

**MARCELA BARBOSA D'EMERY**

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Curcuma longa* NA  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS.**

**RECIFE  
2020**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

MARCELA BARBOSA D'EMERY

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Curcuma longa* NA  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Co-orientadora:

Profa. Dra. Ligia Reis de Moura Estevão

Recife

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- D376a D'Emery, Marcela Barbosa  
AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE Curcuma longa NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS. / Marcela Barbosa D'Emery. - 2020.  
78 f. : il.
- Orientador: Joaquim Evencio Neto.  
Coorientadora: Ligia Reis de Moura Estevao.  
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2021.
1. Cicatrização. 2. Curcuma longa. 3. óleo essencial. 4. pele. I. Neto, Joaquim Evencio, orient. II. Estevao, Ligia Reis de Moura, coorient. III. Título

CDD 636.089

---

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

MARCELA BARBOSA D'EMERY

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Curcuma longa* NA  
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Aprovada em: 28/02/2020

Comissão examinadora

---

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto - Presidente

---

Profa. Dra. Lígia Reis Moura Estevão

---

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

---

Prof. Dr. Vitor Caiaffo Brito

Dedico este trabalho à minha vó Bibi.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter guiado todos os meus passos até esse momento, por ter me dado esse presente, no momento em que eu mais precisei, pela força e coragem para não desistir no meio do caminho. Obrigada Senhor por ser tão grande e generoso comigo!!!

Meu muito obrigado a minha família, aos meus pais, Gerusa e Marcelo, pelo esforço em me educar e me dar as melhores oportunidades de estudos, por me mostrarem todos os caminhos que eu tinha para escolher e principalmente por estarem ao meu lado durante a caminhada, mesmo que o caminho não fosse o que eles escolheriam. Vocês são meu porto seguro, meu modelo, meu guia, a vocês todo o meu respeito e admiração!!! Ao meu irmão, Emmanuel, por todo carinho, dedicação e empenho para que eu chegasse até aqui, você é meu protetor e protegido! Amo vocês infinitamente!

Aos meus amigos, Raissa Camila, Jefferson Medeiros e Karla Sousa, por serem ouvidos nos momentos de desespero, palavras de carinho e abraços reconfortantes, agradeço por toda paciência, amor e força que vocês me deram sempre.

À minha psicóloga, Lindervânia, por todos os momentos compartilhados, por cada grounding, respiração e exercício praticado, por cada descoberta, conflito e reflexão que esses momentos me trouxeram, por está comigo em cada passo do meu autoconhecimento.

Ao Professor Joaquim Evêncio Neto e a Professora Lígia Reis de Moura Estevão pela orientação e co-orientação, respectivamente, pela oportunidade, paciência, aconselhamento, orientação e apoio científico.

À toda a equipe de Cicatrização por toda a ajuda, apoio, estudo e dedicação. Meu obrigada especial, a Érica Bruna, Apolônia Agnes e Juliete Lira, pelo acolhimento, preocupação e por todo o suporte dado durante esses dois anos, vocês foram anjos enviados para me ajudar a concluir esse mestrado!

Ao Laboratório de Histologia Animal e a todos os alunos, funcionários e Professores que nele desenvolvem pesquisas, pelo suporte e infraestrutura

disponibilizada para a execução desse projeto, em especial a Edna e a Cedril por toda ajuda.

Ao Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara, pela disponibilidade de usar o Laboratório de Produtos Naturais e Bioquímicos para a realização da extração do óleo essencial. Ao Prof. Dr. Marcílio Wagner, pelo auxílio na realização da análise química do óleo essencial. Ao Lucas, Arthur, Ariadna, e Milena, discentes e auxiliares do Laboratório de Química, por todo auxílio e paciência.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro concedido para a realização desta pesquisa.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA), Profa. Tatiana Porto e Prof. Rinaldo Mota pelo trabalho realizado no programa, pela humanidade, dedicação, carinho e atenção despendidos a todos os alunos da Pós-graduação. À toda equipe de professores do PPGBA que se empenham em transmitir e dividir todos os seus conhecimentos e experiências com muito empenho e a todos os funcionários da UFRPE que sempre me receberam com muita simpatia, competência e acima de tudo, sempre dispostos a ajudar.

A dona Maria Helena, do Sítio Bom Mirar que permitiu a coleta do material vegetal, possibilitando assim o desenvolvimento da pesquisa. Ao Centro Acadêmico de Vitória (CAV) e ao Biotério do DFMA que disponibilizou os animais e o espaço para a parte experimental dessa pesquisa, à toda a equipe do biotério, aos seguranças, técnicos e outros funcionários que de alguma forma me ajudaram durante os meses de experimento.

à todos muito obrigada!

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”  
(Benjamin Disraeli)



## RESUMO

O processo de cicatrização é comum a todos os seres vivos. Tem como finalidade reconstituir a continuidade tecidual que foi interrompida. Diversas substâncias naturais já são utilizadas na cicatrização de feridas. Este trabalho avaliou os efeitos da pomada à base de óleo essencial das folhas frescas do Açafrão da Terra (*Curcuma longa*) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Foram utilizados 20 machos adultos, as feridas foram divididas em dois grupos: GT (feridas da direita, tratadas com pomada 10% do óleo essencial de *Curcuma longa* + veículo) e GC (feridas da esquerda, tratadas com pomada apenas com o veículo). Os animais foram submetidos a duas incisões na pele, na região torácica, nos antímeros direito e esquerdo. As feridas foram mensuradas imediatamente após o procedimento cirúrgico com auxílio de um paquímetro digital e analisadas macroscopicamente nos dias 3, 7, 14 e 21 de pós-operatório (PO). Ao final de cada período experimental foi realizada biopsia removendo toda área da ferida. Os fragmentos de pele foram processados seguindo protocolos histológicos de rotina, os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina e foram utilizados para as avaliações histomorfológicas e histométricas pela quantificação de vasos sanguíneos. Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey-Kramer ( $p < 0,05$ ). Os resultados revelaram que o óleo possui elevada quantidade  $\alpha$ -Phellandrene (33,19%), Terpinolene (29,00%) e  $\beta$ -Phellandrene (13,31%). Nossos resultados demonstraram uma ação anti-inflamatória importante deste óleo, com diminuição de crosta, diminuição de células inflamatórias e diminuição de vasos sanguíneos. Foi possível concluir que a pomada contendo óleo essencial das folhas de *Curcuma longa* a 10% auxiliou na resposta anti-inflamatória do processo cicatricial, sendo necessário novos experimentos para determinar a melhor concentração deste óleo na viabilidade do processo cicatricial.

**Palavras-chaves:** Cicatrização, *Curcuma longa*, pele, óleo essencial.

## ABSTRACT

The healing process is common to all living beings and can reconstruct the tissue heritage that was interrupted. Several natural substances are already used in wound healing. This work evaluated the effects of the ointment based on essential oil of fresh leaves of Saffron of Earth (*Curcuma longa*) on the healing of skin wounds in rats. Twenty adult males were used, as the wounds divided into two groups: GT (wounds on the right, treated with ointment 10% of the essential oil of *Curcuma longa* + vehicle) and GC (wounds on the left, treated with ointment only with the vehicle). The animals were submitted to two skin incisions, in the thoracic region, in the right and left antimers. Wounds were measured after the surgical procedure with the aid of a digital caliper and analyzed macroscopically on days 3, 7, 14 and 21 of the postoperative period (PO). At the end of each experimental period, a biopsy was performed to remove the entire wound area. The skin fragments were processed according to the basic histological protocols, the sections stained with hematoxylin and eosin, and were used for histomorphological and histometric tests to quantify blood tissues. The data were submitted to the ANOVA test complemented by the Tukey-Kramer test ( $P < 0.05$ ). The results revealed that the oil has a high amount of  $\alpha$ -Phandandrene (33.19%), Terpinolene (29.00%) and  $\beta$ -Phellandrene (13.31%). Our results demonstrated an important anti-inflammatory action of this oil, with reduced crust, decreased inflammatory cells and decreased blood vessels. It was possible to conclude that an ointment contains essential oil from *Curcuma longa* leaves with 10% of anti-inflammatory response of the healing process, being necessary new experiments to determine the best treatment of this oil

**Keywords:** Healing, *Curcuma longa*, skin, essential oil.

## SÚMARIO

SÚMARIO .....	111
<b>1. Introdução</b> .....	12
<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	14
<b>2.1 Histologia da pele:</b> .....	14
<b>2.2 Cinética cicatricial:</b> .....	17
<b>2.2.1 Fase Inflamatória:</b> .....	18
<b>2.2.2 Fase Proliferativa:</b> .....	20
<b>2.2.3 Fase de Remodelagem:</b> .....	22
<b>2.3 Óleo essencial</b> .....	22
<b>2.4 Plantas medicinais:</b> .....	25
<b>2.5 <i>Curcuma longa</i>:</b> .....	26
<b>3. Objetivos</b> .....	29
<b>3.1 Geral</b> .....	29
<b>3.2 Específicos:</b> .....	29
<b>4. Material e métodos</b> .....	29
<b>4.1 Aprovação da comissão de ética:</b> .....	29
<b>4.2 Animais e Local do Experimento:</b> .....	30
<b>4.3 Coleta de material vegetal para identificação</b> .....	30
<b>4.4 Extração do óleo e análise química</b> .....	31
<b>4.5 Preparo das formulações:</b> .....	33
<b>4.6 Procedimento cirúrgico:</b> .....	33
<b>4.7 Avaliação clínica dos animais e das feridas:</b> .....	34
<b>4.8 Avaliação do fechamento das feridas:</b> .....	34
<b>4.9 Avaliações histológicas (morfológica e morfométrica):</b> .....	35
<b>4.10 Delineamento e Análise Estatística:</b> .....	37
Referências.....	37
ARTIGO 1 .....	45
ARTIGO 2 .....	59
Considerações finais.....	78

## 1. INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização é comum a todos os seres vivos, após qualquer lesão ocorre uma sequência de reações químicas, físicas, e biológicas cuja finalidade é reconstituir a continuidade tecidual que foi interrompida (GUERRA et al., 2018). É comum didaticamente dividir a cicatrização de feridas cutâneas em três fases: Inflamação, Proliferação e Remodelagem. Essa divisão ajuda a compreender a sequência de eventos envolvidos na reparação da lesão (ROBBINS & COTRAN, 2005). É importante a busca por substâncias que ajudem nesse processo de cicatrização, tornando-o mais rápido e eficiente (GHOSH & GABA, 2013).

Sendo assim as plantas medicinais, que desde os tempos antigos são utilizadas como fonte de medicamentos para uma variedade de doenças, vêm ganhando espaço nos campos médico e veterinário (GUERRA et al., 2018). O aumento da inclusão das plantas medicinais nessas áreas está relacionada principalmente a fatores econômicos e sociais, como por exemplo, a grande disponibilidade de matéria-prima e a cultura popular relacionada ao uso da planta (GRIGOLLI et al., 2013).

Existem relatos sobre o conhecimento dos óleos essenciais desde séculos antes da era Cristã. As principais referências históricas e de utilização desses componentes estão ligadas a países orientais, entre eles, Egito, China e Índia (BARATTA et al., 1998). Esses componentes são reconhecidos atualmente por apresentarem diversas atividades biológicas, tais como, antibacteriana, antifúngica, antioxidante e cicatrizante (VITTI & BRITO, 2003).

Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas, são constituídos por elementos voláteis, que possuem composição química complexa. Estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel essencial na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000; GONÇALVES et al., 2003; SILVA et al., 2003).

Diversas substâncias naturais já são utilizadas na cicatrização de feridas cutâneas, dentre as mais conhecidas temos o mel, a própolis, as folhas

de *Aloe verae* a aroeira (ARAUJO et al., 2012; ESTEVÃO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; BRANDÃO et al., 2016).

A *Curcuma longa*, planta medicinal que tem sido alvo de diversas pesquisas nas últimas décadas (KUMAR, 2018), é nativa da Índia, porém é bastante cultivada no Brasil, devido às condições climáticas favoráveis ao seu cultivo (MATA, 2004). É uma especiaria admirada em toda a bacia mediterrânea como matéria corante e aromatizante (VAUGHN et al., 2016) e tem sido utilizada, na medicina popular, como planta medicinal para o tratamento de várias doenças, como reumatismo, sinusite e na cicatrização de feridas (AKBIK et al., 2014).

Em termos botânicos, a planta está classificada como *Curcuma longa* L. (sin. *C. domestica*) pertencente à família das *Zingiberaceae*. Em relação a sua composição química, a presença de Curcuminóides, sendo a Curcumina composto principal e responsável pela cor amarela característica dos rizomas, óleos essenciais, açúcares e proteínas (VAUGHN et al., 2016).

No estudo realizado por Priya (2012) foram encontrados cerca de 11 compostos no óleo essencial de *Curcuma longa*, sendo os principais componentes o terpinoleno (52,88%), o b-fielandreno (22,8%) e o  $\alpha$ -fielandreno (21,13%). O óleo essencial pode ser encontrado tanto nos rizomas, quanto nas folhas da planta (KUANAR et al., 2009), porém na indústria as partes mais utilizadas são os rizomas, sendo as folhas um material residual, o que gera um enorme desperdício no processamento (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Atualmente trabalhos mostram que o óleo essencial de *Curcuma longa* tem diversas propriedades, entre elas: antifúngico e antibiótico (PARVEEN, 2013), antiaflatoxigênico (FERREIRA, 2013), antioxidante (PRIYA et al., 2012), anti-inflamatório (KUMAR et al., 2018).

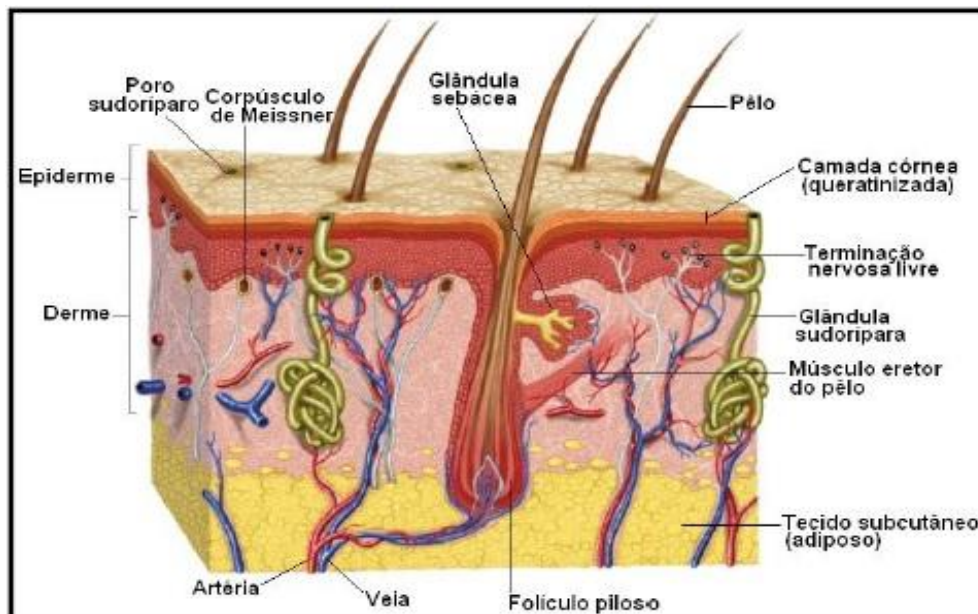
Tendo em vista as propriedades relatadas na literatura, a falta de artigos científicos na sua utilização em feridas cutâneas, e visando evitar o desperdício das folhas de *Curcuma longa* durante o processamento industrial, propomos essa pesquisa, que visa contribuir para a descoberta, registro e patenteamento de novos produtos com propriedades cicatrizantes, como contribuição a saúde humana e veterinária.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histologia da pele:

O sistema tegumentar recobre todo o corpo, tem como principais funções: termorregulação, síntese de vitamina D, percepção sensorial, excreção e equilíbrio hídrico e proteção contra o atrito, a perda de água, a invasão de microrganismos e a radiação ultravioleta (MONTANARI, 2016). A pele juntamente com seus anexos, pelos, unhas, glândulas sebáceas e sudoríparas, faz parte do sistema tegumentar e é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 16% do peso corporal (JUNQUEIRA, 2017). Ela é composta pelas camadas: epiderme, que funciona como uma barreira para o ambiente externo, e pela camada mais profunda, derme, que é composta de tecido conjuntivo, e fornece a pele suas propriedades mecânicas (fig. 1) (ISSAC et al., 2010).

Figura 1 - Anatomia da pele.



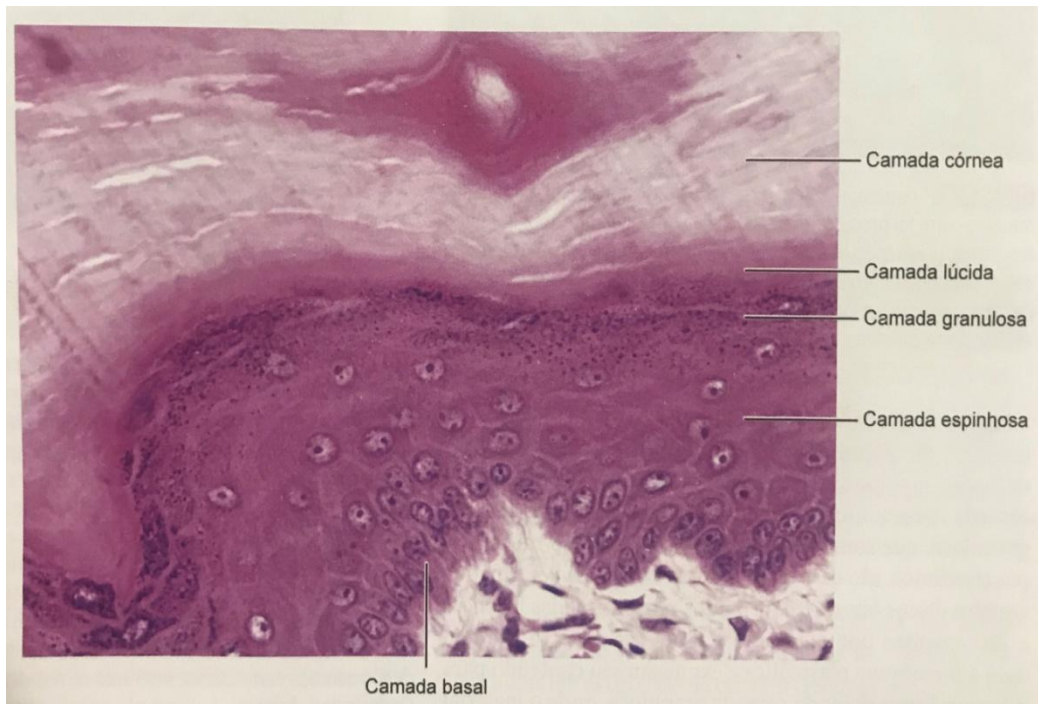
Fonte: JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017.

A epiderme é a camada mais externa. Composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado de células mortas na superfície.

Desenvolve-se da superfície do ectoderma do embrião, as camadas de tecido conjuntivo são provenientes de um tecido conjuntivo frouxo embrionário indiferenciado, o mesênquima (COCHARD, 2014). A estrutura da epiderme é bastante dinâmica e as células estão frequentemente se dividindo e amadurecendo à medida que migram em direção à superfície da pele (ROBERTSON et al., 2011). Podemos identificar cinco estratos: o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso, estrato lúcido e o estrato córneo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017) (fig. 2).

Na camada mais interna se encontra o estrato basal ou germinativo, que é rico em células-tronco, contém filamentos intermediários de queratina e ancora os melanócitos na produção de queratinócitos e células de Merkel. As células de Merkel são semelhantes aos melanócitos ao microscópio de luz, mas são mais escassas, na base da célula, formam junções sinápticas com terminações nervosas sensitivas, que são receptores táteis e são abundantes nas pontas dos dedos e na base dos folículos pilosos. O estrato espinhoso pode ser reconhecido por tonofilamentos, queratinócitos unidos por desmossomas, que são responsáveis pela resistência da epiderme a várias forças, e pelas células de Langerhans, responsáveis por fagocitar e processar os antígenos estranhos na pele, os queratinócitos dessa camada secretam grânulos pequenos cujo conteúdo é uma mistura de lipídeos que reveste a célula, formando uma camada hidrofóbica contínua na pele, servindo como uma barreira contra a perda de água. No estrato granuloso apresenta grânulos basófilos de querato-hialina e existe nesse estrato terminações nervosas livres, que funcionam como receptores táteis de temperatura e de dor. O estrato lúcido é composto por queratinócitos pavimentoso anucleado, com citoplasma repleto de queratina compactada. O estrato córneo é mais evidente na pele espessa, é constituído por células mortas. Os estratos conferem proteção contra o atrito, estiramento, pressão, invasão de microrganismos e a perda de água (MONTANARI, 2016; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017).

**Figura 2** – Fotomicrografia de corte de pele espessa, onde podem ser observadas as várias camadas da epiderme: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea.



Fonte: JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017.

A derme é a camada mais interna constituída por tecido conjuntivo propriamente dito, vasos sanguíneos, terminações nervosas, glândulas, folículos pilosos e vários tipos celulares diferentes, tais como os fibroblastos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos. É subdividida em: derme papilar e derme reticular, ambas contêm fibras elásticas, o que dá elasticidade à pele (Fig. 3). A derme papilar contém evaginações chamadas de cristas dérmicas ou papilas dérmicas e é constituída por tecido conjuntivo frouxo, já a derme reticular, recebe esse nome devido a disposição enovelada dos feixes de fibras colágenas que estão presentes nessa região, é constituída de tecido conjuntivo denso não modelado e representa a maior parte da derme (KÜHNEL, 1991; JONES et al., 2000; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017). A tela subcutânea não é classificada como parte da pele, mas possibilita o apoio da mesma para órgãos subjacentes, está abaixo da derme, e recebe o nome de hipoderme, apresenta em sua composição tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo (APPLEGATE, 2012).



**Figura 3** – Fotomicrografia de corte de pele, onde podem ser observadas as camadas papilar e reticular da derme.



Fonte: JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2017.

## 2.2 Cinética cicatricial:

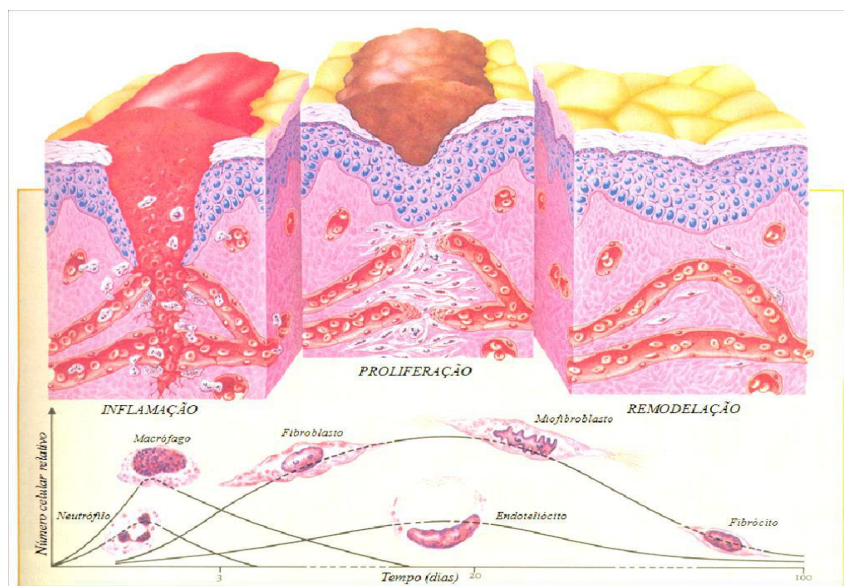
O corpo possui a capacidade de substituir células lesadas ou mortas e assim promover reparos nos tecidos após uma lesão, esse processo é chamado de cicatrização e é uma função fisiológica natural do corpo e se inicia logo após qualquer ferimento, com o objetivo de restaurar a continuidade dos tecidos lesionados (COTRAN et al., 2001; WILLIAMS & MOORES, 2013). O estudo sobre esse processo teve início ainda na Antiguidade, tendo como registros mais antigos, manuscritos egípcios que datam de 3.000-2.500 A.C. (SILVA et al., 2010).

Na restauração de feridas cutâneas estão envolvidos diversos eventos macroscópicos, microscópicos e bioquímicos, tais como, a formação de coágulo, deposição de fibrina e angiogênese; e tipos celulares diferentes, tais como, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais. Esse

processo é dinâmico e as fases são sobrepostas, porém pode ser dividido, didaticamente, em três etapas: inflamação, proliferação e remodelagem (QUEIROZ et al., 2010; WILLIAMS & MOORES, 2013) (fig.4).

São consideráveis os avanços na tecnologia molecular, e eles têm reforçado a compreensão da cinética cicatricial, é por meio do conhecimento do processo envolvido, que o profissional deve ser capaz de avaliar o papel que pode desempenhar na cicatrização das feridas e entender as opções de tratamento que podem modular o processo cicatricial (WILLIAMS & MOORES, 2013).

**Figura 4** - Representação gráfica das três fases do processo de cicatrização.



Fonte: ISAAC et al., 2010.

### 2.2.1 Fase Inflamatória:

A primeira fase, inflamação, ocorre imediatamente após a lesão, que em muitos casos leva a uma ruptura dos vasos e extravasamento de seus constituintes, e é caracterizada por dois processos que buscam limitar a lesão tecidual. A hemostasia, que ocorre concomitante ao estímulo lesivo, por influência nervosa e pela ação de mediadores originados da desgranulação de mastócitos, e é caracterizada pela vasoconstrição, formação de plug plaquetário e formação de plug de fibrina. E a resposta inflamatória aguda, que

é promovida por mediadores bioquímicos que aumentam a permeabilidade vascular, beneficiando a exsudação plasmática e a passagem de elementos celulares para a área da ferida, sendo assim, crucial para proteger o corpo contra organismos invasores no local da lesão (WILLIAMS & MOORES, 2013).

O processo começa com a ativação plaquetária e iniciação da cascata de coagulação, ocorrendo assim uma vasoconstrição e logo se inicia a deposição de plaquetas, resultando na formação de um coágulo de fibrina, que irá tamponar a lesão de forma provisória estimulando a liberação de vários fatores de crescimento, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento endotelial (VEGFs). O coágulo funciona também como uma matriz provisória para a migração inicial de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos T) para o local da ferida, elas vão realizar a fagocitose, a remoção de bactérias, outros materiais estranhos e detritos celulares, essas células também secretam citocinas e fatores de crescimento. Em resposta a produção endotelial aumenta progressivamente a permeabilidade vascular às células migrantes e substâncias biologicamente ativas, como as citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, por esta razão essa fase pode ser caracterizada pela presença de exsudado, vermelhidão e edema (ROBBINS & COTRAN, 2005; ISAAC et al., 2010; BIELEFELD et al., 2013; SNYDER et. al., 2016).

O plug de fibrina não atua apenas como um plug hemostático e como barreira imediata à infecção e perda de fluidos, mas também fornece um substrato para a organização inicial do processo cicatricial. Ele estabiliza as bordas da ferida e a matriz extra celular (MEC) provisória fornece a ela alguma estabilidade. A superfície do plug irá secar e formar uma crosta que protege a ferida, evita uma nova hemorragia e permite que a cicatrização continue por baixo (WILLIAMS & MOORES, 2013).

A primeira linha de defesa celular são os neutrófilos, significativamente predominantes na ferida nas primeiras 24 e 48 horas, através da fagocitose e pinocitose, eles eliminam micro-organismos. Seguido por monócitos que se infiltram e se diferenciam em macrófagos, eles são responsáveis pelo debridamento da ferida iniciado pelos neutrófilos, secreção de citocinas e fatores de crescimento e contribuem significativamente para angiogênese, fibroplasia e síntese da MEC (TOWNSEND, 2011).

### 2.2.2 Fase Proliferativa:

A fase proliferativa é caracterizada principalmente pelos processos de fibroplasia, angiogênese, granulação e reepitelização, começam aproximadamente cinco dias após a lesão e pode continuar por duas semanas, essa fase se inicia com a ativação do sistema complemento (DE NARDI et al., 2004). A transição da fase inflamatória para a fase proliferativa é marcada pela invasão de fibroblastos e pelo acúmulo de colágeno na ferida (WILLIAMS & MOORES, 2013). Os fibroblastos surgem por volta do segundo e terceiro dia após o trauma e são as principais células envolvidas na cicatrização, tendo como principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular. Essas células são os principais componentes do tecido de granulação e após a influência dos fatores de crescimento e demais mediadores, derivados especialmente dos macrófagos, são ativadas e migram das margens da ferida para o seu centro (BLANES, 2004; BALBINO et al., 2005).

Nessa fase a derme é restaurada pela invasão e proliferação de fibroblastos que sintetizam e secretam proteínas da MEC, facilitada pelo fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento de queratinócitos (KGFs) e TGF $\alpha$ , ocorrendo também à liberação e ativação de fatores de crescimento, como o TGF-*b*1. Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. Com a evolução do processo, a MEC, que inicialmente era composta por proteínas derivadas de plaquetas e do plasma, passa por modificações, ocorrendo à migração e ativação de macrófagos e fibroblasto para a região, juntamente com os vasos neoformados, permitindo assim que os componentes da nova matriz sejam produzidos localmente. (EPSTEIN et al., 1999; BALBINO et al., 2005; MONTANARI, 2016).

Queratinócitos migram das bordas da ferida entre a derme e a fibrina facilitada pela produção de collagenase e outras proteases na epiderme, os fibroblastos migram, proliferam e produzem MEC no leito da ferida, resultando em granulação precoce e formação tecidual, o tecido de granulação é

enriquecido com mais fibras de colágeno e começa a adquirir a aparência característica da cicatriz. (SNYDER et. al., 2016). A granulação é a formação de um tecido composto de capilares, colágeno e proteoglicanos. Nesta fase, a formação capilar resulta da liberação de fatores angiogênicos secretados pelos macrófagos que estimulam a proliferação de células endoteliais dos vasos sanguíneos. A neovascularização da região ocorre paralelamente com o processo de fibroplasia e é essencial neste estágio porque permite a troca de gases e nutrição das células metabolicamente ativas. A angiogênese é resultado de fatores secretados por macrófagos e mastócitos que estimulam a proliferação de células endoteliais a partir de vasos sanguíneos (BALBINO et al., 2005).

Uma ferida aberta necessita ser preenchida e para isto são existem duas estratégias diferentes. A primeira ocorre por um fenômeno denominado de “efeitos de vizinhança livre”, onde a própria natureza da ferida proporciona um estímulo para a migração e proliferação das células a partir das suas margens. Na segunda as margens da ferida se movem uma em direção à outra, como se houvesse uma força de tração invisível, isto ocorre devido a diferenciação de alguns fibroblastos das margens em miofibroblastos, portanto, para fibroblastos com capacidade contrátil.

Nas etapas iniciais da cicatrização a inexistência de um substrato adequado para o processo dificulta o processo mitótico. A MEC, que no início era composta principalmente por proteínas derivadas de plaquetas e do plasma, passa por modificações em sua composição. A migração e ativação de macrófagos e fibroblastos para a região, junto à presença de vasos neoformados, permitem que os componentes da nova matriz passem a ser localmente produzidos principalmente por estas células. Os fibroblastos passam a depositar grandes quantidades de fibronectina que, basicamente serve para a fixação da própria célula. Outra substância produzida em grande quantidade neste segundo estágio é o ácido hialurônico, que apresenta facilidade de se ligar à água, auxiliando assim na resistência do tecido à compressão. Estas duas substâncias predominam na matriz durante as primeiras fases do reparo, visto que esta combinação propicia um microambiente eficiente para a movimentação das células, necessárias nesta etapa. À medida que o processo de cicatrização avança, a concentração de

ácido hialurônico diminui e aumenta a síntese de proteoglicanos, essa modificação na composição da MEC favorece a fixação e imobilidade das células favorecendo a diferenciação delas, a medida que a lesão vai sendo coberta pelas células epidermais é acionado o mecanismo de inibição por contato e as células passam a apresentar fenótipos mais maduros (DE NARDI et al., 2004; BALBINO et al., 2005).

No fim desta fase, o leito da ferida está completamente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida e a rede linfática está sendo regenerada. O tecido de granulação é lentamente enriquecido com mais fibras colágenas o que começa a dar à região da ferida a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa (BALBINO et al., 2005).

### **2.2.3 Fase de Remodelagem:**

A terceira fase, remodelagem, ocorre, aproximadamente, a partir do 21º dia em feridas pequenas e pode durar meses, durante essa fase a cicatriz ganha resistência e volume. Nessa fase a densidade celular e a vascularização da ferida diminuem e há a maturação das fibras colágenas, diminuindo assim a deposição de colágeno. O número de ligações cruzadas feitas entre os monômeros desta substância, juntamente a esses processos fornece a ferida um tipo de colágeno mais resistente, onde o colágeno tipo III, que está presente em maior quantidade no tecido de granulação, sofre degradação, dando lugar à produção fibroblástica de colágeno tipo I. Esses mecanismos promovem o remodelamento do tecido cicatricial formado na fase anterior, a fim de aumentar a resistência do tecido e diminuir a espessura da cicatriz. Todos os elementos celulares envolvidos no processo, inclusive fibroblastos, diminuem e a diminuição progressiva de vasos neoformados promovem a regressão endotelial. Durante essa fase a cicatriz vai progressivamente alterando sua tonalidade, ficando mais pálida (ROBBINS & COTRAN, 2005; WILLIAMS & MOORES, 2013).

## **2.3 Óleo essencial**

A história do desenvolvimento das civilizações oriental e ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais, na medicina, no controle de

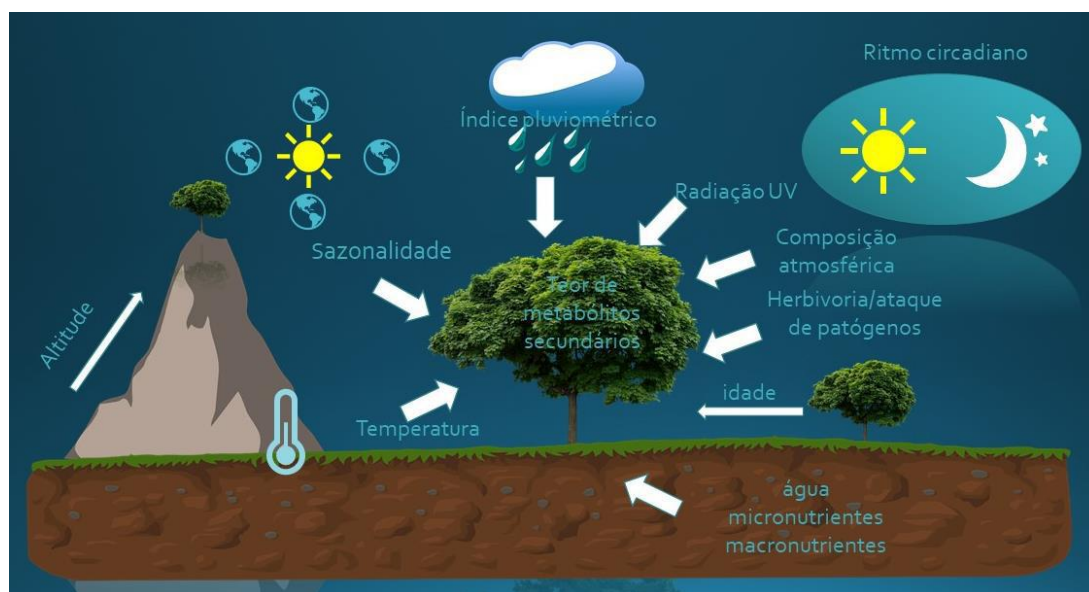
pragas e em mecanismos de defesa, existem relatos sobre o conhecimento dos óleos essenciais desde séculos antes da era Cristã. As principais referências históricas e de utilização desses componentes estão ligadas a países orientais, entre eles, Egito, China e Índia (BARATTA et al., 1998; MACHADO, 2011). Os romanos disseminaram o uso de plantas aromáticas em banhos, chegando a ter mais de 1000 casas de banho por volta de 753 a.C. (SILVA, 1998).

A prospecção fitoquímica tem como objetivo o estudo dos princípios vegetais para detectar os principais componentes presentes nas plantas; os grupos dos metabólitos secundários podem ser identificados por meio dessa análise (DA SILVA et al., 2010).

Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas, são constituídos por elementos voláteis, que possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos, monoterpênicos, cetonas, fenóis, ésteres e fenilpropanoides. Eles são responsáveis pelo cheiro e sabor típicos de uma planta, mas também estão diretamente relacionados à atração de polinizadores, proteção contra parasitas e patógenos, e várias outras funções necessárias para a sobrevivência do vegetal. O ambiente em que uma planta se desenvolve pode interferir no desenvolvimento e concentrações de seus princípios ativos, fatores bióticos, como patógenos e parasitas e fatores ambientais como fotoperíodo, temperatura, umidade, precipitação, condições do sol, podem influenciar a biossíntese desses óleos. A produção de metabólitos secundários também é influenciada pela estação do ano em que a planta é coletada, havendo variação na quantidade e natureza dos constituintes ativos durante o ano (Fig. 5) (SIQUI et al., 2000; GONÇALVES et al., 2003; SILVA et al., 2003; DA SILVA et al., 2016).

Outra característica importante dos óleos essenciais é a volatilidade de seus constituintes. Devido a essa propriedade o processo de extração desse composto vegetal geralmente é o arraste do material com vapor de água (CRAVEIRO, 1992).

**Figura 5** — Fatores que alteram quantitativa e qualitativamente os metabólitos secundários.



Esses compostos podem ser encontrados em qualquer tecido vivo das plantas, em sua maioria, concentrados na casca, sementes, flores, folhas e nos rizomas. Os constituintes que aparecem em maior percentual são conhecidos como componentes principais ou majoritários (ARAÚJO, 1995; VITTI & BRITO, 2003).

Os óleos essenciais apresentam um valor comercial estável e sua produção é bem explorada em países menos desenvolvidos. Em virtude da agricultura primária envolvida no cultivo, por sua vez, os países mais desenvolvidos importam estes óleos como matéria prima barata e agregam valor através de processos de purificação, destilação, isolamento de constituintes e modificações químicas (CRAVEIRO, 1992).

Os óleos essenciais apresentam diferentes propriedades biológicas, como a ação larvicida (RAJKUMAR et al., 2010), atividade antioxidante (WANNES, 2010), ação analgésica e anti-inflamatória (MENDES et al., 2010), fungicida (CARMO et al., 2008) e atividade antitumoral (SILVA, 2008).

Essas propriedades são consideradas de grande interesse para as indústrias agrícolas, farmacêuticas e cosméticas desde que o uso de aditivos naturais ganhou importância como tendência na substituição de substâncias sintéticas (MACHADO, 2011).



## 2.4 Plantas medicinais:

Desde muito cedo civilizações e culturas antigas constataram a presença de princípios curativos nos vegetais, e por um longo período as plantas eram o principal recurso terapêutico utilizado para o tratamento de várias doenças em seres humanos (OLIVEIRA, 2016).

Com o avanço da biotecnologia foi possível promover grandes avanços em modelos de drogas sintéticas, e assim contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos e patentes, porém os produtos naturais ainda continuam sendo a maior fonte para obtenção de novas substâncias e compostos ativos (DE OLIVEIRA, 2001). Devido ao crescimento histórico do uso de plantas medicinais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a fitoterapia como uma alternativa terapêutica no tratamento de doenças. Essa linha de tratamento vem crescendo nos últimos anos, o que pode ser associado aos elevados custos dos medicamentos da indústria farmacêutica e também a valorização dos produtos naturais pelos meios de comunicação (MONTEIRO, 2017).

Atualmente modelos experimentais que incluem plantas medicinais vêm crescendo devido a diversos fatores econômicos e sociais, entre eles, o fato delas serem um recurso altamente disponível e uma fonte ilimitada de substâncias com atividades potencialmente ativas. Também a cultura popular relacionada ao uso de plantas para o tratamento de várias condições patológicas, justifica pesquisas científicas que comprovem sua efetividade (BARACHO et al., 2009; ESTEVÃO et al., 2013).

A utilização de plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas é mencionada desde a pré-história, onde eram empregados para o cuidado humano. Algumas plantas e substâncias são popularmente reconhecidas por suas propriedades cicatrizantes, como por exemplo, as folhas de *Aloe vera*, o mel e a própolis. Faleiro (2009) e Segundo (2007) demonstraram, por meio da aplicação do extrato glicólico de *Aloe vera* e extrato hidroalcoólico de própolis em feridas cutâneas abertas em *Rattus norvegicus*, importante atividade cicatrizante.

## 2.5 *Curcuma longa*:

A *Curcuma longa* é uma planta medicinal que tem sido alvo de diversas pesquisas nas últimas décadas (KUMAR, 2018). Nativa da Índia é bastante cultivada no Brasil devido às condições climáticas favoráveis ao seu cultivo (MATA, 2004). Essa planta desenvolveu relação com a expansão da civilização, sendo hoje encontrada apenas em regiões de cultivo humano, sem relato de espécimes crescendo em locais selvagens (SUETH-SANTIAGO et al., 2014). Ela é uma especiaria admirada em toda a bacia mediterrânea como matéria corante e aromatizante (PINTÃO et al., 2008) e tem sido utilizada, na medicina popular, como planta medicinal para o tratamento de várias doenças, como reumatismo, sinusite e cicatrização de feridas (AKBIK et al., 2014).

Em termos botânicos, a planta está classificada como *Curcuma longa* L. (sin. *C. domestica*) pertencente à família das *Zingiberaceae*. É um arbusto perene, com uma haste curta, folhas grandes oblongo-lanceoladas e oblíquo-nervadas (Fig. 6), que expelem um perfume agradável quando amassadas, apresenta um rizoma central piriforme, arredondado, com ramificações secundárias laterais, compridas, também tuberizadas com coloração castanho-amarelada (CHATTOPADHYAY et al., 2004; GRIGOLLI et al., 2013).

**Figura 6** – Foto das folhas e flor de *Curcuma longa*



Fonte: Arquivo pessoal

Em relação a sua composição química, estudos mostram a presença de Curcuminóides, sendo a Curcumina composto principal e responsável pela cor amarela característica dos rizomas, óleos essenciais, açúcares e proteínas (PINTÃO et al., 2008). O óleo essencial pode ser encontrado tanto nos rizomas, quanto nas folhas da planta (KUANAR et al., 2009), porém na indústria as partes mais utilizadas são os rizomas, sendo as folhas um material residual, o que gera um enorme desperdício no processamento (SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Araujo et al. (2016) realizaram em seus estudos uma análise fotoquímica e termogravimétrica (TGA) do óleo essencial dos rizomas de *C. longa*, identificando um composto amarelado, solúvel em compostos orgânicos polares, com uma curva TGA mostrando alta estabilidade térmica até 90° C e como principais componentes, representando cerca de 80% do total, ar-turmerona,  $\alpha$ -turmerona e  $\beta$ -turmerona, enquanto a Curcumina representa cerca de 1%. Já no estudo realizado por Priya (2012) foram encontrados cerca de 11 compostos no óleo essencial das folhas de *Curcuma longa*, sendo os principais componentes o terpinoleno (52,88%), o b-sesquifelieteno (22,8%), o  $\alpha$ -fielandreno (21,13%) e a curcumina com menos de 1%.

Diversos trabalhos mostram que o óleo essencial de *Curcuma longa* tem várias propriedades, entre elas: antifúngico e antibiótico (PARVEEN, 2013), antiaflatoxigênico (FERREIRA, 2013), antioxidante (PRIYA et al., 2012), anti-inflamatório (KUMAR et al., 2018). Apesar de ser encontrada em menor proporção comparada com os outros metabólicos, é atribuída a Curcumina as principais propriedades biológicas da planta. Esse componente foi isolado pela primeira vez por Vogelem 1815 e teve sua estrutura definida por Milobedzka e Lampe em 1910 e logo passou a ser alvo de diversos grupos de pesquisas, por apresentar diversas atividades biológicas (SUETH-SANTIAGO, 2014).

## **2.6 Fitoterápicos e princípios de manipulação de pomadas:**

Planta medicinal é a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2014). Fitoterápico pode ser definido como: “Produto obtido de matéria prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico podendo ser simples, quando o

ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal”, segundo a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 26, de 13 de Maio de 2014 da ANVISA.

As plantas medicinais vêm ganhando espaço nos campos médico e veterinário (GUERRA et. al., 2018). O aumento dessa inclusão nessas áreas está relacionado principalmente a fatores socioeconômicos, como, a disponibilidade de matéria-prima e a cultura popular relacionada ao uso da planta (GRIGOLLI et. al., 2013).

Entre os anos de 2013 e 2015, a busca por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) obteve crescimento de 161%, conforme dados do Ministério da Saúde. O órgão federal possui um projeto, desde 2012, com o objetivo de fortalecer a produção, principalmente a oferta de fitoterápicos aos usuários do SUS, com isso o ministério já investiu mais de R\$ 30 milhões em 78 projetos com plantas medicinais e fitoterápicos (PORTAL BRASIL, 2016).

As pomadas são formas farmacêuticas semissólidas, para aplicação na pele ou em membranas mucosas que consiste de solução ou dispersão de um ou mais princípios ativos em baixas proporções em uma base adequada, usualmente não aquosa, segundo definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2012).

De acordo com o Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira, na escolha da base para incorporação do fármaco ou outros princípios ativos devem ser considerados o objetivo da formulação, o efeito terapêutico desejado, o local de administração, as propriedades físico-químicas do fármaco destinado à incorporação, tais como solubilidade, pH, compatibilidade química com os demais componentes da fórmula e a estabilidade (BRASIL, 2012).

A combinação de vaselina e glicerina tem como resultado uma mistura de excipientes oleosos e aquosos, promovendo um efeito oclusivo para penetrar na pele, melhorando a absorção dos princípios ativos em camadas mais profundas do tecido e apresentam função protetora e emoliente, protegendo o local da cicatrização, que normalmente é sensível por estar agredido (VIEGAS et al., 2001; BARROS et al., 2009).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar o processo de reparo tecidual de feridas cutâneas em ratos tratados com fitoterápico contendo óleo essencial extraído das folhas frescas de *Curcuma longa* em pomada a 10%.

#### **3.2 Específicos:**

- Extrair o óleo essencial das folhas de *Curcuma longa* e realizar teste fitoquímico para determinar compostos bioativos;
- Determinar o perfil temporal de fechamento das feridas cutâneas em ratos tratados com fitoterápicos pela mensuração da área e cálculo de contração da ferida utilizando paquímetro digital, nos dias 3, 7, 14 e 21 de Pós-Operatório (PO);
- Avaliar morfologicamente as feridas cutâneas nos dias 3, 7, 14 e 21 dias através de escores dos parâmetros crosta, inflamação, vascularização e epitelização.
- Avaliar morfometricamente a epitelização pela mensuração do comprimento da língua epitelial das feridas, nos dias 3 e 7 de PO;
- Analisar a área de tecido de granulação no 3º e 7º dia de PO;
- Avaliar morfometricamente nos dias 3, 7, 14 e 21 de PO o processo inflamatório, regenerativo e cicatricial nas feridas cutâneas de ratos tratados com fitoterápicos pela contagem de vasos sanguíneos utilizando técnicas de coloração por Hematoxilina-eosina.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1 Aprovação da comissão de ética:**

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE para análise do projeto de pesquisa, licença de nº 009/2020.

#### **4.2 Animais e Local do Experimento:**

O experimento foi realizado no biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Foram utilizados 20 ratos *Wistar* albinos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso corporal variando de 250 a 300g, com 90 dias de idade e provenientes do Biotério do DMFA. Foram mantidos em caixas individuais, em ambiente com temperatura de 23 a 25 °C e ciclo claro/escuro controlados de 12 em 12 horas, com ração e água à vontade.

Em cada animal foram realizadas duas incisões de pele, na região dorsal com uso de punch 0,8 mm, uma no antímero direito e uma no antímero esquerdo. Foram divididos em dois grupos: Grupo controle (GC) – feridas lado esquerdo – Feridas tratadas apenas com o veículo e Grupo tratado (GT) – feridas lado direito- feridas tratadas com pomada contendo óleo essencial das folhas frescas de *Curcuma longa* em pomadas a 10%. As feridas foram avaliados aos 3, 7, 14 e 21 dias de PO.

Ao término do experimento os animais foram submetidos à eutanásia com aprofundamento do plano anestésico, utilizando cetamina (80 mg/kg IM), cloridrato de xilazina (20 mg/kg IM) e tiopental sódico (75 mg/kg IP), preparados, congelados e descartados segundo as exigências dos princípios éticos para trabalhos experimentais do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) – Brasília, DF, 2013b.

#### **4.3 Coleta de material vegetal para identificação**

A coleta foi realizada entre os meses de Maio e Junho de 2019, no período da manhã, no Sítio Bom Mirar, na BR-408, Km 100, Penedo de Baixo, Pernambuco. O índice pluviométrico da região foi de 194.7mm em Maio e 358.3mm em Junho, de acordo com dados do IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco). O solo da região é encharcado rico em matéria orgânica, com coloração escura. Todos os exemplares colhidos apresentavam altura maior que 40cm; a planta apresenta um ciclo de colheita de aproximadamente 150 dias, onde ocorre à floração e as partes aéreas da planta secam.

O material coletado foi encaminhado ao Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho – PEUFR, para identificação e registro, realizando o

depósito da exsicata do material botânico e catalogação. O material está registrado com o N<sup>o</sup> de verificação: 54.924.

#### 4.4 Extração do óleo e análise química

O processo de extração do óleo essencial de folhas de *Curcuma longa* foi realizado através da técnica de hidrodestilação, utilizando o aparelho Clevenger (Fig. 6). Após a coleta, as folhas foram levadas ao Laboratório de Produtos Naturais e Bioquímicos do Departamento de Química da UFRPE, onde foram pesadas (350g), lavadas, trituradas e colocadas em balão com capacidade de 5L, contendo água destilada. O balão foi acoplado ao Clevenger e a extração foi realizada pelo período de duas horas. A partir da massa obtida na extração e da massa úmida do material vegetal, o teor do óleo essencial extraído foi calculado pela equação sugerida por Pimentel et al. (2006):

$$TO = \text{Móleo} / \text{Mfolha} \times 100$$

onde TO se refere ao teor de óleo; Móleo corresponde à massa do óleo, Mfolha corresponde à massa fresca das folhas. O resultado foi expresso em % (p/p) (RAGAGNIN, 2013). A mistura foi submetida à técnica de hidrodestilação num aparelho Clevenger (Fig. 7).

**Figura 7** – Liquidificador (A); Material vegetal processado (B); Aparelho Clevenger utilizado para a hidrodestilação (C).



Fonte: Arquivo pessoal

O hidrolato foi coletado e o óleo foi extraído da fase aquosa por partição, com hexano destilado. Foi adicionado sulfato de sódio anidro à fase orgânica, como agente secante. A fase orgânica foi filtrada e o hexano removido em

evaporador rotativo a vácuo a 40 °C e 27 rpm (Fig. 8). O óleo obtido foi armazenado em recipiente de vidro âmbar, bem fechado e mantido acondicionado em freezer a uma temperatura de -20 °C. para posterior utilização em experimentos.

**Figura 8** – Rota-evaporador utilizado para separa o hexano destilado do óleo essencial de *Curcuma longa*.



Fonte: Arquivo pessoal

Após a extração o óleo foi analisado no Centro de Apoio a Pesquisa (CENAPESQ) da UFRPE, por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM) (Fig. 9).

A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial foi realizada por CG-EM da PerkinElmer utilizando-se uma coluna de capilaridade com sílica (30m x 0,25mm x 0,25m). A temperatura da coluna foi programada para 60 °C até 240 à 3 °C/min. As temperaturas do injetor e detector foram de 240 °C e 280 °C, respectivamente. O gás de arraste foi o hélio, fluxo de 1,5 mL/min, (1:50). Os espectros de massa foram obtidos a 70 eV por IE. A velocidade de leitura de 0.5 scans<sup>-1</sup> de m/z 40 a 650. O óleo essencial foi analisado por CG-EM, e a identificação foi feita com base na comparação dos índices de retenção (VAN DEN DOLL & KRATZ, 1963), bem como por comparação computadorizada do espectro de massa obtido com aqueles contidos na biblioteca de espectro de massas do NIST do conjunto de dados CG-EM (ADAMS, 2007).



**Figura 9 -** Cromatográfico gasoso acoplado à espectroscopia de massas (CG-EM)



Fonte: Arquivo pessoal

#### **4.5 Preparo das formulações:**

Foram preparadas formulações teste e controle, com base de vaselina e glicerina. A formulação teste foi constituída pelo óleo essencial das folhas frescas do Açafrão da terra (*Curcuma longa*) na concentração de 10% incorporado ao veículo (vaselina 80% e glicerina 20%). A formulação controle foi constituída apenas com o veículo da pomada teste (vaselina 80% e glicerina 20%). As pomadas foram manipuladas no Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

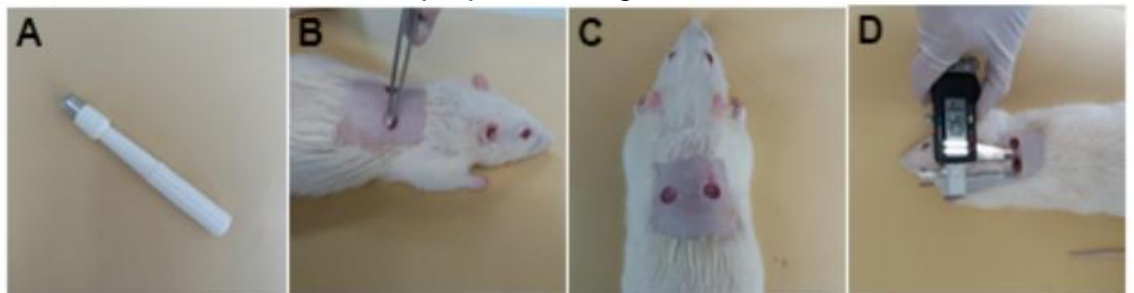
Durante o tratamento foi dispensado, em cada ferida, 0,2 mg, de acordo com o a divisão dos grupos, garantindo que a quantidade de pomada utilizada fosse igual para todos os animais. Uma seringa de 1 mL foi utilizada na dispersão (sendo utilizada uma para cada animal), garantindo assim, um processo limpo.

#### **4.6 Procedimento cirúrgico:**

Para a realização da ferida cirúrgica foi feita uma anestesia dissociativa utilizando cloridrato de xilazina a 2% e cloridrato de cetamina a 10% administrado por via intramuscular nas doses de 20mg/kg e 100mg/kg respectivamente. Depois de anestesiados os animais foram posicionados em decúbito ventral e submetidos à higienização, com clorexidina 2%, antes e depois da tricotomia das regiões torácica dorsolateral direita e esquerda. Com

auxílio de um punch com 0,8 cm de diâmetro foram realizadas incisões de pele e tela subcutânea no antímero direito e esquerdo, com distância mínima de 1,5 cm, ficando exposta a fáscia muscular adjacente. Após a mensuração da área, cada falha cutânea recebeu o tratamento de acordo com a metodologia estabelecida (Fig. 10).

**Figura 10** - Criação de feridas cutâneas em ratos. (A) Punch para biópsia de 8 mm de diâmetro. (B e C) remoção de dois fragmentos da pele dorsal. (D) medição da área da ferida usando um paquímetro digital.



Fonte: Estevão et al. (2019)

#### 4.7 Avaliação clínica dos animais e das feridas:

As avaliações clínicas foram realizadas com 24 horas após a cirurgia e diariamente, observando-se o estado geral dos animais. Avaliou-se a presença de hiperemia, edema, secreção, prurido, crosta, contração, tecido de granulação e tecido cicatricial.

#### 4.8 Avaliação do fechamento das feridas:

A mensuração da área das feridas ao longo do experimento foi feita com o auxílio de um paquímetro digital para o acompanhamento da cinética de fechamento das mesmas, utilizando-se a seguinte fórmula para determinação da área de uma elipse:  $[(\text{diâmetro maior}/2) \times (\text{diâmetro menor}/2) \times \text{Pi}]$ , onde Pi é aproximadamente igual a 3,14. A fim de normalizar os dados, os resultados foram expressos como porcentagem de fechamento relativo ao tamanho original da ferida, utilizando-se a seguinte fórmula:  $[1 - (\text{área da ferida}) / (\text{área original da ferida}) \times 100]$ . As medidas foram feitas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 após o procedimento cirúrgico.

#### 4.9 Avaliações histológicas (morfológica e morfométrica):

As avaliações histológicas foram realizadas no 3º, 7º, 14º e 21º dia de pós-tratamento. Após realização de anestesia os fragmentos de pele foram obtidos através de incisão elíptica, abrangendo a pele íntegra e todo o tecido em processo de cicatrização. Em seguida os animais foram submetidos a eutanásia por tiopental sódico (75 mg/kg IP).

Uma parte do material coletado foi imediatamente fixada em formol a 10% permanecendo por 24 horas. Após esses procedimentos, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol, impregnados pela parafina líquida em estufa regulada à temperatura de 59º C e incluídos em parafina. Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo *Minot*, ajustado para 5 micrômetros (µm). Os cortes obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de MAYER e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37 °C, durante 24 horas, para secagem e colagem, segundo recomendações de Molinaro et al. (2010). Em sequência, os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela hematoxilina-eosina (H.E) para análise morfológica e morfométrica.

A análise morfológica do tecido em cicatrização foi realizada por escores, em lâminas coradas em HE fazendo-se uma varredura em todo o processo cicatricial em diferentes objetivas e campos e avaliando os parâmetros abaixo, segundo protocolo descrito por Estevão et al, 2019.

**Tabela 1-** Reações inflamatórias – avaliado pela celularidade e edema em todos os tempos do experimento.

Escore	Parâmetro utilizado
0	AUSÊNCIA DE INFLAMAÇÃO
1	INFLAMAÇÃO DISCRETA
2	INFLAMAÇÃO MODERADA
3	INFLAMAÇÃO ACENTUADA

**Tabela 2** - Formação de crosta – avaliada pela quantidade de crosta depositada no processo cicatricial nos tempos 3, 7, 14 e 21.

Escore	Parâmetro utilizado
0	AUSÊNCIA DE CROSTA
1	PRESENÇA DISCRETA
2	PRESENÇA MODERADA
3	PRESENÇA ACENTUADA

**Tabela 3** - Angiogênese – avaliado pela concentração de vasos neoformados no tecido de granulação, em todos os tempos. Coloração HE. Objetiva de 40x.

Escore	Parâmetro utilizado
0	AUSENTE
1	DISCRETA FORMAÇÃO DE VASOS
2	MODERADA FORMAÇÃO VASCULAR
3	ACENTUADA FORMAÇÃO VASCULAR

**Tabela 4** - Epitelização – avaliada pela língua epitelial em formação e sua espessura nos tempos 3, 7 e 14.

Escore	Parâmetro utilizado
0	AUSENTE
1	DISCRETA - epitelização parcial com pequena língua epitelial ocupando até 1/3 da ferida
2	MODERADA - epitelização parcial com língua epitelial ocupando mais de 1/3 da ferida
3	ACENTUADA - epitelização total

A análise morfométrica foi realizada pela quantificação de vasos neoformados. Para as análises morfométricas de cada lâmina foram obtidas seis imagens, padronizando sempre o processo de varredura da lâmina (duas fotos em cada uma das bordas e duas no tecido cicatricial) e a objetiva para cada parâmetro. Para avaliação microscópica da evolução da cicatrização utilizou um sistema digitalizador e analisador de imagens onde estas foram capturadas por câmera Leica ICC50 HD e digitalizadas por computador através de Software Leica LAS EZ. As fotomicrografias obtidas foram analisadas pelos programas ImageLab, versão 6.0, para quantificação de vasos sanguíneos, que foi realizada com o auxílio do contador manual.

#### **4.10 Delineamento e Análise Estatística:**

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) composto pelos seguintes tratamentos: pomada de óleo essencial das folhas de *Curcuma longa* 10% mais veículo e pomada apenas com o veículo. Como estes tratamentos foram avaliados nos períodos pós-operatórios de 3, 7, 14 e 21 dias, foi utilizado o esquema de parcela subdividida no tempo, onde os tratamentos estavam na subparcela e os períodos foram considerados como parcelas. Foram utilizados cinco repetições para cada recurso farmacológico e tempo, sendo considerado cada animal uma unidade experimental.

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism 5.0 com os dados obtidos das variáveis: contração das feridas e contagem de vasos sanguíneos, nos dias 3, 7, 14 e 21 de PO. Os dados foram submetidos à análise de variância, através do Two-way ANOVA complementada pelo teste de Tukey, com significância de 5% ( $p < 0,05$ ), conforme Guimarães e Sarsfield (2007).

## **Referências**

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.

AKBIK, Dania; GHADIRI, Maliheh; CHRZANOWSKI, Wojciech; ROHANIZADEH, Rohanizadeh. Curcumin as a wound healing agent. **Life Sciences**, v.116, n.1, p.1-7, 2014.

APPLEGATE, E. **Anatomia e Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2012. 492 p.

ARAÚJO, L.; REIS, P.G.; BARBOSA, L.C.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; GRABE-GUIMARÃES, A.; MOSQUEIRA, V.C.; CARNEIRO, C.M.; SILVA-BARCELLOS, N.M. In vivo wound healing effects of *Symphytum officinale* L. leaves extract in different topical formulations. **Pharmazie**, v. 67, n.4, p.355-60, 2012

ARAÚJO, L.; ARAÚJO, R.; GOMES, F.; LEMES, S.; ALMEIDA, L.; MAIA, L.; GONÇALVES, P.; MRUÉ, F.; SILVA-JUNIOR, N.; MELO-REIS, P. Physicochemical/photophysical characterization and angiogenic properties of Curcuma longa essential oil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.88, n.3, p.1889-1897, 2016.

BALBINO, C.; PEREIRA, L.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BARACHO, N.; OLIVEIRA, H.; MAGLHÃES, I.; GIL, B.; CÂNDIDO IRULEGUI, R.. Extrato hidroalcoólico de própolis e cicatrização de feridas no diabetes tipo I: Estudo experimental. **Revista Científica da FEPI-Revista Científic@ Universitas**, v.1, n.2, 2009

BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.13, n.4, p.235-244, 1998.

BARROS K.N.; GUIMARÃES, H.E.T., SARTOR C.P.; FELIPE, D.F. Desenvolvimento de uma pomada contendo extrato de *Pereskia aculeata*. VI Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, Maringá-Paraná. Disponível em: <[https://www.unicesumar.edu.br/epcc-2009/wp-content/uploads/sites/77/2016/07/kellen\\_nobre\\_barros.pdf](https://www.unicesumar.edu.br/epcc-2009/wp-content/uploads/sites/77/2016/07/kellen_nobre_barros.pdf)>. Acesso em: 20 Nov. 2019.

BRANDÃO, M.L.; REIS, P.R.; ARAÚJO, L.A.; ARAÚJO, A.C.; SANTOS, M.H.; MIGUEL, M.P. Evaluation of wound healing treated with latex derived from rubber trees and Aloe Vera extract in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.31, n.9, p.570-577, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 26, de 13 de Maio de 2014. Brasília: ANVISA, 2014. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf)>. Acesso em: 10 Mar 2019.

BRASIL. Formulário nacional da farmacopéia brasileira / Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2.ed. Brasília: ANVISA, 2012. 224p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS. 1.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 92 p.

BIELEFELD, K.; AMINI-NIK, S.; ALMAN, B. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.70, n.12, p.2059-2081, 2013.

CARMO, E. S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E. L. The potential of origanum vulgare L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n.2, p. 362-367, 2008.

CHATTOPADHYAY, I.; BISWAS, K.; BANDYOPADHYAY, U.; BANERJEE, R..Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. **Current Science-Bangalore-**, v.87, p.44-53, 2004.

COCHARD, L. R. **Atlas de embriologia humana de Netter**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

COTRAN, R.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; COTRAN: R. **Patologia - Bases patológicas das doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**, v.16, n. 3, p.224-228, 1992.

DA SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da área de proteção ambiental municipal de Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia pelna**, v 6, n. 2, p. 1-17, 2010.

DE OLIVEIRA, S.. Formulações de confrei (*Symphytum officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da FZVA**, v.7, n.1, 2001.

- EPSTEIN, J. M. Agent-based computational models and generative social science. **Complexity**, v.4, n.5, p. 41-60, 1999.
- ESTEVIÃO, L. R. M.; MENDONÇA, F. S.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, R S.; BARROS, M. E. G.; ARANTES, R.; RACHID, M.; EVÊNCIO-NETO, J. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolium* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.28, n.3, p.202-209, 2013.
- ESTEVIÃO, L.R.; CASSINI-VIEIRA, P.; LEITE, A.G.B.; BULHÕES, A.A.; BARCELOS, L.S.; EVÊNCIO-NETO, J. Morphological Evaluation of Wound Healing Events in the Excisional Wound Healing Model in Rats. **Bio-protocol**, v.9, n.13, p.e3285. 2019.
- FALEIRO, C.; ELIAS, S.; CAVALCANTI, L.; CAVALCANTI, Á.. O extrato das folhas de babosa, *Aloe vera*, na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. **Natureza On Line**, v.6, n.2, p.56-60, 2009.
- FERREIRA, F.; KEMMELMEIER, C.; ARROTÉIA, C.; DA COSTA, C.; MALLMANN, C.; JANEIRO, V.; FERREIRA, F.; MOSSINI, S.; SILVA, E.; MACHINSKI, M.. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v.136, n.2, p.789-793, 2013.
- GRIGOLLI, B.; POLETTI, N.; BECCARIA, L.; RIBEIRO, R.. Clinical study of *Curcuma longa* L. for healing pressure ulcers. **Journal of Nursing UFPE on line**, v.7, n.9, p.5632-5637, 2013
- GUERRA, A.; BELINHA, J.; JORGE, R.N. Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. **Journal of theoretical biology**, v.459, p.1-17, 2018.
- GUIMARÃES R.C.; SARFIELD CABRAL J.A. 2007. Estatística. 2ª ed. McGraw-Hill, p. 1-13. Disponível em: <<http://www.mat.uc.pt/~cmtm/ECwww/ANOVA.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2019.
- GHOSH, P. K.; GABA, A. Phyto-extracts in wound healing. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.16, n. 5p. 760-820, 2013.
- ISAAC, C.; LADEIRA, P.; RÊGO, F.; ALDUNATE, J.; FERREIRA, M.. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v.89, n.3-4, p.125-131, 2010.
- JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6. ed., São Paulo: Manole, p. 831-839, 2000.



- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J.. **Histologia Básica**. 13ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.100:108, 2017.
- KUANAR, A.; MOHANTY, S.; PANDA, M.; NAYAK, S.. Essential oils from leaves of micropropagated turmeric. **Current Science**, v. 96,n.9, p.1166, 2009.
- KÜHNEL, W.. **Atlas de Citologia, Histologia e Anatomia microscópica para teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- KUMAR, A.; AGARWAL, K.; SINGH, M.; SAXENA, A.; YADAV, P.; MAURYA, A. K.; YADAV, A.; TANDON, S.; CHANDA, D.; BAWANKULE, D. U. Essential oil from waste leaves of *Curcuma longa* L. alleviates skin inflammation. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 5, p. 1245-1255, 2018.
- MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES-JÚNIOR, A. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v.3, n.2, p. 105-127, 2011.
- MATA, A.; NELSON, D.; AFONSO, R.; GLÓRIA, M.; JUNQUEIRA, R.. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n. 1, p.151-157, 2004.
- MENDES, S.S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H.C.; 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. **Journal of Ethnopharmacology**, v.129, n.3, p.391-397, 2010.
- MOLINARO, E. M. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009.
- MONTANARI, T.. **Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas**, 3.ed., Porto Alegre: Edição do Autor, 2016.
- MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Porto Alegre: Artemed Editora, 2017.
- OLIVEIRA, A. C. D.; ROPKE, C. D. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, 2016.

PARVEEN, Z.; NAWAZ, S.; SIDDIQUE, S.; SHAHZAD, K. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Leaves of *Curcuma longa* L. Kasur Variety. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.75, n.1, p.117-122, 2013.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; DE MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 373-375, 2006.

PINTÃO, Ana Maria e SILVA, Inês Filipa. A verdade sobre o açafão. In: **Workshop Plantas Medicinais e Fitoterapêuticas nos Trópicos. IICT/CCCM**. 2008. p. 1-19.

PRIYA, R.; PRATHAPAN, A.; RAGHU, K.; MENON, A. Chemical composition and in vitro antioxidative potential of essential oil isolated from *Curcuma longa* L. leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.2, p.S695-S699, 2012.

QUEIROZ, R.; SOARES, L.; MAIA FILHO, A.; ARAUJO, K.; SANTOS, I.; COSTA JUNIOR, J.; SAFFI, J.. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). **ConScientiae Saúde**, v.9, n.4, 2010.

RAGAGNIN, R. C. G. **Efeito do estresse salino no crescimento e na qualidade do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer**. 2013. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró.

RAJKUMAR, S.; JEBANESAN, A. **Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *Clausena dentata* (Willd) M. Roam**. (Rutaceae) against the chikungunya vector, *Aedes aegypti*.

ROBERTSON, V.; WARD, A.; LOW, J.; ANN, R. **Eletroterapia Explicada: princípios e práticas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ROBBINS, S; COTRAN, R. S.; L; Abbas, Abul K.; Fausto, Nelson; Kumar, Vinay; Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

SEGUNDO, A.; BOSCO, Á.; MAIA, D.; RIBEIRO, R.; AGUIAR, E.; ROCATTO, G.; CIRILO, D.; BUZELLE, S.; SEMENOFF, T.. Influência do *Aloe vera* e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. **Periodontia**, v.17, n.1, 2007.

SILVA, B.; MARTINS, A.; SAAD, I.. Aplicação de um protocolo fisioterapêutico na Síndrome de Kartagener: estudo de caso. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, v.14, n.2, p.139-143, 2010.

SILVA, A. R. **Tudo sobre aromaterapia**. São Paulo: Roca, 1998. 624 p.

SILVA, S. L.; CHAAR, J. S.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.

SILVA, E. A. J. D.; SILVA, V. P. D., ALVES, C. C. F., ALVES, J. M., SOUCHIE, E. L., & BARBOSA, L. C. D. A. (2016). Harvest time on the content and chemical composition of essential oil from leaves of guava. **Ciência Rural**, v.46, n. 10, p.1771-1776, 2016.

SIQUI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p.38-43, 2000.

SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G.; DECOTÉ, D.; LIMA, M.. Curcumina, o pó dourado do açafraão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v.38, n.4, p.538-552, 2015.

TOWSEND, C. M.; BEAUCHAMP, R. D.; EVERS, B. M.; MATTOX, K. L. **Sabiston, tratado de cirurgia: a base biológica da moderna prática cirúrgica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

VAUGHN, A. R.; BRANUM, A.; SIVAMANI, R.K. Effects of Turmeric (*Curcuma longa*) on Skin Health: A Systematic Review of the Clinical Evidence. **Phytotherapy Research**, v.30, n.8, p.1243-64, 2016.

VAN DEN DOLL H.; KRATZ, P. D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.11, p. 463-471, 1963.

VIEGAS, T. X.; VAN WINKLE, L. L., LEHMAN, P. A., FRANZ, S. F.; FRANZ, T. J.. Evaluation of creams and ointments as suitable formulations for peldesine. **International Journal of Pharmaceutics**, v.219, n. 1-2, p. 73-80, 2001.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos florestais**, v.17, p.1-26, 2003.

WANNES, W. A. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, n.5, p.1362-1370, 2010.

WILLIAMS, J.; MOORES, A.. Manual de feridas em cães e gatos. Grupo Gen.  
**Roca Ltda.**, 2013.

## ARTIGO 1

(Artigo científico formatado segundo as normas da “Revista Brasileira de Plantas Mediciniais)

### Caracterização fitoquímica do óleo essencial das folhas do açafão da terra (*Curcuma longa* L.)

D'Emery, M.B.<sup>1</sup>; Estevão, L.R.M.<sup>1</sup>; Evêncio-Neto, J.<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> UFRPE- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 52171-900, Brasil. \*E-mail: [joaquim.evenciont@ufrpe.br](mailto:joaquim.evenciont@ufrpe.br).

**RESUMO:** Desde os tempos antigos plantas medicinais são utilizadas como fonte de medicamentos para uma variedade de doenças. Óleos essenciais são componentes voláteis contidos em diversos órgãos vegetais, e estão ligados com diversas funções necessárias à sobrevivência do vegetal. Esses componentes são reconhecidos atualmente por possuir atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antioxidante e cicatrizante. O objetivo deste trabalho é analisar a composição do óleo essencial das folhas frescas de *Curcuma longa* pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM). As folhas foram coletadas no município de Penedo de Baixo/PE, o óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e feito a análise da composição química. Foi obtido um rendimento equivalente a 0,347%. O perfil químico do óleo obtido por CG-EM foram identificados 98,52% dos constituintes químicos entre Monoterpenos e Sesquiterpenos, sendo identificado como constituintes majoritários  $\alpha$ -Phellandrene (33,19%), Terpinolene (29,00%) e  $\beta$ -Phellandrene (13,315%). Conclui-se que o óleo essencial do Açafão da terra (*Curcuma longa*) possui bom rendimento,

apresentando componentes do metabolismo secundário semelhantes a outros óleos essenciais com importantes funções biológicas testadas e com potencial terapêutico a ser estudado.

**PALAVRA-CHAVE:** *Curcuma longa*, óleo essencial, fitoquímica

**ABSTRATC:** **Phytochemical characterization of the essential oil of turmeric leaves (*Curcumalonga*).** Since ancient times medicinal plants have been used as a source of medicines for a variety of diseases. Nuclei are volatile contained in bodies and plants, and are subject to various survival functions of the plant. Bones currently being protected by biological species such as antibacterial, antifungal, antioxidant and healing. Some medicinal plants are already widely used in the endemic, and have shown that a valuable therapeutic alternative for the treatment of wounds, so this no longer applies as the essential oil image of fresh *Curcuma longa* leaves. The leaves were collected in the municipality of Penedo de Baixo / PE, the essential oil was extracted by hydrodistillation and the chemical composition analysis was performed by gas chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). By diesel equivalent to 0.347%. The original oil profile obtained by GC-MS was eight peaks, where 98.52% of the constituents between Monoterpenes and Sesquiterpenes were identified, being the major constituent factor  $\alpha$ -Phellandrene (33.19%), Terpinolene (29.00%). and  $\beta$ -Phellandrene (13.315%). It is concluded that the essential oil of ground turmeric consists of components that have already been extracted by authors and other species, and also resistant to biological examination. gift oil for providing the operations of sheets and data new impressions to assist the process of tissue deterrence.

**KEYWORDS:** *Curcuma longa*, essential oil, phytochemistry

## INTRODUÇÃO

Plantas medicinais são utilizadas desde os tempos antigos como fonte de medicamentos para uma variedade de doenças, e atualmente vêm ganhando cada vez mais espaço nos campos médico e veterinário (GUERRA et al., 2018). Existem relatos sobre o conhecimento dos óleos essenciais desde séculos antes da era Cristã. As principais referências históricas e de utilização desses componentes estão ligadas a países orientais, entre eles, Egito, China e Índia (BARATTA et al., 1998). Esses componentes são reconhecidos atualmente por apresentarem diversas atividades biológicas, tais como, antibacteriana, antifúngica, antioxidante e cicatrizante (VITTI & BRITO, 2003).

Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas, são constituídos por elementos voláteis, que possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos, cetonas, fenóis, ésteres e fenilpropanoides. Eles são responsáveis pelo cheiro e sabor típicos de uma planta, mas também estão diretamente relacionados à atração de polinizadores, proteção contra parasitas e patógenos, e várias outras funções necessárias para a sobrevivência do vegetal (SIQUI et al., 2000; SILVA et al., 2010). Esses compostos podem ser encontrados em qualquer tecido vivo das plantas, em sua maioria, concentrados na casca, sementes, flores, folhas e nos rizomas. Os constituintes que aparecem em maior percentual são conhecidos como componentes principais ou majoritários. (ARAÚJO, 1995; VITTI & BRITO, 2003).

Atualmente pesquisadores confirmam que o óleo essencial de *Curcuma longa* tem propriedades farmacológicas importantes como antifúngico e antimicrobiano (PARVEEN, 2013), antiaflatoxigênico (FERREIRA, 2013), antioxidante (PRIYA et al., 2012), anti-inflamatório (KUMAR et al., 2018).

A *Curcuma longa* é uma planta medicinal alvo de pesquisas nas últimas décadas (KUMAR et al., 2018). É nativa da Índia, porém, bastante cultivada no Brasil, devido às condições climáticas favoráveis ao seu cultivo (MATA, 2004). Tem sido utilizada, na medicina popular, para o tratamento de várias doenças, como reumatismo, sinusite e cicatrização de feridas (AKBIK et al., 2014). O óleo essencial pode ser encontrado tanto nos rizomas, quanto nas folhas da planta (KUANAR et al., 2009) porém, na indústria, as partes mais utilizadas são

os rizomas, sendo as folhas um material residual, o que gera um enorme desperdício no processamento (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Tendo em vista os potenciais terapêuticos deste óleo e o aproveitamento das folhas durante o processamento industrial, o presente trabalho tem por objetivo analisar o rendimento e a composição química do óleo essencial das folhas frescas da *Curcuma longa*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta de material vegetal para identificação**

A coleta foi realizada entre os meses de Maio e Junho, no período da manhã, no Sítio Bom Mirar, na BR-408, Km 100, Penedo de Baixo, Pernambuco. O índice pluviométrico da região foi de 194.7mm em Maio e 358.3mm em Junho, de acordo com dados do IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco). O solo da região é encharcado rico em matéria orgânica, com coloração escura, todos os exemplares colhidos apresentavam altura maior que 40cm; a planta apresenta um ciclo de colheita de aproximadamente 150 dias, onde ocorre à floração e as partes aéreas da planta secam.

O material foi encaminhado ao Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho - PEUFR para identificação e registro, realizando o depósito da exsicata do material botânico e catalogação. O material está registrado com o Nº de verificação: 54.924.

### **Extração do óleo**

O processo de extração do óleo essencial de folhas de *Curcuma longa* foi realizado através da técnica de hidrodestilação, utilizando o aparelho Clevenger (Figura 1). Após a coleta, as folhas foram levadas ao Laboratório de Produtos Naturais e Bioquímicos do Departamento de Química da UFRPE, onde foram pesadas (350g), lavadas, trituradas e colocadas em balão volumétrico de fundo redondo com capacidade de 5L, contendo água destilada. O balão foi acoplado ao Clevenger e a extração foi realizada pelo período de duas horas. A partir da massa obtida na extração e da massa úmida do material vegetal, o teor do óleo essencial extraído foi calculado pela equação sugerida por Pimentel et al. (2006):



$$TO = \frac{\text{Móleo}}{\text{Mfolha}} \times 100$$

onde TO se refere ao teor de óleo; Móleo corresponde à massa do óleo, Mfolha corresponde à massa fresca das folhas. O resultado foi expresso em % (p/p) (RAGAGNIN, 2013).

**Figura 1** – Liquidificador (A); Material vegetal processado (B); Aparelho Clevenger utilizado para a hidrodestilação (C).



Fonte: Arquivo pessoal

O hidrolato foi coletado e o óleo foi extraído da fase aquosa por partição, com hexano destilado. Foi adicionado sulfato de sódio anidro à fase orgânica, como agente secante. A fase orgânica foi filtrada e o hexano removido em evaporador rotativo a vácuo a 40 °C e 27 rpm (Figura 2). O óleo obtido foi armazenado em recipiente de vidro âmbar, bem fechado e mantido acondicionado em freezer a uma temperatura de -20 °C para posterior utilização em experimentos.

**Figura 2** – Rota-evaporador utilizado para separar o hexano destilado do óleo essencial de *Curcuma longa*.



Fonte: Arquivo pessoal

### **Análise da composição química**

Após a extração o óleo foi analisado no Centro de Apoio a Pesquisa (CENAPESQ) da UFRPE, por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM) (Figura 3).

A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial foi realizada por CG-EM da PerkinElmer utilizando-se uma coluna de capilaridade com sílica (30m x 0,25mm x 0,25m). A temperatura da coluna foi programada para 60 °C até 240 à 3 °C/min. As temperaturas do injetor e detector foram de 240 °C e 280 °C, respectivamente. O gás de arraste foi o hélio, fluxo de 1,5 mL/min, (1:50). Os espectros de massa foram obtidos a 70 eV por IE. A velocidade de leitura de 0.5 scans<sup>-1</sup> de m/z 40 a 650. O óleo essencial foi analisado por CG-EM, e a identificação foi feita com base na comparação dos índices de retenção (VAN DEN DOLL & KRATZ, 1963), bem como por comparação computadorizada do espectro de massa obtido com aqueles contidos na biblioteca de espectro de massas do NIST do conjunto de dados CG-EM (ADAMS, 2007).

**Figura 3** - Cromatográfico gasoso acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM)



Fonte: Arquivo pessoal

## RESULTADOS

O óleo essencial (OE) das folhas frescas do Açafrão da terra (*Curcuma longa*) foi obtido com 0,347% de rendimento.

Foram identificados 98,52% dos constituintes químicos (Tabela 1) dentre mono e sesquiterpenos, dentre eles, foram reconhecidos como componentes majoritários:  $\alpha$ -Phellandrene (33,19%), Terpinolene (29,00%) e  $\beta$ -Phellandrene (13,315%).

**TABELA 1** - Composição química do óleo essencial das folhas frescas de *Curcuma longa*.

	Compounds	IR <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	%
1.	$\alpha$ -Pinene	921	932	1.90
2.	Verbenene	959	961	0.37
3.	Sabinene	966	969	4.73
4.	$\beta$ -Pinene	975	972	2.28
5.	Myrcene	988	988	0.19
<b>6.</b>	<b><math>\alpha</math>-Phellandrene</b>	<b>997</b>	<b>1002</b>	<b>33.19</b>
7.	Mentha-1(7),8-diene	1000	1003	0.49
8.	$\alpha$ -Terpinene	1007	1014	1.93
9.	<i>p</i> -cymene	1014	1020	1.70
10.	<i>Trans</i> -Rose oxide	1018	1122	2.72
<b>11.</b>	<b><math>\beta</math>-Phellandrene</b>	<b>1021</b>	<b>1025</b>	<b>13.31</b>
12.	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimene	1033	1032	0.40
13.	$\gamma$ -Terpinene	1045	1059	2.35
<b>14.</b>	<b>Terpinolene</b>	<b>1073</b>	<b>1086</b>	<b>29.00</b>
15.	<i>p</i> -Mentha-2,4(8)-diene	1088	1085	0.84
16.	Menthol	1167	1167	0.37
17.	$\alpha$ -Terpineol	1181	1186	0.62
18.	$\beta$ -Caryophyllene	1429	1424	1.53
<b>19.</b>	<b>ar-Curcumene</b>	<b>1478</b>	<b>1479</b>	<b>0.39</b>
20.	$\alpha$ -zingiberene	1480	1493	0.23
	Total			98.52
	Monoterpenes			96.38
	Sesquiterpenes			2.15

<sup>a</sup> Índices de retenção calculados a partir dos tempos de retenção em relação aos de uma série de n-alcenos em uma coluna capilar DB-5 de 30m. <sup>b</sup> Índices de retenção linear da literatura. IR = índice de retenção.

## DISCUSSÃO

Os óleos essenciais podem ser utilizados em múltiplas áreas, tais como, cosmética, perfumaria, farmacológica, uma vez que seus constituintes são absorvidos pelos organismos via oral, cutânea, respiratória e injetável (PISTORE et al., 2014). Diversos estudos avaliaram o óleo essencial do Açafraão da terra, sua composição química, suas diferentes propriedades biológicas, sua utilização como fitoterápico e obtiveram resultados variados (KUMAR et. al., 2018; PRIYA et. al., 2012; AWASTHI, et.al., 2009).

Os componentes majoritários:  $\alpha$ -Phellandrene (33,19%), Terpinolene (29,00%) e  $\beta$ -Phellandrene (13,31%) encontrados já foram relatados como principais constituintes do óleo de folhas (AWASTHI, 2009) e corroboram com resultados encontrados nos estudos de Kumar et al. (2018), onde os componentes majoritários foram: terpinolene (52,88%) e  $\alpha$ -phellandrene (21,13%); e Priya et al. (2012) onde os componentes majoritários foram: terpinolene (9,5%),  $\alpha$ -phellandrene (4,8%) e  $\beta$ -Phellandrene (22,8%). Akbar et al. (2018), em seu estudo observou que o teor do óleo essencial extraído dos rizomas do Açafraão da Terra foi influenciado com a umidade relativa do ar e com a precipitação média. A produção de metabólitos secundários pode ser influenciada pela estação do ano em que a planta é coletada, por fatores ambientais como fotoperíodo, temperatura, umidade, e por fatores bióticos, como parasitas e patógenos, podendo assim haver variação na quantidade e natureza dos constituintes ativos (DA SILVA et al., 2010; DA SILVA et al., 2016). O que justifica as diferentes concentrações dos componentes majoritários encontradas pelos autores citados e nesse estudo.

Tais componentes majoritários variam entre folhas e rizomas, de um modo geral, estudos mostram que os principais componentes do óleo essencial dos rizomas são ar-,  $\alpha$ - e  $\beta$ -turmerone (PÉRET-ALMEIDA et al., 2008; FERREIRA et al., 2013). Importante salientar que folhas e rizomas possuem componentes majoritários específicos o que torna cada parte do vegetal única e com possíveis ações sinérgicas e bilógicas distintas, com importância singular para a indústria farmacológica. Curcuminoídes, encontrados como ar-Curcumene (0,39%), representam cerca de 1% da composição total do óleo essencial das folhas e dos rizomas (PÉRET-ALMEIDA et al., 2008; FERREIRA

et al., 2013) e está relacionado as principais atividades biológicas da *C. Longa* (JAIN et al., 2007; ARAUJO et al., 2016).

Os compostos majoritários encontrados no presente óleo essencial já foram relatados em outros vegetais e tiveram diferentes ações biológicas avaliadas. Martinez et al. (2018) em seus estudos identificaram que os óleos essenciais de canela e cravo apresentam efeitos inseticidas em *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). Dos compostos analisados o  $\alpha$ -phandandrene presente no óleo de canela apresentou toxicidade de contato em larvas, pupas e adultos do coleoptera. Chaaban et al. (2019) testaram a atividade inseticida do óleo essencial das folhas de *Curcuma longa* contra larvas de *Lucilia cuprina* e mostrou que o  $\alpha$ -phandandrene foi tóxico para *L. cuprina*. Esses relatos mostram que o  $\alpha$ -phandandrene pode ser um importante composto natural no controle de insetos.

Lee et al. (2009) mostraram em seus estudos que o óleo essencial de pimenta de Sichuan (*Zanthoxylum schinifolium*) apresenta como componentes majoritários  $\beta$ -phandandrene, citronellal e acetato de geranil e seus constituintes apresentaram atividade anti-inflamatórias, suprimindo significativamente a transcrição gênica da óxido nítrico sintase e da ciclo-oxigenase-2. Estevão et al. (2013) em seus trabalhos com óleo essencial de Aroeira demonstraram uma melhora no processo cicatricial, onde o creme com o óleo da aroeira a 5%, acelerou o processo de cicatrização morfológicamente e morfometricamente, devido aos compostos  $\Delta^3$ -Careno (30,09%),  $\beta$ -felandreno (18,51%),  $\alpha$ -Pineno (14,31%), anteriormente descritos por Barbosa et al. (2007). Sendo assim o  $\beta$ -felandreno pode apresentar ação anti-inflamatória podendo assim ser útil como medicamento alternativo para o alívio e retardamento das respostas inflamatórias.

Han (2017) em seu estudo com óleo essencial de Abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) apresentou como principais componentes químicos beta-pineno (23%), sabineno (17%), terpinoleno (14%) e sugeriu com seus resultados que o óleo essencial do Abeto pode modular as respostas imunes e os processos de sinalização tumoral. Tetali (2019) em sua revisão mostra que os monoterpenos, identificados a partir de ervas e especiarias, são explorados comercialmente não apenas pela indústria de alimentos, mas também nos produtos de consumo, como sabonetes, xampus, cremes dentais e até

repelentes de insetos. Segundo Agil (2007), os terpenos são a categoria mais avançada e comprovada de intensificadores de penetração química transepidérmica e são considerados seguros pela Food and Drug Administration. Dessa forma essa classe de compostos podem ter diversas aplicações na indústria, desde produtos de cosmética até a produção de medicamentos.

Os óleos essenciais são utilizados como drogas inteiras ou associados a emolientes e demulcentes em diversos tratamentos (ESTEVÃO et al., 2009). Possuem atividades biológicas investigadas por muitos pesquisadores (LEE et al., 2009; PARVEEN et al., 2013; ESTEVÃO et al., 2013; PRIYA et al., 2012).

Parveen et al., (2013) testou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de *C. longa*, mostrando que o óleo apresenta atividade antibacteriana e antifúngica significativa contra patógenos humanos, dentre eles, *Fusarium miniformes*, *Bacillus subtilis*. Kumar et al. (2018), investigou o potencial anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial das folhas de *C. longa* revelando que este tem ação em citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL1- $\beta$ ) e melhora a inflamação da pele sem qualquer efeito tóxico sobre a mesma. Priya et al. (2012) trabalharam com radicais livres de ácido linoleico e demonstraram que o óleo essencial da folha de *C. longa* tem potencial para um potente antioxidante natural. Segundo Kulac et al. (2013) um bom agente para cicatrização de feridas protege o tecido de infecção bacteriana, reduz a inflamação, atua como anti-oxidante e induz a proliferação celular para ajudar na reconstrução de tecidos danificados.

Tendo em vista a ação antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante do óleo essencial das folhas de *C. longa* relatadas na literatura é possível que o mesmo possa contribuir de forma significativa para o processo de cicatrização de feridas. Os rizomas de *C. longa* já são amplamente utilizados na medicina popular e científica, porém as folhas são desperdiçadas, tornando-se resíduo. Em virtude das importantes atividades biológicas descritas do óleo essencial e por conter compostos químicos com ações farmacológicas importantes também relatadas na literatura, fazem-se necessários estudos *in vivo*, com o uso do óleo essencial das folhas dessa espécie para comprovar a eficácia cicatricial.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que o óleo essencial do Açafrão da terra (*Curcuma longa*) tem substâncias com bom potencial terapêutico justificando pesquisas em diversas áreas. Como perspectiva científica torna-se importante o estudo do presente óleo em tratamentos que envolvam processos de cicatrização, a fim de evitar desperdício das folhas e originar novas descobertas para auxiliar o processo de reparação tecidual.

## AGRADECIMENTOS

A FACEPE pelo apoio financeiro, ao laboratório de Produtos Naturais e Bioativos do departamento de Química da UFRPE e ao CENAPESQ pelo espaço e equipamentos disponibilizados para realização da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**.4.ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.
- AKBAR, A.; KUANAR, A.; PATNAIK, J.; MISHRA, A.; NAYAK, S.. Application of artificial neural network modeling for optimization and prediction of essential oil yield in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Computers and Electronics in Agriculture**, v.148, p.160-178, 2018.
- AKBIK, D.; GHADIRI, M.; CHRZANOWSKI, W.; ROHANIZADEH, R. Curcumin as a wound healing agent. **Life Sciences**, v.116, n.1, p.1-7, 2014.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos**– Teoria e Prática – Óleos Essenciais. Ed. Impr. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 1995.
- ARAUJO, L.; ARAÚJO, R.; GOMES, F.; LEMES, S.; ALMEIDA, L.; MAIA, L.; GONÇALVES, P.; MRUÉ, F.; SILVA-JUNIOR, N.; MELO-REIS, P. Physicochemical/photophysical characterization and angiogenic properties of *Curcuma longa* essential oil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.88, n.3, p.1889-1897, 2016.
- AWASTHI, P.K.; DIXIT, S.C. Chemical composition of *Curcuma Longa* leaves and rhizome oil from the plains of Northern India. **J Young Pharm** v.1, p. 312-6, 2009.

- BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v.13, n.4, p.235-244, 1998.
- BARBOSA, L.C.A; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* raddi. **Química Nova**, v.30, n.8, p.1959-1965, 2007.
- CHAABAN, A.; RICHARDIC, V.S.; CARRERB, A.R.; BRUMD, J.S.; CIPRIANOE,R.R.; MARTINSB, C.E.N; SILVAC, M.A.N.; DESCHAMPSE, C.; MOLENTOA, M.B. Insecticide activity of *Curcuma longa* (leaves) essential oil and its major compound  $\alpha$ -phellandrene against *Lucilia cuprina* larvae (Diptera: Calliphoridae): histological and ultrastructural biomarkers assessment. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 153, p.17-27, 2019.
- DA SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de Cerrado, da área de proteção ambiental municipal de Inhamum. **Scientia pelna**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.
- ESTEVIÃO, L.M.; MEDEIROS, J.P.; SCOGNOMILLO-ZSABÓ, M.V.R.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; GUIMARÃES, E.C.; CÂMARA, C.A.G.; EVÊNCIO-NETO, J. Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n.4, p.406-412, 2009.
- ESTEVIÃO, L.M.; MENDONÇA, F.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, R.; BARROS, M.; ARANTES, R.; RACHID, M.; EVÊNCIO-NETO, J. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolium* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.28, n.3, p.202-209, 2013.
- FERREIRA, F.; KEMMELMEIER, C.; ARROTÉIA, C.; DA COSTA, C.; MALLMANN, C.; JANEIRO, V.; FERREIRA, F.; MOSSINI, S.; SILVA, E.; MACHINSKI, M. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v.136, n.2, p.789-793, 2013.
- GUERRA, A.; BELINHA, J.; JORGE, R.N. Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. **Journal of theoretical biology**, v.459, p.1-17, 2018.
- HAN, X. In vitro biological activities of Douglas fir essential oil in a human skin disease model. **Cogent Biology**, v.3, n.1, p.1336886, 2017.
- JAIN, S.; SATYAENDRA, S.;SATISH, N.;SUMBHATE, S. Plant Review Recent trends in *Curcuma Longa* Linn. **Pharmacognosy Reviews**, v.1,p.119-128, 2007.
- KUANAR, A.; MOHANTY, S.; PANDA, M.; NAYAK, S. Essential oils from leaves of micropropagated turmeric. **Current Science**, v.96, n.9, p.1166, 2009.



KULAC, M.; AKTAS, C.; TULUBAS, F.; UYGUR, R.; KANTER, M.; ERBOGA, M. The effects of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats. **Journal of Molecular Histology**, v.44, p.83–90, 2013

KUMAR, A; AGARWAL, K.; SINGH, M.; SAXENA, A.; YADAV, P.; KUMAR, A. M.; YADAV, A.; TANDON, S.; CHANDA, D.; BAWANKULE, D. U. Essential oil from waste leaves of *Curcuma longa* L. alleviates skin inflammation. **Inflammopharmacology**, v.26, n.5, p.1245-1255, 2018.

LEE, J.E.H.; CHANG, K.M.I.; KIM, G.H. Composition and anti-inflammatory activities of *Zanthoxylum schinifolium* essential oil: suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, cytokines and cellular adhesion. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, n.10, p.1762-1769, 2009.

MARTÍNEZ, L.C.A.; PLATA-RUEDA, H.C.; COLARES, J.M.; CAMPOS, M.H.; DOS SANTOS, F.L.; FERNANDES, J.E.; ZANUNCIO, J.C. Toxic effects of two essential oils and their constituents on the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Bulletin of entomological research**, v.108, n.6, p.716-725, 2018.

MATA, A.; NELSON, D.; AFONSO, R.; GLÓRIA, M.; JUNQUEIRA, R. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p.151-157, 2004.

PARVEEN, Z.; NAWAZ, S ; SIDDIQUE, S ; SHAHZAD, K. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Leaves of *Curcuma longa* L. Kasur Variety. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.75, n.1, p.117-122, 2013.

PÉRET-ALMEIDA, L.; NAGHETINI, C.C.; NUNAN, E.A.; JUNQUEIRA, R.G.; GLÓRIA, M.B.A. Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. **Ciência e agrotecnologia**, v.32, n.3, p.875-881, 2008.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; DE MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. A. Convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, v.29, n.2, p.373-375, 2006.

PISTORE, M.; BRUSTOLIN, M.; ROSSET, A.; ZANELLA, C. A.; CANSIAN, R.L.; ROMAN, S.S. Avaliação do uso tópico do óleo essencial de *Ruta graveolens* L. (arruda) na cicatrização de feridas em ratos. **Perspectiva Erechim**, v.38, n.141, p.57-68, 2014.

PRIYA, R.; PRATHAPAN, A.; RAGHU, K.; MENON, A. Chemical composition and in vitro antioxidative potential of essential oil isolated from *Curcuma longa* L. leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.2, p.S695-S699, 2012.

- RAGAGNIN, R. C. G. **Efeito do estresse salino no crescimento e na qualidade do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer.** 2013. 46p.Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró.
- SIQUI, A.C.; SAMPAIO, A.L.F.; SOUSA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p.38-43, 2000.
- SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G.; DECOTÉ, D.; LIMA, M. Curcumina, o pó dourado do açafreão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v.38, n.4, p.538-552, 2015.
- TETALI, S.D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v.249, n.1, p.1-8, 2019.
- VAN DEN DOLL, H.; KRATZ, P. D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.11, p.463-471, 1963.
- VITTI, A.M.S.; BRITO, J.O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos florestais**, v.17, p.1-26, 2003.

## ARTIGO 2

### **Avaliação do óleo essencial das folhas de *Curcuma longa* na cicatrização de feridas cutâneas de ratos<sup>1</sup>.**

Marcela Barbosa D'Emery<sup>2</sup>, Lígia R. M. Estevão<sup>3</sup> e Joaquim Evêncio-Neto<sup>4</sup>

D'Emery, M.B., Estevão L.R.M. & Evêncio-Neto J. 2019. **[Utilization of the *Curcuma longa* essential oil and healing of rat skin wounds.]** Utilização do óleo essencial de *Curcuma longa* na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: joaquim.evenciont@ufrpe.br.

<sup>2</sup>Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. Pesquisa de mestrado com apoio FACEPE.

<sup>3</sup>Pós-Doutorado em Biociência Animal, UFRPE.

<sup>4</sup>Professor Titular, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE. \*Autor para correspondência: [joaquim.evenciont@ufrpe.br](mailto:joaquim.evenciont@ufrpe.br).

#### **ABSTRACT**

The healing process is common to all living beings and can reconstruct the tissue heritage that was interrupted. Several natural substances are already used in wound healing. This work evaluated the effects of the ointment based on essential oil of fresh leaves of Saffron of Earth (*Curcuma longa*) on the healing of skin wounds in rats. Twenty adult males were used, as the wounds divided into two groups: GT (wounds on the right, treated with ointment 10% of the essential oil of *Curcuma longa* + vehicle) and GC (wounds on the left, treated with ointment only with the vehicle). The animals were submitted to two skin incisions, in the thoracic region, in the right and left antimers. Wounds were measured after the surgical procedure with the aid of a digital caliper and analyzed macroscopically on days 3, 7, 14 and 21 of the postoperative period (PO). At the end of each experimental period, a biopsy was performed to remove the entire wound area. The skin fragments were processed according to the basic histological protocols, the sections stained with hematoxylin and eosin, and were used for histomorphological and histometric tests to quantify blood tissues. The data were submitted to the ANOVA test complemented by the Tukey-Kramer test ( $P < 0.05$ ). The results revealed that the oil has a high amount of  $\alpha$ -Phandandrene (33.19%), Terpinolene (29.00%) and  $\beta$ -Phellandrene (13,315). A macroscopic assessment of the wounds shown as the wounds of the TG showed better results when compared to the CG, despite not showing any statistical difference. Our results demonstrated an important anti-inflammatory action of this oil, with reduced crust, decreased inflammatory cells and decreased blood vessels. It was possible to conclude that an ointment

contains essential oil from *Curcuma longa* leaves with 10% of inflammatory response of the healing process, being necessary new experiments to determine the best treatment of this oil.

**Keyword:** Healing, *Curcuma longa*, Mice.

## RESUMO

O processo de cicatrização é comum a todos os seres vivos e tem como finalidade reconstituir a continuidade tecidual que foi interrompida. Diversas substâncias naturais já são utilizadas na cicatrização de feridas. Este trabalho avaliou os efeitos da pomada à base de óleo essencial das folhas frescas do Açafrão da Terra (*Curcuma longa*) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Foram utilizados 20 machos adultos, as feridas foram divididas em dois grupos: GT (feridas da direita, tratadas com pomada 10% do óleo essencial de *Curcuma longa* + veículo) e GC (feridas da esquerda, tratadas com pomada apenas com o veículo). Os animais foram submetidos a duas incisões na pele, na região torácica, nos antímeros direito e esquerdo e as feridas receberam os respectivos tratamentos imediatamente após o procedimento cirúrgico e diariamente durante 21 dias. As feridas foram mensuradas imediatamente após o procedimento cirúrgico com auxílio de um paquímetro digital e analisadas macroscopicamente nos dias 3, 7, 14 e 21 de pós-operatório (PO). Ao final de cada período experimental foi realizada biópsia removendo toda a área da ferida. Os fragmentos de pele foram processados seguindo protocolos histológicos básicos, os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina, e foram utilizados para as avaliações histomorfológicas e histométricas pela quantificação de vasos sanguíneos. Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA complementado pelo teste de Tukey-Kramer ( $p < 0,05$ ). Os resultados revelaram que o óleo possui elevada quantidade  $\alpha$ -Phellandrene (33,19%), Terpinolene (29,00%) e  $\beta$ -Phellandrene (13,315). Nossos resultados demonstraram uma ação anti-inflamatória importante deste óleo, com diminuição de crosta, diminuição de células inflamatórias e diminuição de vasos sanguíneos. Foi possível concluir que a pomada contendo óleo essencial das folhas de *Curcuma longa* a 10% auxiliou na resposta inflamatória do processo cicatricial, sendo necessário novos experimentos para determinar a melhor concentração deste óleo em pomada neste processo.

**Palavras-chaves:** Cicatrização, *Curcuma longa*, pele, óleo essencial.

## INTRODUÇÃO

A cicatrização é um processo complexo que envolve uma sequência de reações químicas, físicas, e biológicas com finalidade de reconstituir o tecido lesado (GUERRA et al., 2018). No tratamento de feridas cutâneas se busca por substâncias que ajudem nesse processo de cicatrização, tornando-o mais rápido e eficiente (GHOSH & GABA, 2013).

As plantas são usadas como fonte de medicamentos desde os tempos antigos e são fonte de remédios para uma variedade de doenças nos dias de hoje (GUERRA et al., 2018). Como exemplo, a Aroeira, a própolis e a *Aloe vera* (ESTEVÃO et al., 2013, BRANDÃO et al., 2016, OLIVEIRA et al. 2016;) são utilizadas na cicatrização de feridas cutâneas.

A *Curcuma longa*, conhecida popularmente como açafrão da terra ou cúrcuma, é uma planta medicinal que tem sido alvo de diversas pesquisas nas últimas décadas (KUMAR, 2018). É nativa da Índia, porém cultivada no Brasil devido às condições climáticas favoráveis ao seu cultivo (MATA, 2004). Está classificada como *Curcuma longa* L. (sin. *C. domestica*) pertencente à família das *Zingiberaceae*.

O óleo essencial pode ser encontrado tanto nos rizomas, quanto nas folhas da planta (KUANAR et al., 2009). Na indústria as folhas são material residual, o que gera desperdício no processamento (SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Trabalhos demonstram que o óleo essencial de *Curcuma longa* tem diversas propriedades, entre elas: antifúngico e antimicrobiano (PARVEEN, 2013), antiaflatoxigênico (FERREIRA, 2013), antioxidante (PRIYA et al., 2012), anti-inflamatório (KUMAR et al., 2018), potencial angiogênico (ARAÚJO et al., 2016). Do ponto de vista de aplicações médicas, materiais antioxidantes, anti-inflamatórios e que induzem angiogênese são importantes para aumentar a proliferação celular ou promover a cicatrização de feridas (SCHULZ et al., 2003, AKBIK et al., 2014).

Tendo em vista as propriedades relatadas na literatura, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos da pomada à base de óleo essencial das folhas de *Curcuma longa* a 10% na cicatrização de feridas cutâneas em ratos, pela avaliação macroscópica, avaliação histomorfológica e histomorfométrica.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Animais e local:** O experimento foi aprovado pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE (licença nº 009/2020). O experimento foi realizado no biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizados 20 ratos Wistar albinos (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso corporal variando de 250 a 300g, 90 dias de idade, provenientes do Biotério do DMFA- UFRPE. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura de 23 a 25 °C, ciclo claro/escuro controlado de 12 em 12 horas; receberam ração e água à vontade.

**Material botânico:** Para análise do óleo essencial foram utilizadas folhas frescas de *Curcuma longa*. A coleta foi realizada entre os meses de Maio e Junho de 2019, no Sítio Bom Mirar, na Br-408, Km 100, Penedo de Baixo, Pernambuco. O índice pluviométrico da região foi de 194.7mm em Maio e 358.3mm em Junho, de acordo com dados do IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco). Uma exsicata do material botânico foi depositada no Herbário Professor Vasconcelos Sobrinho - PEUFR, nº de verificação: 54.924.

O processo de extração do óleo essencial foi realizado através da técnica de hidrodestilação, utilizando o aparelho Clevenger. Após a coleta, as folhas foram levadas ao Laboratório de Produtos Naturais e Bioquímicos do Departamento de Química da UFRPE, onde foram pesadas (350g), lavadas, trituradas e colocadas em balão com capacidade de 5L, contendo água destilada. O balão foi acoplado ao Clevenger e a extração foi realizada pelo período de duas horas. A partir da massa obtida na extração e da massa úmida do material vegetal, o teor do óleo essencial extraído foi calculado pela equação sugerida por Pimentel et al. (2006):

$$TO = \frac{M_{\text{óleo}}}{M_{\text{folha}}} \times 100$$

onde TO se refere ao teor de óleo; M<sub>óleo</sub> corresponde à massa do óleo, M<sub>folha</sub> corresponde à massa fresca das folhas. O resultado foi expresso em % (p/p) (RAGAGNIN, 2013).

Após a extração o óleo foi analisado no Centro de Apoio a Pesquisa (CENAPESQ) da UFRPE, por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM) e a identificação foi feita com base na comparação dos índices de retenção (VAN DEN DOLL & KRATZ, 1963), bem como por

comparação computadorizada do espectro de massa obtido com aqueles contidos na biblioteca de espectro de massa do NIST do conjunto de dados CG-EM (ADAMS, 2007). Óleo obtido foi armazenado em recipiente de vidro âmbar, bem fechado e mantido em freezer até o experimento, a uma temperatura de -20 °C.

**Preparação das formulações.** Foram preparadas duas formulações. A formulação teste foi constituída por óleo essencial das folhas frescas do açafrão da terra (*Curcuma longa*) na concentração de 10% incorporado ao veículo. A formulação controle foi constituída apenas com o veículo da pomada (vaselina 80% e glicerina 20%). As pomadas foram manipuladas no Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

**Procedimento cirúrgico.** Para a realização da incisão cirúrgica foi feita uma anestesia dissociativa utilizando cloridrato de xilazina a 2% e cetamina a 10%, administrados por via intramuscular, nas doses de 20mg/kg e 100mg/kg, respectivamente. Após os animais foram posicionados em decúbito ventral e submetidos à antissepsia com clorexidina 2% e tricotomia das regiões torácicas dorso laterais direita e esquerda. Com auxílio de um *punch* dermatológico com 8mm de diâmetro foram realizadas duas incisões de pele e tela subcutânea no antímero direito e esquerdo, com distância mínima de 2cm, ficando exposta a fáscia muscular adjacente. Foram formados dois grupos: As feridas do lado esquerdo formando o grupo controle e as feridas do lado direito formando o grupo tratado. Após a mensuração das áreas com paquímetro digital, cada falha cutânea recebeu o tratamento de acordo com a metodologia estabelecida para cada grupo experimental:

Grupo tratado (GT): aplicação tópica uma vez ao dia da pomada contendo 10% do óleo essencial da folha de *Curcuma longa*;

Grupo controle (GC): aplicação tópica uma vez ao dia da pomada contendo apenas o veículo;

Durante o tratamento foi dispensado, em cada ferida, 0,2mL de pomada nos diferentes grupos, com auxílio de seringa descartável de 1,0mL, garantindo que a quantidade utilizada fosse igual para todos os animais. Os animais foram avaliados nos dias 3, 7, 14 e 21 de pós-operatório (PO).

**Avaliação clínica dos animais e das feridas.** As avaliações clínicas foram realizadas diariamente, observando-se o estado geral dos animais, a

presença de hiperemia, edema, secreção, prurido, crosta, contração, tecido de granulação e tecido cicatricial.

**Avaliação do fechamento das feridas.** A mensuração da área das feridas ao longo do experimento foi feita com o auxílio de um paquímetro digital milimetrado para o acompanhamento da cinética de fechamento das mesmas, utilizando-se a seguinte fórmula para determinação da área de uma elipse:  $[(\text{diâmetro maior}/2) \times (\text{diâmetro menor}/2) \times \text{Pi}]$ , onde Pi é aproximadamente igual a 3,14. A fim de normalizar os dados, os resultados foram expressos como porcentagem de fechamento relativo ao tamanho original da ferida, utilizando-se a seguinte fórmula:  $[1 - (\text{área da ferida}) / (\text{área original da ferida}) \times 100]$ . As medidas foram feitas nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 após a confecção das feridas.

**Avaliações histomorfológica e histométrica.** As avaliações histológicas foram realizadas no 3º, 7º, 14º e 21º dias de PO. Foram coletados fragmentos de pele obtidos através de incisão elíptica, abrangendo a pele íntegra e todo o tecido em processo de cicatrização. O material coletado foi imediatamente fixado em formol tamponado a 10%, permanecendo por 24 horas. Após esses procedimentos, os fragmentos foram clivados e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados pelo Xilol, impregnados pela parafina líquida em estufa regulada à temperatura de 59º C e incluídos em parafina. Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo rotativo do tipo *Minot*, ajustado para 5 micrômetros de espessura, em modelo RM2125RT da Leica®. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas de vidro e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37 °C, durante 24 horas, para secagem e colagem, conforme metodologia de Molinaro et al. (2010). Em sequência, os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E) para análise histomorfológica e histométrica.

Para avaliação microscópica da evolução da cicatrização utilizou um sistema digitalizador e analisador de imagens onde estas foram capturadas por câmera Leica ICC50 HD e digitalizadas por computador através de Software Leica LAS EZ. As fotomicrografias obtidas foram analisadas pelos programas ImageLab, versão 6.0 para quantificação de vasos sanguíneos, que foi realizada com o auxílio do contador manual.

A análise morfológica do tecido em cicatrização foi realizada por escores, em lâminas coradas em HE fazendo-se uma varredura em todo o



processo cicatricial em diferentes objetivas e campos e avaliando os parâmetros abaixo, segundo protocolo descrito por Estevão et al, 2019.

**Delineamento e Análise Estatística.** O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), dividido em parcelas compostas por dois tratamentos: (GT e GC), avaliados nos dias 3, 7,14 e 21 de pós-operatório. A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism 5.0 com os dados obtidos das variáveis: contração das feridas e contagem de vasos sanguíneos nos dias 3, 7,14 e 21 de PO. Os dados foram submetidos à análise de variância, através do Two-way ANOVA complementada pelo teste de Tukey, com significância de 5% ( $p < 0,05$ ), conforme Guimarães & Sarsfield (2007).

## RESULTADOS

### Perfil químico do óleo essencial das folhas de *Curcuma longa*

O óleo essencial (OE) das folhas frescas de *Curcuma longa* foi obtido com 0,347% de rendimento. Foram identificados vinte compostos, representando 98,52% do óleo essencial; seus índices de retenção e percentual são apresentados na Tabela 1. Os componentes identificados com maior percentual de concentração de acordo com seus índices de retenção foram  $\alpha$ -Phellandrene (33,19%), Terpinolene (29,00%) e  $\beta$ -Phellandrene (13,315).

**Tabela 1** - Composição química dos óleos essenciais de *Curcuma longa*

	Compostos	IR <sup>a</sup>	IR <sup>b</sup>	%
1.	$\alpha$ -Pinene	921	932	1.90
2.	Verbenene	959	961	0.37
3.	Sabinene	966	969	4.73
4.	$\beta$ -Pinene	975	972	2.28
5.	Myrcene	988	988	0.19
<b>6.</b>	<b><math>\alpha</math>-Phellandrene</b>	<b>997</b>	<b>1002</b>	<b>33.19</b>
7.	Mentha-1(7),8-diene	1000	1003	0.49
8.	$\alpha$ -Terpinene	1007	1014	1.93
9.	<i>p</i> -cymene	1014	1020	1.70
10.	<i>Trans</i> -Rose oxide	1018	1122	2.72
<b>11.</b>	<b><math>\beta</math>-Phellandrene</b>	<b>1021</b>	<b>1025</b>	<b>13.31</b>
12.	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimene	1033	1032	0.40

13.	$\gamma$ -Terpinene	1045	1059	2.35
<b>14.</b>	<b>Terpinolene</b>	<b>1073</b>	<b>1086</b>	<b>29.00</b>
15.	<i>p</i> -Mentha-2,4(8)-diene	1088	1085	0.84
16.	Menthol	1167	1167	0.37
17.	$\alpha$ -Terpineol	1181	1186	0.62
18.	$\beta$ -Caryophyllene	1429	1424	1.53
19.	<i>ar</i> -Curcumene	1478	1479	0.39
20.	$\alpha$ -zingiberene	1480	1493	0.23
	Total			98.52
	Monoterpenos			96.38
	Sesquiterpenos			2.15

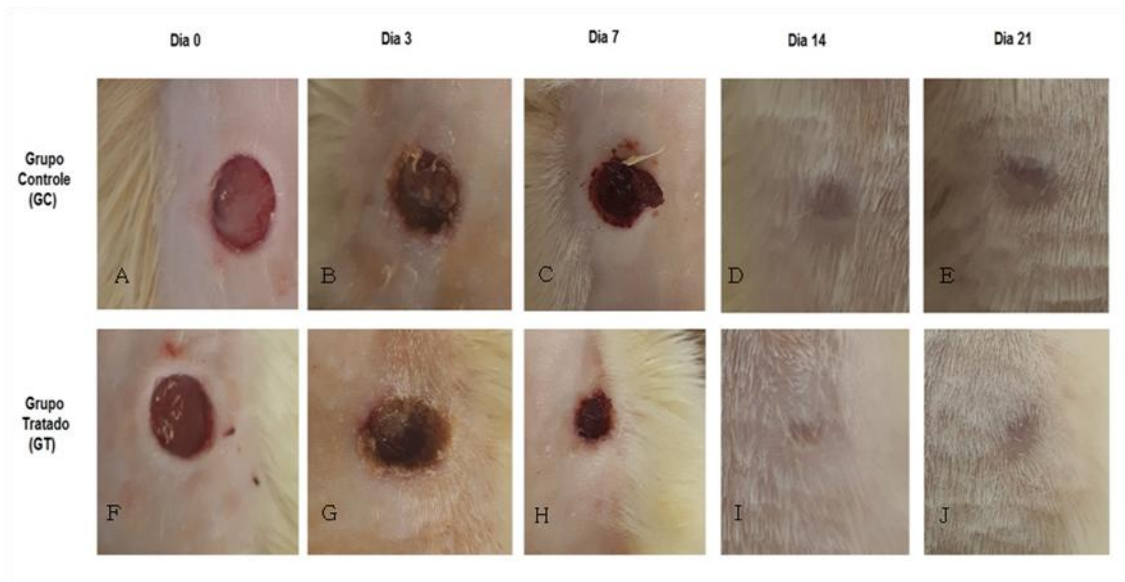
<sup>a</sup> Índices de retenção calculados a partir dos tempos de retenção em relação aos de uma série de n-alcenos em uma coluna capilar DB-5 de 30m. <sup>b</sup> Índices de retenção linear da literatura. IR = índice de retenção.

#### **Avaliação macroscópica:**

Macroscopicamente as feridas, nos GT e GC, apresentaram-se limpas, sem sangramento, com pouca ou nenhuma hiperemia e pouco ou nenhum edema em todos os animais durante o experimento.

Ambos os grupos apresentaram formação de crosta escura e firme recobrendo toda a área da ferida. No grupo controle a camada de crosta foi mais evidente a partir do 3º dia de pós-operatório (PO) evoluindo para uma crosta irregular no 7º dia de PO. No grupo tratado a camada ficou igualmente mais evidente no 3º dia pós-cirúrgico, porém reduziu de tamanho e se apresentou mais uniforme no 7º dia PO. No 14º dia após a cirurgia, todos os animais apresentaram área das feridas completamente reepitelizadas, exceto um animal do grupo controle. No 21º dia de PO, as feridas já estavam completamente fechadas. As feridas do GT apresentaram menor área de cicatriz quando comparadas com o GC, nos dias 14 e 21 de PO (Fig.1).

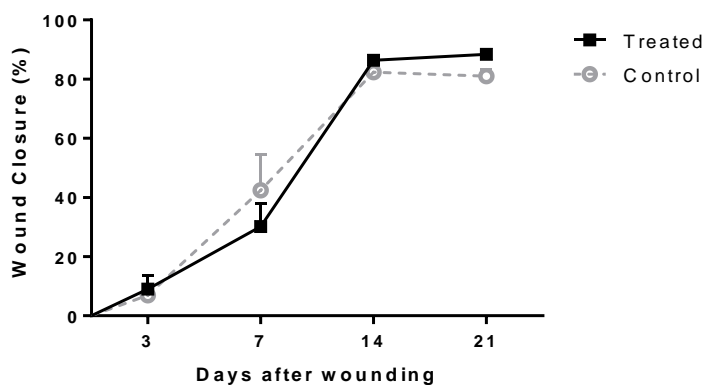
**Figura 1** - Aspectos macroscópicos das lesões dos grupos GC e GT. Observar a crosta menos espessa e de coloração clara na figura (B e G) do dia 3 de PO. Observar no dia 7 na figura (C) a ferida apresenta uma crosta mais escura, irregular e com diâmetro maior do que a figura (H). No dia 14 e 21 observamos a figura (I e J) com menor área de cicatrização quando comparada com as figuras (D e E).



#### Avaliação da contração da ferida:

A contração das feridas ocorreu em todos os grupos a partir do 3º dia pós-operatório. Não houve diferença estatística entre os grupos.

**Gráfico 1** - Cinética da contração da ferida em grupos tratados com *Curcuma longa* e controle. Os resultados do fechamento da ferida foram expressos como contração percentual em relação ao tamanho original ([área da ferida inicial] - [área da ferida final] / [área da ferida inicial] × 100). Os dados representam a média ± DP, n = 10 feridas para cada tempo pós operatório e grupo. (Two-way ANOVA).



### **Avaliação histomorfológica e histométrica:**

As análises histomorfológicas foram mensuradas em escores de acordo com protocolo descrito por Estevão et al. (2019).

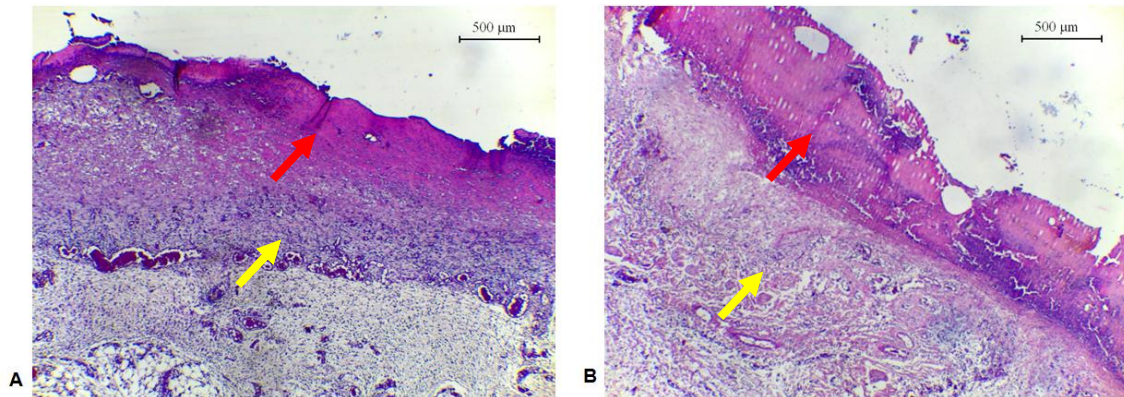
Na avaliação da formação crostosa no 3º e 7º dia PO, o GT apresentou, em média, formação moderada de crosta enquanto as feridas do grupo controle apresentaram crostas com formação moderada à intensa (Fig. 2). No 14º e 21º dias PO as crostas já se apresentava ausentes em todas as feridas.

Com relação à reepitelização, avaliado pela presença e tamanho da língua epitelial em formação, pôde-se notar tanto no grupo tratado quanto no controle uma reepitelização ausente à discreta no 3º dia PO, seguindo a moderada no 7º dia PO em ambos os grupos (Figura 3). No 14º e 21º dias PO todas as feridas já se apresentavam completamente epitelizadas.

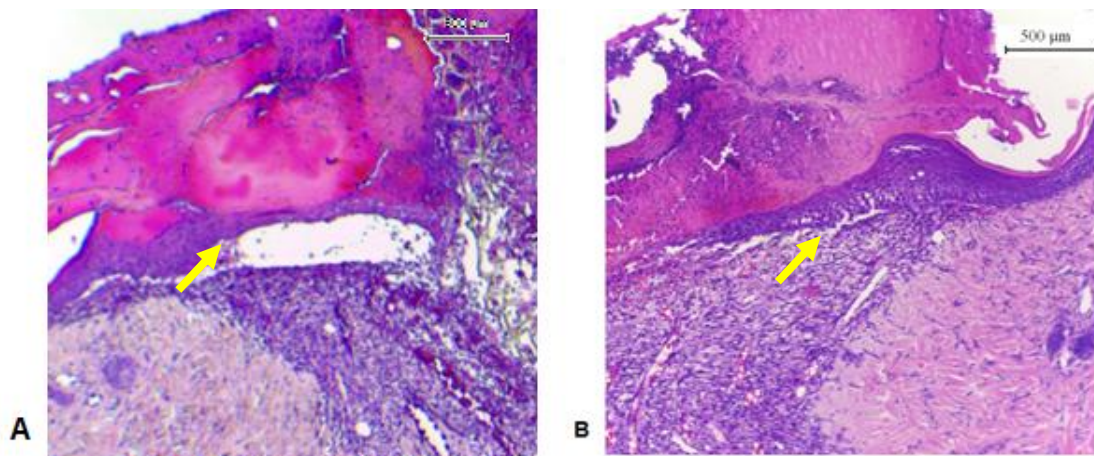
O processo inflamatório é avaliado pela concentração de células inflamatórias no local da lesão e apresentou características moderada à intensa, no 3º dia PO e intensa no 7º dia PO em ambos os grupos. No 14º dia PO, o GC apresentou uma inflamação ainda moderada, diferente do GT que já se apresentava discreta (Figura 4). O mesmo aconteceu ao 21º dia PO (Figura 5).

A vascularização também foi avaliada pela intensidade de vasos neoformados no tecido em formação. A angiogênese foi mais marcante em todos os tempos no GC. No 3º dia PO esta se mostrou intensa no GC e moderada no GT. Foi possível observar neste tempo que o GT apresentou vasos neoformados com menor diâmetro quando comparados ao GC (Figura 6). No 14º e 21º dias PO a angiogênese diminui em ambos os grupos, porém o GC ainda apresenta maior escore. Observou-se MEC mais preenchida no GT (Figura 7).

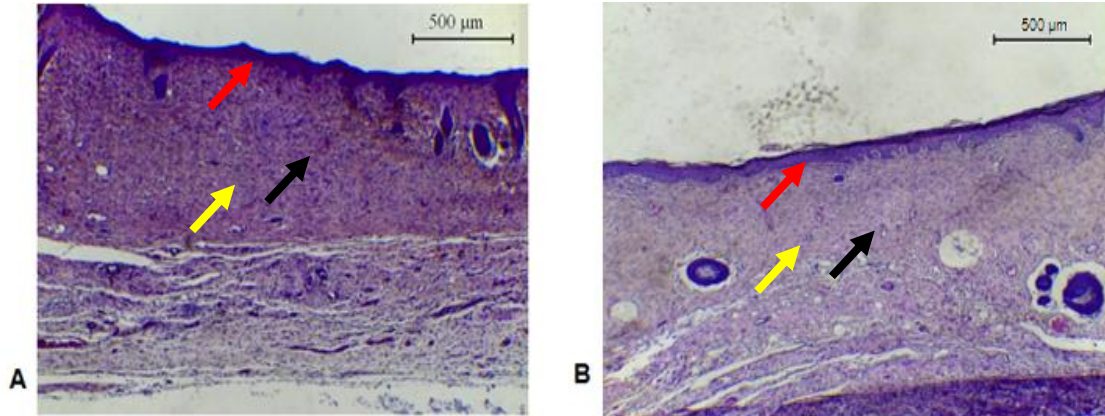
**Figura 2** - Fotomicrografias de cortes histológicos da pele de ratos Wistar com três dias de pós-operatório. Observar crostas (setas vermelhas) em moderada e acentuada quantidade nos animais dos grupos controle (A) e tratado (B), respectivamente. Presença do tecido inflamatório (setas amarelas) em exacerbada e média quantidade nos animais dos grupos controle (A) e tratado (B), respectivamente. Coloração H.E. (barra= 500  $\mu$ m).



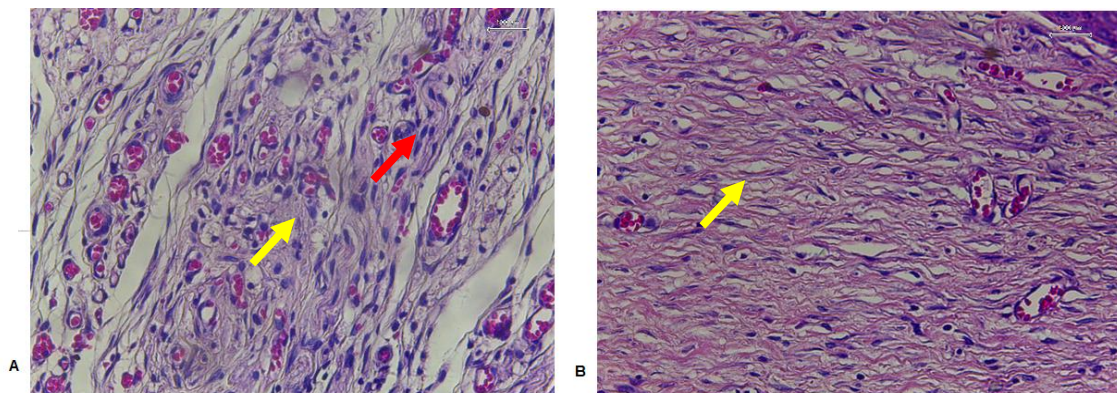
**Figura 3** - Fotomicrografias de cortes histológicos da pele de ratos Wistar com sete dias de pós-operatório. Observar a língua epitelial em formação discreta (seta amarela) nos animais dos grupos controle (A) e tratado (B). Coloração H.E. (barra= 500  $\mu$ m).



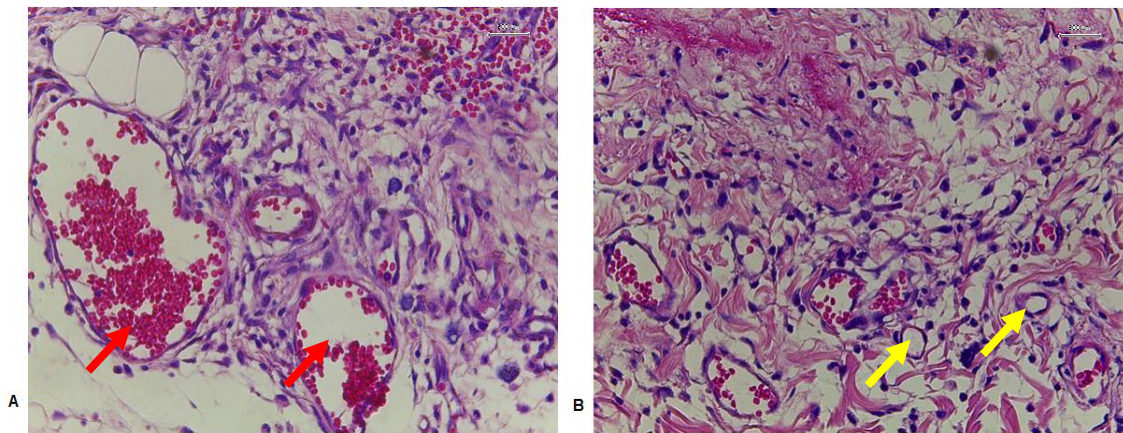
**Figura 4** - Fotomicrografias de cortes histológicos da pele de ratos Wistar com 14 dias de pós-operatório. Observar uma maior organização das fibras colágenas neoformadas (seta amarela) nos animais do grupo tratado (B) do que no grupo controle (A). Tecido inflamatório (setas pretas) discreto no grupo tratado (B) e mais acentuado no grupo controle (A). Reepitelização completa (seta vermelhas) em ambos os grupos. Coloração H.E. (barra= 500  $\mu$ m).



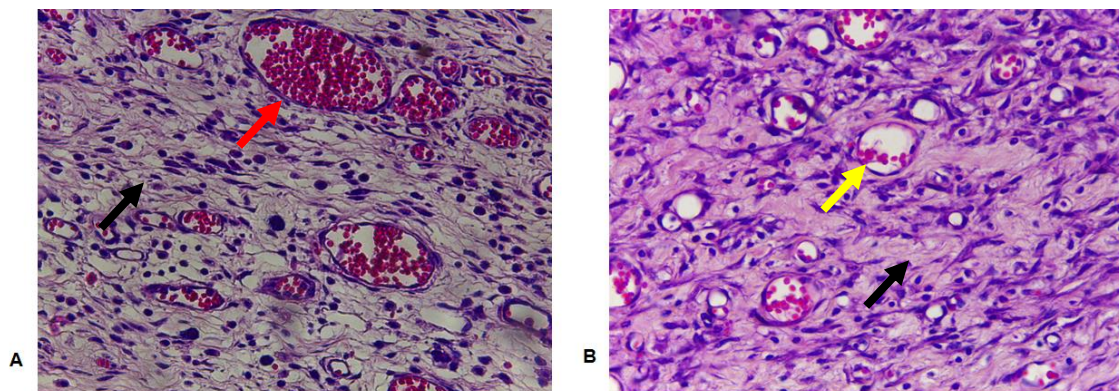
**Figura 5** - Fotomicrografias de cortes histológicos da pele de ratos Wistar com 21 dias de pós-operatório. Observar uma maior organização das fibras colágenas neoformadas (seta amarelas) no grupo tratado (B) e menor organização no grupo controle (A). Observa presença branda de tecido inflamatório (setas vermelhas) no grupo controle (A) e ausência desse tecido no grupo tratado (B) Coloração H.E. Aumento 400x.



**Figura 6** - Fotomicrografias de cortes histológicos da pele de ratos Wistar com três dias de pós-operatório. Observar a presença de vasos recém-formados de menor diâmetro (seta amarelas) no grupo tratado (B) e capilares recém-formados, dilatados no grupo controle (A) (setas vermelhas). Coloração H.E. Aumento 400x.

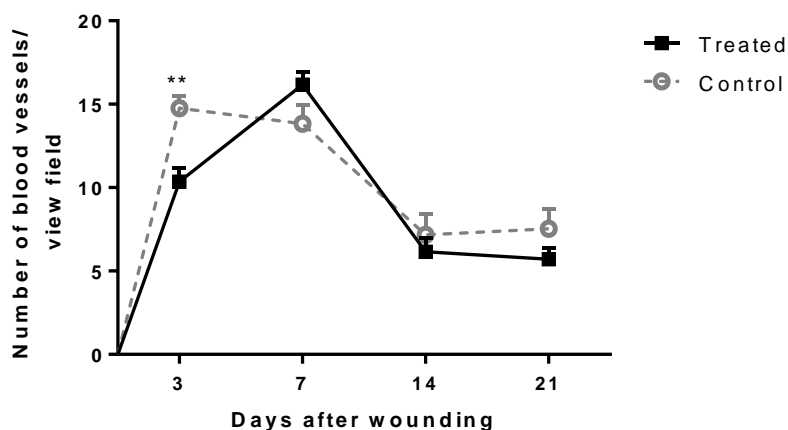


**Figura 7** - Fotomicrografias de cortes histológicos da pele de ratos Wistar com sete dias de pós-operatório. Observar a presença de capilares recém-formados de menor diâmetro (seta amarela) no grupo tratado (B) e de maior diâmetro (seta vermelha) no grupo tratado (A). Observa maior preenchimento da matriz extra celular (seta preta) no grupo tratado (A) comparado com o controle (B). Coloração H.E. Aumento: 400x.

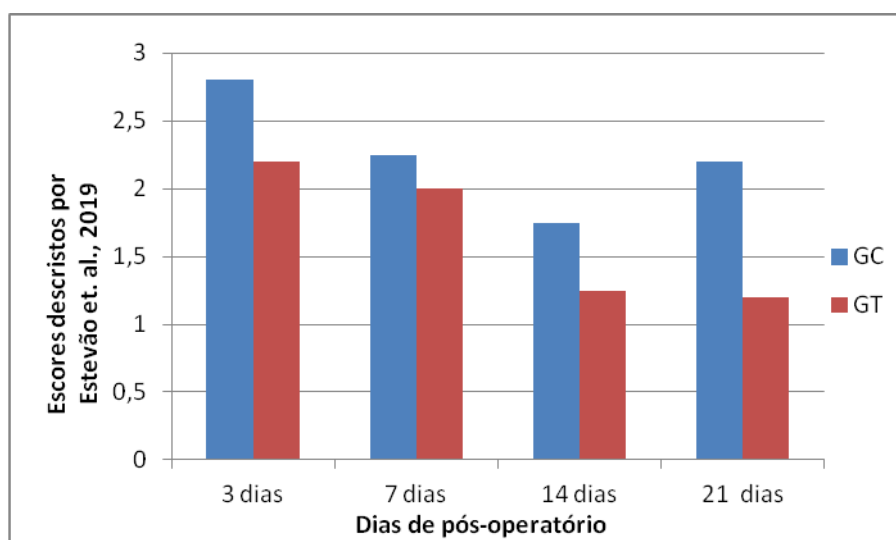


Na contagem de vasos sanguíneos o GC apresentou maiores valores quando comparados com o GT, mostrando diferença significativa no 3º dia de PO (Gráfico 2).

**Gráfico 2** - Quantidade mediana de vasos sanguíneos em feridas cutâneas em ratos nos grupos tratado (GT) e controle (GC), nos dias 3, 7, 14 e 21 de pós-operatório. Observar significativa diferença em quantidade de vasos no dia 3 de PO do GC em relação ao GT. Os dados representam a média  $\pm$  SEM, n = 5 feridas para cada tempo pós operatório e grupo. \*\* p <0,01 grupo tratado versus grupo controle no 3º dia PO (Two-way ANOVA).

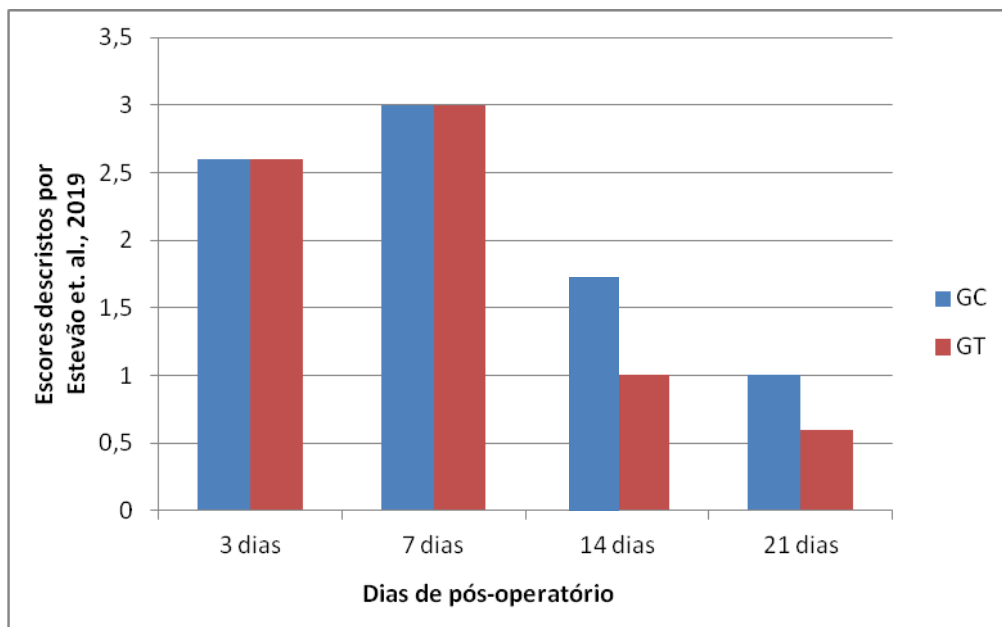


**Gráfico 3** – Mensuração em escores da angiogênese, de acordo com protocolo descrito por Estevão et al, 2019, em feridas cutâneas em ratos nos grupos tratado (GT) e controle (GC), nos dias 3, 7, 14 e 21 de pós-operatório. Observa maior angiogênese no GC do que no GT em todos os dias avaliados.





**Gráfico 4** – Mensuração em escores do tecido inflamatório, de acordo com protocolo descrito por Estevão et al, 2019, em feridas cutâneas em ratos nos grupos tratado (GT) e controle (GC), nos dias 3, 7, 14 e 21 de pós-operatório. Observar maior presença de tecido inflamatório nos dias 14 e 21 de PO no GC em relação ao GT.



## DISCUSSÃO

Os componentes majoritários:  $\alpha$ -Phellandrene (33,19%), Terpinolene (29,00%) e  $\beta$ -Phellandrene (13,315%) encontrados já foram relatados como principais constituintes do óleo de folhas por Kumar (2018), Priya (2012) e Parveen (2013), porém em concentrações diferentes. Fatores ambientais como fotoperíodo, temperatura, umidade, precipitação, condições do solo, e a intensidade da radiação solar podem influenciar a biossíntese de óleos essenciais (SILVA et al., 2016). Akbar et al. (2018) observaram que o teor do óleo essencial extraído dos rizomas do Açafrão da Terra foi influenciado pela umidade relativa do ar e pela precipitação média. O que justifica as diferentes concentrações dos componentes majoritários encontradas pelos autores e nesse estudo.

Segundo Agil (2007), os terpenos são a categoria mais avançada e comprovada de intensificadores de penetração química transepidérmica e são considerados seguros pela Food and Drug Administration. Além disso, o óleo essencial das folhas do Açafrão de Terra possuem ações comprovadas como

antimicrobianos (PARVEEN et al., 2013), bom potencial anti-inflamatório (KUMAR et al., 2018) e efeito antioxidante (PRIYA et al., 2012).

Parveen et al. (2013) testou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de *C. longa*, mostrando que o óleo apresenta atividade antibacteriana e antifúngica significativa contra patógenos humanos, dentre eles, *Fusarium miniformes*, *Bacillus subtilis*. Kumar et al. (2018), investigou o potencial anti-inflamatório in vitro e in vivo do óleo essencial das folhas de *C. longa* revelando que este tem ação em citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL1- $\beta$ ) e melhora a inflamação da pele sem qualquer efeito tóxico sobre a mesma. Priya et al. (2012) demonstraram que o óleo essencial da folha de *C. longa* tem potencial para um potente antioxidante natural. Segundo Kulac et al. (2013) um bom agente para cicatrização de feridas protege o tecido de infecção bacteriana, reduz a inflamação, atua como anti-oxidante e induz a proliferação celular para ajudar na reconstrução de tecidos danificados.

A cicatrização de feridas cutâneas segue um padrão fisiológico onde é possível observar fases de hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (BALBINO et al., 2005). O tempo cicatricial depende de fatores diversos, dentre eles, o tamanho, local e tipo de ferimento, fatores de agressão como corpos estranhos, infecções, suprimento sanguíneo adequado, dentre outros. Neste experimento, seguimos um padrão de feridas cutâneas excisionais, padronizadas por protocolo descrito por Estevão et al. (2019). Por este modelo é possível testar medicamentos diversos com potencial cicatrizante.

A inflamação é uma fase crucial da cicatrização de feridas, muitas vezes descrito como primeiro passo para uma regeneração ideal da pele (AKBIK et al., 2017), porém respostas inflamatórias não controladas podem levar a efeitos indesejáveis e subsequentemente danos aos tecidos (JOE et al., 2004). Nossos resultados demonstraram uma ação anti-inflamatória importante deste óleo, com diminuição de crosta, diminuição de células inflamatórias e diminuição de vasos sanguíneos corroborando com os achados de Kumar et al. (2018). Estes resultados divergem de algumas pesquisas utilizando o extrato da Cúrcuma. Miah et al. (2017), trabalharam com extrato etanólico de curcumina na cicatrização de feridas. Seu estudo histopatológico revelou uma

menor inflamação no grupo controle nos dias 3 e 7 de PO em comparação com o grupo tratado.

Substâncias com o potencial anti-oxidante favorecem o processo de cicatrização, visto que os radicais livres são considerados a principal causa de inflamação durante o processo de cicatrização de feridas (MOHANTY et al., 2012). Considerando ainda que a lesão tecidual causa no início um quadro agudo de inflamação, controlar possíveis infecções por microrganismo pode potencializar o processo de reparo cicatricial (JOE et al., 2004).

Priya et al. (2012) mostraram que óleo essencial da folha de *Curcuma* pode servir como antioxidante e prevenir danos mediados pelo estresse oxidativo. Parveen et al. (2013) verificou que o óleo essencial das folhas da *Cúrcuma* apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*; *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurim* e antifúngica contra *Aspergillus Níger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ficuum* e *Fusarium miniformes*. Por apresentar efeitos anti-oxidantes e ação antibacteriana e antifúngica é possível que a pomada contendo o óleo essencial das folhas da *Cúrcuma* tenha auxiliado no controle da fase inflamatória, possibilitando uma melhor resposta cicatricial, reduzindo a inflamação nos dias 14 e 21 de PO.

A angiogênese é fundamental para os processos de cura de tecidos, pois auxilia no transporte de oxigênio e no transporte de células. Os fatores de crescimento e outros mediadores estimulam as células endoteliais dos vasos intactos dentro das margens da ferida, a migrarem para a área lesada, diferenciando-se para formar novos capilares que brotam no lado externo dos vasos. Estes juntam-se aos capilares originais e restauram o fluxo sanguíneo (BALBINO et al., 2005). Apesar do GT ter apresentado medias inferiores ao GC na formação de novos vasos, esses demonstraram ser suficiente para manter o processo de cicatrização, no controle da inflamação e com epitelização em tempo adequado.

## **CONCLUSÃO**

Após análise dos resultados obtidos neste experimento, concluímos que a pomada contendo óleo essencial das folhas de *Curcuma longa* a 10% auxiliou na resposta inflamatória do processo cicatricial, embora não sendo suficiente para melhorar a cinética de fechamento da ferida. Novos

experimentos deverão ser realizados para determinar a melhor concentração deste óleo no reparo tecidual de ferimentos cutâneos.

## REFERÊNCIAS:

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.
- AKBAR, A.; KUANAR, A.; PATNAIK, J.; MISHRA, A.; NAYAK, S. Application of artificial neural network modeling for optimization and prediction of essential oil yield in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Computers and Electronics in Agriculture**. v.148, p.160-178, 2018..
- AKBIK, Dania; GHADIRI, Maliheh; CHRZANOWSKI, Wojciech; ROHANIZADEH, Rohanzadeh. Curcumin as a wound healing agent. **Life Sciences**, v.116, n.1, p.1-7, 2014.
- ARAÚJO, L.; ARAÚJO, R.; GOMES, F.; LEMES, S.; ALMEIDA, L.; MAIA, L.; GONÇALVES, P.; MRUÉ, F.; SILVA-JUNIOR, N.; MELO-REIS, P. Physicochemical/photophysical characterization and angiogenic properties of *Curcuma longa* essential oil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.88, n.3, p.1889-1897, 2016.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, p.27-51, 2005.
- BRANDÃO, M.L.; REIS, P.R.; ARAÚJO, L.A.; ARAÚJO, A.C.; SANTOS, M.H.; MIGUEL, M.P. Evaluation of wound healing treated with latex derived from rubber trees and Aloe Vera extract in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.31, n.9, p.570-577, 2016.
- ESTEVIÃO, L.R.M.; MENDONÇA, F. S.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, R. S.; BARROS, M. E.G.; ARANTES, R.; RACHID, M.; EVÊNCIO-NETO, J. Effects of aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) oil on cutaneous wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.28, n.3, p.202-209, 2013.
- ESTEVIÃO, L.R.M.; CASSINI-VIEIRA, P.; LEITE, A.G.B.; BULHÕES, A.A., BARCELOS, L.S.; EVÊNCIO-NETO, J. Morphological Evaluation of Wound Healing Events in the Excisional Wound Healing Model in Rats. **Bio-protocol**, v.9, n.13, p.e3285. 2019.
- FERREIRA, Flavio; KEMMELMEIER, Carlos; ARROTÉIA, Carla; DA COSTA, Christiane.; MALLMANN, Carlos; JANEIRO, Vanderly; FERREIRA, Francine; MOSSINI, Simone; SILVA, Expedito; MACHINSKI, Miguel. Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. **Food Chemistry**, v.136, n.2, p.789-793, 2013.
- GHOSH, P. K.; GABA, A. Phyto-extracts in wound healing. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n.5, p.760-820, 2013.
- GUERRA, A.; BELINHA, J.; JORGE, R.N. Modelling skin wound healing angiogenesis: A review. **Journal of theoretical biology**, v.459, p.1-17, 2018.

GUIMARÃES R.C. & Sarsfield Cabral J.A. 2007. Estatística. 2ª ed. McGraw-Hill, p. 1-13. Disponível em: <<http://www.mat.uc.pt/~cmtm/ECwww/ANOVA.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2019.

JOE, B.; VIJAYKUMAR, M.; LOKESH, B. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v.44, p. 97–111, 2004.

KUANAR, Ananya; MOHANTY, Sujata; PANDA, Manoj; NAYAK, Sanghamitra. Essential oils from leaves of micropropagated turmeric. **Current Science**, v. 96,n.9, p.1166, 2009.

KULAC, M.; AKTAS, C.; TULUBAS, F.; UYGUR, R.; KANTER, M.; ERBOGA, M. The effects of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats. **Journal of Molecular Histology**. v.44, p.83–90, 2013.

KUMAR, A.. Essential oil from waste leaves of *Curcuma longa* L. alleviates skin inflammation. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 5, p. 1245-1255, 2018

MATA, A.; NELSON, D.; AFONSO, R.; GLÓRIA, M.; JUNQUEIRA, R.. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n. 1, p.151-157, 2004.

MIAH, M. A. H.; HASAN, M.; SARKER, Y. A.; ALAM, M. M.; JUYENA, N. S. Clinical evaluation of ethanolic extract of curcumin (*Curcuma longa*) on wound healing in Black Bengal goats. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**. v.4, n.2, p.181-186, 2017.

MOHANTY, C.; DAS, M.; SAHOO, S. Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model. **Molecular Pharmaceutics**. v.9, p. 2801–11, 2012.

MOLINARO, E. M.. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 1 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2009.

OLIVEIRA, A. C. D.; ROPKE, C. D. Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, 2016.

PARVEEN, Zahida; NAWAZ, S ; SIDDIQUE, S ; SHAHZAD, K. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Leaves of *Curcuma longa* L. Kasur Variety. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.75, n.1, p.117-122, 2013.

PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; SALGADO, A. P. S. P.; AGUIAR, P. M.; SILVA, V. F.; DE MORAIS, A. R.; NELSON, D. L. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 373-375, 2006.

PRIYA, R.; PRATHAPAN, A.; RAGHU, K.; MENON, A. Chemical composition and in vitro antioxidative potential of essential oil isolated from *Curcuma longa* L. leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.2, p.S695-S699, 2012.

RAGAGNIN, R. C. G. **Efeito do estresse salino no crescimento e na qualidade do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer.** 2013. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró.

SILVA, E. A. J. D.; SILVA, V. P. D., ALVES, C. C. F., ALVES, J. M., SOUCHIE, E. L., & BARBOSA, L. C. D. A.. Harvest time on the content and chemical composition of essential oil from leaves of guava. **Ciência Rural**, v.46, n10, p.1771-1776, 2016.

SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G.; DECOTÉ, D.; LIMA, M.. Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v.38, n.4, p.538-552, 2015.

VAN DEN DOLL H.; KRATZ, P. D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.11, p. 463-471, 1963.

## **Considerações finais**

Após análise dos resultados obtidos neste experimento, concluímos que o óleo essencial do Açafrão da Terra (*Curcuma longa*) tem alto rendimento, apresenta em sua composição substâncias com ótimo potencial terapêutico e a pomada contendo óleo essencial das folhas de *Curcuma longa* a 10% auxiliou na resposta inflamatória do processo cicatricial, embora não sendo suficiente para melhorar a cinética de fechamento da ferida. Sugerimos que novos experimentos deverão ser realizados para determinar a melhor concentração deste óleo no reparo tecidual de ferimentos cutâneos.