



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE
HUMANA E ANIMAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL

LETÍCIA CAVALCANTE NOLÊTO TRAJANO SILVA

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DO ÓLEO DE
EUCALIPTO (*EUCALYPTUS RADIATA*) EM FERIDAS DERMATOLÓGICAS

FORTALEZA - CEARÁ

2022

LETÍCIA CAVALCANTE NOLÊTO TRAJANO SILVA

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DO ÓLEO DE
EUCALIPTO (*EUCALYPTUS RADIATA*) EM FERIDAS DERMATOLÓGICAS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo José Vieira.

FORTALEZA – CEARÁ

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Noletto, Leticia Cavalcante.

Avaliação e caracterização do efeito cicatrizante do óleo de eucalipto (*eucalyptus radiata*) em feridas dermatológicas) [recurso eletrônico] / Leticia Cavalcante Noletto. - 2022. 61 f. : il.

Dissertação (MESTRADO PROFISSIONAL) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Programa de Pós-graduação Em Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal Nível Mestrado, Fortaleza, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Romulo Jose Vieira.

1. *Eucalyptus radiata*. 2. Feridas. 3. Cicatrização. 4. Creme. I. Título.

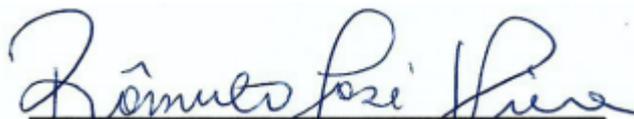
LETÍCIA CAVALCANTE NOLÊTO TRAJANO SILVA

AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DO ÓLEO DE
EUCALIPTO (*EUCALYPTUS RADIATA*) EM FERIDAS DERMATOLÓGICAS

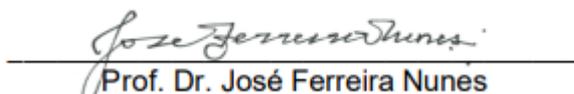
Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 01 de setembro de 2022

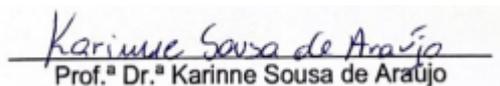
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rômulo José Vieira (Orientador)
Universidade Federal do Piauí – UFPI



Prof. Dr. José Ferreira Nunes
Universidade Estadual do Ceará – UECE



Prof.ª Dr.ª Karinne Sousa de Araújo
Centro Universitário UNIFACID



Prof.ª Dr.ª Janaína de Fátima Saraiva Cardoso
Universidade Federal do Piauí – UFPI



Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Dedico a presente dissertação aos meus pais Edilberto e Iara por sempre acreditarem em mim e, serem meus maiores incentivadores.

Aos meus irmãos Maurício e Gustavo, pelo carinho e incentivo a mim dedicados.

Ao meu esposo Wagner e minhas filhas Edna, Alice e Lara, por todo amor, incentivo, apoio e compreensão. Nada disso teria sentido se não fosse vocês em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha maior fonte de inspiração e sustento em todos os momentos em que a fraqueza humana tentou me consumir.

Aos meus pais, irmãos, filhas, esposo, foi por vocês, para vocês e sempre será. A toda minha rede de apoio sogra, cunhadas e sobrinhos, o que seria de mim não fosse o apoio de todos vocês.

Aos mestres por serem exemplo de sabedoria, persistência e dedicação. Em especial ao meu orientador Professor Dr. Rômulo José Vieira por ter acreditado e confiado a mim a missão de executar este trabalho. Sua confiança, dedicação e esforço junto a mim ao longo deste caminho foram fundamentais para chegarmos onde estamos hoje. Sem os seus ensinamentos, a sua cordialidade e prestígio o caminho teria se tornado menos leve. Obrigada mestre amigo!

Um obrigada especial aos colaboradores Daniel, Cláudio e Sr. Cabral vocês foram fundamentais no processo de execução da pesquisa junto ao Biotério da Universidade Estadual do Piauí.

Meus queridos amigos da Farmácia de manipulação Medpharma, e Indústria Farmacêutica Laboratório Sobral os meus mais sinceros agradecimentos, palavras são poucas para expressar a minha gratidão por toda a contribuição à esta pesquisa.

A querida Ana Cláudia, seu profissionalismo e experiência foram fundamentais, fez todo o sentido para a finalização de todo o processo. Bem como as professoras Karine e Ana Lys, grandes mestres e fonte de inspiração para mim. Gratidão!

“A persistência é o caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

O *Eucalyptus radiata* é uma espécie vegetal originária da Austrália, ecologicamente importante que destaca-se por ser uma fonte economicamente rentável de óleos essenciais (OE) com potenciais atividades biológicas como ação antiinflamatória, antioxidante, analgésica, redutora de fadiga, hipoglicemiante, inseticida e bactericida que em geral são atribuídas a composição bioquímica presente no OE, sobretudo ao composto majoritário 1,8-cineol. Contudo, inexistem estudos investigando o possível potencial cicatrizante do OE de *E. radiata*, o que torna esta planta um importante alvo para pesquisas que almejam a prospecção de novas formulações terapêuticas. Desse modo, o presente estudo teve por objetivo caracterizar o efeito cicatrizante do OE de *E. radiata* em feridas dermatológicas. Para tanto, foi elaborado um creme de uso tópico com OE de *E. radiata*, que foi submetido a caracterização físico-química e a análise *in vivo* (*Rattus norvegicus*) para verificar possíveis efeitos de cicatrização quando aplicado em feridas dermatológicas, além de ter sido mensurado o fechamento das feridas infligidas no modelo murino. Como resultados pode-se evidenciar que o creme elaborado com o OE de *E. radiata* (1,5, 3,5 e 5%) apresentou aspecto homogêneo característico de emulsão fase oleosa/aquosa (O/A), sem presença de grumos, quanto ao pH e a densidade, não houve grandes variações entre as formulações com diferentes percentuais do OE da *E. radiata*, sendo que todas as formulações apresentaram caráter ácido de pH (3,82 - 3,90). No teste de estabilidade acelerada, observou-se que o creme com OE de *E. radiata* não apresentou alterações significativas no aspecto, cor e odor e não houve variação nos valores obtidos de pH e densidade. Portanto, o processo de utilização do OE de *E. radiata* na formulação de um creme apresentou-se ser viável, mantendo o odor característico do óleo. O creme apresentou boa compatibilidade com o OE de *E. radiata*, obteve adequada espalhabilidade, não apresentou mudança de coloração, mantendo se constante sua estabilidade na maioria dos testes realizados. O gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata*, neste trabalho, demonstrou ter potencial de estimular e favorecer o processo de cicatrização *in vivo* em ratos *Rattus norvegicus*, modelo animal.

Palavras-chave: *Eucalyptus radiata*. Feridas. Cicatrização. Creme.

ABSTRACT

Eucalyptus radiata is an ecologically important plant species native to Australia that stands out for being an economically profitable source of essential oils (EO) with potential biological activities such as anti-inflammatory, antioxidant, analgesic, fatigue-reducing, hypoglycemic, insecticidal and bactericidal action. which are generally attributed to the biochemical composition present in the EO, especially to the major compound 1,8-cineole. However, there are no studies investigating the possible healing potential of *E. radiata* EO, which makes this plant an important target for research aimed at prospecting new therapeutic formulations. Thus, the present study aimed to characterize the healing effect of *E. radiata* EO in dermatological wounds. For this purpose, a topical cream was prepared with *E. radiata* EO, which was subjected to physicochemical characterization and in vivo analysis (*Rattus norvegicus*) to verify possible healing effects when applied to dermatological wounds, in addition to having been wound closure inflicted in the murine model was measured. As a result, it can be seen that the cream made with the EO of *E. radiata* (1.5, 3.5 and 5%) presented a homogeneous aspect characteristic of an emulsion oily/aqueous phase (O/W), without the presence of lumps, as for pH and density, there were no major variations between formulations with different percentages of *E. radiata* EO, and all formulations showed acidic pH character (3.82 - 3.90). In the accelerated stability test, it was observed that the cream with *E. radiata* EO showed no significant changes in appearance, color and odor and there was no variation in the values obtained for pH and density. Therefore, the process of using *E. radiata* EO in the formulation of a cream proved to be viable, maintaining the characteristic odor of the oil. The cream showed good compatibility with the EO of *E. radiata*, obtained adequate spreadability, showed no color change, keeping its stability constant in most of the tests performed. The cream gel based on 5% of *E. radiata* EO, in this work, demonstrated the potential to stimulate and favor the healing process in vivo in *Rattus norvegicus* rats, an animal model.

Keywords: *Eucalyptus radiata*. Feridas. Cicatrização. Creme.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Espécie arbórea <i>Eucalyptus</i> sp..... | 25 |
| Figura 2 - Delineamento experimental da avaliação do potencial de cicatrização do gel creme à base de 5% do OE de <i>Eucalyptus radiata</i> | 32 |
| Figura 3 - Creme a base de óleo essencial de <i>Eucalyptus radiata</i> antes de ser submetido ao processo de centrifugação..... | 34 |
| Figura 4 - Creme a base de óleo essencial de <i>Eucalyptus radiata</i> após ser submetido ao processo de centrifugação..... | 34 |
| Figura 5 - Aspecto e cor do creme a base de 5% do óleo essencial de <i>Eucalyptus radiata</i> | 35 |
| Figura 6 - Aspecto e cor do creme a base de 3% do óleo essencial de <i>Eucalyptus radiata</i> | 35 |
| Figura 7 - Aspecto e cor do creme a base de 1,5% do óleo essencial de <i>Eucalyptus radiata</i> | 35 |
| Figura 8 - Fotomicrografia das lesões infligidas em modelo murino (<i>Rattus norvegicus</i>) do grupo controle (C) e dos grupos de tratados com Bacitracina (B) e Gel creme a base de 5% de óleo essencial de <i>Eucalyptus radiata</i> , ao longo do 4º, 7º e 14º dia de tratamento..... | 37 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| Tabela 1 - | Formulação do creme com respectivas fases e insumos utilizados na formulação e função..... | 29 |
| Tabela 2 - | Resultados da estabilidade preliminar do creme a base de <i>Eucalyptus radiata</i>, leitura inicial do 1º ao 10º dia..... | 34 |
| Tabela 3 - | Índices físico-químicos do creme a base de óleo essencial de <i>Eucalyptus radiata</i>..... | 36 |

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Critérios histopatológicos do processo cicatricial de feridas dermatológicas em grupos experimentais de *Rattus norvegicus* após o 4º dia do evento operatório. C4 (Grupo negativo foi tratado com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%); B4 (Grupo do controle positivo tratado com pomada antibiótica com uma combinação de bacitracina zínica e sulfato de neomicina e E4 (Grupo experimental tratado com gel creme a base de 5% de OE de *E. radiata*)..... 36**
- Quadro 2 - Critérios histopatológicos do processo cicatricial de feridas dermatológicas em grupos experimentais de *Rattus norvegicus* após o 7º dia do evento operatório. C7 (Grupo negativo foi tratado com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%); B7 (Grupo do controle positivo tratado com bacitracina zínica e sulfato de neomicina) e E7 (Grupo experimental tratado com gel creme a base de 5% de OE de *E. radiata*)..... 38**
- Quadro 3 - Critérios histopatológicos do processo cicatricial de feridas dermatológicas em grupos experimentais de *Rattus norvegicus* após o 14º dia do evento operatório. C14 (Grupo negativo foi tratado com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%); B14 (Grupo do controle positivo tratado com bacitracina zínica e sulfato de neomicina) e E14 (Grupo experimental tratado com gel creme a base de 5% de OE de *E. radiata*)..... 39**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| <i>E. radiata</i> | <i>Eucalyptus radiata</i> |
| ERRO | Espécies reativas de oxigênio |
| IL | Interleucina |
| NF-kB | Fator nuclear Kappa-B |
| Nrf2 | Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 |
| O/A | Fase oleosa/aquosa |
| OE | Óleo essencial |
| TNF α | Fator de Necrose Tumoral α |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----|---------------------|
| % | Percentual |
| g | Gramo |
| Kg | Kilograma |
| mg | Miligrama |
| mL | Mililitro |
| °C | Graus Celsius |
| rpm | Rotações por minuto |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2 | JUSTIFICATIVA..... | 18 |
| 3 | REFERENCIAL TEÓRICO | 20 |
| 3.1 | Feridas dermatológicas..... | 20 |
| 3.2 | Cicatrização de feridas..... | 20 |
| 3.2.1 | Hemostasia..... | 21 |
| 3.2.2 | Inflamação..... | 21 |
| 3.2.3 | Proliferação..... | 21 |
| 3.2.4 | Remodelamento..... | 22 |
| 3.3 | Coberturas empregues na cicatrização de feridas..... | 22 |
| 3.4 | Custos do tratamento de feridas dermatológicas..... | 23 |
| 3.5 | Metabólitos secundários e ação cicatrizante..... | 24 |
| 3.6 | Óleo essencial de eucalipto (<i>Eucalyptus</i> sp.) e <i>Eucalyptus radiata</i>..... | 24 |
| 4 | OBJETIVOS..... | 28 |
| 4.1 | Objetivo geral..... | 28 |
| 4.2 | Objetivos específicos..... | 28 |
| 5 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| 5.1 | Óleo essencial de <i>Eucalyptus radiata</i>..... | 29 |
| 5.2 | Preparo do creme..... | 29 |
| 5.3 | Incorporação do óleo essencial de <i>Eucalyptus radiata</i> ao creme..... | 30 |
| 5.4 | Estabilidade da formulação..... | 30 |
| 5.5 | Caracterização físico-química do creme a base do óleo essencial de <i>Eucalyptus radiata</i>..... | 31 |
| 5.5.1 | Teste de centrifugação..... | 31 |
| 5.5.2 | Determinação do pH aparente..... | 31 |
| 5.5.3 | Determinação da densidade..... | 31 |
| 5.6 | Testes <i>in vivo</i> da ação cicatrizante do creme a base de óleo de eucalipto (<i>Eucalyptus radiata</i>)..... | 32 |
| 5.6.1 | Avaliação biológicas..... | 32 |
| 5.6.2 | Análises histológicas..... | 33 |
| 5.6.3 | Aspectos éticos..... | 33 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 6 | RESULTADOS..... | 34 |
| 7 | DISCUSSÃO..... | 40 |
| 8 | CONCLUSÃO..... | 49 |
| 9 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 50 |
| 10 | PERSPECTIVAS..... | 51 |
| | REFERÊNCIAS..... | 52 |
| | ANEXO A – CHROMATOGRAM OE DE <i>E. radiata</i>..... | 60 |
| | ANEXO B - CERTIFICADO DE DEFERIMENTO – CEUA..... | 61 |

1 INTRODUÇÃO

As feridas dermatológicas são enfermidades que em muito deprimem a qualidade de vida dos pacientes acometidos pelas mesmas. Essas injúrias são causadas por diversos fatores como os extrínsecos que podem ser episódios de queda, intervenções cirúrgicas, acidentes entre outros e fatores intrínsecos como desnutrição, problemas vasculares, diabetes, câncer e outras comorbidades (MURPHREE, 2017). Além disso, algumas injúrias, como as lesões por pressão, são parâmetros de segurança do paciente em contexto hospitalar, indicando o nível de qualidade de assistência em saúde ofertada, bem como da estrutura hospitalar (GASPAR *et al.*, 2019).

A internação de pacientes para o tratamento de feridas geralmente é por um tempo prolongado e gera um considerável ônus financeiro e econômico, não somente para as instituições de saúde, mas também para o paciente e/ou família do paciente acometido pela injúria dermatológica ocasionando consequências econômicas como perda de produtividade e renda, contribuindo para um ônus que atinge cerca de trilhões de dólares anualmente (SLAWOMIRSKI; AURAAEN; KLAZINGA, 2017).

Nesse sentido, é oportuno destacar que muitas das coberturas utilizadas como curativos para o tratamento de feridas possuem um valor econômico significativo e pode muitas vezes ser inacessível a uma importante parcela da sociedade (HAO *et al.*, 2017; SÁNCHEZ *et al.*, 2016). Somado a isso, existe a complicação de que muitas feridas encontram-se colonizadas e/ou infectadas por microrganismos com mecanismos de virulência e/ou resistência o que impacta ainda mais a dificuldade do tratamento, prolongando o desconforto do paciente, tempo de internação e a necessidade do uso de curativos a base de antimicrobianos o que encarece consideravelmente a assistência em saúde necessária a ser ofertada (CHAKRABARTI *et al.*, 2019).

Diante disso, percebe-se a notável necessidade do desenvolvimento de terapias inteligentes que favoreçam o tratamento de categorias diversificadas de feridas dermatológicas agudas e/ou crônicas, utilizando diferentes matérias-primas como os produtos naturais.

O óleo essencial (OE) de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) é um dos produtos naturais disponíveis, na flora brasileira, que destaca-se por diversas aplicabilidades como na queima para produção de combustíveis, além de apresentar diversas ações biológicas como ação antimicrobiana, antifúngica, repelente, acaricida, nematicida, entre outras atividades, que são possivelmente atribuídas a diversidade bioquímica presente nesse óleo que em sua maioria é composto por diferentes tipos de terpenos (FILOMENO, 2016).

Entre as espécies de eucalipto, a espécie *Eucalyptus radiata* também contempla em sua composição uma diversificada gama de terpenos e outras moléculas bioativas (NISHIMURA *et al.*, 1979), que podem desempenhar importantes atividades como já relatadas para esse gênero (DHAKAD *et al.*, 2017). No entanto, os estudos envolvendo suas potenciais ações biológicas ainda são escassos, sobretudo estudos envolvendo a capacidade de estimulação de processos de cicatrização em organismos vivos.

Assim, a presente pesquisa teve como alvo a produção de um creme a base do óleo de *Eucalyptus radiata* e a investigação da possível ação cicatrizante conferida pelo creme sobre feridas dermatológicas *in vivo*, utilizando ratos *Rattus norvegicus*, como modelo animal.

2 JUSTIFICATIVA

O gênero *Eucalyptus* compreende cerca de 900 espécies, que são exploradas em diversas finalidades como na indústria madeireira, cosmética e destacando-se também na indústria farmacêutica em virtude das propriedades do OE existente nas folhas deste gênero vegetal, que demonstra atividades biológicas como ação antimicrobiana, anti-séptica, antioxidante, inseticida, auxilia no tratamento de distúrbios respiratórios e gastrointestinais, inclusive há relatos de espécies que favorecem a cicatrização de feridas (DHAKAD *et al.*, 2017).

Entre as espécies que compõem o gênero *Eucalyptus* a *E. radiata* é uma espécie ecologicamente importante amplamente distribuída no território da Austrália, que destaca-se por ser uma fonte economicamente importante de óleos essenciais (DUAN *et al.*, 2014), demonstrou ter importante efeito antiinflamatório (OTSUKA *et al.*, 1974), efeito analgésico e redutor de fadiga (ALI *et al.*, 2015), atividade hipoglicemiante (CAPETTI *et al.*, 2020) sendo que tais propriedades são provavelmente justificáveis pela composição bioquímica do OE presente nas folhas da espécie *E. radiata* (α - e β -pinenes, camphene; 1, 8-cineole, α -phellandrene, α -terpinene, terpinen-4-ol, α -terpineol, piperitone, e β -seliene) (NISHIMURA *et al.*, 1979) o que torna esta planta um importante alvo para pesquisas que almejam a prospecção de novas formulações terapêuticas.

Contudo, os estudos envolvendo *E. radiata*, ainda são incipientes, necessitando de mais pesquisas que auxiliem para elucidar os mecanismos de ação do OE das folhas dessa espécie vegetal, sobretudo existe a carência de estudos que foquem nos potenciais efeitos cicatrizantes dessa planta.

É nítido que as feridas dermatológicas deprimem a qualidade de vida dos indivíduos acometidos, sendo um grande entrave para o processo de cicatrização fatores como idade avançada, acima de 65 anos, fatores nutricionais, comorbidades como diabetes, doenças vasculares entre outras (BONIFANT; HOLLOWAY, 2019). A integridade da pele alterada aumenta a chance de infecção, o tempo de internação hospitalar, prejudica a mobilidade, pode resultar na perda de um membro ou, às vezes, na vida do indivíduo acometido por injúrias na pele (MURPHREE *et al.*, 2017). Aliado a isso, existe o fato de que as coberturas, curativos, atualmente disponíveis no mercado, utilizados para o tratamento de lesões na pele, apresentam um custo econômico muitas vezes elevado para uma grande parte da população (PEDROLO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2017), sendo justo, sensato e razoável o interesse para o desenvolvimento de novas estratégias para facilitar a acessibilidade ao tratamento de feridas

dermatológicas.

Desse modo, novas alternativas terapêuticas devem ser exploradas a fim de deprimir a os impactos advindos das feridas dermatológicas que prejudicam a vitalidade dos pacientes, causam desconforto, algia, além de representar um notável risco ao desenvolvimento de processos infecciosos, formação de biofilmes microbianos e assim propiciar a resistência micróbios a drogas antissépticas convencionais e defesa imunológica do organismo hospedeiro (LU *et al.*, 2018). Dessa forma, o presente estudo teve como finalidades investigar o potencial cicatrizante do óleo de *E. radiata* em feridas dermatológicas, bem como o desenvolvimento de uma formulação (creme) para aplicações biomédicas e industriais a partir do OE de *E. radiata*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Feridas dermatológicas

As feridas dermatológicas são lesões, abrasões que acometem as camadas de tecido epitelial e conjuntivo subjacente, que podem ser oriundas de diferentes fatores como queimaduras, acidentes, traumas, substâncias cáusticas e/ou corrosivas, desnutrição, infecções microbianas, além de poderem ser adquiridas por meio de comorbidades como câncer, diabetes, problemas vasculares, incontinências (dermatites), como também de enfermidades congênitas como a epidermólise bolhosa (PRODINGER *et al.*, 2019; MURPHREE, 2017). As feridas podem ser classificadas, quanto o tempo de persistência, em agudas (queimaduras, traumas ou cirurgias), essas também podem ser crônicas tendo sua reparação em tempo adequado sem complicações ou crônicas (lesões por pressão, úlceras diabéticas) geralmente não tem sua reparação dentro do tempo esperado, possuindo complicações, situações essas que podem comprometer tanto na esfera física quanto emocional, principalmente quando as feridas deixam cicatrizes importantes e que podem perdurar ao longo de toda a vida do paciente (YOON, 2018).

As lesões dermatológicas, em síntese, se caracterizam pelo rompimento da integridade da pele, que pode desencadear infecção, trauma e cicatrizes. Dessa forma torna-se importante que o processo de cicatrização seja propício e para que isso ocorra é necessária uma interação complexa de células imunes e cutâneas circundantes, assim como outros fatores (vascularização, ausência de infecção etc.) (GRAY, 2013).

3.2 Cicatrização de feridas

O processo da cicatrização de feridas tem como principal objetivo, devolver aos tecidos lesados todo seu reestabelecimento a nível de estrutura e função. Há um processo natural do corpo capaz de regenerar e devolver toda a integridade do tecido lesado, dependendo diretamente dos esforços de todas as linhagens celulares imprescindíveis para a cura (ÖTÜN; YÜCEL, 2019). A cicatrização de feridas é um processo bem complexo composto por diferentes fases a nível celular e bioquímico, possibilitando a restauração do tecido e retorno da capacidade estrutural e funcional dos tecidos lesados. Tal processo envolve a interação das células que utilizam os mediadores inflamatórios contidos na matriz extracelular em atividade contínua e em diferentes fases sobrepostas. (SILVA, *et al.*, 2019).

No processo de cicatrização de feridas o órgão ou tecido corporal repara o tecido

lesado passando por basicamente quatro fases que são controladas por citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Essas fases são justamente a hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação do tecido (CHAKRABARTI *et al.*, 2018).

3.2.1 Hemostasia

A etapa de hemostasia ocorre imediatamente após a lesão no órgão ou tecido, e para isso a ativação ocorre a ativação do colágeno subendotelial e da produção de trombina com posterior ativação das plaquetas que estão no espaço intravascular. Após ativação das plaquetas ocorre a formação de um coágulo de fibrina que serve como um suporte para que outras células ocupem e se estabeleçam no local da ferida em um estágio posterior. Finalmente, um grupo de citocinas incluindo IL-1, IL-6, IL-10, fatores de crescimento, como fator de crescimento de fibroblastos básico ou ácido, fator de crescimento endotelial, fator de crescimento transformador- β , fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de angiogênese derivado de plaquetas, fator de ativação plaquetária, tromboxano A₂, prostaglandinas, serotonina, bradicinina e histamina são liberados pelas células iniciando os estágios preliminares de cicatrização de feridas (PRATIKCHA, *et al.*, 2020; TOCCO *et al.*, 2012).

3.2.2 Inflamação

Após o desencadeamento da cascata de coagulação, mais precisamente após a ativação da trombina ocorre um aumento da permeabilidade vascular, o que permite uma maior infiltração de células e líquido no leito da ferida, nesse infiltrado encontram-se importantes células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, células essenciais, anticorpos, glóbulos brancos, fatores de crescimento, nutrientes e enzimas que levam a manifestação de edema, calor, dor e vermelhidão que caracterizam a fase inflamatória (SAUAIA; MOORE; MOORE, 2017).

3.2.3 Proliferação

Essa fase é desencadeada por fatores de crescimento celular que são secretados durante a fase da inflamação, esses fatores geralmente estimulam o crescimento de fibroblastos, e células epiteliais, além de promover a quimiotaxia, ou seja, a migração celular para o local da

ferida, conseqüentemente contribuindo para a formação de novos vasos sanguíneos, remodelação do tecido e cicatrização da ferida (SHAH; MITAL, 2018).

3.2.4 Remodelamento

A remodelação (maturação) é a fase final do processo de cicatrização, ocorre após o fechamento da ferida e pode durar até dois anos (CHAKRABARTI *et al.*, 2018). Essa fase é marcada pelo aumento da resistência à tração do tecido dérmico e substituição de fibroblastos não funcionais por funcionais. Nessa etapa também ocorre uma diminuição da atividade celular e da vascularização. Os tecidos de granulação inicialmente formados são fracos, mas gradualmente se fortalecem pela substituição do colágeno tipo III imaturo por colágeno tipo I maduro. A indicação clínica da maturação da ferida consiste em uma série de eventos, como contração, diminuição da vermelhidão, espessura, endurecimento e aumento da força. Os fibroblastos e seus produtos, colágeno e metaloproteinases da matriz (degradam o colágeno), juntamente com os vasos sanguíneos, são os principais atores no processo de maturação da ferida (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2017).

3.3 Coberturas empregues na cicatrização de feridas

Para favorecer o processo de cicatrização é necessário uma cobertura que tenha a capacidade de fornecer uma infinidade de benefícios terapêuticos no local alvo da injúria e de direcionar a complexidade do processo normal de cicatrização das feridas, especificidade do tipo de célula, e abundância de moléculas reguladoras, bem como que contribua para subverter a fisiopatologia das feridas crônicas (CHAKRABARTI *et al.*, 2019).

Várias estratégias são utilizadas para o tratamento de feridas e para favorecer o processo de cicatrização, entre essas estratégias pode-se incluir suplementação nutricional, tratamento da comorbidade de base (diabetes, câncer etc.), mudança de decúbito a cada duas horas (no caso de lesões por pressão), técnica de desbridamento, pressão negativa tópica, terapia com ozônio, utilização de curativos, pomadas e cremes, como bacitracina, sulfadiazina de prata, neomicina e fenitoína (HAO *et al.*, 2017).

Entre as várias terapêuticas utilizadas para tratar feridas, os curativos, o uso de medicamentos antimicrobianos, o alginato, os hidrocolóides, produtos de colágeno, hidrogéis, a técnica do desbridamento, que favorece a cicatrização e aumentando a vascularização, são algumas das alternativas mais utilizadas (RODRIGUEZ, 2020). Logo, percebe-se que no

mercado estão disponíveis várias alternativas curativas para tratar injúrias na pele, desde soluções antissépticas, pomadas, géis e até mesmo complexos de curativos denominados “curativos inteligentes” ou “curativos bioativos” (LORDANI *et al.*, 2018).

Contudo, o processo de reparo decidual utilizando apenas um único fator ou tratamento bioativo, geralmente tem eficácia limitada, o que representa um desafio e estímulo ao desenvolvimento de novas terapias que tenham mais de um componente biologicamente ativo que estimule a migração epitelial (SERRA, 2020). Desse modo, existe uma crescente busca por estudos que busquem validar o uso de novas matérias prima, para elaboração de novas terapias, como a utilização de plantas medicinais e seus derivados que são reconhecidos pela riqueza de diversidade biomolecular e potencial bioativo (MODARRESI; FARAHPOUR; BARADARAN, 2019).

3.4 Custos do tratamento de feridas dermatológicas

Entre a classificação das feridas, quanto ao tempo de persistência, as feridas crônicas destacam-se pela maior representatividade econômica, pois são as que mais contribuem para o encarecimento dos cuidados de assistência em saúde, esses tipos de feridas levam um tempo maior de tratamento, muitas vezes requerem curativos especiais e caros, frequentemente apresentam o leito da ferida acometida por colonização/infecção microbiana, o que requer gastos adicionais com uso de antimicrobianos, inclusive muitas vezes os portadores apresentam doenças de bases (diabetes, obesidade, uso de quimioterapias, esteroides e anti-inflamatórios não esteroidais) o que dificulta ainda mais o tratamento (RODRIGUEZ, 2020).

As feridas, especialmente feridas crônicas, representam um problema global que custa milhões de dólares por ano nos países desenvolvidos e são caracterizadas por complicações microbianas, incluindo infecção local ou evidente, cicatrização retardada e disseminação de germes multirresistentes. Portanto, o tratamento de feridas com antimicrobianos é um grande desafio que continua a exigir novas soluções contra micróbios e seus biofilmes (DAESCHLEIN, 2013).

A análise econômica do ônus advindo do tratamento de feridas dermatológicas deve abranger desde os custos diretos e indiretos com a assistência em saúde, entre os custos diretos pode-se citar os gastos financeiros oriundos dos tratamentos, exames laboratoriais ou hospitalização e entre os custos indiretos ressalta-se a possível perda de produtividade no trabalho que o indivíduo portador da injúria pode vir a ser assolado (LICHTERFELD *et al.*, 2016). Dessa maneira, é bastante oportuno o desenvolvimento de terapias que tenham uma

sensata relação de custo benefício, que sejam acessíveis e seguras.

3.5 Metabólitos secundários e ação cicatrizante

As espécies vegetais são ricas em biomoléculas, entre elas os metabólitos secundários, também chamados de fitoquímicos, são produtos naturais de baixo peso molecular que frequentemente apresentam propriedades bioativas e são produzidos a partir de precursores derivados do metabolismo primário, em sua maioria, são caracterizados com base em seu impacto na saúde humana e animal (CARY *et al.*, 2018).

Os fitoquímicos contribuem para o crescimento vegetal, floração, frutificação e abscisão, e reconhecidos por possuírem diferentes propriedades bioativas como ação antimicrobiana (TEOH, 2016), antioxidante, anti-inflamatória (MERECZ-SADOWSKA *et al.*, 2020), anticancerígena (SITAREK *et al.*, 2020), entre outras. Além disso, o reino vegetal é uma rica fonte de metabólitos secundários, com inúmeras propriedades, incluindo o potencial de favorecer a eliminação da inflamação e propiciar o processo de cicatrização (MERECZ-SADOWSKA *et al.*, 2021). Estudos científicos evidenciam que metabólitos secundários como fenóis, alcalóides, saponinas, terpenos, entre outros, podem modular várias vias de sinalização celular em diferentes tipos de células, incluindo as células epidérmicas por meio de mudanças nas vias de transdução de sinal, além disso, essas biomoléculas podem possuir uma alta capacidade antioxidante e podem suprimir a liberação de espécies reativas de oxigênio, inibir proteínas pró-apoptóticas e apoptose e ativar enzimas antioxidantes que favorece o processo de reparação tecidual (ERB; KLIEBENSTEIN, 2020).

Estudos revelam que até 80% da população mundial faz uso de medicamentos oriundos de plantas para tratar várias doenças de pele, e comprovadamente melhoram o processo de cicatrização de diferentes feridas. Há séculos utiliza-se as plantas medicinais para o tratamento de doenças de ordem dermatológicas, em particular, cortes, feridas, queimaduras (ÖTÜN; YÜCEL, 2019). Dessa forma, cada vez mais é fortalecido o apelo para o uso de formulações a base de produtos naturais, como as plantas medicinais, na saúde e para o bem-estar dos indivíduos (ABUBAKAR; HAQUE, 2020).

3.6 Óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) e *Eucalyptus radiata*

Os OEs são compostos odoríferos e voláteis que podem ser oriundos de todas as partes da planta, seja dos botões, flores, folhas, caules, sementes, frutos, raízes, madeira ou

casca. Normalmente, esses compostos são líquidos hidrofóbicos e solúveis em álcool, ligeiramente solúveis em água, de coloração na grande maioria incolor ou amarelo pálido. Em se tratando da sua composição química, são compostos de hidrocarbonetos e monoterpenos oxigenados, sequiterpenos e diterpenos, compostos aromáticos e alifáticos com baixo peso molecular (BARBOSA; FILOMENO; TEIXEIRA, 2016). Entre as espécies vegetais que produzem óleos essenciais, a árvore *Eucalyptus* sp destaca-se por ser a espécie arbórea mais plantada e representa uma importante fonte de biomassa para a produção de combustíveis, produtos químicos e materiais, além do seu potencial de biomoléculas terapeuticamente ativas (PENÍN *et al.*, 2020).

Nativo da Austrália, o Eucalipto (*Eucalyptus* sp) (Figura 1), representa um dos principais gêneros pertencentes a família Myrtaceae, cultivado em todo o mundo. Possuem folhas perenes, odoríferas características atribuídas à presença de óleos essenciais nas células secretoras. Geralmente o OE é incolor, mas há estudos que relatam sua coloração acastanhada ou esverdeada (HO, *et al.* 2020).

Figura 1 – Espécie arbórea *Eucalyptus* sp



Fonte: Quinta dos ouriques (2021).

O OE de Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) pode ser extraído de diferentes partes da planta, tendo sua maior concentração nas folhas, destacando-se pela ampla atividade biológica dentre elas atividades antimicrobianas, antifúngicas, repelentes, acaricidas e nematicidas, que são possivelmente atribuídas aos terpenos presentes nessa planta, como α -pineno, limoneno, p-

cimeno, tr-pinocarveol, α -terpineol, globulol, α -eudesmol, β -eudesmol, e 1,8-cineol entre outros. Sendo o 1,8-cineol (cineol ou eucaliptol) o responsável por grande parte das atividades terapêuticas do OE de eucalipto e conseqüentemente tem sido bastante estudado em vários modelos animais nos últimos anos (FILOMENO, 2016).

Entre as tecnologias farmacêuticas elaboradas a partir da espécie *Eucalyptus* sp. ressalta-se à fabricação de inalantes, expectorantes, produtos de higiene bucal, ou ainda com a função de dar sabor e aroma aos medicamentos, adicionalmente, possíveis efeitos cicatrizantes, antiinflamatórios e antimicrobianos estão sendo atribuídos a essa planta (MOTA; TURRINI; POVEDA, 2015). Possivelmente as propriedades antiinflamatórias, analgésicas e antimicrobianas (*Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e, cepas de *Pseudomonas aeruginosa*) do óleo de Eucalipto, são decorrentes do seu composto majoritário o 1,8-cineol (YADAV; CHANDRA, 2017).

Adicionalmente, também é relatado atividade estimulante, no sistema imunológico, do OE de Eucalipto, capaz de desencadear ação fagocitária de macrófagos derivados de monócitos, bem como de ação antibacteriana contra *Salmonella* e *E. coli.*, possivelmente, devido aos ácidos graxos de cadeia média presentes no óleo que podem levar a alterações na lipossolubilidade de superfície da bactéria (THACKER, 2016).

Contudo, é válido refletir que entre as espécies de *Eucalyptus* sp. a espécie *E. radiata* ainda é um alvo pouco explorado nos estudos científicos, sobretudo quanto ao possível potencial de cicatrização. Entre os estudos que investigaram o potencial biológico da *E. radiata* destacam-se as pesquisas envolvendo o potencial antimicrobiano dessa espécie.

Mahumane *et al.* (2015) relata o potencial biológico antimicrobiano do OE de *E. radiata* contra cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus mutans* NCTC 10919, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314, *Streptococcus agalactiae* ATCC 55618 e *Streptococcus pyogenes* NHLS 8668, que apresentaram valores de concentração inibitória mínima (CIM) menores ou igual a 1 mg/ml e que possivelmente são decorrentes da composição bioquímica desse OE.

Estudos científicos relatam que o composto majoritário do OE de *E. radiata* é o 1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol (MULYANINGSIH *et al.*, 2011), no entanto, Luis *et al.* (2015) relata que o composto majoritário do *E. radiata* é o limoneno, seguido do α -terpineol, α -terpinil acetato e α -pineno. As diferenças na composição química do OE de *E. radiata* pode ocorrer a devido à variação genética e diferentes fatores ambientais como clima, épocas de colheita e localização (MULYANINGSIH *et al.*, 2011).

De acordo com Luis *et al.* (2015) o OE de *E. radiata* também tem ação

antibacteriana contra as cepas de controle *P. aeruginosa* ATCC 27853 (CIM:32µL/mL), *Escherichia coli* ATCC 25922 (CIM:16µL/mL), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (CIM:16µL/mL), *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 (CIM:32µL/mL), *Acinetobacter baumannii* LMG 1025 (CIM:8µL/mL) e *A. baumannii* LMG 1041 (CIM:8µL/mL), além de mostrar ação antimicrobiana contra as cepas de isolados clínicos de *P. aeruginosa* PA 08 (CIM:16µL/mL), *P. aeruginosa* PA 12/08 (CIM:32µL/mL), *E. coli* EC 08 (CIM:16µL/mL) e *K. pneumoniae* KP 08 (CIM:16µL/mL).

Adicionalmente, Luis *et al.* (2015) também destacaram a forte atividade antioxidante do OE de *E. radiata* apresentou forte atividade antioxidante, que pode estar relacionada ao perfil fitoquímico. Horvathova *et al.* (2014) relataram que o 1,8-cineol mostrou vários graus de poder redutor, eliminação de radicais, ação quelante, além da capacidade de proteção do DNA. O limoneno também é o principal constituinte de outros OEs com notável atividade antioxidante (AMIRI, 2012).

O OE das folhas de *E. radiata* também pode vir a ser uma estratégia para o combate de ácaros como contra o ácaro vermelho das aves, o *Dermanyssus gallinae* (GEORGE *et al.*, 2009). Além de manifestar atividade inseticida contra o cupim japonês, *Reticulitermes speratus* Kolbe (PARK; SHIN, 2005).

Além dos efeitos antimicrobianos e inseticidas relatados na literatura para o OEs da *E. radiata*, pode-se também elencar o efeito antiinflamatório (OTSUKA *et al.*, 1974), efeito analgésico e redutor de fadiga (ALI *et al.*, 2015), atividade hipoglicemiante por meio da inibição da enzima hidrolisadora de carboidratos (α -amilase), o que pode ser uma interessante estratégia terapêutica ao combate da enfermidade diabetes mellitus do tipo 2 (CAPETTI *et al.*, 2020).

Diante do exposto é possível verificar que a constituição bioquímica do OE das folhas da espécie vegetal *E. radiata* representa uma fonte potencial de moléculas bioativas e que pode vir a ser utilizado para o tratamento de diferentes enfermidades, contudo é perceptível que ainda existe uma escassez de estudos envolvendo essa espécie, inclusive, para o conhecimento desta pesquisa, ainda não existe nenhum estudo com o OE dessa planta explorando a atividade de cicatrização de feridas dermatológicas.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar e Caracterizar o efeito cicatrizante do óleo essencial de Eucalipto (*Eucalyptus radiata*) em feridas dermatológicas.

4.2 Específicos

- a) Sintetizar um creme de uso tópico com óleo essencial de Eucalipto (*Eucalyptus radiata*);
- b) Caracterizar as propriedades físico-químicas do creme;
- c) Apontar os efeitos do uso tópico do creme em feridas dermatológicas em ratos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção do óleo essencial de *Eucalyptus radiata*

O OE de *E. radiata* foi adquirido da empresa Do Terra international. O mesmo acompanha certificado de pureza e caracterização cromatográfica com identificação de seus constituintes, descritos no Anexo A.

5.2 Preparo do creme

O creme foi preparado conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019) e em Tibiriça *et al.* (2020), em uma Farmácia de manipulação localizada no município de Floriano-PI, por meio da adição de fase aquosa sobre a oleosa, sob agitação, à temperatura entre 75° a 80°C. Os insumos ativos farmacêuticos utilizados na formulação para do creme, bem como, a porcentagem presente e a função correspondente estão descritas a seguir (**Tabela 1**) sendo separadas nas fases A (aquosa) e B (oleosa) com as respectivas funções. A fase C foi adicionada após o sistema ter sido emulsificado.

Tabela 1 - Formulação do creme com respectivas fases e insumos utilizados na formulação e função

| Fase | INCI | Função |
|------|--------------------------|--------------------------|
| A | Acqua | Veículo |
| A | Disodium EDTA | Sequestrante |
| A | Glycerin | Umectante |
| B | BHT | Antioxidante |
| B | Álcool Cetoestearílico | Emulsificante |
| B | Cyclopentasiloxane | Modificador sensorial |
| B | Cyclomethicone | Modificador sensorial |
| B | Dry Flo | Modificador sensorial |
| B | Aristoflex | Espessante |
| B | Amigel | Espessante/Emulsionante |
| B | Lipomulse | Emulsificante |
| C | Phenoxyethanol + Paraben | Bactericida/conservante. |

Fonte: elaborada pela autora. INCI = Internacional Nomenclature of Cosmetic Ingredients

A Fase A foi aquecida até 80°C e a Fase B até 75°C. Ao atingirem suas respectivas temperaturas foi vertida a Fase A sobre a B sob agitação de um agitador vertical mecânico por 5 minutos. Foi resfriado em banho de gelo, sob agitação, até atingir a temperatura de 40°C. Após resfriamento foram adicionados o componente da Fase C e realizada a homogeneização.

Foram preparados 100 g de creme.

5.3 Incorporação do óleo essencial de *Eucalyptus radiata* ao creme

A incorporação do OE à emulsão já finalizada, procedeu-se sob agitação contínua até completar a homogeneização da mistura, processo pelo qual foi produzido cremes com respectivamente 5%, 3% e 1,5% de concentração do OE de *E. radiata*. Após, a incorporação do OE ao creme, esse bioproduto foi encaminhado a um laboratório industrial farmacêutico (Sobral) do município de Floriano-PI, para análise e caracterização físico-química.

Ressaltando que os respectivos percentuais do OE de *E. radiata* elencados para produção do creme, foram escolhidos baseados em concentrações utilizadas por estudos como de Jesus *et al.* (2021). Adicionalmente a literatura ressalta que formulações a base de 2% de OE é utilizado para peles muito sensíveis e com inclinação para alergias, 3% de OE são indicadas para massagem aromática e melhora da ação medicinal, 5% de OE são recomendadas visando tratamento de problemas agudos como dores e inflamações graves e 10% de OE utilizado para tratamento de problemas crônicos, doenças degenerativas, infecções e inflamações graves, sendo que deve-se sempre estar atento a constituição bioquímica dos OEs que são ricos em cetonas ou fenóis e não devem ultrapassar a 1% da formulação. (AROMAVIDA, 2021)

5.4 Estabilidade da formulação

O estudo de estabilidade da formulação desenvolvida foi realizado em diferentes ambientes (geladeira, ambiente e estufa a 35°C) durante 30 dias, para tanto foram observados parâmetros quanto aspecto, cor, odor, pH e densidade. As amostras foram retiradas da estufa e geladeira 30 minutos antes das análises (ANVISA, 2010).

5.5 Caracterização físico-química do creme a base do óleo essencial de *Eucalyptus radiata*

5.5.1 Teste de centrifugação

A centrifugação é caracterizada como um processo de separação em que uma amostra é submetida a um aparelho centrifugador ou centrífuga a fim de se promover a separação dos componentes, através da sedimentação dos líquidos imiscíveis de diferentes densidades ou de sólidos com partículas muito pequenas que se possam encontrar em suspensão no líquido. É utilizada em diferentes aplicações laboratoriais (BRASIL, 2019b). Para o teste de centrifugação, foram utilizadas 5g do creme a base de OE de *E. radiata*, acondicionadas em tubos de ensaio e levados à centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos, à temperatura ambiente, para observação de uma possível separação das fases.

5.5.2 Determinação do pH aparente

Entende-se o valor de pH como a medida da atividade do íon hidrogênio de uma solução. Convencionalmente é usada a escala da concentração de íon hidrogênio da solução (BRASIL, 2019b). O pH foi aferido através de um eletrodo acoplado a um potenciômetro. A calibração do medidor de pH foi realizada após calibração do eletrodo com soluções padrão pH 7,0 e 4,0. Os resultados foram obtidos através da média de três determinações sucessivas. Para esse teste foi utilizada uma proporção de 2g do creme para 20mL de água destilada, em seguida diluídas e homogeneizadas por meio do vórtex, transferidas para o tubo de ensaio e levadas para a análise no aparelho medidor de pH.

5.5.3 Determinação da densidade

A densidade de massa de uma substância é a razão de sua massa por seu volume a 20°C. A densidade de massa da substância em uma determinada temperatura é calculada a partir de sua densidade relativa. Sendo assim, os materiais utilizados para esse procedimento foram: o picnômetro metálico e a balança hidrostática (BRASIL, 2019b). Para a realização do teste foi utilizado um picnômetro metálico limpo, seco e que foi previamente calibrado. A calibração foi baseada na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa com seu conteúdo com água, recentemente destilada e fervida a 20 °C. Em seguida as amostras foram transferidas para

o picnômetro, feito o ajuste da temperatura 20 °C e quando necessário foi removido o excesso do produto antes de ser pesado. O peso das amostras foi determinado através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio (BRASIL, 2019b).

5.6 Testes *in vivo* da ação cicatrizante do creme a base de óleo de eucalipto (*Eucalyptus radiata*)

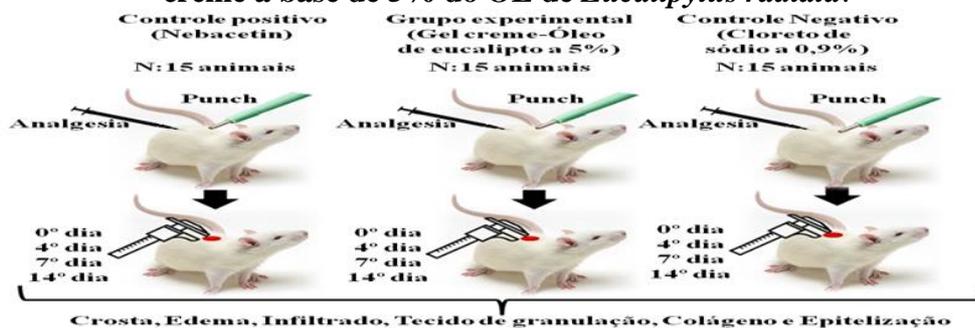
5.6.1 Avaliações biológicas

O presente ensaio foi realizado de acordo com delineamento proposto por Leal *et al.* (2017), para tanto a amostra foi composta por ratos da linhagem *Rattus norvegicus* (n=45) pesando aproximadamente 300g, machos, com 60 dias de idade, e sendo divididos em forma randomizada em 03 (três) grupos que foram submetidos à anestesia para retirada de fragmento da região dorsal utilizando-se *punch* metálico com 02 (dois) cm de diâmetro.

Os ratos foram divididos em 03 grupos composto por 15 animais cada de modo homogêneo entre si. Estes animais possuíam em média 60 dias de idade e para este estudo foram identificados no dorso por marcas feitas a pincel. No Grupo controle positivo – GP, foi aplicado uma pomada antibiótica com uma combinação de bacitracina zínica e sulfato de neomicina, o Grupo experimental – GE recebeu uma camada do gel creme a base de OE de eucalipto 5% e, o Grupo negativo foi tratado com solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%), uma vez ao dia durante 14 dias de tratamento.

Em todos os animais foram observadas diariamente as lesões com relação à hiperemia, edema, sangramento, secreção, odor e crostas. As áreas das feridas foram medidas no diâmetro maior e menor, empregando-se paquímetro no dia 0 (dia de realização das lesões dérmicas) e nos dias 4º, 7º e 14º pós-operatório, conforme ilustrado na figura 2.

Figura 2 - Delineamento experimental da avaliação do potencial de cicatrização do gel creme à base de 5% do OE de *Eucalyptus radiata*.



Fonte: elaborada pela autora.

5.6.2 Análise histológica

Após a eutanásia dos animais foram retiradas peças cirúrgicas (constituídas pela cicatriz ou lesão cutânea) acondicionadas em formol, em seguida para preparo das lâminas que foram coradas com hematoxilina/eosina, posteriormente encaminhadas ao laboratório de Fisiopatologia da Reprodução da Universidade Federal do Piauí, para análise baseada nos seguintes critérios: presença de infiltrado inflamatório, proliferação vascular e fibroblastos, formação de tecido de granulação, deposição de colágeno e reepitelização da área da lesão.

5.6.3 Aspectos Éticos

O presente projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Piauí tendo em vista cumprir as determinações dos aspectos éticos envolvendo a utilização de animais no desenvolvimento da pesquisa e em atividades de ensino, tendo sido aprovado, conforme parecer em Anexo B.

6 RESULTADOS

Nas observações preliminares, em vidro de relógio, após centrifugação, da formulação a base do OE de *E. radiata*, ao longo de 10 dias, pode-se verificar aspecto homogêneo característico de emulsão fase oleosa/aquosa (O/A), sem presença de grumos (Tabela 2, Figura 3, 4, 5, 6 e 7).

Tabela 2 - Resultados da estabilidade preliminar do creme a base de *Eucalyptus radiata*, leitura inicial do 1º ao 10º dia

| Formulação (% do OE de <i>E. radiata</i>) | Aspecto | Cor | Odor | Ph | Densidade (g/mL ⁻¹) |
|--|---------|--------|----------------|-----------|---------------------------------|
| Creme 5% | Creme | Branco | Característico | 3,0 – 4,0 | 0,91 – 0,99 |
| Creme 3% | Creme | Branco | Característico | 3,0 – 4,0 | 0,91 – 0,99 |
| Creme 1,5% | Creme | Branco | Característico | 3,0 – 4,0 | 0,91 – 0,99 |

Fonte: elaborada pela autora.

Legenda: OE: óleo essencial.

Figura 3 – Creme a base de óleo essencial de *Eucalyptus radiata* antes de ser submetido ao processo de centrifugação



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 4 – Creme a base de óleo essencial de *Eucalyptus radiata* após ser submetido ao processo de centrifugação



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 5 – Aspecto e cor do creme a base de 5% do óleo essencial de *Eucalyptus radiata*



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 6 – Aspecto e cor do creme a base de 3% do óleo essencial de *Eucalyptus radiata*



Fonte: elaborada pela autora.

Figura 7 – Aspecto e cor do creme a base de 1,5% do óleo essencial de *Eucalyptus radiata*



Fonte: elaborada pela autora.

De acordo com a caracterização físico-química do creme a base do OE de *E. radiata* foi evidenciado que, em relação ao pH e a densidade, não houve grandes variações entre as formulações com diferentes percentuais do OE de *E. radiata*, conforme visualizado na Tabela 3, sendo que todas as formulações apresentaram caráter ácido de pH.

Tabela 3 – Índices físico-químicos do creme a base de óleo essencial de *Eucalyptus radiata*

| Formulação (% do óleo essencial de <i>Eucalyptus radiata</i>) | pH | Densidade (g/mL ⁻¹) |
|--|------|---------------------------------|
| Creme 5% | 3,82 | 0,9726 |
| Creme 3% | 3,94 | 0,9905 |
| Creme 1,5% | 3,90 | 0,9936 |

Fonte: elaborada pela autora.

Após o desenvolvimento do gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata* procedeu-se com a realização da avaliação do potencial de cicatrização, desse produto, sobre feridas dermatológicas infringidas na superfície cutânea dorsal de ratos *Rattus norvegicus* como pode ser observado nos quadros 1, 2, e 3.

Quadro 1 - Critérios histopatológicos do processo cicatricial de feridas dermatológicas em grupos experimentais de *Rattus norvegicus* após o 4º dia do evento operatório. C4 (Grupo negativo foi tratado com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%); B4 (Grupo do controle positivo tratado com pomada antibiótica com uma combinação de bacitracina zínica e sulfato de neomicina e E4 (Grupo experimental tratado com gel creme a base de 5% de OE de *E. radiata*)

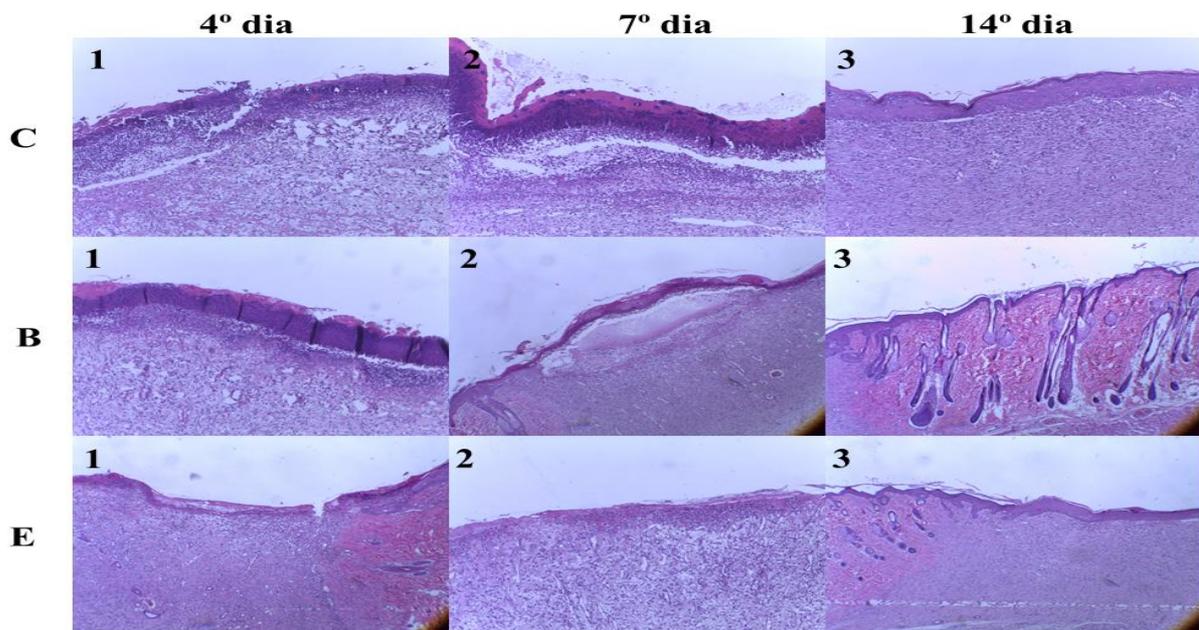
| Grupos | Animal | Crosta | Edema | Infiltrado | Tecidos de granulação | Colágeno | Reepitelização | Outros |
|--------|--------|--------|-------|------------|-----------------------|----------|----------------|------------|
| C4 | R1 | + | + | +++ | Imaturo | - | - | - |
| | R2 | + | + | +++ | Imaturo | + | - | - |
| | R3 | + | + | +++ | Imaturo | - | - | - |
| | R4 | + | + | +++ | Imaturo | + | + | - |
| | R5 | + | + | +++ | Imaturo | + | + | - |
| Grupos | Animal | Crosta | Edema | Infiltrado | Tecidos de granulação | Colágeno | Reepitelização | Outros |
| B4 | R1 | ++ | ++ | ++ | Imaturo | ++ | - | Hemorragia |
| | R2 | ++ | ++ | ++ | Imaturo | + | - | Hemorragia |
| | R3 | ++ | ++ | ++ | Imaturo | + | + | Hemorragia |
| | R4 | ++ | ++ | ++ | Imaturo | + | + | Hemorragia |
| | R5 | ++ | ++ | ++ | Imaturo | ++ | + | Hemorragia |
| Grupos | Animal | Crosta | Edema | Infiltrado | Tecidos de granulação | Colágeno | Reepitelização | Outros |
| E4 | R1 | ++ | ++ | +++ | Imaturo | + | + | Hemorragia |
| | R2 | + | ++ | ++ | Imaturo | + | + | Hemorragia |
| | R3 | + | ++ | ++ | Imaturo | ++ | + | Hemorragia |
| | R4 | ++ | ++ | +++ | Imaturo | + | + | Hemorragia |
| | R5 | ++ | ++ | +++ | Imaturo | + | + | Hemorragia |

Fonte: elaborada pela autora.

A avaliação microscópica das lesões visou observar crosta, edema, infiltrado, tecido

de granulação, colágeno, reepitelização e eventos como hemorragias. Como observado no quadro 1 e Figura 8, as crostas estavam presentes com maior extensão nas lesões ao 4º dia de avaliação, respectivamente em 100% e 60% dos animais dos grupos B4 (controle positivo-pomada antibiótica com uma combinação de bacitracina zínica e sulfato de neomicina) e E4 (Grupo experimental – Gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata*), assim como o edema também que também foi evidente em 100% dos animais de cada um desses dois grupos. Quanto à presença de infiltrado celular foi detectável, em maior quantidade, respectivamente em 100% e 60% dos animais do grupo C4 (Controle negativo-soro fisiológico a 0,9%) e E4. Em relação ao tecido de granulação, 100% dos animais de todos os grupos C4, B4 e E4 apresentaram tecido imaturo. Quanto ao colágeno todos os animais do grupo B4 e E4 apresentaram produção de fibras colágenas, contudo, no grupo C4, 40% dos animais não produziram essas fibras. Conforme o critério de reepitelização, 100% dos animais do grupo E4 apresentaram sinais de reepitelização, em contrapartida, houve evidência em apenas 60% dos animais do grupo B4 e em 40% do grupo C4. Sendo constatado evento de hemorragia em 100% dos animais dos grupos B4 e E4.

Figura 8 - Fotomicrografia das lesões infligidas em modelo murino (*Rattus norvegicus*) do grupo controle (C) e dos grupos de tratados com Bacitracina (B) e Gel creme a base de 5% de óleo essencial de *Eucalyptus radiata*, ao longo do 4º, 7º e 14º dia de tratamento



Fonte: elaborada pela autora.

Quadro 2 - Critérios histopatológicos do processo cicatricial de feridas dermatológicas em grupos experimentais de *Rattus norvegicus* após o 7º dia do evento operatório. C7 (Grupo negativo foi tratado com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%); B7 (Grupo do controle positivo tratado com bacitracina zínica e sulfato de neomicina) e E7 (Grupo experimental tratado com gel creme a base de 5% de OE de *E. radiata*)

| Grupos | Animal | Crosta | Edema | Infiltrado | Tecidos de granulação | Colágeno | Reepitelização | Outros |
|--------|--------|--------|-------|------------|-----------------------|----------|----------------|------------|
| C7 | R1 | ++ | ++ | +++ | imaturo | + | + | - |
| | R2 | ++ | ++ | +++ | imaturo | ++ | + | - |
| | R3 | ++ | ++ | +++ | imaturo | ++ | + | - |
| | R4 | ++ | ++ | +++ | imaturo | ++ | + | - |
| | R5 | ++ | ++ | +++ | imaturo | ++ | + | hemorragia |
| Grupos | Animal | Crosta | Edema | Infiltrado | Tecidos de granulação | Colágeno | Reepitelização | Outros |
| B7 | R1 | ++ | ++ | +++ | imaturo | + | + | - |
| | R2 | ++ | ++ | +++ | imaturo | ++ | + | hemorragia |
| | R3 | ++ | ++ | ++ | imaturo | ++ | + | - |
| | R4 | ++ | ++ | ++ | imaturo | ++ | + | hemorragia |
| | R5 | ++ | ++ | ++ | imaturo | + | + | hemorragia |
| Grupos | Animal | Crosta | Edema | Infiltrado | Tecido de granulação | Colágeno | Reepitelização | Outros |
| E7 | R1 | ++ | ++ | +++ | imaturo | + | + | hemorragia |
| | R2 | ++ | ++ | +++ | imaturo | + | + | hemorragia |
| | R3 | ++ | ++ | +++ | imaturo | ++ | + | hemorragia |
| | R4 | ++ | ++ | +++ | imaturo | ++ | + | hemorragia |
| | R5 | ++ | ++ | +++ | imaturo | ++ | + | hemorragia |

Fonte: elaborada pela autora.

De acordo com o quadro 2 e Figura 8, as crostas, bem como o edema estavam presentes, de forma igualitária, nas lesões ao 7º dia de avaliação, em todos os animais dos grupos C7, B7 e E7. Quanto à presença de infiltrado celular, continuou sendo detectável em maior quantidade em 100% dos animais do grupo C7 e E7 e em apenas 40% dos animais do grupo B7. Em relação ao tecido de granulação, 100% dos animais de todos os grupos C7, B7 e E7 apresentaram tecido imaturo. Quanto ao colágeno, a maior produção, foi respectivamente em 80%, 60% e 60% dos animais dos grupos C7, B7 e E7. Conforme o critério de reepitelização 100% dos animais de todos os grupos C7, B7 e E7 produziram epitélio. Sendo constatado evento de hemorragia em 20%, 60% e 100% dos animais dos grupos C7, B7 e E7.

Quadro 3 - Critérios histopatológicos do processo cicatricial de feridas dermatológicas em grupos experimentais de *Rattus norvegicus* após o 14º dia do evento operatório. C14 (Grupo negativo foi tratado com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%); B14 (Grupo do controle positivo tratado com bacitracina zínica e sulfato de neomicina) e E14 (Grupo experimental tratado com gel creme a base de 5% de OE de *E. radiata*)

| Grupos | Animal | Crosta | Edema | Infiltrado | Tecidos de granulação | Colágeno | Reepitelização | Outros |
|--------|--------|--------|-------|------------|-----------------------|----------|----------------|------------|
| C14 | R1 | - | - | + | Maduro | +++ | total | - |
| | R2 | ++ | + | ++ | Imaturo | ++ | + | - |
| | R3 | ++ | - | ++ | Imaturo | ++ | + | hemorragia |
| | R4 | ++ | - | ++ | Imaturo | ++ | + | hemorragia |
| | R5 | ++ | - | ++ | Imaturo | ++ | + | - |
| Grupos | Animal | Crosta | Edema | Infiltrado | Tecidos de granulação | Colágeno | Reepitelização | Outros |
| B14 | R1 | ++ | ++ | ++ | Imaturo | ++ | + | - |
| | R2 | ++ | ++ | ++ | Imaturo | ++ | + | - |
| | R3 | ++ | ++ | ++ | Imaturo | ++ | + | - |
| | R4 | ++ | ++ | ++ | Imaturo | ++ | + | - |
| | R5 | ++ | + | ++ | Imaturo | ++ | + | hemorragia |
| Grupos | Animal | Crosta | Edema | Infiltrado | Tecidos de granulação | Colágeno | Reepitelização | Outros |
| E14 | R1 | ++ | ++ | ++ | Maduro | ++ | + | - |
| | R2 | ++ | + | ++ | Imaturo | ++ | + | - |
| | R3 | + | + | + | Maduro | +++ | ++ | - |
| | R4 | + | + | + | Maduro | +++ | ++ | - |
| | R5 | - | - | + | Maduro | +++ | total | - |

Fonte: elaborada pela autora.

De acordo com o quadro 3 e Figura 8, as crostas, estavam presentes, em maior extensão, nas lesões ao 14º dia de avaliação, em respectivamente, 80%, 100% e 40% dos animais dos grupos C14, B14 e E14. Respectivamente 80% e 20% dos animais do grupo B14 e E14 apresentaram edema local. Quanto à presença de infiltrado celular, foi detectável, em maior quantidade, em respectivamente 80%, 100% e 40% dos animais dos grupos C14, B14 e E14. Em relação ao tecido de granulação, respectivamente 20% e 80% dos animais dos grupos C14 e E14 apresentaram tecido maduro, contudo, nenhum dos animais do grupo B14 apresentou tecido maduro. Quanto ao colágeno, a maior expressão foi para o grupo E14 sendo observado em 60% dos animais, seguido do grupo C14 em 20% dos animais. Conforme o critério de reepitelização, a maior expressão foi detectada no grupo E14, sendo que 20% dos animais apresentaram reepitelização completa da área da ferida. Nenhum evento hemorrágico foi constatado nos animais do grupo E14, contudo em 40% dos animais do grupo C14 e 20% dos animais do grupo B14 apresentaram hemorragia.

7 DISCUSSÃO

De acordo, com o Anexo A o OE de *E. radiata*, utilizado neste estudo, apresentou em sua constituição como composto majoritário o 1,8 cineol, esse dado vai ao encontro dos achados em estudos científicos que relatam que o composto majoritário dos óleos essenciais da maioria das espécies de *Eucalyptus* sp., inclusive da espécie *E. radiata*, é o 1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol (FILOMENO, 2016; MULYANINGSIH *et al.*, 2011).

O 1,8-cineol é um tipo de monoterpene saturado, com aroma e sabor agradáveis, que frequentemente é adicionado em aromatizantes, cosméticos ou fragrâncias, aditivos para banho, enxaguantes bucais e inclusive repelentes de insetos (CAI *et al.*, 2020). Esse monoterpene possui diversas propriedades farmacológicas nas quais se destacam a ação antiinflamatória por meio da regulação do fator nuclear Kappa-B (NF-Kb) inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e ação antioxidante por meio da regulação do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) inibindo espécies reativas de oxigênio (ERO), respectivamente (JIANG *et al.*, 2019; KENNEDY-FEITOSA *et al.*, 2019).

O metabólito 1,8-cineol demonstra também potencial *in vitro* contra o câncer (SAMPATH *et al.*, 2018), doenças cardiovasculares (LINGHU *et al.*, 2019), no tratamento da doença de Alzheimer (PAUL *et al.*, 2020), doenças digestivas (MURATA *et al.*, 2015), doenças respiratórias como bronquite (FISCHER; DETHLEFSEN, 2013), asma (WORTH; DETHLEFSEN, 2012) e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (WORTH; SCHACHER; DETHLEFSEN, 2009), além de ter ação bactericida (YIN *et al.*, 2020).

Contudo, apesar do 1,8-cineol ter uma importante potencialidade bioativa é oportuno destacar que o mesmo possui uma baixa estabilidade, logo se faz necessário o desenvolvimento de formulações adequadas para posterior aplicação *in vivo* (CAI *et al.*, 2020). Sendo assim, OE de *E. radiata* cujo composto majoritário é o 1,8-cineol, torna-se um ingrediente promissor para ser considerado na composição de formulações farmacêuticas como cremes, sobretudo com a finalidade de verificar a possível ação cicatrizante sobre feridas dermatológicas, diante disso, nesta pesquisa foram desenvolvidos cremes a base de 5%, 3% e 1,5% do OE de *E. radiata*.

As formulações farmacêuticas destinadas à aplicação na superfície da pele podem ser úteis para viabilizar proteção, ou mesmo melhorar a circulação dentro da derme. Contudo, cada formulação desenvolvida para o uso humano deve ser submetida a avaliações de qualidade e adequação, as quais seguem rígidas diretrizes ante os recursos da legislação (HEIN; LULLMANN; MOHR, 2016). Para tanto, nesta pesquisa, o creme a base 5% do OE de *E.*

radiata foi submetido desde caracterizações físico-químicas a bioensaios *in vivo*, a para verificar a viabilidade deste produto no favorecimento da cicatrização e sua possível compatibilidade para utilização em humanos. Adicionalmente, a literatura ressalta que formulações a base de 5% de OE são recomendadas visando tratamento de problemas agudos como dores e inflamações graves (AROMAVIDA, 2021), sendo, portanto, a priori, essa formulação a escolhida para dar início aos ensaios *in vivo*, as demais formulações a base de 3% e 1,5% serão testadas em outro momento oportuno.

O creme elaborado, neste trabalho, com o OE de *E. radiata* é um candidato promissor a ser desenvolvido devido a simplicidade para a produção e a qualidade final do produto elaborado. Nas observações preliminares, em vidro de relógio, após centrifugação, da formulação a base do OE de *E. radiata*, ao longo de 10 dias, pode-se verificar aspecto homogêneo característico de emulsão fase oleosa/aquosa (O/A), sem presença de grumos (Tabela 2, Figura 2, 3, 4 e 5).

Na tabela 3, foi evidenciado que, em relação ao pH e a densidade, não houve grandes variações entre as formulações com diferentes percentuais do OE da *E. radiata*, sendo que todas as formulações apresentaram caráter ácido de pH (3,82 - 3,90). A pele humana apresenta pH levemente ácido (4,6 - 5,8), o que contribui para a proteção antimicrobiana na superfície da pele, dessa forma é importante verificar o Ph de diferentes produtos tópicos, que estão disponíveis no mercado, com intuito de não promover variações bruscas do pH natural da pele, o que pode expor a pele a uma série de agentes agressores, em especial microrganismos (PINTO *et al.*, 1997; RODRIGUES, 1996; RODRIGUES, 1995).

No teste de estabilidade acelerada, observou-se que o creme com OE de *E. radiata* esteve em conformidade segundo os critérios de avaliação do Guia de Estabilidade da ANVISA (2010), uma vez que não houve alterações significativas no aspecto, cor e odor e não houve variação nos valores obtidos de pH e densidade. “Os ensaios de estabilidade de produtos cosméticos visa determinar o comportamento das formulações durante meses ou anos, submetendo-os a diferentes condições de armazenamento” (COELHO *et al.*, 2016).

Após o desenvolvimento do gel creme a base do OE de *E. radiata* procedeu-se com a realização da avaliação do potencial de cicatrização, desse produto, sobre feridas dermatológicas infringidas na superfície cutânea dorsal de ratos *Rattus norvegicus*, para tanto, a priori, foi escolhida a formulação a base de 5% do OE de *E. radiata*, para a realização primária dessa análise biológica, poder cicatrizante, como pode ser observado nos quadros 1, 2, e 3. Geralmente, quanto maior a concentração de um extrato possivelmente maior será a presença

de seu composto majoritário e conseqüentemente do seu efeito biológico, contudo, como essa avaliação não se faz homogênea para todos os produtos naturais (NETO *et al.*, 2020), é válido verificar em outro momento oportuno se o gel creme a base de 1,5% e 3% do OE de *E. radiata* apresenta um efeito dose resposta, quando comparado aos resultados deste ensaio.

As crostas estavam presentes com maior extensão nas lesões ao 4º dia de avaliação, respectivamente, em 100% e 60% dos animais dos grupos B4 e E4 (Quadro 1 e Figura 8). Nas lesões ao 7º dia de avaliação, as crostas estavam presentes, de forma igualitária, em todos os animais dos grupos C7, B7 e E7 (Quadro 2 e Figura 8). Nas lesões ao 14º dia de avaliação, as crostas, estavam presentes em respectivamente, 80%, 100% e 40% dos animais dos grupos C14, B14 e E14 (Quadro 3 e Figura 8). Diante disso, pode-se observar que ao longo do período de avaliação (0 a 14 dias), o grupo E (grupo experimental) do gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata* estimulou a formação de crosta, na ferida dermatológica, de forma semelhante a pomada antibiótica com uma combinação de bacitracina zínica e sulfato de neomicina, sendo, neste grupo, detectada a presença de crosta em menor quantidade, no 14º dia, em virtude da ferida dermatológica já se encontrar em níveis mais avançados de cicatrização. De acordo com Branco Neto *et al.* (2006), a ferida é inicialmente preenchida por coágulo, fibrina e exsudato inflamatório, originando assim a crosta fibrino-leucocitária. Logo, conforme essa premissa, quanto mais rápido houver o estímulo de recrutamento de mediadores químicos da inflamação, bem como de fatores de coagulação, mais rápido tendem a serem executadas as demais etapas envolvidas no processo de cicatrização.

Quanto ao edema, no quadro 1 e figura 8, foi mais expressivo em 100% dos animais dos grupos B4 e E4. Nas lesões ao 7º dia de avaliação, o edema estava presente, de forma igualitária, em todos os animais dos grupos C7, B7 e E7 (quadro 2 e Figura 8). Nas lesões ao 14º dia de avaliação, o edema, apresentou-se em maior extensão, respectivamente em 80% e 20% dos animais do grupo B14 e E14 (quadro 3 e Figura 8). Evidenciando-se dessa forma que o grupo E que foi tratado com gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata* estimulou a formação de edema, na ferida dermatológica, de forma semelhante a pomada antibiótica com uma combinação de bacitracina zínica e sulfato de neomicina, contudo, ainda demonstrou melhor performance, pois ao longo do 14º dia de avaliação o grupo E apresentou importante redução do edema, ou seja, demonstrando potencial de resolutividade do evento inflamatório e propensão a cicatrização.

É evidente que, nesta pesquisa, o grupo E tratado com o gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata*, manifestaram picos de edema semelhante ao grupo B, tratado com pomada antibiótica com uma combinação de bacitracina zínica e sulfato de neomicina, ao longo do 4º e

7º dia de avaliação, tendo reduzido massivamente, para o grupo E, no 14º dia e esses achados vão ao encontro dos resultados de Santos e Rao (1997) que ao avaliarem, ao longo de 24 horas, o efeito do 1,8-cineol (10, 15 e 20 µL), composto majoritário do OE de *E. radiata*, na formação de edema demonstraram que esse terpeno tem a capacidade de degranular mastócitos e consequentemente liberar aminas, histamina e serotonina e assim induzir edema local após injeção subplantar em ratos *Rattus norvegicus*, tendo como o pico de formação de edema aos 30 minutos a 2 horas após a injeção, caindo bruscamente após 5 horas da administração, e essa queda significativa que pode ser em virtude de um estímulo anti-inflamatório, que inclusive os mesmos autores discutem três anos depois em Santos e Rao. (2000).

De forma semelhante, a este trabalho, Santos e Rao. (2000) avaliaram que o 1,8-cineol, composto majoritário do OE de *E. radiata*, reduziu significativamente o edema de pata em ratos, destacando ainda que esse monoterpene entre suas várias potencialidades biológicas, destaca-se a ação anti-inflamatória, contudo, os autores relataram que o mecanismo pelo qual o 1,8-cineol exerce sua ação anti-inflamatória não está claro, mas que provavelmente ocorre devido uma inibição significativa na produção de citocinas (TNF α , IL1-b), leucotrieno B4, tromboxano B2 e prostaglandina E2, diminuindo a formação de mediadores inflamatórios. Adicionalmente, Asanova *et al.* (2003) verificou que o 1,8-cineol extraído da *Artemisia cina* Berg., possui moderada ação analgésica, anti-inflamatória e antiexudante em modelo de edema (carragenina), *in vivo* utilizando ratos *Rattus norvegicus*, e observou que esse composto de forma isolada inibiu 30% do crescimento do edema em relação ao controle (aspirina), contudo, quando os autores verificaram a ação do OE da *Artemisia cina* Berg. a ação foi comparável a da aspirina, levantando a hipótese de que o efeito terapêutico deste óleo essencial é provavelmente devido à ação sinérgica do composto majoritário, 1,8-cineol, com alguma outra combinação de triterpenóides. Assim, vale a pena refletir que os efeitos promissores do gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata*, neste trabalho, podem ser provavelmente, tanto em virtude do composto majoritário, quanto devido ao sinergismo entre os compostos bioquímicos presentes no OE.

Quanto à presença de infiltrado celular, no quadro 1 e figura 8, foi detectável, em maior quantidade, respectivamente em 100% e 60% dos animais do grupo C4 e E4. Nas lesões ao 7º dia de avaliação, à presença de infiltrado celular, continuou sendo detectável em maior quantidade em 100% dos animais do grupo C7 e E7 e em apenas 40% dos animais do grupo B7 (quadro 2 e Figura 8). Nas lesões ao 14º dia de avaliação, o infiltrado celular, foi detectável, em maior quantidade, em respectivamente 80%, 100% e 40% dos animais dos grupos C14, B14 e E14 (quadro 3 e Figura 8). Evidenciando-se dessa forma que o grupo E tratado com gel creme

a base de 5% do OE de *E. radiata* estimulou mais rapidamente, a migração de mediadores químicos da inflamação, na ferida dermatológica, em comparação a pomada antibiótica com uma combinação de bacitracina zínica e sulfato de neomicina, bem como também demonstrou mais rápida resolução da inflamação, pois ao longo do 14º dia de avaliação o grupo E apresentou significativa redução do infiltrado celular em comparação com os demais grupos, indicando o possível potencial da formulação a base de eucalipto no desfecho do processo de cicatrização, situação essa que vai ao encontro dos achados na pesquisa de Santos *et al.* (2004) na qual foi observada a capacidade do 1,8-cineol (400 mg/Kg) em promover ação antiinflamatória, na redução do infiltrado de neutrófilos e na redução da detecção da enzima mieloperoxidase na colite induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico em ratos (*Rattus norvegicus*), desse modo enfatizando o potencial de redução de infiltrados celulares que possivelmente o OE de *E. radiata* possui, haja visto que seu composto majoritário é o 1,8-cineol. Da mesma forma, o trabalho de Juergens *et al.* (2004) também corroboram com os resultados, deste estudo, visto que a pesquisa desses autores evidenciou que doses diárias de 1,8-cineol (200 mg as 8:00 am, 2:00 am e 8:00 pm ao longo de 12 semanas) em pacientes humanos com diagnóstico de asma brônquica (32-75 anos de idade) reduziram, infiltrado de linfócitos e monócitos, a produção de citocinas como o TNF- α e IL-1 β , assim reforçando a hipótese de que o OE de *E. radiata* tem potencial de inibir o processo de inflamação.

Em relação ao tecido de granulação, no quadro 1 e figura 8, nas lesões ao 4º dia de avaliação, 100% dos animais de todos os grupos C4, B4 e E4 apresentaram tecido imaturo, assim como nas lesões ao 7º dia de avaliação (quadro 2 e Figura 8). Nas lesões ao 14º dia de avaliação, respectivamente, em 20% e 80% dos animais dos grupos C14 e E14 apresentaram tecido maduro, contudo, nenhum dos animais do grupo B14 apresentaram tecido maduro (quadro 3 e Figura 8). Revelando dessa maneira que a formulação a base de 5% do OE de *E. radiata* possui significativa influência na maturação tecidual e estímulo precoce de cicatrização. Tunel *et al.* (2016) também obteve resultados similares ao desta pesquisa avaliar o efeito do OE da *Alpinia Zerumbet*, Zingiberaceae, no processo de reparo tecidual *in vivo* (*Wistar albino*), cuja composição é rica em 1,8-cineol, e observou que esse OE inibiu o processo inflamatório e atuou como modulador do processo inflamatório, acelerando eventos fisiopatológicos associados ao processo de reparo tecidual, como a retração da área da ferida e a maturação da reação ou tecido de granulação. Diante do exposto, o resultado de Tunel *et al.* (2016) vem a somar para legitimar os resultados desta pesquisa, o potencial de cicatrização provindo do gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata*.

Quanto ao colágeno, no quadro 1 e figura 8, nas lesões ao 4º dia de avaliação, 100%

dos animais do grupo B4 e E4 apresentaram produção de fibras colágenas, contudo, no grupo C4, 40% dos animais não produziram essas fibras. Nas lesões ao 7º dia de avaliação, a maior produção de colágeno, foi respectivamente em 80%, 60% e 60% dos animais dos grupos C7, B7 e E7 (quadro 2 e figura 8). Nas lesões ao 14º dia de avaliação, a maior expressão de colágeno foi para o grupo E14 sendo observado em 60% dos animais, seguido do grupo C14 em 20% dos animais (quadro 3 e figura 8). Pelo exposto, observou-se que a formulação a base de OE de *E. radiata* estimulou de maneira mais eficaz a produção de fibras colágenas, quando comparado ao grupo que foi submetido a pomada antibiótica com uma combinação de bacitracina zínica e sulfato de neomicina. Óleos essenciais ricos em terpenos, como o 1,8-cineol, podem estimular a atividade pró-reparativa de tecidos por meio de um provável efeito estimulatório sobre fibroblastos e turnover do colágeno tipo I, modelando o tecido original (SANTOS-JÚNIOR, 2013).

Conforme o critério de reepitelização, no quadro 1 e figura 8, nas lesões ao 4º dia de avaliação, houve regeneração do epitélio, respectivamente, em 40%, 60% e 100% dos animais dos grupos C4, B4 e E4. Nas lesões ao 7º dia de avaliação, 100% dos animais de todos os grupos C7, B7 e E7 produziram epitélio (quadro 2 e figura 8). Nas lesões ao 14º dia de avaliação, a maior expressão foi detectada no grupo E14, sendo que 20% dos animais apresentaram reepitelização completa (quadro 3 e figura 8). O gel-creme a base de OE de *E. radiata* estimulou a precoce reepitelização do leito da ferida dermatológica quando comparado ao grupo submetido a pomada antibiótica com uma combinação de bacitracina zínica e sulfato de neomicina. Após a formação do coágulo, formação de crosta, edema, recrutamento de mediadores químicos da inflamação, estabelecimento do tecido de granulação primário (vasos sanguíneos invasores, formação de tecido endotelial e fibroblastos e seus produtos, como colágeno fibrilar, elastina, fibronectina, etc), os fibroblastos, mais precisamente os miofibroblastos, presentes no tecido de granulação, contraem as paredes marginais da lesão, forçando as fibras de colágeno a se sobreporem e se entrelaçarem, reduzindo a área de sangramento e facilitando a reepitelização que levará ao fechamento das superfícies da lesão e que é iniciada pela migração de células epiteliais (queratinócitos) desde as margens da ferida (OLIVEIRA; DIAS, 2012). Segundo, Santos-Júnior (2013) óleos essenciais ricos em terpenos, podem estimular a atividade pró-reparativa de tecidos por modulação da ação dos fibroblastos e do colágeno.

Quanto ao evento de hemorragia, no quadro 1 e Figura 8, nas lesões ao 4º dia de avaliação, em 100% dos animais de cada um dos grupos B4 e E4 foram evidenciados focos de sangramento. Nas lesões ao 7º dia de avaliação, ocorreu hemorragia em 20%, 60% e 100% dos

animais dos grupos C7, B7 e E7 (quadro 2 e Figura 8). Nas lesões ao 14º dia de avaliação, nenhum evento hemorrágico foi constatado nos animais do grupo E14, contudo em 40% e 20% dos animais do grupo C14 e B14 apresentaram hemorragia (quadro 3 e Figura 8). A ausência de foco hemorrágico em 100% dos animais do grupo submetido a formulação do OE de *E. radiata*, vem a reforçar a hipótese de que a presente formulação rica em diversos terpenos, com potentes ações biológicas, possui um provável efeito de aceleração do processo de cicatrização. Depois de estruturados o tecido de granulação maduro e o processo de epitelização na ferida dermatológica, o fluxo sanguíneo e a oxigenação são restabelecidos, dessa forma o principal fator desencadeador da angiogênese é reduzido e os vasos neoformados começam a diminuir, reduzindo assim os focos de sangramento (OLIVEIRA; DIAS, 2012; NETO, 2003).

Diante do exposto, pode-se refletir que a composição bioquímica do OE de *E. radiata*, sobretudo do seu composto majoritário o 1,8-cineol, possivelmente exerceu notável influência para o favorecimento do processo de cicatrização *in vivo*, neste trabalho. Adicionalmente, também é oportuno mencionar e enfatizar que parâmetros físico-químicos do gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata*, como o pH, também pode ter contribuído para o êxito no processo cicatricial estudado, nesta pesquisa.

O pH de uma preparação para aplicação cutânea deve ser cuidadosamente observado, uma vez que cada produto deve apresentar pH compatível com a região do corpo onde se aplica. A pele humana tem normalmente um pH médio de 5,5, que pode variar ligeiramente conforme as diferentes zonas do corpo (OLIVEIRA, 2009). O pH natural da pele provém das secreções das glândulas apócrinas e endócrinas (suor e sebo) que contém enzimas bactericidas (lisozima), anticorpos e ácido láctico, que dá à pele um valor de pH ácido (MENDES *et al.*, 2016). O pH da pele pode variar de 4 a 6, dependendo da idade e localização anatômica. Esta particularidade de pH da pele proporciona uma barreira contra a proliferação de microrganismos e favorece os processos de reparação tecidual (MENOÍTA; SEARA; SANTOS, 2014).

O processo de cicatrização compreende uma cascata de eventos complexos e sequenciais, entre esses eventos existem diversos fatores que alteram o processo de cicatrização e um deles é a variação do pH das feridas. Em geral o pH alcalino tem sido observado como um indicativo de possível processo infeccioso e presente nas feridas crônicas, consequentemente o pH ligeiramente ácido em grande maioria favorece o processo cicatricial e aumenta as chances de cura (FARIAS *et al.*, 2021). Na tabela 3, o gel creme a base de OE de *E. radiata* a 5% apresentou pH de caráter ácido de (3,82), sendo compatível com o pH do leito das feridas dermatológicas nos modelos murinos.

De acordo com Svensson e Wahlstrom (2017) feridas com valores de pH entre 4,5-5,5 tem menores chances de infecção e complicações, para que ocorra o processo de cicatrização, o ideal é que a ferida mantenha o pH o mais próximo do pH da pele (4 a 6) e que o ambiente seja mantido o mais invariável possível para o melhor processo de cura.

Durante o processo de reparação tecidual de uma ferida ocorre uma intensa demanda metabólica (SIRKKA et al, 2016). Entre as exigências metabólicas para viabilizar o processo cicatricial pode-se elencar o aumento da demanda de oxigênio (O₂), contudo devido ao processo de vasoconstricção, ocorre uma diminuição do fluxo sanguíneo no leito da ferida e consequentemente uma redução de O₂ e aumento da presença de CO₂ e produção de ácido lático o que contribui para a manutenção do pH ácido no leito da ferida, ou seja, uma acidificação fisiológica. Contudo essa acidose fisiológica temporária no leito da ferida estimula a dissociação da hemoglobina do oxigênio, deixando assim o O₂ livre para os tecidos favorecendo a cicatrização, esse cenário é denominado efeito Bohr. Uma redução de 0,6 unidades de íons hidrogênio liberta aproximadamente 50% de oxigênio livre para os tecidos (MENOÍTA, 2015). Neste estudo o controle positivo, grupo B (bacitracina zínica + sulfato de neomicina), foi tratado com uma pomada de pH ácido, visto que a bacitracina zínica tem pH ácido (5,7) (SCOGIN; BALDWIN; GENNIS, 1983) e a neomicina possui grupo amina, quanto mais amina menor o pH (PUB CHEM, 2022) que visa justamente não alterar o pH natural da pele (4 a 6) e favorecer o processo de cicatrização, assim como a formulação deste trabalho, grupo E (gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata*) que também possui pH ácido.

O pH levemente ácido estimula a quimiotaxia de macrófagos e leucócitos para o leito da ferida (PERCIVAL *et al.*, 2014). A angiogênese também é favorecida em pH baixo, uma vez que estimula a produção de citocinas e enzimas pro-angiogênicas que visam restaurar o suprimento sanguíneo em um tecido rompido (LEMOS, 2008).

Assim, o gel creme a base do OE de *E. radiata* reúne qualidades desde físico-químicas (pH, densidade, aspecto, odor, cor) e uma composição bioquímica relevante, formada por diferentes terpenos, como o 1,8-cineol que se destacam por importantes bioatividades, que se tornam oportunas para o desencadear da cascata de eventos que culminam no processo de cicatrização tecidual, o que provavelmente contribuiu para os resultados observados na presente pesquisa.

O gel creme a base do OE de *E. radiata* é um produto novo e que precisa ainda ser melhor investigado. Sendo assim, são necessários mais estudos para melhor caracterizar e elucidar as potencialidades biológicas dessa formulação. Além disso, é necessário realizar testes antimicrobianos, abrangendo um espectro de cepas bacterianas, fúngicas, protozoárias, entre

outras. Adicionalmente, também é importante investigar seu potencial toxicológico.

Cabe destacar que existe a possibilidade do OE de *E. radiata* apresente outros efeitos biológicos e possa ser matéria-prima para diversas tecnologias (na composição de curativos, adjunto em fármacos já disponíveis no mercado, sabonetes antimicrobianos, entre outras possibilidades) possuindo, portanto, um imenso potencial científico e tecnológico a ser explorado.

8 CONCLUSÃO

O processo de utilização do OE de *E. radiata* na formulação de um creme apresentou-se ser viável, mantendo o odor característico do óleo. O creme apresentou boa compatibilidade com o O.E. de *E. radiata*, obteve adequada espalhabilidade, não apresentou mudança de coloração, mantendo se constante sua estabilidade na maioria dos testes realizados.

O gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata*, neste trabalho, demonstrou ter potencial de estimular e favorecer o processo de cicatrização *in vivo* em ratos (*Rattus norvegicus*).

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata* é um produto novo, advindo de uma planta medicinal, segundo as análises de caracterização do OE de *E. radiata*, conforme anexo A, evidencia que o composto majoritário desse produto é o terpeno 1,8-cineol, contudo são necessários mais ensaios para verificar se suas potencialidades biológicas, como a capacidade de favorecer o processo de cicatrização, são em sua maioria atribuídas a esse composto ou devido ao sinergismo com outros compostos presentes no OE de *E. radiata*. Dessa maneira, são oportunos também testes antimicrobianos *in vitro* e *in vivo*, com o gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata*, envolvendo micróbios como vírus, fungos, protozoários, helmintos e cepas bacterianas, para melhor investigar a suscetibilidade dos microrganismos a essa formulação.

Adicionalmente, também é importante investigar seu potencial toxicológico, além de explorar outras possíveis atividades biológicas do OE de *E. radiata*, para que ele possa ser matéria-prima para diversas outras tecnologias, possuindo, portanto, um imenso potencial científico e tecnológico a ser explorado.

10 PERSPECTIVAS

- a) Realizar teste de controle microbiológico do gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata* conforme a RDC 481/99;
- b) Executar ensaios de natureza crônica, haja visto que os resultados *in vivo* desta pesquisa são ensaios agudos;
- c) Avaliar o potencial antimicrobiano do gel creme a base de 5% do OE de *E. radiata* contra bactérias e fungos de importância clínica humana e/ou veterinária, como contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, entre outros;
- d) Avaliar o possível potencial de cicatrização do gel creme a base de 3% e 1,5% do OE de *E. radiata*;
- e) Verificar se o gel creme a base de 1,5% e 3% do OE de *E. radiata* apresenta um efeito dose resposta, quando comparado aos resultados deste ensaio;
- f) Realizar análise toxicológica.

REFERÊNCIAS

- ABUBAKAR, A. R.; HAQUE, M. Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1-10, jan. 2020.
- ALI, B. *et al.* Essential oils used in aromatherapy: a systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 601-611, ago. 2015.
- AMIRI, H. Volatile constituents and antioxidant activity of flowers, stems and leaves of *Nasturtium officinale*. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 109-115, jan. 2012.
- AROMAVIDA. **Como calcular o número de gotas e a concentração da sua formulação?** [S. l.]: AromaVida, 2021. Publicado em 29 de abril de 2021. Disponível em: <https://www.aromavidarp.com.br/blog/como-calculiar-o-numero-de-gotas-e-a-concentracao-da-sua-formulacao-> Acesso em: 31 maio 2022.
- ASANOVA, Z. K. *et al.* Biological activity of 1, 8-cineole from levant wormwood. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 28-30, jan. 2003.
- BARBOSA, L. C. A.; FILOMENO, C. A.; TEIXEIRA, R. R. Chemical Variability and Biological Activities of Eucalyptus spp. Essential Oils. **Molecules**, [s. l.], v. 21, n. 1671, p. 1-9, jan. 2016.
- BONIFANT, H.; HOLLOWAY, S. A review of the effects of ageing on skin integrity and wound healing. **British Journal of Community Nursing**, London, v. 1, n. 24, p. 28-33, jan. 2019.
- BRANCO NETO, M. L. C. *et al.* Avaliação do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 15-20, jan. 2006.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 01, de 29 de julho de 2010. Guia para a realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 jul. 2010. Seção 1, p. 1. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0001_29_07_2005.html Acesso em: 10 jul. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira v. 1**. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019.
- CAI, Z. M. *et al.* 1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application. **Journal of Asian Natural Products Research**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 938-954, out. 2020.
- CARY, J. W. *et al.* *Aspergillus flavus* secondary metabolites: more than just aflatoxins. **Food Safety**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 7-32, jan. 2018.
- CHAKRABARTI, S. *et al.* Aspects of nanomaterials in wound healing. **Current Drug**

Delivery, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 26-41, jan. 2018.

CAPETTI, F. *et al.* Bio-guided fractionation driven by *in vitro* α -amylase inhibition assays of essential oils bearing specialized metabolites with potential hypoglycemic activity. **Plants (Basel)**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 1242-1249, set. 2020.

COELHO, K. D. *et al.* Desenvolvimento e avaliação da estabilidade e capacidade antioxidante de uma formulação em gel contendo o extrato das folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.). **Biomotriz**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1-8, jan. 2016.

DAESCHLEIN, G. Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. **International Wound Journal**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 9-14, jan. 2013.

DHAKAD, A. K. *et al.* Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 833-848, mar. 2017.

DUAN, H. *et al.* Elevated [CO₂] does not ameliorate the negative effects of elevated temperature on drought-induced mortality in *Eucalyptus radiata* seedlings. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 37, n. 7, p. 1598-1613, jul. 2014.

SCOGIN, A. D.; BALDWIN, T. O.; GENNIS, R. B. Studies on the complex formed between bacitracin A and divalent cations. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 742, n. 1, p. 184-188, jan. 1983.

ERB, M.; KLIEBENSTEIN, D. J. Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 184, n. 1, p. 39-52, jan. 2020.

FARIAS, R. C. *et al.* Capítulo 1: A influência do pH no processo de cicatrização de feridas. In: SILVA NETO, B. R. (Org.). **Medicina: aspectos epidemiológicos, clínicos e estratégicos de tratamento 4**. Ponta Grossa: Atena, 2021. cap. 1, p. 1-33.

FILOMENO, C. A. Composição química e atividade inseticida de óleos essenciais de espécies de myrtaceae contra *Plutella xylostella* e *Rhyzopertha Dominica*. 2016. 175 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.

FISCHER, J.; DETHLEFSEN, U. Efficacy of cineole in patients suffering from acute bronchitis: a placebo-controlled double-blind Trial. **Cough**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 25-30, jan. 2013.

GASPAR, S. *et al.* Effectiveness on hospital-acquired pressure ulcers prevention: a systematic review. **International Wound Journal**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 1087-1102, maio 2019.

GEORGE, D. R. *et al.* Variation in chemical composition and acaricidal activity against *Dermanyssus gallinae* of four eucalyptus essential oils. **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 43-50, jan. 2009.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2008.

GOULDING, M.; SMITH, N. **Palmeiras: sentinelas para a conservação da Amazônia**. Lima: Amazon Conservation Association, 2007. 358 p.

GRAY, M. The journal of wound, ostomy and continence nursing at 40: living on a global stage. **Journal of Wound, Ostomy and Continence Nursing**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 563-564, jun. 2013.

HAO, X. Y. *et al.* Topical phenytoin for treating pressure ulcers. **Cochrane Database Systematic Reviews**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 1-8, fev. 2017.

HEIN, L.; LULLMANN H.; MOHR K. **Farmacologia: texto e atlas**. 7. ed. São Paulo: Artmed, 2016.

HO, C. L.; LI, L. H.; WENG, Y. C.; HUA, K. F.; JU, T. C. Eucalyptus essential oils inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages through reducing MAPK and NF- κ B pathways. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, [s. l.], v. 20, n. 200, p. 1-7, jun. 2020

HORVATHOVA, E. *et al.* Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-protective effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 6632-6639, jan. 2014.

JESUS, J. G. *et al.* Elaboration of topical pharmaceutical formulas using essential oil extracted from lemongrass. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 3, p. 21800-21815, mar. 2021.

JIANG, Z. *et al.* The essential oils and eucalyptol from artemisia vulgaris l. prevent acetaminophen-induced liver injury by activating Nrf2-Keap1 and Enhancing APAP clearance through non-toxic metabolic pathway. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 10, n. 782, p. 1-12, jul. 2019.

JUERGENS, U. R. *et al.* Antiinflammatory activity of 1,8-cineole (eucalyptol) in bronchial asthma: a double blind placebo-controlled Trial. **Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 256-257, mar. 2004.

KENNEDY-FEITOSA, E. *et al.* Eucalyptol promotes lung repair in mice following cigarette smoke-induced emphysema. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 70-79, jan. 2019.

LEAL, E. R. *et al.* Ação cicatrizante da nanopartícula de prata com norbixina em queimaduras. **ConScientiae Saúde**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 241-248, fev. 2017.

LEMONS, Q. T. **Angiogênese e fibrose hepática experimental**. 2008. 86 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

LICHTERFELD, A. *et al.* Systematic mapping review about costs and economic evaluations of skin conditions and diseases in the aged. **Journal of Tissue Viability**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 6-19, fev. 2016.

LINGHU, K. G. *et al.* 1,8-Cineole Ameliorates LPS-Induced Vascular Endothelium

- Dysfunction in Mice via PPAR- γ Dependent Regulation of NF- κ B. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1-11, jan. 2019.
- LORDANI, T. V. A. *et al.* Therapeutic effects of medicinal plants on cutaneous wound healing in humans: a systematic review. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1-12, jan. 2018.
- LU, B. *et al.* Imidazole-molecule-capped chitosan-gold nanocomposites with enhanced antimicrobial activity for treating biofilm-related infections. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 531, n. 1, p. 269-281, jan. 2018.
- LUÍS, A. *et al.* Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 79, n. 1, p. 274-282, jan. 2015.
- MAHUMANE, G. D. *et al.* The potential for *Eucalyptus radiata* leaf essential oil use as a commercial antimicrobial. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 98, n. 1, p. 186-187, jan. 2015.
- MENDES, B. R. *et al.* Avaliação crítica do pH dos sabonetes infantis. **Jornal de Pediatria**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 290-295, mar. 2016.
- MENOITA, E. C. **Gestão de Feridas Complexas**. Loures: Lusodidacta, 2015.
- MENOITA, E.; SEARA, A.; SANTOS, V. Plano de tratamento dirigido aos sinais clínicos da infecção da ferida. **Journal of Aging & Innovation**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 62-73, fev. 2014.
- MERECZ-SADOWSKA, A. *et al.* The modulatory influence of plant-derived compounds on human keratinocyte function. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 22, p. 1-10, jan. 2021.
- MERECZ-SADOWSKA, A. *et al.* Anti-inflammatory activity of extracts and pure compounds derived from plants via modulation of signaling pathways, especially PI3K/akt in macrophages. **Int. J. Mol. Sci.**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1-6, jan. 2020.
- MODARRESI, M.; FARAHPOUR, M.-R.; BARADARAN, B. Topical application of *Mentha piperita* essential oil accelerates wound healing in infected mice model. **Inflammopharmacology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 531-537, mar. 2019.
- MOTA, V. S.; TURRINI, R. N. T.; POVEDA, V. B. Atividade antimicrobiana do óleo de *Eucalyptus globulus*, xilitol e papaína: estudo piloto. **Rev Esc Enferm USP**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 216-220, fev. 2015.
- MURATA, S. *et al.* 1,8-Cineole Ameliorates Steatosis of Pten Liver Specific KO Mice via Akt Inactivation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 12051-12063, jun. 2015.
- MULYANINGSIH, S. *et al.* Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharm. Biol.**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 893-899, jan. 2011.

MURPHREE, R. W. Impairments in skin integrity. **Nursing Clinics of North America**, [s. l.], v. 52, n. 3, p. 405-417, mar. 2017.

NISHIMURA, H. *et al.* Essential oil of *Eucalyptus* as reproductive biomass. **Koen Yoshishu Koryo, Terupen Oyofi Seiyu Kagaku Nikausura Toronkai**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 195-197, jan. 1979.

NETO, J. C. L. **Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em equinos em 2003**. [S. l.]: [s. n.], 2003. Disponível em: <http://br.merial.com/pdf/arquivo8.pdf> Acesso em: 10 jan. 2022.

OLIVEIRA, A. Z. M. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com Ácido hialurônico**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, 2009.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 267-271, abr. 2012.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. **International Wound Journal**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 5-19, jan. 2017.

OTSUKA, H. *et al.* Studies on anti-inflammatory agents: anti-inflammatory screening by fertile egg method. **Yakugaku Zasshi**, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 796-801, jan. 1974.

ÖTÜN, B.; YÜCEL, U. M. Wound healing effect of different extracts of *Centaurea pterocaula*. **Bangladesh J Pharmacol.**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 9-16, jan. 2019.

PAUL, K. *et al.* Is 1,8-Cineole-Rich extract of small cardamom seeds more effective in preventing Alzheimer's Disease than 1,8-Cineole Alone? **Neuromolecular Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 150-158, jan. 2020.

PARK, I. K.; SHIN, S. C. Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 11, p. 4388-4392, nov. 2005.

PEDROLO, E. *et al.* Cost effectiveness of dressing in the prevention of catheter-related infection in critically ill patients. **The Journal of Infection in Developing Countries**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 871-877, out. 2018.

PENÍN, L. *et al.* Technologies for Eucalyptus wood processing in the scope of biorefineries: a comprehensive review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 311, n. 9, p. 1-15, set. 2020.

PERCIVAL, T. L. *et al.* Antiseptics for treating infected wounds: efficacy on biofilms and effect of Ph. **Crit Rev Microbiol.**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 293-309, ago. 2016.

PIMENTA NETO, A. A. *et al.* Bioatividade de óleos essenciais e extratos vegetais no controle de doenças causadas por *Phytophthora nicotianae* em solanáceas. **Summa**

Phytopathol., Botucatu, v. 46, n. 3, p. 267-272, mar. 2020.

PINTO, P. *et al.* Definição de critérios de avaliação dos efeitos sobre a superfície cutânea de cremes hidratantes: I – análise após uma aplicação. **Revista Portuguesa de Farmácia**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 23-34, jan. 1997.

PRATIKCHA, R. *et al.* Development of sheep butter based cream for dermal wound healing. **Int. J. Pharm. Investigation**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 43-48, jan. 2020.

PRODINGER, C. *et al.* *Epidermolysis bullosa*: advances in research and treatment. **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 1176-1189, out. 2019.

PUB CHEM. **Neomycin**. [S. l.]: NCBI, 2022. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Neomycin> Acesso em: 03 mar. 2022.

QUINTA DOS OURIQUES. **Eucalyptus sp.** [S. l.]: Quinta dos ouriques, 2021. Disponível em: <https://www.quintadosouriques.com/store/seeds/trees/eucalyptus/red-stringybark/> Acesso em: 01 jan. 2022.

RODRIGUES, L. A. Avaliação biofísica da superfície cutânea: indicadores fisiológicos da funcionalidade epidérmica. **Revista portuguesa de farmácia**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 52-59, jan. 1995.

RODRIGUES, L. Bioengenharia cutânea: novas perspectivas sobre a fisiologia da pele. **Cosmetics & Toiletries**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 51-55, abr. 1996.

RODRIGUEZ, M. I. A. *et al.* Practical context of enzymatic treatment for wound healing: A secreted protease approach (Review). **Biomedical Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 3-14, jan. 2020.

SAMPATH, S. *et al.* Bioactive compound 1,8-Cineole selectively induces G2/M arrest in A431 cells through the upregulation of the p53 signaling pathway and molecular docking studies. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 57-68, jan. 2018.

SÁNCHEZ, G. *et al.* Sun protection for preventing basal cell and squamous cell skin cancers. **Cochrane Database Systematic Reviews**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 1-34, jul. 2016.

SANTOS, F. A. *et al.* 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-Colitis. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 579-584, jan. 2004.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 240-244, jan. 2000.

SANTOS JÚNIOR, L. **Avaliação do efeito do óleo essencial da *Alpinia zerumbet*, Zingiberaceae no processo cicatricial após tenotomia parcial no tendão do calcâneo de ratos.** 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Animal) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2013.

- SAUAIA, A.; MOORE, F. A.; MOORE, E. E. Postinjury inflammation and organ dysfunction. **Critical Care Clinics**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 167-191, jan. 2017.
- SHAH, D.; MITAL, K. The role of trypsin: chymotrypsin in tissue repair. **Advances in Therapy**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 31-42, jan. 2018.
- SILVA, D. R. A. *et al.* Pressure ulcer dressings in critical patients: a cost analysis. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 51, n. 1, p. 1-9, jan. 2017.
- SILVA, S. M. M. *et al.* Wound healing effect of essential oil extracted from *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) Leaves. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 1-7, dez. 2018.
- SIRKKA, T.; SKIBA, J. B.; APELL, S. P. **Wound pH depends on actual wound size**. [S. l.]: Department of Physics and Gothenburg Physic Centre, 2016. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/1601.06365> Acesso em: 10 jul. 2022.
- SITAREK, P. *et al.* An in vitro evaluation of the molecular mechanisms of action of medical plants from the lamiaceae family as effective sources of active compounds against human cancer cell lines. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1-9, jan. 2020.
- SERRA, M. B. *et al.* Chemical characterization and wound healing property of *Jacaranda decurrens* Cham. (Bignoniaceae): an experimental study based on molecular mechanisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1-13, jan. 2020.
- SLAWOMIRSKI, L.; AURAAEN, A.; KLAZINGA, N. **The economics of patient safety: strengthening a value-based approach to reducing patient harm at national level**. Paris: OECD Publishing, 2017.
- SVENSSON, E.; WAHLSTROM, E. **Monitoring pH in wounds: the possibilities of textiles in healthcare**. Gothenburg: Linné, 2017. Disponível em: https://hb.diva-portal.org/smash/record.jsf?aq2=%5B%5B%5D%5D&c=7&af=%5B%5D&searchType=LIS_T_LATEST&query=&language=en&pid=diva2%3A1120581&aq=%5B%5B%5D%5D&sf=all&aqe=%5B%5D&sortOrder=author_sort_asc&onlyFullText=false&noOfRows=50&dswid=-6615 Acesso em: 10 jul. 2022.
- TEOH, E. S. **Medicinal orchids of Asia**. Berlin: Springer, 2016.
- THACKER, P. A. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. **Thacker Journal of Animal Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 4, n. 35, p. 1-13, jan. 2016.
- TIBIRIÇA, C. L. *et al.* Antimicrobial activity of Melaleuca essential oil and its incorporation into a mucocutaneous cream. **Revista Fitos**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 26-37, jan. 2020.
- TOCCO, I. *et al.* Nanotechnologybased therapies for skin wound regeneration. **Journal of Nanomaterials**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1-9, jan. 2012.
- TUNEL, F. M. S. *et al.* Avaliação do efeito do óleo essencial da *Alpinia Zerumbet*, *Zingiberaceae* no processo de reparo tecidual em modelo murino. *In*: SEMANA DE

PESQUISA DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, 18., Aracaju, 2016. **Anais** [...] Aracaju: Unit, 2016.

VIEIRA, S. **Bioestatística**: tópicos avançados. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

WORTH, H.; DETHLEFSEN, U. Patients with asthma benefit from concomitant therapy with cineole: a placebo-controlled, double-blind Trial. **Journal of Asthma**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 849-853, ago. 2012.

WORTH, H.; SCHACHER, C.; DETHLEFSEN, U. Concomitant therapy with Cineole (Eucalyptole) reduces exacerbations in COPD: a placebo-controlled double-blind Trial. **Respiratory Research**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 69-74, jan. 2009.

YADAV, N.; CHANDRA, H. Suppression of inflammatory and infection responses in lung macrophages by eucalyptus oil and its constituent 1,8-cineole: Role of pattern recognition receptors TREM-1 and NLRP3, the MAP kinase regulator MKP-1, and NFκB. **Plos one**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1-6, nov. 2017.

YIN, C. Y. *et al.* Eucalyptol alleviates inflammation and pain responses in a mouse model of gout arthritis. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 177, n. 9, p. 2042-2057, set. 2020.

YOON, D. *et al.* Accelerated wound healing by fibroblasts differentiated from human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in a pressure ulcer animal model. **Hindawi**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1-13, jan. 2018.

ANEXO A – CHROMATOGRAM OE DE *E. RADIATA*

| Peak# | R.Time | Name | Area% |
|-------|--------|---------------------------------|--------|
| 1 | 8.945 | cis-3-Hexenol | 0.03 |
| 2 | 9.345 | trans-2-Hexenol | 0.02 |
| 3 | 9.472 | n-Hexanol | 0.02 |
| 4 | 12.171 | alpha-Thujene | 0.23 |
| 5 | 12.593 | alpha-Pinene | 2.23 |
| 6 | 13.414 | alpha-Fenchene | 0.01 |
| 7 | 13.515 | Camphene | 0.02 |
| 8 | 14.792 | Sabinene | 1.91 |
| 9 | 15.102 | beta-Pinene | 0.64 |
| 10 | 15.519 | 6-methyl-Hept-5-en-2-one | 0.01 |
| 11 | 15.712 | Myrcene | 1.31 |
| 12 | 16.664 | Pseudolimonene | 0.01 |
| 13 | 16.812 | alpha-Phellandrene | 0.81 |
| 14 | 17.467 | alpha-Terpiene | 0.28 |
| 15 | 18.007 | para-Cymene | 0.28 |
| 16 | 18.332 | Limonene | 6.04 |
| 17 | 18.613 | 1,8-cineole | 68.28 |
| 18 | 19.329 | trans-beta-Ocimene | 0.28 |
| 19 | 20.143 | gamma-Terpinene | 0.44 |
| 20 | 20.963 | cis-Sabinene hydrate | 0.05 |
| 21 | 21.949 | Terpinolene | 0.15 |
| 22 | 22.042 | trans-Linalool oxide (furanoid) | 0.05 |
| 23 | 22.929 | Linalool | 0.38 |
| 24 | 23.055 | trans-Sabinene hydrate | 0.02 |
| 25 | 24.673 | cis-para-Menth-2-en-1-ol | 0.25 |
| 26 | 25.919 | trans-para-Menth-2-en-1-ol | 0.17 |
| 27 | 26.368 | Isopulegol | 0.01 |
| 28 | 26.592 | Citronellal | 0.06 |
| 29 | 27.240 | cis-Chrysanthenol | 0.01 |
| 30 | 27.888 | delta-Terpineol | 0.23 |
| 31 | 28.138 | trans-Linalool oxide (pyanoid) | 0.02 |
| 32 | 28.591 | Terpinen-4-ol | 1.13 |
| 33 | 29.110 | Cryptone | 0.01 |
| 34 | 29.708 | alpha-Terpineol | 11.26 |
| 35 | 30.562 | trans-Piperitol | 0.10 |
| 36 | 30.953 | 3-oxo-Cineole | 0.01 |
| 37 | 31.555 | Nerol | 0.04 |
| 38 | 31.707 | Citronellol | 0.07 |
| 39 | 32.557 | Neral | 0.16 |
| 40 | 32.885 | Benzylacetone | 0.03 |
| 41 | 33.330 | Geraniol | 1.08 |
| 42 | 33.679 | Piperitone | 0.12 |
| 43 | 34.593 | Geranial | 0.22 |
| 44 | 38.772 | delta-Elemene | 0.01 |
| 45 | 39.809 | alpha-Terpinyl acetate | 1.07 |
| 46 | 41.869 | Geranyl acetate | 0.02 |
| 47 | 42.570 | beta-Elemene | 0.00 |
| 48 | 44.509 | beta-Caryophyllene | 0.13 |
| 49 | 46.786 | alpha-Humulene | 0.01 |
| 50 | 47.055 | Alloaromadendrene | 0.01 |
| 51 | 48.987 | Viridiflorene | 0.01 |
| 52 | 49.277 | Bicyclogermacrene | 0.18 |
| 53 | 52.477 | alpha-Elemol | 0.03 |
| 54 | 57.394 | gamma-Eudesmol | 0.01 |
| 55 | 58.731 | beta-Eudesmol | 0.03 |
| | | | 100.00 |

CUSTOMER: do Terra International

Lot number: 2201411

Data filled: 05/20/2020

Column: ZB5 (60 m length × 0.25 mm inner diameter × 0.25 µm film thickness)

Instrument: Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra

Carrier gás: Helium 80 psi

Temperature ramp: 2 degrees celsius per minute up to 260-degrees Celsius

Split ratio: 30:1

Sample preparation: 5% w/v solution with Dichloromethane

Comments: The analysis of this Eucalyptus lot revealed no contaminants or adulteration.

The sample meets the expected chemical profile for authentic essential oils of *Eucalyptus radiata*.

ANEXO B – CERTIFICADO DE DEFERIMENTO - CEUA



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO CICATRIZANTE DO ÓLEO DE EUCALIPTO (*Eucalyptus radiata*) EM FERIDAS DERMATOLÓGICAS”. Protocolo número , sob responsabilidade de *Rômulo José Vieira*, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **DEFERIDO AD REFERENDUM**, pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí.

| ESPÉCIE | LINHAGEM | SEXO | IDADE | PESO | VIGÊNCIA DO PROJETO | Nº DE ANIMAIS |
|-------------------|----------------|--------------|---------|-------|---------------------|---------------|
| RATO HETEROGÊNICO | WISTAR ALBINUS | MACHO+ FÊMEA | 60 DIAS | 300 G | 01 ANO | 45 |

TERESINA, 08 DE MARÇO DE 2022


Dr. Francisco Araújo
 Sub-Coordenador CEUA/UESPI
 Portaria Nº 1347 - 20/11/14
 CRMV - 0415/17