

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE CICATRIZANTE *IN VIVO* DA RESINA DE *Protium*
heptaphyllum (Aubl.) March**

MIRIAN DE ALMEIDA SILVA

VILA VELHA

JULHO/2013

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE CICATRIZANTE *IN VIVO* DA RESINA DE *Protium*
heptaphyllum (Aubl.) March**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências Farmacêuticas,
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda
Campos Rosetti Lessa.

MIRIAN DE ALMEIDA SILVA

VILA VELHA

JULHO/2013

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UUV-ES

S586a Silva, Mirian de Almeida.

Atividade cicatrizante in vivo da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March / Mirian de Almeida Silva. – 2013.

39 f.: il.

Orientadora: Fernanda Campos Rosetti Lessa.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Plantas – Uso terapêutico. 2. Óleos vegetais - Composição. 3. Agentes antiinflamatórios. 4. Cicatrização de ferimentos. I. Lessa, Fernanda Campos Rossatti. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615.321

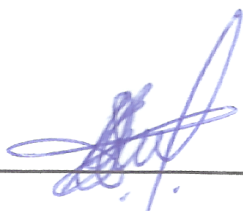
MIRIAN DE ALMEIDA SILVA

**ATIVIDADE CICATRIZANTE *IN VIVO* DA RESINA DE *Protium
heptaphyllum* (Aubl.) March**

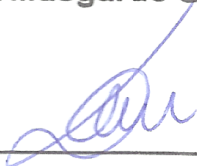
Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como
pré-requisito do Programa de
Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção
do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Aprovada em 31 de julho de 2013,

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Hildegardo Seibert França - IFES



Profª. Drª. Denise Coutinho Endringer- UVV



Profª. Drª. Fernanda Campos Rosetti Lessa- UVV

Orientador

A Deus e a minha família pelo apoio, força,
Incentivo e companheirismo. Sem vocês
nada disso seria possível.

Agradecimentos

A Deus, pela força, sabedoria, e por guiar meus passos durante essa difícil caminhada! Agradeço a meus pais, que por mais uma vez me apoiaram e acreditaram que poderia tornar mais este sonho realidade. Obrigada pelo incentivo e pela confiança. Amo vocês!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Fernanda Campos Rosetti Lessa, por compartilhar comigo seus conhecimentos e suas experiências. Obrigada.

A Prof^a. Dr^a. Denise Coutinho Endringer, que sempre me ajudou e me orientou diante as minhas dúvidas. Agradeço carinhosamente a sua atenção e ajuda nos momentos finais deste trabalho. Não sei o que seria de mim sem você.

Ao professor João Damasceno, pela orientação nos experimentos microbiológicos, pela paciência, atenção, carinho e amizade.

Ao professor de minha graduação, hoje coordenador do curso de mestrado em ciências farmacêuticas, Tadeu Uggere de Andrade, que abriu as portas para realização deste sonho, saiba que tenho enorme admiração.

Aos amigos do mestrado que me acolheram no laboratório, vocês não são somente amigos, são também a minha família. Ewelyne, Gírlândia, Driele, Andrews, Silas, Suellen, Ana Cláudia, Michele, Mayara, Mariana, sou muito feliz por tê-los em minha vida. Agradeço a Fernanda Endringer pela colaboração com minhas referências, Vevê e Gi, agradecimento especial a vocês por me ajudar nos momentos de desespero, muito feliz por tê-las em minha vida e a você Andrews que nunca mediu esforços para me ajudar na pesquisa. Vocês moram no meu coração.

Agradeço ao Alex a paciência e a compreensão da minha ausência.

Aos funcionários, estagiários e alunos de iniciação científica do biopráticas, que me ajudaram em todos momentos. Fica aqui meu agradecimento. Paulinha, agradecimento especial a você, valeu a parceria.

Ao Fundo de Apoio à Pesquisa do Espírito Santo – FAPES, pela bolsa de estudos e financiamento deste trabalho. A Universidade Vila Velha - UVV por proporcionar conhecimento e estrutura necessários para realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que estiveram ao meu lado, que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui.

”Transportai um punhado de terra todos os dias e fareis uma montanha”.

Confúcio

RESUMO

SILVA, Mirian de Almeida M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, julho de 2013.
ATIVIDADE CICATRIZANTE *IN VIVO* DA RESINA DE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Orientadora: Fernanda Campos Rosetti Lessa.

A *Protium heptaphyllum* é uma espécie encontrada em todo Brasil e conhecida pela produção de uma resina rica em óleo essencial utilizada popularmente como importante agente terapêutico tais como, analgésico, anti-inflamatório e cicatrizante. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a composição química, atividade antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*, sobre diferentes cepas, e sobre a linhagem de epitélio bucal transfectado com papiloma vírus (KB-18). Além da atividade cicatrizante *in vivo*, da resina desta planta. A análise dos constituintes químicos do óleo foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Para o ensaio antimicrobiano foram utilizadas cepas padrão ATCC, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus agalactiae* aplicando-se o método de microdiluição, nas concentrações do óleo de 0,195-3,125 mg.mL⁻¹. A citotoxicidade foi avaliada pelo método de MTT nas concentrações de 16-125 µg.mL⁻¹ do óleo. A atividade cicatrizante foi avaliada em ratos Wistar machos, divididos em dois grupos, grupo controle (GC) tratado com salina e grupo tratado com pomada da resina de *P. heptaphyllum* (25% p/p), diariamente por 30 dias, sendo as análises macroscópicas e microscópicas, realizadas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21. O óleo essencial apresentou predominância de substâncias monoterpênicas. O tratamento com o óleo essencial promoveu sensibilidade de quase todas as cepas testadas, com exceção da espécie bacteriana *Salmonella typhimurium*. Verificou-se uma atividade citotóxica fraca deste óleo no tratamento de células KB-18 com IC₅₀ de 48,7 ± 7,2 µg/mL. O tratamento tópico com a resina de *P. heptaphyllum* favoreceu o processo de cicatrização das feridas na fase inicial, até o 7º dia de tratamento, entretanto, apresentou-se semelhante ao grupo controle aos 21 dias. Conclui-se que a atividade antimicrobiana do óleo essencial provavelmente auxiliou na melhora da cicatrização das feridas em ratos na fase inicial, possivelmente pela ação sinérgica das substâncias químicas presentes no óleo e na resina desta planta, além disso, o óleo não apresentou atividade citotóxica alta nas células KB-18.

Palavras chave: Cicatrização, fitoterápicos, citotoxicidade, *Protium heptaphyllum*

ABSTRACT

SILVA, Mirian de Almeida M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, julho de 2013.
HEALING ACTIVITY *IN VIVO*, THE RESIN OF THE *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Orientadora: Fernanda Campos Rosetti Lessa.

The *Protium heptaphyllum* is a species found throughout Brazil and known for producing a resin rich in essential oil, used popularly as an important therapeutic agent, analgesic, anti-inflammatory and healing. The objectives of this study were to evaluate the chemical composition, antimicrobial and cytotoxic activities of essential oil resin of *P. heptaphyllum* in different strains, and the lineage of oral epithelium transfected with human papilloma virus (KB-18), respectively, besides of the healing activity *in vivo*, the resin of this plant. The analysis of the chemical constituents of the oil was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometer. To test antimicrobial agent were used ATCC strains, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* applying the microdilution method in oil concentrations of 0,195-3,125 mg.mL⁻¹. Cytotoxicity was assessed by MTT method at concentrations of 16 to 125 µg. mL⁻¹ of oil. The healing activity was evaluated in male Wistar rats, divided into two groups, control group (CG) treated with vehicle, and the group treated with lanolin-petrolatum ointment of the resin of the *Protium heptaphyllum* (25% p/p), daily for 30 days with the macroscopic and microscopic analysis carried out on days 0, 3, 7, 14 and 21. The essential oil showed a predominance of substances monoterpenes. The treatment with the essential oil promoted sensitivity of almost all strains tested, with the exception of the bacterial species *Salmonella typhimurium*. Verified that there was a weak cytotoxic activity of this oil in the treatment of KB-18 cell line with IC₅₀ of 48,7 ± 7.2 µg/mL. The Topical treatment with *P. heptaphyllum* resin favored the process of wound healing in the initial phase, until the 7th day of treatment. It is concluded that the antimicrobial activity of essential oil probably helped in improving the healing of wounds in rats possibly by the synergistic action of chemical compounds present in the oil and resin of the plant furthermore suggest a possible chemopreventive activity oil, seen that this did not show high cytotoxic activity in KB 18 cell line.

Key-words: Healing, Herbal, Cytotoxicity, *Protium heptaphyllum*

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
Capítulo	13
Resumo	14
Introdução	15
Métodos	17
Resultados e discussão.....	22
Conclusão	31
Referências	32
Anexos – Normas da revista	

CAPÍTULO

Atividade cicatrizante *in vivo* da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March

Mirian de Almeida Silva^I, Eduardo Roberto Cole^I, Fabrício Raposo^I, Fernanda Campos Rosetti Lessa^I, Denise Coutinho Endringer^{I,II*}, Vinicius Ricardo Cuña de Souza^{I*},

^I Universidade Vila Velha – UVV. 29102-920, Vila Velha, ES, Brasil.

^{II} Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo - IFES, 29106-010, Vila Velha, ES, Brasil.

* Autor para correspondência: Universidade Vila Velha; Avenida Comissário José Dantas de Melo, nº21, Boa Vista, Vila Velha – ES. CEP 29102-920;+55 (27) 3421-2001, e-mail: denise.endringer@uvv.br.

RESUMO

Introdução e objetivo: *Protium heptaphyllum*, conhecida pela produção de uma resina rica em óleo essencial é utilizada popularmente como analgésico, anti-inflamatório e cicatrizante. Avaliar a composição química, atividade antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*, além da atividade cicatrizante *in vivo* da resina desta planta, foram os objetivos do presente estudo. **Métodos:** A análise dos constituintes químicos do óleo foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. Para o ensaio antimicrobiano, utilizou-se diferentes cepas fúngicas e bacterianas aplicando-se o método de microdiluição. A atividade cicatrizante foi avaliada em ratos Wistar machos, divididos em dois grupos, grupo controle e grupo tratado com resina de *P. heptaphyllum* (25% p/p) e a citotoxicidade avaliada pelo método de MTT. **Resultados:** O óleo essencial apresentou predominância de substâncias monoterpênicas. Verificou-se que o tratamento com o óleo essencial promoveu sensibilidade em quase todas as cepas testadas, apresentando uma fraca atividade citotóxica em células KB-18, com IC₅₀ de 48,7 ± 7,2 µg/mL. **Conclusão:** O tratamento tópico com a resina de *P. heptaphyllum* favoreceu o processo de cicatrização das feridas na fase inicial. A antimicrobiana do óleo essencial provavelmente auxiliou na melhora da cicatrização das feridas em ratos.

Palavras chaves: Cicatrização, fitoterápicos, citotoxicidade, *Protium heptaphyllum*

ABSTRACT

Introduction and object: The *Protium heptaphyllum*, known for producing a resin-rich essential oil is popularly used as an analgesic, anti-inflammatory and healing. Evaluate the chemical composition, antimicrobial and cytotoxic activities of essential oil resin of *P. heptaphyllum*, besides of the healing activity *in vivo* of the resin of this plant, were the aims of this study. **Methods:** The analysis of the chemical constituents of the oil was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. For testing we used different microbial strains fungal and bacterial applying the microdilution method. The healing activity was evaluated in male Wistar rats, divided into two groups, control group and the group treated with resin of the *P. heptaphyllum* (25% p/p) and cytotoxicity evaluated by MTT method. **Results:** The essential oil showed a predominance of substances monoterpenes. Verified that treatment with the essential oil sensitivity promoted in nearly all strains tested, presenting a weak cytotoxicity in KB-18 cells, with IC₅₀ of 48,7 ± 7.2 µg/mL. **Conclusion:** The Topical treatment with the resin of *P. heptaphyllum* favored the process of wound healing in the initial phase. The antimicrobial essential oil probably helped in improving wound healing in rats.

Keywords: Healing, Herbal, Cytotoxicity, *Protium heptaphyllum*

INTRODUÇÃO

A família Burseraceae compreende 16 gêneros e mais de 800 espécies, as espécies desta família são bem conhecidas pela produção de exsudados e resinas ricas em substâncias aromáticas, muito utilizadas em produtos de perfumaria, produção de verniz e para diversos fins medicinais (Le Cointe, 1934). A espécie *Protium heptaphyllum* é conhecida popularmente como Almécega, Alméscar, Almíscar, Breu-Branco-verdadeiro, apresenta cerca de 10 metros de altura com tronco espesso (50-60 cm de diâmetro na base), e uma casca vermelho escuro, suas folhas são opostas e imparipinadas, as flores são pequenas e os frutos são drupas avermelhadas que contém quatro sementes (MATOS, 1997).

Popularmente, várias atividades farmacológicas têm sido atribuídas à resina, tais como tônico, estimulante, anti-ulceroso, anti-inflamatório, cicatrizante, analgésico e expectorante (Siani *et al.*, 1999).

A resina coletada do tronco de sua madeira é um eficaz agente cicatrizante dotado de propriedades anti-inflamatório e analgésico (Siani *et al.*, 1999). Da resina, além do óleo essencial, cujo teor é de 11%, foram isolados monoterpenos triidroxilado, os triterpenos α -amirina, β -amirina e breina (Bandeira, 2002).

O óleo essencial extraído da resina da *P. heptaphyllum* teve relatada sua atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (Bandeira *et al.* 2006). Agentes antimicrobianos desempenham importante papel na cura de feridas, uma vez que promovem uma barreira contra micro-organismos, protegendo desta forma a área lesionada e contribuindo assim para a atividade farmacológica cicatrizante que algumas plantas possuem (Ipek *et al.* 2011).

O processo de cicatrização de uma ferida envolve vários eventos incluindo agregação plaquetária, ativação da cascata de coagulação, infiltrado inflamatório, diferenciação celular e remodelação tecidual. É um processo complexo mediado por citocinas e fatores de crescimento como VEGF, TGF, TNF e IL-1 que visam a restauração completa do tecido (Sweet e Butler, 1977). Assim, estudos utilizando modelos animais como ratos têm sido realizados na tentativa de compreender melhor esse processo e buscar novas formas terapêuticas.

Em virtude dessas propriedades, espera-se que a resina da *P. heptaphyllum* pode ser um agente cicatrizante ideal para travar a progressão da ferida evitando a cronicidade.

Assim, uma vez que a atividade antimicrobiana auxilia na cicatrização, e que a inflamação está relacionada com a progressão de cânceres, o objetivo do presente estudo foi, portanto, avaliar a composição química, atividade antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*, em diferentes cepas, e sobre a linhagem de câncer de boca (KB-18), respectivamente, além da atividade cicatrizante *in vivo*, da resina desta planta.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

A resina de caule da espécie *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March foi coletada no mês de maio de 2010, na Ilha de Guriri, São Mates, Espírito Santo. Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Vila Velha (UVV/ES 1802) e identificada pela botânica MSc. Solange Zanotti Schneider.

Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada de acordo com Skrubis (1983) e Ming et al. (1996) com modificações. Foram adicionados 1,5 L de água deionizada e 250g da resina, a extração foi realizada por hidrodestilação utilizando aparelho de cleverger durante duas horas. O hidrolato obtido foi mantido em repouso, ao abrigo da luz, 4 °C, o óleo foi separado por crio-separação. A fração oleosa foi filtrada sobre sulfato de magnésio anidro e armazenada em frasco âmbar, 4 °C. O rendimento de extração foi determinado pela relação proporcional entre o peso da resina e o peso do óleo obtido.

Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM)

A análise dos constituintes químicos do óleo e da resina foi realizada em um cromatógrafo a gás (Trace Ultra, ThermoScientific®) acoplado a um espectrômetro de massas (DSQII, ThermoScientific®). As substâncias voláteis foram separadas em uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mmd.i. x 0,25 µm, J&W Scientific®, Folsom Califórnia, USA). A programação de temperatura foi iniciada a 70°C permanecendo por 5 min, aumentando-se até 250 °C por uma rampa de temperatura de 3°C/min, permanecendo por 5 min. na temperatura final. Utilizou-se o gás hélio para arraste, com uma vazão constante de 1 mL/min. A

temperatura do injetor foi mantida em 220 °C e a temperatura da interface (CG/EM) foi mantida em 250 °C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (+70 eV), utilizando o modo de varredura, realizada de 35 a 450 mHz. As amostras foram injetadas no CG/EM em duplicata, diluídas em hexano (1 mg/mL), e o volume injetado foi de 1,0 µL com o injetor no modo *splitless*.

A identificação das substâncias contidas no óleo e na resina foi realizada pela comparação da similaridade dos espectros de massa obtidos com os da literatura^{75,76}. As percentagens relativas dessas substâncias foram calculadas a partir das áreas médias obtidas dos cromatogramas.

Ensaio Microbiológico

Foram utilizadas cepas bacterianas e fúngicas padrão ATCC. Cepa fúngica: *Candida albicans* (ATCC 10231). Cepas bacterianas GRAM positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 259230; *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Streptococcus agalactiae* (ATCC 12386) e cepas GRAM negativas: *Escherichia coli* (ATCC 8739); *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). Os trabalhos foram conduzidos nos Laboratórios de Obtenção e Análise de Produtos Naturais e Microbiologia da Universidade Vila Velha (UVV), Vila Velha, Espírito Santo.

Os microrganismos foram cultivados em placas de Petri contendo BHI ágar, em capela de fluxo laminar para evitar contaminações da colônia e incubados por um período de 24-48 horas, dependendo da cepa, em estufa a 37°C, em condições de microaerofilia a anaerobiose.

Para a obtenção de um inóculo 10^8 UFC/mL dos microrganismos, depois de incubados, os mesmos foram capturados das placas de Petri com o auxílio de uma haste metálica esterilizada e diluídos inicialmente em salina. Em seguida, três alíquotas de 100 µL dos microrganismos diluídos em salina foram transferidas para uma placa contendo 96 poços

de fundo chato para determinação da concentração exata dos inóculos, e levado para leitura de absorbância em leitor de ELISA (Leitora Automática de Microplacas de 96 Poços - Mod. Tp Reader - ThermoPlate).

Os microrganismos foram diluídos em meio RPMI – 1640 tamponado na proporção de 1:50. Em uma nova placa de 96 poços foram semeados 100 µL dos inóculos e incubados por 24 horas em estufa a 37°C, em condições de microaerofilia ou anaerobiose.

Após esse período, o óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), a fim de obter-se uma solução-estoque de 100 mg.mL⁻¹. Tanto o óleo quanto o DMSO foram previamente esterilizados com membrana filtrante de 0,22 µm. As concentrações intermediárias foram preparadas diluindo-se a solução-estoque em meio apropriado, de forma a resultar em concentrações finais de aproximadamente 3,125 mg.mL⁻¹; 1,562 mg.mL⁻¹; 0,781 mg.mL⁻¹; 0,391 mg.mL⁻¹; 0,195 mg.mL⁻¹.

Foram adicionados 100 µL das diferentes concentrações do óleo e a placa foi incubada em estufa a 37°C durante 12 horas. No grupo controle negativo foram adicionados 100 µL do inóculo com RPMI – 1640 tamponado e adicionados mais 100 µL de DMSO 10%. No grupo controle positivo foram adicionados 100 µL do inóculo diluído em RPMI – 1640 tamponado e adicionados 100 µL de hipoclorito de sódio 3%.

Após a incubação foram adicionados 20 µL de solução de resazurina a 20% em água em cada poço. Nos poços onde a cor mudou de azul para rosa ficou caracterizado viabilidade microbiana, a não-mudança da cor, caracteriza inviabilidade microbiana.

Animais experimentais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos com idade entre 3-4 meses e peso corporal variando entre 300 e 350 g, mantidos em gaiolas individuais com controle de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro de 12h e acesso livre à água e comida. Estes animais foram

fornecidos pelo Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas – UVV. Todo o procedimento foi realizado de acordo com os princípios éticos elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991) e aprovado pela Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal da Universidade Vila Velha (UVV, CEUA-UVV; N° 71/2009).

Protocolo experimental atividade cicatrizante

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, o controle (GC; n=6), que recebeu veículo e o grupo tratado (GR; n=6) que recebeu 0,5 g da pomada lanolina-vaselina de *P. heptaphyllum* (25% p/p), todos os tratamentos foram realizados diariamente por 30 dias, sendo as análises macroscópicas realizadas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 e a retirada de fragmentos para as biópsias realizadas nos dias 0, 3, 7, 14, 21 e 27 dias após ferida.

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina e Xilasina (30 e 1 mg.kg⁻¹; intraperitoneal – IP), tiveram o dorso tricotomizado e higienizado com álcool 70% e solução de iodo polivinilpirrolidona (PVPI; 1%) seguida da excisão cirúrgica de uma área de 1,5x1,5cm até a exposição da fáscia muscular. Após o procedimento a região foi limpa com soro fisiológico e seca com gaze esterilizada.

Análise Macroscópica e Histológica

Para a análise macroscópica, nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 o animal foi anestesiado, teve a região da ferida medida com o auxílio de um paquímetro e fotografada (Sony CyberShot H9) utilizando o zoom 100 e 400 há uma distância de 30 cm, as análises da área da ferida foram realizadas de acordo com o descrito por Prata *et al* (1988). Após as avaliações macroscópicas foi realizada uma biópsia da ferida. O tecido retirado foi armazenado em tampão formalina, e lâminas foram confeccionadas e coradas com hematoxilina-eosina (HE) e analisada em microscópio ótico (Leica DM/LS, Leica – Germany) por patologista, que analisou a presença

ou ausência de crosta, angiogênese, células inflamatórias, fibroplasia, colágeno e re-epitelização do tecido, sendo analisadas duas laminas para cada animal.

Ao fim do tratamento os animais foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico (Tiopental sódico 40 mg.kg⁻¹) e o pulmão, baço e fígado foram extraídos e armazenados com tampão formalina para a avaliação de possível toxicidade da resina.

Ensaio Citotóxico

O ensaio colorimétrico do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade celular (Mosmann, 1983). Foi utilizada linhagem celular epitélio bucal transfectado com papiloma vírus 18 (KB18, ATCC®-CCL17TM), mantida em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO), suplementado com 10 mL de solução de penicilina G- estreptomicina-l-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 10% de soro fetal bovino (SBF; Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY). Essas células foram semeadas em placas de 96 poços, a 2x10⁴ células.mL⁻¹ e incubadas com 190 µL de meio DMEM suplementado com SFB a 10% e 10 µL do óleo essencial (OE) a 10% DMSO por 72 h, a 37 °C, em 5% CO₂. Para a determinação da concentração inibitória média (IC₅₀), os poços foram incubados com diferentes concentrações de OE (16-125 µg.mL⁻¹). A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo (5 µg.mL⁻¹; Zheng *et al.*, 2012). Após o período de incubação o sobrenadante foi substituído por 200 µL de DMEM e 25 µL de MTT (5 mg.mL⁻¹) e as células incubadas por 4 h, a 37 °C, em 5% CO₂. Os cristais de formazana insolúveis foram dissolvidos em 200 µL de isopropanol acidificado em ácido clorídrico (HCl) a 0,04 M. A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570nm em leitor de ELISA (TP-Reader, Thermoplate, China) e calculada de acordo com a equação: % inibição = (CN – AP) X 100 / CN, onde CN é o controle negativo e AP representa a absorbância do poço.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M). Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) seguido por teste *post-hoc* pelo método de Tukey, ajustado para múltiplas comparações, com significância aceita quando $p < 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* realizada previamente pelo nosso grupo revelou um total de 11 substâncias, com área relativa média de 91,1%, sendo predominante a presença de monoterpenos como o α -terpinoleno, limoneno, 3-careno e o-cimeno (Lima *et al.*, 2012). Além disso, o rendimento de extração do óleo essencial foi de 14,4% (m/m), porcentagem superior aos 10,0% (m/m) relatados por (Siani *et al.*, 1999a).

Diversos autores já relataram anteriormente uma composição química semelhante ao óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* analisado no presente estudo. Oliveira (2005), observou composição química predominantemente monoterpênica, apresentando como substâncias majoritárias α -pineno, limoneno, α -felandreno e terpinoleno, em óleo de *P. heptaphyllum* coletado no Ceará, assim como Carvalho *et al.* (2009), que obtiveram resultados semelhantes, com predomínio dos monoterpenos α -terpineol, epóxido de α -felandreno e terpinen-4-ol.

Os resultados obtidos por Yamada *et al.* (2006) identificaram monoterpenos em maior concentração no óleo da resina desta mesma planta, sendo o 3-careno uma das substâncias majoritárias verificada. Além disso, Siani *et al.* (1999a), Rao *et al.* (2007) e Marques *et al.* (2010) também evidenciaram a presença destas substâncias químicas, o que corrobora com os resultado do presente estudo.

Fatores como tempo de exposição ao sol, estresse hídrico e concentração de nutrientes no solo são capazes de afetar significativamente a produção de metabólitos secundários, o que pode justificar as variações observadas na composição química do óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum*, nos diferentes trabalhos (Willians *et al.*, 1998).

O estudo da atividade antibacteriana e antifúngica realizado através do método da microdiluição em placas esterilizadas, demonstrou que o óleo essencial extraído da resina de *P. heptaphyllum* foi ativo frente à maioria dos micro-organismos testados, com exceção da cepa bacteriana *Salmonella typhimurium*, na qual o óleo essencial não foi capaz de inibir seu crescimento, conforme pode ser observado na Tabela 1 (dados em função da concentração inibitória mínima, CIM).

O controle negativo, DMSO 10%, não apresentou atividade antimicrobiana frente a qualquer dos microorganismos testados. Os resultados do teste com o controle positivo, hipoclorito de sódio, demonstraram sensibilidade das cepas avaliadas ao agente em questão.

Das bactérias empregadas no estudo, as espécies Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* foram as que apresentaram maior resistência ao óleo. Os microorganismos mais sensíveis ao óleo, ou seja, alvos de menor CIM, foram *Candida albicans* e *Enterococcus faecalis*. Os valores de CIM para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* mostraram-se medianos (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *Protium heptaphyllum* em diferentes cepas microbianas padrão ATCC.

Microorganismo	CIM (mg.mL ⁻¹)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ¹ (ATCC 10031)	1,562
<i>Candida albicans</i> ³ (ATCC 10231)	0,391
<i>Staphylococcus aureus</i> ² (ATCC 25923)	0,781
<i>Enterococcus faecalis</i> ² (ATCC 29212)	0,391
<i>Streptococcus agalactiae</i> ² (ATCC 12386)	0,781
<i>Escherichia coli</i> ¹ (ATCC 8739)	1,562
<i>Salmonella typhimurium</i> ¹ (ATCC 14028)	Não ocorreu inibição

¹Espécies Gram-negativas. ²Espécies Gram-positivas. ³Espécie fúngica.

As variações de sensibilidade ao óleo essencial avaliadas nas diferentes cepas podem ser justificadas pelas diferenças estruturais verificadas na parede celular das bactérias testadas, pois espécies Gram-negativas possuem parede celular mais complexa, composta por uma fina camada de peptidoglicano e de uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos, responsável por uma barreira hidrofóbica adicional, enquanto, a parede celular das bactérias Gram-positivas, apesar de mais espessa, apresenta predominantemente um único tipo de macromolécula (Murray *et al.*, 2000; Trabulsi *et al.*, 2004) e, em função desta parede celular mais simples, mostram-se mais sensíveis à ação inibitória do óleo.

Além disso, a membrana externa das bactérias Gram-negativas possui um espaço periplasmático que contém enzimas capazes de inativar alguns antibióticos (Duffy *et al.*, 2001; Sartori *et al.*, 2003; Schaetechter *et al.*, 2002). Também tem sido observado que esta resistência intrínseca que muitos micro-organismos Gram-negativos apresentam está

relacionada com mecanismos especializados em expulsar substâncias estranhas para fora da célula (bomba de efluxo) (Nikaido *et al.*, 1989; Köhler *et al.*, 1999; Van *et al.*, 2003).

Bandeira *et al.* (2006) relataram que o óleo essencial extraído da resina da *P. heptaphyllum* mostrou-se ativo contra *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, apresentando CIM de 1,25 µg.mL⁻¹ e 2,5 µg.mL⁻¹, respectivamente.

Alguns estudos buscam correlacionar a composição química e bioatividade dos óleos essenciais, contudo, isso não têm sido totalmente elucidados (Onofre *et al.* 2005; Cano *et al.* 2006). Presume-se que a atividade biológica dos óleos essenciais não está determinada somente pela quantidade de monoterpenos, mas também por sua taxa de proporcionalidade (Sartori *et al.*, 2005; Cano *et al.* 2006; Costa *et al.* 2009). Assim, apesar de já se ter demonstrado que os mono e sesquiterpenos são ativos contra diversos tipos de micro-organismos, seu mecanismo de ação específico não está completamente elucidado (Sartori *et al.*, 2005), uma vez que o óleo essencial é formado por uma grande variedade de constituintes químicos e cada um destes pode atuar em diferentes sítios na célula microbiana (Carson *et al.*, 2002).

Agentes antimicrobianos apresentam papel importante na cura de feridas, visto que proporcionam uma barreira contra os ataques desses organismos, protegendo a área lesionada de várias infecções, assim pode-se atribuir a atividade farmacológica cicatrizante de algumas plantas, pela ação antimicrobiana que estas possuem (Ipek *et al.*, 2011).

Estudos realizados pelo nosso grupo observaram que o tratamento com óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* promoveu uma redução significativa da área das feridas ao longo do período experimental, sugerindo seu uso para esse fim na medicina veterinária (Bernadi *et al.*, 2013). Porém, não é de conhecimento dos autores do presente estudo, a possível ação cicatrizante da resina de *P. heptaphyllum*, haja vista que a mesma é constituída quimicamente

por triterpenos, principalmente das séries α -amirina (ursano) e β -amirina (oleano) e óleo essencial rico em mono e sesquiterpenos (Bandeira *et al.* 2006; Pinto *et al.* 2008a; Pinto *et al.* 2008b; Aragão *et al.* 2006; Aragão *et al.* 2007).

A avaliação macroscópica das feridas para os grupos controle (GC) e resina (GR) de *P. heptaphyllum* estão representadas na tabela 2. Foi possível observar a redução significativa da área das feridas ao final do período experimental nos dois grupos. Porém o tratamento com resina, quando analisados nos diferentes dias, só foi mais eficaz que o controle no terceiro dia, onde foi possível observar uma menor área da ferida no GR comparado ao GC.

Tabela 2. Área de contração das feridas, induzidas experimentalmente em ratos, tratadas com a resina de *Protium heptaphyllum* (GR) e veículo (GC).

	Dia 0	Dia 3	Dia 7	Dia 14	Dia 21
GC	7,07 $\pm$ 0,00 ^a	9,86 $\pm$ 2,70 ^{bA}	4,23 $\pm$ 1,37 ^{cA}	0,84 $\pm$ 0,20 ^{dB}	0,43 $\pm$ 0,19 ^{dA}
GR	7,07 $\pm$ 0,00 ^a	7,72 $\pm$ 1,49 ^{aB}	4,27 $\pm$ 1,54 ^{bA}	0,99 $\pm$ 0,47 ^{cB}	0,93 $\pm$ 0,89 ^{cA}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha denotam diferença estatística significativa entre as medias ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna denotam diferença estatística significativa entre as medias ($p < 0,05$). Valores expressos em media $\pm$ D.P.

Entretanto, na avaliação microscópica, pode-se observar uma melhoria nos primeiros dias do processo evolutivo da cicatrização no tratamento com a resina, em comparação com o grupo controle. No 3º dia de tratamento foi possível observar uma inflamação moderada multifocal originando-se do tecido sadio e presença de crosta infectada com infiltrado de células polimorfonucleares no GC. No GR, evidenciou-se proliferação fibroblástica leve, inflamação discreta a leve, além da ausência de crosta e início neovascularização.

Na avaliação das lâminas do 7º dia, pode-se observar uma semelhança do GC com a avaliação do 3º dia do GR, acrescido de evidência da fibroplasia que não foi observada no GR. No 7º dia GR observou-se uma fibroplasia mais avançada e re-epitelização presente a partir das bordas da lesão, mostrando uma melhor regeneração do tecido neste grupo.

No 14º dia de tratamento, evidenciou-se no GC ausência de crosta, inflamação leve focal e hiperplasia regenerativa focal na margem da lesão. No GR observou-se ainda uma hiperplasia regenerativa focal na margem da lesão e a presença de crosta.

No 21º dia, observou-se no GC uma fibroplasia leve, presença de deposição de matriz colágena e arranjo estrutural da cicatriz. No 27º dia de tratamento o GC apresentou neovascularização avançada, com presença de colágeno imaturo e contração do colágeno, enquanto que o GR foi possível observar uma fibroplasia moderada e remodelagem no 21º e 27º dia respectivamente, demonstrando-se que a resina promoveu um avanço no processo de cicatrização nos primeiros dias da ferida (3 e 7 dias), ou seja, uma ação positiva nas fases iniciais da cicatrização.

Na avaliação microscópica das feridas para os grupos controle (GC) e resina (GR) de *P. heptaphyllum* foi possível observar, inicialmente, uma melhoria no processo evolutivo da cicatrização no tratamento com a resina, em comparação com o grupo controle, evidenciado na análise das lâminas do 7º dia de tratamento, onde o GR apresentou uma fibroplasia mais avançada e hiperplasia regenerativa focal na margem da lesão, indicando assim um processo cicatricial mais acelerado quando comparado ao GC.

Apesar de ter mostrado uma possível aceleração no processo cicatricial até o 7º dia de tratamento, o GR após esse período teve comportamento semelhante ao GC e ao final do experimento ambos os grupos apresentaram basicamente as mesmas características biológicas, corroborando com a avaliação macroscópica realizada neste estudo.

A maior ou menor velocidade de cicatrização, o tamanho da cicatriz e a sua maior ou menor retração estão na dependência da quantidade e qualidade das citocinas e fatores de crescimento produzidos por leucócitos, plaquetas, células endoteliais além daqueles liberados da MEC ou produzidos após a ação de proteases dessa matriz (Brasileiro, 2009).

Não foi observada alteração no fígado, pulmão e baço dos animais testados, que possa atribuir uma possível toxicidade da resina no período do experimento, tanto na avaliação macroscópica quanto na microscópica.

A atividade cicatrizante verificada no presente estudo deve-se possivelmente à composição química existente a resina de *P. heptaphyllum*. Oliveira *et al.* (2004) avaliaram a atividade anti-inflamatória da resina de *P. heptaphyllum* em modelos animal de úlcera e verificou uma atenuação significativa dos danos gástricos em ratos, indicando uma potencial propriedade gastroprotetora e anti-inflamatório desta planta, provavelmente pelas amirinas, principais constituintes triterpenóides da resina.

Medeiros *et al.* (2007) forneceram evidências *in vivo* que o triterpeno pentacíclico α -amirina, derivados de plantas, apresenta forte ações anti-inflamatórias topicamente em orelha de rato, através de um mecanismo que parece envolver a inibição nos níveis de Prostaglandina E2 (PGE2), através da inibição da expressão de Ciclooxigenase- 2 (COX-2), inferindo-se que α -amirina exerce sua atividade anti-inflamatória por meio de regulação da Proteína Quinase C (PKC) α , ativação MAPKs provavelmente através da inibição da atividade do Fator de Transcrição Nuclear kB (NF-kB).

Pinto *et al.* (2008) apresentaram resultados sugerindo que α , β -amirina retarda a inflamação aguda em modelo de periodontite em ratos, reduzindo a infiltração de neutrófilos, o estresse oxidativo e a produção de citocina pró-inflamatória TNF- α .

Existem vários relatos na literatura da ação de óleos essenciais de plantas medicinais no processo de cicatrização (Kumar *et al.*, 2007; Fatima *et al.*, 2008). Sutar *et al.* (2011) verificaram potente atividade cicatrizante de óleo essencial de orégano. Tumen *et al.* (2011) evidenciaram notável cicatrização e atividade anti-inflamatória, em feridas experimentais após tratamento com óleos essenciais de *Cedrus libani* e *Abies cicilica*, ricos em monoterpeneo limoneno, assim como, Adams e Thrash, (2010) que relataram a importância desta mesma substância na cicatrização.

A ação anti-inflamatória do óleo essencial de folhas de *Lippia gracilis*, foi demonstrada por Mendes *et al.* (2010), onde o principal componente identificado foi o timol, um derivado do monoterpeneo cimeno, que exibe várias atividades biológicas como, antimicrobiano, antioxidante, antinociceptivo, anestésico local, e anti-inflamatória *in vitro* (Braga *et al.*, 2006; Haeseler *et al.*, 2002; Karpanen *et al.*, 2008; Yanishlieva *et al.*, 1999).

Portanto, infere-se um efeito sinérgico dos triterpenos e monoterpeneos presentes na resina de *P. heptaphyllum*, promovendo assim uma melhoria na cicatrização no presente estudo. Os isômeros α , β –amirina, podem modular o processo inflamatório agudo na ferida dos ratos, como sugerido por outros autores, associado com a atividade antimicrobiana verificada no óleo, provavelmente por ação dos monoterpeneos, como limoneno e cimeno, favorecendo a cicatrização na fase inicial.

A inflamação é um importante passo na etiologia do câncer (Marchand *et al.*, 2002), e sabe-se que vários genes capazes de mediar os processos ocorridos durante a carcinogênese são regulados por vários agentes, dentre esses, os inflamatórios (Shishodia *et al.*, 2003), assim, substâncias capazes de promover efeitos anti-inflamatórios, podem apresentar promissor efeito anticancerígenos.

No ensaio de citotoxicidade celular por MTT em células de epitélio bucal transfectado com papiloma vírus 18 (KB-18), foi evidenciado que o óleo essencial da resina do *P. heptaphyllum* apresentou atividade citotóxica fraca, $IC_{50} = 48,7 \pm 7,2 \mu\text{g/mL}$, de acordo com a concentração preconizada pelo Instituto Nacional Americano de Câncer (NCI) ($IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$, para extrato e frações)(Boyed, 2005).

Siani *et al.* (1999) em seus estudos mostraram que os óleos essenciais de *P. heptaphyllum* foram eficazes em retardar a migração de células inflamatória controlando assim o processo inflamatório. No entanto, os seus resultados mais interessantes foram obtidos pela ação do óleo sobre as células neoplásicas SP2:0, Neuro-2a e J774, onde sua taxa eficácia nas linhas neoplásicas foi de 76-89% para J774, de 66 a 95% para SP2: 0 e 60 a 98% para Neuro-2a. Hashim *et al.* (1994) afirmam ainda que monoterpenos e arilpropanóides estão envolvidos na modulação da formação de DNA, um passo inicial e crítico no processo carcinogênico.

Estudo realizado por Taylor *et al.* (2012), verificaram a citotoxicidade do extrato da casca de *P. heptaphyllum*, em células de diferentes tipos de câncer (PC-3, MCF-7 HT-29 MDA-MB-231, 4T1, RAW-267), obtendo atividade citotóxica fraca em todos os ensaios.

Lima *et al.*(2012) também evidenciaram uma atividade citotóxica fraca do óleo essencial da resina do *P. heptaphyllum*, em células de câncer de mama MCF-7, o que corrobora com o resultado encontrado no presente estudo, além disso, estes autores sugerem uma possível atividade quimiopreventivo de câncer, uma vez que, o óleo essencial da resina de *P. heptaphyllum* não induziu citotoxicidade e foi capaz de promover atividade antimutagênica, possivelmente pela presença de monoterpenos contidos no óleo, como observado na análise química.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a atividade antimicrobiana do óleo essencial provavelmente auxiliou na melhora da cicatrização das feridas em ratos, possivelmente pela ação sinérgica das substâncias químicas presentes no óleo e na resina desta planta, como monoterpenos e sesquiterpenos, confirmando a utilização etnofarmacológica da resina de *P. heptaphyllum*. Além disso, o óleo apresentou atividade citotóxica baixa em células KB-18. Entretanto, é necessária uma avaliação mais detalhada com intuito de compreender melhor os mecanismos, vias e segurança de uso desta planta.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo (FAPES).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, S.;THRASH, T.P. Methods for wound treatment and healing using limonene-based compositions. International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty. WO2010/062933 A1, 2010.
- ARAGÃO, G.F.; CARNEIRO, L.M.; JUNIOR, A.P.; VIEIRA, L.C.; BANDEIRA, P.N. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of α - and β -amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Pharmacol. Biochem. Behav, v. 85, p. 827–834, 2006.
- ARAGÃO, G.F.; PINHEIRO, C.M.C.; BANDEIRA, N.P.; LEMOS, G.T.L.; VIANA, B.G.S.J.; Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Herb Pharmacother, v. 7, p. 31–47, 2007.
- BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D.L.; TREVISAN, M.T.S.; LEMOS, T.L.G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. *Quim. Nova*, v. 25, p.1078-1080, 2002.
- BANDEIRA, P.N.; FONSECA, A.M.; COSTA, S.M.O.; LINS, M.U.D.S.; PESSOA, O.D.L. Al. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of resin of *Protium heptaphyllum*. *Nat. Prod. Comun*, v.1, p.117–120, 2006.
- BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; SANTOS, H.S. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Protium heptaphyllum*. In: 48º Congresso Brasileiro de Química, Salvador, BA; 2006.
- BERNADI, W.A.; ZANOTELLI, J.C.; LIMA, E.M; COELHO, C.S.; DE SOUZA, T.D.; ENDRINGER, D.C.; DE SOUZA V.R.C.Effects of topical application of essential oil from resin of alméscar (*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand) oil resin in experimentally induced skin wounds in rats. (submetido)

- BOYED, T. In Anticancer drug development guide; preclinical screening, clinical trials and approval. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.59, p. 137, 2005.
- BRAGA, P.C; DAL SASSO, M.; CULICI, M.; BIANCHI, T.; BORDONI, L.; MARABINI, L. Anti- inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. *Pharmacology*, v.77, p.130–136, 2006.
- BRASILEIRO, G.F. Bogliolo: patologia geral. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- CANO, C.; BONILLA, P.; ROQUE, M.; RUIZ, J. Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Muna). *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, v.25, p.298-301, 2008.
- CARSON, C.F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanisms of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother*, v.46, p.1914-1920, 2002.
- CARVALHO, A.A.; SOUSA, C.M.M.; CHAVES, M.H. Óleo essencial de *Protium heptaphyllum*: fracionamento e identificação. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, CE; 2009.
- COSTA, A.C.B.P.; FREIRE, F.; PEREIRA, C.A.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Atividade antifúngica da *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre cepas de *Candida albicans*. *Rev Odontol UNESP*, v.38, p.111-116, 2009.
- DUFFY, C.F.; POWER, R.F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *Int J Antimicrob Agents*, v.17, p.527-529, 2001.

FATIMA, A.; MODOLO, L.V.; SANCHES, A.C.; PORTO, R.R. Wound healing agents: the role of natural and non-natural products in drug development. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v.8, p.879–888, 2008.

FOSSUM, T. W. *Small Animal Surgery*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005. 1408p.

HAESLER, G.; MAUE, D.; GROSSKREUTZ, J.; BUFLER, J.; NENTWIG, B.; PIEPENBROCK, S.; DENGLER, R.; LEUWR, M. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. *Eur J Anaesthesiol*, v.19 , p.571–579, 2002.

HASHIM, S.; ABOOBAKER, V.S.; MADHUBALA, R.K.; BHATTACHARYA, R.K.; RAO, A.R.. Modulatory effects of essential oils from spices on the formation of DNA adduct by aflatoxin B1 *in vitro*. *Nutrition and Cancer*, v.21, p.169–175, 1994.

IPEK, S.; IBRAHIM, T.; OSMAN, U.; HIKMET, K.; ESRA, K.A. Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of Pinus species by in vivo and *in vitro* experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, v.139, p.533– 540, 2012.

KARPANEN, T.J.; WORTHINGTON, T.; HENDRY, E.R.; CONWAY, B.R.; LAMBERT, P.A. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicro Chemother*, v.62, p.1031–1036, 2008.

KÖHLER, T.; PECHÉRE, J.C.; PLÉSIAT, P. Bacterial antibiotic efflux Systems of medical importance. *Cell Mol Life Sci*, v.56, p.771-778, 1999.

- KUMAR, B.; VIJAYAKUMAR, M.; GOVINDARAJAN, R.; PUSHANGADAN, P. Ethnopharmacological approaches to wound healing- exploring medicinal plants of India. *J Ethnopharmacology*, v.114, p.103–113, 2007.
- LE COINTE, P., 1934. A Amazônia Brasileira: Árvores e Plantas Úteis. Belém, Brasil. Cia. Edit. Nacional, 1947. 506p.
- Lima EM. Essential oil and triterpenes from the resin of *Protium Heptaphyllum* – chemical composition, cytotoxicity and antimutagenicity. 2012. Dissertação. Universidade Vila Velha. Vila velha. 2012.
- MARCHAND, L. L. Cancer preventive effects of flavonóides – a review. *Biomed Pharmacother*, v. 56, p. 296-301, 2002.
- MARQUES, D.D.; SARTORI, R.A.; LEMOS, T.L.G. ; MACHADO, L.L.; SOUZA, J.S.N.; MONTE, F.J.Q. *Acta Amaz*, v. 40:1, p. 227–230, 2010.
- MATOS, F.J.A. O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha. 2.ed. Fortaleza: UFC, 1997. 258p.
- MEDEIROS, D.M.; KLAHSEN, D.; RICKLEFS, K.; Differential expression of genes involved with apoptosis, cell cycle, connective tissue proteins, fuel substrate utilization, inflammation and mitochondrial biogenesis in copper-deficient rat hearts: implication of a role for Nfkb1. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.18, p. 719-726, 2007.
- MENDES, S.S.; BOMFIM, R.R.; JESUS, H.C.R; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; ESTEVAM, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; THOMAZZI, S.M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *J Ethnopharmacology*, v. 129, p.391–397, 2010.

MING, L.; FIGUEIREDO, R.; MACHADO, S.; ANDRADE, R. Yield of essential oil of and citral content in different parts of lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf.) Poaceae. *Acta Hort*, v.1, p.555–559, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, v.65, n.55, p.63, 1983.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. *Microbiologia médica*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

NIKAIDO, H. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v.33, p.1831-1836, 1989.

OLIVEIRA, F.A. *Estudo das propriedades farmacológicas da resina de Protium heptaphyllum (Aubl.) March e seus principais constituintes, mistura de α e β -amirina*. Ceará, 2005. [Monografia de Pós-Graduação em Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, FE].

ONOFRE, S.B.; FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E.D.; PRESENTI, E.; BEDNARSKI, F. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D. C. e *Baccharis uncinella* D. C. (astreraceae). *Rev Bras Farmacogn*, v.17, p.224-230, 2007.

PINTO, S.A.H.; PINTO, L.M.S.; CUNHA, G.M.A.; CHAVES M.H.; SANTOS, F.A. Anti-inflammatory effect of β , α -amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, v.16, p. 48–52, 2008a.

PINTO, S.A.H.; PINTO, L.M.S.; GUEDES, M.A.; CUNHA, G.M.A.; CHAVES, M.H. Antinoceptive effect of triterpenoid α , β -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine*, v.15 p. 630–634, 2008b

SARTORI, M.R.K. *Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de Acmela brasiliensis Spreng (Wedelia paludosa) (Asteraceae)*. Itajaí, SC,

2005. [Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade do Vale do Itajaí].

SARTORI, M.R.K.; PRETTO, J.B.; CRUZ, A.B.; BRESCIANI, L.F.V.; YUNES, R.A.; SORTINO, M.; ZACHINO, S.A.; CECHINEL FILHO, V. Antifungal activity of fractions and two compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliense*) (ASTERACEAE). *Pharmazie*, v.58, p.567-569, 2003.

SCHAETECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. *Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 642p.

SHISHODIA, S.; MAJUMDAR, S.; BANERJEE, S.; AGGARWAL, B.B. Ursolic Acid Inhibits Nuclear Factor- κ B Activation Induced by Carcinogenic Agents through Suppression of I κ B Kinase and p65 Phosphorylation: Correlation with Down-Regulation of Cyclooxygenase 2, Matrix Metalloproteinase 9, and Cyclin D1. *Cancer Res*, v.63, p.4375-4383, 2003.

SIANI, A.C.; RAMOS, M.F.S.; MENEZES-de-LIMA Jr., O.; RIBEIRO-dos-SANTOS, R.; FERREIRA, E.F.; SOARES, R.O.A.; ROSAS, E.C.; SUSUNAGA, G.S.; GUIMARÃES, A.C.; ZOGHBI, M.G.B.; HENRIQUES, M.G.M.O. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *J Ethnopharmacol*, v.66, p.57-69, 1999a.

SKRUBIS, B.G. The drying of laurel leaves. *Perf&Flav*, v.7, p.37-40, 1983.

SWEET, J.B.; BUTLER, D.P.; Increased incidence of postoperative localized osteitis in mandibular third molar surgery associated with patients using oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol*, p.518-9, 1977.

SUNTAR, I.; AKKOL, E.K.; KELES, H.; OKTEM, A.; BASER, K.H.; YESILADA, E. A novel wound healing ointment: a formulation of Hypericum perforatum oil and sage and oregano essential oils based on traditional turkish knowledge. *J Ethnopharmacology*, v.134, p.89–96, 2011.

SUNTAR, I.; TUMEN, I.; USTUN,O.; KELES, H.; AKKOL, E.K. Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of Pinus species by in vivo and in vitro experimental models. *J Ethnopharmacology*, v.139, p.533-540, 2001.

TAYLOR, J.J.; SEYMOUR, G.J.; shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol*, v.35, p9-13, 2007.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p.13.

TUMEN, I.; AKKOL, E.K.; SUNTAR, I.; KELES, H. Wound repair and anti- inflammatory potential of essential oils from cones of Pinaceae: preclinical experimental research in animal models. *J Ethnopharmacology*, v.137, p.1215–1220, 2011.

TUMEN, I.; HAFIZOGLU, H.; KILIC, A.; DONMEZ, I.E.; SIVRIKAYA, H.; REUNANEN, M. Yields and constituents of essential oil from cones of Pinaceae spp. Natively grown in Turkey. *Molecules*, v.15, p.5797–5806, 2010.

VAN BAMBEKE, F.; MICHOT, J.M.; TULKENS, P.M. Antibiotic efflux in eukaryotic cells: occurrence and impact on antibiotic cellular pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicodynamics. *J Antimicrob Chemother*, v.51, p.1067-1077, 2003.

WILLIAMS, L.R.; STOCKLEY, W.; YAN, W.; HOME, V.N. Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. *Intern J Aromatherapy*, v.8, p.30-40, 1998.

YAMADA, E.S.M.; BRITO, J.O. Análise da composição química do óleo de *Protium heptaphyllum*. In: 14º Simpósio Internacional de Iniciação Científica, Piracicaba, SP; 2006.

YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M.; GORDON, M.H.; RANEVA, V.G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry*, v.64, p.59–66, 1999.

ZHENG, J.; LIU, Q.; YANG, J.; REN, Q.; CAO, W.; YANG, J.; YU, Z.; YU, F.; WU, Y.; SHI, H.; LIU, W.; *Braz J Med Biol Res*, v.6, p. 510–515, 2012.

ANEXOS

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

Forma de apresentação de manuscritos:

- **Estrutura**

Cabeçalho: constituído por: Título do trabalho, que deve ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho; Autor(es) por extenso, indicando a(s) instituição(ões) a(s) qual(is) pertence(m) mediante números. O autor para correspondência deve ser identificado com asterisco, fornecendo o endereço completo, incluindo o eletrônico. Estas informações devem constar na margem esquerda do texto e logo após a filiação.

Resumo: deve apresentar a condensação do conteúdo, expondo metodologia, resultados e conclusões, não excedendo 200 palavras.

Unitermos: devem representar o conteúdo do artigo, evitando-se os de natureza genérica. Observar o limite máximo de 6 (seis) unitermos.

Resumo em português: deve ser apresentado junto ao resumo em inglês e ser antecedido do título do artigo em português. O conteúdo deve acompanhar o resumo em inglês.

Unitermos em português: devem acompanhar os unitermos em inglês e estar abaixo do Resumo.

Introdução: deve estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos no mesmo campo. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, nos quais tais revisões tenham sido apresentadas.

Material e Métodos: a descrição dos métodos usados deve ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho. Processos e Técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, devem ser apenas referidos por citação. Estudos em humanos e em animais devem, obrigatoriamente, fazer referência à aprovação do Comitê de Ética correspondente.

Resultados e Discussão: deverão ser apresentados de forma concisa e em ordem lógica. Tabelas ou figuras, quando possível, devem substituir o texto, na apresentação dos dados. Sempre que pertinente, fornecer as faixas, desvios padrão e indicar as significâncias das diferenças entre os valores numéricos obtidos. A discussão deve se restringir ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados, procurando, sempre que possível, relacionar sua significância em relação a trabalhos anteriores da área. Especulações que não encontram justificativa para os dados obtidos devem ser evitadas. É facultativa a apresentação desses itens em separado.

Conclusões: quando pertinentes, devem ser fundamentadas no texto.

Agradecimentos: devem constar de parágrafo à parte, antecedendo as referências bibliográficas, e ser compatíveis com as exigências de cortesia e divulgação.

Referências bibliográficas: devem ser organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT NBR-6023, ordenadas alfabeticamente no fim do artigo incluindo os nomes de todos os autores. **A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Para exemplos, consultar o site www.bcq.usp.br.**

- **Apresentação dos originais:**

Os trabalhos devem ser apresentados em lauda padrão (de 30 a 36 linhas com espaço 1,5), utilizando o programa Word for Windows. Os trabalhos, acompanhados de carta de encaminhamento assinada por todos os autores, devem ser enviados, apenas por via eletrônica.

- **Informações Adicionais:**

Citação bibliográfica: As citações bibliográficas devem ser apresentadas no texto pelo(s) nome(s) do(s) autor(es), com apenas a inicial em maiúsculo, seguidas do ano

de publicação. No caso de haver mais de três autores, citar o primeiro e acrescentar a expressão *et al.* Caso haja mais de uma citação com mesmos autores e mesmo ano de publicação, diferenciá-las com letras minúsculas junto ao ano.

Ilustrações: As ilustrações (gráficos, tabelas, fórmulas químicas, equações, mapas, figuras, fotografias) devem ser incluídas no texto, o mais próximo possível das respectivas citações. Mapas, figuras e fotografias devem ser, também, apresentados em arquivos separados e digitalizadas em formato TIF ou JPG com resolução de 300 dpi. **Cada fascículo da BJPS reproduzirá, na capa, figura escolhida de um dos trabalhos.** As tabelas devem ser numeradas consecutivamente em algarismos romanos e as figuras em algarismos arábicos, seguidos do título. As palavras TABELA e FIGURA devem aparecer em maiúsculas apenas no título ou na legenda, respectivamente. Legendas e títulos devem acompanhá-las nos arquivos separados, assim como no texto.

Nomenclatura: pesos, medidas, nomes de plantas, animais e substâncias químicas devem estar de acordo com as regras internacionais de nomenclatura. A grafia dos nomes de fármacos deve seguir, no caso de artigos nacionais, as Denominações Comuns Brasileiras (DCB) em vigor, podendo ser mencionados uma vez (entre parênteses, com inicial maiúscula) os registrados.