



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PAULO SÉRGIO DE MELO CARVALHO

**TRATAMENTO TÓPICO COM O TRITERPENO PENTACÍCLICO UVAOL ACELERA  
A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS**

Maceió – AL

2013

PAULO SÉRGIO DE MELO CARVALHO

**TRATAMENTO TÓPICO COM O TRITERPENO PENTACÍCLICO UVAOL ACELERA  
A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como um dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emiliano de Oliveira  
Barreto

Maceió – AL

2013

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos**

C331t Carvalho, Paulo Sérgio de Melo.

Tratamento tópico com o triterpeno pentacíclico uvaol acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos / Paulo Sérgio de Melo Carvalho. – 2013. 59 f. : il.

**Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.**

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

**Bibliografia: f. 55-59.**

1. Uvaol – Uso tópico. 2. Cicatrização cutânea. 3. Terpeno. 4. Organização tecidual.  
I. Título.

CDU: 616-003.9:615.322

## Folha de Aprovação

Paulo Sérgio de Melo Carvalho

Tratamento tópico com o triterpeno pentacíclico uvaol acelera cicatrização de feridas cutâneas em camundongos

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 13 de novembro de 2013.



Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto (Orientador)

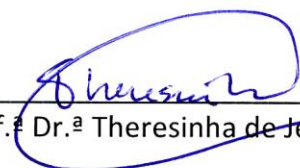
### Banca Examinadora



Prof.ª Dr.ª Klayza Moreira Ramos – (UNCISAL)



Prof.ª Dr.ª Salete Smaniotto – (UFAL)



Prof.ª Dr.ª Theresinha de Jesus Carvalho Calado - (UFAL)

Dedico este trabalho a meus pais, Pedro e Maria (*In Memoriam*), pelos ensinamentos que formaram o alicerce da minha história. Aos meus filhos Andressa, Victor e Viviane, ao meu neto Guilherme, por todo amor, carinho e compreensão e, principalmente à minha amada esposa Ana Cláudia, pela dedicação e companhia ao longo da trajetória que levou à concretização deste sonho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me proporcionado a concretização deste trabalho e colocar na minha vida pessoas formidáveis.

Aos meus pais, que já não estão entre nós, mas que foram fundamentais na formação do meu caráter, ensinando-me desde cedo a importância das palavras amizade, humildade e bondade.

Ao professor, orientador e amigo, Dr. Emiliano de Oliveira Barreto, pela oportunidade, compreensão e, acima de tudo, pela paciência com que conduziu e colaborou na construção deste trabalho.

À Isabela Agra, nossa amiga Bela, por ter me apoiado e ajudado nos primeiros passos desta longa caminhada.

À minha querida esposa Ana Cláudia, pela compreensão, carinho e companheirismo.

Aos meus filhos Andressa, Victor e Viviane e ao meu neto Guilherme, pelo amor, carinho e dedicação.

Às amigas Laís Agra, Janylle Ferro, Almair Ferreira (Mia), Fernanda Lima e Ana Carolina Correia, sem a colaboração das quais seria super difícil a concretização deste trabalho, meu muitíssimo obrigado.

A toda minha família que sempre me incentivou, principalmente a minha mãe-irmã Ieda.

Ao meu sobrinho Fabiano, que tenho como um filho de coração.

A todos os amigos e companheiros do Laboratório de Biologia Celular, especialmente Rafael Vital, pela disponibilidade e consideração.

Às professoras Salete e Silvana, pela amizade de longas datas e pela convivência salutar que sempre tivemos.

A todos os servidores técnicos, especialmente os da secretaria geral da Unidade e aos docentes do ICBS, pelo incentivo e apoio.

A todos os meus colegas de turma de mestrado, turma 2011.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, especialmente à Melânia e Jhonatan, pelo profissionalismo e dedicação.

À professora Dra. Theresinha Calado, Diretora do ICBS e amiga de tantos anos, obrigado pela cumplicidade e carinho.

E por fim, à Universidade Federal de Alagoas, minha segunda casa, onde trabalho há 31 anos, dos meus bem vividos 50.

“O homem nasceu para aprender, aprender tanto quanto a vida lhe permita”.

(Guimarães Rosa)



## RESUMO

A cicatrização de feridas mostra-se como um evento complexo que envolve diferentes células e moléculas capazes de interagir para proporcionar a reconstituição do tecido. Neste estudo avaliou-se o efeito tópico do triterpeno pentacíclico uvaol, no processo de cicatrização de feridas cutâneas experimentais. Para tal, feridas excisionais foram realizadas no dorso de camundongos Swiss, cujas contrações foram avaliadas em diferentes dias após o procedimento cirúrgico, e depois do tratamento com uvaol, Fibrase<sup>®</sup> ou solução salina (NaCl, 0,9%). No dia 9, os animais tratados com uvaol apresentaram uma redução significativa na área da ferida, quando comparados com os controles. A análise histológica mostrou que o uvaol induziu uma melhor organização tecidual, bem como um aumento na deposição de colágeno em relação ao grupo tratado com solução salina. Foi demonstrado que o tratamento tópico de uvaol não causou toxicidade sistêmica nos parâmetros determinados neste estudo e durante o tempo do processo de cicatrização avaliado. Ainda, esse triterpeno não interferiu no perfil celular sanguíneo e nem alterou o peso dos animais após o tratamento. *In vitro*, o uvaol não induziu alterações na viabilidade de fibroblastos humanos, indicando ausência de efeitos tóxicos associados ao uso. Quando incorporado a um creme, o uvaol manteve sua propriedade de cicatrizar feridas cutâneas, indicando que este princípio ativo mantém suas propriedades mesmo quando sob formulação farmacêutica. Em adição, o tratamento cutâneo em pele íntegra com a formulação não produziu alterações nas áreas tratadas, reforçando a ausência de efeitos indesejáveis associados ao uso do medicamento. Em conjunto, os resultados deste estudo demonstram, pela primeira vez, os efeitos cicatrizantes do uvaol na terapia de feridas cutâneas.

**Palavra-chave:** Uvaol. Cicatrização. Terpeno. Inflamação.

## ABSTRACT

Wound healing is a complex event which involves various cells and molecules capable of interacting to provide for reconstruction of the tissue. In this study we evaluated the effect of pentacyclic triterpene, uvaol, in the process of healing of experimental wounds. Thus, excisional wounds were made on the dorsum of Swiss mice, which wound contractions were evaluated under treatment with uvaol, Fibrase® or NaCl (0.9%) on different days after surgical procedure. On day 9 after surgery, uvaol treated mice showed a significant reduction in wound area compared to the controls. Histological analysis showed that uvaol was able to induce an adequate tissue organization as well as an increase in collagen deposition when compared to the group treated with saline. Furthermore, this study demonstrated that topical treatment of uvaol was not able to cause systemic toxicity in parameters determined in this study and for the duration of the healing process assessed. Moreover, this triterpene did not interfere with both animal weight and profile cell blood during the period of treatment. *In vitro*, uvaol was not able to induce changes in viability of human fibroblasts, indicating absence of toxic effects associated with its use. When incorporated into a cream, uvaol kept its property to heal wounds, indicating that this active ingredient retains its properties even when under pharmaceutical formulation. In addition, skin treatment on skin with this formulation did not induce changes in the treated areas, reinforcing the absence of undesirable effects associated with medication. Together, the results of this study demonstrate for the first time the healing effects of uvaol in therapy of skin wounds.

**Keywords:** Uvaol. Wound healing. Terpene. Inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Camadas da epiderme.....	17
Figura 2-	Caracterização da fase inflamatória pelo influxo de neutrófilos e macrófagos para o ferimento.....	21
Figura 3-	Reepitelização a partir da diferenciação de células-tronco em queratinócitos no estrato basal e migração ao longo da borda da ferida para preencher o defeito.....	25
Figura 4-	Fase de remodelamento que resulta na aparência final da ferida.....	25
Figura 5-	Estrutura química do triterpeno pentacíclico uvaol.....	33
Figura 6-	Perfil representativo das análises macroscópicas dos diferentes grupos o longo do processo de cicatrização.....	40
Figura 7-	Perfil representativo das análises microscópicas dos diferentes grupos no 10 <sup>o</sup> dia de tratamento do processo de cicatrização.....	42
Figura 8-	Perfil representativo da análise da deposição de colágeno dos diferentes grupos no 10 <sup>o</sup> dia de tratamento do processo de cicatrização.....	43
Figura 9-	Perfil de leucócitos totais do sangue periférico dos animais durante o período de cicatrização.....	45
Figura 10-	Efeito do uvaol sobre fibroblastos humanos mantidos em cultivo celular.....	46
Figura 11-	Perfil representativo do dorso dos animais tratados com a formulação contendo uvaol.....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diferentes classes de curativos e suas indicações.....	30
Tabela 2 -	Efeito tópico do uvaol em modelo de ferida excisional .....	41
Tabela 3 -	Efeito do tratamento tópico com uvaol sobre o peso corpóreo dos animais nos dias 0, 3, 6 e 10.....	44
Tabela 4 -	Efeito cicatrizante da formulação contendo uvaol sobre a ferida cutânea em camundongos.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1	Ativador Proteico 1
C5-a	Sub-produto do sistema complemento
cAMP	Monofosfato Cíclico de Adenosina
cGMP	Monofosfato Cíclico de Guanosina
COX-2	Ciclooxigenase 2
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
Fmlp	<i>N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine</i> (F-Met-Leu-Phe)
IL-8	Interleucina – 8
IL-1	Interleucina – 1
IL-6	Interleucina – 6
MMP-8	Metaloproteinase – 8
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear kappa B
NOS	Síntase do Óxido Nítrico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas ( <i>Platelet Derived Growth Factor</i> )
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento de Transformação – $\beta$ ( <i>Trasnforming Growth Factor – <math>\beta</math></i> )
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral ( <i>Tumour Necrosis Factor</i> )
VEGF	Fator de crescimento de célula endotelial vascular ( <i>Vascular Endothelial Cell Growth Factor</i> )
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (Low-Density Lipoprotein)
MTT	3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
WHS	Wound Healing Society
SBF	Soro Bovino Fetal

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>A pele</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Processo de cicatrização</b> .....	<b>20</b>
3.2.1	Hemostasia.....	20
3.2.2	Inflamação.....	21
3.2.3	Proliferação.....	23
3.2.4	Remodelamento.....	25
<b>3.3</b>	<b>Feridas cutâneas e seu impacto sobre a qualidade de vida</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4</b>	<b>Terapias disponíveis para o tratamento de feridas cutâneas</b> .....	<b>28</b>
<b>3.5</b>	<b>Produtos naturais e a cicatrização</b> .....	<b>31</b>
<b>3.6</b>	<b>Uvaol</b> .....	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Preparo da formulação</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Animais</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Modelo de ferida excisional e tratamento</b> .....	<b>35</b>
4.3.1	Avaliação macroscópica.....	36
4.3.2	Avaliação microscópica.....	37
<b>4.4</b>	<b>Avaliação toxicológica após uso tópico de uvaol</b> .....	<b>37</b>
<b>4.5</b>	<b>Ensaio de viabilidade por MTT</b> .....	<b>37</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>5.1</b>	<b>Uvaol acelera o processo de cicatrização em modelo de ferida excisional</b> .....	<b>39</b>
<b>5.2</b>	<b>Efeito do tratamento tópico do uvaol no peso corporal dos animais e celularidade sistêmica durante o período de cicatrização</b> .....	<b>44</b>
<b>5.3</b>	<b>Efeito do uvaol sobre a viabilidade de fibroblastos</b> .....	<b>45</b>
<b>5.4</b>	<b>Efeito da formulação contendo uvaol em base Lanette<sup>®</sup> sobre a</b>	

	<b>cicatrização de feridas cutâneas.....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As Feridas cutâneas afetam diretamente a qualidade de vida do paciente e mostram-se como um sério problema clínico quando há comprometimento no curso do processo cicatricial, tornando o indivíduo suscetível a infecções que podem evoluir para quadros clínicos mais severos como a sepse (KUMAR et al., 2007; MACDONALD; GEYER, 2010). Dados precisos sobre a incidência de feridas na população são escassos em muitos países, mas nos Estados Unidos estima-se que cerca de 7 milhões de pessoas sofram a cada ano com problemas decorrentes de falhas no processo de cicatrização de feridas cutâneas (PETRIE; YAO; ERICKSON, 2003). Na Índia, estudos epidemiológicos revelaram que a prevalência de feridas crônicas afeta cerca de 5 pessoas a cada 1000 habitantes, enquanto que as feridas agudas atingem 11 pessoas em cada 1000 habitantes (GUPTA et al., 2004), constituindo portanto uma questão de saúde importante, com impacto socioeconômico considerável. Apesar dessa grande prevalência, países como Índia e China, por exemplo, são detentores de práticas tradicionais antigas e possuem informações valiosas de várias plantas que são usadas por curandeiros tradicionais para o tratamento de feridas e queimaduras cutâneas (FU, 2005).

A população brasileira apresenta enorme aceitação ao uso tradicional de produtos naturais como terapia alternativa. Provavelmente um dos fatores que contribuem para esta situação é a grande biodiversidade disponível; supõe-se que cerca de 20% de toda a diversidade de plantas e microrganismos existentes no planeta esteja em solo brasileiro (CALIXTO, 2005). Entretanto, as pesquisas sobre o potencial cicatrizante de produtos de origem natural obtidos de plantas nativas do Brasil ainda são escassas (KUMAR et al., 2007). Mesmo assim, a diversidade molecular encontrada nessas plantas é a principal razão que tem motivado várias corporações farmacêuticas a direcionarem seus estudos na busca de protótipos que possuam atividades inibitórias ou antagonistas com alvos biológicos bem definidos (CALIXTO, 2005).

As substâncias biologicamente ativas presentes nas plantas são chamadas de metabólitos secundários e são produzidas através de rotas biossintéticas diversas,



cujos compostos de partida são os metabólitos primários, nos quais se incluem os carboidratos, proteínas e lipídeos, que são essenciais para as funções vitais da planta (CHEN et al., 2002). 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: esteroides, alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas, lignanas, terpenos etc (DZUBARK et al. 2006).

Os metabólitos secundários, como moléculas biologicamente ativas, podem interferir em vários mecanismos ou mediadores envolvidos no processo inflamatório, tais como: metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, enzimas (NOS, COX-2, fosfolipase A2), produção de segundos mensageiros (proteína-quinase, cGMP, cAMP) e fatores de transcrição (NF- $\kappa$ B, AP-1) (CALIXTO, 2005).

Dentre os metabólitos secundários de grande repercussão devido à ampla diversidade de efeitos farmacológicos encontram-se os terpenoides. Esses compostos constituem o maior grupo de metabólitos secundários dos vegetais encontrados em todas as partes da planta, tais como as folhas, pólen, frutas e sementes (MAHATO et al., 1988; MIURA et al., 1999) e distribuem-se amplamente na natureza, sendo identificados aproximadamente 30.000 compostos (DZUBARK et al. 2006).

O triterpenoide pentacíclico uvaol vem despertando interesse devido aos efeitos terapêuticos associados ao seu uso, como as ações antioxidante, antitrombótica e antibacteriana (ALLOUCHE et al., 2010; MARTINS et al., 2011). Em sintonia com estas observações, nosso grupo demonstrou recentemente que o uvaol apresenta ainda efeitos antialérgico (AGRA, 2012) e imunomodulador (MELO, 2013). Porém, apesar desses efeitos associados ao uso do uvaol, ainda não há uma descrição de suas possíveis ações cicatrizantes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito cicatrizante do triterpenoide uvaol utilizando o modelo experimental de ferida cutânea excisional em camundongos.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o potencial efeito cicatrizante do uvaol no modelo experimental de ferida cutânea excisional em camundongos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

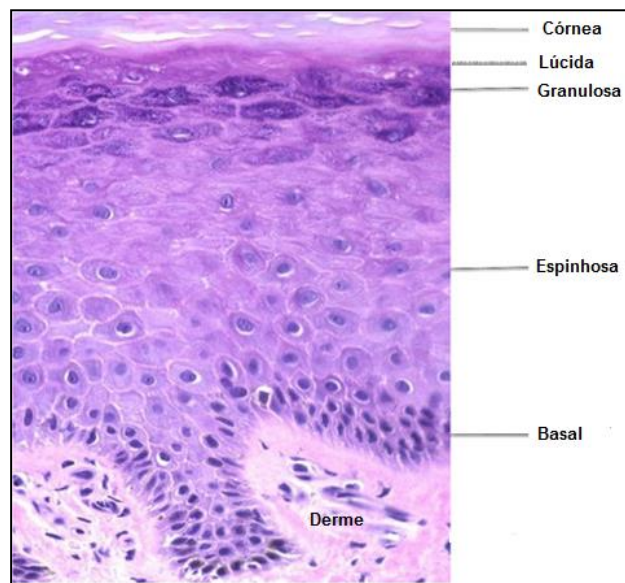
- Avaliar o efeito tópico do uvaol sobre o grau de reparação da lesão em cicatrização sob aspectos macroscópicos;
- Investigar o efeito do uvaol na organização tecidual após o processo de cicatrização em feridas, utilizando parâmetros microscópicos;
- Analisar os possíveis efeitos tóxicos do uvaol associados ao seu uso tópico;
- Investigar o efeito do uvaol sobre a viabilidade de fibroblastos humanos;
- Avaliar o efeito tópico do uvaol incorporado a uma formulação farmacêutica em feridas cutâneas.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A pele

A pele é um órgão complexo que isola e recobre a superfície corpórea e representa entre 14-16% do peso corporal, sendo constituída por duas camadas de estrutura e propriedades distintas: epiderme e derme. A epiderme possui cinco camadas, a partir da superfície até a base: córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal (Figura 1). A camada epidérmica avascular recebe seus nutrientes por difusão através da camada dérmica. Como a pele possui várias espessuras, esta variedade tem implicações na cicatrização de tecidos e eventual formação de cicatrizes (GANTWERKER; HOM, 2012).

**Figura 1 – Camadas da epiderme (hematoxilina-eosina, 40x).**



**Fonte:** Adaptado de KHAVKIN; ELLIS, 2011.

A epiderme é composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado que sofre renovação contínua. A principal célula na epiderme é o queratinócito derivado do ectoderma, tornando-se cerca de 95% das células epidérmicas (KHAVKIN; ELLIS, 2011). A epiderme é constituída de múltiplos tipos celulares que possuem diferentes origens embrionárias. Aproximadamente 80-85% da epiderme é constituída de queratinócitos, 10-13% de melanócitos, 4% de células de Langerhans e 1% de células de Merckel. A epiderme também contém apêndices

essenciais incluindo folículos pilosos associados com glândulas sebáceas (unidade pilossebáceo) e glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas. A manutenção do número de células na epiderme depende do balanço entre proliferação celular e morte celular (diferenciação/apoptose) dos queratinócitos. Esse processo é governado pela comunicação parácrina e autócrina via hormônios, fatores de crescimento e citocinas ou por comunicação intercelular via célula-célula e célula-matriz de adesão, ou ainda pela comunicação intercelular na região da *gap junction* (GANTWERKER; HOM, 2012).

A epiderme tem a capacidade de autorrenovação tanto sob condições homeostáticas como em condições nocivas, devido à presença de uma população celular mitoticamente ativa na camada basal. Em condições normais, a renovação epidérmica é balanceada pela descamação da camada córnea na superfície da pele, onde se verifica uma diferenciação celular progressiva, através do processo de queratinização e cornificação, a partir da camada basal em direção à superfície (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

A unidade pilossebáceo contém células-tronco epiteliais que são capazes de regenerar e diferenciar em queratinócitos basais e são essenciais para o processo de reepitelização. Essas células-tronco são importantes, uma vez que são relativamente indiferenciadas e possuem grande potencial de proliferação e elevada capacidade de autorrenovação (LAROUCHE et al., 2005). As Dificuldades na cicatrização são vistas quando essas células-tronco são destruídas por insultos, como queimaduras, e até mesmo fontes iatrogênicas, como a dermoabrasão. Quando a dermoabrasão ou recapeamento da pele é realizado de modo muito profundo pode destruir as glândulas écrinas e a unidade pilossebáceo, levando a uma cura imprópria e eventuais cicatrizes (GANTWERKER; HOM, 2012).

A derme é a camada imediatamente inferior à epiderme e recebe o maior fornecimento de sangue, além de conter a maioria dos apêndices dérmicos, incluindo glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas, glândulas sebáceas e folículos pilosos. A constituição dessa camada envolve polissacarídeos (hialuronidatos e condroitinsulfatos), substância fundamental (glicoproteínas, proteoglicanas e glicosaminoglicanas), material fibrilar (fibras colágenas, fibras elásticas e fibras

reticulares), receptores sensoriais (ex.: corpúsculos de Meissner, corpúsculos de Pacini), células dérmicas (fibroblastos), vasos sanguíneos e linfáticos (LAROUCHE et al., 2005).

Os fibroblastos sintetizam diferentes macromoléculas que entram na constituição da matriz extracelular, como por exemplo o colágeno e a elastina (LAROUCHE et al., 2005). A derme é dividida em duas regiões distintas: a superior, derme superficial ou papilar e a inferior, derme reticular. A derme papilar é composta por feixes frouxamente arranjados de colágeno, fibras elásticas, fibrócitos, vasos sanguíneos e terminações nervosas. A derme reticular contém fibras de colágeno compactas, fibras elásticas grossas, parte profunda dos anexos epidérmicos e uma rede vascular e nervosa. Como regra geral, qualquer dano que se estende para esta camada mais profunda reticular, invariavelmente, causa cicatrizes e pode precisar de reparos com espessura total de enxertos ou retalhos para garantir uma cura adequada (GANTWERKER; HOM, 2012).

Durante um processo inflamatório ou de cicatrização ocorre o aumento da proliferação e da atividade de fibroblastos devido à ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (GAILIT; CLARK, 1994). Os vasos sanguíneos presentes na derme permitem que ocorra a infiltração de células migratórias importantes no processo de resposta imunológica e de cicatrização, como os macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos etc (GANTWERKER; HOM, 2012).

As inervações vegetativas presentes na derme transmitem estímulos nervosos para as glândulas sudoríparas, músculo piloerector e vasos sanguíneos, auxiliando no controle da temperatura corporal. A inervação sensitiva, por sua vez, conduz a estímulos mecânicos, térmicos, químicos e dolorosos para o sistema nervoso central (GANTWERKER; HOM, 2012).

A interação coordenada entre os diferentes tipos celulares presentes nas camadas da pele permite que este órgão responda, pronta e efetivamente, a uma variedade de estímulos nocivos que ocorrem na interface do organismo com o meio externo, como a ação de toxinas, organismos patogênicos, radiação ultravioleta,

extremos de temperatura, garantindo assim a manutenção da homeostasia cutânea (GANTWERKER; HOM, 2012).

### **3.2 Processo de cicatrização**

O processo de cicatrização é dinâmico, apresenta uma complexa interação de citocinas e envolve diferentes tipos celulares (GANTWERKER; HOM, 2012). A pele é dotada de importantes características imune e protetora, além de possuir uma habilidade surpreendente de curar, invariavelmente com cicatrizes. Em geral, são quatro fases distintas do processo de cicatrização: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento. Embora essas fases sejam separadas para simplificar o processo, de fato elas são bastante sobrepostas, e mesmo em diferentes áreas da ferida pode haver diferentes fases de cicatrização. Essas fases são influenciadas por várias interações celulares, onde são reguladas pela liberação local de sinais químicos como as citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e inibidores (BENNETT; SCHULTZ, 1993). Qualquer interrupção na cascata natural de cicatrização pode interferir as fases subsequentes e pode potencialmente resultar em cicatrização anormal, feridas crônicas e eventuais cicatrizes.

#### **3.2.1 Hemostasia**

A hemostasia é a fase inicial do processo de cicatrização que ocorre entre segundos a minutos após o início do insulto, para minimizar a hemorragia. Com a perda da integridade estrutural inicia-se a cascata de coagulação e constrição da parede vascular, resultando na formação de coágulo. As plaquetas retidas no coágulo são essenciais para a hemostase e uma resposta inflamatória normal (ENOCH; LEAPER, 2007). Enquanto constroem os vasos sanguíneos, as plaquetas são ativadas por ligação ao colágeno exposto na matriz extracelular, liberando fibronectina, trombospondina, esfingosina 1 fosfato e fator Von Willebrand, que promovem uma maior ativação e agregação plaquetária. Com essa ativação e liberação desses e de outros fatores de coagulação, uma matriz de fibrina é depositada na ferida, a qual funciona como uma matriz provisória para estabilizar o local da mesma. As plaquetas agregadas, em seguida, ficam presas na matriz de

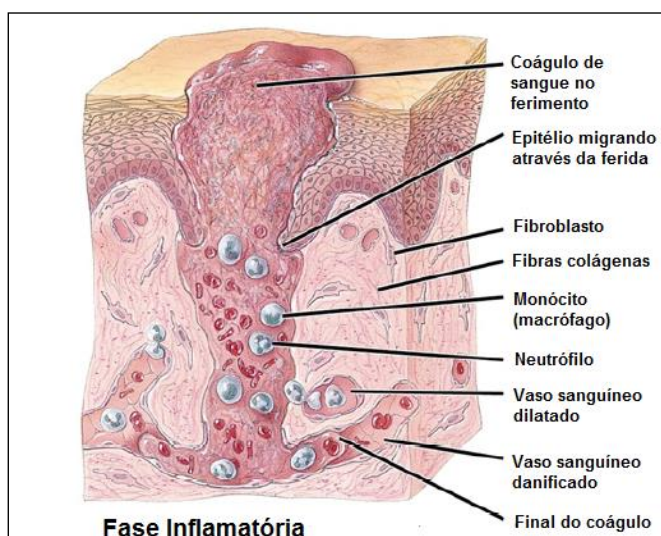
fibrina, formando um coágulo estável dentro da matriz provisória (GAILIT; CLARK, 1994).

Diversos mediadores importantes são libertados pelas plaquetas e são responsáveis pelo início e progressão da ferida através das fases subsequentes da cicatrização. Esses mediadores incluem fator de crescimento derivado de plaquetas (*platelet derived growth factor* - PDGF) e fator de transformação do crescimento  $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$*  - TGF- $\beta$ ). O TGF- $\beta$  e o PDGF recrutam células adicionais, tais como neutrófilos e macrófagos para o local da ferida (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010). O PDGF também recruta fibroblastos e os ativa para a produção de colágeno e glicosaminoglicanas, que são importantes para o reparo da matriz extracelular (BENNETT; SCHULTZ, 1993). Níveis excessivos desses fatores de crescimento têm sido indicados em condições anormais de cicatrização.

### 3.2.2 Inflamação

A fase inflamatória inicia-se nas primeiras 24 horas após a injúria. A inflamação é evidente através de sinais físicos como eritema, rubor, edema e dor. Em nível celular, a inflamação representa vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de leucócitos para a área da injúria (Figura 2) (TELLER; WHITE, 2009).

**Figura 2 – Caracterização da fase inflamatória pelo influxo de neutrófilos e macrófagos para o ferimento.**



Fonte: Adaptado de GANTWERKER; HOM, 2012.

Os neutrófilos são os primeiros leucócitos a aparecerem na área, chegam em grande quantidade nas primeiras 24 horas por um processo chamado quimiotaxia e são atraídos por mediadores solúveis, como o C5a (um subproduto do sistema complemento), o tripeptídeo f-Met-Leu-Phe (*N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*) que é um resíduo de um produto produzido por bactérias que podem estar presentes na ferida, além de interleucina 8 (IL-8). Quando os neutrófilos estão presentes na área da ferida liberam na matriz extracelular enzimas de degradação de matriz, como as elastases e metaloproteinase de matriz (MMP-8) para mover-se através desta (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010). Durante a resposta de cicatrização normal aguda, essas enzimas são liberadas em quantidades fisiológicas e não podem causar um dano excessivo ao tecido. Em contraste, em muitas feridas não curadas, essas enzimas são superabundantes nos neutrófilos e são liberadas em grandes quantidades causando dano excessivo para a matriz extracelular, bem como a destruição de importantes fatores de crescimento como o PDGF e TGF- $\beta$  (NWOMEH et al.,1999; YAGER et al.,1997). Por outro lado, quando presentes no local da ferida, os neutrófilos iniciam a fagocitose de vários materiais estranhos e eliminam bactérias através de uma poderosa quantidade de enzimas e espécies reativas de oxigênio que são capazes de produzir (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010).

Nessa fase os macrófagos também são atraídos pelos produtos derivados da apoptose de neutrófilos e infiltram aproximadamente 48 horas após a injúria e permanecem até a conclusão da fase inflamatória. Os macrófagos da ferida são ativados por quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e fragmentos solúveis de componentes da matriz extracelular produzida pela degradação proteolítica de colágeno e fibronectina (DIEGELMANN; COHEN; KAPLAN, 1981). A função dos macrófagos na ferida é remover vários resíduos de bactérias, corpos estranhos e restos de tecido necrótico. Apesar de apresentarem uma função semelhante a dos neutrófilos, os macrófagos regulam melhor a destruição proteolítica de tecido da ferida, pois secretam inibidores de proteases. Além disso, os macrófagos ingerem os neutrófilos carregados de bactérias e medeiam a progressão da ferida da fase inflamatória à fase proliferativa. Essas células também secretam uma multiplicidade



de fatores de crescimento e citocinas, tais como o PDGF, o TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , fator de crescimento de fibroblastos (*fibroblast growth factor* - FGF), fator-1 de crescimento semelhante à insulina e IL-6, que são importantes no recrutamento de fibroblastos e células endoteliais para o local da ferida, para a deposição da matriz e neovascularização (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010).

### 3.2.3 Proliferação

A fase proliferativa começa em cerca de três dias e dura por 2-4 semanas após o ferimento e é caracterizada pela migração de fibroblastos, deposição de matriz extracelular e formação de tecido de granulação. Os neutrófilos efetivamente iniciam os primeiros estágios da fase proliferativa, liberando IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha* – TNF- $\alpha$ ) para iniciar a ativação dos fibroblastos e células epiteliais (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010). Os fibroblastos aparecem na ferida de 2-4 dias após o ferimento e as células endoteliais surgem cerca de um dia depois (ENOCH; LEAPER, 2007). Após a lesão, os fibroblastos migram para a ferida em resposta a mediadores liberados a partir de plaquetas e macrófagos e movem-se através da matriz extracelular por meio de ligações com moléculas de matriz extracelular, como as fibronectinas, vitronectinas e fibrina. Essas células também secretam metaloproteinases que facilitam o seu movimento através da matriz e ajudam na remoção de componentes danificados da matriz. Uma vez que os fibroblastos entram na ferida, eles produzem colágeno, proteoglicanos e outros componentes, e sua atividade é predominantemente regulada pelo PDGF e TGF –  $\beta$ , que estimulam a proliferação, quimiotaxia e expressão de colágeno. O colágeno proporciona resistência e integridade para todos os tecidos e assim desempenha um papel vital no reparo da ferida (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010). Ele é composto por três cadeias- $\alpha$  de proteína entrançadas em tripla hélice, as cadeias individuais são capazes de entrelaçar hermeticamente porque cada polipeptídeo  $\alpha$  tem uma molécula de glicina a cada terceira posição. Mais de 30 cadeias- $\alpha$  distintas formam cerca de 28 diferentes tipos de colágeno (alguns dos quais podem ser únicos para as células e tecidos específicos) (GORDON; HAHN, 2010). Alguns tipos de colágeno, por exemplo: I, III e V formam fibrilas devido a reticulação lateral das triplas hélices, e formam a maior parte do tecido conjuntivo na

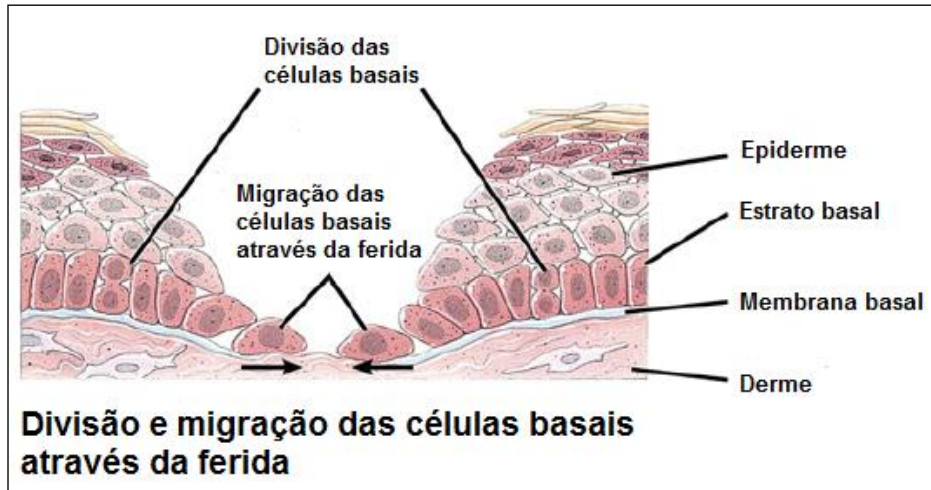
cicatrização de feridas; também há colágenos não fibrilares, por exemplo o tipo IV que tornam-se componentes da membrana basal (ENOCH; LEAPER, 2007).

Além do colágeno, os fibroblastos produzem e secretam os glicosaminoglicanos, que se associam a uma proteína para se tornarem sulfatados, essas cadeias polissacarídicas são conhecidas como proteoglicanos. Os proteoglicanos são determinados a serem um constituinte primário do tecido de granulação. À medida que a matriz de colágeno substitui o coágulo de fibrina, os proteoglicanos podem fornecer um papel de apoio para a montagem de fibrilas de colágeno (TELLER; WHITE, 2009).

A formação do tecido de granulação é bem estabelecida de 3-5 dias (ENOCH; LEAPER, 2007). Esse tecido consiste de uma rede densa de vasos sanguíneos, elevada densidade celular de fibroblastos e macrófagos, e fibras de colágeno organizadas de forma aleatória (GOLDBERG; DIEGELMANN, 2010). A taxa metabólica é também mais elevada para esse tecido comparado com uma derme normal, pois reflete a atividade necessária para a migração celular, divisão e síntese de proteínas; por isso a importância de uma nutrição e quantidade adequada de oxigênio para curar a ferida. Esta fase também se caracteriza pela angiogênese ou formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes no local da lesão (neovascularização). Os eventos de angiogênese são regulados por meio de fatores do crescimento (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , VEGF, FGF, PDGF) derivados das plaquetas, macrófagos e células epiteliais danificadas (MARTIN, 1997). Assim como a angiogênese, a restauração do epitélio começa no início do processo de cicatrização, mas não é facilmente perceptível até vários dias após a lesão. A epitelização restabelece a barreira externa que minimiza a perda de fluido e invasão bacteriana (TELLER; WHITE, 2009), e esse processo é marcado pela proliferação e influxo de queratinócitos próximos a borda da ferida (Figura 3). As células-tronco do bulbo de folículos pilosos e glândulas écrinas começam a se diferenciar em queratinócitos e restabelecem o estrato basal e uma nova membrana basal, bem como começam a migrar ao longo da ferida (GANTWERKER; HOM, 2012). Outra parcela de queratinócitos migra sobre as células epiteliais recentemente estabelecidas para preencher o defeito, digerindo a matriz extracelular usando proteases até que

ocorra o contato físico e cessam a migração por inibição do contato de queratinócitos vizinhos (PILCHER et al., 1999)

**.Figura 3 – Reepitelização a partir da diferenciação de células-tronco em queratinócitos no estrato basal e migração ao longo da borda da ferida**

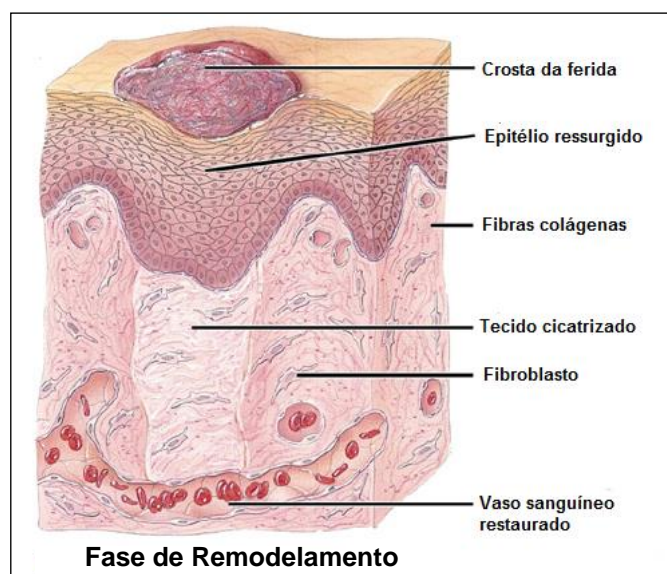


Fonte: Adaptado de GANTWERKER; HOM, 2012.

#### 3.2.4 Remodelamento

A última fase do processo de cicatrização da ferida é a fase de remodelamento em que o tecido de granulação se transforma em cicatriz (Figura 4).

**Figura 4 – Fase de remodelamento que resulta na aparência final da ferida.**



Fonte: Adaptado de GANTWERKER; HOM, 2012.

Pequenos capilares se agregam em vasos sanguíneos maiores e há uma diminuição no teor de água da ferida, e na densidade e atividade metabólica das células da ferida. Uma das maiores mudanças que ocorre nessa etapa é na quantidade e organização das fibras de colágeno total, resultando no aumento da resistência à tração da ferida. Inicialmente, há um aumento do colágeno do tipo III, também denominado como colágeno reticulado, que é gradualmente substituído por colágeno do tipo I, o colágeno fibrilar dominante na pele (CLORE; COHEN; DIEGELMANN, 1979).

### **3.3 Feridas cutâneas e seu impacto sobre a qualidade de vida**

As feridas cutâneas são as principais preocupações tanto para o paciente quanto para o clínico, pois acometem um grande número de pessoas e reduzem seriamente a sua qualidade de vida, causando dor e sofrimento quando são muito difíceis de curar, levando a prolongados períodos de deficiência e impedindo a realização de atividades cotidianas básicas, como andar e tomar banho. Essa inatividade, muitas vezes, pode desenvolver comorbidades e possível depressão, apesar dessa última característica ser difícil de quantificar, mas certamente é uma consequência real (KUMAR et al., 2007; MACDONALD; RYAN, 2010).

A Sociedade de Cicatrização de Feridas (*Wound Healing Society* - WHS) define a ferida de caráter crônico como um processo que “falhou para prosseguir durante o processo de reparação ordenado e ao longo do tempo para produzir uma integridade anatômica e funcional” (ROBSON; BARBULA, 2007). Apenas nos Estados Unidos a incidência de feridas consiste em torno de 6,5 milhões de pacientes, sendo estas feridas principalmente as do tipo crônica (SEN et al., 2009). Atualmente esse problema já gera custos de 1,7 bilhões de dólares em curativos especiais, dispositivos e tratamentos tópicos (MACDONALD; GEYER, 2010; FRYKBERG ET al., 2000). Apesar de dados sobre a incidência em outros países serem escassos, sabe-se que as feridas continuam sendo um importante problema global de saúde com impacto socioeconômico considerável. O custo anual em decorrência desses ferimentos é maior que US\$ 20 bilhões, não incluindo os custos adicionais para a sociedade em termos de dias perdidos de trabalho ou produtividade (MACDONALD; RYAN, 2010). Portanto, faz-se necessária a busca por

tratamentos de feridas cada vez mais eficazes e acessíveis que melhorem a qualidade de vida das pessoas, prevenindo complicações e possibilitando seu retorno para a cadeia produtiva.

### 3.4 Terapias disponíveis para tratamento de feridas cutâneas

A partir da década de 1990, os profissionais de saúde começam a se preocupar com o impacto social e econômico, no que se refere ao reparo ou à cronificação de feridas com o conseqüente aparecimento de infecções locais ou sistêmicas, o que conduz à utilização de antissépticos e vários tipos de agentes antimicrobianos. Dessa forma, as terapias usadas no cuidado das feridas são definidas de acordo com o histórico do paciente, a avaliação da causa e tipo da ferida, bem como a característica da pele que a circunda (SIBBALD et al., 2010). Cada ferida deve ser tratada individualmente, não existindo um padrão de tratamento. Porém, os curativos podem beneficiar os pacientes, reduzindo a dor e melhorando o ferimento com uso conveniente e menores custos (HARDING; MORRIS; PATEL, 2002). Apesar da individualidade no tratamento das feridas, algumas características do curativo são comuns e devem ser mantidas: é importante manter uma umidade adequada para o ambiente da ferida, não causar dor, prevenir infecções e não causar danos tanto à ferida como a sua área periférica (SIBBALD et al., 2010). Na tabela 1 há uma lista das diferentes classes de curativos e suas indicações. Deve-se enfatizar a importância da compreensão do mecanismo de ação do curativo na ferida, bem como as indicações e contraindicações do uso. A seleção do melhor curativo deve equilibrar os cuidados necessários frente ao tipo de ferida e os custos que esse tipo de curativo acarretará. Portanto, faz-se sempre necessário buscar terapias alternativas a fim de se obterem os melhores resultados e menores custos.

A busca por terapias alternativas com potencial cicatrizante através de substâncias de origem natural vem ocorrendo desde tempos remotos, quando variadas substâncias têm sido utilizadas para tratar feridas, na tentativa de parar o sangramento, absorver exsudato, e promover a cura. Algumas dessas substâncias consistem em mel, óleos ou gorduras de animais, teias de aranha, lama, folhas, musgo de esfagno ou esterco de animais (FORREST, 1982). Embora grande parte destas substâncias naturais fossem encontradas facilmente na natureza, notou-se que o uso da maioria trazia pouco ou nenhum benefício, enquanto que outras, como o mel, mostrou-se útil para o tratamento de feridas devido ao potencial cicatrizante,

por acelerar a cicatrização de feridas causadas por queimaduras (JULL; RODGERS; WALKER, 2009).

**Tabela 1 – Diferentes classes de curativos e suas indicações.**

<b>Classe</b>	<b>Descrição</b>	<b>Indicações/ Contra-indicações</b>
Filmes/ Membranas	Folha adesiva semipermeável. Impermeável a moléculas de água e bactérias.	Não deve ser utilizado em drenagem ou feridas infectadas. Cria barreira oclusiva contra a infecção.
Não-aderentes	Folhas de baixa adesão ao tecido. Composto de tule não medicamentoso.	Permite a drenagem para escoar através de poros para curativo secundário. Facilita a aplicação de medicações tópicas.
Hidrogéis	Polímeros com elevado teor de água. Disponível em géis, folhas sólidas ou impregnado em gaze.	Não deve ser usado em drenagem de feridas. Folhas sólidas não devem ser usadas em feridas infectadas.
Hidrocoloides	Pode conter gelatina, carboximetilcelulose de sódio, polissacarídeos e/ou pectina com uma camada de filme externa de poliuretano.	Deve ser usado sobre a pele frágil. Não deve ser usado com muita frequência em drenagem ou feridas infectadas. Cria barreira oclusiva para proteger a ferida de contaminações exteriores.
Alginatos de Cálcio	Folhas ou fibras de alginato de sódio e cálcio (derivado de algas marinhas). Tem capacidade hemostática.	Não deve ser utilizado em feridas secas. Baixa resistência à tração - evitar uso em cavidades estreitas e profundas. Bioreabsorvível.
Curativos compostos	Múltiplas camadas, combinação de curativos para aumentar a capacidade de absorção e autólise.	Uso em feridas onde o curativo pode permanecer no local por vários dias.
Espumas	Espuma de poliuretano adesiva ou não-adesiva. Folhas ou fechamento da cavidade. Pode ter proteção oclusiva. Alguns têm bloqueio de fluidos	Uso moderado em drenagem de feridas profundas. Espumas oclusivas não devem ser usadas em drenagem de feridas profundas e feridas infectadas.
Carvão	Produtos mantêm no interior carvão que absorve o odor.	Alguns produtos de carvão são inativados pela umidade. Deve assegurar que as bordas do curativo estejam seladas.
Hipertônico	Folha, faixas ou gel impregnado com sódio concentrado.	Faixas de gazes não devem ser utilizadas em feridas secas. Pode ser doloroso no tecido sensível. Gel pode ser usado em feridas secas.
Fibras hidrofílicas	Folha ou faixas de carboximetilcelulose de sódio. Converte em um gel sólido quando ativado pela umidade (bloqueio de fluido).	Melhor para quantidade moderada de exsudato. Não deve ser utilizado em feridas secas. Baixa resistência à tração - evitar uso em cavidades estreitas e profundas.
Antimicrobianos	Prata ou cadexomer iodo com o veículo para a entrega: folhas, géis, espumas, alginatos ou pasta.	De amplo espectro contra bactérias. Não deve ser usado em pacientes com hipersensibilidade conhecida a qualquer componente do produto.
Dispositivos	Terapia de feridas por pressão negativa, nessa terapia, aplica-se uma pressão negativa localizada à superfície e margens da ferida. Curativos consistem em materiais de poliuretano ou álcool polivinílico.	Essa pressão distribui ativamente o curativo da ferida removendo o fluido e promovendo a aproximação das bordas da ferida. Requer uma habilidade avançada para selecionar pacientes para esse tipo de terapia.
Biológicos	Fibroblastos humanos fornecidos em camadas congelados. Preparações com colágeno, ácido hialurônico, fatores de crescimento derivados de plaquetas.	Não deve ser utilizado em feridas com infecção, ou em pacientes com hipersensibilidade conhecida a qualquer componente do produto.

Fonte: Modificado de SIBBALD et al., 2010.



### 3.5 Produtos naturais e a cicatrização

A partir de práticas medicinais milenares foi possível observar que substâncias de origem natural, como as plantas, são fontes de muitos compostos bioativos e muitos destes compostos são tradicionalmente usados para acelerar a cicatrização, portanto buscam-se encontrar esses compostos a partir da medicina popular, visto que essa prática é geralmente caracterizada pela alta aceitabilidade e boa tolerância (JAGETIA; RAJANIKANT, 2004).

Conseqüentemente, o número de estudos vem aumentando e demonstrando efeitos promissores no tratamento de feridas. Um exemplo comumente utilizado é a aplicação tópica de *Aloe vera* em queimaduras e outras lesões cutâneas (DAVIS et al., 1989; MAENTHAISONG et al., 2007), e recentemente tem sido comprovada a sua capacidade em acelerar a cicatrização de feridas abertas em ratos diabéticos do tipo 2 expostos à radiação, quando administrada por via oral (ATIBA; UENO; UZUKA, 2011). Outra espécie, como o *Hippophae rhamnoides L.* conhecido popularmente como espinheiro marinho, vêm demonstrando que seu extrato aquoso das folhas liofilizado promove a cicatrização em queimaduras e tem uma influência positiva em diferentes fases do reparo da cicatrização, incluindo a angiogênese (UPADHYAY; YOGENDRA KUMAR; GUPTA, 2010). Interessantemente, nas folhas, nos frutos maduros e nas sementes do espinheiro marinho foi encontrado um largo número de substâncias bioativas, incluindo flavonoides (isoramnetina, quercetina, miricetina, kaempferol e seus derivados glicosilados), carotenoides ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ -caroteno, licopeno), vitaminas (A, C, E e K), taninos, triterpenoides, glicerídeos de palmito, esteárico e ácidos oléicos e alguns aminoácidos essenciais (BEVERIDGE et al., 1999; ZU et al., 2006). Esse elevado conteúdo de substâncias bioativas tem refletido na extensa exploração da espécie *H. rhamnoides L.* pela medicina alternativa (UPADHYAY; YOGENDRA KUMAR; GUPTA, 2010).

Atualmente substâncias bioativas isoladas de plantas vêm ganhando destaque na investigação científica, dentre estas substâncias, os terpenoides, que se mostram como o maior grupo de metabólitos secundários dos vegetais e estão amplamente distribuídos na natureza por estarem presentes em todas as partes da planta, tal como as folhas, pólen, frutas e sementes (MIURA et al., 1999). Estes

metabólitos são também denominados como isoprenoides, pois são formados por unidades de isoprenos e os números dessas estruturas moleculares introduzidas servem de base para classificação desses compostos. As estruturas químicas formadas através da junção de duas, três, quatro, cinco, seis e oito unidades isoprênicas são chamadas de mono, sesqui, di, sester, tri e tetraterpenos, respectivamente. Dessas classes, os mono e sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais e das resinas. Os representantes das demais classes são em sua maioria sólidos e podem ser encontrados na forma livre, glicosilados ou como ésteres. Estima-se que haja aproximadamente 30.000 terpenos identificados, sendo 4.000 referentes a triterpenos (MAHATO et al., 1988). Esses compostos isolados de origem natural têm sido estudados para possíveis atividades biológicas em vários modelos animais e tem sido relatado serem detentores de uma atividade anti-inflamatória e cicatrizante, como por exemplo, o monoterpreno timol (RIELLA et al., 2012).

Os triterpenos compreendem um grande número de diferentes tipos de compostos que podem ser subdivididos em famílias de estruturas químicas importantes. Os principais grupos de triterpenoides e seus derivados glicosilados são representados por derivados tetracíclicos dos protostanos, cicloartanos, damaranos, eufanos e derivados pentacíclicos do tipo ursano, oleanano, gamacerano, lupano e ropano. Os triterpenos pentacíclicos apresentam um esqueleto com trinta átomos de carbonos arranjados em cinco anéis de seis carbonos (ursanos e lanostanos) ou quatro anéis de seis e um anel de cinco carbonos (lupanos e ropanos). Dentre esses compostos, o betulinol é o mais abundante na natureza e é o precursor na biossíntese de muitos compostos biologicamente potentes, como o ácido betulínico. Embora a grande maioria das pesquisas voltadas para os triterpenoides foquem na propriedade de reduzir o colesterol, existe uma enorme quantidade de publicações que sugerem a utilidade dos triterpenoides para o tratamento de uma variedade de doenças, tais como o diabetes e o câncer (SIDDIQUE; SALEEM, 2011; YAN et al., 2013).

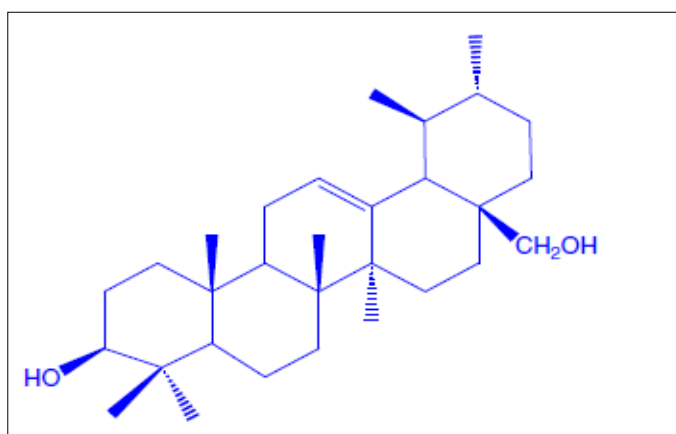
Atualmente sabe-se que o uso de curativo bioativo com base em colágeno aliado a substâncias com propriedades anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante é eficaz no tratamento de lesões de pele (DIAS et al., 2011). Dados

recentes demonstram que filmes de colágeno contendo lipossomas carregados com ácido úsnico são bastante úteis na melhoria do processo de cicatrização de queimaduras, relacionando essa melhora com a modulação de alguns eventos biológicos envolvidos neste processo, tais como a resposta inflamatória, epitelização, e formação de colágeno (NUNES et al., 2011). Além disso, os triterpenoides apresentam várias atividades biológicas, como propriedades pro- e anti-inflamatórias dependendo da dose e da estrutura química, atividade antioxidante e antimicrobiana e isso tem sido relatado como sendo útil no tratamento de feridas da pele (MUKHERJEE et al., 2011). Diante deste contexto, o uso dos triterpenoides constitui uma abordagem atrativa para o tratamento de vários distúrbios inflamatórios, cortes, feridas e queimaduras.

### 3.6 Uvaol

O uvaol é um triterpenoide pentacíclico (Figura 5), presente no azeite de oliva, principalmente em frações não-glicerídicas do óleo, obtido a partir de *Olea europaea* L. (ALLOUCHE et al., 2010), e em outras plantas como *Eucalyptus globulus labill*, *Arctostaphylos uva ursi*, *Salvia officinalis* (GOTFREDSEN, 2011) .

**Figura 5 – Estrutura química do triterpeno pentacíclico uvaol.**



Fonte: MARQUEZ-MARTIN; LA PUERTA; FERNANDEZ-ARCHE, 2006.

Alguns trabalhos demonstraram que a estrutura química do uvaol, contendo um grupo hidroximetil ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ) em R2, apresenta forte efeito na supressão da geração de ânion superóxido induzido por ácido araquidônico e fMLP em neutrófilos humanos (CHEN et al., 2002) e que na concentração de 20  $\mu\text{M}$  possui atividade antioxidante e antitrombótica relacionada em partículas lipoprotéicas de baixa densidade (LDL) de

humanos (ALLOUCHE et al., 2010). Em adição, há relatos de que o uvaol isolado de *Carpobrotus edulis* apresenta propriedade antibacteriana, reduzindo a resistência de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MARTINS et al., 2011). Além disso, esse triterpeno também inibe a produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  em células mononucleares do sangue periférico de humanos estimulados pelo mitógeno fitohemaglutinina (MARQUEZ-MARTIN et al., 2006).

Portanto, esse conjunto de efeitos biológicos apresentados pelo uvaol, aliado à propriedade cicatrizante do azeite de oliva, que apresenta em sua composição este triterpeno, levantou-se a hipótese de que o uvaol seria o responsável pelo efeito cicatrizante em feridas cutâneas. Assim, objetivou-se avaliar o potencial efeito cicatrizante do triterpenoide uvaol em modelo de ferida excisional em camundongos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Preparo da formulação**

No Laboratório de Biologia Celular (ICBS-UFAL) o uvaol (sigma) foi incorporado em creme Lanette<sup>®</sup> (creme base) e acondicionado em pote plástico. O creme aniônico (Lanette<sup>®</sup> - Farmaderm) é uma composição de álcoois graxos superiores e alquil sulfato, hidratante e emoliente, de baixa oleosidade, de toque suave à alta resistência aos princípios ativos que requerem veículos com este caráter. É o veículo ideal para a incorporação de ativos compatíveis com meio aniônico, podendo ser usado como veículo para queratolíticos, hidratantes, anti-inflamatórios, regeneradores, adstringentes, calmantes, cicatrizantes, entre outros. Composto por ceras auto-emulsionantes, propilenoglicol, triglicérides do ácido cáprico, metilparabenos, propilparabenos, imidazolidinil uréia, dimeticone, EDTA dissódico e água deionizada. Sua forma de apresentação farmacêutica é em creme com carga aniônico e pH por volta de 6,00 a 8,00.

As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos brancos em temperatura ambiente com o objetivo de facilitar a análise visual das características organolépticas (odor, cor e homogeneidade).

### **4.2 Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) adultos machos pesando entre 25 e 35 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BioCen-UFAL). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. Cada grupo experimental foi composto por cinco animais ( $n = 5$ ). Todos os experimentos foram aprovados e estão de acordo com as normas do Comitê de Ética Institucional da UFAL (Processo nº 9244/2009-45).

### **4.3 Modelo de ferida excisional e tratamento**

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos foram confeccionados campos cirúrgicos fenestrados e todo instrumental cirúrgico, as compressas de gaze,

as espátulas de madeira foram esterilizados à autoclave. As seringas, agulhas, luvas e lâminas de bisturi foram de uso descartável e todas as técnicas de assepsia foram observadas durante os procedimentos da realização da ferida e durante os tratamentos.

Os camundongos foram anestesiados com xilazina (5 mg/kg) e ketamina (35 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) e submetidos ao resseccionamento de um fragmento cutâneo circular de aproximadamente 1 cm de diâmetro, até a exposição da fáscia muscular na região dorsal (AGRA et al., 2013). Os animais foram tratados por via tópica diariamente por um período de 10 dias com uvaol nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1%. Como controles, foi utilizado Fibrase<sup>®</sup> (Fibrinolisa 10%) e salina (NaCl 0,9%). O dorso foi escolhido para confeccionar as feridas por ser um local com o melhor sítio para incisão, pois evita irritação por contato e auto canibalismo.

A mesma metodologia foi empregada para avaliar a atividade cicatrizante da formulação contendo o princípio ativo uvaol. O uvaol foi solubilizado no dispersante propilenoglicol e incorporado ao creme base padrão, Lanette<sup>®</sup>, para atingir concentrações finais de 0,1, 0,01 e 0,001%. Essas formulações foram utilizadas para o tratamento tópico diário das feridas feitas em camundongos por 10 dias consecutivos. Grupos que foram tratados apenas com Lanette<sup>®</sup> sem princípio ativo e apenas com salina (NaCl 0,9%) foram os grupos controles.

#### 4.3.1 Avaliação macroscópica

Para a análise macroscópica e análise das taxas de contração da ferida, nos dias 3, 6 e 10 foram realizadas as aquisições de imagens com uma câmera digital Sony Steadyshot DSC-S 3000 e analisadas através do programa de análise de imagens Adobe Photoshop CS4. O cálculo da porcentagem do fechamento da ferida foi realizado através de uma equação:

$$\text{Área da ferida (\%)} = \frac{[(\text{área do dia 0} - \text{área do dia n})]}{\text{área do dia 0}} \times 100$$

onde n representa o dia respectivo da análise (AGRA et al., 2013).

#### 4.3.2 Avaliação microscópica

Após 10 dias de tratamento os animais foram eutanasiados e as áreas correspondentes da região da ferida foram removidas e fixadas em formalina 10%, em seguida foram processados de acordo com a rotina para inclusão em parafina. Os blocos foram seccionados em corte de 5  $\mu\text{m}$ , tendo sido coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise morfológica. Para a análise de deposição de colágeno, os cortes foram corados com tricômio de Masson e todos foram analisados em microscopia óptica para a obtenção das imagens.

#### 4.4 Avaliação toxicológica após uso tópico de uvaol

Para avaliar uma possível toxicidade sistêmica ocasionada pelo tratamento tópico do uvaol foram analisados parâmetros comportamentais como agitação, sedação, sonolência, ocorrência de diarreia e sialorreia. Para isso os animais foram avaliados de maneira individual em caixas de acrílico, por 2 minutos diariamente, e no primeiro dia por 4 horas seguidas em intervalos de 15 minutos. Além disso, o peso corporal e a celularidade do sangue periférico após a indução da ferida foram avaliados nos dias 0, 3, 6, 10. Para a análise do perfil de celularidade periférica foi realizada a contagem de leucócitos totais, em que uma amostra de 10  $\mu\text{L}$  de sangue da extremidade da cauda do animal foi coletada nos respectivos dias, diluída em solução de Turk e contada em câmera de Neubauer.

Durante o período de 15 dias foi avaliado macroscopicamente se a formulação uvaol incorporado no creme Lanette<sup>®</sup> apresentava alguma toxicidade cutânea. O dorso do animal foi depilado e a pele previamente limpa com álcool 70% antes de aplicar a formulação de base Lanette<sup>®</sup> e a formulação de base Lanette<sup>®</sup> contendo uvaol 0,1, 0,01 e 0,001% diariamente, em experimentos distintos.

#### 4.5 Ensaio de viabilidade por MTT

O efeito do uvaol sobre a viabilidade celular foi avaliado utilizando fibroblastos humanos (adaptado de LEE et al., 2012). Essas células foram cultivadas em placas de 96 poços, na densidade de  $10^4$  células/poço na presença de meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB), num volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Em seguida, as células foram incubadas por 12 h em estufa de  $\text{CO}_2$  a 37<sup>o</sup> C para adesão

a placa. O Uvaol foi adicionado em diferentes concentrações (0,001, 0,01 e 0,1 mM) e incubado por 1 e 24 h na estufa de CO<sup>2</sup> a 37°C. Após esse período foi adicionado 22,5 µL da solução de 3-(4,5 dimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL) diluído em RPMI 1640 contendo SFB (10 %) em todos os poços, seguido de uma incubação por 4 h, em que apenas as células viáveis foram capazes de reduzir o MTT em cristais violetas insolúveis de formazan, através da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com o auxílio da pipeta, e então adicionado em todos os poços 150 µL de DMSO (100%), para a solubilização dos cristais de formazan. Seguidos 15 min, foi realizada a leitura da densidade óptica da placa por espectrofotometria com comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular foi normalizada para a viabilidade de 100% de células em meio RPMI sendo, portanto o controle. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

#### **4.6 Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) e as diferenças entre as médias foram analisadas estatisticamente empregando-se os teste t ou análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do pós-teste de Newman-Keuls, onde os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Todos os resultados foram analisados com o auxílio do programa estatístico Graphpad Prism<sup>®</sup> versão 5.02 (Graphpad Software Inc., San Diego CA – USA).

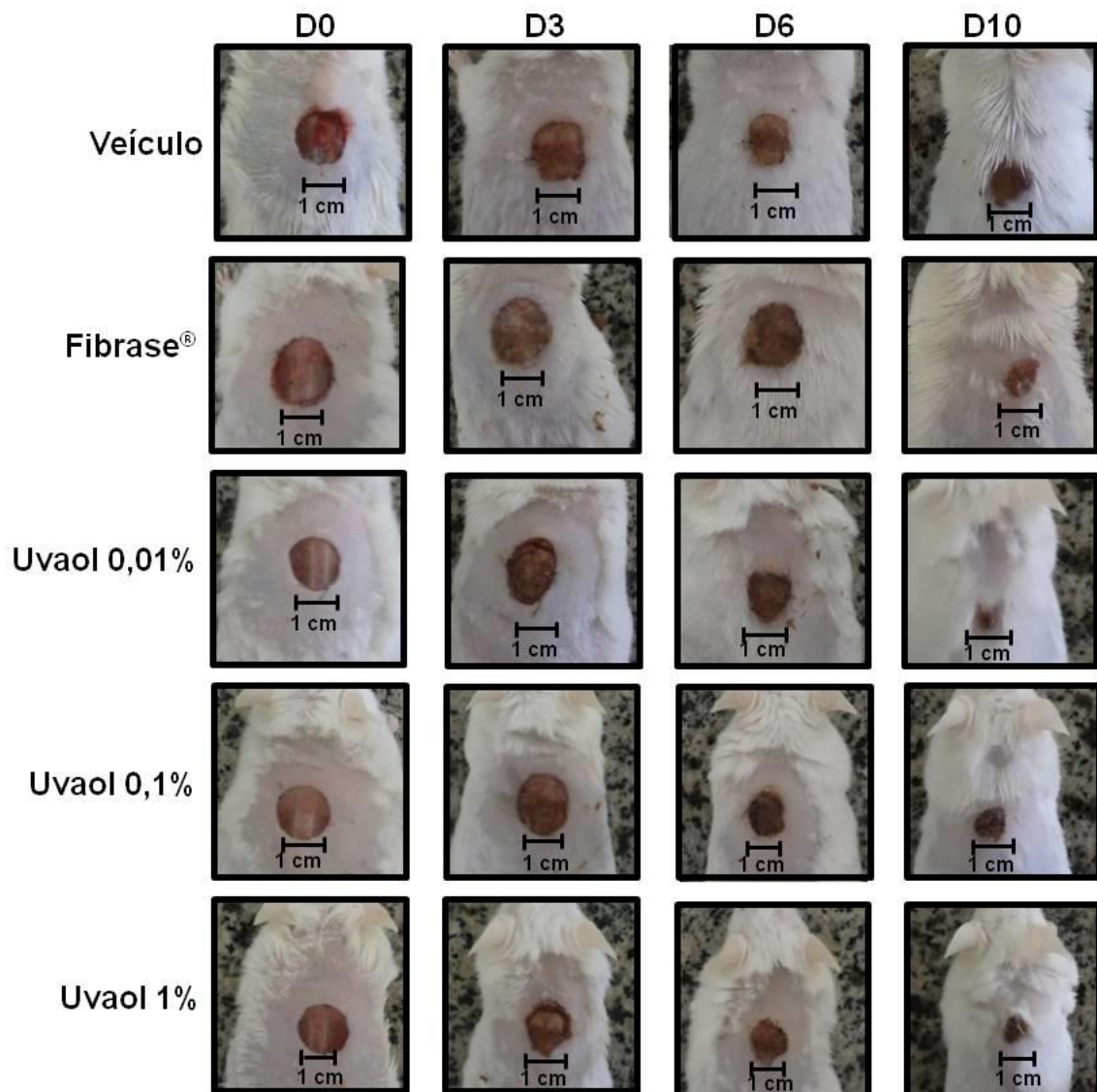


## **5 RESULTADOS**

### **5.1 O Uvaol acelera o processo de cicatrização em modelo de ferida excisional**

A progressão do processo de cicatrização após o tratamento com uvaol, Fibrase<sup>®</sup> e do grupo tratado com veículo no modelo de ferida excisional são mostrados na Figura 6. Os grupos tratados com uvaol em todas as doses aumentaram o percentual de contração da ferida, principalmente o grupo tratado com a concentração de 1%, que aumentou significativamente o percentual de contração da ferida a partir do 3º dia com 25% apresentando no 10º dia um percentual de 71%, quando comparado com o grupo veículo. Os grupos de animais tratados com uvaol nas demais concentrações (0,01 e 0,1%) apresentaram um aumento significativo no percentual de 87% e 70%, respectivamente no 10º dia de avaliação quando comparado com o grupo tratado com veículo. Vale ressaltar que os percentuais foram superiores ao grupo tratado com o fármaco de referência Fibrase<sup>®</sup> que apresentou um percentual de 67% (Tabela 2).

**Figura 6 – Perfil representativo das análises macroscópicas dos diferentes grupos o longo do processo de cicatrização.**



As colunas D0, D3, D6 e D10 representam, respectivamente, os dias 0, 3, 6 e 10 em que foram realizadas as análises. As linhas, representadas por Veículo, Fibrase®, uvaol 0,01, uvaol 0,1 e uvaol 1%, mostram um grupo com fotografias das feridas nos respectivos dias após tratamento.

Fonte: Autor, 2013.

Tabela 2 – Efeito tóxico do uvaol em modelo de ferida excisional.

Dia	Área da ferida sob tratamento				
	Veículo	Fibrase®	Uvaol (0,01%)	Uvaol (0,1%)	Uvaol (1%)
0	1,6 ± 0,03	1,3 ± 0,03	1,9 ± 0,06	1,8 ± 0,12	1,8 ± 0,04
3	1,4 ± 0,04 (13%)	1,0 ± 0,02 (20%)	1,7 ± 0,07 (12%)	1,6 ± 0,05 (9,8%)	1,3 ± 0,07 * (25%)
6	1,2 ± 0,03 (27%)	0,9 ± 0,02 (31%)	0,9 ± 0,05 ** (50%)	1,2 ± 0,09 (34%)	0,9 ± 0,08 ** (48%)
10	0,8 ± 0,06 (49%)	0,4 ± 0,06 ** (67%)	0,2 ± 0,02*** (87%)	0,5 ± 0,02 ** (70%)	0,5 ± 0,1 ** (71%)

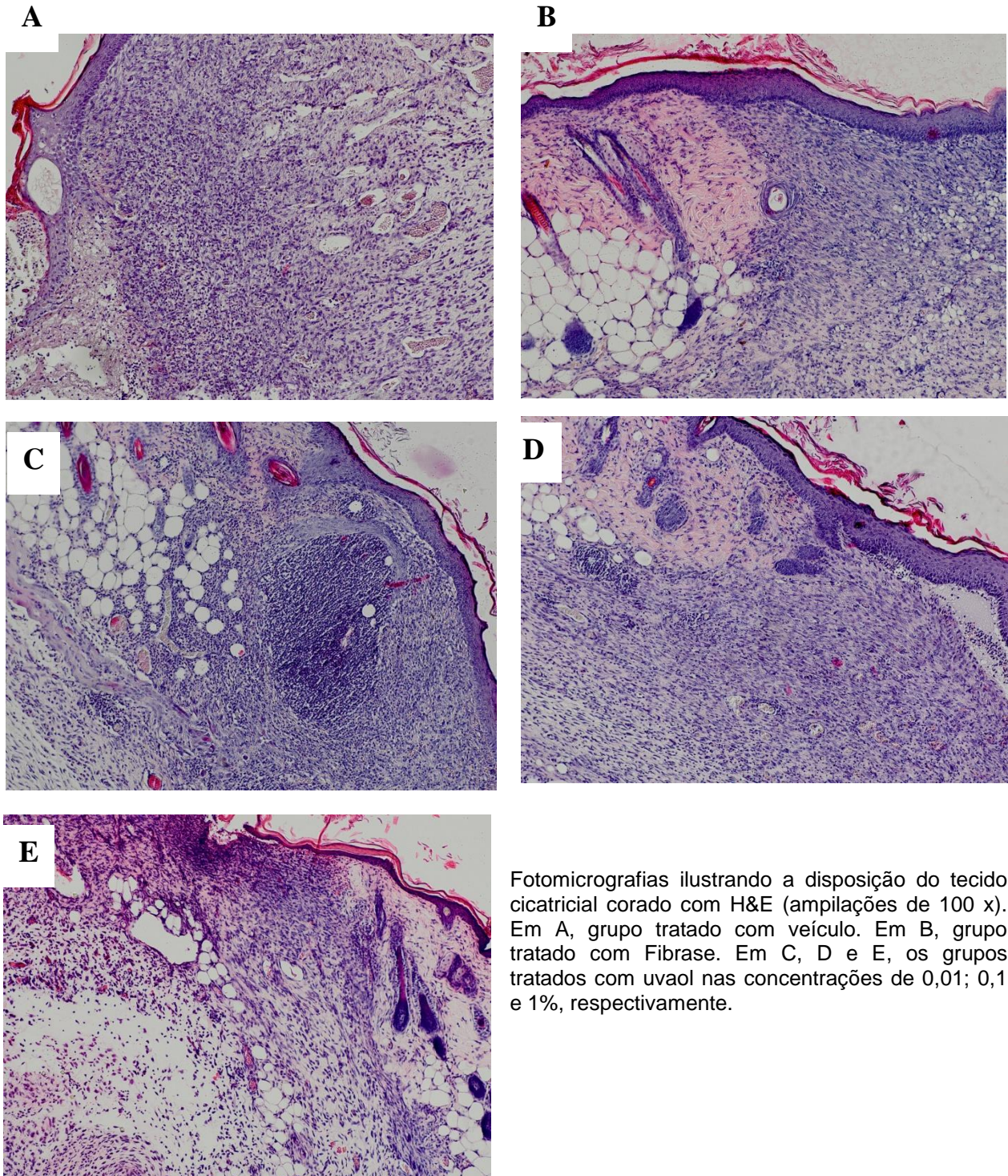
Valores entre parênteses representam a média da contração da ferida em porcentagem (%) a partir do dia 0. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos do teste de Neuman-Keuls. \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01 e \*p < 0,05 (veículo vs. grupos teste nos dias 0, 3, 6 e 10, respectivamente), (n = 5).

Fonte: Autor, 2013.

No 10° dia os animais foram eutanasiados e tiveram a área de cicatrização removida para uma análise histológica através de lâminas coradas com H&E e tricômio de Masson. Como apresentado na Figura 7, os grupos tratados com Fibrase® e uvaol apresentaram a pele com a região da ferida fechada quando comparada com o grupo veículo que apresentou uma reepitelização incompleta. Os grupos tratados apresentaram camadas de células da epiderme e derme mais organizadas e compactas do que o grupo veículo.

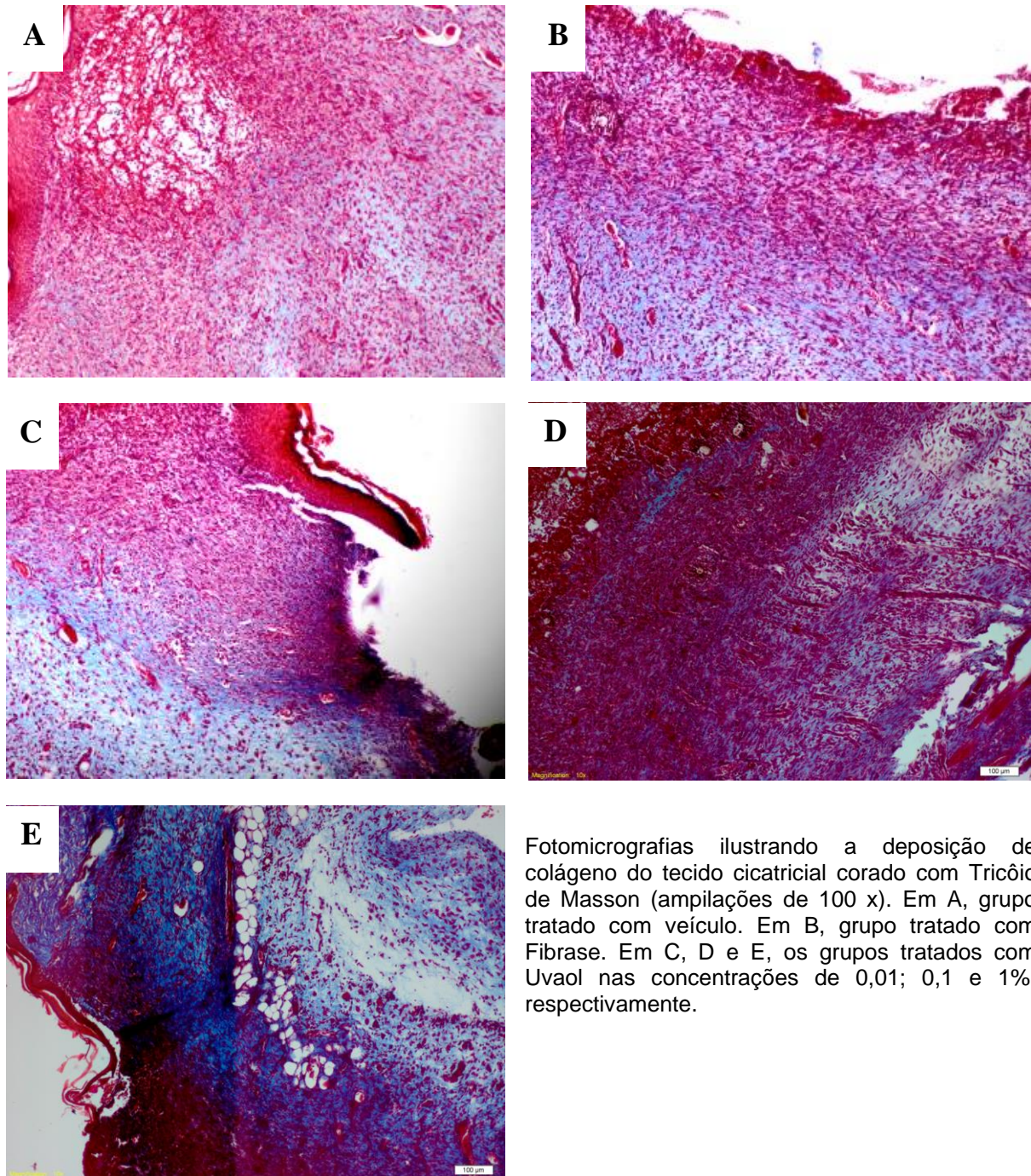
Quando observados os cortes histológicos corados com tricômio de Masson é possível identificar que no 10° dia após a indução da ferida ocorreu uma maior deposição de colágeno nos grupos tratados com Fibrase® e uvaol. Esses grupos apresentam uma derme com uma maior intensidade na coloração azul, o que indica uma maior deposição do colágeno devido a esse tipo de coloração. As imagens corroboram com os valores obtidos no percentual de contração da ferida. o grupo tratado com a concentração de 0,01% apresenta 87% de contração da ferida, apresentou uma maior deposição de colágeno (Figura 8).

**Figura 7 - Perfil representativo das análises microscópicas dos diferentes grupos no 10º dia de tratamento do processo de cicatrização**



Fotomicrografias ilustrando a disposição do tecido cicatricial corado com H&E (ampliações de 100 x). Em A, grupo tratado com veículo. Em B, grupo tratado com Fibrase. Em C, D e E, os grupos tratados com uvaol nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1%, respectivamente.

**Figura 8 - Perfil representativo da análise da deposição de colágeno dos diferentes grupos no 10º dia de tratamento do processo de cicatrização**



Fotomicrografias ilustrando a deposição de colágeno do tecido cicatricial corado com Tricôio de Masson (amplificações de 100 x). Em A, grupo tratado com veículo. Em B, grupo tratado com Fibrase. Em C, D e E, os grupos tratados com Uvaol nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1%, respectivamente.

Fonte: Autor, 2013.

## 5.2 Efeito do tratamento tópico do uvaol no peso corporal dos animais e celularidade sistêmica durante o período de cicatrização

Os animais foram pesados nos dias 0, 3, 6 e 10 após a indução da ferida e como apresentado na Tabela 3, os tratamentos tópicos realizados com o uvaol não interferiram no peso corporal dos animais durante o processo de cicatrização. O tratamento tópico com uvaol também não interferiu nos diferentes parâmetros comportamentais, tais como agitação, sedação e sonolência. Além disso, ao longo do tratamento, os animais não apresentaram episódios de diarreia e sialorreia.

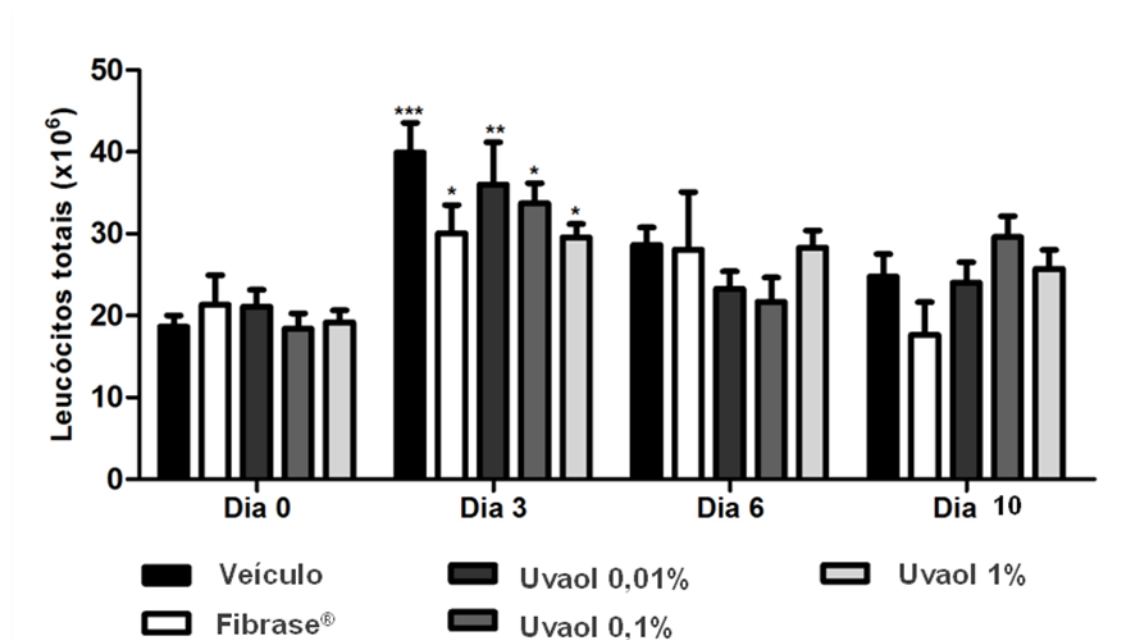
**Tabela 3 – Efeito do tratamento tópico do uvaol sobre o peso corpóreo dos animais nos dias 0, 3, 6 e 10.**

Dia	Peso corpóreo (g)				
	Veículo	Fibrase®	Uvaol (0,01%)	Uvaol (0,1%)	Uvaol (1%)
<b>0</b>	34,4 ± 0,37	35,5 ± 0,48	37,9 ± 0,31	41,0 ± 0,63	36,4 ± 1,12
<b>3</b>	34,0 ± 0,95	34,8 ± 0,87	36,3 ± 0,70	39,4 ± 0,17	34,8 ± 0,95
<b>6</b>	33,8 ± 1,09	34,3 ± 1,18	35,1 ± 0,49	38,1 ± 0,61	33,7 ± 1,01
<b>10</b>	33,8 ± 1,09	34,8 ± 1,18	35,6 ± 0,58	39,4 ± 1,41	34,2 ± 1,01

Fonte: Autor, 2013.

Quando realizada a contagem de leucócitos totais nos respectivos dias de análise foi possível observar que o tratamento tópico com uvaol não alterou o perfil de celularidade dos animais durante o processo de cicatrização, mantendo um aumento significativo do número de células no 3º dia de análise em todos os grupos tratados quando comparado com o perfil celular dos animais tratados no dia de indução da ferida (Figura 9), representando a fase inflamatória do processo de cicatrização. Notou-se também que nos dias seguintes ocorreu uma redução nas contagens de leucócitos totais. Vale ressaltar que o perfil celular apresentado pelos grupos tratados com Fibrase® e uvaol foram semelhantes ao perfil obtido pelo grupo tratado com veículo.

**Figura 9 - Perfil de leucócitos totais do sangue periférico dos animais durante o período de cicatrização.**

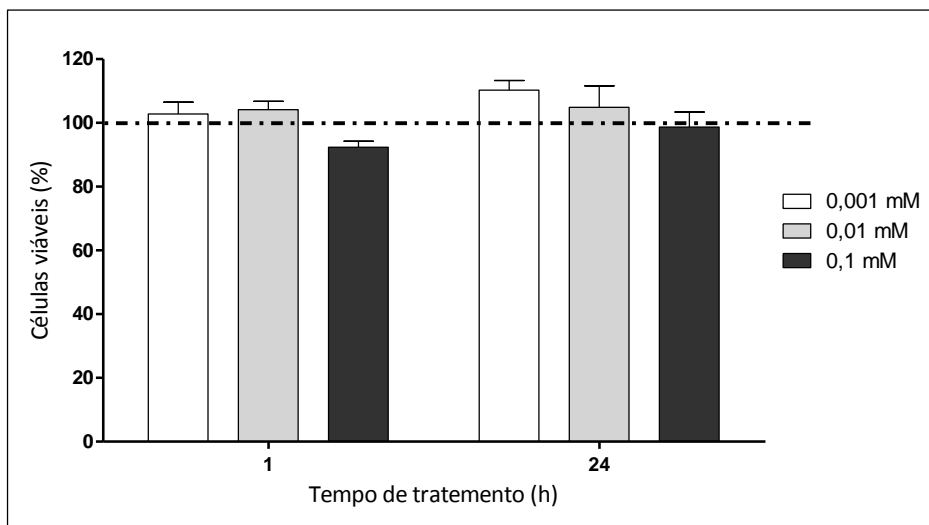


As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos do pós-teste de Neuman-Keuls. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  (veículo no dia 0 vs. grupos teste).

Fonte: Autor, 2013.

### 5.3 Efeito do uvaol sobre a viabilidade de fibroblastos

Com propósito de descartar algum possível efeito tóxico associado ao uso do uvaol, os fibroblastos humanos foram expostos por 1 ou 24 horas ao uvaol em diferentes concentrações (0,001, 0,01 e 0,1 mM) em sistema de cultura celular. Após o período de exposição, o uvaol não induziu morte celular após os períodos de tratamento (Figura 10).

**Figura 10 - Efeito do uvaol sobre fibroblastos humanos mantidos em cultivo celular.**

Fonte: Autor, 2013.

#### **5.4 Efeito da formulação contendo uvaol em base Lanette<sup>®</sup> sobre a cicatrização de feridas cutâneas**

Os resultados obtidos até o momento demonstram que o uvaol foi capaz de reduzir o tempo de cicatrização no tecido cutâneo. Em face disto, buscamos agregar valor a este composto elaborando uma forma farmacêutica padronizada contendo o uvaol como princípio ativo para uso como cicatrizante. Para esta finalidade, o uvaol foi incorporado a um creme base não-iônico para a constituição da forma farmacêutica.

Para avaliar a ausência de ação irritante da formulação contendo uvaol, camundongos foram depilados e expostos topicamente a formulação por um período de 15 dias. Esta exposição na pele dos animais não provocou irritação, sinais de inflamação, inchaço ou qualquer alteração na pele como apresentado na Figura 11.



**Figura 11 – Perfil representativo do dorso dos animais tratados com a formulação contendo uvaol.**



Em A, B e C, fotografia dos animais tratados com o creme base Lanette®. Em D, E e F fotografia dos animais tratados com a formulação contendo uvaol. Imagens evidenciam a ausência de qualquer alteração macroscópica no dorso do animal.

Fonte: Autor, 2013.

O mesmo modelo de ferida excisional em camundongos foi utilizado para avaliar o efeito cicatrizante da formulação contendo uvaol. Os valores da área de ferida encontram-se dispostos na Tabela 4.

**Tabela 4 – Efeito cicatrizante da formulação contendo uvaol sobre a ferida cutânea em camundongos.**

Dia	Área da ferida				
	Controle	Veículo	Uvaol 0,001%	Uvaol 0,01%	Uvaol 0,1%
<b>0</b>	1,1 ± 0,02	1,0 ± 0,06	1,2 ± 0,04	1,2 ± 0,10	1,1 ± 0,06
<b>10</b>	0,1 ± 0,02 * (87%)	0,1 ± 0,02 * (87%)	0,1 ± 0,01 * (90%)	0,1 ± 0,02 * (90%)	0,1 ± 0,02 * (92%)

As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos do teste de Neuman-Keuls. \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01 e \*p < 0,05 (dia 0 vs. dia 10).

Fonte: Autor, 2013.

Os animais tratados com diferentes doses de uvaol demonstraram no dia 10 após o início do tratamento uma área da ferida inferior quando comparado ao grupo controle (Tabela 4), conseqüentemente apresentaram um percentual de contração da ferida maior que o grupo veículo. Dessas doses a que apresentou melhor resultado foi a de uvaol 0,1%, cujo percentual de contração da ferida foi de 92%. Este resultado revela que mesmo em formulação o uvaol mantém sua atividade cicatrizante.

## 6 DISCUSSÃO

O cenário competitivo da indústria farmacêutica tem sido regido pela revolução tecnológica, globalização, competitividade com acentuada ênfase em preço, qualidade e satisfação do consumidor. Empresas que investem na inovação de seus produtos estão, portanto, buscando assegurar sua permanência ou expansão no mercado. No desenvolvimento de novas formulações é extremamente importante escolher os componentes de maneira a atingir os critérios desejados, como eficácia, segurança, estabilidade e aceitação pelo consumidor/paciente.

O reparo tecidual mostra-se como um evento dinâmico que compreende diferentes processos, dentre eles, inflamação, proliferação celular e síntese de elementos que constituem a matriz extracelular, como o colágeno, elastina e fibras reticulares (GANTWERKER; HOM, 2012).

Diversos estudos já avaliaram o emprego tópico de vários compostos derivados de plantas com o objetivo de influenciar o processo cicatricial, com resultados variados. Os triterpenos também são conhecidos por promoverem a cicatrização de feridas, principalmente por causa da sua propriedade adstringente e antimicrobiana, que parecem ser responsáveis pelo aumento da taxa de epitelização em feridas infectadas (SCORTICHINI; PIA ROSSI, 1991). Porém, a revisão de literatura realizada nas bases de dados da Medline e Lilacs não identificou trabalho clínico ou experimental, que tenha avaliado a ação cicatrizante do uvaol sobre ferida cutânea em camundongos, sendo assim tornou-se justificável a realização deste trabalho.

A atividade cicatrizante de alguns triterpenos já tem sido relatada e utilizada como cicatrizante para o reparo de feridas e queimaduras. Dentre estes triterpenos destaca-se o lupeol que foi capaz de apresentar uma completa epitelização e um aumento na deposição de colágeno em modelo de ferida excisional em ratos (HARISH et al., 2008). Outro triterpeno, bacoside A, foi capaz de aumentar a taxa de contração da ferida e acelerar a epitelização (SHARATH et al., 2010). Tal como esses trabalhos, o tratamento tópico do uvaol foi avaliado a partir do modelo de ferida excisional. Esse modelo de ferida permite avaliar o percentual de contração da ferida e o número de dias necessários para epitelização completa da área da ferida.

O tratamento realizado com uvaol mostrou-se capaz de acelerar o fechamento, aumentando a taxa de contração (Tabela 2), bem como foi capaz de realizar uma epitelização completa no décimo dia após a indução da ferida, quando comparado com o grupo controle (Figura 7).

Considerando o conjunto de resultados, pode-se propor que provavelmente o uvaol esteja agindo na fase proliferativa do processo cicatricial tendo em vista o rápido fechamento da ferida em torno do sexto dia após o início da lesão. Essa fase corresponde à aproximadamente 20% do processo de cicatrização, iniciando-se no terceiro ou quarto dia após o insulto. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, proliferação de fibroblastos, síntese e deposição de colágeno, que constituem o tecido de granulação.

Certamente não se pode desconsiderar a ação do uvaol sobre a resposta celular inflamatória local. Nosso grupo recentemente reportou que o uvaol foi capaz de induzir um aumento tanto na produção de fibronectina quanto na expressão de seu receptor (VLA-5) em macrófagos murinos (MELO, 2013). Assim, como é sabido que os macrófagos são indispensáveis para que ocorra o processo de cicatrização, os efeitos do uvaol podem apresentar um papel fundamental na transição da fase inflamatória para a fase proliferativa, na medida em que produzem os fatores de crescimento, que estimulam a proliferação de fibroblastos e a formação de fibras de colágeno. Dessa maneira, o uvaol poderia estimular a formação dos componentes da matriz extracelular, proporcionando o fenômeno de contração e remodelamento da ferida.

O colágeno, um dos maiores componentes do tecido epitelial, é importante para a integridade estrutural da pele e abrange 70-80% do peso seco da pele. Atualmente encontram-se descritos mais de 20 tipos diferentes de colágeno nos tecidos animais (SON et al., 2007).

No processo de contração e reepitelização da ferida onde se observa o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, proliferação de fibroblastos, a deposição de colágeno constitui um evento necessário para consolidação destes eventos. Diante disso, para visualizar mudanças na deposição de colágeno na derme, cortes histológicos da pele no décimo dia após a indução da ferida foram

corados com tricômio de Masson e foi possível identificar um aumento da deposição de colágeno total nos grupos tratados com uvaol quando comparados com o grupo veículo. Portanto, o tratamento tópico com uvaol acelera a contração da ferida e a deposição de colágeno no processo de cicatrização. Esta informação torna-se relevante visto que a contração da ferida é um método dependente de fibroblasto que envolve a deposição e maturação de colágeno (GHOSH et al., 2012).

Sendo o fibroblasto uma célula essencial no processo de cicatrização devido à sua atividade secretora de colágeno e subsequente efeito no remodelamento do tecido de granulação em uma camada de derme definida, foi avaliado se o tratamento do uvaol interferia na viabilidade de fibroblastos humanos. Alguns estudos já demonstraram que o triterpeno asiaticosídeo no ensaio de viabilidade celular não apresenta citotoxicidade em nenhuma das doses entre 61,5 a 1000  $\mu\text{M}$  (LEE et al., 2012). E o uvaol de maneira semelhante não apresenta efeitos tóxicos em fibroblastos humanos nas doses entre 1-100  $\mu\text{M}$ . Além disso, o tratamento tópico com uvaol também não interferiu nos parâmetros comportamentais analisados como agitação, sedação e sonolência. Assim como todos os animais não apresentaram diarreia e sialorreia durante o tempo de análise. Como muitos fármacos aplicados por via tópica são capazes de atravessar de maneira eficiente as barreiras da pele, é importante avaliar alguns parâmetros que possam levantar evidências que mostrem que as substâncias não estão exercendo um efeito tóxico sistêmico (SILVA, 2009). Com isso foi avaliado o peso corporal e a celularidade sanguínea dos animais durante o período de cicatrização e o tratamento tópico do uvaol não interferiu nesses parâmetros. O aumento significativo de células totais que ocorreu no 3º dia após a indução da ferida representa a primeira fase do processo de cicatrização, a inflamação. Essa primeira resposta age como mecanismo de defesa do tecido, promovendo uma resistência às contaminações microbianas (KONDO, 2007). Portanto, o uvaol acelera o processo de cicatrização, mas não interfere na resposta natural da fase inflamatória.

Alguns estudos já avaliaram a atividade cicatrizante de alguns metabólitos secundários em diferentes tipos de formulações. As formulações de pomada contendo a flavona (2-(3,4-dihydroxy-phenyl)-5,7-dihydroxy-chromen-4-one) isolada do extrato de *Pedilanthus tithymaloides* possui atividade cicatrizante, causando uma

rápida epitelização, um significativo aumento na contração e uma melhor resistência à tração da ferida (GHOSH et al., 2012). Estudos recentes demonstraram que outro flavonoide denominado astragalósido IV aprimora o reparo da ferida por promover reepitelização, melhorar o processo de recuperação da resistência à tração da pele ferida, bem como induz à regeneração dos apêndices da pele (PENG et al., 2012). Ainda nesse mesmo estudo foi realizada a comparação da eficácia do tratamento da solução de astragalósido IV com uma formulação de hidrogel contendo astragalósido IV e foi possível observar que o hidrogel com liberação sustentada da substância apresentou superioridade na liberação tópica de astragalósido IV, aumentando a sua eficiência na reepitelização de feridas, secreção de TGF- $\beta$ 1 e formação de novos apêndices da pele (PENG et al., 2012).

Dentre os metabólitos secundários, um triterpeno no qual o tratamento tópico em formulação de gel de alginato de sódio 0,2% aumentou significativamente a atividade cicatrizante foi o lupeol, mostrando-se detentor de uma atividade cicatrizante maior que a nitrofurazona, uma pomada comercializada e comumente utilizada para a cicatrização (HARISH et al., 2008). De maneira semelhante, a formulação do uvaol incorporado na base Lanette<sup>®</sup> manteve sua propriedade cicatrizante por favorecer o fechamento da ferida quando comparado ao grupo controle.

Utilizou-se a formulação em base Lanette<sup>®</sup> conforme a orientação da ANVISA, que em suas normas técnicas para preparação de medicamentos recomenda para formas farmacêuticas de uso externo a preparação máxima a 10%, seja para creme, gel ou pomada. A opção de formulação em creme, e não pela forma líquida, deve-se à sua aderência ao local lesionado, permanecendo por mais tempo no tecido. Quanto à opção pelo creme, e não pela pomada ou gel, ocorreu devido à facilidade de aquisição e manipulação do veículo do creme, o que permitiu a sua preparação artesanalmente.

Os Medicamentos tópicos são as primeiras escolhas para o tratamento de feridas devido à sua facilidade de aplicação (GHOSH et al., 2012). O tratamento tópico de feridas tem muitas vantagens, incluindo a redução de custos e o aumento da facilidade de aplicação, em comparação com o tratamento sistêmico (DIAS et al., 2011). Estudos recentes têm demonstrado que as taxas mais rápidas de fechamento

da ferida podem ser obtidas quando um agente cicatrizante é serialmente entregue ao longo de um período prolongado (HRYNYK et al., 2010).

Com esses dados apresentados, pode-se afirmar que os objetivos desse trabalho foram alcançados através da demonstração, pela primeira vez, do efeito cicatrizante do triterpeno pentacíclico uvaol utilizado topicamente, bem como seus efeitos foram mantidos quando incorporado em uma base de creme Lanette<sup>®</sup>, indicando que o uvaol é um promissor princípio ativo para medicamentos cicatrizantes no tratamento de feridas cutâneas.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- O tratamento tópico com uvaol acelerou o processo de cicatrização cutânea por reduzir o tempo de fechamento da ferida;
- Em feridas tratadas topicamente com uvaol ocorreu uma melhor organização tecidual considerando a arquitetura do tecido, bem como um aumento na deposição do colágeno;
- O tratamento com uvaol não induziu efeitos tóxicos associados ao uso tópico.
- O tratamento com uvaol *in vitro* não foi capaz de induzir efeitos citotóxicos em fibroblastos humanos.
- A formulação em creme contendo uvaol foi capaz de manter os efeitos cicatrizantes sem induzir efeitos tóxicos associados ao uso.



## REFERÊNCIAS

- AGRA, I. et al., Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of aqueous extract from *Bowdichia virgilioides* stem barks in mice. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 85, 2013 (*no prelo*).
- AGRA, L. et al. Uvaol, um triterpeno pentacíclico, inibe a resposta inflamatória alérgica induzida por antígeno. In: REUNIÃO REGIONAL DA FeSBE, 7., Maceió, 2012. **Anais...** Maceió, 2012.
- ALLOUCHE, Y. et al. Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 48, p. 2885-2890, 2010.
- ATIBA, A; UENO, H; UZUKA, Y. The effect of aloe vera oral administration on cutaneous wound healing in type 2 diabetic rats. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 73, p.583-589, 2011.
- BENNETT, N. T; SCHULTZ, G. S. Growth factors and wound healing: part II. Role in normal and chronic wound healing. **Am. J. Surg.**, v. 166, n. 1, p. 74-81, 1993.
- BEVERIDGE, T. et al. Sea buckthorn products: manufacture and composition. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 3480-3488, 1999.
- BROUGHTON, G. et al. The basic science of wound healing. **Plast. Reconstr. Surg**, v. 117, n. 7S, p. 12S-34S, 2006.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 131-134, 2005.
- CHEN, G. et al. H. Effect of five triterpenoid compounds isolated from leaves of *Diospyros kaki* on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation in human polymorphonuclear leukocytes. **Clin. Chimic. Acta**, v. 320, p. 11-16, Jan. 2002.
- CLORE, J. N; COHEN, I. K; DIEGELMANN, R. F. Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. **Proc. Soc. Exp. Med.**, v. 161, n. 3, p. 337-340, 1979.
- DAVIS, R. H, et al. Wound healing oral and topical activity of *aloe vera*. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 79, p. 559-562, 1989.
- DIAS, A. M. A. et al. Development of natural based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide. **Inter J. Pharma.**, v. 408, p. 9-19, 2011.
- DIEGELMANN, R. F. Cellular and biochemical aspects of normal wound healing: an overview. **J. Urol.**, v. 157, n. 1, p. 298-302, 1997.

DIEGELMANN, R. F; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front. Biosci.**, v. 9, p. 283-289, 2004.

\_\_\_\_\_; COHEN, I. K; KAPLAN, A. M. The role of macrophages in wound repair: a review. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 68, n. 1, p.107-113, 1981.

DZUBARK, P. et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Nat. Prod. Rep.**, v. 23, p. 394-411, May 2006.

ENOCH, S.; LEAPER, D..J. Basic science of wound healing. **Basic Science**, v. 26, n. 2, p. 31-37, 2007.

FORREST, R. D. Early history of wound treatment. **J. R. Soc. Med.**, v. 75, n. 3, p. 198-205, mar. 1982.

FRYKBERG R.G. et al. Diabetic foot disorders: a clinical practice guideline. **J. Foot and Ankle Surg.**, v. 39, p. S1-S60, 2000.

FU, X. Skin ulcers in lower extremities : the epidemiology and management in China. **Inter. J. Low. Extrem. Wounds**, v. 4, p. 4-6, 2005.

GAILIT, J.; CLARK, R. A. Wound repair in the context of extracellular matrix. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 6, n. 5, p. 717-725, 1994.

GANTWERKER, E. A; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Clin. Plastic. Surg.**, v. 39, p. 85-97, 2012.

GHOSH, S. et al. Evaluation of the wound healing activity of methanol extract of *Pedilanthus tithymaloides*(L.) Poit leaf and its isolated active constituents in topical formulation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 142. p. 714-722. 2012.

GOLDBERG, S. R; DIEGELMANN, R. F. Wound healing primer. **Surg. Clin. N. Am.**, v. 90, p. 1133-1146, 2010.

GORDON, M. R; HAHN, R. A. Collagens. **Cell. Tissue Res.**, v. 339, n. 1, p. 247-257, 2010.

GOTFREDSEN, E. **Liber herbarum II**: the incomplete reference-guide to Herbal medicine. Disponível em: <<http://www.liberherbarum.com/In2096.HTM>>. Acesso em: 5 dez. 2011.

GUPTA, N. et al. An Indian community based epidemiological study of wounds. **J. Wound Care.**, v. 13, p. 323-325, 2004.

HARDING, K. G; MORRIS, H. L; PATEL, G. K. Science medicine and the future : healing chronic wounds. **B. M. J.**, London, v. 324, n. 7330, p. 160-163, 2002.

HARISH, B. G. et al. Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3-b-protein with isolated triterpenoid lupeol in rats. **Phytomedicine**. v. 15, p. 763-767. 2008.

HRYNYK, M. G., et al.. Sustained prolonged topical delivery of bioactive human insulin for potential treatment of cutaneous wounds. **Int. J. Pharm.**, v. 398, p. 146-154. 2010.

HUNT, T. K. Wound healing. In: DOHERTY, G. M; WAY, L. W. **Current surgical diagnosis and treatment**, 12<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2006.

JAGETIA, G. C; RAJANIKANT, G. K. Role of curcumin, a naturally occurring phenolic compound of turmeric in accelerating the repair of excision wound, in mice whole-body exposed to various doses of gamma-radiation. **J. Surg. Res.**, v. 120, p. 127-138, 2004.

JULL, A. B; RODGERS, A; WALKER, N. Honey as a topical treatment for wounds (Review). **The Cochrane Collaboration**, 2009.

KHAVKIN, J; ELLIS, D.A.F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plast. Surg. Clin. N. Am.**, v. 19, p. 229-234, 2011.

KONDO, T. Timing of skin wounds. **Int. J. Leg. Med.**, v. 9, p. 109-114. 2007.

KUMAR et al. Ethnopharmacological approaches to wound healing: exploring medicinal plants of India. **J. Ethnopharmacol.**, v. 114, p. 103-113, ago. 2007.

LAROUCHE D. et al. Identification of epithelial stem cells in vivo and in vitro using keratin 19 and BrdU: methods in molecular biology. In: TURKSEN, K. **Epidermal cells**, Clifton: Humana Press, 2005. p. 383-400.

LEE, M. S.; REO, S. R.; KIM, J. C. Ab-cyclodextrin, polyethyleneimine and silk fibroin hydrogel containing Centella asiatica extract and hydrocortisone acetate: releasing properties and in vivo efficacy for healing of pressure sores. **Clin. Exper. Dermatol.**, v. 37, p 762-777, 2012.

MACDONALD, J. M; GEYER, M. J. **Wound and lymphoedema management**. Washington: WHO, 2010.

\_\_\_\_\_ ; RYAN, T. J. Global impact of the chronic wound and lymphoedema. In: Wound and lymphoedema management. In: \_\_\_\_\_ ; GEYER, M.J. (Org.). **Wound and lymphoedema management**. Washington: WHO, 2010. p. 13-24.

MAENTHAISONG, R. et al. The efficacy of Aloe vera used for burn wound healing: A systematic review. **Burns**, v. 33, p. 713-718, 2007.

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

MARQUEZ-MARTIN, A.; LA PUERTA, R.; FERNANDEZ-ARCHE, A. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. **Cytokine**, v. 36, p.211-217, Dec. 2006.

MARTIN, P. Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 76-81, 1997.

MARTINS, A. et al. Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 37, n. 5, p. 438-444, mai 2011.

MELO, R. R. S. **Avaliação da atividade imunomodulatória do triterpeno pentacíclico uvaol**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2013.

MIURA, N. et al. Protective effects of triterpene compounds against the cytotoxicity cadmium in HepG2 Cells. **Mol. Pharmacol.**, v. 56, p.1324-1328, Sept.1999.

MUKHERJEEA, P. K. et al. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. **Phytomedicine**, v. 19, p. 64-73, 2011.

NUNES, P. S. et al. Collagen-based films contain in liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **J. Biomed. Biotechnol.**, p. 1-9, 2011.

NWOMEH B. C. et al. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. **J. Surg. Res.**, v. 81, n. 2, p. 189-195, 1999.

PENG, L. H. et al. Topical astragaloside IV-releasing hydrogel improves healing of skin wounds in vivo. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 35, p. 881-888, 2012.

PETRIE, N. C; YAO, F; ERICKSON, E. Therapy in wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, v. 83, p. 194-199, 2003.

PILCHER, B. K. et al. Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 878, p. 12-24, 1999.

RIELLA, K. R. et al. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **J. Ethnopharmacol.**, v. 143, p. 656-663, Jul. 2012.

ROBSON, M. C.; BARBUL, A. Guidelines for the best care of chronic wounds. **Wound Rep. Rege.**, v. 14, p. 647-648, 2007.

RODERO, M; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 3, n. 7, p. 643-653, 2010.

SCORTICHINI, M., PIA, R. M. Preliminary in vitro evaluation of the antimicrobial activity of terpenes and terpenoids of *Erwinia amylovora* (Burrill). **J. Appl. Bacteriol.**, v. 71, p. 109-112, 1991.

SIBBALDI, R. G et al. Best clinical practices for preparing the wound bed: update 2006. In: \_\_\_\_\_; GEYER, M.J. (Org.). **Wound and lymphoedema management**. Washington: WHO, 2010.

SIDDIQUE, H. R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. **Life Sciences**, v. 88, p. 285-293. 2011.

SEN, C. K et al. Human Skin Wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Rep. Reg.**, v. 17, n. 6, p.763-771. 2009.

SHARATH, R. et al. Wound Healing and Protease Inhibition Activity of Bacoside-A, Isolated from *Bacopa monnieri* Wetttest. **R. Phytother. Res.**, v. 24, p. 1217-1222, 2010.

SILVA, J. P. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato aquoso bruto de *Bowdichia virgilioides* Kunth**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009. p. 28-51.

SON, E. D. et al. Alpha-ketoglutarate stimulates procollagen production in cultured human dermal fibroblasts, and decreases UVB-induced wrinkle formation following topical application on the dorsal skin of hairless mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 8, 2007.

TELLER, P; WHITE, T. K. The physiology of wound healing: injury through maturation. **Surg. Clin. N. Am.**, v. 89, p. 599-610, 2009.

UPADHYAY, N. K; YOGENDRA KUMAR, M. S; GUPTA, A. Antioxidant, cytoprotective and antibacterial effects of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, p. 3443-3448, 2010.

YAGER, D. R. et al. The ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors. **Wound Rep. Reg.**, v. 5, p. 23-32, 1997.

YAN, X. J. et al., Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. **Drug Disc. Today**, 2013. (*in press*).

ZU, Y. et al. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 41, p. 714-719, 2006.