dia de tratamento utilizando-se de uma câmera digital. A área foi calculada pela fórmula ( $A = \pi \times R \times r/2$ ), onde R representa o eixo crânio-caudal e o r corresponde ao eixo látero-lateral da lesão (RIELLA et al., 2012). O grau de contração da área (GC) da lesão foi calculado por meio da fórmula demonstrada por Oliveira e colaboradores (2000):

$$GC = \frac{\text{Área } T^{\circ} - \text{Área } T^{\text{dia medição}} \times 100}{\text{Área } T^{\circ}}$$

Onde:  $T^{\circ}$  = dia zero

$T^{\text{dia medição}}$  = dias 4, 7 ou 14.

Após eutanásia, as lesões foram excisadas com 1 cm de pele íntegra, em torno da lesão, em profundidade até a fáscia muscular. Cada material foi identificado individualmente e uma amostra de cada subgrupo foi colocada em solução de formol a 10% e submetidas à análise histopatológica (GARROS et al., 2006; AMORIM et al., 2006). As demais foram empregadas para quantificação das atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG).

#### 4.6.3.1 Aplicação do tratamento

Os animais foram distribuídos e identificados aleatoriamente em 5 grupos: controle negativo (sem tratamento), controle positivo e três grupos experimentais. Cada grupo recebeu diariamente um tratamento previamente estabelecido (Quadro 1). Os grupos foram divididos em dois subgrupos, de acordo com o período da eutanásia (7 dias e 14 dias), com 6 animais em cada subgrupo.

Após a contenção manual do animal, 200  $\mu$ L de EEPR ou 200 mg de cEEPR foram aplicadas sobre as lesões. O grupo controle negativo recebeu 200  $\mu$ L de solução salina a 0,9% (EEPR) ou 200 mg do creme base Lanette<sup>®</sup>. O grupo controle positivo de EEPR foi tratado com Dersani<sup>®</sup> (loção a base de ácidos graxos essenciais, com vitaminas A e E), enquanto o grupo controle positivo de cEEPR recebeu 200 mg de dexametasona creme 1 mg/g, genérico Germed. Os grupos experimentais foram tratados com concentração de 0,10, 0,25 e 0,50% (EEPR e cEEPR) (OKAMOTO, 2010). O Quadro 1 mostra o esquema de tratamento dos animais.

Durante a realização dos procedimentos, os animais foram examinados diariamente quanto ao seu aspecto geral, avaliando a aparência macroscópica das lesões, presença ou ausência de crosta, exsudato ou hemorragias. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados pelo aprofundamento da anestesia por via intraperitoneal. As lesões foram avaliadas com o auxílio de uma lupa para verificação de crostas, secreções, cicatriz hipertrófica e verificação da ferida tecidual, no maior e menor eixo, medidos com micrômetro externo digital (DIGIMES®) conforme protocolos previamente descritos por Lopes e colaboradores (2005) e Garros e colaboradores (2006).

Quadro 1 - Divisão dos grupos experimentais

<b>GRUPO</b>	<b>TRATAMENTO</b>	
<b>Controle negativo</b>	Soro fisiológico (NaCl 0,9%)	Creme base Lanette
<b>Controle positivo</b>	Dersani®	Dexametasona
<b>Grupo 01</b>	Extrato 0,10 %	Creme com 0,10 % EEPR
<b>Grupo 02</b>	Extrato 0,25 %	Creme com 0,25 % EEPR
<b>Grupo 03</b>	Extrato 0,50 %	Creme com 0,50 % EEPR

Fonte: O autor (2015)

#### 4.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As amostras de tecido obtidas nas avaliações das atividades anti-inflamatória tópica e cicatrizante foram conservadas em formol 10% conforme descrito anteriormente. Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de

álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) por um período de 16 horas seguida de conservação em álcool 70% até início do processo de desidratação. Os materiais histológicos foram posteriormente desidratados, emblocados em parafina, seccionados em cortes de 5 µm em um micrótomo e corados com hematoxilina e eosina. O edema foi avaliado quanto à infiltração de leucócitos, vasodilatação, espessura da epiderme e derme em áreas representativas com aumento de 10x e 20x. Nesses mesmos aumentos, foram realizadas fotografias dos cortes histológicos com câmera fotográfica acoplada ao microscópio (Olympus® BX41) utilizando o *software* Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics).

## 4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MIELOPEROXIDASE E N-ACETIL-β-D-GLICOSAMINIDASE

### 4.8.1 Obtenção do sobrenadante

Os fragmentos obtidos das orelhas dos camundongos e das lesões excisadas da região dorsocostal dos ratos foram usados para preparar o homogenato e obter o sobrenadante para realização da medida das atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG). Para isto, os fragmentos e os tecidos cicatrizados foram triturados por 30 segundos em gral de porcelana. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão fosfato de sódio 80mM, pH 5,4, contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTBA). O homogenato foi transferido para tubos de ensaio e adicionado mais 1 mL de tampão fosfato de sódio. As amostras (2 mL) permaneceram em banho de gelo a 4°C e ultrassom por 10 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas a 3.000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e utilizado na dosagem de proteínas totais e ensaios para avaliação das atividades das enzimas MPO e NAG (DE YOUNG et al., 1989; SANCHEZ; MORENO, 1999).

### 4.8.2 Dosagem de proteínas totais

O método utilizado para dosagem de proteínas foi descrito inicialmente por Lowry e colaboradores (1951) e posteriormente modificado por Sargent (1987). O ensaio foi realizado em triplicata, pipetando 20 µL do sobrenadante, obtido do homogenato através da trituração dos tecidos dos animais. Foram adicionados 380 µL de água destilada, 2 mL da mistura reativa (composta por 120 mL de solução alcalina que foi produzida a partir de 1 g de NaOH mais 5 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 250 mL de água), 2 mL de tartarato de cobre e 2 mL de sulfato de cobre. Após 10 minutos, foram acrescentados 200 µL de solução Folin (1:5), aguardando trinta minutos para

realização da leitura em espectrofotômetro UV 1800 (Shimadzu®) no comprimento de onda 660 nm, zerando o branco com água destilada.

#### **4.8.3 Ensaio da atividade enzimática da mieloperoxidase**

Para a avaliação da atividade de MPO, foi utilizada a metodologia de Bradley e outros (1982) modificada por De Young e colaboradores (1989). Triplicatas de 25 µL de cada sobrenadante, obtido do homogenato descrito no item 4.8.1, foram colocadas em uma placa de 96 poços, adicionando 25 µL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM em 3 mL de DMSO, 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,003% v/v diluído em tampão fosfato de sódio 0,08 M (pH 5,4) para promover o início da reação. Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos, adicionando 100 µL de ácido sulfúrico 4M a 4°C em cada poço para interromper a reação. A atividade da enzima foi determinada colorimetricamente usando o leitor de placas Thermoplate TR-Reader® cuja leitura de absorbância foi realizada em 450 nm, sendo expressa em densidade óptica/mg de proteínas (dO/mg de proteínas).

#### **4.8.4 Ensaio da atividade enzimática da N-acetil-β-D-glicosaminidase**

A atividade da enzima N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) é utilizada como indicativo da presença de leucócitos mononucleares em tecido após 24 horas de indução de processo inflamatório. Esta atividade foi avaliada utilizando a metodologia de Sanchez e Moreno (1999). Triplicatas de 100 µL do sobrenadante, obtido do homogenato descrito no item 4.8.1, foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 100 µL de TMB 2,24mM em tampão citrato/fosfato de sódio 0,1M, pH 4,5 para desencadear o início da reação. Em seguida, a placa foi incubada a 37°C por 10 minutos e a reação interrompida pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2 M pH 10,6 em cada poço. A atividade de NAG foi determinada colorimetricamente usando o leitor de placas Thermoplate TR-Reader®, cuja leitura da absorbância foi realizada em 405 nm, sendo expressa em densidade óptica/mg de proteínas (dO/mg de proteínas).

### **4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão médio (EPM). Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman-Keuls foi utilizada para medir o grau de significância ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$ ).

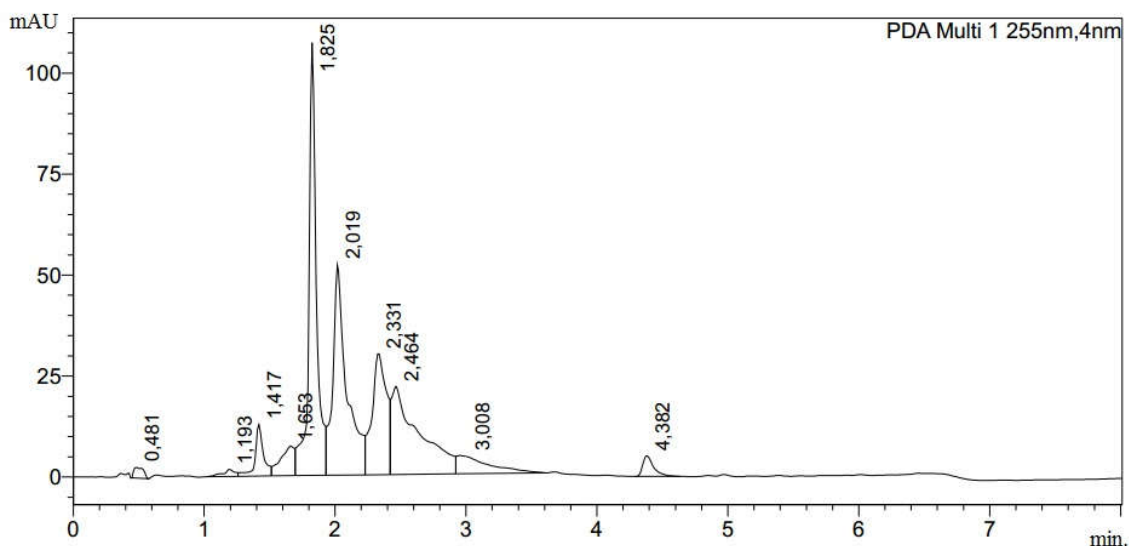
## 5. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

#### 5.1.2 Caracterização química por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detector de ultravioleta e espectrofotômetro de massas

O extrato etanólico de *P. rigida* foi analisado através da técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao detector de Ultravioleta e Espectrômetro de Massas (CLUE-UV-EM). Após análise com detector de ultravioleta em 255 nm, foi possível obter o perfil cromatográfico mostrado na Figura 9 e a análise por espectrometria de massas produziu o cromatograma apresentado na Figura 10. Pode-se observar um maior número de picos no cromatograma proveniente a partir do detector usando espectrômetro de massas do que aquele obtido pelo ultravioleta. O UV tem como alvo de identificação as substâncias que apresentam grupos cromóforos, enquanto o detector massas possui uma ampla gama de identificação de constituintes em uma amostra.

Figura 9 - Perfil cromatográfico de EEPR por UPLC-UV-EM.

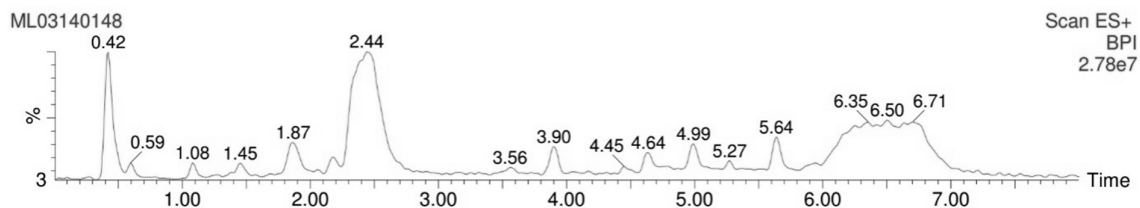


Cromatograma gerado pelo detector de ultravioleta.

Fonte: O autor (2015)



Figura 10 - Perfil cromatográfico de EEPR por CLUE-UV-EM.



Cromatograma gerado pelo espectrofotômetro de massas.

Fonte: O autor (2015)

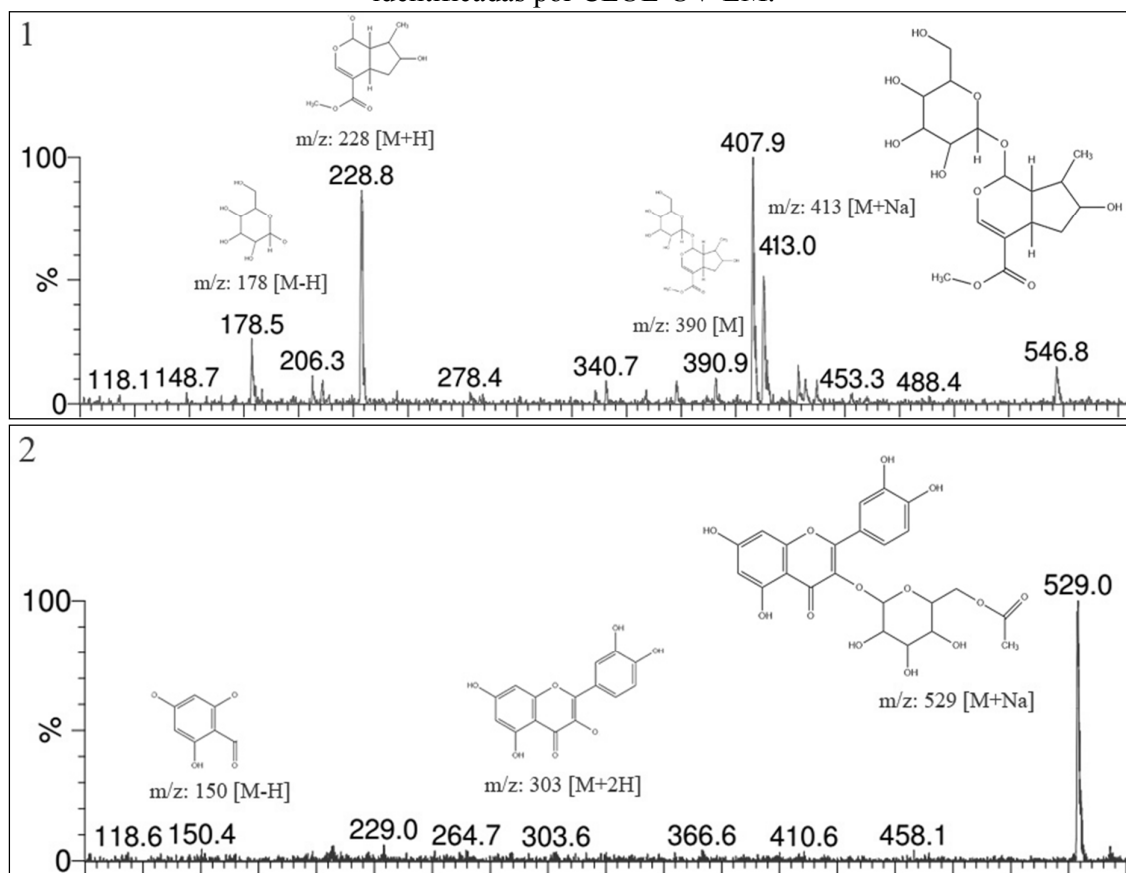
A fragmentação produzida pela ionização fornece o *fingerprinting* da substância e através do padrão da sua estrutura é possível identificar os fragmentos. Pela comparação do perfil de fragmentação da amostra com a literatura é possível sugerir que os picos em 1,87 e 2,44 min correspondem às substâncias de loganina e quercetina 3-(6-*O*-acetil- $\beta$ -glicosídeo), respectivamente, descritas na Tabela 5. Nesta Tabela, também é apresentado o nome das substâncias com o tempo de retenção (Tr), a massa molecular, fórmula molecular, área e os principais íons fragmentados. Os espectros de massas juntamente com os prováveis fragmentos das substâncias identificadas são dispostos na Figura 11.

Tabela 5 – Características químicas das substâncias identificadas por CLUE-UV-MS

Fonte: O autor (2015)

Nº	Substância	Tr (min)	Massa Molecular g/mol	Fórmula Molecular	Área %	Íons Fragmentados	Referência
1	Loganina	1,87	390,98	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	26,89	407,9, 413 e 414	HORAI et al., 2010; XUE et al., 2014.
2	Quercetina 3-(6- <i>O</i> -acetil- $\beta$ -glicosídeo)	2,44	506,10	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>	19,54	229,0, 303,6 e 529,09	HORAI et al., 2010; SLIMESTAD, HOSTETTMANN, 1996.

Figura 11 – Espectros de massas e representação da fragmentação das substâncias identificadas por CLUE-UV-EM.



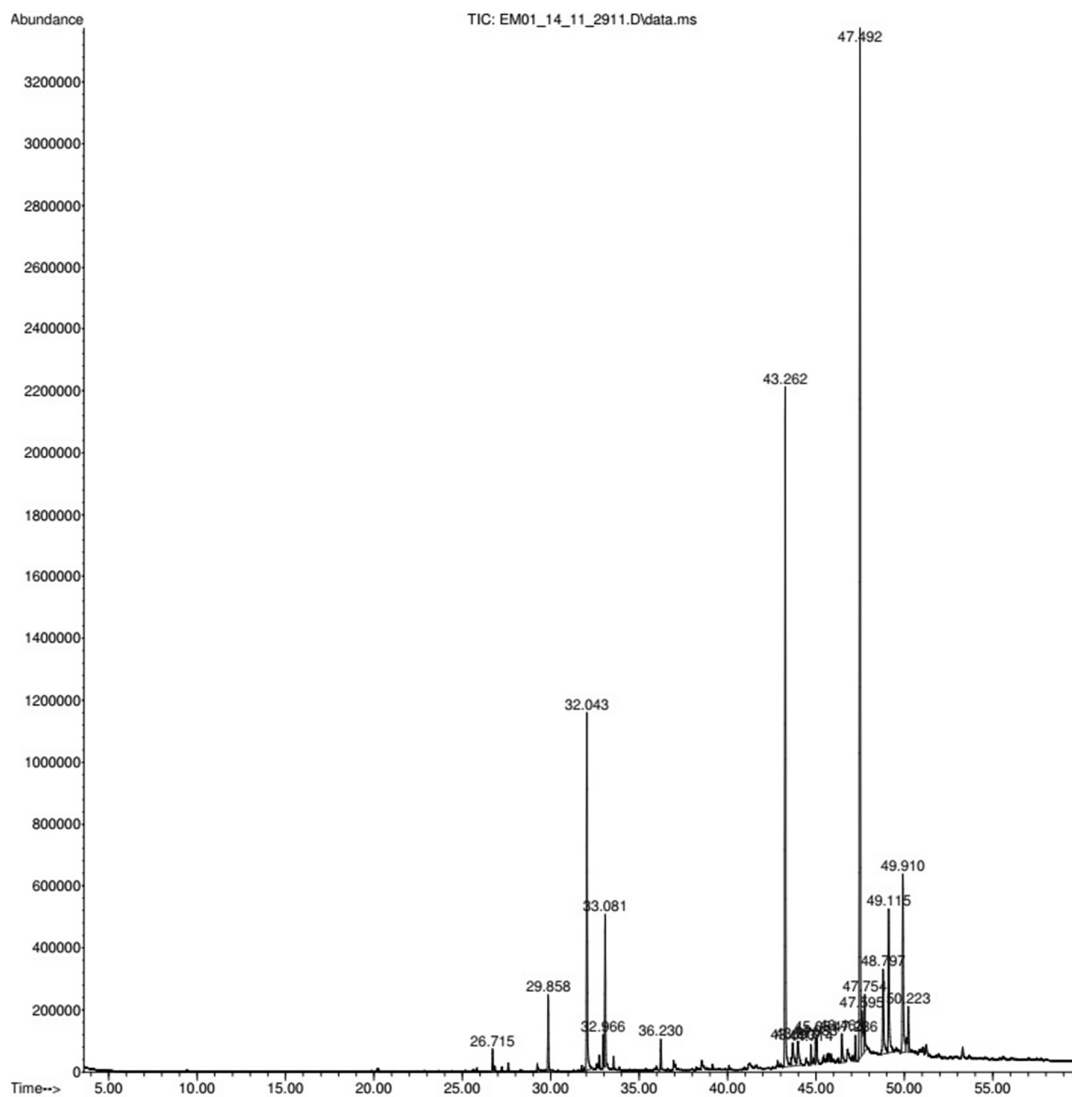
Fonte: O autor (2015)

### 5.2.3 Perfil cromatográfico e caracterização química por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

A fração hexânica, obtida a partir do extrato etanólico da *P. rigida*, foi submetida análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM), adquirindo o perfil cromatográfico representado na Figura 12. Os 9 picos, com área maior que 1%, foram analisados pelo padrão de fragmentação e comparados com o banco de dados da biblioteca do equipamento e com a literatura, sendo possível identificar substâncias com padrão de fragmentação similar a das seguintes substâncias: ácido palmítico, fitol, ácido linoleico, esqualeno, gama tocoferol, vitamina E, campesterol, estigmasterol e gama sitoesterol. A Tabela 6 apresenta estas substâncias seguidas das informações do tempo de retenção (Tr), massa molecular (g/mol), fórmula molecular, área no cromatograma (%) e os principais íons

fragmentados. As Figuras 13 e 14 apresentam o perfil de fragmentação e a estrutura química das substâncias identificadas.

Figura 12 - Perfil cromatográfico da fração hexânica das folhas de *P. rigida* obtido por CG-EM.



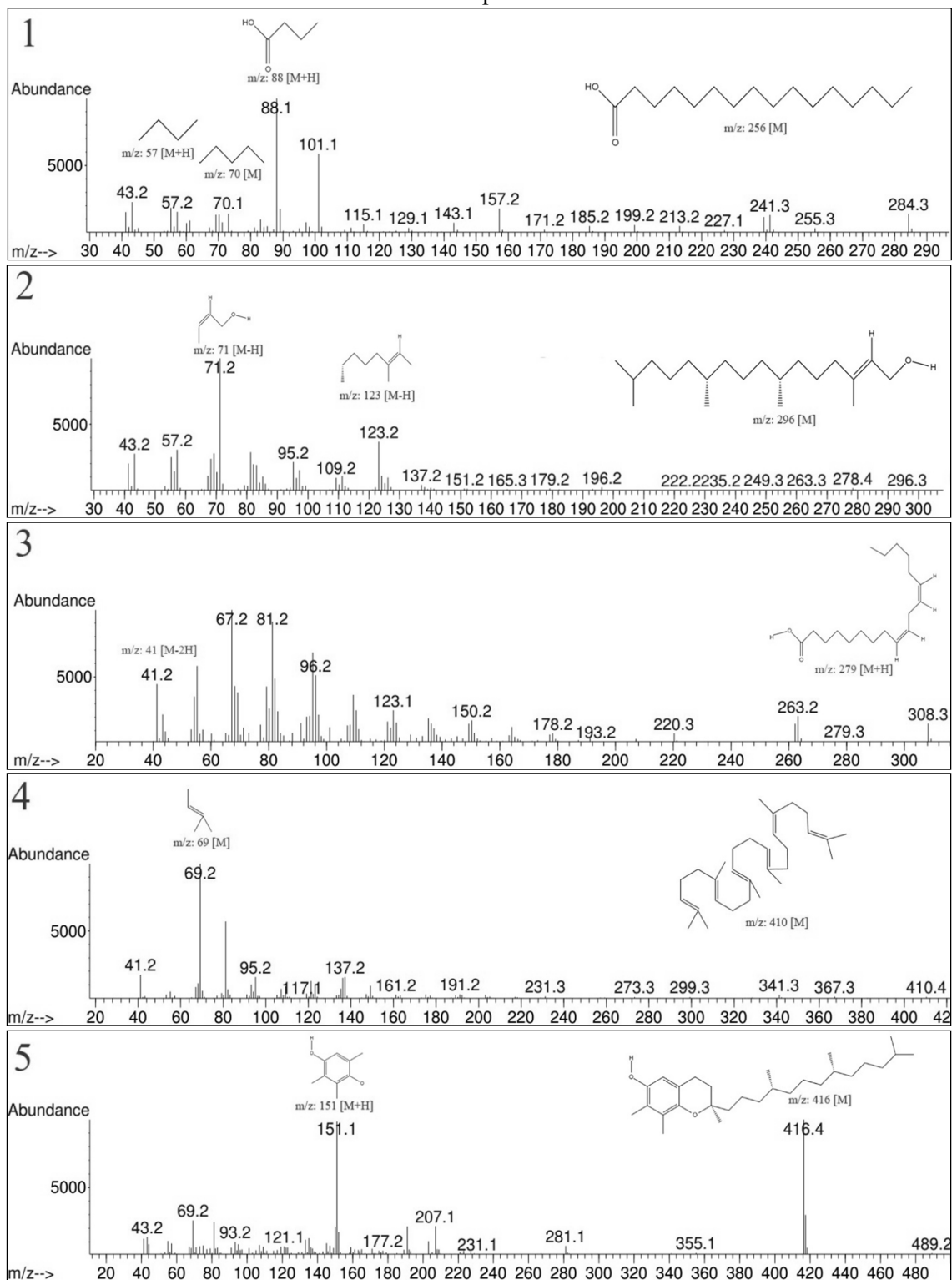
Fonte: O autor (2015).

Tabela 6 – Características químicas das substâncias identificadas por CG-EM.

Nº	Substância	Tr (min)	Massa Molecular (g/mol)	Fórmula Molecular	Área (%)	Íons Fragmentados	Referência
1	Ácido palmítico	29,85	256,42	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	1	43; 57; 70; 88,1; 101; 157	CHOI, 1996
2	Fitol	32,04	296,53	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	10,71	43,2; 57,0; 71,2; 123,2	ALAGAMMAL, TRESINA, MOHAN, 2012.
3	Ácido linoleico	33,08	280,44	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	4,25	41; 55,2; 79,2; 95,2; 121,2	HORAI et al., 2010.
4	Esqualeno	43,25	410,71	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub>	19,77	41,2; 69,2; 95,2; 137,2	ALAGAMMAL; TRESINA; MOHAN, 2012.
5	γ-tocoferol	46,46	416,67	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	1,31	151,1; 416,4	HORAI et al., 2010.
6	Vitamina E	47,49	430,70	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	32,90	165,1; 430,4	HORAI et al., 2010.
7	Campesterol	48,79	400,68	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	4,02	43,2; 107,1; 145,1; 207,1; 289,3; 400,4	OLIVEIRA, 2014.
8	Stigmasterol	49,11	412,69	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	5,68	55,2; 83,2; 133,2; 159,2; 255,2; 412,4	OLIVEIRA, 2014.
9	γ-sitosterol	49,91	414,70	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	7,16	43,2; 81,2; 107,2; 145,1; 213,2; 303,33; 329,4; 414,4	VENKATA et al., 2012.

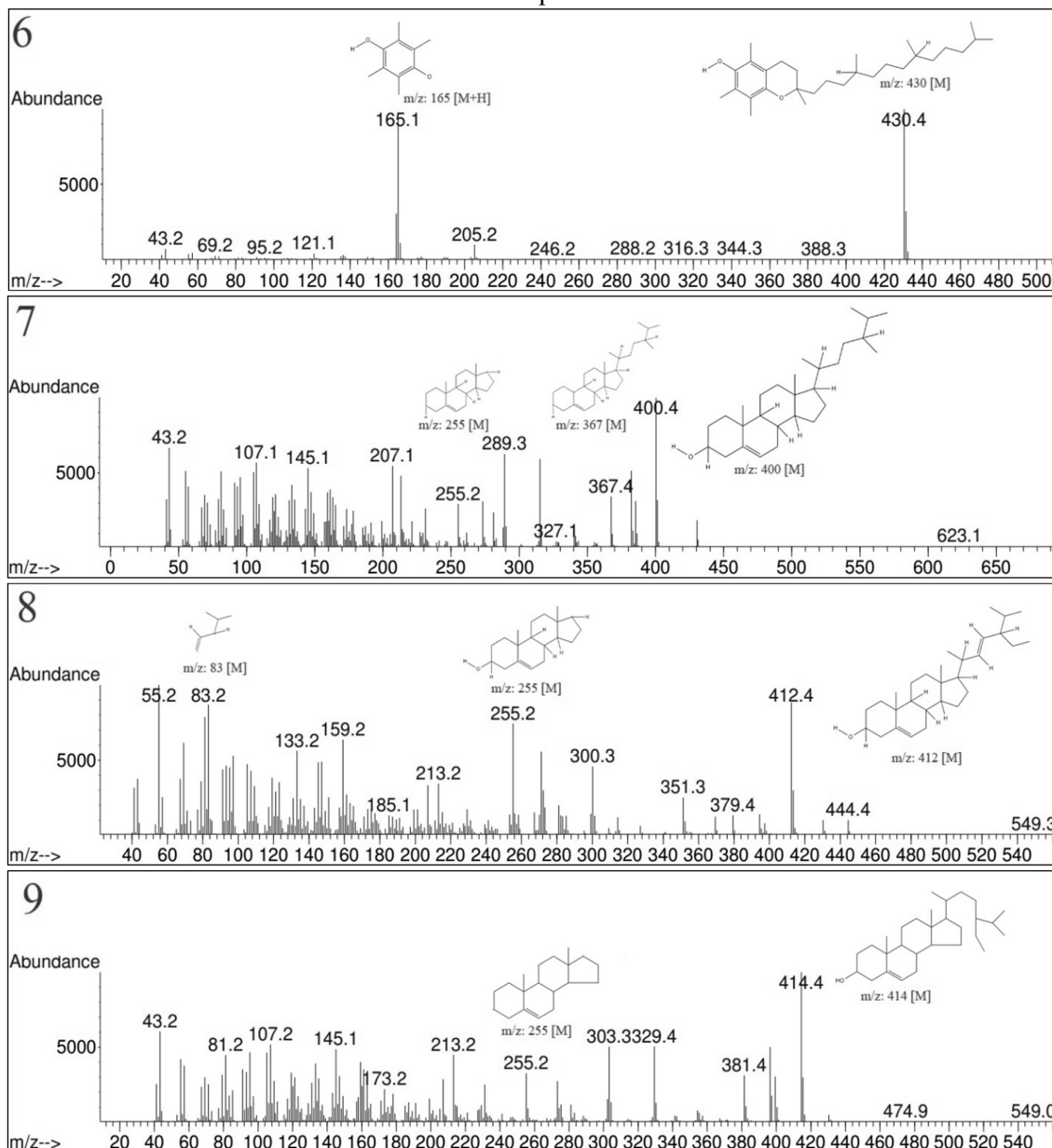
Fonte: O autor (2015)

Figura 13 - Espectros de massas e representação da fragmentação das substâncias 1 a 5 identificadas por CG-EM.



Fonte: O autor (2015)

Figura 14 - Espectros de massas e representação da fragmentação das substâncias 6 a 9 identificadas por CG-EM.



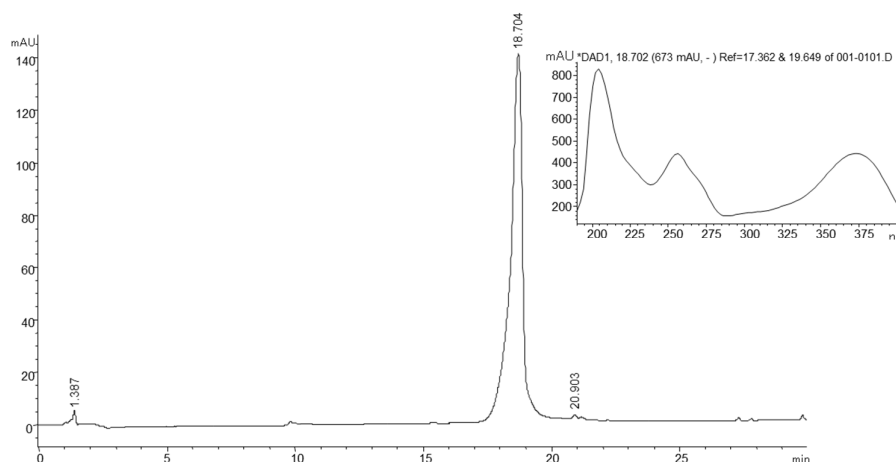
Fonte: O autor (2015)

#### 5.2.4 Purificação, isolamento e identificação de constituintes a partir da fração em acetato de etila.

A purificação e separação da fração em acetato de etila foi realizada em coluna cromatográfica contendo como fase estacionária Sephadex LH-20<sup>®</sup> e fase móvel metanol P.A. A primeira coluna, contendo a fração em acetato de etila, originou 4 frações denominadas de C1F1 a C1F4. A fração C1F4, por apresentar menor complexidade após análise por CCD, foi submetida a uma segunda coluna originando mais 4 frações (C2F1 a C2F4) que foram

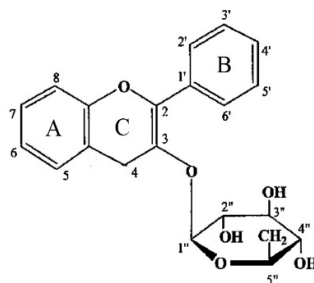
analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV). A fração C2F4 produziu um rendimento de 7 mg e a análise demonstrou 98% de pureza, com pico majoritário em 18,704 minutos e um espectro de UV característico de flavonoide (Figura 15). Para uma melhor compreensão dos dados de elucidação, a estrutura básica do flavonoide glicosilado foi representada na Figura 16.

Figura 15 – Cromatograma e espectro de UV da substância C2F4 obtido por CLAE-UV-DAD.



Fonte: O autor (2015)

Figura 16 - Estrutura básica de um flavonoide glicosilado



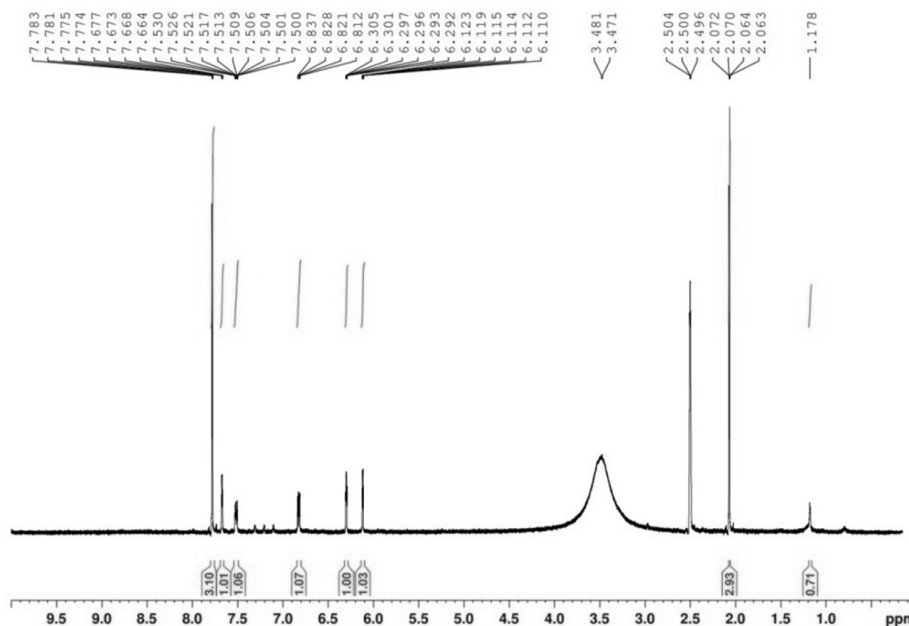
Fonte: O autor (2015)

Para elucidação da estrutura química da substância isolada, foram realizadas análises de ressonância magnética nuclear e fragmentação de massas. Com os dados obtidos através da análise e RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 17),  $^{13}\text{C}$  (Figura 18) e HSQC (Figura 19) foi possível determinar os sinais referentes a presença de hidrogênio e carbono bem como as constantes de acoplamento destes elementos para a substância C2F4 (Tabela 7).

A análise por RMN  $^1\text{H}$  evidenciou um sinal em  $\delta$  6,11 (d; 2,06 Hz) característico de hidrogênio de sistema aromático associado ao H6. De forma semelhante, o sinal em  $\delta$  6,30 (d;

2,06 Hz) foi atribuído ao H8, confirmando constantes de acoplamento em 2,06 Hz características de padrão de substituição meta. O duplete em  $\delta$  7,66 (2,1 Hz) revela a presença dos hidrogênios do sistema aromático referente ao hidrogênio H2', bem como, em  $\delta$  6,81 (8,6 Hz) do hidrogênio H5'. Os sinais na região de  $\delta$  7,50 (dd; 2,2 e 8,6 Hz) sugerem a presença do hidrogênio H6'. Os picos na região de  $\delta$  3,2-3,9 demonstram a presença de hidrogênios carbinólicos, sendo esta região característica da presença de uma unidade de açúcar.

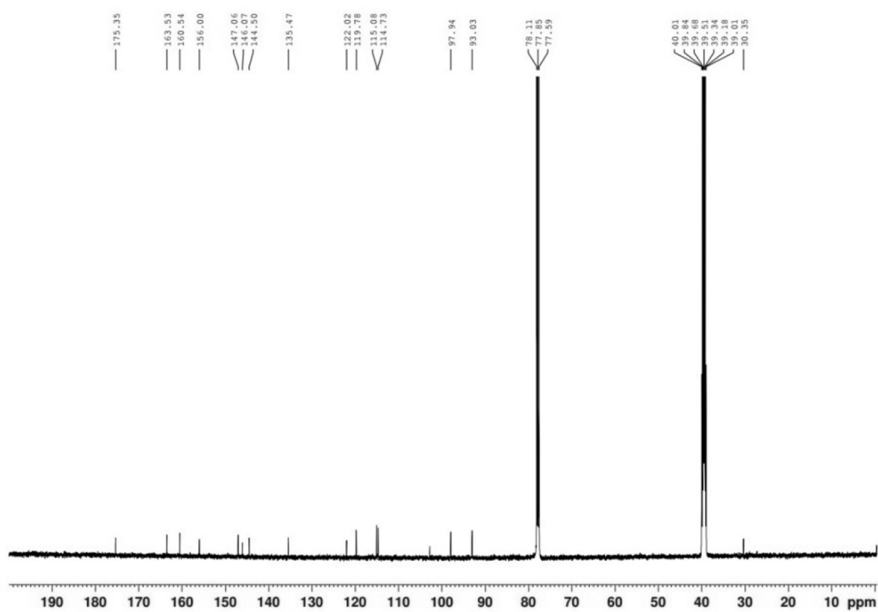
Figura 17 - Espectro RMN  $^1\text{H}$  da substância C2F4.



Fonte: O autor (2015)

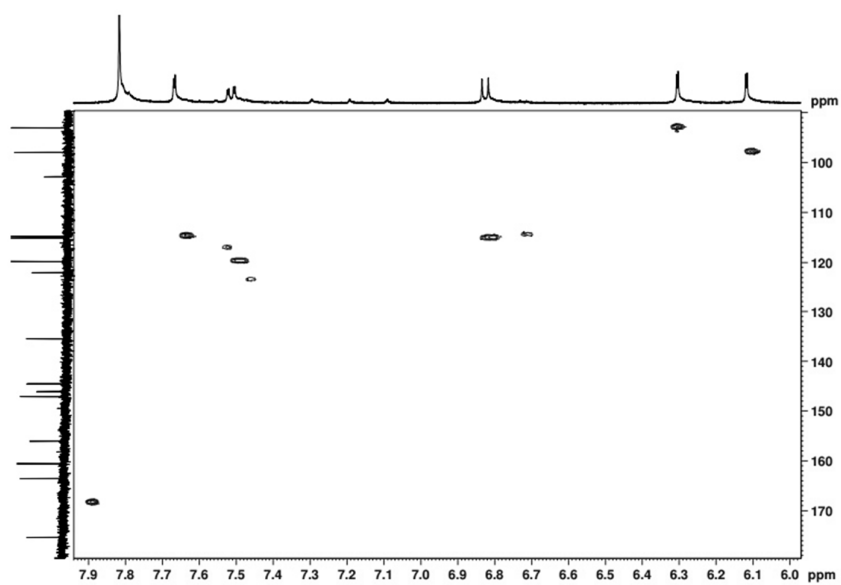
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 18) evidencia a presença de sinais de carbonos em  $\delta$  156,00 (C2), 135,47 (C3), 97,97 (C6), 93,03 (C8), 160,00 (C9), 114,73 (C2'), 115,08 (C5') e 119,78 (C6'). Os carbonos carbinólicos foram observados em; 146,07 (C3'), 144,50 (C4') e 163,53 (C5) também foi visualizado o sinal em  $\delta$  175,35 referente ao carbono carbonílico (C4). Na unidade glicosídica, o sinal em  $\delta$  102,83 foi conferido ao carbono anomérico C1'', revelando que a presença de uma unidade de açúcar. É importante ressaltar que, por questões de solubilidade, a substância recebeu a adição de dois solventes ( $\text{CHCl}_3$  e DMSO), o que pode ter produzido ocultação de sinais.



Figura 18 - Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  da substância C2F4.

Fonte: O autor (2015)

Figura 19 - Mapa de contornos HSQC da substância C2F4.



Fonte: O autor (2015)

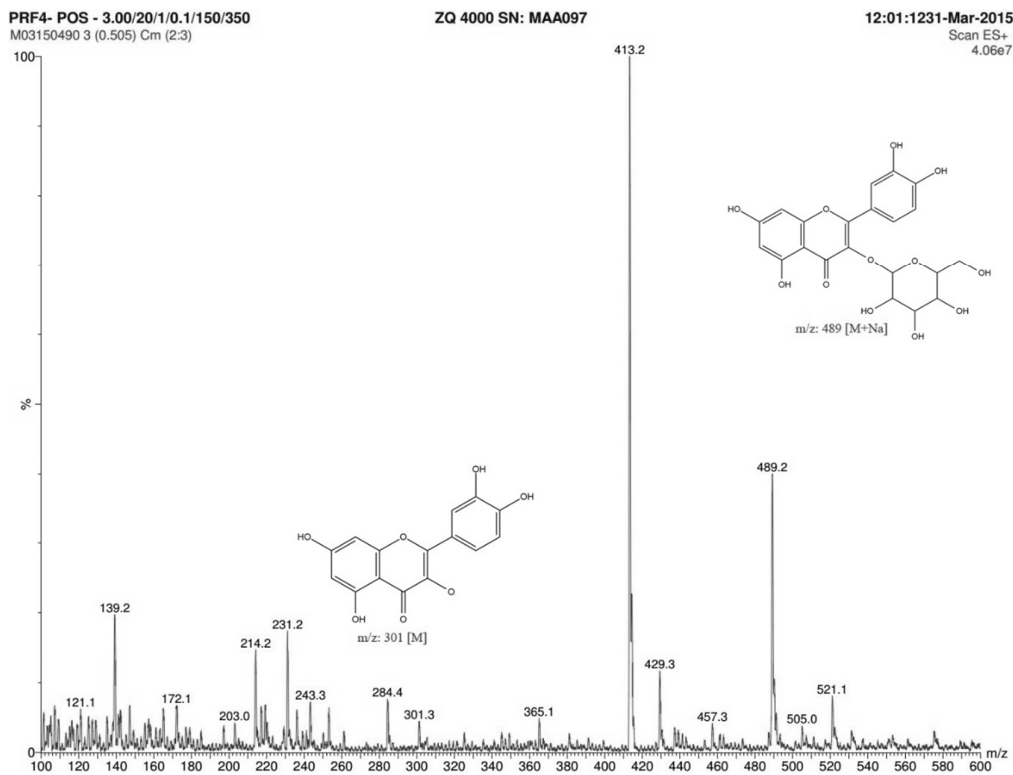
Tabela 7 - Valores dos sinais de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  e constantes de acoplamento

Sinal	C		H		Constante de Acoplamento
	Sinal	C	Sinal	H	
1	30,35	-	-	-	-
2	93,03	C-8	6,30	H-8	$J$ 2,06 Hz
3	97,95	C-6	6,11	H-6	$J$ 2,06 Hz
4	102,83	C-1''	-	-	-
5	114,73	C-2'	7,66	H-2'	$J$ 2,2 Hz
6	115,08	C-5'	6,81	H-5'	$J$ 8,6 Hz
7	119,78	C-6'	7,50	H-6'	$J$ 8,6 Hz e $J$ 2,2 Hz
8	122,02	C-1'	-	-	-
9	135,47	C-3	-	-	-
10	144,50	C-4'	-	-	-
11	146,07	C-3'	-	-	-
12	147,06	-	-	-	-
13	156,00	C-2	-	-	-
14	160,54	C-9	-	-	-
15	163,53	C-5	-	-	-
16	175,35	C-4	-	-	-

Fonte: O autor (2015)

Para uma melhor compreensão da estrutura química da substância C<sub>2</sub>F<sub>4</sub>, a amostra foi analisada por espectrometria de massas (Figura 20), onde foi possível obter seu padrão de fragmentação. O espectro de fragmentação apresentou como pico molecular o sinal em 489,2 m/z; correspondendo a [M+23] devido ao acoplamento de um íon de Na<sup>+</sup> no íon molecular que tem sua massa real no valor de 466 m/z podendo corresponder a massa da quercetina 3-O-β-D-glicosídeo. O pico no valor de 301,3 indica a perda da porção glicosídica da molécula.

Figura 20 – Espectro de massas e representação da fragmentação da substância C2F4.



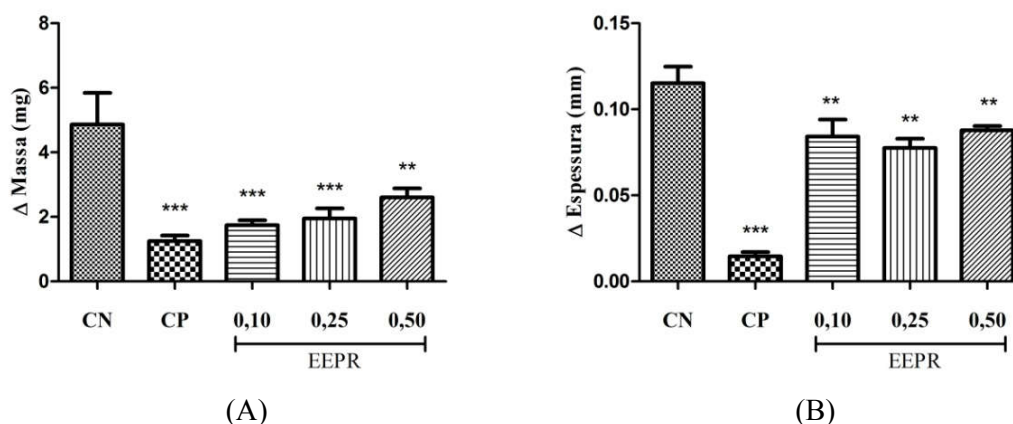
Fonte: O autor (2015)

## 5.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DE EEPR

### 5.2.1 Efeito de EEPR sobre o edema de orelha induzido por óleo de Cróton

Seis horas após a aplicação tópica do óleo de cróton, observou-se a formação do edema bem estruturado no grupo controle negativo como mostrado no Gráfico 1. EEPR, nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, reduziu significativamente ( $p < 0,001$  ou  $p < 0,01$ ) o edema em 64,19, 59,87 e 46,50%, respectivamente (Gráfico 1A). Considerando a mesma ordem de concentração, a espessura da orelha foi inibida em 26,89, 32,60 e 23,73% quando comparada à do grupo controle (Gráfico 1B). Como esperado, a dexametasona, fármaco de referência, foi ativa em ambas as medidas do edema. Embora sejam quantificados em unidades diferentes, é importante destacar que ambas as medidas corroboram entre si, podendo apresentar pequenas variações.

Gráfico 1 - Efeito anti-inflamatório tópico de EEPR sobre edema de orelha induzido por óleo de Cróton.



(A) Medida da massa (mg) dos fragmentos das orelhas. (B) Medida da espessura (mm) das orelhas. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ).  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ , diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo; CP = Controle positivo (Dexametasona); EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.

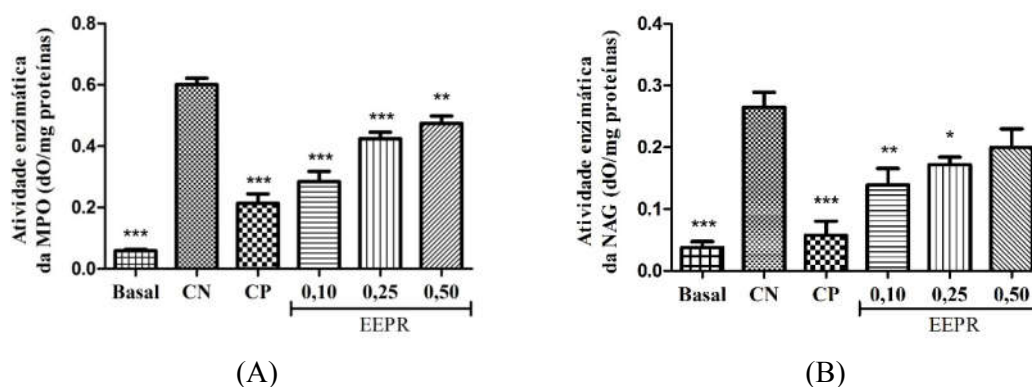
Fonte: O autor (2015)

#### 5.2.1.1 Efeito de EEPR sobre as atividades de MPO e NAG após indução do edema de orelha por óleo de Cróton

Usando amostras do edema de orelha induzido por óleo de cróton, a medida da atividade da MPO é mostrada no Gráfico 2A. EEPR, nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, foi capaz de inibir a atividade da MPO em 53,00, 29,42 e 21,12%, respectivamente. A concentração de

0,10% de EEPR apresentou eficácia próxima à da dexametasona, agente anti-inflamatório esteroideal inibidor de mediadores da inflamação, em reduzir a atividade dessa enzima. O Gráfico 2B mostra que, após 6 horas da indução do edema, houve um aumento da atividade de NAG no controle negativo, enquanto o controle positivo (dexametasona) produziu uma redução bastante expressiva dessa atividade. As concentrações 0,10 (47,43%;  $p < 0,01$ ) e 0,25% (35,12%;  $p < 0,05$ ) de EEPR reduziram a atividade de NAG significativamente.

Gráfico 2 - Efeito de EEPR sobre as atividades de MPO e NAG após indução do edema de orelha por óleo de Cróton.

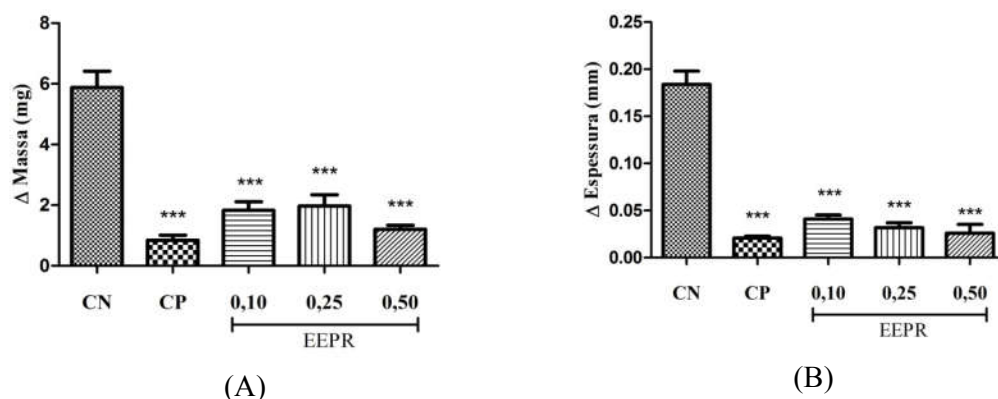


(A) Atividade de MPO. (B) Atividade de NAG. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 4$ ). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo, CP = Controle positivo (Dexametasona), EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.  
Fonte: O autor (2015)

### 5.2.2 Efeito de EEPR sobre o edema de orelha induzido por fenol

Após 2h da aplicação tópica, o fenol induziu uma expressiva formação do edema no grupo controle negativo observado através do aumento da massa e da espessura das orelhas (Gráfico 3). Neste gráfico, observou-se também que, após tratamento, a dexametasona, controle positivo, apresentou eficácia em ambas as medidas realizadas. Concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% de EEPR inibiram significativamente ( $p < 0,001$ ) a massa do edema em 68,85, 66,63 e 79,48%, respectivamente (Gráfico 3A), enquanto a espessura foi reduzida em 77,68, 82,68 e 85,91% nas respectivas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%/orelha (Gráfico 3B).

Gráfico 3 - Efeito anti-inflamatório tópico de EEPR sobre edema de orelha induzido por fenol.

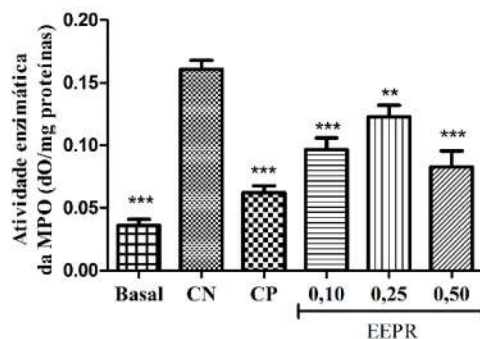


(A) Medida da massa (mg) dos fragmentos das orelhas. (B) Medida da espessura (mm) das orelhas. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ).  $***p < 0,001$ , diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo; CP = Controle positivo (Dexametasona); EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.  
Fonte: O autor (2015)

#### 5.2.2.1 Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO após indução do edema de orelha por fenol.

No Gráfico 4, é possível destacar que, após 2 horas, o fenol elevou a atividade da enzima mieloperoxidase no grupo controle negativo. As concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% de EEPR geraram uma redução significativa da atividade de MPO em 39,92 ( $p < 0,001$ ), 23,63 ( $p < 0,01$ ) e 58,50% ( $p < 0,001$ ), respectivamente. A dexametasona, anti-inflamatório esteroide, reduziu de forma significativa a atividade da enzima MPO ( $p < 0,001$ ).

Gráfico 4 -Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO após indução do edema de orelha por fenol.

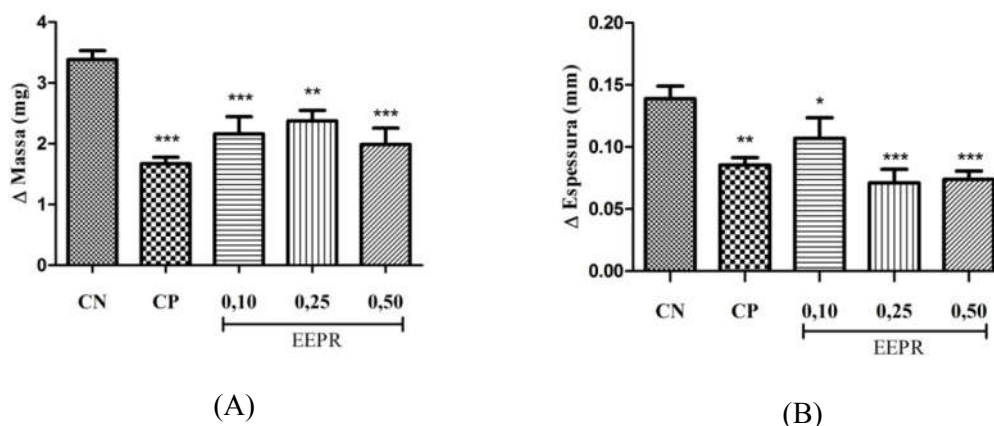


Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de quatro fragmentos de orelha.  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ , diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo; CP = Controle positivo (Dexametasona); EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.  
Fonte: O autor (2015).

### 5.2.3 Efeito de EEPR sobre o edema de orelha induzido por capsaicina

A capsaicina induziu um aumento da massa e da espessura da orelha de camundongos após 30 minutos de aplicação tópica, mostrando a formação do edema no grupo controle negativo (Gráfico 5). Concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% de EEPR (36,09, 29,88 e 41,42%, respectivamente) foram capazes de reduzir significativamente ( $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$ ) a massa do edema em relação ao grupo controle negativo (Gráfico 5A). A espessura do edema também foi diminuída em 23,20, 48,92 e 46,76% nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% de EEPR, respectivamente (Gráfico 5B). Dexametasona, controle positivo, foi significativamente ( $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$ ) ativa na redução da massa e da espessura do edema.

Gráfico 5 - Efeito anti-inflamatório tópico de EEPR sobre edema de orelha induzido por capsaicina.



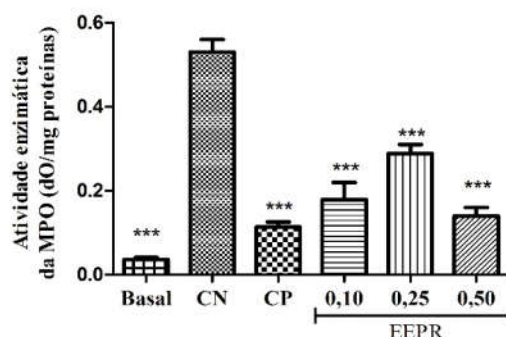
(A) Medida da massa (mg) dos fragmentos das orelhas. (B) Medida da espessura (mm) das orelhas. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de oito camundongos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo; CP = Controle positivo (Dexametasona); EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.

Fonte: O autor (2015)

#### 5.2.3.1 Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO após indução do edema de orelha por capsaicina

A aplicação tópica da capsaicina promoveu aumento da atividade da enzima MPO no grupo controle (Gráfico 6). A dexametasona, controle positivo, foi capaz de bloquear o processo inflamatório pela redução da atividade de MPO. Nos grupos testados, EEPR, nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, diminuiu a atividade de MPO em 66,26, 45,54 e 73,64%, respectivamente.

Gráfico 6 - Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO após indução do edema de orelha por capsaicina.

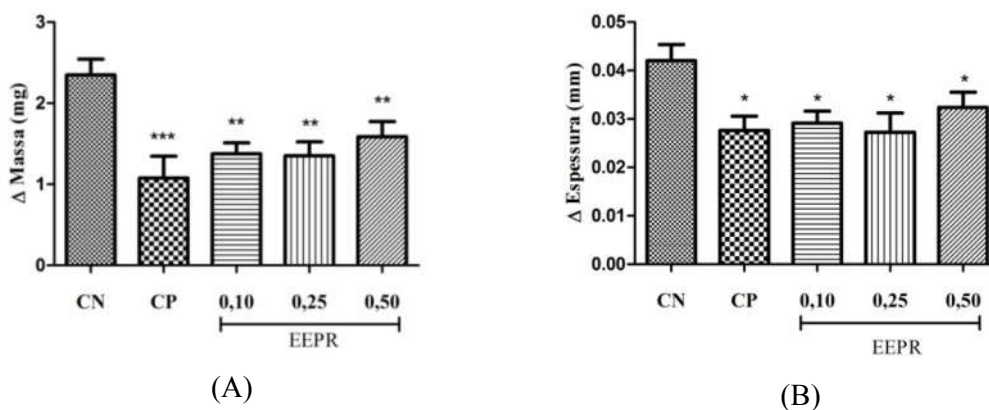


Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de quatro fragmentos de orelhas. \*\*\* $p < 0,001$ ; diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo; CP = Controle positivo (Dexametasona); EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.  
Fonte: O autor (2015).

#### 5.2.4 Efeito de EEPR sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico

AA induziu um aumento expressivo da massa e da espessura das orelhas do grupo controle negativo (Gráfico 7). O tratamento com EEPR promoveu uma redução do edema em 41,70, 42,55 e 32,76% nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, respectivamente (Gráfico 7A). EEPR também diminuiu a espessura do edema em 30,95 (0,10%), 35,71 (0,25%) e 23,73% (0,50%) quando comparado ao grupo controle (Gráfico 7B). Indometacina, inibidor da ciclo-oxigenase e usada como controle positivo, foi ativa em ambas as medidas.

Gráfico 7 - Efeito anti-inflamatório tópico de EEPR sobre edema de orelha induzido por ácido araquidônico.



(A) Medida da massa (mg) dos fragmentos das orelhas. (B) Medida da espessura (mm) das orelhas. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de oito camundongos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo; CP = Controle positivo (Indometacina); EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.

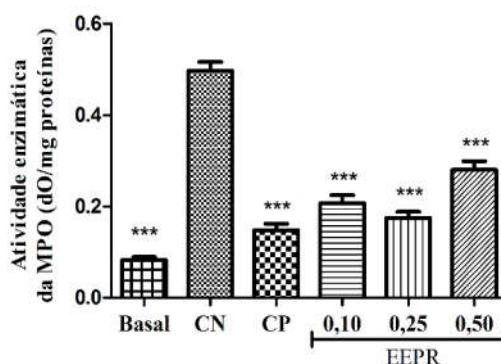
Fonte: O autor (2015)



#### 5.2.4.1 Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO após indução do edema de orelha por ácido araquidônico

O edema de orelha induzido por AA também foi avaliado quanto à atividade da enzima MPO (Gráfico 8). O processo inflamatório revelado pelo aumento de MPO no controle negativo foi revertido pela aplicação tópica de 0,10, 0,25 e 0,50% de EEPR em 58,26, 64,91 e 43,54%, respectivamente. De maneira semelhante, a indometacina, controle positivo, reduziu a atividade enzimática de forma eficaz ( $p < 0,001$ ).

Gráfico 8 - Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO após indução do edema de orelha por ácido araquidônico.



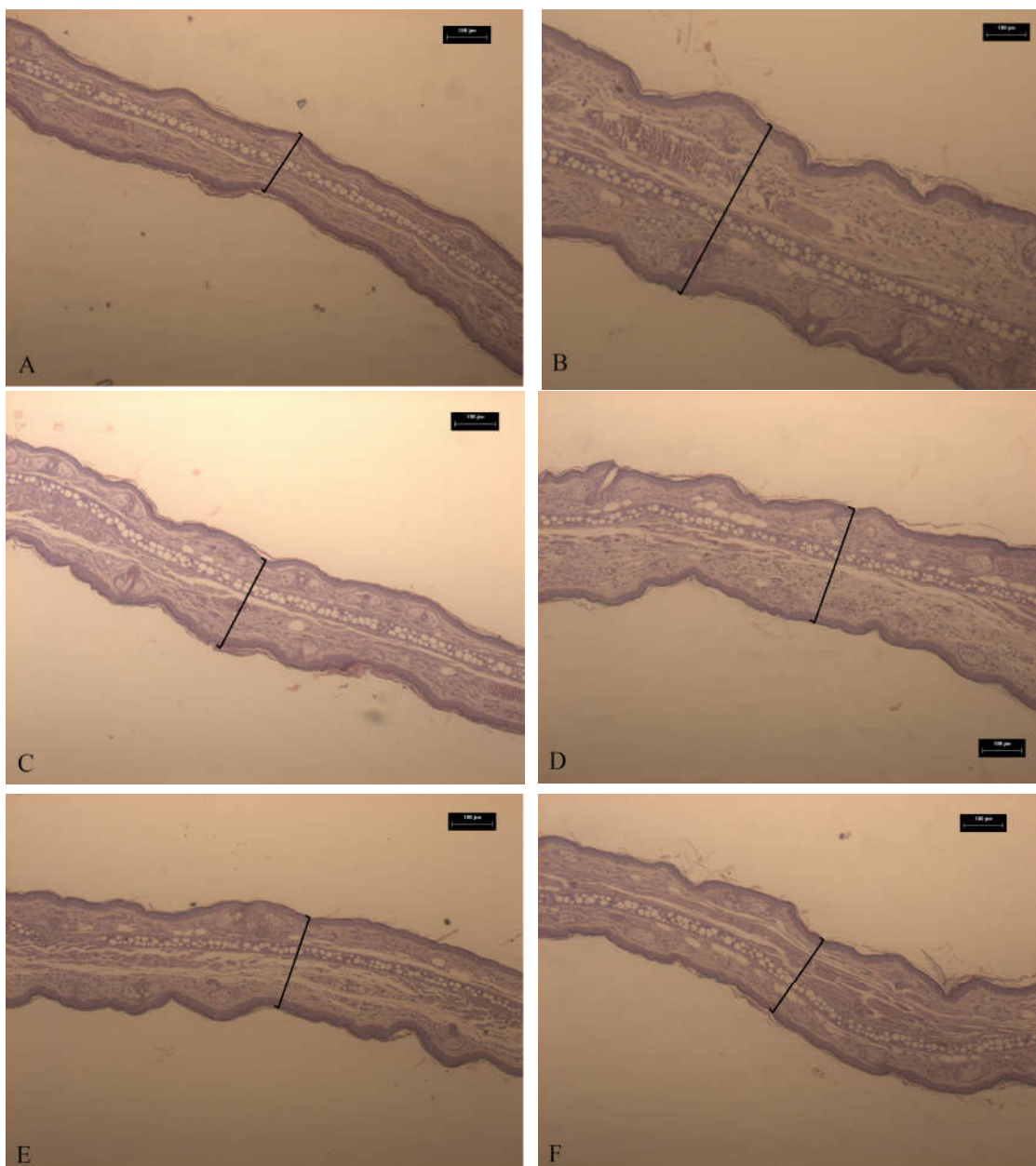
Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de quatro fragmentos de orelhas. \*\*\* $p < 0,001$ ; diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo; CP = Controle positivo (Indometacina); EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.

Fonte: O autor (2015).

#### 5.2.5 Análise histopatológica do edema de orelha induzido por óleo de cróton

Para corroborar com os resultados descritos, fragmentos de orelha obtidos do modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton foram analisados histopatologicamente e cortes representativos são visualizados na Figura 21. O grupo basal (sem indução de edema) mostra ausência de edema e de processo inflamatório (Figura 21A), enquanto que o grupo controle negativo (com indução do edema, sem tratamento) apresentou um aumento acentuado da espessura da orelha, caracterizando edema típico de processo inflamatório (Figura 21B). O tratamento EEPR, nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, reduziu a formação de edema, sendo observado pela espessura da derme nos cortes histológicos das orelhas (Figuras 21D, 21E e 21F). Após aplicação da dexametasona 0,1 mg/orelha, controle positivo, a inibição do edema foi também visualizada de forma expressiva (Figura 21C).

Figura 21 - Cortes histológicos de orelhas com edema induzido por óleo de cróton após tratamento com EEPR.



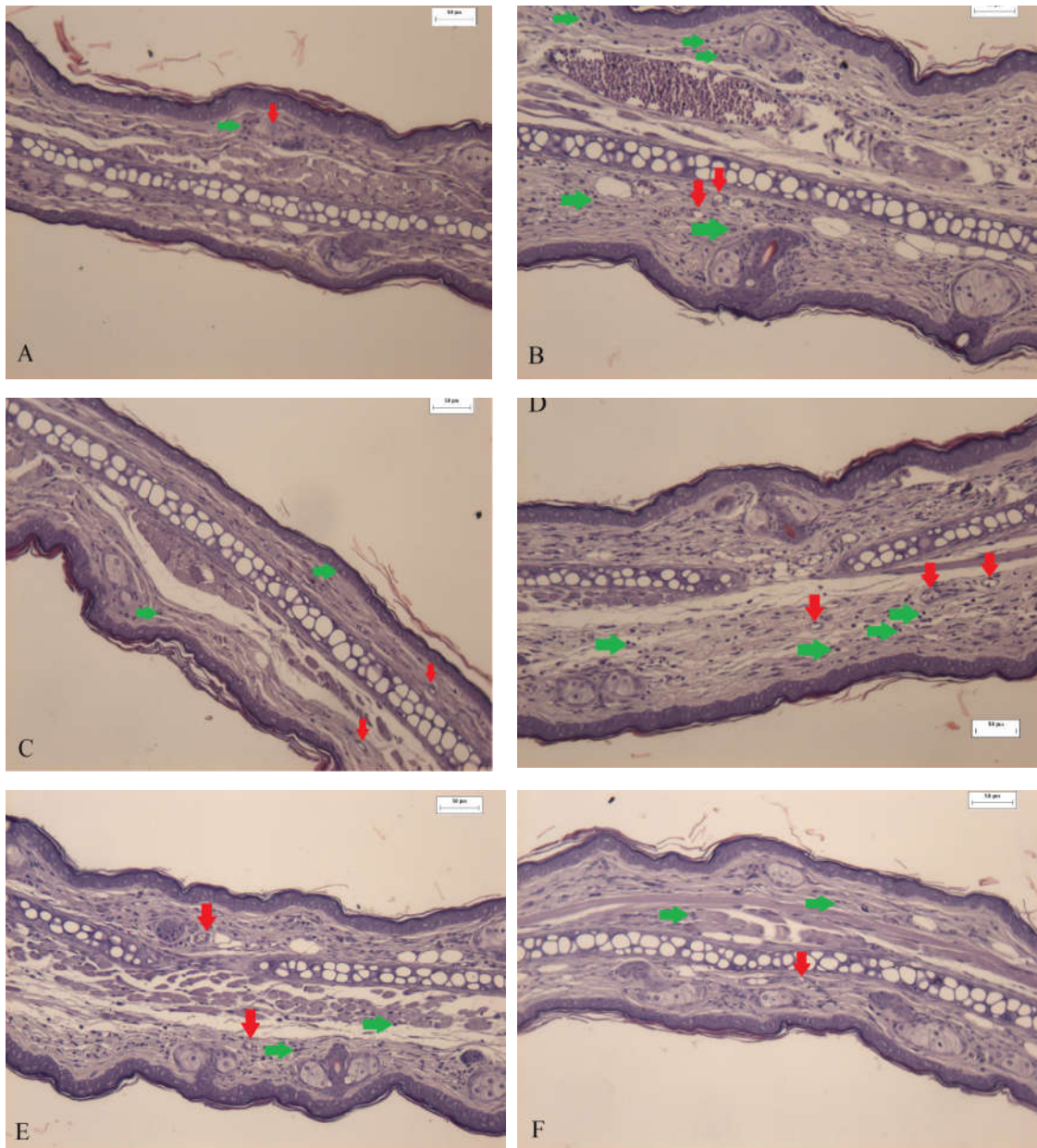
Cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (10x, escala de 100 µm). (A) Basal (sem inflamação); (B) Controle negativo (acetona); (C) Controle Positivo (dexametasona); (D) EEPR 0,10%; (E) EEPR 0,25%; (F) EEPR 0,50%.

Fonte: O autor (2015)

Parâmetros de inflamação nas amostras das orelhas de camundongos também foram analisados através da visualização de infiltração de leucócitos polimorfonucleares na derme e vasodilatação (Figura 22). Esses parâmetros da inflamação, causados por óleo de cróton, foram suprimidos pelo tratamento tópico com EEPR nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, assim

como pela dexametasona (0,10 mg/orelha), podendo ser observado nos cortes histológicos (20x, escala 100  $\mu$ m) (Figura 22).

Figura 22 - Cortes histológicos de orelhas com edema induzido por óleo de cróton após tratamento com EEPR.

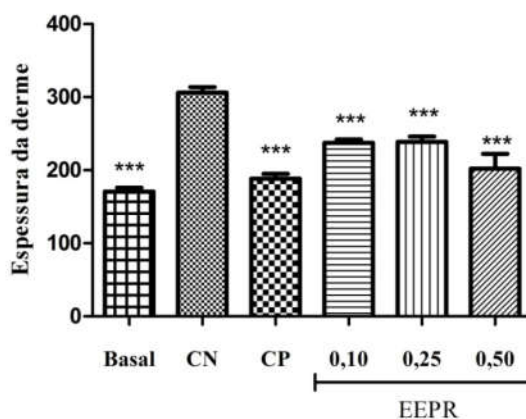


Cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (200x, escala de 50  $\mu$ m). (A) Basal (sem inflamação); (B) Grupo controle; (C) Dexametasona; (D) EEPR 0,10%; (E) EEPR 0,25%; (F) EEPR 0,50%; (ED) edema/espessamento da derme; seta vermelha indica vasos sanguíneos e seta verde a presença de leucócitos.

Fonte: O autor (2015)

Usando o programa Imagepro-Plus<sup>®</sup>, a espessura do edema foi quantificada frente aos grupos tratados com EEPR e demais grupos (Gráfico 9). Neste gráfico, observa-se que EEPR reduziu significativamente a formação de edema em 24,99, 22,57 e 31,24% nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, respectivamente. Após a aplicação da dexametsona, o edema foi reduzido para  $183,4 \pm 16,1$  ( $\mu\text{m}$ ), o que corresponde a 40,91% de inibição. O grupo basal (veículo, sem inflamação) não produziu formação de edema e processo inflamatório, apresentando também menor espessura entre os grupos investigados (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Efeito do EEPR sobre o tamanho do edema de orelha induzido por óleo de crótonnos cortes histológicos analisados através do programa Imagepro-Plus<sup>®</sup>.



Medidas da espessura do tecido edematoso ( $\mu\text{m}$ ) em cinco regiões aleatórias de cada corte histológico. Cada grupo foi representado por quatro cortes histológicos ( $n = 4$ ). \*\*\* $p < 0,001$ ; diferente do grupo controle negativo após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo, CP = Controle positivo (Dexametasona), EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.

Fonte: O autor (2015).

### 5.3 ATIVIDADE CICATRIZANTE DE EEPR

O procedimento operatório e o tratamento pós-operatório transcorreram sem complicações. Todos os animais recuperaram-se bem da anestesia, demonstrando bom estado geral e atividades física e comportamental normais para a espécie.

#### 5.3.1 Efeito de EEPR sobre a massa corporal e consumo de água e ração

A Tabela 9 mostra os valores da massa corporal, consumo de água e ração dos animais submetidos ao modelo de cicatrização cutânea durante sete e 14 dias de tratamento com EEPR. Entre grupos avaliados observa-se que o grupo tratado com a concentração 0,25% apresentou, no período de 14 dias maior consumo de ração e também maior peso (Tabela 8).

Tabela 8 – Efeito de EEPR sobre a massa corporal e o consumo de água e ração nos tratamentos de 7 e 14 dias.

Parâmetros	Tratamentos (dias)	CN	CP	EEPR		
				0,10%	0,25%	0,50%
Massa Corporal (g)	7	136,75 ± 11,24	138,89 ± 3,72	142,62 ± 13,41	131,95 ± 10,52	140,48 ± 12,06
	14	178,23 ± 16,15	184,87 ± 5,37	183,89 ± 15,50	194,37 ± 19,42*	188,15 ± 17,11
Água (mL)	7	179,38 ± 49,16	191,25 ± 47,18	206,88 ± 49,99	173,13 ± 56,87	189,00 ± 47,33
	14	205,66 ± 40,43	186,33 ± 27,61	217,33 ± 31,33	225,66 ± 18,50	204,00 ± 27,07
Ração (g)	7	264,00 ± 29,09	258,25 ± 30,38	287,88 ± 26,07	276,75 ± 24,39	282,63 ± 23,38
	14	262,46 ± 11,31	264,73 ± 16,50	279,66 ± 30,50	295,53 ± 15,90***	281,93 ± 22,59











Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n = 6). CN = Controle negativo, CP = Controle positivo, EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*, cEEPR = Creme contendo EEPR. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ ; diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo e CP = Controle positivo.

#### 5.3.2 Efeito de EEPR sobre a análise macroscópica do processo de cicatrização nos tratamentos de 7 e 14 dias

Após remoção da pele, a análise macroscópica das lesões permitiu observar o desenvolvimento do edema acompanhado de vermelhidão ao redor da lesão. Ao decorrer do tratamento de sete dias com EEPR, notou-se uma redução do edema em todas as lesões até o terceiro dia do pós-operatório, referente às fases iniciais da resposta inflamatória. No entanto, não foi constatada a formação de exsudato purulento, mas observou-se a produção de exsudação serosa nos animais do grupo controle até o 4º dia e dos grupos tratados com EEPR e Dersani® até o 2º dia. A partir do 3º dia, a geração de crostas mais delgadas foi observada nos grupos tratados com EEPR e Dersani®, enquanto o grupo controle apresentou crostas espessas e

ressecadas. No 5º dia, iniciou-se, espontaneamente, o desprendimento das crostas, mostrando sinais de re-epitelização. Sob análise macroscópica, observou-se no 7º dia que, embora o processo de cicatrização tenha sido bem expressivo nos grupos tratados, o mesmo foi menos abundante no grupo controle (Quadro 2).

Quadro 2 - Efeito de EEPR sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar no tratamento de 7 dias.











GRUPO	DIA 0	DIA 7
Controle negativo		
Controle positivo		
EEPR 0,10%		
EEPR 0,25%		
EEPR 0,50%		

Fonte: O autor (2015)

Considerando o experimento de 14 dias, os parâmetros macroscópicos dos 7 dias iniciais dos animais tratados com EEPR foram semelhantes ao experimento de 7 dias mostrado no quadro 1. No entanto, após 14 dias, EEPR promoveu uma completa oclusão das lesões

(Quadro 3), ocorrendo um completo fechamento das lesões de todos os grupos, incluindo o grupo controle negativo.

Quadro 3 - Efeito de EEPR sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar no tratamento de 14 dias.

GRUPO	DIA 0	DIA 14
Controle negativo		
Controle positivo		
EEPR 0,10%		
EEPR 0,25%		
EEPR 0,50%		

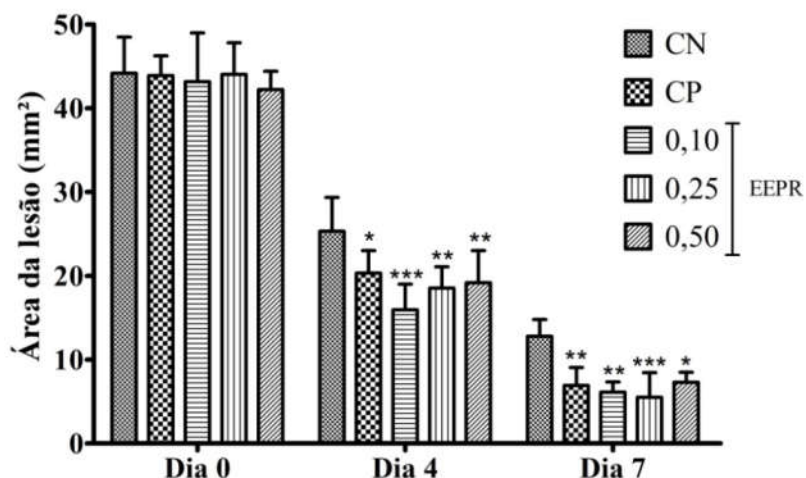
Fonte: O autor (2015)

### 5.3.3 Efeito de EEPR sobre a área da lesão nos tratamentos de 7 e 14 dias

O Gráfico 10 representa a evolução do processo de cicatrização nos dias 0, 4 e 7, onde é possível observar que nos dias 4, as concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% de EEPR e Dersani® reduziram a área da lesão significativamente ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) em relação ao controle. Além disso, ao final dos sete dias, o grupo controle negativo (CN) apresentou grau de

contração de 71% da lesão em relação ao dia 0 com maior área da lesão ao longo dos 7 dias. Os grupos tratados com EEPR, nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, apresentaram grau de contração de 85,00, 87,00 e 80,00%, respectivamente.

Gráfico 10 - Efeito de EEPR sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar no tratamento de 7 dias.



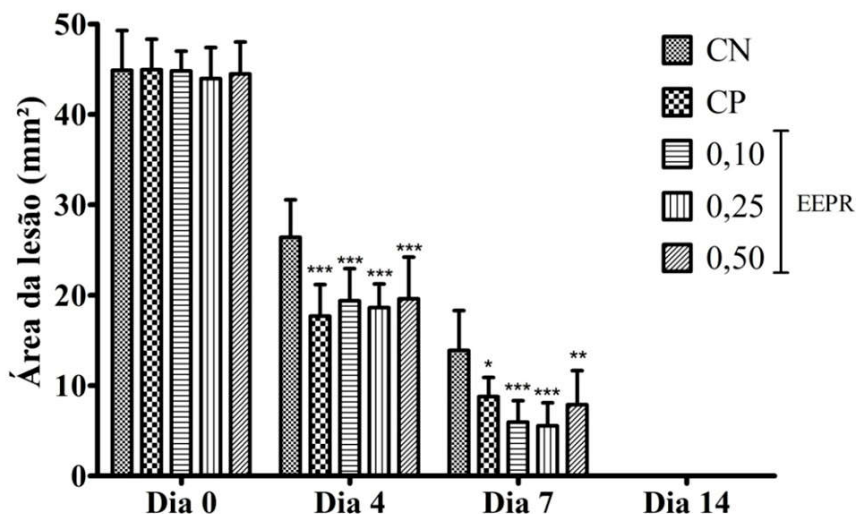
Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de seis ratos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo; CP = Controle positivo (Dersani<sup>®</sup>); EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.

Fonte: O autor (2015)

Considerando o tratamento de 14 dias, foi possível observar que, até o 7º dia de experimento, os resultados foram semelhantes àqueles descritos no Gráfico 10 para 7 dias de tratamento. As três concentrações promoveram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle negativo após 4 e 7 dias de tratamento (Gráfico 11). No 14º dia de tratamento, houve um completo fechamento das lesões em todos os grupos avaliados, produzindo um grau de contração de 100%.



Gráfico 11 - Efeito de EEPR sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar no tratamento de 14 dias.



Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de seis ratos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo; CP = Controle positivo (Dersani<sup>®</sup>); EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.

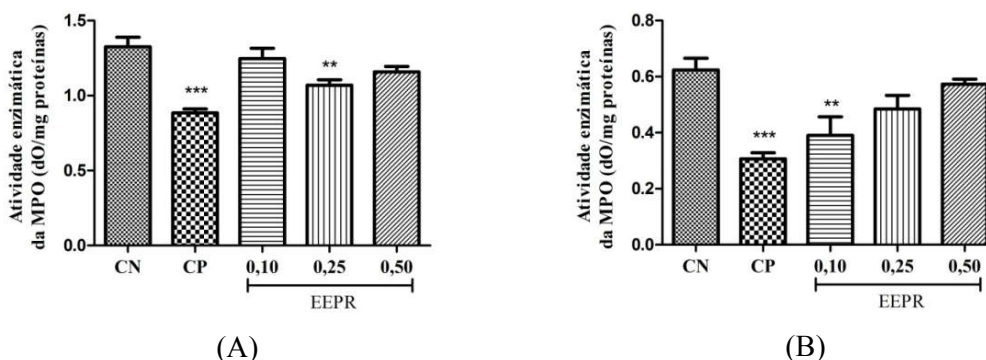
Fonte: O autor (2015)

#### 5.3.4 Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO nos tratamentos de 7 e 14 dias

O Gráfico 12 mostra a atividade da enzima mieloperoxidase que foi avaliada ao final dos 7 e dos 14 dias. A atividade de MPO foi aumentada de forma expressiva no grupo controle negativo, enquanto o Dersani<sup>®</sup>, controle positivo, inibiu a atividade de MPO significativamente ( $p < 0,001$ ) após 7 dias de tratamento (Gráfico 12A). A concentração de 0,25% de EEPR inibiu a atividade de MPO em 19,30% ( $p < 0,01$ ).

Após 14 dias de tratamento (Gráfico 12B), a atividade da MPO encontrou-se elevada no grupo tratado com solução fisiológica (controle negativo), enquanto que o grupo CP apresentou uma redução significativa da atividade desta enzima ( $p < 0,001$ ). Nos grupos tratados com EEPR nas concentrações teste apenas apresentou redução significativa da atividade de MPO a concentração de 0,10% ( $p < 0,01$ ), inibindo em 19,30% a atividade desta enzima.

Gráfico 12 - Efeito de EEPR sobre a atividade de MPO no processo cicatrização em ratos Wistar nos tratamentos de 7 e 14 dias.



(A) Tratamento de 7 dias. (B) Tratamento de 14 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de quatro fragmentos de orelhas. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. NS = não significativo. CN = Controle negativo, CP = Controle positivo (Dersani<sup>®</sup>), EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.

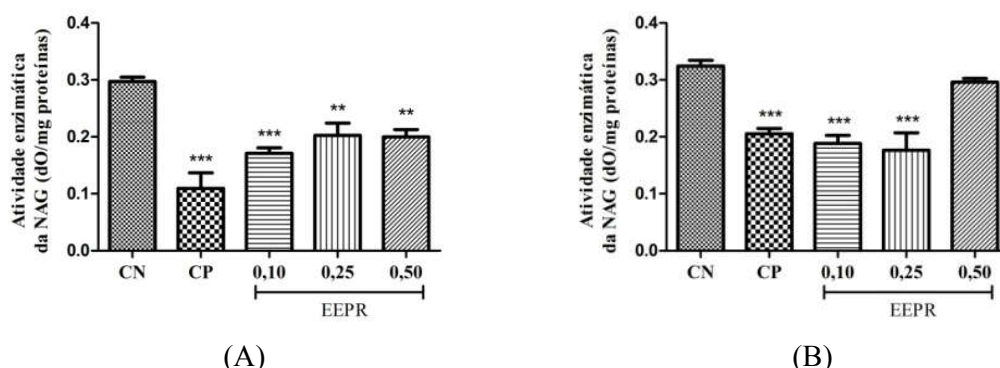
Fonte: O autor (2015).

### 5.3.5 Efeito de EEPR sobre a atividade de NAG nos tratamentos de 7 e 14 dias

A ação do extrato etanólico também foi avaliada quanto à atividade da enzima NAG que é indicativa da presença de leucócitos mononucleares. Após 7 dias de tratamento, o grupo controle positivo apresentou redução significativa na atividade enzimática ( $p < 0,001$ ), enquanto os grupos tratados com EEPR nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% apresentaram 42,40 ( $p < 0,001$ ), 31,80 ( $p < 0,01$ ) e 32,60% ( $p < 0,01$ ) de inibição da NAG, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo (Gráfico 13A).

A ação de EEPR também foi avaliada quanto à atividade enzimática de NAG após 14 dias de tratamento (Gráfico 13B). Nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% de EEPR, a atividade de NAG foi inibida em 41,32 ( $p < 0,001$ ), 45,12 ( $p < 0,001$ ) e 7,84% (não significativa), respectivamente, em relação ao grupo controle negativo. O grupo controle positivo (Dersani<sup>®</sup>) reduziu, significativamente ( $p < 0,001$ ), a atividade de NAG.

Gráfico 13 - Efeito de EEPR sobre a atividade de NAG no processo cicatrização em ratos Wistar nos tratamentos de 7 e 14 dias.



(A) Tratamento de 7 dias. (B) Tratamento de 14 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de quatro fragmentos de orelhas.  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ; diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo, CP = Controle positivo (Dersani<sup>®</sup>), EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida*.

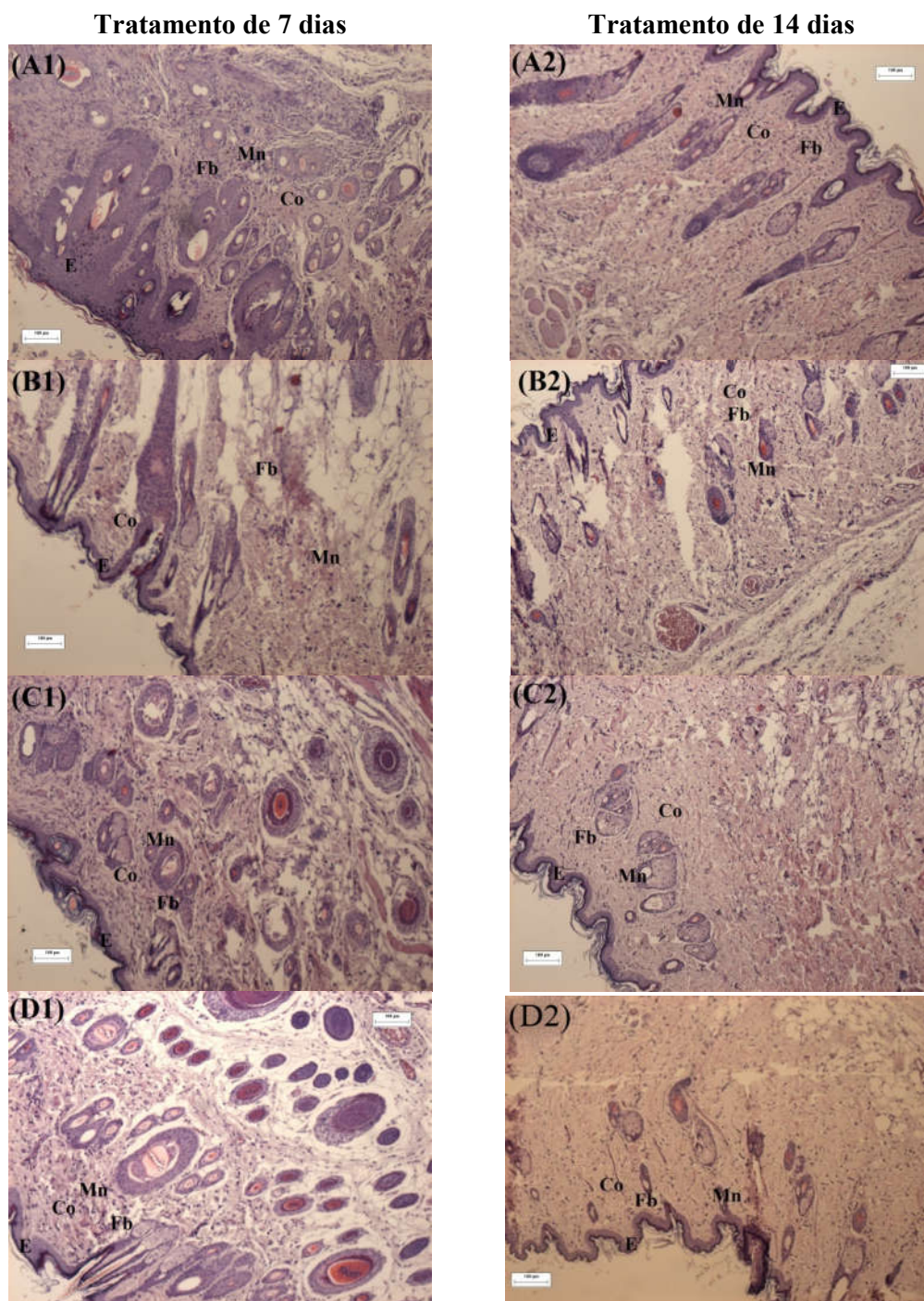
Fonte: O autor (2015).

### 5.3.6 Análise histopatológica de tecido cicatrizado nos tratamentos de 7 e 14 dias com EEPR

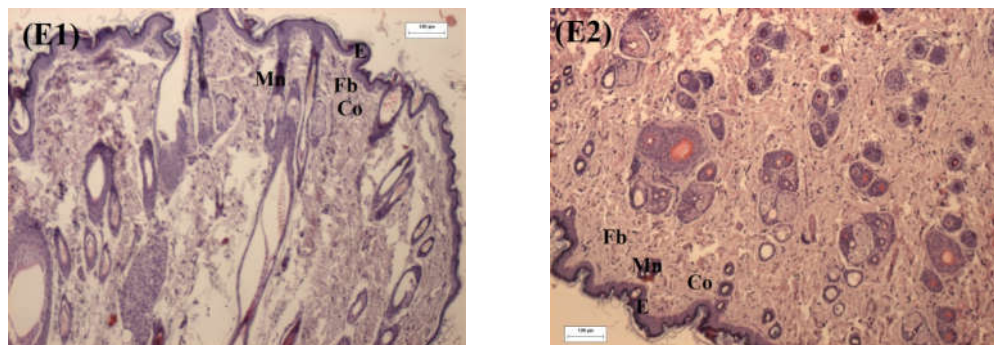
Cortes histológicos de tecidos cicatrizados obtidos após sete e 14 dias de tratamento, corados com HE (hematoxilina e eosina) e analisadas em microscopia ótica nas objetivas de 10x e 20x, foram avaliados com intuito de observar possíveis alterações morfológicas microscópicas.

Após sete dias, o tratamento com EEPR mostrou que o grupo controle (tratado com solução fisiológica) apresentou uma epiderme (E) acentuadamente espessa com hiperplasia, maior intensidade de mononucleares (Mn), colágeno (Co) mais condensado e presença de fibroblasto (Figura 23A1) quando comparado ao grupo controle de 14 dias (Figura 23A2). O tratamento com Dersani<sup>®</sup> (controle positivo) reduziu a espessura da epiderme, o processo inflamatório (pouca presença de mono e polimorfonucleares) e produziu uma maior proliferação de colágeno e fibroblastos, mostrando um melhor processo de cicatrização (Figuras 23B1 e 23B2) em ambas as fases do estudo (sete e 14 dias). Em relação ao tratamento com EEPR (0,10, 0,25 e 0,50%), verificou-se uma redução progressiva da epiderme e do processo inflamatório de forma dependente da concentração após sete (Figuras 23C1 a 23E1) e 14 dias de tratamento (Figuras 23C2 a 23E2). Nestes períodos, ocorreu um aumento da proliferação de colágeno e fibroblastos, mostrando uma completa cicatrização, especialmente na concentração de 0,50%. Também, foram observados outros tecidos anexos, tais como tecido adiposo, folículos pilosos e tecidos glandulares (glândulas sebáceas e sudoríparas).

Figura 23 - Fotomicrografia do tecido cicatrizado de ratos Wistar nos tratamentos de 7 e 14 dias com EEPR.



Continuação da Figura 23....



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

Fonte: O autor (2015)

#### 5.4 ATIVIDADE CICATRIZANTE DE cEEPR

##### 5.4.1 Efeito de cEEPR sobre a massa corporal e consumo de água e ração

A Tabela 9 mostra os valores da massa corporal e consumo de água e ração dos animais submetidos ao modelo de cicatrização cutânea nos tratamentos de sete e 14 dias com cEEPR. Entre os grupos, observa-se que aqueles tratados com cEEPR 0,25% apresentou, no tratamento de 14 dias maior consumo de ração e também maior peso. Além disso, não foram verificadas alterações comportamentais e morte de animais durante os períodos analisados.

Tabela 9 – Efeito de cEEPR sobre a massa corporal e o consumo de água e ração nos tratamentos de 7 e 14 dias.

Parâmetro	Tratamentos (dias)	CN	CP	cEEPR		
				0,10%	0,25%	0,50%
Massa Corporal (g)	7	136,75 ± 11,24	138,89 ± 3,72	142,62 ± 13,41	131,95 ± 10,52	140,48 ± 12,06
	14	178,23 ± 16,15	184,87 ± 5,37	183,89 ± 15,50	194,37 ± 19,42*	188,15 ± 17,11
Água (mL)	7	179,38 ± 49,16	191,25 ± 47,18	206,88 ± 49,99	173,13 ± 56,87	189,00 ± 47,33
	14	205,66 ± 40,43	186,33 ± 27,61	217,33 ± 31,33	225,66 ± 18,50	204,00 ± 27,07
Ração (g)	7	264,00 ± 29,09	258,25 ± 30,38	287,88 ± 26,07	276,75 ± 24,39	282,63 ± 23,38
	14	262,46 ± 11,31	264,73 ± 16,50	279,66 ± 30,50	295,53 ± 15,90***	281,93 ± 22,59











Os valores correspondem à média ± E.P.M. (n = 6). Análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ ; diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo e CP = Controle positivo.

#### **5.4.2 Efeito de cEEPR sobre a análise macroscópica do processo de cicatrização nos tratamentos de 7 e 14 dias**

O Quadro 4 apresenta fotos representativas dos grupos tratados com cEEPR no tratamento de sete dias, destacando os dias 0 e sete. Foi observado que, após remoção do fragmento da pele (dia 0), houve a presença de vermelhidão ao redor da lesão seguida de inchaço do tecido. Assim como observado no tratamento com EEPR, foi verificada uma exsudação serosa até o 4º dia de tratamento nos animais do grupo controle, enquanto os grupos tratados com cEEPR e dexametasona (creme) essa exsudação permaneceu até o 2º dia. Crostas mais delgadas e estruturadas foram constatadas nos grupos tratados com cEEVP e dexametasona a partir do 3º dia, enquanto crostas espessas e ressecadas foram notadas no grupo controle após 4 dias de tratamento. O desprendimento espontâneo das crostas começou em alguns animais de todos os grupos a partir do 5º dia de tratamento, indicando a ocorrência de re-epitelização. No 7º dia, o desprendimento total das crostas e o fechamento das lesões demonstraram que o processo de cicatrização se encontrava na fase de finalização. No entanto, foi verificado que esse processo estava mais tardio no grupo controle negativo.











O tratamento realizado por 14 dias demonstrou que, nos primeiros sete dias, cEEPR produziu efeitos sobre o processo de cicatrização semelhantes aqueles observados no tratamento de sete dias com cEEPR (Quadro 4). No entanto, após 14 dias, cEEPR promoveu uma completa cicatrização das lesões (Quadro 5), sendo visualizados pelo fechamento das lesões de todos os grupos.

Quadro 4 - Efeito de cEEPR sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar no tratamento de 7 dias.

GRUPO	DIA 0	DIA 7
Controle negativo		
Controle positivo		
cEEPR 0,10%		
cEEPR 0,25%		
cEEPR 0,50%		

Fonte: O autor (2015)

Quadro 5 - Efeito de cEEPR sobre o processo de cicatrização em ratos Wistar no tratamento de 14 dias.

GRUPO	DIA 0	DIA 14
Controle negativo		
Controle positivo		
cEEPR 0,10%		
cEEPR 0,25%		
cEEPR 0,50%		

Fonte: Autor (2015)

#### 5.4.3 Efeito de cEEPR sobre a área da lesão nos tratamentos de 7 e 14 dias

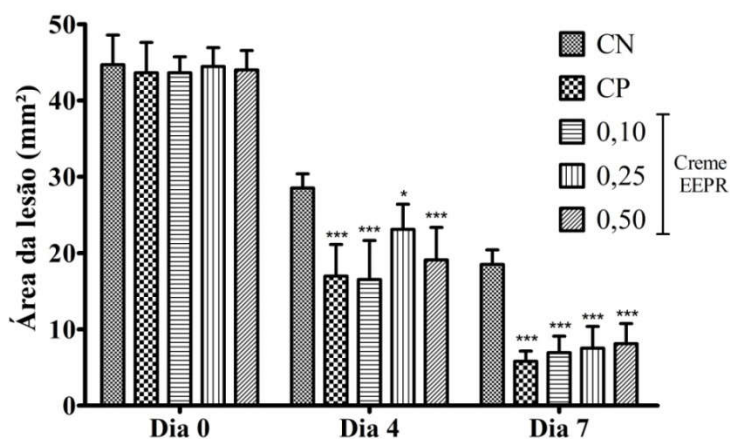
O Gráfico 14 apresenta os valores da área das lesões, observando que, ao final dos sete dias de tratamento, o grupo controle negativo (CN) apresentou grau de contração da ferida de 58,62% em relação ao dia 0. O grupo controle positivo (CP), tratado com dexametasona, produziu uma redução significativa da área da lesão. Nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50%, cEEPR, apresentou grau de contração de 84, 83 e 81%, respectivamente.



A área da lesão também foi avaliada durante 14 dias de tratamento e é mostrada no Gráfico 15. Neste gráfico, é possível observar que o resultado de sete dias de tratamento foi similar aquele demonstrado no Gráfico 14. No 14º dia de tratamento, exceto o grupo controle negativo, houve um completo fechamento das lesões nos grupos avaliados.

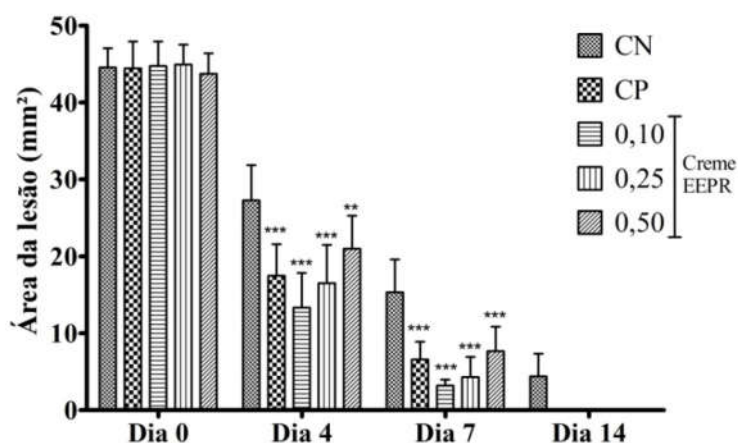
Considerando o grau de contração, o grupo controle negativo apresentou medidas superiores aos demais grupos em todos os dias avaliados: 41% (dia 4), 65% (dia 7) e 90% de grau de contração ao 14º dia. cEEPR, nas concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% e dexametasona apresentaram grau de contração 100% no tratamento de 14 dias, demonstrando completo fechamento das lesões.

Gráfico 14 - Efeito de cEEPR sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar no tratamento de 7 dias.



Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de quatro fragmentos de orelhas. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo, CP = Controle positivo (Dexametasona), Creme EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida* incorporado a creme base Lanette®.  
Fonte: O autor (2015).

Gráfico 15 - Efeito de cEEPR sobre a área das lesões induzidas em ratos Wistar no tratamento de 14 dias.



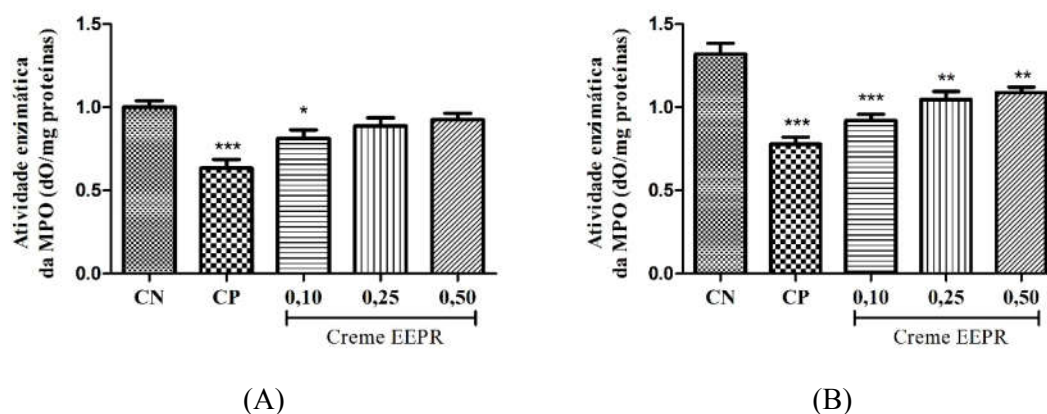
Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de quatro fragmentos de orelhas.  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ; diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo, CP = Controle positivo (Dexametasona), Creme EEPR = Extrato etanólico de *P. rigida* incorporado a creme base Lanette®.

Fonte: O autor (2015).

### 5.3.4 Efeito de cEEPR sobre a atividade de MPO nos tratamentos de 7 e 14 dias

O Gráfico 16 apresenta os valores obtidos da atividade de MPO nos diferentes grupos tratados por sete e 14 dias. É observado que o grupo controle positivo, dexametasona, foi capaz de inibir significativamente ( $p < 0,001$ ) a atividade de MPO e a concentração de 0,10 % de cEEPR inibiu a atividade em 18,83% ( $p < 0,05$ ), em relação ao grupo controle negativo (Gráfico 16A). Após 14 dias de tratamento, dexametasona, controle positivo, inibiu a atividade de MPO em 41,09% (Gráfico 16B). Neste gráfico, é também observado que as concentrações de 0,10, 0,25 e 0,50% reduziram ( $p < 0,001$  ou  $p < 0,01$ ) a atividade de MPO em 30,29, 20,74 e 17,66%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle negativo (CN).

Gráfico 16 - Efeito de cEEPR sobre a atividade de MPO no processo cicatrização em ratos Wistar nos tratamentos de 7 e 14 dias.



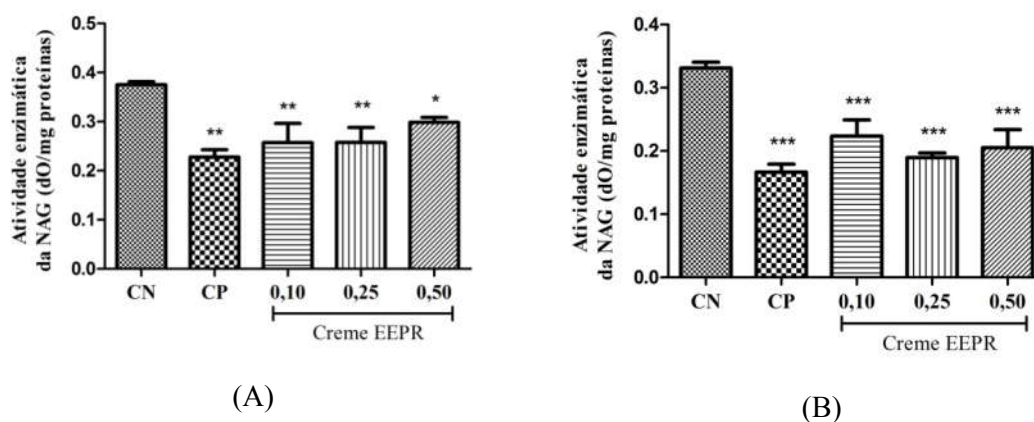
(A) Tratamento de 7 dias. (B) Tratamento de 14 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de quatro fragmentos de orelhas. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo, CP = Controle positivo (Dexametasona), cEEPR = Creme do extrato etanólico de *P. rigida*.

Fonte: O autor (2015).

#### 5.4.5 Efeito de cEEPR sobre a atividade de NAG nos tratamentos de 7 e 14 dias

O efeito de cEEPR sobre a atividade de NAG nos diferentes grupos tratados por sete e 14 dias é mostrado no Gráfico 17. Após sete dias de tratamento, a dexametasona, controle positivo, inibiu a atividade de NAG em 38,01% ( $p < 0,01$ ) (Gráfico 17A). Neste período de avaliação, 0,10 e 0,25% reduziram a atividade de NAG em 29,68 e 29,32%, respectivamente, quando comparada ao grupo controle negativo. O tratamento de 14 dias com cEEPR promoveu uma inibição da atividade de NAG em 49,75 (dexametasona), 32,63 (0,10%), 42,98 (0,25%) e 38,21% (0,50%) em relação ao grupo tratado com solução fisiológica (controle negativo) (Gráfico 17B).

Gráfico 17 - Efeito de cEEPR sobre a atividade de NAG sobre o processo cicatrização em ratos Wistar nos tratamentos de 7 e 14 dias.



(A) Tratamento de 7 dias. (B) Tratamento de 14 dias. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de quatro fragmentos de orelhas. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; diferente do grupo controle após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-Keuls. CN = Controle negativo, CP = Controle positivo (Dexametasona), cEEPR = Creme do extrato etanólico de *P. rigida*.

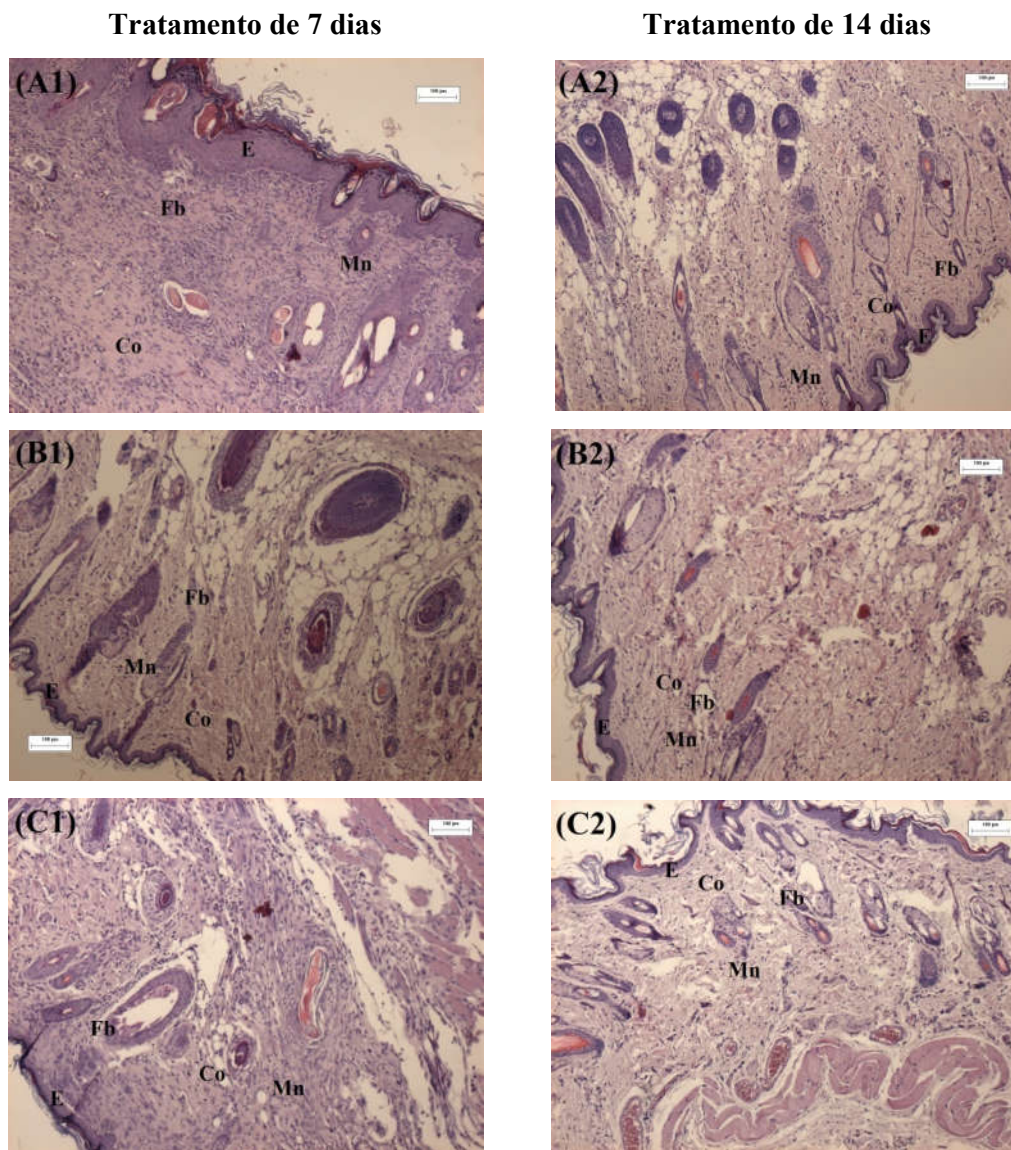
Fonte: O autor (2015).

### 5.3.6 Análise histopatológica de tecido cicatrizado nos tratamentos de 7 e 14 dias com cEEPR

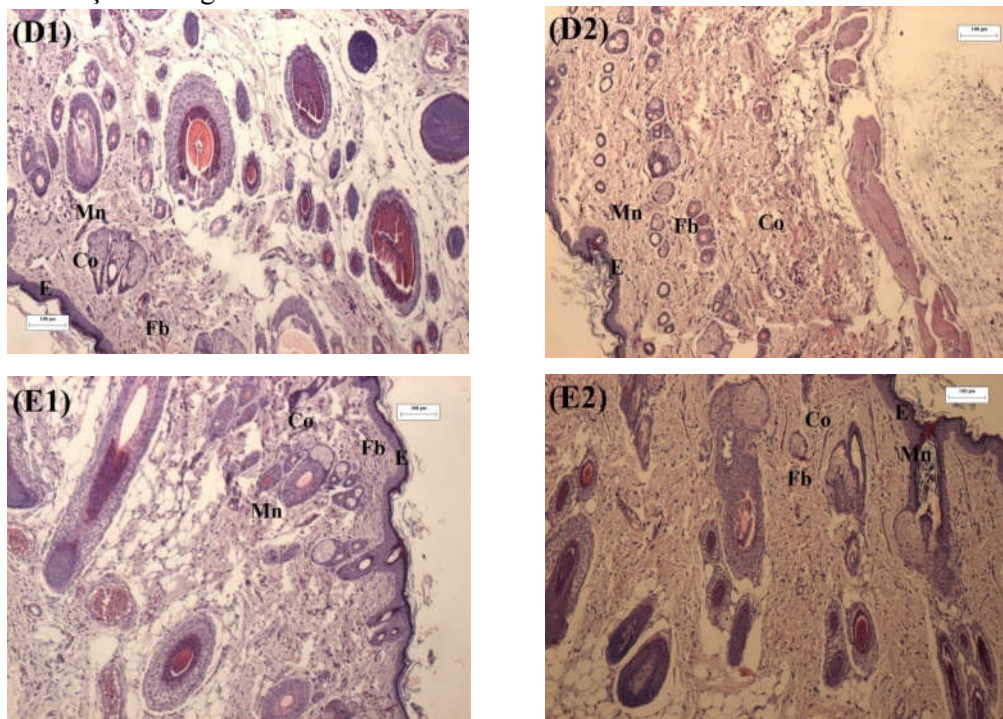
Após sete e 14 dias de tratamento com cEEPR, cortes histológicos de tecidos cicatrizados foram corados com HE (hematoxilina e eosina) e analisadas em microscopia ótica nas objetivas de 10x e 20x para observação de possíveis alterações morfológicas (Figura 25). O tratamento de sete dias produziu uma epiderme (E) mais espessa com hiperplasia, maior intensidade de mononucleares (Mn), colágeno (Co) menos condensado e presença de fibroblasto (Figura 24A1) com maior intensidade no grupo controle negativo. Neste grupo, a epiderme (E) tornou-se menos espessa com redução da hiperplasia, os mononucleares (Mn) com menor intensidade, o colágeno apresentou-se mais condensado e menor após 14 dias de tratamento (Figura 24A2). O tratamento com dexametasona (controle positivo) reduziu a espessura da epiderme, o processo inflamatório (pouca presença de mono e polimorfonucleares), produziu uma maior proliferação de colágeno e menos fibroblastos, mostrando finalização do processo de cicatrização (Figuras 24B1 e 24B2) em ambas as fases do estudo (sete e 14 dias). Considerando o tratamento com cEEPR (0,10, 0,25 e 0,50%), houve uma aceleração do processo de cicatrização observado através da diminuição da espessura da epiderme, proliferação de colágeno, redução de fibroblastos e redução dos parâmetros inflamatórios com diminuição de mono e polimorfonucleares após sete (Figuras 24C1 a 24E1) e 14 dias de tratamento (Figuras 24C2 a 24E2). Além disso, foram também observados outros

tecidos e anexos, tais como tecido adiposo, folículos pilosos e tecidos glandulares (glândulas sebácea e sudorípara).

Figura 24 - Fotomicrografia do tecido cicatrizado de ratos Wistar nos tratamentos de 7 e 14 dias com cEEPR.



Continuação da Figura 24...



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

Fonte: O autor (2015)

## 6 DISCUSSÃO

As folhas e hastes de *Palicourea rigida*, pertencente à família Rubiaceae, conhecida popularmente como bate-caixa, gritadeira e douradão, tem sido utilizada na medicina tradicional na forma de decocto para o tratamento de doenças do sistema urinário e como diurética (VENCATO et al., 2006). Além disso, a população rural de Minas Gerais faz uso das folhas e raízes para doenças da pele, especialmente em caso de sífilis, e das folhas e casca do caule, na forma de decocto, como depurativo para doenças renais e inflamações ovarianas (GRANDI et al., 1989). Atividades citotóxica (SILVA et al., 2006), antimicrobiana (VENCATO et al., 2006), antioxidante e anti-inflamatória (ROSA et al., 2010) têm sido relatadas para a referida espécie, enquanto triterpenos derivados da friedelanona (BOLZANI; TREVISAN; YOUNG, 1992), iridóide loganina (LOPES et al., 2004) e alcaloide indólico vallesiachotamina (VENCATO et al., 2006) foram substâncias identificadas. No entanto, as atividades anti-inflamatória tópica e cicatrizante têm sido pouco exploradas para *P. rigida*, tornando-se a principal hipótese da presente investigação. Para isto, extrato etanólico das folhas de *P. rigida* (EEPR) e um creme dermatológico desenvolvido com EEPR (cEEPR) foram usados para realização deste estudo.

Os resultados obtidos na caracterização química por CLUE-UV-EM do extrato etanólico das folhas de *P. rigida* se assemelham com os dados da literatura referente ao perfil fitoquímico da espécie, sendo encontrado o iridóide loganina, já isolado na espécie (MOREL et al., 2010) e com ação imunomoduladora (MATHAD et al., 1998), anti-inflamatória (PARK et al., 2007), analgésica, hepatoprotetora e nefroprotetora (XU, 2006; YAMABE et al., 2010). Estudos também sugerem que a loganina pode aumentar o conteúdo de osteocalcina e de colagênio de tipo I, sendo indicado para o tratamento da osteoporose (LI et al., 2010). A quercetina 3-(6-*O*-acetil- $\beta$ -glicosídeo) já foi descrita em plantas da família asteraceae (HARBORNE, MABRY, MABRY, 1975).

A análise da fração hexânica por CG-EM confirmou a presença de substâncias mais apolares, algumas exercem atividade antioxidante significativa como a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e o gama tocoferol ambas com atividade antioxidante (COONEY et al., 1993). O ácido linoleico, também identificado, é característico por prevenir distúrbios em reações de hipersensibilidade do tipo I, doenças auto-imunes e inflamações de mucosas (HONTECILLAS et al., 2002; WHIGHAM et al., 2002). Também foram identificados os fitoesteróis: campesterol, estigmasterol e gama sitosterol, vários resultados sugerem que os fitoesteróis, como o sitosterol são responsáveis, pelo menos em parte, por efeitos de prevenção do desenvolvimento de doenças causadas por espécies reativas de oxigênio (VIVACONS;

MORENO, 2005). O terpeno fitol, identificado pela técnica cromatográfica também apresenta propriedades biológicas importantes, estando relacionado com a atenuação da resposta inflamatória através da inibição da migração de neutrófilos que é causada em parte por redução da IL-1 $\beta$  e diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  e stress oxidativo (SILVA et al., 2014). O esqualeno é uma substância triterpênica intermediária na biossíntese de esteróides que tem sua atividade anti-oxidante amplamente descrita (HUANG; LIN; FANG, 2009; AIOI; SHIMIZU; KURIYAMA, 1995) além de apresentar sinergismo em sua atividade na presença de  $\alpha$ -tocoferol e  $\gamma$ -tocopherol (FINOTTI et al., 2000).

Os dados espectroscópicos adquiridos nas análises de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o composto C2F4 demonstram grande similaridade com os descritos por Melos e colaboradores (2007) e Rosa e colaboradores (2010) para o flavonoide quercetina 3-O- $\beta$ -D-glicosídeo que tem sido isolado das espécies de *Prangos ferulaceae* (Apiaceae) (RAZAVI et al., 2009), *Euphorbia retusa* (Euphorbiaceae) (HARRAZ, 2009), *Rosa nutkana* (Rosaceae) (JOVEL et al., 2007) e *Desmostachia bipinnata* (Gramineae) (AWAAD et al., 2008), bem como de *Palicourea rigida* (ROSA et al., 2010). A comparação da fragmentação de massas do composto também apresentou similaridade aos dados descritos na literatura (NEGRI et al., 2013; TATKE et al., 2014).

A quercetina 3-O- $\beta$ -D-glicosídeo tem sido relacionada à atividade antioxidante, anti-inflamatória e fitotóxica (RAZAVI et al., 2009). A forma glicosilada da quercetina pode indicar que esta substância pode ser encontrada na forma aglicona em algum momento de sua biossíntese. Além disso, a presença de quercetina em sua forma aglicona tem sido associada à modulação de células envolvidas na inflamação (ex. linfócitos e neutrófilos), inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (ex. TNF- $\alpha$  e IL-1) e modulação de enzima formadora de óxido nítrico, das enzimas fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase (enzimas da via do ácido araquidônico) (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008; NIJVEDLT et al., 2001; BOOTS; HAENEN; BAST, 2008).

O processo inflamatório constitui um mecanismo de reação dos tecidos que se caracteriza pela saída de líquidos e células (exsudação) com indução de reparo celular. Neste processo, predominam cinco sinais denominados cardinais que são calor, rubor, tumor, dor e perda da função (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; NEHER et al., 2011). O calor e o rubor são decorrentes da vasodilatação ocasionada, principalmente, por óxido nítrico e prostaglandinas que promovem uma maior quantidade de sangue (hiperemia) local, produzindo um aspecto de vermelhidão. Além disso, o aumento da permeabilidade vascular gera o extravasamento de líquidos, produzindo um aumento da espessura do edema que caracteriza o



tumor. Essas alterações teciduais culminam no surgimento da dor que é decorrente da compressão dos nervos pela ativação dos nociceptores e ação de mediadores inflamatórios, tais como prostaglandinas, leucotrienos e cininas, em receptores específicos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; NEHER et al., 2011). Com isso, pode ocorrer perda da função do tecido de forma total ou parcial. Considerando esses aspectos, os modelos de edema de orelha induzidos por diferentes agentes flogísticos são fundamentais para avaliar as potencialidades farmacológicas de substâncias sintéticas e naturais e produtos farmacêuticos dermatológicos (INOUE; NAGATA; KOSHIHARA, 1993; GÁBOR, 2000; DE YOUNG et al., 1989; BOUCLIER et al., 1990). Neste sentido, as substâncias indutoras de edema utilizadas nos experimentos da presente dissertação induzem uma inflamação cutânea com geração de mediadores pró-inflamatórios que promovem a vasodilatação, migração leucocitária e extravasamento de plasma, acarretando um processo inflamatório agudo semelhante às complicações de pele que ocorrem nos seres humanos e animais (DE BERNARDIS et al., 1994).

Com base na descrição acima, a atividade anti-inflamatória tópica de EEPR foi avaliada em modelos de edema de orelha induzido por diferentes agentes irritantes que causam alterações na fisiologia da pele. Além disso, a escolha desses modelos se deve ao uso de pequena quantidade de amostras, a rapidez na obtenção de resultados, a reprodutibilidade, assim como os resultados indicam que produtos ou substâncias têm a capacidade de penetrar o tecido cutâneo. Portanto, constitui um método importante para a investigação de novos medicamentos para doenças inflamatórias que acometem a pele (KAVELAARS et al., 2003; BOUCLIER et al., 1990; GÁBOR, 2003).

O modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton (*Croton tiglium* L.) em camundongos é largamente utilizado na pesquisa da atividade de agentes anti-inflamatórios de uso tópico, mas responde também à administração sistêmica de anti-inflamatórios esteroidais ou não esteroidais (BRASIL, 2014). As alterações fisiológicas são decorrentes da presença do acetato de tetradecanoil-forbol (TPA), um dos principais componentes do óleo de cróton, que ativa vias de mediadores da inflamação, liberando produtos como prostaglandinas, histamina e serotonina, entre outros (CASTAGNA et al., 1982). Esses produtos induzem estresse oxidativo e ativação de oncogenes (GARG; RAMCHANDANI; MARU, 2008) seguido de vasodilatação, infiltração de polimorfonucleares e edema (SARAIVA et al., 2011). Uma das enzimas envolvidas nesse processo é a proteína quinase C (PKC) que estimula a fosfolipase A2 (PLA2) com liberação do ácido araquidônico (AA) a partir de fosfolipídios de membrana. Sob a ação da ciclo-oxigenase ou lipoxigenase, o AA é convertido em mediadores inflamatórios como

prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LC), respectivamente (BRASH, 2001; FISCHER et al., 1990). Mediadores tais como óxido nítrico (NO) e citocinas inflamatórias, como IL-1 e TNF- $\alpha$ , também estão associados à fisiopatogenia da inflamação induzida por TPA (LOCKETTE; BRENNAMAN; OTSUKA, 1987). As enzimas que participam dessas vias promovem síntese e liberação de mediadores inflamatórios que, diretamente ou indiretamente, são alvos de inibição por fármacos anti-inflamatórios esteroidais (corticosteroides), como a dexametasona (ABRAHAM et al., 2006).

Após tratamento com EEPR, as medidas da massa e espessura do edema induzido por óleo de Cróton foram reduzidas de forma não dependentes da concentração (Gráfico 1). Essas medidas são complementares e corroboram entre si, mostrando que, embora existam variações, o efeito está apoiado por dois parâmetros que, normalmente, são usados em estudos de atividade anti-inflamatória tópica (CHIBLI et al., 2014). Apesar da diferença em magnitude, o efeito de EEPR foi similar à dexametasona (controle positivo) que é um fármaco com ação sobre os receptores nucleares, ativando a síntese de proteínas anti-inflamatórias ou inibindo a síntese de proteínas inflamatórias que, entre outros, bloqueiam a geração de mediadores da via do ácido araquidônico (KADMIEL; CIDLOWSKI, 2013; NEWTON, 2005; RHEN; CIDLOWSKI, 2005). Os controles negativo (acetona) e basal (acetona) encontraram-se também apropriados, pois não interferiram no efeito de EEPR. Além disso, a análise histopatológica do tecido das orelhas tratadas com EEPR revelou uma redução da espessura da derme e da epiderme, do edema, da vasodilatação e do número de leucócitos após 6 horas da indução do edema por óleo de cróton quando comparado ao grupo tratado com acetona. Portanto, neste experimento, o efeito anti-inflamatório tópico de EEPR está associado a uma redução da permeabilidade vascular e migração leucocitária que pode ser decorrente da inibição da via do AA, formação de radicais reativos ao oxigênio e síntese de citocinas pró-inflamatórias.

Após 2 h de aplicação do fenol, foram observadas alterações cutâneas indicativas de processo inflamatório que, de acordo com Kim e colaboradores (2004), mimetizam uma dermatite de contato que ocorre na pele humana e de animais. Segundo Murray e colaboradores (2007) e Wilmer e colaboradores (1994), o processo inflamatório induzido por fenol é decorrente da ativação de diferentes mecanismos, especialmente por sua ação sobre os queratinócitos com geração de mediadores pró-inflamatórios, tais como IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-8, metabólitos do AA e espécies reativas de oxigênio (ERO). As enzimas peroxidases e tirosinases podem intensificar esse processo através da oxidação do fenol em radicais fenoxilas que também iniciam a liberação e produção dos mediadores pró-inflamatórios (LIM; PARK; KIM, 2004; MURRAY et al., 2007). Considerando esses aspectos, o tratamento com EEPR reduziu

significativamente o edema de orelha, tanto a massa quanto a espessura, semelhante à ação da dexametasona (controle positivo). É possível que, além de inibir os diferentes mecanismos dos mediadores da inflamação, EEPR reduza a formação ou tem a capacidade de inibir a ação de radicais livres. Moraes (2013) e Rosa e colaboradores (2010) mostraram que *P. rigida* apresenta propriedade antioxidante que foi atribuída à presença de substâncias fenólicas, como os flavonoides. Além disso, os resultados da caracterização química identificaram substâncias, como quercetina 3-(6-*O*-acetil- $\beta$ -glicosídeo), gama-tocoferol e vitamina E, que são conhecidas por suas propriedades antioxidantes (BRACA et al., 2003; SALDEEN; LI; MEHTA, 1999; TRABER; ATKINSON, 2007).

Quando aplicada topicamente, capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenemida), um alcalóide presente em sementes e frutos carnosos de plantas do gênero *Capsicum*, promove uma resposta inflamatória neurogênica com formação de edema (GÁBOR, 2000; KWAK et al., 1998). Essa substância age como agonista dos receptores vaniloides de potencial transitório (TRPV1) que propaga estímulo via neurônio nociceptivo das fibras C, induzindo a liberação de neuropeptídeos, como substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Esses mediadores são capazes de produzir inflamação pela liberação de bradicinina, serotonina, histamina e PGs que ocasionam vasodilatação arteriolar, aumento do fluxo sanguíneo e eritema como resposta imediata (RANG et al., 2007; SZOLCSÁNYI, 2004; ZEGARSKA et al., 2006). EEPR inibiu a formação do edema (Gráfico 6), indicando que substâncias presentes nesse extrato podem antagonizar a ação da capsaicina pelo bloqueio dos receptores TRPV1, o que evitaria a ativação dos nociceptores. Outro possível mecanismo é o bloqueio dos receptores de histamina e serotonina, bem como a inibição da síntese de proteínas inflamatórias ou estimulação da síntese de proteínas anti-inflamatórias, o que pode resultar em uma ação analgésica e anti-inflamatória (OJEWOLE, 2005). Dessa forma, foi utilizada a dexametasona (anti-inflamatório esteroideal) como controle positivo que, assim como EEPR, promoveu a redução do edema no modelo supracitado (GÁBOR, 2000).

O ácido araquidônico, gerado a partir de fosfolipídio de membrana pela ação da fosfolipase A2 (PLA2), é um precursor das prostaglandinas e leucotrienos responsáveis por desencadear respostas inflamatórias (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). No presente estudo, o ácido araquidônico (AA) foi aplicado sobre a orelha de camundongos para induzir um processo inflamatório e elucidar possível mecanismo de ação de substâncias contidas no extrato EEPR sobre a via metabólica deste ácido. Por esta via, AA sofre ação das ciclo-oxigenase e/ou lipoxigenase, produzindo, entre outros, prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs), respectivamente, que são importantes mediadores da inflamação (RICCIOTTI; FITZGERALD,

2011; KAVELAARS et al., 2003). Esses mediadores, como PGE2, LTC4 e LTD4, causam efeitos que são observados pela formação de eritema e edema e migração de leucócitos (CRUMMEY et al., 1987; HUMES et al., 1986; YOUNG et al., 1984). O extrato EEPR mostrou-se efetivo na redução do edema induzido por AA tanto verificado pela redução da massa como pela espessura da orelha. Mesmo com menor intensidade, este efeito foi semelhante à indometacina (controle positivo), um anti-inflamatório não-esteroidal (AINE), inibidor da COX, que impede a síntese de prostaglandinas a partir do AA (RODA et al., 2007). Neste sentido, os resultados indicam que, em parte, um dos mecanismos de ação de EEPR envolve a inibição da via de AA com redução da produção de prostaglandinas e/ou leucotrienos.

Entre os eventos do processo inflamatório, a migração de leucócitos tem sido destacada em decorrência de seus mecanismos associados à interação ao endotélio vascular. Nas células endoteliais, esses mecanismos envolvem a expressão de moléculas de superfície (selectinas, ICAM-moléculas de adesão intercelular e integrinas), enquanto as células leucocitárias liberam agentes quimiotáticos como a IL-8, PAF, C5a, LTB4 e várias quimiocinas que podem recrutar mais leucócitos para os espaços intersticiais (NOURSHARGH; ALON, 2014; MULLER, 2013). Por sua vez, após chegada no interstício, os leucócitos neutrofilicos polimorfonucleares (neutrófilos) promovem a liberação de diversos agentes, tais como ROS, mediadores pró-inflamatórios e enzimas proteolíticas, como a mieloperoxidase (MPO), principalmente no início da inflamação (KLEBANOFF, 2005). Na fase mais tardia, os mononucleares liberam a enzima N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) que contribui para a manutenção do processo inflamatório (LEONI; DEAN, 1983).

Como alvo do presente estudo, a atividade da enzima MPO, nos modelos de inflamação induzida por óleo de cróton, fenol, capsaicina e ácido araquidônico, foi reduzida pela ação de EEPR e apresentou uma resposta similar aos controles positivos (dexametasona ou indometacina). EEPR também inibiu a atividade da enzima NAG no modelo de edema induzido por óleo de Cróton, mostrando que houve uma redução do processo inflamatório após 24 horas de tratamento com EEPR. Considerando esses aspectos, pode-se destacar que EEPR possui ação inibitória sobre as vias de sinalização da migração de leucocitária, o que pode ser corroborado pelas análises dos tecidos que mostraram redução na espessura do edema e no número de células inflamatórias.

Em decorrência da importante atividade anti-inflamatória tópica demonstrada neste trabalho, foi especulada uma nova hipótese para um possível efeito cicatrizante do extrato etanólico de *P. rigida*, pois uma das etapas da cicatrização é a fase inflamatória. Para isto, o extrato etanólico (EEPR) e o creme deste extrato (cEEPR) foram avaliados frente ao modelo de

lesões induzidas na região dorsal de ratos (PACHALY, 2006). Esse modelo é prático, de baixo custo, reprodutivo e confiável e a linhagem de rato Wistar foi usada pela facilidade de manuseio, acomodação, resistência à agressão cirúrgica e baixa mortalidade frente a infecções (SIMÕES et al., 1985; MARTINS et al., 2006; KASHYAP; BEEZHOLD; WISEMAN, 1995). Foram também escolhidos ratos machos e adultos para evitar a interferências que, normalmente, ocorrem nas fêmeas devido às variações hormonais do ciclo estral, o que ocasionariam alterações no mecanismo de reparação tecidual (HARRIS; STOPAK; WILD, 1981; GOLDENBERG; BELIVACQUA, 1981).

Considerando as etapas da cicatrização de tecidos lesionados, o crescimento de micro-organismo e a resposta inflamatória iniciam o processo após ruptura do tecido epitelial e conjuntivo (MECKLENBURG et al., 2013). O aumento do fluxo sanguíneo, a permeabilidade vascular com extravasamento do plasma, a ativação de plaquetas e a migração de leucócitos são características da inflamação seguida da formação de fibrina e coágulo com crosta que recobre a ferida iniciando a cicatrização (MECKLENBURG et al., 2013; BELIVACQUA et al., 1981). As primeiras células a migrarem para a região lesionada são os neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, as quais são produtoras de substâncias quimiotáticas, destacando o papel dos eicosanoides (leucotrienos, TX e PGs) e quimiocinas (IL-1 e TNF- $\alpha$ ) que acionam e mantêm a inflamação (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Neste sentido, os resultados apresentados na presente investigação evidenciaram baixo sinal de infecção e uma maior rapidez na redução do processo inflamatório nos grupos tratados com EEPR e creme cEEPR. Provavelmente, a ação anti-inflamatória tópica descrita e o efeito anti-inflamatório mostrado por Moraes (2013) tenham contribuído para estes achados. Portanto, a ausência de um processo infeccioso drástico e a diminuição da inflamação proporcionaram uma reparação mais rápida da lesão com o aparecimento de uma crosta que separou o tecido lesionado do meio ambiente.

Um dos mecanismos envolvidos no processo de cicatrização é a formação de crostas que ocorre devido à deposição de tecido de granulação sobre a área lesionada para ser substituída por tecido conjuntivo denso e promover uma maior proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (MECKLENBURG et al., 2013; BAUM; ARPEY, 2005). Neste evento, a lesão tende ao fechamento pela ação da contração das bordas com participação de citocinas, como fator  $\beta$  transformador do crescimento (TGF- $\beta$ ), e redução de sinais e efeitos quimiotáticos decorrentes da inflamação (WERNER; GROSE, 2003; BARRIENTOS et al., 2008). Com base nesses aspectos, os resultados mostraram que as crostas das lesões induzidas nos animais foram desenvolvidas mais rapidamente nos grupos tratados com EEPR e cEEPR, assim como com Dersani<sup>®</sup> e dexametasona (controles positivos) quando comparados aos grupos que receberam

salina e creme base Lanette® (controles negativos). É provável que EEPR e cEEPR tenham a ação de induzir a formação e maturação do tecido de granulação, promovendo uma maior organização das fibras no tecido e acelerando o fechamento das lesões.

Um dos parâmetros avaliados no processo de cicatrização foi a área das lesões que reduziram no decorrer do tempo com tendência ao completo fechamento, particularmente entre 12 e 14 dias de tratamento (SINGER; CLARK, 1999). Com base nos resultados, quando comparadas aos grupos controles (salina e creme Lanette®), as lesões tratadas com EEPR, cEEPR, Dersani® e dexametasona, em sete e 14 dias, foram reduzidas significativamente em relação à área e ao grau de contração, mostrando efeito cicatrizante promissor do extrato etanólico de *P. rigida*. No 14º dia, o grau de contração foi maior do que no 7º dia, entretanto, a diferença do 14º dia entre grupos tratados com EEPR e cEEPR e o grupo controle foi reduzida, provavelmente, devido ao processo natural da cicatrização. Como previsto nos trabalhos de Borges (2011) e Batista e colaboradores (2010), o creme base Lanette® (controle negativo) não interferiu na propriedade cicatrizante de EEPR. No entanto, é interessante destacar que a forma de creme permite uma maior permanência de EEPR sobre as lesões, tornando-as mais úmidas e favorecendo a biodisponibilidade e, conseqüentemente, o tratamento. Ao contrário, solução de EEPR se espalha mais rapidamente e o veículo tende a evaporar após aplicação. Outro importante achado observado, foi a presença de crostas mais delgadas e úmidas nos grupos tratados com EEPR e cEEPR, o que pode corroborar com o efeito direto do extrato sobre a redução das lesões.

Levando em consideração a análise histopatológica, após os dias sete e 14, foram observadas a presença de mononucleares e maior intensidade de fibroblastos e fibras colágenas nos grupos tratados com EEPR e cEEPR, demonstrando um efeito positivo no processo de cicatrização. A diminuição de neutrófilos e o aumento na proliferação capilar na reparação tecidual e angiogênese com geração de brotos endoteliais e vasos sanguíneos, o que permite um maior fluxo sanguíneo também deve ter contribuído significativamente para a reparação desse processo (SANCHEZ-NETO et al., 1993; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; VIDINSKÝ et al., 2006; BARRIENTOS et al., 2008; MONACO; LAWRENCE, 2003). Além disso, não foi observada uma superprodução de colágeno, o que poderia ocasionar a formação de uma cicatriz hipertrófica (RIBEIRO et al., 2004; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A redução das atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG), quantificada em fragmentos de pele, foi um importante achado, pois foi verificado a presença do processo inflamatório após sete e 14 dias de tratamento com EEPR e cEEPR. Foi observada uma inibição da atividade dessas enzimas nos grupos tratados com

EEPR, cEEPR, Dersani<sup>®</sup> e dexametasona (controles positivos) em comparação aos grupos controles negativos (salina e creme Lanette<sup>®</sup>). Essa inibição foi mais evidenciada na atividade da enzima NAG, uma vez que os mononucleares permanecem no tecido danificado após 24 horas da indução da lesão (KRAWISZ et al., 1984; BAILEY, 1988). No entanto, a atividade da MPO é indicativa da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido, pois ativa mecanismos bactericidas dependentes de O<sub>2</sub> contra microrganismos patogênicos. Dessa forma, sua atividade está relacionada à resposta imune inata, sendo considerada uma enzima pró-oxidante e microbicida liberada e ativada durante o processo de fagocitose dos neutrófilos. Além disso, participa de diferentes mecanismos fisiológicos e deletérios associados à sinalização celular (CAMPA, 2009; PEREIRA et al., 2000).

Considerando os resultados apresentados na presente Dissertação, pode-se destacar que EEPR e cEEPR contribuíram para o reparo de lesões induzidas em ratos, evidenciando o efeito cicatrizante que pode estar associado a sua atividade anti-inflamatória, bem como a presença de substâncias flavonoidicas e terpênicas, entre outras, detectadas em *P. rigida* (MORAES, 2013; ROSA et al., 2010). Esses dados, somados às aplicações tradicionais, implicam em uma alternativa terapêutica para o tratamento de distúrbios que acometem a pele.

## 7 CONCLUSÃO

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

1. *Palicourea rigida* apresentou uma ampla variedade de substâncias do metabolismo especial, destacando-se: loganina, quercetina 3-(6-*O*-acetil- $\beta$ -glicosídeo), ácido palmítico, fitol, ácido linoleico, esqualeno, gama tocoferol, vitamina E, campesterol, estigmasterol, gama sitoesterol e quercetina 3-*O*- $\beta$ -D-glicosídeo;
2. O extrato etanólico das folhas de *P. rigida* apresentou atividade anti-inflamatória tópica em diferentes modelos *in-vivo* e *in-vitro*;
3. O extrato etanólico e o creme dermatológico das folhas de *P. rigida* apresentaram atividade cicatrizante;
4. Portanto, os resultados indicam que o extrato etanólico das folhas de *P. rigida* são fontes de substâncias ativas com atividades anti-inflamatória tópica e cicatrizante que justificam o uso tradicional do “bate-caixa” e evidenciam que a espécie possui potencialidades terapêuticas para a geração de produtos inovadores para a saúde humana e animal.



## REFERÊNCIAS

ABRÃO, R. **As ervas e a saúde** – A farmácia no cerrado. Ed. de autor. Campo Grande, MS: Produtora M, 303 p., 2010.

Acheflan. Gabriela Mallmann. Garulhos: Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A., 2012. Bula de remédio.

AIOI, A.; SHIMIZU, T.; KURIYAMA, K. Effect of squalene on superoxide anion generation induced by a skin irritant, lauroylsarcosine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 2, p. 159-164, 1995.

ALAGAMMAL, M., TRESINA, P.S., MOHAN, V.R. GC-MS determination of bioactive components of *Polygala javana* dc. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 2, p. 42-44. 2012.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 687-689, 2006.

ALBURQUERQUE, E.R.C. **Avaliação clínica e histológica de feridas cutâneas tratadas por segunda intenção com lectina de *Craulyias mollis* em camundongos**. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2005.

AMORIM, E.; MATIAS, J.E.F; COELHO, J.C.U.; CAMPOS, A.C.L.; STAHLKE Jr H.J.; TIMI, J.R.R.; ROCHA, L.C.A.; MOREIRA, A.T.R.; RISPOLI, D.Z; FERREIRA, L.M. Efeito do uso tópico do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (bagaço) na cicatrização de feridas cutâneas: estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 2, p.67-76, 2006.

ANVISA. **Formulário de Fitoterápicos**. Brasília, 125 p., 2011.

ANVISA. **Medicamentos fitoterápicos** – Informações gerais. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/4q>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; COLVILE-NASH, P.R.; WILOUGHBY, D.A. Temporal and spatial immunolocalization of cytokines in murine chronic granulomatous tissue. **Laboratory Investigation**, v. 69, n. 4, p. 405-414, 1993.

AWAAD A.S., MOHAMED N.H., MALTLAND D.J., SOLIMAN G.A. Anti-ulcerogenic activity of extract and some isolated flavonoids. **Record of Natural Products**, v. 2, p. 76-82, 2008.

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

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

- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.
- BARBOSA, M.R.; ZAPPI, D.; TAYLOR, C.M.; CABRAL, E.L.; JARDIM, J.G.; PEREIRA, M.S.; CALIÓ, M.F.; PESSOA, M.C.R.; SALAS, R.; SOUZA, E.B.; DI MAIO, F.R.; MACIAS, L.; ANUNCIACÃO E.A.; FILHO, G.P. Rubiaceae. In: R. FORZZA, R. (Org.). **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v.2, p. 1545-1591, 2010.
- BARRIENTOS, S.; STOJADINOVIC, O.; GOLINKO, M.S.; BREM, H.; MARJANA, T.C. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound repair and regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.
- BARROSO, G.M.; GUIMARÃES, E.F.; ICHASO, C.L.F.; COSTA, C.G.; PEIXOTO, A.L.; LIMA, H.C. Rubiaceae. In: BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Feral de Viçosa, p. 189-229, 1986.
- BARZOTTO, I. L. M.; OLIVEIRA, S. M. M.; TAVARES, B.; DALLABRIDA, S. Stability of emulsions front of different techniques of Homogenization and cooling. **Visão Acadêmica**. v. 10, n. 2, p. 36-42, 2009.
- BATISTA, J.S.; OLINDA, R.B., MEDEIROS, V.B.; RODRIGUES, C.M.F.; OLIVEIRA, A.F.; PAIVA, E.S.; FREITAS, C.I.A.; MEDEIROS, A.C. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, p.136-141, 2011.
- BATISTA, J.S.; SILVA, A.E., RODRIGUES, C.M.F.; COSTA, K.M.F.M.; OLIVEIRA, A.F. PAIVA, E.S.; NUNES, F.V.A.; OLINDA, R.G. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p.441-447, 2010.
- BAUM, C.L.; ARPEY, C.J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatologic surgery*, v. 31, n. 6, p. 674-686, 2005.
- BEVILACQUA, M.P.; AMRANI, D.; MOSESSON, M.W.; BIANCO, C. Receptors for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin) on human monocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 153, n. 1, p.42-60, 1981.
- BISPO, M.D.; MOURÃO, R.H.V.; FRANZOTTI, E.M.; BOMFIM, K.B.R.; ARRIGONI M.D.F.; MORENO, M.P.N.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A.R.. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 81-86, 2001.
- BOLZANI, V.S.; TREVISAN, L.M.V.; YOUNG, M.C.M. Triterpenes of *Palicourea rigida* H. B. K. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 23, n. 1, p. 20-21, 1992.
- BOOTS, A.W., HAENEN, G.R., BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European journal of pharmacology**, v. 585, n. 2, p. 325-337. 2008.

BORGES, M.D. **Avaliação dos extratos da *cassia occidentalis* na cicatrização de feridas cutâneas causadas por indução de veneno de *bothrops moojeni* em camundongos.** Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2011.

BOS, A., WEVER, R., ROOS, D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 525, n. 1, p. 37-44, 1978.

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

BRACA, A.; POLITI, M.; SANOGO, R.; SANOU, H.; MORELLI, I.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6689-6695, 2003.

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

BRASH, A.R. Arachidonic acid as a bioactive molecule. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 11, p. 1339-1345, 2001.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº. 899. Guia para Validação de Metodologias Analíticas**, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Atos do Poder Executivo. Decreto n. 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas** / Ministério da Saúde, Secretariade Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília: Ministério da Saúde, p. 56, 2002.

BREMER B., JANSEN R.K., OXELMAN B., BACKLUND M., LANTZ H., KIM K.J. More characters and more taxa for a robust phylogeny-case study from the coffee family (Rubiaceae). **Systematic Biology**. v.48, n. 3, p. 413-435, 1999.

BREMER, B. Phylogenetic studies within Rubiaceae and relationships to other families based on molecular data. **Opera Botanica**, v.7, p. 33-50, 1996.

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

CAMPA, A. **Atividade de mieloperoxidase e formação de oxigênio singlete em monócitos, macrófagos e células dendríticas: localização versus atividade**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A.L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿indicadores de dependencia o factores de desarrollo? **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 22, n. 3, p. 265-278, 2003.

CAPELARI-OLIVEIRAI, P.; PAULA, C.A.; REZENDE, S.A.; CAMPOS, F.T.; GRABE-GUIMARÃES, A.; LOMBARDI, J.A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian "Arnica"). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 15-25, 2011.

CARVALHO, A.B.C.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-19, 2008.

CASTAGNA M.; TAKAI Y.; KAIBUCHI K.; SANO K.; KIKKAWA U.; NISHIZUKA Y.; Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, p. 7847-7851, 1982.

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

CHIBLI, L.A.; RODRIGUES, K.C.; GASPARETTO, C.M.; PINTO, N.C.; FABRI, R.L.; SCIO, E., ALVES M.S.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O.V. Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 330-338, 2014.

CHOI, S. Characterization of ion fragmentation of fatty acids. **Bulletin of the Korean chemical society**, v. 18, n. 6, p. 573-578, 1997.

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

CONSOLARO, H.N. **A distilia em espécies de rubiaceae do bioma cerrado**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2008.

COONEY, R.V., FRANKE, A.A., HARWOOD, P.J., HATCH-PIGOTT, V., CUSTER, L.J., MORDAN, L.J.  $\gamma$ -Tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: Superiority to  $\alpha$ -tocopherol. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 90, n. 5, p. 1771-75, 1993.

COSTA, V.B.; COUBE, C.S.; MARINHO, B.G.; MATHEUS, M.E.; LEITÃO, S.G.; FERNANDES, P.D. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Bouchea fluminensis*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 4, p. 364-371, 2003.

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

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; YANG, S.S. Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 488-498, 2006.

CRONQUIST, A. **An integrated system of flowering plants**. New York: Columbia University Press. 1262 p., 1981.

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

DAUGHERTY, A.; DUNN, J. L.; RATERI, D. L.; HEINECKE, J. W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **Journal of Clinical Investigation**, n 94, n. 1, p. 437 444, 1994.

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

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, n. 3-4, p. 335-341, 1989.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products** – A biosynthetic approach. 3<sup>a</sup> ed. University of Nottingham, UK: Willey, 539 p., 2009.

EL-SEEDI, H. Coumarins, benzoic acids and terpenoids from *Palicourea demissa*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 27, p. 13-16, 1999.

ENGLER, S.A. Syllabus der Pflanzenfamilien. Berlin: **Gebrücher Borntraeger**, v. 2, p. 418-421, 1964.

FINOTTI, E.; D'AMBROSIO, M.; PAOLETTI, F.; VIVANTI, V.; QUAGLIA, G. Synergistic effect of  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -sitosterol and squalene on antioxidant activity assayed by crocin bleaching method. **Die Nahrung**, v. 44, n. 5, p. 373–374, 2000.

FISCHER, T.H.; GRIFFIN, A.M.; BARTON, D.W.; WHITE, G.C. Kinetic evidence that arachidonate-induced calcium efflux from platelet microsomes involves a carrier-type ionophoric mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1022, n. 2, p. 215-228, 1990.

FRANZOTTI, E.M.; SANTOS, C.V.F.; RODRIGUES, H.M.S.L.; MOURÃO, R.H.V.; ANDRADE, M.R.; ANTONIOLLI, A.R. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (malva-branca). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 273-278, 2000.

FURSTENBERGER, B.I.; CSUK-GLANZER, F.; MARKS, D.K. Phorbol ester-induced leukotriene biosynthesis and tumor promotion in mouse epidermis. **Carcinogenesis**, v. 15, n. 12, p. 2823-2827, 1994.

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

GÁBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

GÁBOR, M.; RÁZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents and Actions**. n. 36, n. 1-2, p. 83-86, 1992.

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

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

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

GOTTLIEB, O.R. Phytochemicals: differentiation and function. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1715-1724, 1990.

GRANDI, T.S.M.; TRINDADE, J.A.; PINTO, M.J.F.; FERREIRA, L.L.; CATELLA, A.A. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 185-224, 1989.

GROSSER, T.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G.A. Agentes anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos; farmacoterapia da gota. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12ª ed. Porto Alegre: AMGH, 2012, p. 959-1003.

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

HALBERSTEIN, R. A., Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Annals Epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686-699, 2005.

HARBORNE, J.B., MABRY T.J., MABRY H. **The flavonoids**. London: Chapman & Hall, p. 418-427, 1975.

HARRAZ, F.M. Constituents of *Euphorbia retusa*. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 8, p. 179-183, 2009

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

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacology Reviews**, n. 43, n. 2, p. 143-201, 1991.

HONTECILLAS R., ZIMMERMAN D.R., HUTTO D.L., WILSON J., AHN D.U., BASSAGANYA-RIERA J. Nutritional regulation of bacterial-induced colitis by conjugated linoleic acid. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 7, p. 2019–2027. 2002

HORAI, H.; ARITA, M.; KANAYA, S.; NIHEI, Y.; IKEDA, T.; SUWA, K.; OJIMA, Y.; TANAKA, K.; TANAKA, S.; AOSHIMA, K.; ODA, Y.; KAKAZU, Y.; KUSANO, M.; TOHGE, T.; MATSUDA, F.; SAWADA, Y.; HIRAI, M.Y.; NAKANISHI, H.; IKEDA, K.; AKIMOTO, N.; MAOKA, T.; TAKAHASHI, H.; ARA, T.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; SHIBATA, D.; NEUMANN, S.; IIDA, T.; TANAKA, K.; FUNATSU, K.; MATSUURA, F.; SOGA, T.; TAGUCHI, R.; SAITO, K.; NISHIOKA, T. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. **Journal of mass spectrometry**, v. 45, n. 7, p. 703-714, 2010.

HUANG, Z.R.; LIN, Y.K.; FANG, J.Y. Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology. **Molecules**, v. 14, p. 540-554, 2009.

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

INÁCIO, M.C.; MORAES, R.M.; MENDONÇA, P.C.; MOREL, L.J.F.; FRANÇA, S.C.; BERTONI, B.W.; PEREIRA, A.M.S. Phenolic compounds influence seed dormancy of *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae), a medicinal plant of Brazilian Savannah. **American Journal of plant sciences**, v. 4, p. 129-133, 2013.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear oedema. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 4, p. 1614-1620, 1993.

INOUE H., TAKEDA Y., NISHIMURA H., KANOMI A., OKUDA T., PUFF C. Chemotaxonomic studies of Rubiaceae plants containing iridoid glucosides. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2591-2598, 1988.

JOVEL E.M., ZHOU X.L., MING D.S., WAHBE T.R., TOWERS G.H. Bioactivity-guided isolation of the active compounds from *Rosa nutkana* and quantitative analysis of ascorbic acid by HPLC. **Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 865-871, 2007.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOUGHUE, M.J.. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. Porto Alegre, Artmed, 3ª ed., 632 p., 2009.

KADMIEL M.; CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends in pharmacological sciences**, v. 34, n. 9, p. 518-530, 2013.

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

KAVELAARS, A.; VRONN, A.; RAATGEVER, R.P.; FONG, A.M.; PREMONT, R.T.; PATEL, D.D.; LEFKOWITZ, R.J.; HEIJNEN, C.J. Increased Acute Inflammation, Leukotriene B4-Induced Chemotaxis, and Signaling in Mice Deficient for G Protein-Coupled Receptor Kinase 6. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 11, p. 6128-6134, 2003.

KWAK, J.Y.; JUNG, J.Y. HWANG, S.W.; LEE, W.T.; OH, U. A capsaicin-receptor antagonist, capsazepine, reduces inflammation-induced hyperalgesic responses in the rat: evidence for an endogenous capsaicin-like substance. **Neuroscience**, v. 86, n. 2, p. 619-626, 1998.

KINGSTON, D.G.I. Natural products as pharmaceuticals and sources for lead structures. In: Wermuth, C. (ed.). **The practice of Medicinal Chemistry**. San Diego: Academic Press, p.101-114, 1996.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of leukocyte biology**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

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

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

LEITE, N.S.; LIMA, A.P.; ARAÚJO-NETO, V.; ESTEVAM, C.S.; PANTALEÃO, S.M.; CAMARGO, E.A.; FERNANDES, R.P.M.; COSTA, S.K.P.; MUSCARÁ, M.N.; THOMAZZI, S.M. Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p. 164-170, 2015.

LEONI, P.; DEAN, R.T. Mechanisms of lysosomal enzyme secretion by human monocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 762, n. 3, p. 378-389, 1983.



- LI, M.; WANG, W.; WANG, P.; YANG, K.; SUN, H.; WANG, X. The pharmacological effects of morroniside and loganin isolated from Liuweidihuang Wan, on MC3T3-E1 cells. **Molecules**, v.15, n.10, p. 7403-7414. 2010
- LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9-18, 2007.
- LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacological Research**, v. 27, n. 4, p. 442-448, 2004.
- LOCKETTE, W.; BRENNAMAN, B.; OTSUKA, Y. Phorbol ester, vascular relaxation, and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate. **Hypertension**, v. 9, n. 6, p. 91-95, 1987.
- LOIZOU, S., LEKAKIS, I., CHROUSOS, G.P., MOUTSATSOU, P. Beta-sitosterol exhibits anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. **Molecular nutrition & food research**. v. 54, n. 4, p. 551-558, abril, 2010.
- LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 265-72, 2005.
- LOPES, S.; POSER, G.L.; KERBER, V.A.; FARIAS, F.M.; KONRATH, E.L.; MORENO, P.; SOBRAL, M.E.; ZUANAZZI, J.A.S.; HENRIQUES, A.T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). **Biochem System Ecology**, v. 32, n. 12, p. 1187-1195, 2004.
- LÓPEZ-POSADAS R., BALLESTER I., ABADÍA-MOLINA A.C., SUÁREZ M.D., ZARZUELO A., MARTÍNEZ-AUGUSTIN O., SÁNCHEZ M.F. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical pharmacology**, v.76, n. 4, p. 495-506, 2008.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.J.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MACHADO, A.O.; SILVA, A.P.; CONSOLARO, H., BARROS, M.A.G.; OLIVEIRA, P.E. Breeding biology and distyly in *Palicourea rigida* H. B. & K. (Rubiaceae) in the Cerrados of Central Brazil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, n. 3, p 686-696, 2010.
- MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H.S.A. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 393-410, 2003a.
- MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S.A. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003b.

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

MATHAD V.T., RAJ K., BHADURI A.P., SAHAI R., PURI A., TRIPATHI L.M., SRIVASTAVA V.M.L. Studies on the profile of immunostimulant activities of modified iridoid glycosides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 605-611, 1998.

MCGRATH, J.A.; EADY, R.A. J.; POPE, F.M. **Anatomy and Organization of Human Skin**. In: T. BURNS, S. BREATHNACH, N. COX AND C. GRIFFITHS. Rook's Textbook of Dermatology. 7<sup>th</sup> ed. Massachusetts: Blackwell Publishing, p.3.1-3.84, 2008.

MECKLENBURG, L.; KUSEWITT, D.; KOLLY, C.; TREUMANN, S.; ADAMS, E.T.; DIEGEL, K.; YAMATE, J.; KAUFMANN, W.; MÜLLER, S.; DANILENKO, D.; BRADLEY, A. Proliferative and non-proliferative lesions of the rat and mouse integument. **Journal of toxicologic pathology**, v. 26, n. 3, p. 27-57, 2013.

MEDEIROS, J.D. **Guia de campo – vegetação do cerrado 500 espécies**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, p. 532, 2011.

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

MELOS, J.L.R.; HONDA, N.K. Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* HUMB. & BONPL. EX. WILLD (Pteridaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 292-297, 2007.

MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 21-35, 2001.

MONACO, J.L.; LAWRENCE, W.T. Acute wound healing an overview. **Clinics in plastic surgery**, n. 30, v. 1, p. 1-12, 2003.

MORAES, M.A. **Análise da legislação sobre o uso de plantas medicinais no Brasil. Potencial químico-farmacológico de *Palicourea rigida* Kunth**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

MOREIRA, A.S.; SPITZER, V.; SCHAPOVAL, E.E.S.; SCHNEKEL, E.P. Anti-inflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 8, p. 638-640, 2000.

MOREL, L.J.F.; BARATTO, D.M.; PEREIRA, P.S.; CONTINI, S.H.T.; MOMM, H.G.; BERTONI, B.W.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. Loganin production in *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae) from populations native to Brazilian Cerrado. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 12, p. 2559-2565, 2011.

- MULLER, W.A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 7-22, 2013.
- MURRAY, A. R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINEMI, C.; GUNTHER, M. R.; SHVEDOVA, A. A. Phenol-induced *in vivo* oxidative stress in Skin: Evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemistry Research in Toxicology**, v. 20, n. 12, p. 1769-1777, 2007.
- MURRAY, R.K. Metabolismo de xenobióticos. In: MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.W. (Org.) **Harper: bioquímica ilustrada**. 26ªed. São Paulo: Atheneu, p. 626-632, 2006.
- MUSCARÁ, M.N.; MCKNIGHT, W.; ASFAHA, S.; WALLACE, J.L. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 4, p. 681-686, 2000.
- NASCIMENTO, C.A.; GOMES, M.S.; LIÃO, L.M.; OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L.; SILVA, C.C.; TANAKA, C.M.A. Alkaloids from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61b, p. 1443 – 1446, 2006.
- NEGRI, G.; SANTI, D.; TABACH, R. Flavonol glycosides found in hydroethanolic extracts from *Tilia cordata*, a species utilized as anxiolytics. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 15, n. 2, p. 217-224, 2013.
- NEHER J.J.; NENISKYTE, U.; ZHAO J.W.; BAL-PRICE A.; TOLKOVSKY A.M.; BROWN G.C. Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 8, p. 4973-4983, 2011.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I. Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. In: **The Practice of Medicinal Chemistry**, 3ªed. San Diego: Academic Press, p.159-186, 2008.
- NIJVELDT, R.J., NOOD E.V., HOORN, D.E., BOELEN, P.G., NORREN, K., LEEUWEN, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The american journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.
- NOURSHARGH, S.; ALON, R. Leukocyte migration into inflamed tissues. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 694-707, 2014.
- OJEWOLE, J.A. Hypoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v. 27, n. 10, p. 689-695, 2005.
- OKAMOTO, M.K.H. **Estudo das atividades cicatrizante e antimicrobiana do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. e estudo da estabilidade do gel**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, da Universidade de São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C.I.A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.3, p.302-310, 2010.

OLIVEIRA, A.L.L. **Avaliação química e biológica de espécimens de *Bostrychia radicans* (Rhodomelaceae)**. Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

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

OYUG, D.A.; AYORINDE, F.O.; GUGSSA A.; ALLEN, A.; IZEVBIGIE, E.B.; ERIBO, B.; ANDERSON, W.A. Biological activity and mass spectrometric analysis of *vernonia amygdalina* fractions. **Journal of Bioscience and Technology**. v. 2; n. 3, p. 287-304, 2011.

PACHALY, J.R. Terapêutica por extrapolção alométrica. In: Cubas, Z.S.; Silva, J.C.R.; Catão-Dias, J.L. (Orgs.). **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 480p, 2006.

PARENTE, L.M.L.; SILVA, M.S.B.; BRITO, L.A.B.; LINO-JÚNIOR, R.S.; PAULA, J.R.; TREVENZOL, L.M.F.; ZATTA, D.T.; PAULO, N.M. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.383-391, 2009.

PARK K.S., KIM B.H., CHANG M. Inhibitory potencies of several iridoids on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 enzymes activities, tumor necrosis factor- $\alpha$  and Nitric Oxide Production *in vitro*. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v. 7, n. 1, p. 41-45, 2010.

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

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. v. 2, p. 483-512, 1990.

PROVEDA, R.R.; BAGÁN, J.V; SORIANO, J.Y. Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs in dental practice. A review. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 12, n. 1, p. 10-18, 2007.

RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J. M., **Bioactive molecules and medicinal plants**. Heidelberg: Springer, p. 379, 2008.

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

RAZAVI S.M., ZAHRI S., ZARRINI G., NAZEMIYEH H., MOHAMMADI S., HARRAZ F.M. Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 35, n. 3, p.376-378, 2009

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J.A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.

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

RICCIOTTI E.; FITZGERALD G.A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

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

ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. **Opera Botanica Belgica**, v.1, p. 1-127, 1988.

ROSA, E.A. **Contribuição ao estudo químico das espécies vegetais *Palicourea rigida* e *Palicourea coriacea* e avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e moluscicida de *Palicourea rigida***. Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual de Maringá, 2009.

ROSA, E.A.; SILVA, B.C.; SILVA, F.M.; TANAKA C.M.A; PERALTA, R.M.; OLIVEIRA, C.M.A; KATO, L.; FERREIRA, H.D.; SILVA, C.C. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 20, n. 4, p. 484-488, 2010.

ROVA, J.H.E.; DELPRETE, P.G.; ANDERSSON, L.; ALBERT, V.A. A trnL-F cpDNA sequence study of the Condamineae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 145-59, 2002.

SALDEEN, T.; LI, D.; METHA, J.L. Differential effects of alpha- and gamma-tocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 34, n. 4, p. 1208-1215, 1999.

SALGADO, J.C., BIN, C., MANSI, D.N., SOUZA, A. Effect of the hass avocado (American Persea Mill) on hipercolesterolemia rats. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 4, oct./dec. 2008.

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

SANCHEZ, T.; MORENO, J.J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, n. 5, p. 877-879, 1999.

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

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p. 403-434, 2010.

SARAIVA, R.A.; ARARUNA, M.K.; OLIVEIRA, R.C.; MENEZES, K.D.; LEITA, G.O.; KERNTOPF, M.R.; COSTA, J.G.; ROCHA, J.B.; TOMÉ, A.R.; CAMPOS, A.R.; MENEZES, I.R. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by diferente irriant agentes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, p. 504-510, 2011.

SARGENT, M. G. Fiftyfold amplification of the Lowry protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 136, n. 3, p. 476-489, 1987.

SCHENKEL, E.P.; SIMÕES, C.M.O.; MENGUE, S.S; MENTZ, L.A.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. **Caderno de Farmácia**, v.1, p. 65-72, 1985.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Drug Research**, v. 32, n. 3, p. 230-235, 1982.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**. v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHU, Y. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, C.D. **Combretum leprosum Mart (Combretaceae) – Avaliação da atividade antiinflamatória tópica em modelos de inflamação de pele agudo e crônico em camundongos**. Dissertação de Mestrado em Farmacologia apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SILVA, F.M.; OLIVEIRA C.M.A.; KATO L.; TANAKA C.M.A.; SILVA C.C.; SOARES P.R.O.; GUILLO L.A. Vallesiachotamina e atividade citotóxica de *Palicourea rigida* Kunth. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia, Brasil, 2006.

SILVA-JÚNIOR, M.C. **100 árvores do cerrado: guia de campo**. Brasília, Editora Rede de Sementes do Cerrado. 278 p., 2005.

SILVA, A.P. Biologia reprodutiva e polinização de *Palicourea rigida* H.B.K. (Rubiaceae). Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Botânica, do Instituto de Ciências Biológicas, **Universidade de Brasília**, Distrito Federal, 1995.

SILVA, O.R.; SOUSA, F.B.M.; DAMASCENO, S.R.B.; CARVALHO, N.S.; SILVA, V.G.; OLIVEIRA, F.R.M.A.; SOUSA, D.P.; ARAGÃO, K.S.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, R.M.; MEDEIROS, J.V.R. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental e Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 455-464, august, 2014.

SIMÕES, C.M.O. e SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p. 289-326, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 173 p., 1986.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p.35-40, 2002.

SINGER, A.J.; CLARCK, R.A. Cutaneous wound healing. **The New England journal of medicine**, v. 341, n. 10, p. 738-746, 1999.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica e sistemática**: Guia ilustrado para a identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 521-537, 2008.

SZOLCSÁNYI, J. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. **Neuropeptides**, v. 38, n. 6, p. 377-385, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Artmed: São Paulo, 3ª ed, 719 p., 2006.

TATKE, P., DESAI, S., GABHE, S.Y. Isolation of Quercetin-3-O- $\beta$ -D-Glucoside from *Azadirachta indica*. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 2:7, p. 870-876, 2014.

TAYLOR, C.M. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae) in Mexico and Central America. **Sistematic Botany Monography**, v. 26, p. 1-102, 1989.

TEMPONI, V.S.; SILVA, J.B.; ALVES, M.S.; RIBEIRO, A.; PINHO, J.J.R.G.; YAMAMOTO, C.H.; PINTO, M.A.O.; DEL-VECHIO-VIEIRA, SOUSA, O.V. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Ethanol Extract from *Vernonia polyanthes* Leaves in Rodents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 3, p. 3887-3899, 2012.

THOMPSON, J. E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2006.

TRABER, M.G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free radical biology & medicine**, v. 13, n. 1, p. 4-15, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V.F., MELLO J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 464-471, 2008.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 519-528, 2005.

VENCATO I.; SILVA, F. M.; OLIVEIRA, C. M.A.; KATO, L.; TANAKA, C. M. A.; SILVA, C. C e SABINO, J. R. Vallesiachotamine. **Acta crystallographica**, v.62, p.429-431, 2006.

VENKATA, R.B.; SAMUEL, L.A.; PARDHA, S.M.; NARASHIMHA, R.B.; NAGA, V.K.A.; SUDHAKAR, M.; RADHAKRISHNAN, T.M. ANTIBACTERIAL, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND GC-MS ANALYSIS OF *Eupatorium odoratum*. **Asian jornal of pharmaceutical and clinical research**, v. 5, n. 2, p. 99-106, 2012.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drugs development. **Drug discovery today**, v. 3, n. 5, p. 232-238, 1998.

VICKERY, M.L.; VICKERY, B. **Secondary plant metabolism**. London: Mc Millan, 335 p., 1981.

VIDINSKY B.; GAL P.; TOPORCER T.; LONGAUER F.; LENHARDT L.; BOBROV N.; SABO J. Histological study of the first seven days of skin wound healing in rats. **Acta veterinaria Brno**, n. 75, p. 197-202, 2006.

VIVACONS, M.; MORENO, J.J. Beta-sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. **Free radical biology & medicine**, v. 39, p. 91-97. 2005.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.

WHIGHAM L.D., HIGBEE A., BJORLING D.E., PARK Y., PARIZA M.W., COOK M. E. Decreased antigen-induced eicosanoid release in conjugated linoleic acid-fed guinea pigs. **American journal of physiology**, v. 282, p. 1104-1112, 2002.

WHO. **Bulletin of the World Health Organization**. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review, Geneva. p. 45, 1998.

WHO. WOLRD HEALTH ORGANIZATION. **WHO**: monographs on selected medicinal plants, v.01, p 289, 1999.

WILLOUGHBY, D.A. *In vivo* models of Inflammation. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p. 129-131, 2003.

WILMER, J. L.; BURLESON, F. G.; KAYAMA, F.; KANNO, J.; LUSTER, M. I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. **The journal of investigative dermatology**, v. 102, n. 6, p. 915-922, 1994a.



WILMER, J. W.; MORITZ, C.; HALL, L.; TOOP, J. Extreme population structuring in the threatened ghost bat, *Macroderma gigas*: evidence from mitochondrial DNA. **Proceedings of the royal society of London**, v. 257, p. 193-198, 1994b.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surgical clinics north america journal**, v. 77, p. 509-28, 1997.

XU, H.; LIU, H.; SHI, Y.; LI, L. WEI M. Morroniside and loganin extracted from *Cornus officinalis* have protective effects non rat mesangial cell proliferation exposed to advanced glycation end products by preventing oxidative stress. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 84, n. 12, p. 1267-1273. 2006.

YAMABE, N.; NOH, J.S.; PARK, C.H.; KANG, K.S.; SHIBAHARA, N.; TANAKA, T.; YOKOZAMA, T. Evaluation of loganin, iridoid glycoside from Corni Fructus, on hepatic and renal glucolipotoxicity and inflammation in type 2 diabetic *db/db* mice. **European journal of pharmacology**, v. 648, n. 1-3, p. 179-187. 2010.

YOSHIDA, Y.; NIKI, E. Antioxidant effects of phytosterol and its components. **Journal of nutritional science and vitamin**, v. 49, n. 4, p. 277-280. 2003.

YOUNG, J.M.; SPIRES, D.A.; BEDORD, C.J.; WAGNER, B.; BALLRON, S.J.; DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of investigative dermatology**, v. 82, n. 4, p. 367-371, 1984.

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; CHIMELLI, M.; DALMAZ, A.C. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Revista visão acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 47-58, 2001.

ZEGARSKA, B.; LELINSKA, A.; TYRAKOWSKI, T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. **Pharmacological reports**, v. 58, p. 13-21, 2006.