

ANDREIA CRISTINA LOPES CORREA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DA POMADA E  
DO EXTRATO ETANOLICO BRUTO DE *Equisetum pyramidale* Goldn  
NAS LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS NÃO DIABÉTICO E  
DIABÉTICOS NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL**

CAMPO GRANDE  
2010

ANDREIA CRISTINA LOPES CORREA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DA POMADA E  
DO EXTRATO ETANOLICO BRUTO DE *Equisetum pyramidale* Goldn  
NAS LESÕES CUTÂNEAS DE RATOS NÃO DIABÉTICOS E  
DIABÉTICOS NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Iandara Schettert  
Silva

CAMPO GRANDE  
2010

## DEDICATÓRIA

A **Deus**, pela grandiosidade de sua obra. Agradeço por ter me concedido o discernimento, a sabedoria e a compreensão, necessárias para os pequenos e grandes adventos da vida.

À minha família, especialmente ao meu esposo **Adair Martins Torres**, aos meus filhos **Felipe Corrêa Torres** e **Lucas Corrêa Torres**, à minha mãe **Eva Lopes Corrêa** que em todos os momentos estiveram ao meu lado, me dando incentivo e apoiando todas as minhas decisões.

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a **Deus** pelo dom da vida, por me proporcionar saúde para seguir em frente e alcançar meus objetivos.

- A minha orientadora, **Profa. Dra. Iandara Schettert Silva**, que conduziu-me com dedicação durante todo o processo de elaboração deste trabalho. Agradeço pela confiança, pelo seu conhecimento, amizade e paciência por minhas ansiedades.

- A minha mãe **Eva Lopes Corrêa**, pelos preciosos ensinamentos de vida e pelo constante incentivo.

- Aos Laboratórios de Química Analítica e de Histopatologia da UNIDERP-ANHANGUERA/MS, pelo espaço oferecido e pela ajuda que tive.

- A **Profa. Dra. Doroty Mesquita Dourado**, pela atenção e sabedoria científica para o amadurecimento dos conhecimentos e conceitos que tanto me auxiliaram na execução e conclusão deste trabalho.

- A **Profa. Msc. Rosemary Matias Coelho**, pelo incentivo e por compartilhar a sua grandiosa experiência. Muito me honra tê-la como referência como pesquisadora, uma fonte de inspiração.

- Aos companheiros de turma, pelo convívio, amizade, que fizeram de nossos encontros bem divertidos, fazendo essa jornada ser a melhor possível.

- A todos os que me ajudaram e incentivaram, de forma direta, Bióloga Ana Paula Machado (com sua ajuda imprescindível), e de forma indireta, amigos e familiares, sem os quais seria difícil alcançar esse objetivo.

- Ao **Programa de Pós-graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste**, através de professores, pelo conhecimento doado e funcionários, pela dedicação prestada, ajudando muito na concretização deste sonho.

- À **FUNDECT/CAPES** pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado que recebi após seleção.

"Não há fatos eternos, assim como não há  
verdades absolutas."

**(Friedrich Nietzsche)**

## RESUMO

**Corrêa, A.C.L. Avaliação da atividade antiinflamatória da pomada e do extrato etanólico bruto da *Equisetum pyramidale* Goldn nas lesões cutâneas de ratos normais e diabéticos no processo de reparação tecidual.** Campo Grande; 2009. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Neste estudo foi avaliada a atividade antiinflamatória no processo de reparação tecidual em feridas cutâneas da *Equisetum pyramidale* Goldn em duas apresentações em ratos Wistar não-diabéticos e diabéticos. Para a avaliação histológica utilizou-se os parâmetros: infiltrado inflamatório, necrose, hiperemia, e o processo de reepitelização. Os resultados indicam que ao 3º dia de pós-operatório, não houve diferença significativa nos parâmetros analisados entre os grupos não-diabéticos e diabéticos, no 7º dia de pós-operatório os grupos avaliados (controle e sem tratamento) não apresentaram revestimento epitelial apenas uma crosta fibrino leucocitária e tecido de granulação em franca atividade. Já aos 14º dia de pós-operatório os grupos tratados com a pomada e extrato etanólico bruto de *E. pyramidale* tiveram redução no processo de inflamação e reepitelização completa e organizada na derme profunda abundantes fibroblastos, fibras colágenas espessas e proliferação de vasos em todo tecido conjuntivo. Os resultados, analisados em conjunto, permitem sugerir que a ação antiinflamatória destes compostos, está relacionada à inibição de uma ou mais vias de sinalização intracelular envolvidas nos efeitos dos mediadores da resposta inflamatória, sem comprometer completamente a degranulação de mastócitos ou a formação de metabólitos do ácido araquidônico. Em síntese, a pomada e o extrato etanólico, com sua constituição rica em metabólitos farmacologicamente ativos, tem um importante efeito antiinflamatório. Estas características, somadas à ampla distribuição e fácil cultivo da planta, confirmam sua utilização popular e a colocam como promissora fonte para o desenvolvimento de alternativas aos antiinflamatórios em uso atualmente.

**Descritores:** Cicatrização. Compostos Fenólicos. Diabetes Mellitus. Feridas Cutâneas. Fitoterápico.

## ABSTRACT

**Corrêa, A.C.L. Evaluation of anti-inflammatory ointment and ethanol extracts of *Equisetum pyramidale* Goldner in skin lesions of normal and diabetic rats in the process of tissue repair.** Campo Grande; 2009. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

In this study was evaluated the anti-inflammatory activity in the tissue repair process in skin wounds of *Equisetum pyramidale* Goldner in two performances in non-diabetic and diabetics Wistar rats. For the histological evaluation, we used the following parameters: inflammatory infiltrate, necrosis, hyperemia, and the process of reepithelialization. The results indicate that in the 3rd day postoperatively, had no significative difference in the parameters analyzed between groups non-diabetics and diabetics, the 7th day after surgery both groups (control and untreated) no showed epithelial lining only a crust fibrinogen and leucocyte granulation tissue in full activity. Already the 14th day after surgery the groups treated with ointment and ethanol crude extract of *E. pyramidale* was reduction in the inflammation process and complete reepithelialization organized in the deep dermis and abundant fibroblasts, collagen fibers and thick vessel proliferation in any tissue. The results, taken together, may suggest that the antiinflammatory action of these compounds is related to inhibition of one or more intracellular signaling pathways involved in effects of mediators of inflammatory response, without compromising full degranulation of mast cells or the formation of metabolites arachidonic acid. In summary, the ointment and the ethanol extract, with its rich constitution pharmacologically active metabolites, have a important anti-inflammatory effect. These characteristics, combined with the wide distribution and easy to grow plant, confirming its use popular and pose as a promising source for the development of alternatives to anti-inflammatory drugs in use today.

**Keywords:** Cicatrization, Phenolic Compounds, Diabetes Mellitus, Skin Wounds, Herbal medicine.

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1– Divisão dos períodos, grupos e subgrupos de tratamento.....35

Tabela 1 – Resultados da avaliação dos parâmetros inflamatórios entre os grupos não-diabéticos e diabéticos, no 3º dia de pós-operatório. Valores expressos em médias e desvio padrão.....46

Tabela 2 – Resultados da avaliação dos parâmetros inflamatórios entre os grupos não-diabéticos e diabéticos, no 7º dia de pós-operatório. Valores expressos em médias e desvio padrão.....47

Tabela 3– Resultados da avaliação dos parâmetros inflamatórios entre os grupos não-diabéticos e diabéticos, no 14º dia de pós-operatório. Valores expressos em médias e desvio padrão.....48

Tabela 4 – Resultados da avaliação do processo de reepitelização entre os grupos não-diabéticos e diabéticos. Valores expressos em médias e desvio padrão.....49

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Partes aéreas de *E. pyramidale* .....26
- FIGURA 2. Estrutura química do ácido ferúlico – *trans* (I) e *cis* (II).....28
- FIGURA 3. Estrutura química do  $\beta$ -Sitosterol (I) e Stigmasterol (II).....29
- FIGURA 4. Estrutura química do ácido ursólico (I) e ácido oleanólico (II).....30
- FIGURA 5. (A e B) Indução de diabetes, através de injeção intravenosa de aloxana (veia dorsal do pênis). C) Controle da glicemia sanguínea através do Glucometer..37
- FIGURA 6. A) Tricotomia e área demarcada; B) Execução da ferida com auxílio de bisturi Nº 19; C) Retirada do tecido; D) Tratamento das lesões.....38
- FIGURA 7.A) Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 3º DPO. (P) pomada; (Ext.) extrato etanólico bruto. Visualiza-se inflamação aguda moderada e crosta superficial.HE- 100X.....41
- FIGURA 8.A) Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 3º DPO. (C) controle (veículo); (S/T) sem tratamento. Nota-se inflamação aguda com intenso infiltrado inflamatório neutrofílico e espessa crosta fibrino-leucocitária. Nas setas observam-se camada com células mononucleares e células polimorfonucleares. HE- 100X.....41
- FIGURA 9. A) Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 7º DPO. (P), pomada; (Ext.) extrato etanólico bruto. Visualiza inflamação moderada, intensa fibroplasia e neovascularização.HE - 100X.....43
- FIGURA 10. Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabéticos) e (2ª coluna GII diabético) no 7º DPO. (C) controle; (S/T) sem tratamento. Visualiza intensa inflamação linfocítica, fibroplasia moderada e neovascularização. HE - 100X.....43

FIGURA 11. Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 14º DPO. (P) pomada; (Ext) extrato etanolico bruto. Visualiza discreto numero de células inflamatórias. HE - 400X.....45

FIGURA 12. Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 14º DPO. (C) controle; (S/T) sem tratamento. Visualiza intensa neovascularização, maior numero de células inflamatórias. HE - 400X.....45

FIGURA 13. Gráfico com a comparação dos grupos nos parâmetros inflamatórios: Infiltrado Inflamatório, Necrose e Hiperemia, no 3º dia de pós-operatório.....46

FIGURA 14. Gráfico com a comparação entre os grupos nos parâmetros inflamatórios: Infiltrado Inflamatório, Necrose e Hiperemia, no 7º dia de pós-operatório.....47

FIGURA 15. Gráfico com a comparação entre os grupos nos parâmetros inflamatórios: Infiltrado Inflamatório, Necrose e Hiperemia, no 14º dia de pós-operatório.....48

FIGURA 16. Gráfico com a comparação entre os grupos nos parâmetros inflamatórios: Infiltrado Inflamatório, Necrose e Hiperemia, no 14º dia de pós-operatório.....49

FIGURA 17. Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 7º DPO. (P), pomada; (Ext.) extrato etanólico. Nas setas observam-se epitélio em formação inicial: Derme (D) tecido conjuntivo mais organizado e Epiderme (Ep), camada fina de queratinização superficial(Q). HE- 400x.....50

FIGURA 18. Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 7º DPO. (C), controle; (S/T.) sem tratamento. Observa-se processo de reepitelização atrasado, (S/T) não completou a reepitelização. HE – 100 e 400X.....51

FIGURA 19. Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 14º DPO. (P), pomada; (Ext.) extrato etanólico. Observa-se processo de reepitelização completo, camadas bem diferenciadas e queratização. HE – 100X.....51

FIGURA 20. Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 14º DPO. (C), controle; (S/T.) sem tratamento. Observa-se processo de reepitelização lento, (S/T) não completou reepitelização. HE – 100X.....52

## LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AO	Ácido oleanólico
AU	Ácido ursólico
AMPc	Monofosfato cíclico de 3' 5'-adenosina
a.C	Antes de Cristo
$\beta$	Beta
BK	Bradicinina
CEUA	Comissão ética no uso de animais
C3a e C5a	Fatores do complemento
COX	Ciclogenase
COX-1	Ciclogenase tipo 1
COX-2	Ciclogenase tipo 2
d.C	Depois de Cristo
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DAPI	Giemsa e fluorescência
DPO	Dia pós-operatório
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EXT <sub>ETOH</sub>	Extrato etanólico bruto
FACS	Citrometria de fluxo
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GMPc	Monofosfato cíclico de 3' 5'- guanosina
g	gramas
GIP	Grupo não diabético pomada
GIIP	Grupo diabético pomada
GIEXT	Grupo não diabético extrato
GIEXT	Grupo diabético extrato
GIC	Grupo não diabético controle
GIIC	Grupo diabético controle
GIS/T	Grupo não diabético sem tratamento
GIIS/T	Grupo diabético sem tratamento

HE	Hematoxilina-eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Vírus do papiloma humano
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
HIS	Histamina
IgE	Imunoglobulina E
KGF	Fator de crescimento de queratinócito
IL-4	Interleucina-4
IL	Interleucinas
IL- $\alpha$	Interleucina $\alpha$
IL- $\beta$	Interleucina $\beta$
5-LOX	5-Lipoxigenase
IC <sub>50</sub>	concentração 50% inibitória
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LT	Leucotrieno
MEC	Matriz extra celular
mg/mL	miligrama por mililitro
mg/L	miligramas por litro mililitro
Mm	megametro
NOX	Enzima óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido nítrico
PLA2	Fosfolipase A2
PG	Prostaglandina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PGE2	Prostaglandinas E2
PGI2	Prostaciclina
PGD2	Prostaglandina do tipo D2
PGF <sub>2</sub> $\alpha$	Prostaglandina do tipo F2 $\alpha$
PGDF	Fator de crescimento derivados de plaquetas
P <sub>ETOH</sub>	Pomada a base de extrato etanólico bruto
PCR	Reação de cadeia polimerase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SP	Substância P

ROS	Espécies reativas de oxigênio
TXA2	TXA2 - tromboxano A2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TGF	Fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF	Fator transformador de crescimento
UV-B	Radiação ultravioleta B
$\mu$ M	micrometro
UNIDERP	Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VCAM	Moléculas de adesão das células vasculares

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3 OBJETIVOS.....	34
4 MATERIAL E MÉTODO.....	35
5 RESULTADOS.....	40
5.1.Avaliação da atividade antiinflamatória na reparação tecidual.....	40
5.2.Avaliação dos aspectos histopatológicos através de análise estatística.....	46
5.3.Avaliação do processo de Reepitelização.....	49
6 DISCUSSÃO.....	53
7 CONCLUSÕES.....	61
8REFERÊNCIAS.....	62



## 1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma reação complexa envolvendo componentes celulares e moleculares. É uma resposta inespecífica a uma agressão específica. O agente responsável pela agressão pode ter natureza química, física ou biológica (ZHOU *et al.*, 2007).

A inflamação aguda em indivíduos normais é normalmente um mecanismo de proteção localizada em resposta a invasão microbiana, trauma/injúria ou estímulo químico. Quando a resposta inflamatória é excessiva e prolongada pode levar as diversas desordens, que formam as patologêneses mais prevalentes, como as doenças reumáticas, diabetes, doença de Alzheimer e aterosclerose (SERHAN & CHIANG, 2004).

Desta forma, a resposta inflamatória é um mecanismo que provoca alterações do sistema vascular, nos componentes líquidos e celulares, visando destruir (fagocitose e anticorpos), diluir (plasma extravasado) e isolar ou seqüestrar (malha de fibrina) o agente lesivo. É uma reação de defesa ao agente agressor, assim como pode induzir a reparação de células do epitélio (reepitelização), do parênquima (regeneração), do estroma (cicatrização) e de tecidos mortos (HERSH *et al.*, 1998; CONE, 2001).

Sem este sistema de reparo, as infecções prosseguiriam desimpedidas, as feridas não cicatrizariam, não haveria cura e reparo das lesões e os órgãos danificados poderiam tornar-se lesões ulceradas permanentes (MADDOX & SCHWARTZ, 2002). Contudo, uma reação inflamatória prolongada pode levar à lesão tecidual, a apoptose e necrose (ALLER *et al.*, 2006), a uma disfunção orgânica e morte (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004; FLOWER & PERRETTI, 2005).

A magnitude da resposta inflamatória pode ser determinante em pacientes portadores diabetes (TRACEY, 2002) uma vez que esta doença, considerada como um distúrbio crônico que afeta o metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, com tendência ao desenvolvimento de aterosclerose, microangiopatia, nefropatia e neuropatia pode levar a uma série de complicações crônicas vasculares devido a alterações da resposta imunológica, especialmente redução da quimiotaxia e da fagocitose de neutrófilos, retardando o processo de cicatrização (ORTOLAN, 2004; FOSS *et al.*, 2005).

Apesar da predominância, no arsenal terapêutico, de substâncias sintéticas, ressaltando a classe dos antiinflamatórios, nos últimos anos têm-se verificado retomada à valorização de práticas terapêuticas consideradas por muitos profissionais de saúde como populares ou não científicas, inclusive a lenta reincorporação das ervas medicinais como uma opção e/ou complemento terapêutico (GARROS, 2006).

Neste contexto, a literatura descreve inúmeras atividades biológicas relacionadas com os compostos encontrados nessas preparações tradicionais, principalmente os compostos fenólicos. Desta forma, o uso terapêutico de plantas medicinais, vem crescendo ao longo dos anos com grande interesse nas suas propriedades biológicas, principalmente na ação específica em doenças crônicas e degenerativas (MONTOURO *et al.*, 2005).

As substâncias biologicamente ativas presentes nas plantas são chamadas de metabólitos secundários, os quais compõem moléculas biologicamente ativas e podem interferir em vários mecanismos ou mediadores envolvidos no processo inflamatório, tais como: metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, enzimas (NOS, COX-2, PLA2), produção de segundos mensageiros (proteína-quinase, GMPc, AMPc), fatores de transcrição (NF- $\kappa$ B, AP-1) (CARLSON *et al.*, 1985; BOUCLIER *et al.*, 1990; VANE, 2000; CALIXTO *et al.*, 2003).

Assim, a considerável diversidade e complexidade das estruturas químicas e a atividade biológica encontrada nos metabólitos secundários, predispõem a identificação de protótipos com atividade antiinflamatória. Nesse contexto, o interesse pelas plantas medicinais permanece forte, pois permite o desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de diversas doenças, inclusive aquelas que acometem a pele, considerando que os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento de várias dermatoses (psoríase, dermatite atópica, eczemas, etc.), como os antiinflamatórios não-esteroidais, anti-histamínicos, glicocorticóides e imunossupressores, muitas vezes não apresentam a eficácia desejada, além de promoverem efeitos adversos que limitam seu uso (CLARK, 2002; FIRESTEIN, 2004).

O gênero *Equisetum* possui como marcador quimiotaxonômico os flavonoídes (WIEDENFELD; CETTO; AMADOR, 2000), entretanto para *E. pyramidale* foi detectado apenas a presença dos compostos fenólicos (ácido ferúlico), esteróides e

com predominância dos triterpenos (ácido ursólico e ácido oleanólico) (MATIAS *et al.*, 2008b).

Estudos realizados com as partes aéreas desta espécie apontam ação cicatrizante em feridas de segunda intenção em modelos experimentais além da atividade antioxidante, antimicrobiana e citotóxica (CORREA, 2007; MATIAS *et al.*, 2008a).

As substâncias de origem vegetal, pertencentes às mais diversas classes químicas, possuem atividade antiinflamatória comprovada cientificamente. Dentre elas, destacam-se os esteróides (CECHINEL FILHO, 2000), os compostos fenólicos (SOARES, 2002), os taninos, os flavonóides, as lignanas, os terpenos, as saponinas, as cumarinas e os alcalóides (COUTINHO *et al.*, 2009).

Os estereóides sendo os mais conhecidos o estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, são relatados na literatura devido suas importantes propriedades antiinflamatórias e quando associados a outros esteróides, são efetivos no tratamento da hiperplasia benigna de próstata (HBP), doença que atinge acima de 50% dos homens comunidade superior a 50 anos (CECHINEL FILHO, 2000).

Os compostos fenólicos são antioxidantes primários que agem como seqüestradores de radicais livres e bloqueadores de reações em cadeia. Eles estão largamente distribuídos na natureza e são derivados dos ácidos benzóicos e cinâmico, bem como de flavonóides (SOARES, 2002).

Com base no exposto e considerando que as conseqüências relacionadas a diabetes, vêm crescendo nos últimos anos, o presente trabalho vem avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto e da pomada obtidos das partes aéreas de *E. pyramidale* no processo de reparação tecidual de indivíduos não diabéticos e diabéticos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Processo Inflamatório Agudo

A palavra inflamação, do grego *phlogosis* e do latim *flamma*, significa fogo, área em chamas. Descrições das características clínicas da inflamação foram encontradas em papiros egípcios, datados de aproximadamente 3000 a.C., mas o primeiro autor a listar os quatro sinais cardinais da inflamação foi Celsius, um escritor romano do século I d.C., que relatou o aumento no fluxo sanguíneo e a dilatação dos pequenos vasos, *rubor*, a permeabilidade vascular aumentada, *tumor*, que levaria a um aumento na temperatura local, *calor*, à passagem de células do sangue circulante e dor local, *dolor* (ROCHA E SILVA e GARCIA LEME, 2006)

A descrição moderna da inflamação superficial não difere significativamente da definição formulada por Celsius no primeiro século d.C. Hoje, estudos microscópicos tornaram possível estabelecer que os sinais clínicos da inflamação e resultado da vasodilatação, acúmulo de leucócitos, aumento do líquido intersticial e estimulação dos terminais nervosos por mediadores (ALLER *et al.*, 2007).

A reação inflamatória é uma resposta de defesa do organismo na tentativa de reparo tecidual. Esta resposta envolve uma série de eventos celulares e liberação de enzimas e mediadores químicos, dentre eles destacam-se: o óxido nítrico (SANCHAYITA; ABRAHAM, 2006; SCHMID-SCHÖBEIN, 2006; MARIOTTO *et al.*, 2007; TSUCHIYA *et al.*, 2007), a mieloperoxidase (ARATANI, 2006; KLEBANOFF, 2005; WINTERBOURN *et al.*, 2006; HANSSON *et al.*, 2006) e a adenosina-deaminase (ZAVIALOV; ENGSTRÖM, 2005), além das citocinas (MANDERSCHIED *et al.*, 2004; SCHMID-SCHÖBEIN, 2006) e quemocinas (SPEYER *et al.*, 2004; SCHMID-SCHÖBEIN, 2006). Como consequência da liberação destes mediadores, ocorre o aumento da permeabilidade vascular, a angiogênese e apoptose celular, além de outros eventos (SCHMID-SCHÖBEIN, 2006).

A inflamação aguda tem, típica ou relativamente, curta duração (horas a dias) e é caracterizada por vasodilatação, exsudação de líquido rico em proteínas (plasma), migração de células (primariamente neutrófilos) para o sítio lesado e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação. Processos patológicos causados pela exacerbação de quadros inflamatórios agudos estão entre os maiores desafios de gerenciamento para anestesiistas e profissionais de cuidados intensivos. Sepsis,

traumas severos e grandes cirurgias são exemplos de situações que apresentam os principais componentes inflamatórios agudos (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Os principais mecanismos de defesa do hospedeiro contra microorganismos são os anticorpos (defesa humoral) e os leucócitos (defesa celular). Estes são encontrados normalmente na corrente sanguínea, o que justifica a importância atribuída, na inflamação aguda, aos fenômenos vasculares. Em situações de homeostase, normalmente as proteínas plasmáticas e as células circulantes estão contidas no interior dos vasos, em movimento no sentido do fluxo sanguíneo. Diante de um estado inflamatório, os vasos sanguíneos sofrem várias alterações, com o objetivo de facilitar a passagem de proteínas plasmáticas e células sanguíneas da circulação para o local da lesão ou da infecção (KUMAR *et al.*, 2005).

Os principais componentes para o desenvolvimento da inflamação são: (1) vaso dilatação; (2) aumento da permeabilidade vascular; (3) ativação e adesão celular; (4) e coagulação (SAYERS, 2002).

Os sinais da inflamação, incluindo eritema e calor, se desenvolvem rapidamente após a lesão, como resultado da vasodilatação (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; ALLER *et al.*, 2006). Uma lesão significativa produz resposta vasomotora local que, dentre outros objetivos, tende a recuperar a homeostase. Vasoconstrição é um contribuinte primário a esse fim e é iniciada pela liberação de aminas vasoativas, mas células lesadas que secretam prostaglandinas também contribuem para essa diminuição no calibre dos vasos (ALLER *et al.*, 2006, POBER e SESA, 2007).

A vasodilatação segue a vasoconstrição inicial que é revertida 10 a 15 minutos após a lesão. A transição de constrição para dilatação é mediada por diversos fatores, produtos endoteliais, e fatores derivados de mastócitos como leucotrienos (LT), prostaglandinas (PG) e, particularmente, histamina (HIS) contribuem para a vasodilatação. Ao mesmo tempo, o aumento do calibre do vaso poderia ocorrer com lesão de reperfusão que, por sua vez, causa edema intersticial (ALLER *et al.*, 2006). Os principais mediadores envolvidos nas alterações vasculares são histamina, fator ativador de plaquetas (PAF), prostaglandinas E (PGE2) e prostaciclina (PGI2) ou ainda o sistema de cininas (como a bradicinina), fatores do complemento (C3a e C5a), fatores do sistema de coagulação e/ou fibrinolítico (derivados do plasma) (VALDERRAMAS, 2006).

O edema, uma característica fundamental da inflamação aguda, é causado pelo aumento da permeabilidade vascular, que leva ao extravasamento transvascular de fluido rico em proteínas de alto peso molecular (exsudato) do compartimento intravascular para o interstício (KUMAR *et al.*, 2005; ALLER *et al.*, 2006).

O exsudato inflamatório, o sangue e o tecido necrótico sofrem ação de enzimas secretadas por neutrófilos promovendo a liquefação e posterior remoção através de vasos linfáticos. As diminutas partículas sólidas remanescentes são fagocitadas por macrófagos. Em seguida, fibroblastos e células endoteliais ocupam a área lesada e proliferam. Dentro de 3 a 5 dias formam um tipo especializado de tecido denominado tecido de granulação (CHANDRASORA, 1993; COTRAN *et al.*, 2000).

Resultado das ações de mediadores como HIS, bradicinina (BK), LT, componentes do complemento, substância P (SP) e fator ativador de plaquetas (PAF). Estes fatores alteram intensamente as funções de barreira dos pequenos vasos e aumentam a permeabilidade dos capilares e vênulas à água e proteínas. Um papel fundamental da mudança na permeabilidade vascular é facilitar a chegada de células e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, ao sítio de lesão tecidual (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; ALLER *et al.*, 2006).

Muitas variáveis podem modificar o processo inflamatório básico, como a natureza e a intensidade da lesão, o local e o tecido afetado, e a responsividade do hospedeiro. Entretanto, a inflamação aguda, geralmente evolui para um destes três resultados finais: resolução completa, estado ideal; cicatrização pela substituição de tecido conjuntivo (fibrose); progressão da resposta tecidual, a cronicidade da resposta (DE BERNARDIS *et al.*, 1994; FURSTENBERGER *et al.*, 1994; GILROY, 2004; KUMAR *et al.*, 2005).

O acúmulo e a ativação de leucócitos são as maiores desordens inflamatórias. Existe grande distância entre o controle de eventos pelo mediador químico endógeno e a resposta do hospedeiro. Estes pequenos sinais químicos regulam o tráfico de leucócitos como os sinais cardinais da inflamação são: eritema, dor, calor, edema e perda de função da área lesionada. Estes sinais são provenientes da dilatação de arteríolas e aumento da permeabilidade vascular por ação de mediadores inflamatórios. Há o aumento do fluxo sanguíneo na área lesada produzindo calor e eritema. Com aumento da temperatura, as reações metabólicas

ocorrem com maior rapidez e liberam calor adicional. O edema surge com aumento da permeabilidade (VERGNOLLE, 2008).

Esses efeitos são estabelecidos por eicosanóides clássicos, como as prostaglandinas e leucotrienos, que exercem importantes funções como mediadores locais e exercem expansivas ações em reposta de interesse na inflamação. Atualmente, o alcance e o conjunto de mediadores químicos têm sido identificados consideravelmente. Esse conjunto inclui novos mediadores, novas citocinas (interleucina-10, fator de crescimento  $\beta$ ), gases (óxido nítrico), como também novas funções para nucleosídeos e nucleotídeos (SERHAN & CHIANG, 2004).

Os mediadores da inflamação, portanto, são substâncias formadas e liberadas, concomitante ou sequencialmente, no local da lesão. A origem destes mediadores pode ser plasmática (fatores do complemento e bradicinina) ou celular (histamina, serotonina, prostaglandinas, fator ativador plaquetário (PAF), leucotrienos, citocinas, etc). Os mediadores estão envolvidos na gênese e manutenção dos eventos característicos da reação inflamatória e se ligam a receptores específicos nas células-alvos podendo, inclusive, estimular a liberação de outros mediadores (ZHOU *et al.*, 2007).

Além disso, muitos mediadores inflamatórios provocam mudanças na excitabilidade do neurônio. Entre os mediadores envolvidos estão: histamina, serotonina, adenosina, bradicinina, citocinas (interleucina-1-beta, interleucina-6), leucotrienos, nervo de crescimentos neural, prostaglandinas, óxido nítrico e mais recentemente as serinas proteases. Esses mediadores induzem despolarização da membrana, diminuição na condutância da membrana, elevação da excitabilidade ou supressão da hiperpolarização após os potenciais de ação. Os mediadores inflamatórios provocam ativação direta sobre reflexo os nociceptores periféricos, causando hipersensibilidade imediata (VERGNOLLE, 2008).

Vários mediadores químicos conhecidos presente no local lesado podem estimular os nociceptores e, portanto, promover a dor. Dentre os mediadores inflamatórios incluídos neste grupo estão a histamina (que também causa prurido) e a bradicinina (BK). A BK atua através de receptores ligados à proteína G, produzindo uma variedade de efeitos pró-inflamatório que inclui vasodilatação e edema (MAYER *et al.*, 2007). A bradicinina também estimula atividade enzimática da PLA2 ligada à membrana que, por sua vez, provoca a desesterificação da membrana levando à liberação do ácido araquidônico livre (ácido ecosatetraenóico) e à biossíntese

subseqüente de prostaglandinas (por exemplo, PGE2 e prostaciclina, PGI2) pela ciclooxigenase (COX). As prostaglandinas são potentes vasodilatadoras e importantes mediadores na dor inflamatória (WIENECKE, 2008).

A dor pode resultar de vários fatores, como aumento da pressão, devido ao edema, sobre tecidos e terminações nervosas; de lesão das fibras nervosas; da irritação tóxica produzidas por microorganismos ou extravasamento de substâncias intracelulares de células lesadas e, também por cininas que afetam terminações nervosas. As prostaglandinas intensificam a dor associada à inflamação (ROCHA *et al.*, 2007).

## **2.1.1 Mediadores químicos da inflamação**

### **2.1.1.1 Derivados do ácido araquidônico**

A produção das prostaglandinas e dos leucotrienos é iniciada com a liberação do ácido araquidônico a partir dos fosfolípidios de membrana, uma reação catalisada pela fosfolipase A2 (PLA2). A PLA2 é ativada em resposta a vários estímulos, tais como: ação da trombina nas plaquetas, do fator do complemento C5a (C5a) nos neutrófilos, da bradicinina nos fibroblastos, das reações antígeno-anticorpo nos mastócitos e da lesão celular promovida por diferentes agentes (ROS - espécies reativas de oxigênio, UV-B, agentes químicos, etc) (RANG *et al.*, 2007, WANG *et al.*, 2007). O Ácido Araquidônico uma vez liberado serve de substrato para as duas isoformas da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), onde é convertido em prostaglandinas e tromboxanos (PGE2, PGD2, PGF2 $\alpha$ , PGI2, TXA2), e também para a 5-lipoxigenase (5-LOX), sendo por essa via metabólica convertido em leucotrienos (LTB4, LTC4, LTD4, LTE4). Na pele normal, a COX-1 está distribuída em toda a epiderme, enquanto a COX-2 se localiza principalmente nos queratinócitos supra-basais, sendo essa isoforma prontamente induzida frente a um estímulo inflamatório. Ambas as enzimas são formadas pelo ácido araquidônico, o qual é liberado devido à lesão tecidual que promove a ativação de fosfolipase A2. A expressão aumentada de COX-2 é associada com vários fatores fisiopatológicos, incluindo doenças inflamatórias e diferentes cânceres (HARPER & TYSON-CAPPER, 2008).

A prostaglandina E2 (PGE2) é a principal prostaglandina presente no tecido cutâneo, onde modula vários eventos inflamatórios, como o aumento da

permeabilidade vascular e vasodilatação, contribuindo assim na formação do edema e na adesão e diapedese dos neutrófilos e monócitos. No entanto, o tráfego dos linfócitos a partir do lúmen pós-capilar para o espaço intersticial já é um processo mediado em parte pelo LTB<sub>4</sub> (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; LEE *et al.*, 2003). As PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub>, por sua vez, induzem a transcrição de enzimas requeridas para a síntese de uma outra classe de eicosanóides envolvidas na fase de resolução da fase inflamatória, como as lipoxinas (SERHAN e SAVILL, 2005; HILÁRIO *et al.*, 2006).

A via da 5-lipoxigenase (5-LOX) é associada com uma variedade de doenças inflamatórias incluindo asma, arteriosclerose, artrite reumatoide, dor, câncer e fibrose hepática. Muitas classes de inibidores da 5-lipoxigenas foram identificados, mas apenas uma droga, o zileuton, um inibidor redox da 5-LOX, foi aprovado para uso clínico (ZWEIFEL *et al.*, 2008).

Os leucotrienos são potentes mediadores pro-inflamatórios, estimulam diretamente e indiretamente proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (WAN & WU, 2007). Os leucotrienos consistem em diidroxi leucotrieno LTB<sub>4</sub> e cistenil leucotrienos LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>, por ação de receptores expressos em superfícies de células inflamatórias e em paredes de vasos. Os leucotrienos induzem ativação de leucócitos e quimiotaxia com alta e baixa afinidade pelos receptores BLT1 e BLT2, respectivamente (BÄCK, 2006).

### **2.1.1.2 Outros mediadores importantes:**

Outros mediadores químicos também desempenham uma ação importante durante processo inflamatório cutâneo como, por exemplo, a histamina. A histamina atua em muitos processos fisiológicos celulares, mas também intervêm nas reações alérgicas e a inflamação, sendo esse um dos principais motivos dos mastócitos estarem estrategicamente localizados na microvasculatura dos tecidos que estão em contato com o meio externo, como a pele, os pulmões e intestinos. A liberação da histamina ocorre pelo processo de exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas através da interação de fatores do sistema complemento (C3a e C5a) e de antígenos com anticorpos IgE fixados nos mastócitos. Após a degranulação dos mastócitos, a histamina atua em receptores específicos (receptores histaminérgicos) promovendo a constrição do músculo liso, vasodilatação, aumento da

permeabilidade vascular e prurido (RANG *et al.*, 2007; SILVA e CARVALHO, 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Outros mediadores químicos como a serotonina, substância P e neurocinina A também participam da regulação dos processos vasculares, contribuindo assim na resposta inflamatória (HOLZER, 1991).

A função coordenada da população celular presente na derme e epiderme permite que ocorra uma resposta rápida e efetiva frente à variedade de estímulos que ocorrem na interface entre o organismo e o meio externo (WILLIAMS e KUPPER, 1996).

Outro mediador extremamente importante é o óxido nítrico (ON). Ele é um gás solúvel de radical livre que utiliza como substrato a L-arginina, sendo produzido por plaquetas, polimorfonucleares, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos. A sua liberação é estimulada por citocinas e produtos bacterianos (WELLER, 1997; WITTE e BARBUL, 2002). Normalmente, na pele íntegra, existe uma produção constante de ON em baixos níveis, este mecanismo mantém a integridade imunológica da pele (WELLER, 1997; ATUESTA, 2001). Porém após uma lesão, dentro de 24 horas observa-se a presença de ON, com uma expressão máxima entre dois e cinco dias, diminuindo durante os próximos dez dias. Inicialmente, o ON participa da vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária, quimiotaxia em leucócitos e ativam linfócitos T (WITTE e BARBUL, 2002).

Dependendo da sua concentração nos tecidos o ON pode inibir ou estimular a proliferação celular. Quando em altas concentrações, o ON liga-se ao superóxido formando peroxinitrito, um poderoso oxidante que ocasiona citotoxicidade (WELLER, 1997).

Sugere-se que esta ação explique o efeito bactericida do ON no controle de infecções cutâneas (WELLER, 1997). Por outro lado, a presença de colonização bacteriana e a infecção de feridas crônicas, pelo estímulo constante, induzem a produção de grandes quantidades de ON (WITTE e BARBUL 2002).

O ON estimula a reepitelização através da produção de fator de crescimento epidérmico (EGF) (WELLER 1997; ATUESTA 2001). Adicionalmente, a produção de ON pelos fibroblastos pode ser importante durante os estágios inflamatórios da cicatrização, aumentando o fluxo sanguíneo que facilitaria a nutrição e a infiltração

celular e, provavelmente, também nos estágios tardios de proliferação e remodelamento, pelo mecanismo de regulação negativa da resposta inflamatória.

## **2.2 Eventos celulares no processo inflamatório**

O resultado da ativação de leucócitos para migrarem para o tecido é atuarem contra agentes nocivos. Isto é uma resposta benéfica “normal” que é essencial para a sobrevivência, além de reparar e curar o tecido. Os eventos celulares envolvem a adesão de leucócitos à parede do endotélio e subsequente migração de neutrófilos para o interior dos tecidos (SAYERS, 2002).

O recrutamento de neutrófilos para o tecido lesado é essencial para a inflamação e para a defesa contra a infecção, mas ao mesmo tempo pode prejudicar a cura da lesão. Um mecanismo para a regulação dessa dualidade é promovido por lipídios autacóides, os quais atuam limitando a ativação de leucócitos e promovendo a resolução da inflamação (GRONERT, 2008).

O agrupamento de neutrófilos da circulação para o sítio inflamatório envolve muitos eventos, os quais se iniciam com o rolamento ao longo da parede da célula endotelial mediada predominantemente por L-, P-, e E-selectinas. Em seguida, os neutrófilos são ativados por quimiocinas liberadas por células inflamatórias presentes no endotélio. Isto induz ao aumento de integrinas, cuja função é mediar a adesão firme de neutrófilos nas células endoteliais. O ICAM-1 e o VCAM são exemplos de célula de adesão (RITTNER *et al.*, 2005).

Os neutrófilos aderem-se ao local da lesão poucas horas após ocorrer à injúria, através de quimiotaxia por mediadores liberados por plaquetas, células pertencentes ao sistema imune, microrganismos ou ainda devido à ativação do complemento (PRIETO *et al.*, 2003; PARK; BARBUL, 2004; SZPADERSKA; DIPIETRO, 2005). Além de sua função fagocitária, os neutrófilos possuem ação pró-inflamatória pela liberação de citocinas que ativam fibroblastos e queratinócitos. Caso a ferida não esteja severamente infectada, em poucos dias, o número de neutrófilos diminui devido à fagocitose por macrófagos (MARTIN, 1997; WERNER; GROSE 2003).

Depois de um ou dois dias, monócitos teciduais se infiltram no local da lesão e se diferenciam em macrófagos que participam e concluem o processo inflamatório, realizando um debridamento no local da lesão. O debridamento é facilitado pela

fagocitose e pela produção de enzimas como a colagenase e elastase (PARK; BARBUL, 2004; SZPADERSKA; DIPIETRO, 2005).

Os macrófagos possuem função essencial na continuidade do processo cicatricial, por secretarem fatores de crescimento, promovendo não só a proliferação celular e síntese protéica, como também a produção de componentes da matriz extracelular. Estas células também estimulam a proliferação de linfócitos e liberação de citocinas em resposta a antígenos específicos (IBA *et al.*, 2004; SZPADERSKA; DIPIETRO, 2005). As citocinas liberadas por estas células: Fator de Crescimento Derivados de Plaqueta (PGDF), Fator de Crescimento Transformante (TGF), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGF), entre outras, provocam o influxo de neutrófilos, bem como a migração e proliferação de células endoteliais, fibroblastos e células indiferenciadas que começarão a repopular o sítio da lesão (RICHES, 1996; DANTAS, 2000; WERNER; GROSE 2003).

A interleucina-4 (IL-4), citocina secretada por macrófagos, é também responsável pela formação do tecido conjuntivo (por exemplo, produção de colágeno por fibroblastos) fazendo com que fibroblastos e outras células presentes migrem através das trabéculas de fibrinas presentes na lesão (MUTSAERS *et al.*, 1997; BRANSKI *et al.*, 2005).

Os queratinócitos constituem as células envolvidas na primeira linha de defesa do sistema imune cutâneo devido à produção de vários mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas, cuja produção se mostra consideravelmente aumentada após a ativação dessas células por diferentes estímulos (WILLIAMS e KUPPER, 1996). Além dos queratinócitos, outras células residentes na epiderme e derme, como fibroblastos, células endoteliais, melanócitos e macrófagos também produzem diversas citocinas mediante um estímulo (KUPPERa, 1990; BURBACH *et al.*, 2000).

As citocinas são mediadores protéicos cujas ações envolvem o desenvolvimento da resposta imune celular e humoral, indução da inflamação, controle da proliferação e diferenciação celular, bem como a indução da cicatrização. As citocinas regulam, de forma autócrina e parácrina, a resposta imune e inflamatória através da interação com receptores específicos presentes nos queratinócitos, fibroblastos, células de langerhans, células endoteliais e linfócitos T infiltrados, promovendo a mobilização de leucócitos a partir do sangue e a ativação

de outras células do tecido cutâneo (WILLIAMS e KUPPER, 1996; UCHI *et al.*, 2000; RANG *et al.*, 2007).

Os queratinócitos produzem uma variedade de citocinas, incluindo as interleucinas (IL), fatores de crescimento, o fator estimulador de colônia de macrófagos-granulócitos e algumas quimiocinas (UCHI *et al.*, 2000). No entanto, entre todas as citocinas produzidas pelos queratinócitos, somente as primárias (IL-1 $\alpha$ , IL-1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral) ativam um número suficiente de mecanismos efetores capazes de desencadear uma resposta inflamatória cutânea (KUPPERb, 1990).

### **2.3 Processo de Reparação Tecidual**

A cicatrização de feridas pode acontecer por: primeira intenção ou união primária, quando as margens da ferida são aproximadas, havendo perda mínima de tecido. Por segunda intenção ou união secundária quando ocorre perda excessiva de tecido, comprometendo a reparação, que se torna mais lenta e por terceira intenção ou união terciária, quando a ferida não é suturada no tempo previsto ou quando a sutura se rompe e a ferida necessita ser suturada novamente, comprometendo o processo de cicatrização (VIEIRA, 2006).

O reparo de tecidos pode ocorrer de duas formas: (1) pela regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido ou (2) pela cicatrização com restabelecimento da homeostasia do tecido com perda da sua atividade funcional pela formação de tecido conjuntivo neoformado-fibrose. Após um trauma ou doença, esses processos ocorrem visando limitar os danos e restabelecer a integridade e a função dos tecidos afetados. Inicialmente, a ferida é preenchida por coágulo, fibrinas e exsudato formando uma crosta que a isola do meio ambiente quase que imediatamente e sua reestruturação constituem mecanismo complexo, em que vários fatores contribuem para a criação de diversos tipos de cicatrização, como hipertrofia, atrofia ou normótrofia, da área lesionada (ROCHA JÚNIOR, 2006).

A regeneração e a cicatrização constituem eventos distintos. Na regeneração, a reposição tecidual é realizada por meio de células do mesmo tipo das células perdidas no momento da lesão; sendo assim, se houver pouca alteração do estroma, a regeneração da lesão será completa. Na cicatrização, entretanto, diante

de grandes destruições teciduais, estes são substituídos por um conjuntivo próprio que é a cicatriz (VIEIRA, 2006).

O reparo é dividido em três fases: (1) inflamação, (2) formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e (3) remodelação. Estas fases não são mutuamente excludentes, mas sobrepostas no tempo. O reparo completo de tecidos resulta de reações anabólicas e catabólicas que têm os leucócitos um dos principais participantes. Essas células, além de suas conhecidas atividades imunes, estão intimamente envolvidas com as reações catabólicas de degradação de tecidos pela produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e também com as reações anabólicas de formação de tecidos pela produção de fatores de crescimento, responsáveis pela recomposição da celularidade regional ou restabelecimento da sua homeostasia pela formação da cicatriz (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A fase inflamatória inicia-se imediatamente após a lesão, ocorrendo vasoconstrição por cinco a dez minutos. Essa vasoconstrição inicialmente reflexa propicia o fechamento dos vasos lesados e favorece a hemostasia. Posteriormente, as células endoteliais retraem-se e perdem suas conexões, aumentando a permeabilidade vascular e permitindo a passagem de elementos sanguíneos para a ferida como plasma, eritrócitos e leucócitos, através do fenômeno de diapedese. São importantes nesta fase os neutrófilos, responsáveis pela digestão das bactérias e tecidos desvitalizados e os monócitos que se transformam em macrófagos e auxiliam na fagocitose (GUYTON, 1989; VIEIRA, 2006).

Durante a fase proliferativa ocorre a reparação do tecido conjuntivo e do epitélio observam-se o surgimento do tecido de granulação, reepitelização e contração da ferida, os quais desempenham papéis importantes na cicatrização normal. O processo de proliferação de fibroblastos e a atividade sintética de colágeno são denominados de fibroplasia. A fase fibroplásica é caracterizada ainda por um aumento do número de fibroblastos, os quais iniciam a síntese e secreção de componentes da matriz extracelular, como os glicosaminoglicanos e as fibras colágenas tipo I e III, associadas à proliferação e ao crescimento interno dos capilares (angiogênese) O fibroblasto surge por volta do segundo e terceiro dia após o trauma (RESENDE; PEREIRA; CASTRO; 2005).

A remodelação do colágeno inicia-se na formação do tecido de granulação e mantém se por meses após a reepitelização. As collagenases e outras proteases

produzidas por macrófagos e células epidérmicas dão direção correta às fibras colágenas difusas. Há diminuição de todos os elementos celulares, inclusive fibroblastos (VIEIRA, 2006).

Com o crescimento centrípeto dos fibroblastos a partir das margens da ferida, observa-se simultaneamente a ocorrência da angiogênese. As células endoteliais no interior dos capilares intactos nas margens da ferida passam através da membrana basal da parede vascular, mediante a secreção de colágenas e do fator ativador do plasminogênio. Em seguida, essas células migram na direção do espaço ocupado pela ferida, utilizando como substrato a matriz extracelular ali presente. Essas células migratórias diferenciam-se para formar novos tubos capilares, no que resulta a maior parte da neovascularização que ocorre na ferida, sendo secundária a diferenciação das células endoteliais migratórias (CARVALHO, 2002; CARDOSO, 2003).

O estímulo responsável pela angiogênese está relacionado à liberação de diversos fatores solúveis (peptídeos) no local da lesão. Tais fatores de crescimento têm potentes propriedades biológicas de quimioatração e mitogênese demonstradas através de sistemas experimentais *in vitro* e ensaios *in vivo* (FAZIK, 2000; LABRO, 2000).

Como conseqüência de angiogênese, o tecido conjuntivo (agora denominado tecido de granulação) é formado, recebendo esta denominação devido a sua aparência granular pela presença de inúmeros capilares (WERNER; GROSE 2003).

O tecido de granulação pode ser compreendido como uma matriz friável de fibronectina, colágeno e ácido hialurônico, onde está embebida uma densa população de macrófagos e fibroblastos, associada a vasos sanguíneos neoformados (MUTSAERS *et al.*, 1997). São vários os fatores responsáveis pela formação do tecido de granulação. Embora os fatores de crescimento desempenhem um papel crucial na migração e diferenciação das células necessárias à formação desse tecido, os macrófagos presentes na ferida e as plaquetas capturadas no trombo são, provavelmente, os principais contribuintes para o processo (CARVALHO, 2002).

Os fibroblastos infiltrados na área da lesão desempenham, nesse momento, dois papéis significativos: 1) produzir e depositar grande quantidade de elementos da MEC, principalmente fibras colágenas do tipo I e III, que aumentam a força tênsil da lesão, contribuindo para o fechamento da lesão; 2) diferenciar-se em

miofibroblastos, cuja função primordial é neoformação dermal e contração das margens da ferida, alinhando-se a elas e unindo-as (THOMAS *et al.*, 1995, MOULIN *et al.*, 2000; CARVALHO, 2002; GOMATHI *et al.*, 2003). Os miofibroblastos foram inicialmente identificados como um fibroblasto modificado que possuía características de uma célula muscular lisa, através de microscopia eletrônica no tecido de granulação de feridas cicatrizadas (DESMOULIÈRE; CHAONNIER; GABBIANE, 2005). A conversão de fibroblastos em miofibroblastos é realizada por fatores de crescimento como o TGF- $\beta$ 1, expressando  $\alpha$ -actina do músculo liso e tornando-se células musculares lisas capazes de realizar grandes forças contráteis (MARTIN, 1997).

## 2.4 Reepitelização

Se a lesão é superficial, o evento inicial da reepitelização é a migração de células da epiderme não danificadas das margens da ferida, e do epitélio de folículos pilosos e outras estruturas anexas. Este processo ocorre nas primeiras 24 horas após a lesão, e é um evento dirigido, não requerendo um aumento inicial em proliferação celular. Depois que a migração começa, ocorre um aumento da proliferação celular epitelial às margens da ferida, fornecendo células adicionais para a cobertura da lesão. Esta proliferação atinge o pico em dois a três dias, e reflete um aumento mitótico e hiperplasia do epitélio nas margens da ferida (CARVALHO, 2002, EHRLICH; DIEZ, 2003; DEODHAR e RANA, 1997).

Os queratinócitos participam do processo de reepitelização produzindo fibronectina, colágenas, ativador de plasminogênio, proteases neutras e colágeno. A fibronectina promove a adesão de queratinócitos e os auxiliam na orientação durante a migração sobre o tecido de granulação. As colágenas e outras proteases são importantes para o debridamento do tecido desvitalizado e abertura de espaços para a reepitelização (SAARIALHO-KERE *et al.*, 1993).

Os queratinócitos estendem-se em camadas aderidas à lâmina basal, e tem ligações intracelulares com a rede citoesquelética de queratina. Esta ligação tem que ser desfeita para permitir a migração dos queratinócitos. Durante a migração ocorre a expressão de integrinas e ligação com fibronectina e tenascina da matriz extracelular. A locomoção dos queratinócitos envolve a contração de filamentos de actina-miosina em um movimento rastejante (SAARIALHO-KERE *et al.*, 1993;

MARTIN, 1997; SINGER e CLARK 1999; O'TOOLE, 2001). Embora o citoesqueleto de actina-miosina seja crítico para motilidade do queratinócito, poderia ser presumido que a rede citoesquelética de queratina também participaria deste mecanismo, provendo suporte e força durante a migração. Foi evidenciado, que ratos transgênicos deficientes em queratina apresentam reepitelização prejudicada (WAWERSIK *et al.*, 2001).

As células epiteliais que migram dissecam a ferida, abrindo um espaço para a reepitelização. Para abrir um caminho pelo coágulo de fibrina ao longo da interface entre o coágulo de fibrina e a matriz extracelular, o queratinócito tem que dissolver a barreira de fibrina à sua frente. A principal enzima fibrinolítica é a plasmina, que é derivada de plasminogênio dentro do próprio coágulo, sendo ativada por ativadores de plasminogênio. Várias metaloproteínases são secretadas pelos queratinócitos na ferida. As metaloproteínases degradam colágeno, o que permite a migração dos queratinócitos (SAARIALHO-KERE *et al.*, 1994; MARTIN, 1997; VU e WERB 2002). Após 24 a 48 horas da lesão, células epiteliais à margem da ferida começam a proliferar atrás das células que estão migrando. Provavelmente, os estímulos para a migração e proliferação de células epiteliais durante a reepitelização podem ser desencadeados pela ausência de células vizinhas à margem da ferida, bem como pela liberação local de fatores de crescimento e expressão aumentada de seus receptores (SINGER e CLARK 1999; O'TOOLE, 2001).

O processo de reepitelização é regulado pelos fatores de crescimento EGF, TGF e KGF. O EGF atua na epiderme estimulando a proliferação e migração de queratinócitos (MARTIN, 1997 WERNER; GROSE 2003). O TGF e algumas citocinas pró-inflamatórias parece estimularem a expressão de integrinas que facilitariam a migração dos queratinócitos no tecido de granulação. Por outro lado o TGF inibe a proliferação de queratinócitos (AMENDT *et al.*, 2002). O KGF apresenta um papel fundamental na reepitelização, sendo produzido pelos fibroblastos da derme, e secretado em altas concentrações nas primeiras 24 horas após a lesão, tendo uma maior concentração nas margens da ferida (SHERRAT e DALLON 2002). O uso tópico de KGF em feridas tem efeitos mitogênicos e migratórios sobre os queratinócitos, além de estimular a liberação de ativadores de plasminogênio e metaloproteínases pelos queratinócitos que migram, aumentando a capacidade da epiderme em dissecar o coágulo. Tal fato pode acelerar a taxa de reepitelização e a cicatrização de feridas. Adicionalmente, ratos que são tratados com corticosteróides

e ratos diabéticos, apresentam reepitelização deficiente e possuem baixas concentrações de KGF (MARTIN, 1997).

Resíduos de folículos pilosos podem contribuir para a reepitalização, pois as células do folículo piloso agem como células epidérmicas da ferida. Em feridas cutâneas profundas onde o folículo piloso seja totalmente retirado, o epitélio não regenera pêlos; o mesmo também é verdade para as glândulas sudoríparas perdidas no local da lesão. As feridas não regeneram os pêlos, não por que não possa responder a sinais que induzem o crescimento do pêlo, mas porque não recebe o sinal. Quando células de papilas dérmicas foram semeadas em ferida, ocorreu um estímulo para o crescimento de pêlos (MARTIN, 1997).

A reepitalização termina quando a superfície da ferida está coberta por uma única camada de queratinóitos. Uma epiderme extratificada nova encontra-se sob a lâmina basal reestabelecendo as margens dentro da ferida. Células da camada suprabasal deixam de expressar integrinas e queratinas e sofrem diferenciação. Os sinais que fazem parar a reepitalização incluem a inibição por contato. Com o início da síntese da lâmina basal as metaloproteínases são inibidas, e novas adesões de hemidesmossomas para lâmina basal rejeitam. Os últimos componentes dos anexos da epiderme que alcança maturidade são as fibrilas que unem a lâmina basal ao tecido conjuntivo subjacente (MARTIN, 1997).

A queratinização das camadas externas restabelece a função de barreira normal, impedindo a perda de líquido para o meio externo e a absorção de substâncias tóxicas para o meio interno. O epitélio formado é mais fino e frágil que os epitélios normais, estando fracamente aderido ao tecido cicatricial subjacente (POPE, 1996).

## **2.5 Diabetes Mellitus**

O *Diabetes mellitus* (DM), ou simplesmente diabetes, é causada pela diminuição dos índices de secreção de insulina pelas células beta das ilhotas de Langerhans, presentes no pâncreas, ou devido a uma menor ação hormonal a nível periférico, sendo que, esta deficiência de insulina, acarreta um grande número de distúrbios, que afetam a utilização e a disponibilidade de glicose pelos tecidos insulino-dependentes, situa-se entre as dez principais causas de morte nos países

ocidentais e, apesar dos progressos em seu controle clínico, ainda não foi possível controlar de fato suas conseqüências letais (CHICARELLI, 2000; NEGRI, 2005).

Segundo Batista et al. (2006), existem, no Brasil, dois estudos que demonstram o grau de evolução desordenado do diabetes no país. O primeiro estudo foi realizado entre os anos de 1987 e 1988, nele foi evidenciada a prevalência em 7,6% dos casos investigados. O segundo trabalho foi realizado em 2001 onde o número de casos confirmados passou a ser de 14,66%.

Para Coeli et al. (2002) e Spadella et al. (2005), o aumento do número de casos de diabetes nos países subdesenvolvidos é de elevada importância, principalmente para a população idosa, devido à sua alta freqüência, ela pode acarretar complicações macrovasculares (doença cardiovascular, cerebrovascular e dos vasos periféricos) e microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia).

No DM, por apresentar uma série de complicações crônicas, os pacientes acometidos por esta doença procuram tratamentos alternativos e não raro, utilizam plantas medicinais para diminuir o nível glicêmico, “muitas vezes buscando o conhecimento acumulado na sua herança cultural familiar, ou indicações de conhecidos” (ALVES, 2007).

As plantas medicinais apresentam benefícios múltiplos, como o controle do metabolismo de carboidratos, através de vários mecanismos como a prevenção e restauração da integridade e função das células  $\beta$ -pancreáticas, a atividade estimulante da liberação de insulina, a melhora da captação e utilização da glicose e suas propriedades antioxidantes, fazendo das plantas um excelente alvo para o desenvolvimento de novos modelos terapêuticos em potencial na prevenção e no tratamento das complicações do diabetes (ROCHA et al., 2006).

Macedo e Ferreira (2004), trabalhando com comunidades da Bacia do Alto Paraguai e do Vale do Guaporé no Mato Grosso, identificaram 17 espécies utilizadas no tratamento do diabetes.

Diante destes dados é plenamente justificável a busca de condutas terapêuticas mais eficazes, não só para controlar o metabolismo glicídico, como também, evitar a progressão das lesões crônicas sobre os vasos, rins, retina e nervos e que se não detectado e tratado, apresenta complicações, que podem ser de caráter agudo ou crônico. Dentre as complicações mais preocupantes está o comprometimento do processo de reparação tecidual (FELIX *et al.*, 1990; SPADELLA *et al.*, 2005).

### 2.5.1 Diabetes e reparação tecidual

Os portadores de diabetes mellitus (DM) são em geral reconhecidos como pacientes mais vulneráveis a uma série de complicações de natureza metabólica e/ou de origem infecciosa, como os processos bacterianos, fúngicos e virais (MINELLI *et al.*, 2003).

Frente a esta realidade, vários estudos experimentais têm sido desenvolvidos na tentativa de melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos do diabetes e suas complicações, pois no campo cirúrgico, já é bem estabelecido que “os diabéticos cicatrizam mal suas feridas”, e que 50% destes pacientes necessitarão de algum procedimento cirúrgico durante suas vidas (ORTOLAN *et al.*, 2004).

No processo de cicatrização, o metabolismo normal das proteínas é fator primordial, pois a insulina age facilitando a entrada de aminoácidos nas células, independentemente do seu transporte da glicose, bem como atua incorporando esses aminoácidos às proteínas celulares. A aumentada atividade catabólica sobre as proteínas e a diminuição da sua síntese condiciona no paciente diabético à dificuldade de cicatrização, além do fato desses indivíduos serem muito mais suscetíveis às infecções, fator este que por si só dificulta o mecanismo reparador (HIRAOKA, 2007).

Para Foss *et al.* (2005), além da situação metabólica descrita, existem outros fatores que favorecem o aumento de infecções em diabéticos. São eles: as complicações crônicas vasculares ou neurológicas, as alterações da resposta imunológica, especialmente redução da quimiotaxia e da fagocitose de neutrófilos.

Loots *et al.* (1999), estudaram a proliferação de fibroblastos “*in vitro*” em 4 pacientes diabéticos não insulino dependentes com úlcera de perna e concluíram que um menor número de fibroblastos na úlcera é causado pela sua proliferação prejudicada, o que provavelmente contribuiu para uma produção diminuída de proteínas da matriz extracelular, prejudicando a reparação da ferida. Os resultados sugerem ainda que, alta concentração de glicose pode ser inibidora da proliferação de fibroblastos, havendo também diminuída capacidade proliferativa e morfologia anormal de fibroblastos.

Carvalho *et al.* (2006), em análise da influência da aplicação de laser de baixa potência (HeNe) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos e não diabéticos, concluíram que o grupo tratado com laser apresentou média de fibras

colágenas maiores estatisticamente em relação ao grupo não tratado tanto para diabético como para os não diabéticos, e que o tratamento com laser foi capaz de influenciar no percentual de colágeno na cicatrização das feridas cutâneas.

## **2.6 Plantas medicinais com atividade anti-inflamatória**

A utilização das plantas na medicina tradicional é tão antiga quanto à própria humanidade. Tradicionalmente o uso de plantas e a forma na qual são utilizadas em uma doença é transferida oralmente de geração em geração em uma comunidade. É admirável que este conjunto de conhecimentos tenha subsistido durante milênios sem nunca, porém, cair no esquecimento (SAMUELSSON, 2004; SILVA e CARVALHO, 2004).

Estes tratamentos, desenvolvidos a centenas de gerações passadas, tornaram-se conhecidos como medicina tradicional. A humanidade possui grande dívida para com incontáveis autores anônimos que reuniram informações da medicina Greco-romana, Chinesa e de outros sistemas de medicina tradicional, assim como grandes escribas e sábios shamans que passaram seus conhecimentos de forma verbal (KHAN, 2006).

No Brasil, onde existem cerca de 120.000 espécies de plantas superiores, os indígenas usaram e ainda fazem uso de vários vegetais como tratamento para seus males ou como veneno em suas guerras e caçadas (SARTI e CARVALHO, 2004).

Diante do universo botânico, é possível a busca de novas drogas com o estudo de plantas de uso popular consagrado para certa finalidade (AGRA *et al.*, 2008; BERTUCCI *et al.*, 2008; MARLIÉRE *et al.*, 2008; VEIGA-JUNIOR, 2008; JESUS *et al.*, 2009; LEITÃO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009).

Os produtos naturais representam fontes de diversidades moleculares na descoberta de drogas. Ainda permanece urgente a necessidade para identificar novos quimiotipos para conduzir o desenvolvimento em várias áreas terapêuticas. Entre o desafio para a tentativa de diversidade de produtos naturais é preciso permanecer competitivo com substâncias sintéticas. Avanços significativos são realizados para a formação de enzimas adaptadas envolvidas na biossíntese de produtos naturais, além de novas estruturas que produzem substituintes não naturais (ZHANG *et al.*, 2006).

Enquanto os produtos naturais representam uma rica fonte de compostos terapeuticamente aproveitáveis, o interesse no desenvolvimento de produtos naturais pela indústria farmacêutica tem declinado. Entretanto, os produtos naturais permanecem biologicamente validados e, como tal, devem proporcionar uma boa produção de opções terapêuticas. Se os produtos naturais são mais uma vez interesse de extensa descoberta de drogas no mundo, eles precisam ser utilizados ao alcance de conduzir novos padrões de produção terapêutica (QUINN *et al.*, 2008).

Os produtos naturais têm contribuído fortemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas através de seus metabólitos secundários. Estes são conhecidos por atuar de forma direta ou indireta no organismo, podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros), sobre a produção ou ação de segundos mensageiros (como GMPc, AMPc, proteínas quinases, etc.), na expressão e transcrição de fatores como AP-1, NF- $\kappa$ B e na expressão de células pró-inflamatórias como sintetase do óxido nítrico (NOS), ciclooxygenase (COX-2), citocinas (IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , etc.), neuropeptídeos e proteases (CALIXTO *et al.*, 2003).

Desta forma, nos últimos anos, tem-se evidenciado um crescente aumento no estudo de plantas preconizadas pela medicina popular para validar a sua utilização como fitoterápico seguro e eficaz, tendo em vista que o uso popular de uma determinada planta não é suficiente para validá-la como fitoterápico. Deste modo, o emprego de técnicas modernas de farmacologia, bioquímica, toxicologia e biologia molecular renovaram o interesse na procura de novos medicamentos ou de protótipos de novos fármacos a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2000)

Os metabólitos secundários são substâncias de baixo peso molecular, de estrutura complexa, marcante atividade biológica e, contrariamente aos metabólitos primários, são encontrados em concentrações relativamente baixas e somente em determinados grupos de plantas (ALVES, 2001; POSER e MENTZ, 2004).

Atualmente são conhecidos 140.000 metabólitos secundários que apresentam diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais. De acordo com a estrutura e/ou origem biogênica, os metabólitos secundários podem ser divididos em diferentes grupos, tais como: esteróides, alcalóides, flavonóides, terpenos, taninos, cumarinas, lignanas (PHILLIPSON, 1999; STROHL, 2000; VERPOORTE, 2000).

Assim sendo, o reino vegetal representa um forte manancial para a investigação de novas moléculas e terapias, considerando que dentre as 250.000 espécies conhecidas somente uma pequena porcentagem (8 a 12%) foi investigada sob o ponto de vista químico e, ainda, uma menor fração foi submetida a ensaios de atividade biológica (WILLIAMSON *et al.*, 1996).

O tratamento com plantas medicinais tornou-se extremamente popular. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 88% da população faz uso de plantas medicinais como tratamento primário de diversas doenças, de forma que 6 a 8% das pessoas as utilizam com a finalidade de tratar patologias relacionadas com a pele (ERNST, 2000; WHO, 2002). Além disso, 30% dos produtos provenientes da medicina tradicional são utilizados no tratamento de diferentes condições dermatológicas (SOSA *et al.*, 2002; CAUWENBERGH, 2002).

Plantas que são utilizadas tradicionalmente na cicatrização, febre, infecção, edema ou doenças reumáticas, são indicadores da presença de compostos com propriedades anti-inflamatórias e, assim, devem ser investigados e a sua eficácia comprovada. A evolução no entendimento dos aspectos moleculares da patofisiologia da inflamação favoreceu o estabelecimento de novos sistemas de testes *in vitro* para a seleção de diversas substâncias que permitem a identificação de novos compostos anti-inflamatórios (CARVALHO, 2004).

Existem vários ensaios *in vitro* que são utilizados para testar a atividade anti-inflamatória, porém o procedimento de triagem mais comum é a verificação da inibição da COX e/ou da 5-LOX. Extratos ou compostos isolados de várias plantas utilizadas na medicina tradicional demonstraram promover a inibição da COX e/ou 5-LOX, como a *Achillea millefolium*, *Echinacea angustifolia*, *Echinacea purpurea*, *Hamamelis virginiana*, *Juniperus communis*, *Ledum palustre*, *Polygonum aviculare*, *Sanguinaria canadensis* e *Tanacetum vulgare* (BORCHERS *et al.*, 2000).

Outras plantas revertem o processo inflamatório por atuarem em outros alvos como, por exemplo, a *Glycyrrhiza glabra* que, além de inibir a atividade da COX, também promove a inibição da atividade da enzima PLA<sub>2</sub>, exibindo uma atividade comparável à hidrocortisona. Além disso, a *Glycyrrhiza glabra* também inibe a formação de ROS pelos neutrófilos no sítio inflamado (OHUCHI e TSURUFUJI, 1982; OKIMASU *et al.*, 1983; AKAMATSU *et al.*, 1991).

Plantas ricas em triterpenóides são usadas em chás e infusões desde os primórdios da humanidade devido aos seus efeitos curativos. As plantas que os

contêm são conhecidas tradicionalmente por possuir propriedades anti-inflamatórias e protetoras do sistema vascular, além de atividades antialérgica, analgésica e antipirética, que foram comprovadas ao longo da metade do século XX (LOPES, 2007).

Muitas plantas que apresentam atividade anti-inflamatória já tiveram os compostos responsáveis por tal atividade isolados e caracterizados, como por exemplo, os terpenos presentes na *Matricaria recutita* (os monoterpenos a-bisabolol e azuleno), na *Calêndula officinalis* (os triterpenos taraxasterol e o lupeol), na *Arnica Montana* (a lactona sesquiterpênica helenalina), na *Glycyrrhiza glabra* (o triterpeno glicirrizina ou ácido glicirrízico), no *Rosmarinus officinalis* (os triterpenos ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido micromérico), *Salvia officinalis* (o triterpeno ácido ursólico), na *Cordia verbenaceae* (o sesquiterpeno  $\alpha$ -humuleno), *Equisetum pyramidale goldn* (os triterpenos ácido ursólico e ácido oleanólico) (OKIMASU *et al.*, 1983; AKAMATSU *et al.*, 1991; CARVALHO *et al.*, 1991; BLUMENTHAL, 2003; ALTINIER *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2007; MATIAS *et al.*, 2009a).

No entanto, grande parte das plantas utilizadas na medicina tradicional ainda não foi submetida a estudos que comprovem sua eficácia e segurança e o uso popular não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros. Afinal, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético e a preconização ou autorização oficial do seu uso como medicamento, devem estar fundamentadas em evidências experimentais (SIMÕES *et al.*, 2000).

## **2.7 Gênero *Equisetum***

No Brasil as espécies do gênero *Equisetum* podem ser encontradas em toda região central (Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), onde ocorrem como uma espécie cujo caule delgado apóia sobre outras plantas, podendo atingir até 12 m de comprimento (CORRÊA, 1984).

As diversas espécies de cavalinha, do grande grupo das plantas Criptogâmicas, constituem o que se poderia chamar de verdadeiros fósseis vivos, de um período de 325 milhões de anos. São aproximadamente 15 espécies catalogadas como tal e diversos híbridos compondo o gênero *Equisetum* (VEIT *et al.*, 1995a).

As plantas do gênero *Equisetum*, especialmente as híbridas, apresentam uma morfologia extremamente variável e a sua identificação pode ser particularmente difícil desta forma a espécies deste gênero são apontadas em geral como cavalinha (VEIT *et al.*, 1995b).

São plantas desprovidas de folhas e flores, constituídas basicamente de um rizoma alongado que emite talos aéreos de cor verde acinzentada, os quais são subdivididos por vários nós em todo o seu comprimento, e que vão reduzindo seu diâmetro da base para o ápice. Esses talos, do ponto de vista visual, são as partes mais representativas da planta, e podem emitir muitas ramificações a partir de cada nó (VEIT *et al.*, 1995a).

As espécies do gênero em questão apresentam como principal constituinte os flavonóides além dos compostos fenólicos, em especial os derivados do ácido cinâmico (ácido cafeíco, ácido ferúlico, ésteres de ácido cafeíco, ácido tartárico e ácido clorogênico); ácidos dicarboxilícos (ácido equisetólico), esteróides; estirilpironas e açúcares livres. A presença dos flavonóides, nas partes aéreas, justifica o grande potencial terapêutico apresentado pela cavalinha, enquanto que nas raízes predomina os derivados do ácido cinâmico e estirilpironas (BECKERT *et al.*, 1997; HUTZIER *et al.*, 1998; WIEDENFELD; CETTO; AMADOR, 2000; SANTOS JUNIOR, 2005; MIMICA-DUKIC *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, o interesse pelas propriedades farmacológicas e bioquímicas destes ácidos tem crescido gradativamente, principalmente pela sua atividade anti-inflamatória e anticancerígena, com capacidade de reduzir o risco de doenças como o câncer (DALLA VECHIA *et al.*, 2009)

Ferreira (2001), em estudo químico, avaliou o potencial antioxidante da *Equisetum arvense* utilizando metanol, hexano e acetato de etila como solventes. Foi verificado que o extrato obtido apresenta compostos bioativos e também a presença de substâncias seqüestradoras dos radicais hidroxilas e superóxidos (atividade antioxidante). Embora a *E. arvense* tenha exibido um interessante perfil farmacológico, foram isolados apenas dois esteróides ( $\beta$ -sitosterol e estigmasterol) devido à complexidade dos compostos presentes na planta.

Revilla *et al.* (2002), constatou o efeito hipoglicemiante do extrato aquoso de *E. myriochaetum* Schlecht and Cham (Equisetaceae) em pacientes diagnosticados com diabetes do tipo II começou 90 minutos depois da administração da decocção.

Os níveis de insulina não mudaram significativamente, o que implica mecanismo de ação diferente ao do hipoglicemiante glibenclamida.

A *E. pyramidale* (Figura 1), espécie comum na região de Mato Grosso do Sul, porém confundida com a *Equisetum giganteum*, é utilizada na medicina popular como remineralizante (POTT, POTT, 2000; OLIGOVISK, 2006). Esta espécie vem sendo utilizada em trabalhos que visam o cultivo e estudos com modelos experimentais no processo de cicatrização de feridas de segunda intenção em ratos normais e diabéticos (OLIGOVISK, 2006; CORREA, 2007).



Figura 1: Partes aéreas de *E. pyramidale*

Por outro lado, foi isolado das partes aéreas de *E. pyramidale* predominantemente os triterpenos (ácido ursólico e ácido oleánólico) e, também, os ácidos fenólicos e esteróides (MATIAS, 2008b). Apesar da presença de compostos fenólicos e dos triterpenos ácidos o extrato etanólico de *E. pyramidale* apresentou baixa atividade antioxidante com  $IC_{50} = 506,4 \text{ mg/mL}$  em DPPH (MATIAS *et al.*, 2009a).

Ensaio realizado com *Artemia salina* com o extrato etanólico de *E. pyramidale* nas concentrações 500, 250, 125, 65,5, 31,2 mg/L causaram total mortalidade, estes resultados apontam que este extrato tem ação citotóxica (MATIAS *et al.*, 2009a).

O extrato bruto etanólico das partes aéreas da *E. pyramidale* foi eficaz frente à *Staphylococcus aureus* (MATIAS *et al.*, 2008b), esta ação pode estar relacionada com os triterpenos e compostos fenólicos que atuam como antimicrobianos (SILVA *et al.*, 2007).

Corrêa (2007), concluiu que o uso da pomada a 20% do extrato etanólico das partes aéreas de *E. pyramidale* nas lesões cutâneas de ratos diabéticos apresentou resultados promissores no processo de reparação tecidual em relação ao grupo controle solução salina.

## **2.8. Compostos fenólicos, Esteróides e Triterpenoides com atividade anti-inflamatória**

### **2.8.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são formados no metabolismo secundário dos vegetais e possuem funções de defesa contra o ataque de pragas. Já em animais e humanos tem-se observado que são capazes de reagir com radicais livres, formando radicais estáveis. Esse poder de neutralização das estruturas radicalares dos compostos fenólicos é devido à sua estrutura química formada por pelo menos um anel aromático com grupamentos hidroxilas (GIADA; MANCINI-FILHO, 2006).

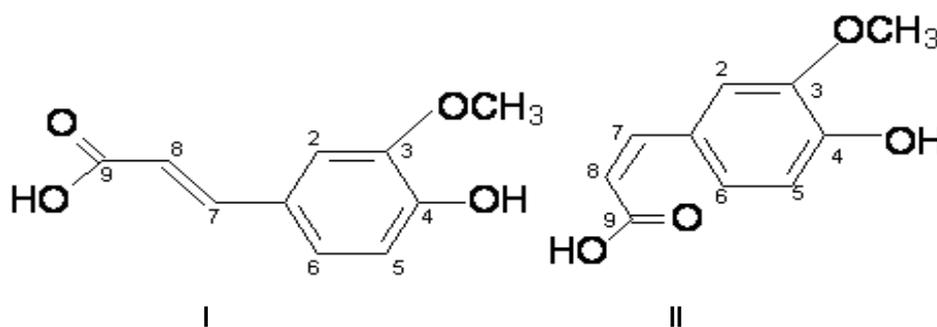
Os compostos fenólicos estão envolvidos na adaptação a condições de estresse ambiental, seja na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (FARAH; DONAGELO, 2006).

Os ácidos fenólicos são compostos hidrobenzóicos e hidrocinâmicos, que contêm um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila e com diferentes grupos funcionais: aldeídos, alcoóis ou ácidos; que podem formar ésteres com os ácidos orgânicos ou unir-se a açúcares (GONTHIER *et al.*, 2003; NARDINI *et al.*, 2006).

Vários efeitos, benéficos à saúde tem sido atribuídos a esta classe de metabólitos presentes nos alimentos e em subprodutos, estudos realizados correlacionam aos mesmos, propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (MUNOZ *et al.*, 2007; ABE 2007), doenças cardiovasculares e outras doenças (SOARES, 2002).

O ácido ferúlico (Figura 2) é um polifenol natural pertencente à classe dos ácidos hidrocixinâmicos, extraído de grãos de alguns cereais como o arroz e a cevada o qual exerce efeito antioxidante, hipotensivo e anti-inflamatório de acordo com alguns estudos publicados na literatura (HIRABAYASHI *et al.*, 1995; UCHIDA *et al.*, 1996; SUZUKI *et al.*, 2002, BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Além da atividade antioxidante e antiinflamatória (OU *et al.*, 2003) também é apontado atividade antimicrobiana, anti-trombose e atividades anticancerosa. Igualmente protege o organismo a doenças coronárias, abaixa o colesterol e aumenta a viabilidade do esperma. É usado como a matéria-prima para a produção de vanillina e de preservativos, como um agente anti-ruga protegendo a pele (OU; KWOK, 2004).



**Figura 2.** Estrutura química do ácido ferúlico – *trans* (I) e *cis* (II)

Segundo Fujita *et al.* (2008) o ácido ferúlico pode exercer também um efeito benéfico na prevenção da neuropatia diabética em ratos, efeito esse muito mais exacerbado quando comparado ao do  $\alpha$ -tocoferol. De acordo com os autores, isso pode ser possível em função do efeito exercido pelo mesmo na redução do stress oxidativo gerado por este processo.

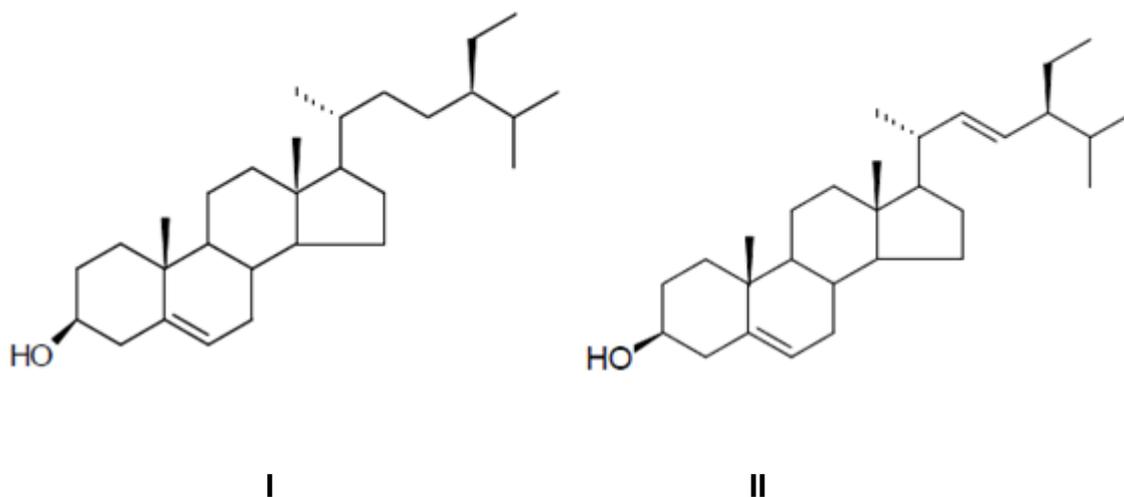
De maneira em geral, os compostos antioxidantes são substâncias que retardam ou previnem significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia, além de prevenirem ou repararem danos ocasionados às células pelas espécies reativas de oxigênio (MOREIRA *et al.*, 2002; CHANWITHEESUK *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2006).

Embora outras características também contribuam para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres, esta é, geralmente, determinada

pelo número de hidroxilas presentes na molécula. A hidroxila do ácido ferúlico existente na posição orto com o grupo metoxila, doador de elétrons, é um fator que aumenta a estabilidade do radical fenoxil e aumenta a eficiência antioxidante do composto. A presença de uma segunda hidroxila na posição orto ou para, também aumenta a atividade antioxidante (CHEN & HO, 1997). O efeito seqüestrante do radical hidroxil parece estar diretamente relacionado aos grupos hidroxil localizados na posição para no anel aromático (DEGÁSPARI *et al.*,2004).

### 2.8.2 Esteróides

Os esteróides são substâncias orgânicas encontradas na natureza que apresentam grande importância médica e terapêutica; como anti-inflamatório e anticoncepcional. Os esteróides mais comuns são o colesterol,  $\beta$ -sitosterol e o estigmasterol (Figura 3) (OLIVEIRA; BUENO, 1996).



**Figura 3.** Estrutura química do  $\beta$ -Sitosterol (I) e Stigmasterol (II)

### 2.8.3 Triterpenos

Os ácidos ursólico e oleanólico (Figura 4) são triterpenos pentacíclicos pertencentes às famílias ursano e oleano, respectivamente. Podem ser encontrados em diversas fontes vegetais na forma livre ou como agliconas de saponinas

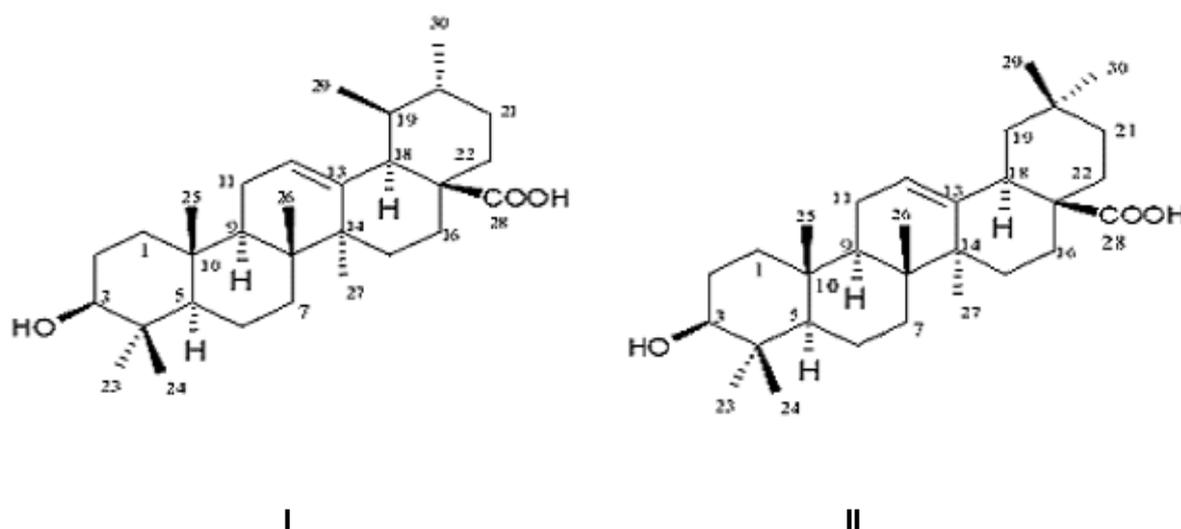
terpênicas e apresentam atividade biológica marcante quer em modelos in vivo, in vitro ou ex vivo (RESENDE *et al.*, 2005).

Nas plantas usualmente ocorrem na forma de ésteres os quais podem ser ambos solúveis (acumulando-se em vacúolos) ou insolúveis (componentes da parede celular) (MAAS; GALLETTA, 1991).

Estes ácidos triterpênicos foram muito investigados no tocante ao seu amplo espectro de atividades biológicas, onde se destacam as atividades: antiinflamatória (LIU, 1995, MÁRQUEZ *et al.*; 2005), antineoplásica (TOKUDA *et al.*, 1986; PISHA *et al.*, 1995), antivirótica (PAVLOVA *et al.*, 2003), antimicrobiana (SATTAR *et al.*, 1995), antiparasitária (LEITE *et al.*, 2001), hepatoprotetora (SARASWAT *et al.*, 1996), e outras.

De acordo com Varanda *et al.* (1992), o extrato hidroalcoólico de folhas de *Jacaranda decurrens* contém ácido ursólico, triterpeno com significativa atividade inibitória de células cancerígenas humanas (HSU *et al.*, 2004; MA *et al.*, 2005). Além desse triterpeno, Pereira *et al.* 2007, isolaram de extrato metanólico de folhas de *J. decurrens* o ácido oleanólico o qual apresenta significativa atividade antiinflamatória (LIU, 1995).

Estes ácidos apresentam uma baixa ou nenhuma toxicidade, sendo, inclusive, utilizados como aditivos em bebidas, alimentos e em cosméticos (LEUNG; FOSTER, 1996). E ampla a abordagem farmacológica encontrada na literatura sobre os triterpenos ácido ursólico (AU) e ácido oleanólico (AO) (DALLA VECHIA *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Estrutura química do ácido ursólico (I) e ácido oleanólico (II)

Estudos comprovam que o ácido oleanólico inibe as lipases, glicerolfosfatodesidrogenases, DNA ligases e Kinases AMPc dependentes; apresenta atividade antiolesterolêmica, antihepatotóxica, antioxidante, antiinflamatória, antifúngica, antibiótica e inibe o crescimento de tumores e de patógenos orais. O ácido oleanólico antagoniza ainda a ação da interleucina 8/C INC, age contra a psoríase, protege a pele da ação da luz, reverte à resistência da leucemia P388 à vimblastina e possuem efeito antagonista em choques anafiláticos (KELECOM *et al.*, 2002).

Marquez *et al.* (2005), concluíram que o ácido oleanólico inibiu a atividade da enzima fosfolipase A2; apresentou também inibição da produção de nitritos em macrófagos murinos RAW267-4, mostrando uma potencial atividade antiinflamatória. As mesmas atividades foram apresentadas pela fração insaponificável do óleo do bagaço da azeitona, na qual esse triterpeno está presente.

Diaz *et al.* (2000), em ensaio com ácido oleanólico (60,91Mm), mostrou que este tem um efeito significativo na síntese da prostaglandina E2 (PGE2), com porcentagens de inibição similares ao da indometacina (IC50= 0,95mM).

Com relação ao ácido ursólico, esse triterpeno também apresenta várias atividades biológicas, por exemplo, uma potente atividade inibitória contra HIV-1 protease (XU *et al.*, 1996; MA *et al.*, 1999). O efeito antiinflamatório desse triterpeno (ID50 = 0,14 $\mu$ mol/cm<sup>2</sup>) foi duas vezes maior que da indometacina (ID50 = 0,26  $\mu$ mol/cm<sup>2</sup>), um fármaco não-esteroidal antiinflamatório que foi utilizado como padrão de referência (BARICEVIC *et al.*, 2005).

O ácido ursólico mostrou atividade antiinflamatória e antinociceptiva inibindo o edema induzido por 1% de carragenina e quando foi avaliado pelo teste ácido acético e no teste da placa quente (TAPONDJOU *et al.*, 2003).

A atividade antinociceptiva apresentada pelo extrato diclorometânico das partes aéreas de *Leonurus sibiricus* L. pode estar relacionada com o ácido ursólico (GRANDO *et al.*, 2006)

Da mesma forma, a atividade antiinflamatória dos extratos de *Salvia officinalis* L. parece ser devida à presença, nos extratos, do ácido ursólico que apresentou essa atividade em pele de ratos (MANEZ *et al.*, 1997).

Também foi avaliado o efeito do ácido ursólico na expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), induzida por forbol-12-miristato-13-acetato, em células mamárias e epiteliais orais humanas. O tratamento com ácido ursólico impediu a

indução da ciclooxigenase-2 (COX-2) e a síntese da prostaglandina-E2 induzida por forbol-12-miristato-13-acetato. Esses dados são importantes para compreender a atividade antitumoral e antiinflamatória do ácido ursólico (SUB BARAMIAH *et al.*, 2000).

Pelo fato da estrutura do ácido ursólico ser um pouco parecida com a estrutura da dexametasona (59), um glicocorticóide sintético, foi investigada a atividade antiproliferativa e antiviral desse triterpeno e da dexametasona em células humanas de câncer cervical associadas ao papilomavírus (HPV). Foi realizado um ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio para medir a atividade antiproliferativa e também caracterizar a apoptose, caracterizada pela fragmentação do DNA e pela análise por citometria de fluxo. Foi investigada a proteína relacionada a apoptose usando o método Western Blots (YIM *et al.*, 2006)

Após o tratamento *in vitro*, foi usada a reação da transcrição reversa da cadeia da polimerase (PCR) para a expressão do gene HPV-E6/E7 e foi observada a atividade antiviral. O ácido ursólico suprimiu o crescimento de células de carcinoma cervical. Em contraste com esses resultados, a dexametasona, não inibiu a proliferação. Esses resultados sugerem que o ácido ursólico pode ser um fármaco útil no tratamento da neoplasia cervical associada ao HPV (YIM *et al.*, 2006).

Em contraste com esses resultados, a dexametasona, não inibiu a proliferação. Esses resultados sugerem que o ácido ursólico pode ser um fármaco útil no tratamento da neoplasia cervical associada ao HPV (YIM *et al.*, 2006).

Diante destes dados, podemos dizer que o processo inflamatório está associado com uma alta incidência de câncer. O processo inflamatório é geralmente acompanhado de estresse oxidativo, responsável por gerar mutações progressivas levando ao desenvolvimento tumoral. O AU e outros triterpenóides comuns em plantas são muito bem conhecidos por sua atividade antiinflamatória e, sendo assim, é possível que a atividade antitumoral dos mesmos também esteja relacionada às suas propriedades antiinflamatórias (DALLA VECHIA *et al.*, 2009).

Estudos comprovados a respeito de triterpenos sintéticos derivados do AO e AU foram testados quanto à modulação dos níveis das enzimas iNOS e COX-2 em macrófagos de camundongos ativados por citocinas inflamatórias, resultando na diminuição da taxa de transcrição destas duas enzimas. Estas estão envolvidas na inflamação, tendo papel importante na resposta dos tecidos ao dano e a agentes infecciosos. Apesar da atividade fisiológica destas enzimas serem benéfica ao

organismo, a excessiva expressão delas implica na patogenia de muitas doenças. Agentes que possam inibir a expressão ou a atividade destas enzimas geralmente induzidas por citocinas inflamatórias são potenciais agentes antiinflamatórios e quimiopreventivos (SUH *et al.*, 1998; RANG *et al.*, 2007).

Outros estudos promissores sustentam o potencial antitumoral destes dois triterpenos e seus derivados, a qual vem sendo comprovada por trabalhos na área. Neste contexto, destacam-se as inibições da promoção tumoral *in vivo*, do crescimento tumoral em camundongos com tumores implantados, da ativação aguda do antígeno do vírus Epstein-Barr da angiogênese *in vitro* e a indução da diferenciação celular (DALLA VECHIA *et al.*, 2009).

Tanto o ácido ursólico quanto o ácido oleanólico possuem atividade anticâncer, mostram efeitos benéficos na hematopoiese imunocompetente em ratos e diminuem os danos indesejáveis do tecido hematopoético após a radioterapia (HSU *et al.*, 1997).

O ácido ursólico apresenta efeito inibitório da proliferação da célula do tumor com a apreensão da célula-ciclo, e esse efeito é maior que aquele apresentado pelo ácido oleanólico (LI *et al.*, 2002). A atividade antiproliferativa observada nos extratos brutos de *Galianthe brasiliensis* pode estar relacionada ao ácido ursólico (MOURA *et al.*, 2006)

A atividade citotóxica do ácido oleanólico e do ácido ursólico foi investigada frente às células de carcinoma nasofaríngeo HONE-1, carcinoma epidermóide oral KB, e carcinoma colorretal HT29. Ambos os triterpenos apresentaram atividade citotóxica significativa contra essas células com IC50 entre 4,0-9,4 $\mu$ M (CHIANG *et al.*, 2005). Esses triterpenos também apresentaram citotoxicidade *in vitro* contra as linhagens A549 (células de câncer pulmonar), SK-OV-3 (ovário), SK-MEL-2 (melanoma), XF498 (sistema nervoso central) e HCT-15 (cólon) (KIM *et al.*, 2000).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico bruto e da pomada a base de *Equisetum pyramidale* Goldn em lesões cutâneas induzidas em ratos não-diabéticos e diabéticos, bem como investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação antiinflamatória dessa planta no processo de reparação tecidual.

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar os parâmetros de inflamação (infiltrado inflamatório, necrose e hiperemia) através da análise histológica das lesões cutâneas.
- Avaliar histologicamente o parâmetro da reepitelização no processo da reparação tecidual.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Amostra

A amostra foi composta por 48 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem WISTAR, com peso corpóreo variando entre 250 a 300 gramas, procedentes do Biotério Central do Campus da Unidade Agrárias da Universidade Anhanguera - Uniderp, Campo Grande-MS.

Os animais foram mantidos em condições de temperatura e luminosidade natural com acesso à ração granulada específica para roedores e água à vontade durante o experimento.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS** em reunião de 22 de Junho de 2007, com protocolo nº. 162/2007.

### 4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos distintos: (Grupo 1 e Grupo 2). Sendo 24 animais não diabéticos (Grupo 1) e 24 animais diabéticos (Grupo 2). Os grupos foram ainda subdivididos em 4 em função do tratamento nos períodos de observação (3, 7 e 14 dias), com 2 animais em cada subgrupo, conforme ilustrado no quadro 1.

**Quadro 1** – Divisão dos períodos, grupos e subgrupos de tratamento.

Período	Grupo 1 Pomada	Grupo 1 Extrato	Grupo 1 Veículo	Grupo 1 S/Trat.	Grupo 2 Pomada	Grupo 2 Extrato	Grupo 2 Veículo	Grupo 2 S/Trat.	Total
3 dias	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	16
7 dias	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	16
14 dias	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	N = 2	16
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>48</b>

### 4.3 Tratamentos:

- **Pomada:** foi administrado nas lesões 0,1g de pomada a base de *E. pyramidale*, sendo considerado subgrupo experimental.
- **Extrato:** foi administrado nas lesões 0,1g de extrato etanólico bruto de *E. pyramidale*, sendo considerado subgrupo experimental.
- **Veículo:** foi administrado nas lesões 0,1g de veículo (lanolina/vaselina), sendo considerado subgrupo controle.
- **Sem tratamento:** as lesões não receberam tratamento.

#### 4.4. Material Botânico

O material botânico utilizado neste trabalho foi cultivado na Horta de Plantas Medicinais e cedido pela Prof<sup>a</sup>. Ms. Rosemary Matias Coelho do Campus da Unidade Agrárias da Universidade Anhanguera - Uniderp, Campo Grande-MS.

##### 4.4.1. Preparo do extrato etanólico bruto e a pomada

As partes aéreas após limpeza e secagem em estufa circuladora de ar (40 °C), foram pesadas, trituradas e submetidas à extração com etanol (99,5%) em banho de ultrasson (UNIDQUE®, 1450) seguido de maceração por 24 horas. Este procedimento foi utilizado até esgotamento do material (15 dias). A remoção do solvente ocorreu sob vácuo em evaporador rotativo, obtendo-se, o rendimento de 20% do peso (500g).

Este extrato foi codificado como extrato bruto etanólico (Ext<sub>EtOH</sub>). Parte do Ext<sub>EtOH</sub> foi incorporada no veículo (vaselina/lanolina na proporção 1:1), para confecção da Pomada a base de Ext<sub>EtOH</sub> 20%, codificada como P<sub>EtOH</sub>.

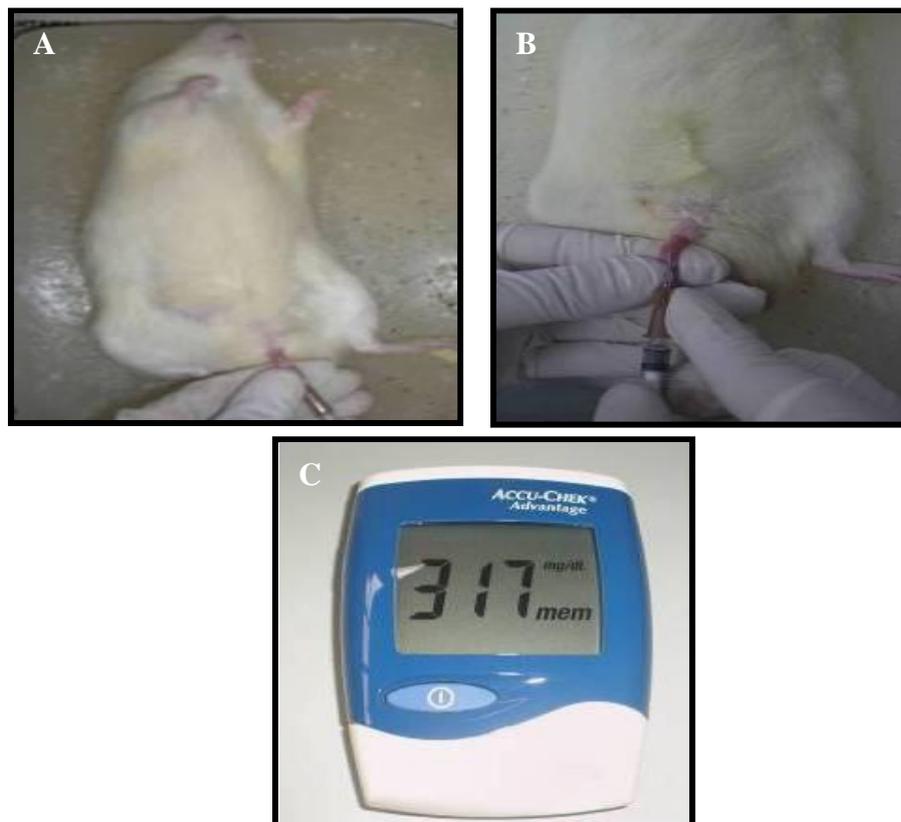
#### 4.5 Indução ao Diabetes Aloxânico

O experimento foi realizado no Laboratório de Toxicologia e Plantas Medicinais da Universidade Anhanguera-Uniderp, Campo Grande-MS.

Da amostra inicial de 48 animais foram retirados 24 animais para compor o Grupo 1 (ratos não diabéticos), os 24 ratos que sobraram ficaram em jejum prévio por 24 horas, pois nestas condições tornavam-se mais susceptíveis ao diabetes.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução da associação de Cloridrato de Xilazina 2% e Cloridrato de Cetamina 10%, sendo que para 100 gramas de peso corporal, foi utilizado 0,2 mL de anestésico.

Após anestesia os animais foram contidos em decúbito dorsal, onde receberam injeção intravenosa (veia dorsal do pênis) de Aloxana (2, 4, 5, 6, - Tetraoxypyrimidina; 5 - 6 – Dioxuryracila) – (SIGMA) preparada no momento da utilização (Figura 5 A e B). Seis horas após a indução, os animais foram tratados com solução de glicose (10%), para evitar convulsões e morte, comuns na fase hipoglicêmica. Após 24 horas, foi retirada a glicose da água. Para constatar a diabetes, realizou-se a primeira leitura da glicemia, retirando-se uma gota de sangue da veia da cauda colocando sobre fitas reagentes da marca ADVANTAGE II e a leitura foi processada em um aparelho GLUCOMETER. Os animais que apresentaram valores superiores a 250mg/dL de sangue foram separados e identificados para dar andamento aos grupos experimentais (Figura 5 C).

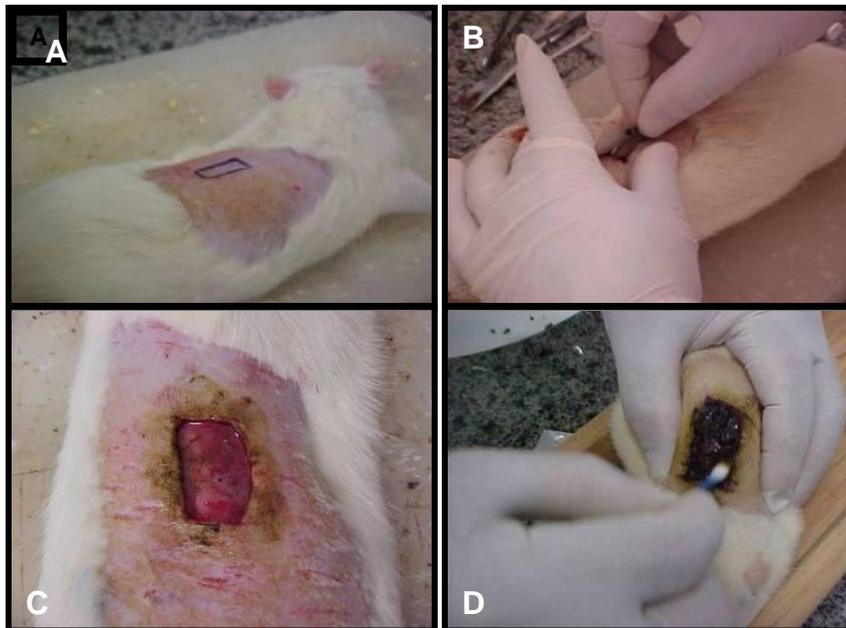


**Figura 5**– (A e B) Indução de diabetes, através de injeção intravenosa de aloxana (veia dorsal do pênis). C) Controle da glicemia sanguínea através do Glucometer.

#### 4.6 Realização das feridas cutâneas

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de solução da associação de Cloridrato de Xilazina 2% e Cloridrato de Cetamina 10%, na proporção 1:2, em doses de 0,10-0,15 ml/100g de peso corporal.

Após o procedimento anestésico, foi realizada a tricotomia da região dorsal superior, utilizando lâmina de barbear. Para a demarcação da área da lesão foi utilizado o paquímetro, confirmado o diâmetro de um retângulo de 2,0 x 1,0cm, o local da incisão foi marcado com caneta específica. A pele demarcada foi incisada com auxílio de bisturi de lâmina 19, o tecido foi pinçado e retirado com pinça dente de rato. As lesões foram tratadas conforme os grupos, durante os períodos estabelecidos (Figura 6). Após os tratamentos, os animais foram recolocados em gaiolas limpas, sendo um em cada uma, com água e ração apropriada, à vontade. No dia final dos períodos estabelecidos, foram identificados, e, posteriormente submetidos à eutanásia com injeção intraperitoneal letal da associação de solução injetável de Cloridrato de Xilazina 2% e Cloridrato de Cetamina. Após terem sido cuidadosamente retirado tecido subcutâneo, as peças foram imersas em frascos de vidros herméticos, com paraformoldeído a 4% e encaminhadas para processamento do material histológico.



**Figura 6-** A) Tricotomia e área demarcada; B) Execução da ferida com auxílio de bisturi Nº 19; C) Retirada do tecido; D) Tratamento das lesões

#### 4.7 Procedimentos Histológicos

Os seguimentos destinados à histologia foram identificados e fixados em solução de paraformoldeído 4% por um período mínimo de 24 horas. Após este período, foram processadas, desidratadas em álcool etílico e incluídas em parafina, submetidas a cortes de 5µm de espessura, corados pela técnica de rotina Hematoxilina-Eosina (HE).

As imagens de cada campo foram obtidas a partir do microscópio de luz Axiolab(Carl Zeiss, objetiva 10x) acoplado a uma câmera para captura de imagem conectada ao micro computador enviadas ao programa específico de Processamento e Análise de Imagem (IMAGELAB), do Laboratório de Pesquisa de Toxicologia e Plantas Medicinais da UNIDERP/MS. Em seguida foi realizada a leitura das lâminas, observando-se dez campos, quatro campos próximos à região de transição ferida/pele normal, seis campos centrais, em sentido horizontal (lâmina corrida).

Contou-se a intensidade do infiltrado inflamatório, extensão de áreas de necrose e hiperemia, estabelecendo a classificação (0) ausente= ausência de infiltrado inflamatório/necrose; (1) discreto=escasso número de células inflamatórias/ pequena área de necrose e hiperemia; (2) moderado=grande número de células inflamatórias/ moderada área de necrose e hiperemia; (3) intenso= excessivo número de células inflamatórias/ extensa área de necrose e hiperemia, para quantificar o processo de reepitelização, foi utilizado o mesmo critério. Considerou-se discreto quando a presença de determinado item ocupou até 25% da lâmina, moderado de 25% a 50% e intenso acima de 50%.

#### 4.8 Análise Estatística

As medidas das variáveis foram expressas em média  $\pm$  desvio padrão. A magnitude de variação entre as variáveis e grupos estudados foi realizada através do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, com pós-teste de Student-Newmans-Keuls. O nível de decisão estabelecido foi  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

As alterações histológicas foram representadas por reação inflamatória predominantemente neutrofílica, áreas de necrose, hiperemia, que variaram de grupo a grupo, em intensidades diferentes, o que induziu uma análise mais acurada. A graduação da intensidade inflamatória, as zonas de necrose/hiperemia e reepitelização obedeceram aos critérios estabelecidos anteriormente na metodologia.

### 5.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória na reparação tecidual

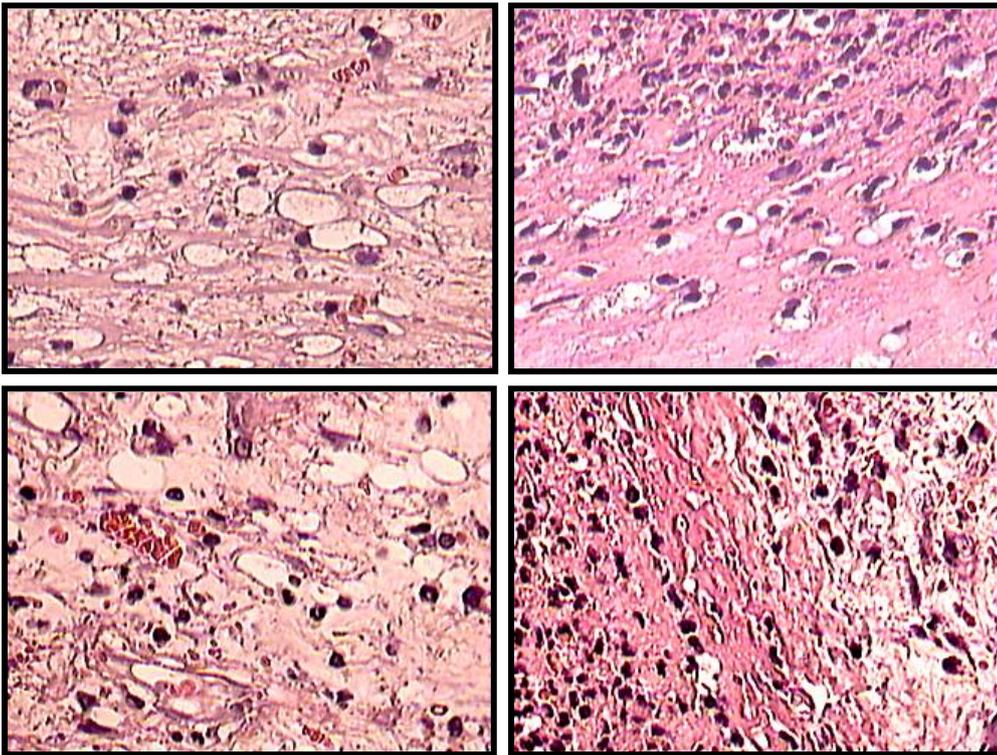
#### 5.1.1 Período 3º DPO

**a) Subgrupo Experimental Pomada (GIP) e (GIIP):** Observa-se área da ferida, encoberta por crosta e moderado quantidade de material necrótico, que serve como proteção para o incipiente tecido de granulação. Infiltrado inflamatório moderado, sendo este menor que no GII, com predomínio de linfócitos e neutrófilos. Ambos apresentaram ausência de vasos sanguíneos (angiogênese), epitélio ou anexos da pele (Figura 7).

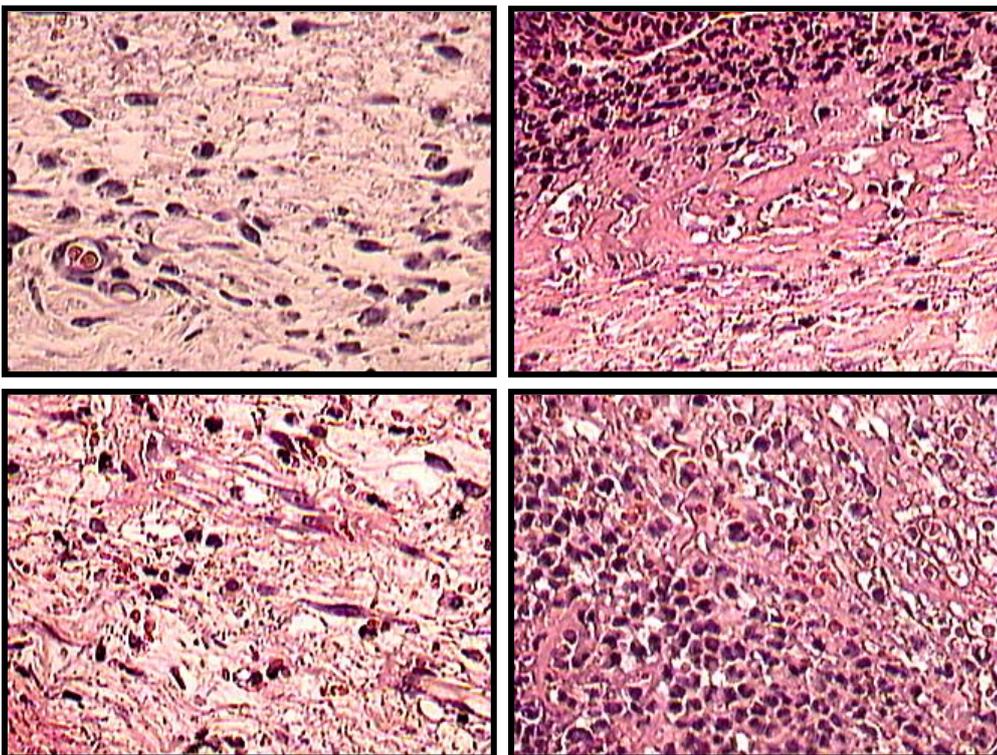
**b) Subgrupo Experimental Extrato Etanólico (GIExt) e (GIExt):** Observa-se área da ferida, com presença de crosta, tecido necrótico discreto, infiltrado inflamatório moderado com presença de linfócitos e neutrófilos e presença de fibroblastos no tecido conjuntivo, não há evidências de vasos sanguíneos (angiogênese), epitélio ou anexos da pele, para ambos os grupos (Figura 7).

**c) Subgrupo Veículo (Controle Positivo) (GIV) e (GIIV):** Observa-se presença intensa de crosta, formada por tecido necrótico superficial rico em fibrina, intensa reação inflamatória aguda, caracterizada pelo predomínio de linfócitos e neutrófilos. Ausência de epitélio e anexos da pele (Figura 8).

**d) Subgrupo Sem tratamento (Controle Negativo) (GIS/T) e (GIIS/T):** Observa-se área da ferida extremamente ampla coberta por uma crosta espessa com tecido necrótico em maior quantidade que nos demais subgrupos. Infiltrado inflamatório considerado intenso as células inflamatórias predominantes são os linfócitos, não havendo diferença entre o grupo correspondente. O GII apresentou crosta com exsudato purulento fétido. O aparecimento de tecido de granulação foi semelhante aos subgrupos experimentais, com a presença moderada de fibroblastos e ausência de epitélio e de vasos sanguíneos (Figura 8).



**Figura 7**– Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas no 3º DPO, 1ª coluna (grupo não diabético) e 2ª coluna (grupo diabético) GIP e GIIP- Visualisa-se inflamação aguda moderada. GIEXT e GIEXT- Visualisa-se inflamação aguda moderada. HE- 100X.



**Figura 8**– Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 3º DPO. GIC e GIIC. Nota-se inflamação aguda com intenso infiltrado inflamatório neutrofílico e espessa crosta fibrino-leucocitária. GIS/T e GIIS/T. Observa-se nas setas camada com células mononucleares e células polimorfonucleares. HE- 100X.

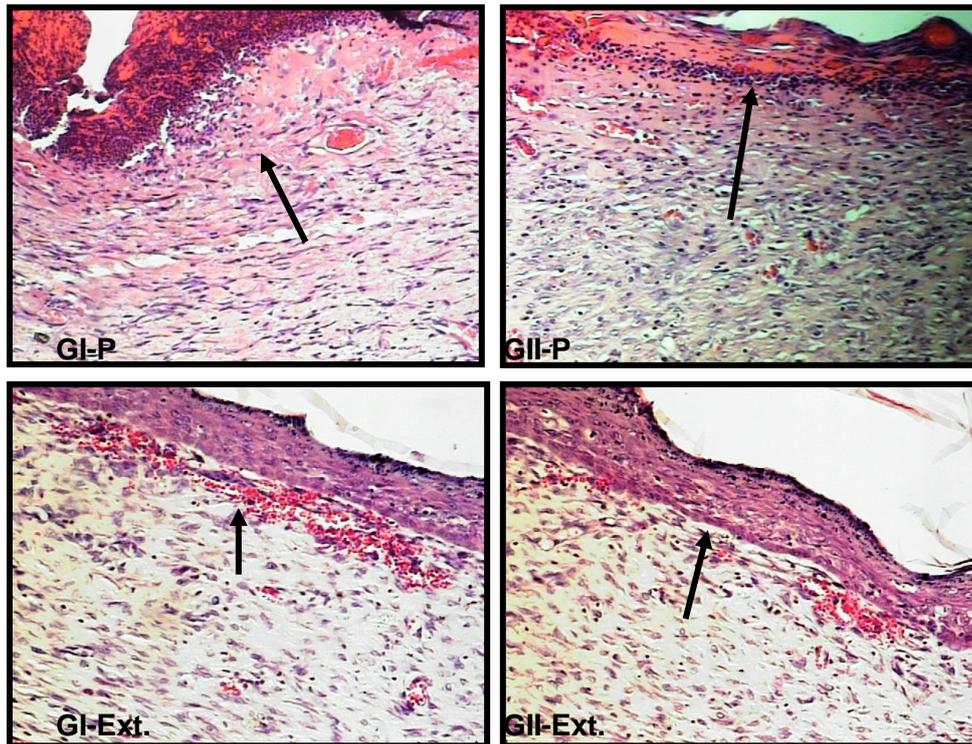
### 5.1.2 Período 7º DPO

**a) Subgrupo Experimental Pomada (GIP) e (GIIP):** Observa-se a área da ferida com presença de crosta reduzida, sendo menor para o GII, infiltrado inflamatório moderado, formação do tecido de granulação foi marcada por intensa proliferação de fibroblastos e a presença de grande quantidade de capilares neoformados, presença de pequenos feixes de fibras colágenas. Tecido epitelial moderado, em fase inicial (Figura 9).

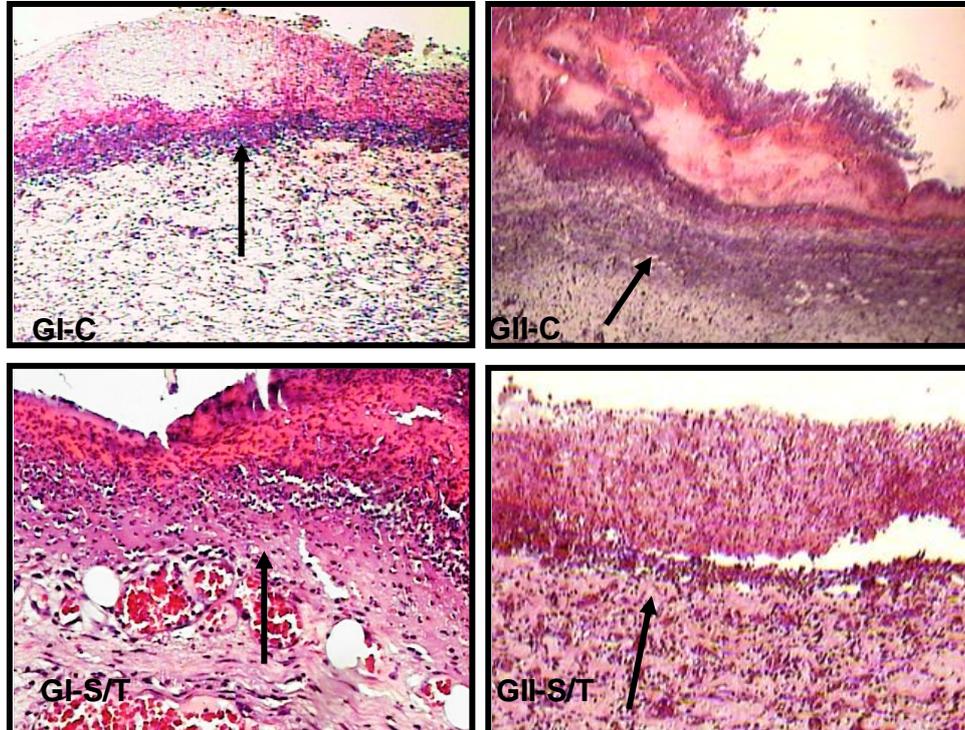
**b) Subgrupo Experimental Extrato Etanólico (GIExt) e (GIExt):** Observa-se reação inflamatória moderada, o infiltrado inflamatório caracterizou-se pelo predomínio de linfócitos e presença de neutrófilos, ausência de crosta, inflamação foi considerada moderada. A formação de tecido de granulação também apresentou intensa proliferação de fibroblastos e a presença de capilares neoformados, melhor organização das fibras colágenas (Figura 9).

**c) Subgrupo Veículo (Controle Positivo)(GIC) e (GIIC):** A crosta ainda encontra-se presente, observando-se, grande quantidade de tecido necrótico, tecido de granulação com predominância de grande quantidade de neutrófilos, presença de fibroblastos e vasos sanguíneos, sendo os vasos presentes em menor quantidade que nos grupos experimentais. A fibroplasia foi mais moderada, teve-se o início da síntese de colágeno. O tecido conjuntivo mostrou-se pouco denso, frouxo e depositado aleatoriamente (Figura 10).

**d) Subgrupo Sem tratamento (Controle Negativo) (GIS/T) e (GIIS/T):** Houve presença de crosta somente no GI, e a reação inflamatória foi considerada intensa, com predomínio de neutrófilos, presença de áreas necróticas e hiperêmicas. Observa-se ainda a presença de fibroblastos e vasos neoformado, sendo presente em maior quantidade no GI. Ausência de tecido epitelial em ambos os grupos (Figura 10).



**Figura 9**—Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 7º DPO. GIP e GIIP, GIS/T e GIIS/T. Visualiza inflamação moderada, intensa fibroplasia e neovascularização. HE - 100X.



**Figura 10**—Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 7º DPO. GIC e GIIC, GIS/T e GIIS/T. Visualiza intensa inflamação linfocítica, fibroplasia moderada e neovascularização. HE - 100X.

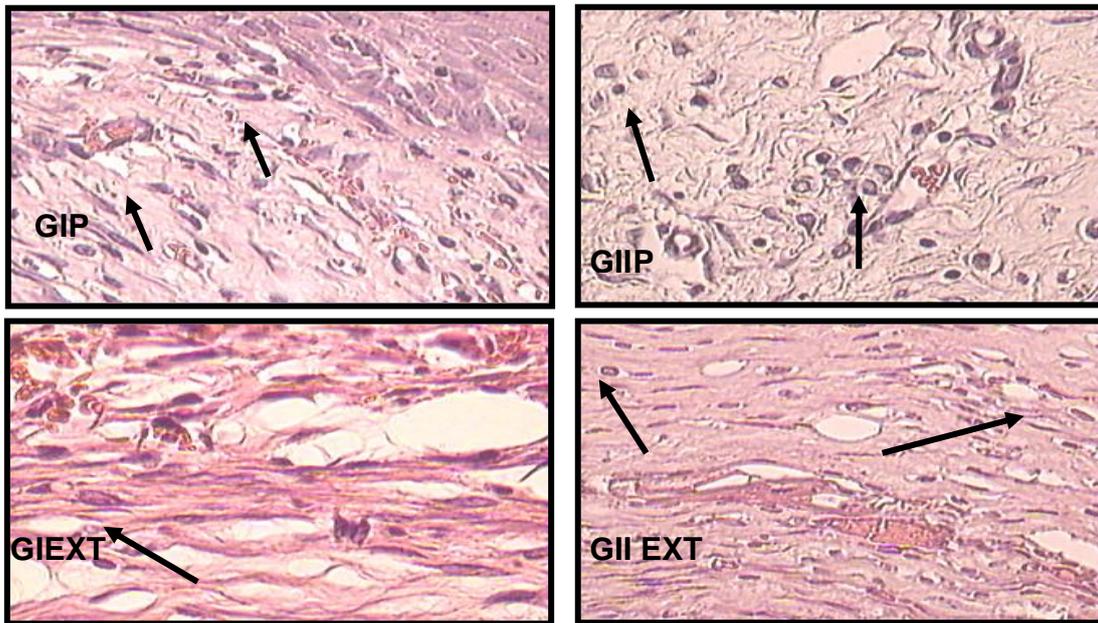
### 5.1.3 Período 14º DPO

**a) Subgrupo Experimental Pomada (GIP) e (GIIP):** Nos animais do grupo GI e GII, houve diminuição do processo de inflamação. Presença de grande quantidade de fibroblastos e finos feixes fibras colágenas, presença discreta de vasos sanguíneos (Figura 11).

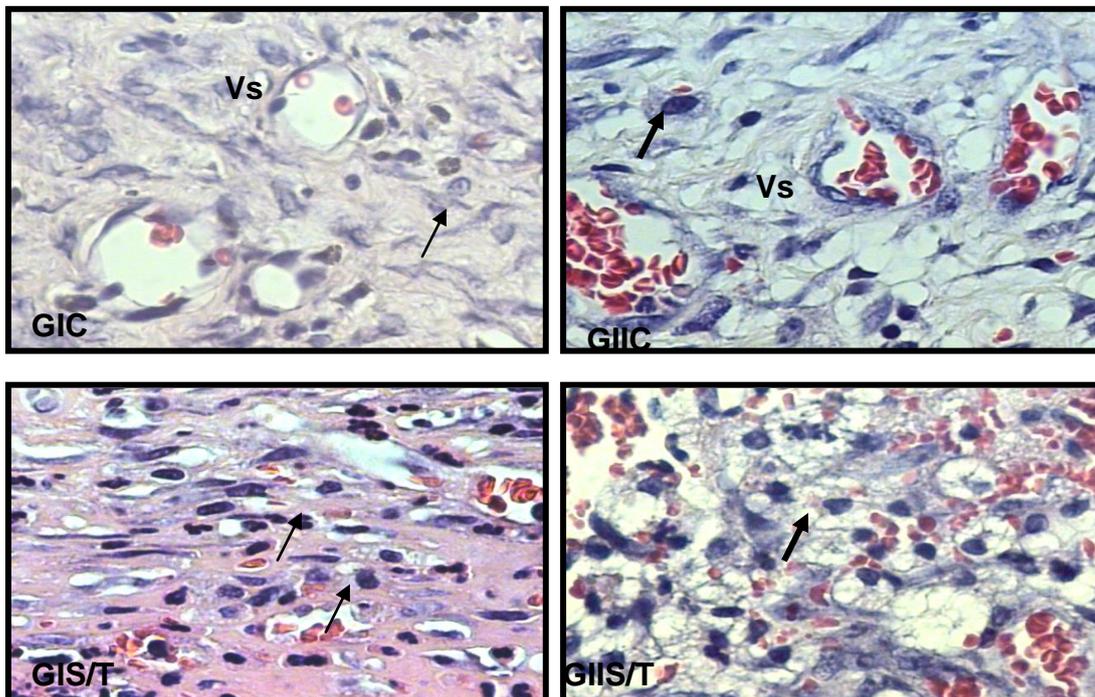
**b) Subgrupo Experimental Extrato Etanólico (GIExt) e (GIExt):** Nos animais do GI e GII, houve discreto infiltrado inflamatório, comparando com os animais do subgrupo pomada, com grande quantidade de fibroblastos e fibras colágenas dispostos irregularmente, presença de vasos sanguíneos em menor quantidade (Figura 11).

**c) Subgrupo Veículo (Controle Positivo) (GIC) e (GIIC):** Observou-se, ferida com presença de infiltrado inflamatório com presença de muitas células. No GI a formação do tecido de granulação encontrou-se atrasada em relação ao GII, a presença de vasos sanguíneos foi presente em ambos os grupos (Figura 12).

**d) Subgrupo Sem tratamento (Controle Negativo) (GIS/T) e (GIIS/T):** Observa-se infiltrado inflamatório com intensa presença de células, grande quantidade de vasos sanguíneos nos animais GII, quando comparados ao GI. Estes subgrupos apresentaram processo de reparação lento quando comparados aos demais subgrupos testados (Figura 12).



**Figura 11-** Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 14º DPO. GIP e GIIP, GIEXT e GIIEXT. Visualiza discreto nmero de células inflamatórias. HE - 400X.



**Figura 12-** Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI não-diabético) e (2ª coluna GII diabético) no 14º DPO. (C) controle; (S/T) sem tratamento. Visualiza intensa neovascularização, maior numero de células inflamatórias. HE - 400X.

## 5.2 Avaliação dos aspectos histopatológicos através de análise estatística

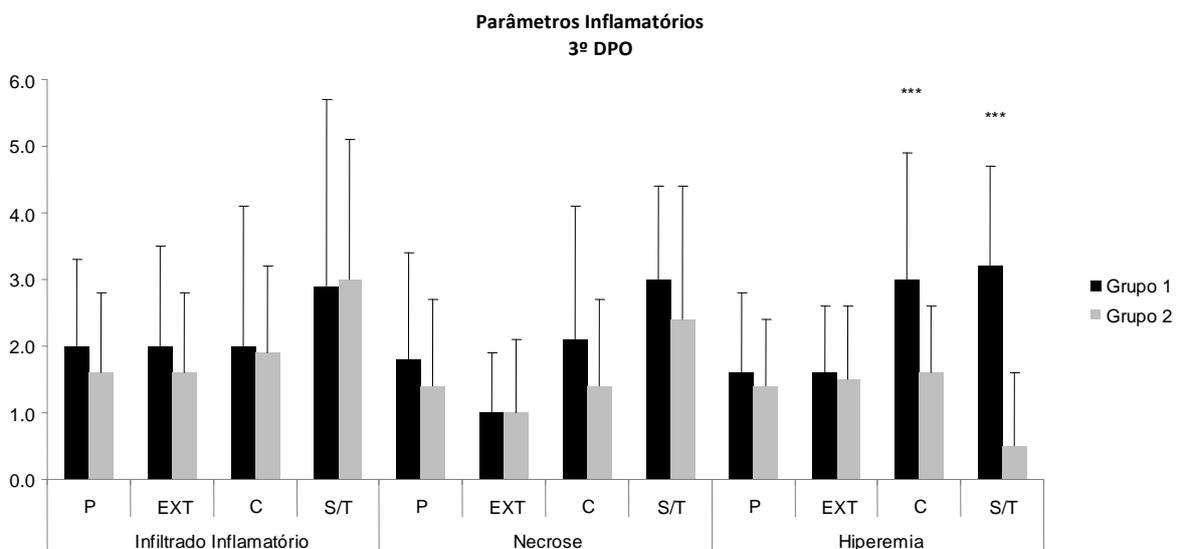
### 5.2.1 Período 3º DPO

A tabela 1 resume os resultados obtidos na análise dos parâmetros inflamatórios, observa-se que os Grupos I e Grupo II, não apresentaram diferença significativa, nos aspectos histopatológicos dos subgrupos pomada, extrato etanólico e controle (veículo), ( $p > 0.05$ ). Logo, comparando o Grupo I e II, quanto ao aspecto hiperemia, pode-se afirmar que no primeiro, o valor é significativamente maior que no Grupo II, obtendo  $p = 0.0167$  e  $p = 0.0001$ , respectivamente (Figura 13).

**Tabela 1**—Resultados da avaliação dos parâmetros inflamatórios entre os grupos normais e diabéticos, no 3º dia de pós-operatório. Valores expressos em médias e desvio padrão.

Aspectos histopatológicos	Subgrupos	Grupo1	Grupo2	Valor p	
<b>Infiltrado Inflamatório</b>	P	2.0± 1.3	1.6± 1.2	0.2793	ns
	Ext.	2.0± 1.5	1.6± 1.2	0.3104	ns
	C	2.0± 2.1	1.9± 1.3	0.6359	ns
	S/Trat	2.9± 2.8	3.0± 2.1	0.7049	ns
<b>Necrose</b>	P	1.8± 1.6	1.4± 1.3	0.5075	ns
	Ext.	1.0± 0.9	1.0± 1.1	0.3980	ns
	C	2.1± 2.0	1.4 ±1.3	0.3302	ns
	S/Trat	3.0± 1.4	2.4± 2.0	0.1441	ns
<b>Hiperemia</b>	P	1.6± 1.2	1.4± 1.0	0.6456	ns
	Ext.	1.6± 1.0	1.5± 1.1	0.6949	ns
	C	3.0± 1.9	1.6± 1.0	0.0167	***
	S/Trat	3.2± 1.5	0.5± 1.1	0.0001	***

P=Pomada. Ext.=Extrato Etanólico Bruto. C=Controle (Veículo). S/Trat.= sem tratamento.  $p < 0,05$ (\*\*\*)



**Figura 13**— Gráfico com a comparação dos grupos nos parâmetros inflamatórios: Infiltrado Inflamatório, Necrose e Hiperemia, no 3º dia de pós-operatório.

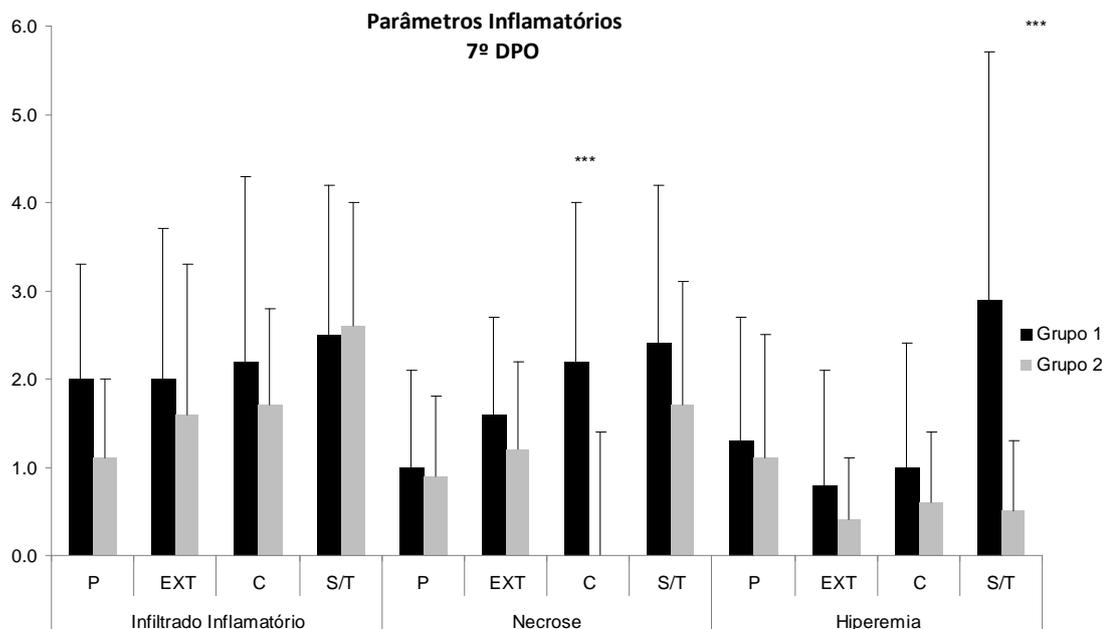
### 5.2.2 Período 7º DPO

Na análise do 7º DPO, com base nos resultados obtidos foi possível constatar que neste período somente os subgrupos controle e sem tratamento apresentaram diferenças significativas nas variáveis: necrose e hiperemia ( $p < 0.05$ ), entre os grupos não-diabéticos e diabéticos (Tabela 2 – Figura 14).

**Tabela 2**–Resultados da avaliação dos parâmetros inflamatórios entre os grupos normais e diabéticos, no 7º dia de pós-operatório. Valores expressos em médias e desvio padrão.

Aspectos histopatológicos	Subgrupos	Grupo1	Grupo2	Valor p	
<b>Infiltrado Inflamatório</b>	P	2,0±1,3	1,1±0,9	0.0305	ns
	Ext.	2,0±1,7	1,6±1,7	0.3577	ns
	C	2,2±2,1	1,7±1,1	0.5979	ns
	S/Trat	2,5±1,7	2,6±1,4	0.7764	ns
<b>Necrose</b>	P	1,0±1,1	0,9±0,9	0.8392	ns
	Ext.	1,6±1,1	1,2±1,0	0.1988	ns
	C	2,2±1,8	1,1±1,4	0.0398	***
	S/Trat	2,4±1,8	1,7±1,4	0.2448	ns
<b>Hiperemia</b>	P	1,3±1,4	1,1±1,4	0.6073	ns
	Ext.	0,8±1,3	0,4±0,7	0.4819	ns
	C	1,0±1,4	0,6±0,8	0.6652	ns
	S/Trat	2,9±2,8	0,5±0,8	0.0022	***

P=Pomada. Ext.=Extrato Etanólico Bruto. C=Controle(Veículo). S/Trat.= sem tratamento.  $p < 0,05$ (\*\*\*)



**Figura 14** – Gráfico com a comparação entre os grupos nos parâmetros inflamatórios: Infiltrado Inflamatório, Necrose e Hiperemia, no 7º dia de pós-operatório.

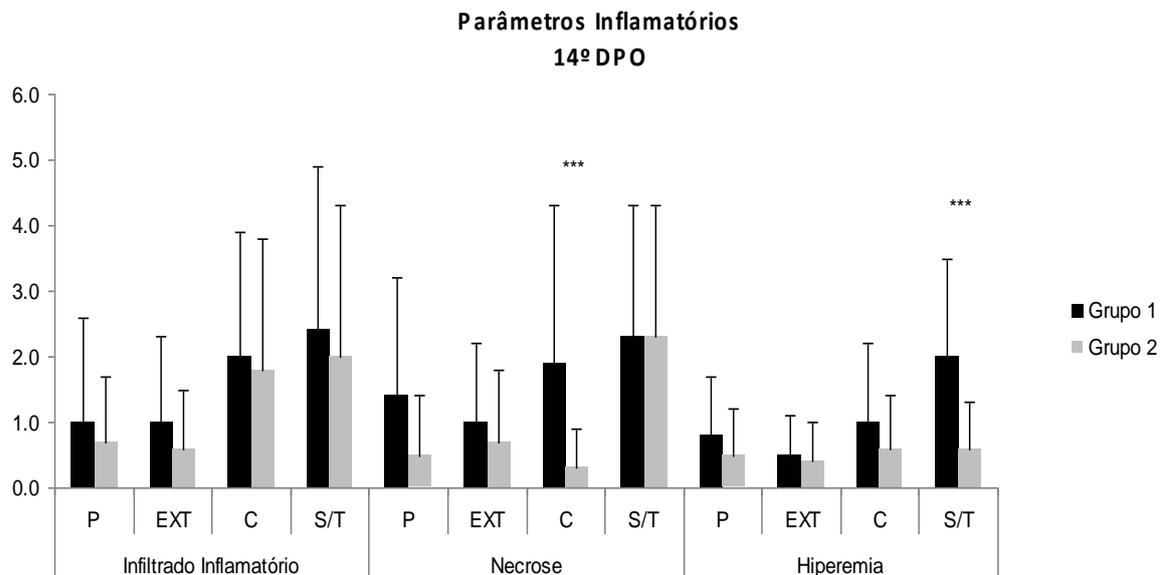
### 5.2.3 Período 14º DPO

No 14º DPO, de acordo com os resultados estatísticos, foi constatada entre os grupos diferença significativa na variável necrose para o subgrupo controle e para o subgrupo sem tratamento na variável hiperemia. Nos demais subgrupos testados não houve diferença quando foi aplicada a análise estatística (Tabela 3 – Figura 15).

**Tabela 3–** Resultados da avaliação dos parâmetros inflamatórios entre os grupos normais e diabéticos, no 14º dia de pós-operatório. Valores expressos em médias e desvio padrão.

Aspectos histopatológicos	Subgrupos	Grupo1	Grupo2	Valor p	
<b>Infiltrado Inflamatório</b>	P	1,0±1,6	0,7±1,0	0.8498	ns
	Ext.	1,0±1,3	0,6±0,9	0.4017	ns
	C	2,0±1,9	1,8±2,0	0.8287	ns
	S/Trat	2,4±2,5	2,0±2,3	0.4249	ns
<b>Necrose</b>	P	1,4±1,8	0,5±0,9	0.7150	ns
	Ext.	1,0±1,2	0,7±1,1	0.4570	ns
	C	1,9±2,4	0,3±0,6	0.0439	***
	S/Trat	2,3±2,0	2,3±2,0	1.0000	ns
<b>Hiperemia</b>	P	0,8±0,9	0,5±0,7	0.3302	ns
	Ext.	0,5±0,6	0,4±0,6	0.7972	ns
	C	1,0±1,2	0,6±0,8	0.3793	ns
	S/Trat	2,0±1,5	0,6±0,7	0.0019	***

P=Pomada. Ext.=Extrato Etanólico Bruto. C=Controle(Veículo). S/Trat.= sem tratamento. p<0,05(\*\*\*)



**Figura 15–** Gráfico com a comparação entre os grupos nos parâmetros inflamatórios: Infiltrado Inflamatório, Necrose e Hiperemia, no 14º dia de pós-operatório.

### 5.3. Avaliação do processo de Reepitelização

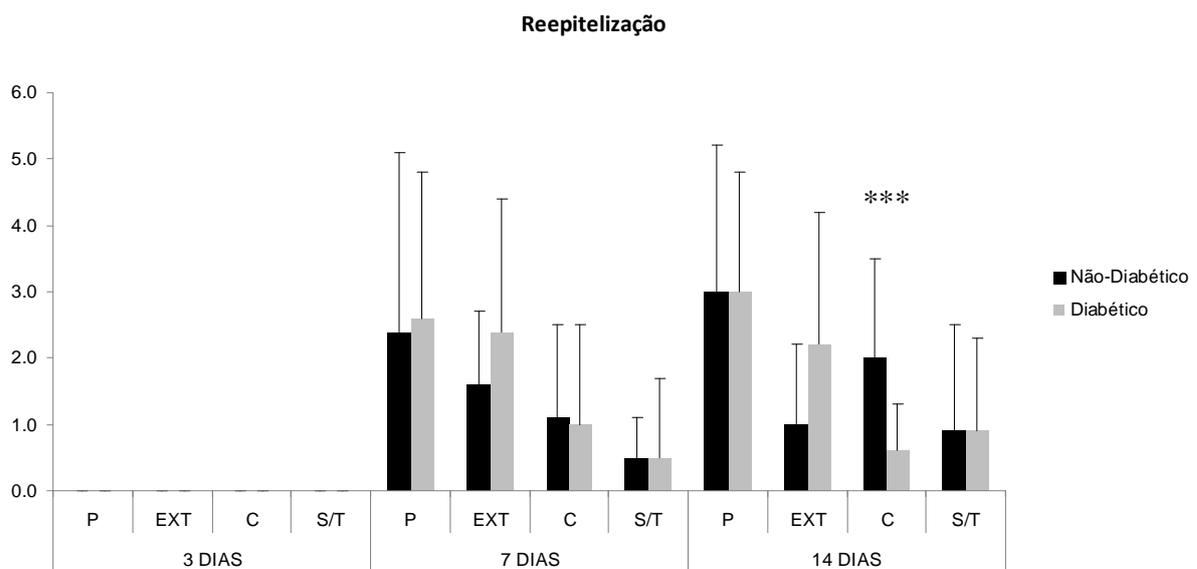
#### 5.3.1 Período de avaliação 3, 7 e 14 dias

A tabela 4 demonstra os resultados das médias do processo de reepitelização, observa-se no 3º DPO, ausência de reepitelização, e ao 7º DPO, não houve diferenças significativas entre os grupos. Porém ao 14º DPO os grupos apresentaram diferença significativa para o subgrupo controle, sendo o GI com maior reepitelização do que o GII ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 4**– Resultados da avaliação do processo de reepitelização entre os grupos normais e diabéticos. Valores expressos em médias e desvio padrão.

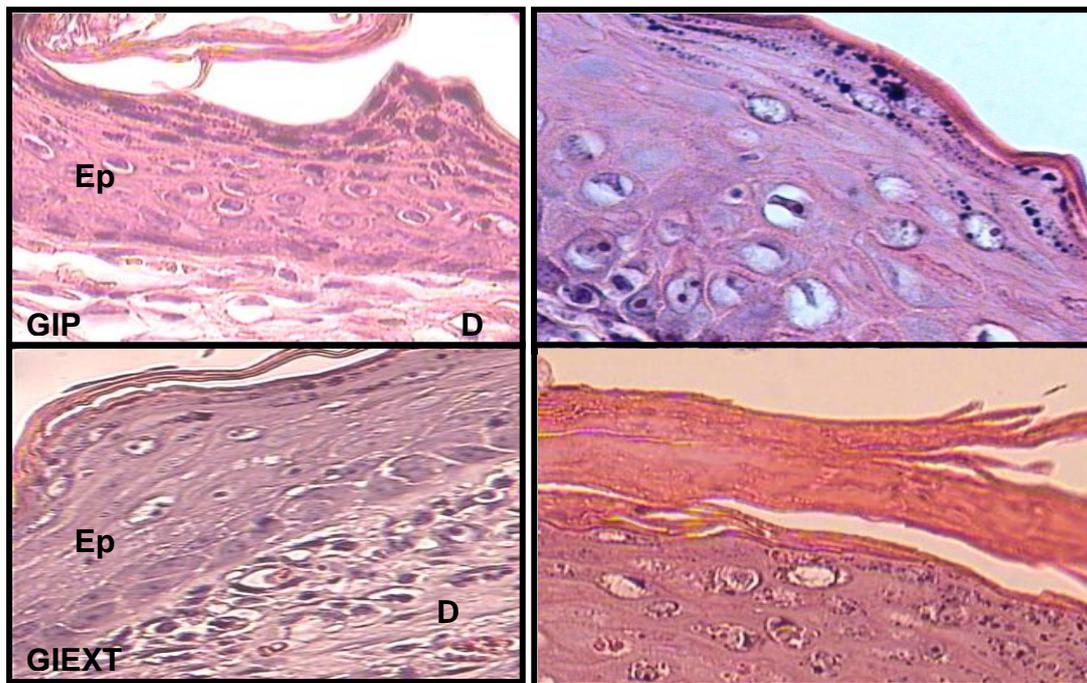
Período	Subgrupos	Grupo1	Grupo2	Valor p	
3 D	P	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0	
	Ext.	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0	
	C	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0	
	S/Trat	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0	
7 D	P	2.4±2.7	2.6±2.2	0.5338	ns
	Ext.	1.6±1.1	2.4±2.0	0.2559	ns
	C	1.1±1.4	1.0±1.5	0.5700	ns
	S/Trat	0.0±0.0	0.5±1.2	0.1762	ns
14 D	P	3.0±2.2	3.0±1.8	0.8711	ns
	Ext.	1.0±1.2	2.2±2.0	0.6949	ns
	C	2.0±1.5	0.6±0.7	0.0017	***
	S/Trat	0.9±1.6	0.9±1.4	0.8498	ns

P=Pomada. Ext.=Extrato Etanólico Bruto. C=Controle(Veículo). S/Trat.= sem tratamento.  $p < 0,05$ (\*\*\*)

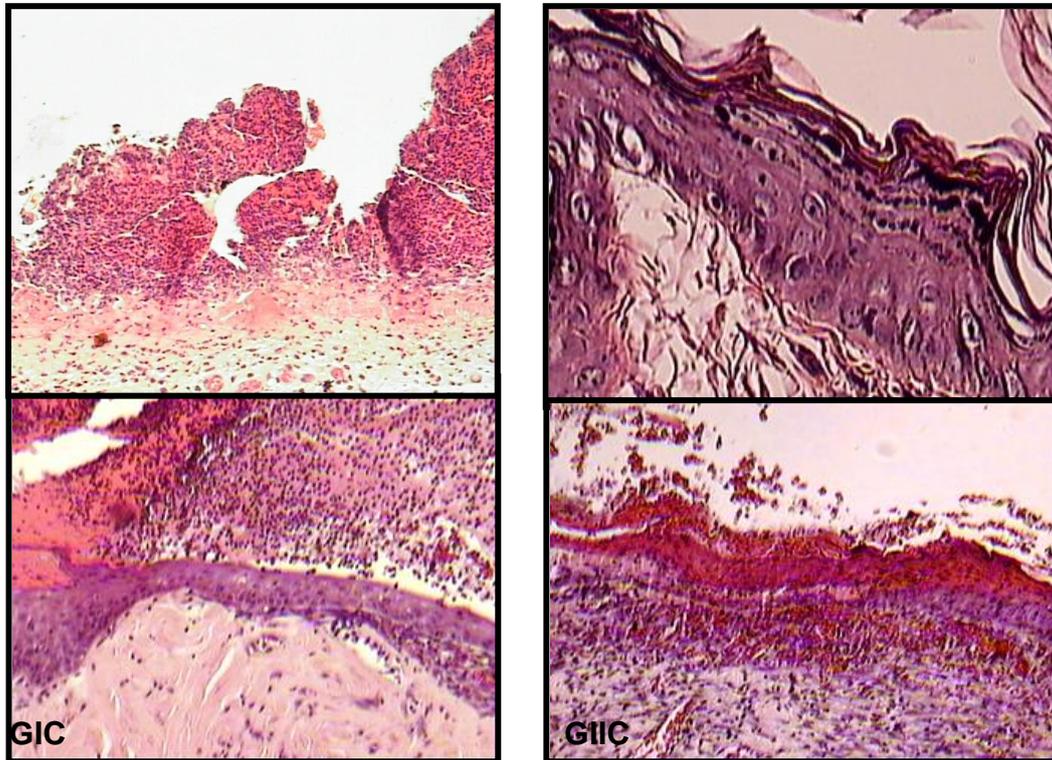


**Figura 16**– Gráfico com a comparação entre os grupos nos parâmetros inflamatórios: Infiltrado Inflamatório, Necrose e Hiperemia, no 14º dia de pós-operatório.

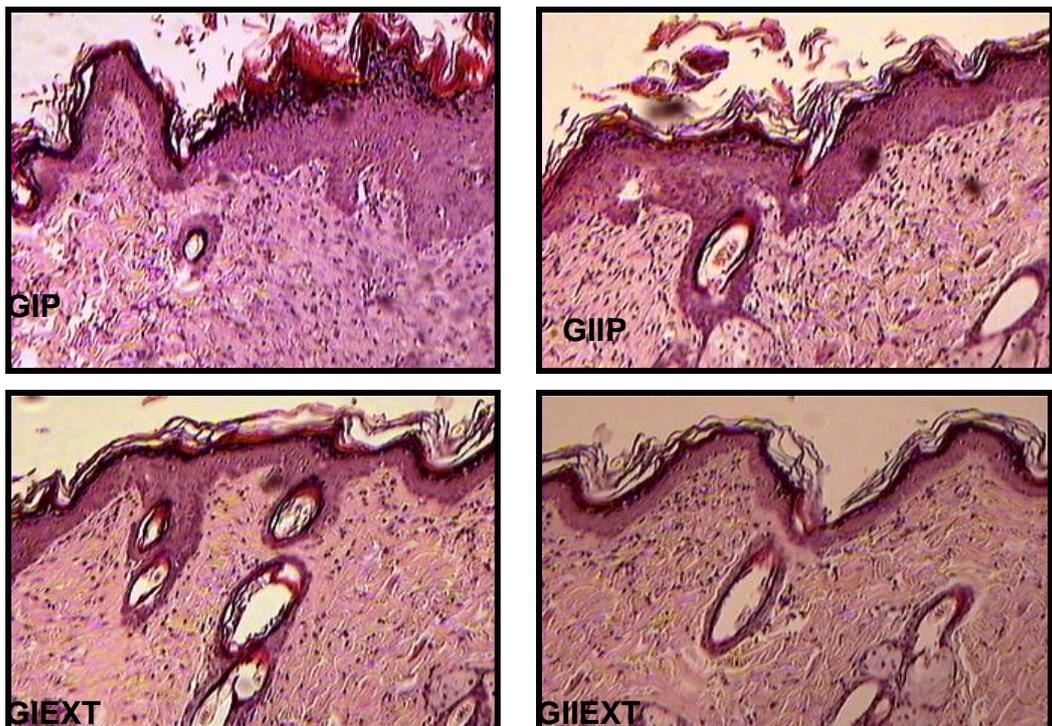
Na avaliação microscópica, houve ausência de reepitelização em todos os espécimes dos subgrupos testados no 3º DPO. No 7º DPO, observou-se início de reepitelização, onde a proliferação epitelial, apesar de ainda encontrar-se incipiente, foi mais evidente nas feridas dos subgrupos experimentais (pomada e o extrato etanólico bruto). No 14º DPO, o processo de reepitelização foi mais evidente nos subgrupos experimentais, com camada dérmica e epidérmica. No subgrupo controle a cicatrização foi completa, porém em um animal do Grupo II apresentou esse processo mais lento. Adicionalmente, foi constatada uma maior queratinização nas feridas do subgrupo experimentais, o que evidencia uma evolução mais acelerada da cicatrização e recuperação funcional nestes dois tratamentos. Nos animais do subgrupo sem tratamento a proliferação epitelial foi mais lenta, principalmente os animais do grupo diabético (Figuras 17 a 20).



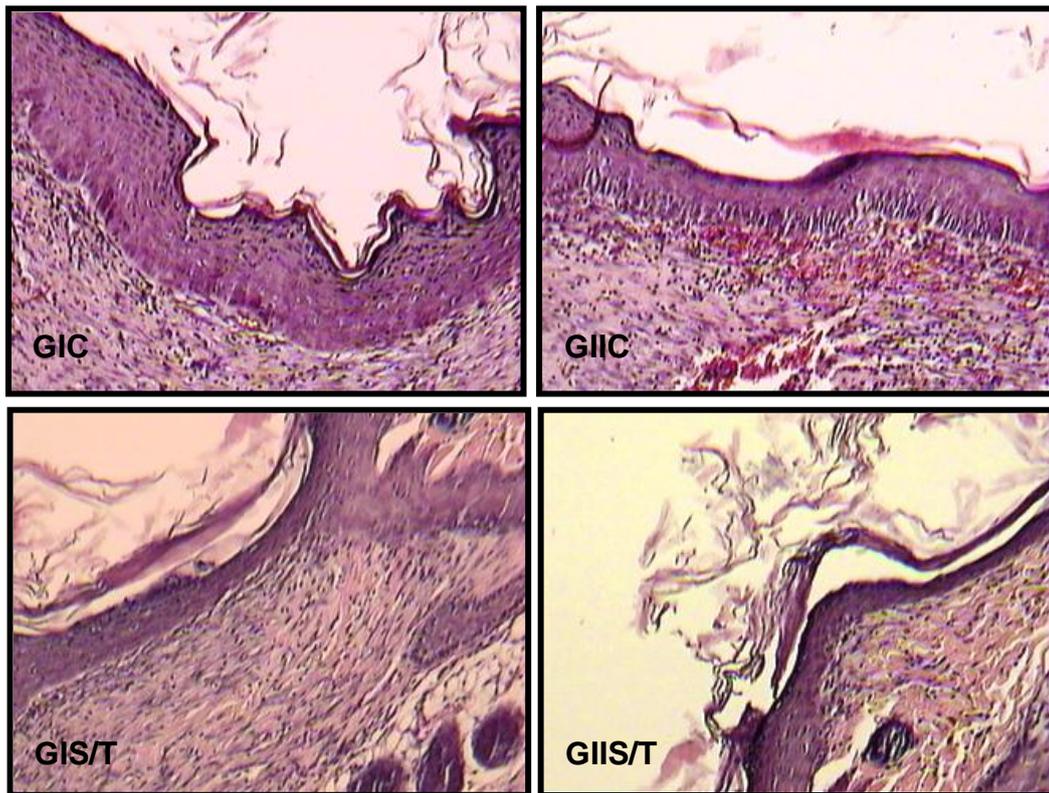
**Figura 17-** - Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI normal) e (2ª coluna GII diabético) no 7º DPO. (P), pomada; (Ext.) extrato etanólico. Nas setas observam-se epitélio em formação inicial: Derme (D) tecido conjuntivo mais organizado e Epiderme (Ep), camada fina de queratinização superficial(Q). HE- 400x.



**Figura 18-** Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI normal) e (2ª coluna GII diabético) no 7º DPO. GIC e GIIC. Observa-se processo de reepitelização atrasado, GIS/T e GIIS/T não completou a reepitelização. HE.400X.



**Figura 19-** Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI normal) e (2ª coluna GII diabético) no 14º DPO. (P), pomada; (Ext.) extrato etanólico. Observa-se processo de reepitelização completo, camadas bem diferenciadas e queratização. HE – 100X.



**Figura 20-** Fotomicrografia de cortes histológicos das feridas dos grupos (1ª coluna GI normal) e (2ª coluna GII diabético) no 14º DPO. GIC eGIIC. Observa-se processo de reepitelização lento. GI(S/T e GIIS/T não completou reepitelização. HE – 100X.

## 6. DISCUSSÃO

Vários estudos com algumas espécies do gênero *Equisetum* têm demonstrado que algumas destas espécies apresentam atividade antiinflamatória e antioxidante (FERREIRA, 2001). O gênero *Equisetum* produz os metabólitos típicos da família Equisetaceae, como: compostos fenólicos (ácido ferúlico), esteróides, e triterpenos (ácido ursólico e ácido oleanólico), com várias atividades biológicas já descritas, tal como atividade fungistática (LEITE *et al.*, 2001), atividade citotóxica (LEUNG;FOSTER, 2004), atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética (LOPES, 2007).

No entanto, nenhum estudo avaliou o potencial anti-inflamatório dos compostos encontrados em nenhuma espécie desse gênero, incluindo a *E. pyramidale* que já foi investigada no tratamento de lesões cutâneas limpas de ratos normais e diabéticos (OLIGOVISK, 2006; CORREA, 2007). Assim, a investigação da atividade anti-inflamatória da *E. pyramidale* se faz necessária para comprovação da eficácia desta espécie nas doenças inflamatórias cutâneas, considerando que o uso tradicional não é suficiente para validar eticamente nenhuma planta medicinal como um medicamento eficaz e seguro (LAPA *et al.*, 2004).

Além disso, a interação dos estudos químico/farmacológicos realizados em laboratórios com as informações provenientes da abordagem etnofarmacológica junto à comunidade que faz uso da flora medicinal, resulta numa estratégia bastante útil, na investigação de novos fármacos a partir de plantas medicinais. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade anti-inflamatória da *E. pyramidale* em processos inflamatórios agudos, utilizando para tal diferentes grupos de tratamentos.

As lesões cutâneas induzidas no presente trabalho apresentam ação tópica e induzem uma inflamação local como resultado da produção de mediadores pró-inflamatórios que promovem a vasodilatação, infiltração de células PMN e extravasamento de plasma, conduzindo assim à instalação dos sinais clássicos da inflamação (DE BERNARDIS *et al.*, 1994; FURSTENBERGER *et al.*, 1994).

Assim, os modelos de lesões cutâneas permitem identificar compostos com atividade anti-inflamatória que possam ser potencialmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias que acometem a pele, pois promovem condições que se

assemelham com alguns tipos de dermatites observadas em humanos (CARLSON *et al.*, 1985; BOUCLIER *et al.*, 1990; VANE, 2000).

Essas lesões consistem num modelo útil para a triagem da atividade anti-inflamatória de compostos que atuam na fase aguda da inflamação, bem como em processos inflamatórios hiperproliferativos (GARROS, 2006). A aplicação tópica da pomada, extrato vaselina/lanolina induziu uma resposta inflamatória cutânea caracterizada por vasodilatação e formação de eritema já no terceiro dia, seguido do aumento da espessura da crosta como resultado do extravasamento celular que atinge um pico máximo no 5-6 dias e tende a diminuir, nos próximos dias. A aderência dos leucócitos PMN na parede dos vasos e a degranulação de mastócitos é verificada entre a 4<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias. No entanto, a infiltração máxima de leucócitos polimorfonucleares no tecido é atingida somente 72 horas após a aplicação tópica dos tratamentos.

O mecanismo pelo qual os triterpenos exercem seus efeitos no processo de inflamação é decorrente da ativação da PKC, bem como da ativação seqüencial da via da MAP quinase, fosfolipase A2, ativação do AA, indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da LOX, que por sua vez culmina na síntese e liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular, sendo estas as características da resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica da planta (MURAKAWA *et al.*, 2006). Assim, compostos capazes de inibir a cascata do AA se mostram ativos anti-inflamatórios, como efetivamente demonstrado pelos corticóides, inibidores da PLA2 e inibidores da COX e/ou LOX (GARROS, 2006).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as prováveis atividades anti-inflamatórias da *Equisetum pyramidale* uma vez que os triterpenos encontrados na composição química apresentaram ambas as atividades(anti-inflamatórias). Para isso, utilizamos modelos clássicos de avaliação farmacológica envolvendo atividades antiinflamatórias e antioxidantes. A evolução no entendimento dos aspectos moleculares da patofisiologia da inflamação favoreceu o estabelecimento de novos sistemas de testes *in vitro* para a seleção de diversas substâncias que permitem a identificação de novos compostos anti-inflamatórios (CARVALHO, 2004).

Existem vários ensaios *in vitro* que são utilizados para testar a atividade anti-inflamatória, porém o procedimento de triagem mais comum é a verificação da inibição da COX e/ou da 5-LOX, extratos ou compostos isolados de várias plantas

utilizadas na medicina tradicional demonstraram promover a inibição COX e/ou 5-LOX (BORCHERS *et al.*, 2000).

Nas observações macroscópicas, verificou-se que o aumento de volume da área central e o aspecto irregular das feridas dos animais dos grupos a partir do 7º dia, foi devido à presença de crosta fibrino leucocitária, coincidindo com as observações feitas por (COTRAN, 2000), uma ferida ao sofrer agressões é isolada do meio ambiente após ser preenchida por coágulos, fibrinas e exsudato, formando uma crosta (EURIDES *et al.*, 1998).

Na avaliação microscópica foi possível constatar que os subgrupos pomada e extrato etanólico, apresentaram a fase inflamatória da cicatrização moderada que prevaleceu no 3º e 7º DPO, sendo caracterizada pela predominância de neutrófilos e uma menor quantidade de linfócitos. Neste período, de forma geral, as feridas dos subgrupos experimentais apresentaram uma inflamação mais moderada e um melhor aspecto macroscópico com menor formação de crostas e ausência de exsudação, até o 14º DPO, quando comparado aos subgrupos controle e sem tratamento, que apresentaram maior quantidade de células mononucleares.

A *Equisetum pyramidale* apresentou atividade anti-inflamatória nas lesões e migração celular. Deste modo, sugere-se que a ação anti-inflamatória dos compostos ácidos ursólicos e oleanólicos possa ocorrer através de uma interferência na síntese e/ou liberação das cininas, prostaglandinas, histamina e serotonina, ou por agir sobre esses receptores envolvidos na resposta inflamatória.

O efeito anti-inflamatório foi caracterizado também pela inibição da exsudação. Estes resultados estão de acordo com os estudos previamente realizados por Goulart *et al.* (2007), onde demonstraram que as raízes, folhas e inflorescências da *Solidago chilensis* possuem propriedades antiinflamatórias inibindo os leucócitos e a exsudação no modelo da pleurisia induzida por diferentes agentes flogísticos.

Uma vez que foi observada uma diminuição significativa na migração de neutrófilos, é importante comentar sobre as moléculas de adesão que são as responsáveis pela quimiotaxia destas células na resposta inflamatória. Estas moléculas são responsáveis pelo rolamento, adesão e transmigração dos leucócitos (SEELY *et al.*, 2003; RUTH *et al.*, 2005; HIETBRINK *et al.*, 2006). Os neutrófilos ativados presentes no foco inflamatório contribuem significativamente na liberação de radicais livres, enzimas proteolíticas (BRADLEY *et al.*, 1982; ARNHOLD, 2003) e

alguns mediadores inflamatórios (LT, PG e elastase humana leucocitária) (PRIETO *et al.*, 2003). Os mediadores liberados pelos neutrófilos são responsáveis pela sustentação de um processo inflamatório agudo na placa psoriática, através da ativação de queratinócitos e linfócitos T (TERUI, 2000). A inflamação aguda é uma resposta rápida frente a diversos agentes ou estímulos que envolvem o recrutamento e ativação de neutrófilos (POBER e SESA, 2007; VERGNOLLE, 2008).

No entanto, quando o estímulo não é eliminado o processo inflamatório persiste, tornando-se crônico. A principal característica da transição do processo inflamatório agudo para crônico é a mudança na composição do infiltrado leucocitário, onde os neutrófilos são substituídos por células mononucleares fagocíticas e linfócitos T (POBER e SESA, 2007). Desta forma, a redução da migração de macrófagos, neutrófilos e linfócitos para o sítio de inflamação por um determinado composto é importante para que o quadro clínico da inflamação não chegue a uma inflamação crônica ou na reversão do processo inflamatório crônico (BRADLEY *et al.*, 1982; ARNHOLD, 2003).

Park *et al.* (2001) e Murakawa *et al.* (2006), considerando as vias e os mediadores pró-inflamatórios envolvidos na resposta inflamatória, verificaram que vários são os alvos sobre os quais os compostos presentes nas plantas podem exercer sua ação farmacológica. No entanto, parte da ação antiinflamatória dessas plantas também poderia ser decorrente de um efeito inibitório sobre a síntese de metabólitos do ácido araquidônico ou bloqueando suas ações.

Desta forma, provavelmente, a *E. pyramidale* apresentou um efeito inibidor sobre os mediadores da inflamação, com efeito benéfico da atividade anti-inflamatória dos triterpenos ácidos em especial ácidos ursólico e oleanólico encontrado na composição química da planta.

Estes dados estão de acordo com os descritos por Diaz *et al.* (2000), que verificaram em modelos experimentais que estes ácidos inibem a síntese da prostaglandina E2, similar ao da indometacina (IC=0,95mM). De acordo com os resultados obtidos, pomada assim como o extrato etanólico; foram efetivos em diminuir a migração leucocitária, à custa principalmente de neutrófilos, o que caracteriza inibição da resposta inflamatória aguda (SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

Suh *et al.*(1998) e Rang *et al.*(2007), em estudo realizado com derivados sintéticos de ácido ursólico e oleanólico, verificaram a diminuição da taxa de transcrição de duas enzimas relacionadas ao fator de transcrição, fator nuclear-κB

(NF-Kb), crítico para a indução das enzimas iNOS e COX-2. A expressão aumentada de COX-2 é associada com vários fatores fisiopatológicos, incluindo doenças inflamatórias e diferentes cânceres (HARPER & TYSON-CAPPER, 2008).

Estudos têm demonstrado que estes dois ácidos apresentam resultados satisfatórios na diminuição do processo inflamatório assim como inibição da expressão de algumas enzimas associadas à patologia, como o câncer (SUB BARAMIAH *et al.*, 2000; TAPONDJOU *et al.*, 2003; YIM *et al.*, 2006; DALLA VECHIA *et al.*, 2009).

O processo inflamatório caracteriza-se por quatro sinais clássicos: calor, eritema, edema e dor. Assim, a utilização do infiltrado inflamatório como parâmetro de avaliação em lesões cutâneas, permite avaliar o potencial anti-inflamatório tanto por via tópica quanto sistêmica de vários agentes, sejam eles compostos sintéticos, extratos de plantas ou compostos isolados (YOUNG, 2001; GARROS, 2006). Além disso, quando o objetivo é o desenvolvimento de medicamentos de uso tópico, esse modelo oferece ainda a vantagem de identificar compostos que apresentam uma absorção cutânea apropriada de forma a atingir concentrações adequadas na pele para exercer um efeito farmacológico (BOUCLIER *et al.*, 1990).

No presente estudo, as médias dos aspectos histopatológicos das feridas tratadas com pomada e extrato etanólico de *E. pyramidale* não tiveram diferenças significativas no 3º, 7º e 14º DPO. Porém os subgrupos controle positivo e negativo apresentaram diferenças significativas no 3º, 7º e 14º DPO nos aspectos necrose e hiperemia (Figuras 13,14 e 15).

Adicionalmente, nossos resultados vão ao encontro com dados da literatura que mostram que a aplicação tópica de triterpenos resultou em inibição de três eventos inflamatórios importantes, ou seja, a formação de edema, a migração de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e a diminuição nos níveis de citocina IL-1 $\beta$  (VIEIRA, 2006).

No exame macroscópico da ferida, observou-se presença ou ausência de crosta, secreção, edema, na avaliação permitiu monitorar a evolução da cicatrização e a eficiência do tratamento usado, estando de acordo com dados descritos na literatura (PRATA *et al.*, 1988; RIBEIRO *et al.*, 1996; EURIDES *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2000). Macroscopicamente, a pele dos animais do subgrupo sem tratamento (diabéticos) manteve sinais inflamatórios como, edema e hiperemia, que persistiram até o sétimo dia do processo. Esta permanência da fase inflamatória

pode estar associada à presença de crostas e conseqüente falta da reconstituição da epiderme, podendo facilitar a contaminação da ferida (BALBINO *et al.*, 2005), foram também observados sinais de dor possivelmente, pela presença de crostas engrossadas na maioria dos animais.

No entanto, a menor formação de crostas nos subgrupos pomada e extrato etanólico, provavelmente, ocorreram pela ação antiinflamatória de *E. pyramidale*. Outros pesquisadores também observaram uma menor formação de crostas quando aplicaram topicamente uma formulação em gel de confrei (*Symphytum officinale*) (OLIVEIRA *et al.*, 2000) ou uma pomada formada de um composto vegetal contendo 15 plantas medicinais (BÜRGER *et al.*, 2003).

No 7º DPO, as crostas foram facilmente removidas, conforme recomendação de Stadelmann *et al.* (1988), Eurides *et al.* (1998) e Oliveira *et al.* (2000). A crosta, que é formada pela desidratação do coágulo de fibrina, é essencial para a hemostasia, para o fechamento temporário da ferida e o controle da contaminação bacteriana (STADELMANN *et al.*, 1988).

Por outro lado, para que ocorra efetivamente a migração das células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos através do coágulo de fibrina, é necessária a ativação de enzimas proteolíticas que abre um caminho para estas células. Apesar de proteger a ferida do meio externo, a crosta interfere com a cicatrização na medida em que serve de obstáculo à migração celular (SAARIALHO-KERE *et al.*, 1993; VU e WERB, 2000; OVINGTON 2002; VISSE e NAGASE 2003) ela prejudica a deposição de colágeno e a reepitelização da ferida (STADELMANN *et al.*, 1988).

O tecido de granulação foi observado nos dois grupos a partir do 3º DPO com um aumento significativo no 7º DPO, este caracterizou-se pela proliferação fibroblástica e pela presença de capilares neoformados. Os achados encontram-se de acordo com a descrição de Singer e Clark (1999), onde por volta do 4º DPO inicia-se a proliferação de fibroblastos e o brotamento de novos capilares que constituem o tecido de granulação. A fibroplasia foi mais intensa, no 7º DPO, nas feridas tratadas com pomada e extrato etanólico, possuíam uma maior intensidade de deposição de fibras de colágeno, ocasionada pela presença intensa de fibroblastos, com aumento crescente na sua deposição e melhor organização dessas fibras ao longo da evolução da cicatrização no 14º DPO, quando comparado ao subgrupo controle.

O colágeno é obviamente importante em todas as fases da cicatrização da ferida sendo fundamental na recuperação da força e integridade do tecido cicatricial (ADZICK, 1999). Durante o período de fibroplasia o colágeno é produzido de forma crescente, continuamente, até aproximadamente 21º dia, quando a homeostase é alcançada e a taxa de degradação do colágeno equilibra-se com a sua síntese. O conteúdo crescente de colágeno na ferida durante a fase fibroblástica correlaciona-se com a resistência crescente da ferida à tensão (STADELMANN *et al.*, 1998).

Isto foi observado no presente estudo, uma vez que as feridas tratadas com a pomada apresentaram uma maior resistência à tensão, e corresponderam às feridas que possuíam uma maior intensidade de fibroplasia e presença de fibras colágenas, possivelmente, o efeito sobre o entrecruzamento das fibras de colágeno e sua organização proporcionou feridas mais resistentes (DEODHAR *et al.*, 1997).

Portanto, pode-se presumir que a pomada e o extrato etanólico aumentaram a deposição de colágeno e o entrecruzamento de suas fibras com conseqüente aumento de resistência à tensão no 14º, demonstrando uma cicatrização superior em relação aos demais subgrupos testados.

No 14º DPO figura 19, processo de reepitelização completo nas feridas tratadas com a pomada e o extrato etanólico este resultado devem-se também à ação antioxidante, justificada devido à presença do ácido ferúlico na composição química da planta, este ácido também foi estudado por Ou *et al.*, (2003), onde inibiu a ação deletérica dos radicais livres evitando dano tecidual.

Neste aspecto, cabe ressaltar o trabalho de Awale *et al.* (2005) que demonstraram o efeito inibitório sobre a produção de óxido nítrico. Segundo os autores, a inibição da síntese de óxido nítrico é benéfica na medida em que reduz os danos teciduais provocados por esta substância, quando produzida excessivamente. Soma-se a isto, a afirmativa de Weller (1997) e Atuesta (2001) de que a integridade imunológica da pele é mantida pela produção constante de óxido nítrico em baixos níveis, e que esta substância estimula a proliferação celular e a reepitelização. Porém, inibe esta proliferação quando em concentração elevada.

Portanto, é possível, que a pomada e o extrato etanólico de *E.pyramidale* ocasionaram uma melhor reepitelização por inibir a produção de óxido nítrico. Outra observação é o efeito umectante da pomada que evita a perda de água por evaporação no foco da ferida proporcionando um micro-ambiente mais úmido, favorecendo a reepitelização.

Conforme Ovington (2002), a difusão intercelular de mediadores, citocinas e fatores de crescimento só podem ocorrer em um micro-ambiente de ferida úmido. Um dos mecanismos pelos os quais curativos úmidos em feridas aumentam as taxas de cicatrização, por facilitar a comunicação intercelular dentro do foco da ferida. Deodhar e Rana (1997) afirmam que a movimentação de células epidérmicas na ferida é determinada em parte pelo conteúdo de água. O epitélio busca uma migração com uma umidade crítica. Quando a ferida encontra-se desidratada a dissecação e abertura para a migração do epitélio é prejudicada, retardando o processo de cicatrização.

Todo processo evidenciado nas feridas dos subgrupos pomada e extrato etanólico no 14<sup>o</sup> DPO ocorreu, devido a epiderme espessar-se e as células basais da borda da ferida aumentarem de tamanho e migrarem para a mesma, não se dividindo até ser restaurada a continuidade epidérmica. O estágio final da reepitelialização é a maturação das células epidérmicas. Em torno do décimo dia há um extrato córneo, que, comumente, é mais espesso que o da pele sã circunjacente (YOUNG, 2001).

Na avaliação do processo de reepitelização foi possível constatar que os subgrupos pomada e extrato etanólico apresentaram vantagens em relação aos demais, pois as feridas exibiram uma cicatrização superior, onde em todos os animais foi observada cicatrização completa no 14<sup>o</sup> DPO. Enquanto que no subgrupo controle e sem tratamento existiam feridas ainda abertas.

Apesar dos resultados positivos dos subgrupos pomada e extrato etanólico, pode-se observar que os animais do subgrupo sem tratamento, especialmente os diabéticos apresentaram um atraso no processo de reparação tecidual, estes dados foram confirmados em estudos realizados por Carvalho (2002); Loots et al.(1999); Devlin et al. (1996); em animais diabéticos permitiram os autores concluir que o diabetes retarda a reparação pela inibição de fibroplasia, havendo uma diminuída mitose dos fibroblastos. De acordo com Chicarelli (2000), há uma reduzida densidade da superfície das membranas plasmáticas em células diabéticas que acabam por alterar a mobilidade e migração dos fibroblastos interferindo na reparação.

Foi comprovado o efeito antiinflamatório da pomada e do extrato etanólico bruto, dado a redução de exsudação, infiltração de células inflamatórias, em relação aos demais subgrupos testados.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitiram as seguintes conclusões:

a) A pomada de *E.pyramidale* a 20% apresentou efeito positivo sobre a cicatrização de feridas cutâneas de ratos não-diabéticos e diabéticos.

b) As feridas tratadas com o extrato etanólico e a pomada apresentaram um fechamento mais rápido, com menor formação de crostas e menor quantidade de secreção.

c) O uso do extrato etanólico e da pomada apresentaram um efeito anti-inflamatório e estimulou a proliferação de tecido de granulação, evidenciado histologicamente pelo aumento da fibroplasia, neovascularização e deposição de fibras colágenas. Bem como acelerou a reepitelização das feridas.

d) As feridas que receberam tratamento do extrato etanólico e a pomada apresentaram uma melhor organização das fibras colágenas com conseqüente aumento da resistência à tensão.

e) Mais estudos são necessários para avaliar o efeito do Extrato Etanólico de *E.pyramidale* sobre a cicatrização de feridas infectadas, bem como esclarecer a atividade de seus constituintes fitoquímicos sobre os vários componentes do processo de cicatrização.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE L. T. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, 2, p. 394-400, 2007.

ADZICK, N.S. Cicatrização da ferida: características biológicas e clínicas. In: SABISTON, J.R.; DAVID, C.; LYERLY, H.K. *Tratado de cirurgia: as bases biológicas da prática cirúrgica moderna*. 15ªed. vol.1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p 194-206.

AGRA, MF; ARANTES; S.R. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, v.18, p. 472-508, 2008.

ALLER, M.A.; ARIAS, J.L; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The Inflammatory response: An efficient way of life. *Medical Science Monitor*, v.12 (10), p. 225 – 234, 2006.

ALLER, M.A.; ARIAS, J.L; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The Inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. *Medical Hypotheses* v. 68, p. 202 – 209, 2007.

ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*: n. 3, 2001.

ALVES, N.M., 2007. Estudo farmacognóstico e da toxicidade experimental (aguda e subaguda) do Guatambu (*Aspidosprema subincanum* Mart.). Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília.

AMENDT, C.; MANN, A.; SCHIRMACHER, P.; BLESSING, M. Resistance of keratinocytes to TGFB- mediated growth restriction an apoptosis induction accelerates reepithelization in skin wounds. *J. Cell Sci.*, v.115, p. 2189-2198, 2002.

ARATANI, Y. Role of myeloperoxidase in the host defense against fungal infection. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*.v. 47, p.195-199, 2006.

ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry*, v. 69 (1), p. 4-9, 2003.

ATUESTA, J.J. Oxido nítrico y biología cutánea. *Acta Méd. Colomb.*, v. 26 n.4, p.202-204,2001.

ALTINIER, G.; SOSA, S.; AQUINO, R.P.; MENCHERINI, T.; DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v 55(5) p.18-23,2007.

AKAMATSU, H.; KOMURA, J.; ASADA, Y. Mechanism of anti-inflammatory action of glycyrrhizin: effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation. *Planta Medica*,v. 97, p.119-121, 1991.

AWALE, S., KAWAKAMI, T.; TEZUKA, Y.; UEDA, J.; TANAKA, K.; KADOTA, S. nitric oxide (NO) production inhibitory constituents of *Tabebuia avellanedae* from Brazil. *Chem. Pharmacol. Bull.*, v.53, n.6, p.710-713, 2005.

BATISTA, M.C.R., PRIORE, S.L., ROSADO, L.E.F.P.L., TINÔCO, A.A.L., FRANCESCHINI, S.C.C. Controle de diabéticos: resultados de estudos de diagnóstico situacional e de intervenção. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica* 21, 309-315, 2006.

BARICEVIC, D; SOSA, S.; DELLA LOGGIA, R.; TUBAR O, A.; SIMNOVSKA, B.; KRASNA, A.; ZUPANIC, A. Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinallis* L. Leaves. The relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, v.5, n. 75, p.125-132, 2005.

BÄCK M. Leukotrienes: potential therapeutic targets in cardiovascular diseases *Bull Acad Natl Med*, 190(7):1511– 1518, 2006.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L.M., CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.41, n.1, jan./mar,2005.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v.99, n.1, p. 191-203,2006.

BRANSKI, R. C.; et al. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. *Journal of Voice* , v. 19, n. 2, p. 283-289, 2005.

BRADLEY, P.P.; et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal Investigative of Dermatology*. v. 78, p. 206-209, 1982.

BERTUCCI, A.; et al. Prospección química del bosque de galería del río Uruguay. *Rev Brás Farmacogn.* v.18, p. 21-25, 2008.

BECKERT, C.; et al. Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense*. *Phytochemistry.* v. 44, n.2, p.275-283, 1997.

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

BURBACH, G. J; ANSEL, J.C.; ARMSTRONG, C.A. Cytokines in the skin. In: *the Biology of the Skin.* 1 ed. The New York:Parthenon Publishing Group, p. 299-3319,2000.

BLUMENTHAL, R. *The complete German Comission E monographs.* American Botanical Council, New York, 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, p. 179 – 189, 2000.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kB (NF-kB). *Planta Médica*, v. 69 (11), p. 973 – 983, 2003.

CARDOSO. C.R.B. Influência da administração tópica dos ácidos graxos essenciais ômega-3 e ômega-6 e do não essencial ômega-9 na cicatrização de feridas cutâneas induzidas cirurgicamente. *Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicada).* Minas Gerais: Universidade Federal de Uberlândia, 2003.

CARVALHO, P.T. C. et al. Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir. Bras., São Paulo*, v. 21, n. 3, jun. 2006.

CARVALHO, J.C.T. In: *Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas.* São Paulo:Tecmedd, 2004.

CARVALHO, P. T. C. Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de

espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

CARVALHO, P.S.P.; TAGLIAVINI, D.G.; TAGLIAVINI, R.L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas: estudo clínico e histológico em ratos. R. Ci. Bioméd., v.12, p.33-38, 1991.

CAUWENBERGH, G. The role of the pharmaceutical industry in drug development in dermatology. Clinical Dermatology. v. 20, p. 467-473, 2002.

CLARK, A. Natural Products. WILLIAMS, D. LEMKE, T.L. In: Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

CECHINEL FILHO, V.; et al. 13-naringenina-118-4'-OMe-eriodictyol: a new potential analgesic agent isolated from *Rheedia gardneriana* leaves. Zeitschrift für Naturforsch, 55c, p. 820 – 823, 2000.

CHICARELLI, M. Reparação tecidual em ratos diabéticos submetidos a baixas doses de radiação de elétrons em corpo todo. (Mestrado em Radiologia Odontológica). Piracicaba, SP: [s.n],2000,111p.

CONE, J.B. Inflammation. Am J Surgery., 182: 558-562, 2001.

COELI, C.M., FERREIRA, L.G.F.D., DERBAL, M.M., VERAS, R.P., CAMARGO JR., K.R., CASCÃO, A.M. Mortalidade em idosos por *Diabetes mellitus* como causa básica e associada. Revista Saúde Pública 36, 135-140, 2002.

COELHO, M.C.O.C.; REZENDE, C.M.F.; NUNES, V.<sup>a</sup>; SIMÕES, H. Substitutos temporários de pele em feridas: estudo experimental em cães. Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec., v.51, n.1, p.49-56, 1999a.

CORREA, P. M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 5, 1984.

CORREA, A. C. Morfologia da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos diabéticos tratados com pomada orgânica a base de *Equisetum pyramidale*. (Trabalho de Conclusão de Curso), Ciências Biológicas da UNIDERP/MS, 2007.

COTRAN RS, Kumar V, Robbins, ST. Patologia estrutural e funcional. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 87-99, 2000.

COUTINHO, M. A. S.; et al. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Rev. Virtual Quim.* Vol 1, No.3 241-256, 2009.

CHANDRASOMA P, Taylor CR. Patologia básica. São Paulo: Ed. Prentice-Hall do Brasil Ltda; p. 70-9, 1993.

CHANWITHEESUK A, TEERAWUTGULRAG A, RAKARIYATHAM N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chem* 92: 491-497, 2005.

CHEN, Y. F.; TSAI, H. Y.; WU, T. S. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. *Planta Medica*, v. 61, n. 1, p. 2-8, 1997.

CHIANG, C. Y.; et al. Cytotoxic triterpenes from the aerial roots of *Ficus microcarpa*. *Phytochemistry*, vol. 66, n. 4, pp 495- 501, 2005.

DANTAS, C. J. S. Reparação tecidual: mecanismos celulares e musculares da inflamação. Rio de Janeiro: Medsi, p. 197-225, 2000.

DALLA VECHIA, L.; et al. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. *Quím. Nova*, vol.32, n.5, p. 1245-1252, 2009.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; SANTOS, R. J. Atividade antioxidante de extrato de fruto de aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi). *Visão Acadêmica*, vol. 5, n. 2, 2004.

DEODHAR, A.K.; RANA, R.E. Surgical physiology of wound healing. *J. Pos.Grad. Med.*, v.43, n.2, p.52-56, 1997.

DEVLIN,H.,GARLAND, H.,SLON,P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. *J.Oral Maxillofac Surg.Philadelphia*, v.54,n.9, p.1087-1091, Sept.1996.

DESMOULIÈRE, A.; CHAPONNIER, C.; GABBIANE, G. Tissue repair, contraction and the myofibroblast. *Wound repair and Regeneration*, v. 13, p. 7-12, 2005.

DIAZ, A. M.; et al. In vitro anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from *Phillyrea latifolia* L. *Biol. Pharm. Bull.*, vol, 11, pp 1307-1313, 2000.

EURIDES, D.; et al. Aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de copaíba (*Copaifera langesdorfii*). *Vet. Notícias*, v.4, n.1, p.77-82, 1988.

ERNST, E. Adverse effects of herbal drugs in dermatology. *British Journal of Dermatology*, v.143, p. 923-929, 2000.

EHRlich, H. P.; DIEZ, T. Role for gap junctions intercellular communications in wound repair. *Wound Repair and Regeneration*, v. 11, p. 481-489, 2003.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.18, p.23-26, 2006.

FAZIK, M. J.; ZITE, J. A.; GOSLEN, J. B. Cicatrização de feridas. In: COLEMAN, W. P.; HANKE, W. *Cirurgia cosmética, princípios e técnicas*. 2. ed., Rio de Janeiro: Revinter, p. 18-38, 2000.

FELIX, V. N.; MEDEIROS, J. C. O organismo, a ferida e o processo de cicatrização. *Rev.Bras Med*, São Paulo, v.47, n.8, p.355-362, ago. 1990.

FERREIRA, V. B. N. Estudo químico e avaliação do potencial antioxidante da *Equisetum arvense* e da *Marsypianthes chamaedrys*, Dissertação (Mestrado em Química), Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

FERNANDES, E.S.; SILVA, A. C. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, v. 569 (3), p. 228-236, 2007.

FIRESTEIN, G.S. Mechanisms of inflammation and tissue repair. GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. *Textbook of Medicine*, 22 ed., p. 227, 2004.

FOSS, N T, POLON, D P, TAKADA, M H. Skin lesions in diabetic patients. *Rev. Saúde Pública*, Aug. Vol .39, no.4, p.677-682. ISSN 0034-8910, 2005.

FUJITA, A.; FERNANDES, A.S.; LIN, W. Ferulic acid prevents pathological and functional abnormalities of the kidney in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 79, n. 1, p. 11-17, 2008.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance *The Journal of Experimental Medicine*, v. 201 (5), p. 671 – 674, 2005.

GARROS, I.C. et al. Extrato de *passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*. v.21, 2006. Suplemento 3.

GRANDO, R.; SILVA, R. F. R.; MINAMO, M, M.; FIGUEIRA, G. M.; FOGERO, M. A.; LOPES, L. C. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato diclorometano da espécie *Leonurus sibiricus* L. In: 58º Reunião Anual da SBPC, Florianópolis, SC, 2006. Livro de Resumos, 2006.

GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos da dieta na promoção da saúde humana. *Publicatio UEPG Ciencias Biologicas e da Saude*, v. 12, n. 4, p. 7-15, 2006.

GILROY, D. W. The endogenous control of acute inflammation – from onset to Resolution. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies / Inflammatory and musculoskeletal diseases*, v. 1(3), p. 313 – 319, 2004.

GOULART, S.; CORREA, S.A. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy, *J. Ethnopharmacol.* 113: 346-353, 2007.

GOMATHI, K.; HERNANDES, W.; MARCONDES S. Quercetin incorporated collagen matrices of dermal wound healing process in rat. *Biomaterials*,v. 24, p. 2767-2772, 2003.

GONTHIER, M.; NORONHA, A. Chorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *J. Nutr.*, v.133, p. 1853-1859, 2003.

GRONERT, K. Lipid autacoids in inflammation and injury responses: a matter of privilege. *Mol Interv.* (8), 28–35, 2008.

GUYTON, A. C. Resistência do organismo à infecção – sistema de macrófagos dos tecidos, leucócitos e inflamação. *Tratado de fisiologia médica*. 7.ed. Rio de Janeiro:Guanabara, cap.5, p.42-48, 1989.

HAYDEN, M. S., AND S. GHOSH. Signaling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev.* 18, 2195–2224, 2004.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W.M.. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archs. of Biochem. and Biophys.* v. 445, p. 214-224, 2006.

HARPER, K. A. & TYSON-CAPPER, A. J., Complexity of COX-2 gene regulation. *Biochem Soc Trans.*, v. 36, 543-545, 2008.

HERSH, D.; WEISS, J.; ZYCHLINSKY, A. How bacteria initiate inflammation: aspects of the emerging story. *Curr Opin Microbiol.*, 1: 43-48, 1998.

HIRABAYASHI, T.; HERNANDES, C.S.; ALVES, C. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on murine interleukin-8 production in response to influenza virus infections in vitro and in vivo, *Planta Medica*, v. 61, n. 3, p. 221-226, 1995.

HIRAOKA, C.M. Estudo das alterações dos tecidos periodontais durante a movimentação ortodôntica em ratos diabéticos. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade Paulista UNIP: 2007.

HILÁRIO, M. O. E., TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *Jornal de Pediatria*, v. 82, n. 5, p. S206- S212, 2006.

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanism of action and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Review*, v. 43, p. 143-201, 1991.

HUTZER, P.; FISCHBACH, R.; HELLER, W.; JUNGBLUT, T. P.; REUBER, S.; SCHMITZ, R.; VEIT, M.; WEISSENBOCK, G.; SCHNITZLER. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany*, v.49, n.323, p.953-965. 1998.

HSU, H. YANG, J. J.; LIN, C. C.; Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Lett*, vol 1, n. 111(1-2), pp. 7-13, 1997.

HSU, Y. L.; Kuo, P. L.; Lin, C. C.; *Life Sci.* 75, 2303, 2004.

IBA, Y.; SHIBATA, A.; KATO, M.; MASUKAWA, T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing. *International Immunopharmacology*, v. 4, p. 1879-1880, 2004.

JESUS NZT. ; MARQUEZ, ACS.; HELLER,W. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 19: 130-139, 2009.

JUNIOR, P. T. S.; AMADO, K.S.; SILVA, P. Gênero *Acomium*: composição química e potencial farmacológico. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19, (1A): 150 – 157, 2009.

KHAN, I. A. Issues related to botanicals. *Life Sciences*, v. 78, p. 2033 – 2038, 2006.

KIM, Y. K.; YOON, S. K.; KYU, S. Y. Cytotoxic triterpenos from stem bark of *Physocarpus intermedius*. *Planta Med.*, vol. 66, pp. 485-486, 2000

KUPPERa, T.S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. *Mechanisms and Speculations. Journal of Clinical Investigation*. v. 86, p. 1783-1789, 1990.

KUPPERb, T.S. The role of epidermal cytokines. In: SHEVACH, E. e OPPENHEIM, Immunophysiology: The role of cells and cytokines in immunity and inflammation.). New York:Oxford University Press, p. 285-305, 1990.

KELECOM, A.; ROCHA, M. A.; MAJDALANI, E. C.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B. Novas atividades biológicas em antigos metabolitos: ácido oleico e eugenol de *Eugenia caryophyllata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 12 supl. 1, pp. 70-71, 2002.

KUMAR, V.; et al. *Patologia – Bases patológicas das doenças*. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 49 – 79, 2005.

LABRO, M. T. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 4, p. 615-650, 2000.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M.L. *Farmacologia e toxicologia de produtos naturais*. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.;

PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2000.

LEE, J.L.; et al. Cyclooxygenase in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 192, p. 294-306, 2003.

LEUNG, D.Y.M.; BOGUNIEWICZ, M., FOSTER, M.D.; NOMURA, I. HAMUD, Q. A. New insights into atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 113, p. 651-657, 2004.

LEITE, J. P. V.; LOMBARDI, J. A.; CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B.; biomonitorado de uma substância tripanossomicida de Arrabidaea. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 11, n. 2, pp. 77-87, 2001.

LEITÃO F, FONSECA-KRUEL VS, SILVA IM, REINERT F. Urban Janeiro, Brazil). *Rev Bras Farmacogn* 19: 333-342, 2009.

LI, J., GUO, W. J.; YANG, Q. Y. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT 15. *World J. Gastroenterol*, vol. 8(3) pp. 493-495, 2002.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic. *Journal of Ethnopharmacology*, v.49, p.57-68, 1995.

LIMA-JUNIOR, R. C. P.; SANCHES, S.A.; FONSECA E. A Attenuation of visceral nociception by - and -amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. *Planta Med* vol. 72; pp. 34-39, 2006.

LOOTS, M.A.M., SANTOS, M.O. Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) slow disturbed proliferation. *Arch Dermatol Res*, Berlin, v.291, n.2/3, p.93-99, Feb./Mar.1999.

LOPES, J. Triterpenóides com atividade anti-cancerígena, Cadeira de documentação informação, Química Aplicada, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Lisboa, 2007.

MA, C.; CAI SQ, CUI JR, WANG RQ, TU PF, HATORRI M, DANESHTALAB M. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. *Eur J Med Chem* 40: 582-589, 2005.

MA, C.; WANG RQ, TU PF, HATORRI M. Inhibitory effects of constituents from *Cynomorium songaricum* and related triterpene derivative on HIV-1 p rotease. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 47, n. 2, pp. 141 145, 1999.

MACEDO, M., FERREIRA, A.R., 2004. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14, 45-47.

MAAS, J. L.; GALLETTA, G. J. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries: a review. *American Society for Horticultural Science*, v. 26, n. 1, p. 10-14, 1991.

MADDOX, L.I.; SCHWARTZ, D.A. The pathophysiology of asthma. *Annual Review of Medicine.*, 53: 477-498, 2002.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and a bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 79, No 5, 727-747, 2004.

MANDERSCHIED, P.A.; et al. Bacterial clearance and cytokine profiles in a murine model of postsurgical nosocomial pneumonia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* v. 11, p. 742-751, 2004.

MARLIÈRE, LDP.; et al. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 18 (Supl.): 754-760, 2008.

MARIOTTO, S.; SUZUKI, Y.; PERSICHINI, T.; COLASANTI, M.; SUZUKI, H.; CANTONI, O.. Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. *Curr. Med. Chem.* v. 14, p. 1940-1944, 2007.

MARQUEZ, M. A., FERNANDEZ, A. M. A., DE LA PUERTA, V. R.; RUIZ, G. V. Efecto antiinflamatorio de compuestos triterpénicos presentes en la fracción insaponificable del aceite de orujo de oliva. *Nutricion Hospitalaria*, vol. XX Supl. 1, 2005

MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. *Science*, v. 276, p. 74- 81, 1997.

MATIAS, Rosemary ; Macedo, Cristiana Santos de ; FAVERO, Silvio ; SCHLEDER, Eloty Justina Dias ; PORTO, K. R. ; SARRAGIOTTO, Maria Helena ; SARRAGIOTTO, Maria Helena ; SARRAGIOTTO, Maria Helena . Characterization and antimicrobial activity of a phenolic compound isolated from *Equisetum pyramidale* Goldn. In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil & X Congresso Internacional de Etnofarmacologia., 2009, São Paulo. Anais XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil & X Congresso Internacional de Etnofarmacologia.. São Paulo : XX SPMB & X CIE, 2009. v. 1. p. 1-1.

MATIAS, R.; et al. Isolated triterpenes from *Equisetum pyramidale* Goldn and effect of ethanolic extract on cutaneous wound healing.. In: IN: BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY (SBQ). DIVISION OF MEDICINAL CHEMISTRY. 4TH BRAZILIAN SYMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY, 2008, Porto de Galinhas. Anais do IN: BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY (SBQ). DIVISION OF MEDICINAL CHEMISTRY. 4TH BRAZILIAN SYMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY. São Paulo - SP : SBQ\_Divisão de Química Medicinal, 2008b. v. 1. p. 66-66.

MAYER, S.; IZYDORCZYK, I.; REEH, P. W. & GRUBB, B. D. Bradykinin-induced nociceptor sensitisation to heat depends on cox-1 and cox-2 in isolated rat skin. *Pain*, 130, 14–24, 2007.

MINELLI, L., SALMAZO, J.C., MARCONDES, M., NONINO, A.B., NEME, L. Diabetes mellitus and cutaneous affections. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. 78, 735-747, 2003.

MIMICA-DUKIC, N.; SIMIN, N.; CVEJIC, N.; JOVIN, E.; ORCIC, D. BOZIN, B. Phenolic Compounds in Field Horsetail (*Equisetum arvense* L.) as Natural Antioxidants. *Molecules*, v.13, p.1455-1464. 2008.

MOREIRA DL, Engelhardt RL, Reis AS, Sanches EM, Leitão SG, Leitão GG 2002. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae-Mimosoideae). *Rev Bras Farmacogn* 12(Supl.): 124-125.

MONTOURO, P.; et al. Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Rap.Comm.in Mass Sprectr.*, vol. 19, n.16, p. 2244-2250, 2005.

MOULIN, V.; AUGER, F. A.; GARREL, D.; GERMAIN, L. Role of wound repair myofibroblats on re-epithelialization of human skin. *Burns*, v. 26, p. 3-12, 2000.

MUTSAERS, S. E.; BISHOP, J. E.; MSGROUTHER, G.; LAURENT, G. J. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 29, n. 1, p. 5-17, 1997.

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

MUNOZ, O. et al. Contenido de flavonoides y compuestos fenolicos de mieles chilenas e indice antioxidante. *Quimica Nova*, v. 30, n. 4, p. 848-851, 2007 .

MOURA, C. L. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos das espécies vegetais *Miconia rubiginosa* e *Pfaffia glomerata* em microorganismos da cavidade bucal. (Dissertação de Mestrado), Universidade de Franca, p.71, 2006.

NARDINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C.; GISHELLI, A. Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.17, p.14-22, 2006.

NEGRI, G., 2005. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 41, 121-142.

NIEDERBERGER, E.; TEGEDER, I.; VETTER, G.; SCHMIDTKO, A.; SCHMIDT, H.; EUCHENHOFER, C.; BRÄUTIGAM, L.; GRÖSCH, S. & GEISLINGER, G. Celecoxib loses its anti-inflammatory efficacy at high doses through activation of NF- $\kappa$ B. *The FASEB Journal*, 2001.

OHUCHI, K. e TSURUFUJI, A. A study of the anti-inflammatory mechanism of glycyrrhizin. *Mino Medical Review*, v.27, p. 188-193, 1982.

OKIMASU, E.; MOROMIZATO, Y.; WATANABE, S. Inhibition of phospholipase A2 and platelet aggregation by glycyrrhizin an antiinflammation drug. *Acta Medical Okayama*. v. 37, p. 385-391, 1983.

ORTOLAN, E. V. et al. Avaliação de parâmetros de cicatrização no cólon de ratos diabéticos sem agressão cirúrgica. *Acta Cir.Brás.*, v.9, n.3, p.286-295, 2004.

O'TOOLE, E.A. Extracellular matrix and keratinocyte migration. *Clin. Exp. Dermatol.*, v.26, n.6, p.525-530, 2001.

OVINGTON, L.Z. Overview of matrix metalloprotease modulation and growth factor protection in wound healing. *Wounds: Comp. Clin. Res. Pract.* v.14, n.5, p.12-19 2002.

OLIVEIRA, S.T.; LEME, M.C.; PIPPI, N.L.; RAISER, A.G.; MANFRON, M.P. Formulações de confrei (*Symphytum officinale*) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. *R. Fac. Zootec. Vet. Agro. Uruguiana*, v.7, n.1, p.61-65, 2000.

OLIVEIRA, B.H;BUENO, D.D.; *Química Nova* 19(3), 233-236, 1996.

OLISKOVICZ, K.; FACCO, G.; FÁVERO, S.; JARDIM, M. I. A.; DOURADO, D. M.; SARRAGIOTTO, M. H.; MATIAS, R. Morfologia da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos wistar tratados durante 7 e 14 dias com extrato de *Equisetum pyramidale* cultivado. *Ensaio e Ciência*, v.10, n.1, p.153-166. 2006.

OU, S.; KWOK, K.-C. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J. Sci. Food Agric.*, v.84, p.1261-1269, 2004.

PANIZZA, S. *Plantas que Curam (Cheiro de Mato)*. 15ª ed. IBRASA, São Paulo, 1997.

PAVLOVA NI, et al. Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against enveloped and nonenveloped viruses. *Fitoterapia* 74: 489-492, 2003.

PARK, J. E. P.; BARBUL, A. B. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery*, v. 187, p. 115-165, 2004.

PRATA, M.C.; HADDAD, C.M.; GOLDENBERG, S.; SIMÕES, M.J.; MOURA, L.A.R.; TRABULSI, L.R. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em rato. *Acta Cir. Brás.*, v.3, n.2, p.43-48, 1988.

PRIETO, J.M.; RECIO, M.C.; GINER, R.M.; MÁÑEZ, S. RIOS, J.L. Pharmacological approach to the pro- and anti-inflammatory effects of *Ranunculus sceleratus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, p. 131-137, 2003.

PIETROVSKI, E. F. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos das flores de *Combretum Leprosum* Mart. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PISHA E, et al. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med* 1: 1046-1051, 1995.

PHILLIPSON, J. D. New drugs from nature-it could be yew. *Phytotherapy Research*, v.13, p. 2-8, 1999.

POBER, J.S.; SESSA, W. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, 2007.

POPE, E.R. Cicatrização da pele. In: BOJRAB, MJ. *Mecanismos das moléstias na cirurgia dos pequenos animais*. 1ªed. São Paulo: Manole; p.178-183, 1996.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ,

L.A.; PETROVICK, P.R. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento, 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2004.

POTT, V.J. & POTT, A. Plantas aquáticas do Pantanal. Brasília, Embrapa, pp. 404, 2000.

QUINN, R. J.; CARROLL, A. R.; PHAM, N. B.; BARON, P.; PALFRAMAN, M. E.; SURAWEEERA, L.; PIERENS, G. K. & MURESAN, S. Developing a Drug-like Natural Product Library. *J. Nat. Prod.* 71, 464–468, 2008.

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

RESENDE, M. A.; PEREIRA, L.S.; CASTRO, M. S. A. Proposta de um modelo teórico de intervenção fisioterapêutica no controle da dor e inflamação. *Fisioterapia Brasil*, v. 6, n. 5, p.368-371, set./out. 2005.

REVILLA, M. C.; ANDRADE-CETTO, A.; ISLAS, S.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial portion type 2 diabetic patients. *J. Ethnopharmacol.*, v. 81, p. 117-120, 2002.

RIBEIRO, R.C.; SANTOS, O.L.R.; FROTA, C.; CAPARICA FILHO, A.; ABOIM, E. Eficácia do açúcar, colagenase e nitrofurazona no tratamento das infecções incisionais: estudo experimental em camundongos. *R. Bras. Cir.*, v.86, n.1, 25-33, 1996.

RITTNER, H.L.; MACHELSKA, H.; STEIN, C. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. *J. Leukoc. Biol.*, v. 78, p. 1215-1222, 2005.

RICHES, D. W. H. Macrophages involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R. A. F. The molecular and cellular biology of wound repair. New York: Plenum, 1996. p. 95-141.

ROCHA, F.D., TEIXEIRA, V.L., PEREIRA, R.C., KAPLAN, M.A.C. *Diabetes mellitus* e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. *Revista Brasileira de Farmácia.* 87, 49-54, 2006.

ROCHA E SILVA, M.; GARCIA LEME, J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. In: International series of Monographs in Pure and Applied Biology, Modern Trends in Physiological Sciences, v. 37, p. 1 – 47, 2006.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. S. & SAKATA, R. K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. *Rev Bras Anesthesiol.*; 57: 1: 94-105, 2007.

ROCHA JUNIOR, A. M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, 2006.

SANTOS EB, DANTAS GS, SANTOS HB, DINIZ MFFM, SAMPAIO FC. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 19: 321-324,2009.

SAYERS, R. D., Aortic aneurysm, inflammatory pathway and nitric. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 84, 239-246, 2002.

SAARIALHO-KERE, U.K.; KOVACS, S.O.; PENTLAND, A.P.; OLERUD, J.E., WELGUS, H.G.; PARKS, W.C. Cell-matrix interections modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound heling. *J. Clin. Invest.*, v.92, n.6, p.2858-2866, 1993.

SARTI, S. J.; CARVALHO, J., C., T. Fitoterapia e fitoterápicos. In: CARVALHO, J., C., T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 13 – 38, 2004.

SARASWAT B, Visen PKS, Dayal R, Agarwal DP, Patnaik GK . Protective action of ursolic acid against chemical induced hepato-toxicity in rats. *Indian J Pharmacol* 28: 232-239, 1996.

SAMUELSSON, G. *Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy*, 5 ed., Stockholm:Swedish Pharmaceutical Press, 2004.

SANTOS JUNIOR, J. G. dos; BLANCOM, M. M.; DO MONTE, F. H. M.; RUSSI, M.; LANZIOTTI, V. M. N. B.; LEAL, L. K. A. M.; CUNHA, G. M. Sedative and anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of *Equisetum arvence*. *Fitoterapia*, v.76, p.508-513. 2005.

SANCHAYITA, M.; ABRAHAM, E.. Participation of superoxide in neutrophil activation and cytokine production. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1762, p. 732-741, 2006.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W.. Analysis of Inflammation. *Annual Review of Biomed. Eng.* v. 8, p. 93-151, 2006.

SHERRAT, J.A.; DALLON, J.C. Theoretical models of wound healing: past successes and future challenges. *Comp. Rend. Biol.*, v. 325, n.5, p.557-564, 2002.

SERHAN, C. N. & CHIANG N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resoleomics. *Rheum Dis Clin North Am.* (30), 69–95, 2004.

SERHAN, N.C. e SAVIL, J. Resolution of Inflammation: The beginning programs the end. *Nature Immunology*, v. 6 (12), p.1191-1197, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2000.

SILVA, M.A.C."Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii*(Mart.&Miq.) Baehni(Sapotaceae)"[Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde], Brasília, Universidade de Brasília, 2007.

SILVA, C. M.; CARVALHO, J., C., T. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). In: CARVALHO, J., C., T. *Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 323 – 325, 2004.

SINGER ,A.J.; CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.*, v.341, n.10, p.738-746, 1999.

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

STADELMANN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *Am. J. Surg.*, v.176, n.2 suppl 1, p.26-38,1998.

STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, v.5, p. 39-41, 2000.

SPADELLA CT, Macedo CS, Machado JLM, Schellini SA, Padovanni CR. Estudo comparativo entre cinco diferentes tratamentos sobre as alterações clínicas e laboratoriais do rato diabético induzido pela aloxana. *Acta Cir Bras.* 2005 .

SPEYER, C.L.; GAO, H.; RANCILIO, N.J.; NEFF, T.A.; HUFFNAGLE, G.B.; SARMA, J.V.; WARD, P.A.. Novel Chemokine Responsiveness and Mobilization of Neutrophils during Sepsis. *Am. J. Pathol.* v. 165, p. 2187-2196, 2004.

SZPADERSKA, A. M.; DIPIETRO, L. A. Inflammation in surgical wound healing: Friend or foe *Surgery*, v. 137, p. 571-573, 2005.

SOARES S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v.15, n.1, p. 71-81, 2002.

SOSA, S.; BALICK, M.J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R.G.; PIZZA, C.; ALTINIER, G.; TUBARO, A. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some central american plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, p. 211-215, 2002.

SUZUKI, A. et al. Short- and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Americal Journal of Hypertension*, v. 15, n. 4, p. 351-357, 2002.

SUH, N.; Honda, T.; Finlay, H. J.; Barchowski, A.; Williams, C.; Benoit, N. E.; Xie, K. W.; Nathan, C.; Gribble, G. W.; Sporn, M. B.; *Cancer Res.* 58, 717, 1998.

TAPONDJOU, L.; LONTR I, D.; SONDEGAM, B. L.; CHOI, J.; LEE, K. T.; JUNG, A. J.; PARK, H. J. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydr oxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. *Archives of Pharmacal Research*, vol. 26, n.2, pp. 143-146, 2003.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. *Nature— insight review articles*, v. 420 (19/26), p. 852 – 859, 2002.

TERUI, T. Inflammatory and immune reactions associated with stratum corneum and neutrophils in sterile pustular dermatoses. *Tohoku Journal Experimental Medicine*. v.190, p. 239-248, 2000.

TOKUDA H, OHIGASHI H, KOSHIMIZU K, ITO I. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13- acetate. *Cancer Lett* 33: 279-285, 1986.

THOMAS, D. W.; O'NEILL, I. D.; HARDING, K. G.; SHEPHERD, J. P. Cutaneous wound healing: a current perspective. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 53, p. 442-447, 1995.

TSUCHIYA, K.; SAKAI, H.; SUZUKI, N.; IWASHIMA, F.; YOSHIMOTO, T.; SHICHIRI, M.; HIRATA, Y.. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high-fat-induced obese mice. *Endocrinology*. 2007. (In press).

UCHI, H.; TERAOKA, H.; KOGA, T.; FURUE, M. Cytokines and chemokines in the epidermis. *Journal of Dermatological Science*, v. 24 (1), p. 29-38, 2000.

UCHIDA, M. et al. Antioxidative effect of sesamol and related compounds on lipid peroxidation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 19, n. 4, p. 623-626, 1996.

VALDERRAMAS, A.C. Estudo da atividade anti-inflamatória de *Ricinus communis* (euphorbiaceae). 2006. 57p. Dissertação (mestrado em Biologia Oral-área de concentração Fisiologia Oral)-Universidade do Sagrado Coração. Bauru, São Paulo.

VARANDA EM, ZUNIGA GE, SALATINO A, ROQUE NF, CORCUERA LJ. Effect of ursolic acid from epicular waxes of *Jacaranda decurrens* on *Schizaphis graminum*. *J Nat Prod* 55: 800-803, 1992.

VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. *Neurogastroenterol Motil*, 20, 73–80, 2008.

VERPOORTE,R. Pharmacognosy in the new millennim: leadfinding and biotechnology.*J Pharm Pharmacol* 52:253-262,2000.

VEIT, M.; BECKERT, C., H...HNE, C., BAUER, K. und GEIGER, H. Interspecific and intraspecific variation of phenolics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. **Phytochemistry**, v.38, p.881-891. 1995<sub>a</sub>.

VEIT, M.; GEIGER, H.; KAST, B.; BECKERT, C.; HORN, C.; MARKHAM, K. R.; WONG, H.; CZYGAN, F. Styrylpyrone glucosides from *Equisetum*. **Phytochemistry**, v.39, n.4, p.915-917. 1995<sub>b</sub>.

VEIGA-JUNIOR, VF. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev Bras Farmacogn* 18: 308-313, 2008.

VIEIRA, S. A.L. Efeito do laser de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas experimentais. Dissertação (mestrado em Promoção de Saúde)- Universidade de Franca, São Paulo,2006.

VU, T.H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Gene Dev.*, v.14, n.17, p.2123-2133, 2002.

WAN, K.S. & WU, W.F. Eicosanoids in asthma. *Acta Paediatr Taiwan*. 48(6), 299-304, 2007.

WANG, MAN-TZU; HONN, K. V. & NIE D.. Cyclooxygenases, prostanoids, and tumor progression. **Cancer Metastasis Rev**, 26, 525-534, 2007.

WAWERSIK, M.J.; MAZZALUPO, S.; NGUYEN, D.; COULOMBE, P.A. Increased levels of keratin 16 after epithelialization potential of mouse skin keratinocytes in vivo and ex vivo. *Mol. Biol. Cell*, v.12, n.11, p.3439-3450, 2001.

WIENECKE, T.; OLESEN J.; PETER S.; OTURAI B. & ASHINA; M. Prostacyclin (epoprostenol) induces headache in healthy subjects. **Pain**, 2008.

WIEDENFELD, H.; CETTO, A. A.; AMADOR, C. P. Flavonol glycosides from *Equisetum myriochaetum*. Biochemical systematics and ecology, v.28, p.395-397. 2000.

WINTERBOURN, C.C.; HAMPTON, M.B.; LIVESEY, J.H.; KETTLE, A.J.. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. J. Biol. Chem. v. 281, p. 39860-39869, 2006.

WILLIAMS, I.R. e KUPPER, T.S. Immunity at the surface: Homeostatic mechanisms of the skin immune system. Life sciences, v. 58 (18), p. 1485-1507, 1996.

WILLIAMSON, E.M. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material. Willey & sons Ltd.:Chinchester, 1996.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. Am. J. Surg., v.183, n.4,p.406-412, 2002.

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

WELLER, R. Nitric oxide: a newly discovered chemical transmitter in human skin. Br. J.Dermatol., v.137, n.5, p.665-672, 1997.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Traditional Medicine Strategy 2002–2005. Geneva, 2002.

YIM, E. K.; LEE, M. J.; LEE, K. H.; PARK, J. S. Antiproliferative and antiviral mechanisms of ursolic acid and dexamethasone in carcinoma cell lines. International Journal of gynecological cancer, vol. 16, n. 6, pp. 2023, 2006.

YOUNG, T. The healing process: nurses are familiar with the management of wounds as they pass through the different stages of the healing process but do they understand the physiology behind tissue growth and repair as well as they could? Pract Nursing, 22 (10): 38-40,2001.

ZHANG, C.; WELLER, R. L.; THORSON, J. S. & RAJSKI, S. R. Natural Product Diversification Using a Non-natural Cofactor Analogue of S-Adenosyl-L-methionine. J. Nat. Prod. 128, 2760-2761, 2006.

ZAVIALOV, A.V.; ENGSTRÖM, A.. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. Biochem. J. v. 391, p. 51-57, 2005.

ZWEIFEL B. S.; HARDY M. M.; ANDERSON G. D.; DUFIELD D. R.; PUF AHL R. A. & MASFERRER J. L. A rat air pouch model for evaluating the efficacy and selectivity of 5-lipoxygenase inhibitors. European Journal of Pharmacology, 584, 166-174, 2008.

ZHOU, H. Y.; SHIN, E.M.; GUO, L.Y.; ZOU, L.B.; XU, G.H.; LEE, S.H.; ZE, K.R.; KIM, E.K.; KANG, S.S. & KIM, Y.S. Anti-inflammatory activity of 21 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methykmelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. *European Journal of Pharmacology*, 572, 239-248, 2007.