

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTIINFLAMATÓRIA,
CICATRIZANTE E ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO
E FRAÇÕES DAS FLORES DA *Calendula officinalis* L.
CULTIVADAS NO BRASIL**

Leila Maria Leal Parente
Orientadora: Neusa Margarida Paulo

GOIÂNIA
2008



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Leila Maria Leal Parente** CPF: _____ E-mail: **lathosvet@hotmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: _____ Agência de fomento: CAPES

País: **Brasil** UF: **GO** CNPJ: _____ Sigla: **UFG**

Título: Atividades angiogênica, antiinflamatória, cicatrizante e antibacteriana do extrato etanólico e frações das flores da Calendula officinalis L. cultivadas no Brasil Palavras-chave: **reparo, calêndula, plantas medicinais**

Título em outra língua: **Angiogenic, anti-inflammatory, healing and antibacterial activities of etanolic extract and fractions of flowers to Calendula officinalis L. cultivated in Brazil**

Palavras-chave em outra língua: **healing, calendula, medicinal plants**

Área de concentração: **Patologia, Clínica e Cirurgia** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **11/09/2008**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Neusa Margarida Paulo** CPF: _____ E-mail: **nmp@vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **Luíz Augusto Batista Brito** CPF: _____ E-mail: **labrito@vet.ufg.br**

Co-orientador(2): **José Realino de Paula** CPF: _____ E-mail: **jrp@cultura.com.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, toma-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 9 de outubro de 2008


Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

LEILA MARIA LEAL PARENTE

**ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTIINFLAMATÓRIA,
CICATRIZANTE E ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO
E FRAÇÕES DAS FLORES DA *Calendula officinalis* L.
CULTIVADAS NO BRASIL**

Tese apresentada para obtenção
do grau de Doutor em Ciência
Animal junto à Escola de
Veterinária da Universidade
Federal de Goiás.

Área de concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Neusa Margarida Paulo

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito

Prof. Dr. José Realino de Paula

GOIÂNIA

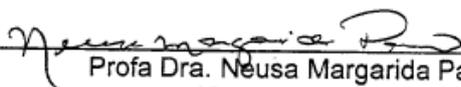
2008

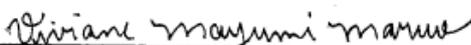
Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

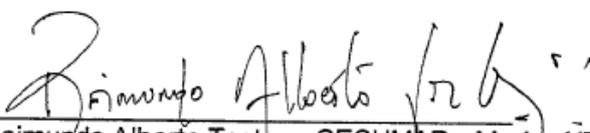
P228a	<p>Parente, Leila Maria Leal. Atividades angiogênica, antiinflamatória, cicatrizante e antibacteriana do extrato etanólico e frações das flores da <i>Calendula officinalis</i> L. cultivadas no Brasil [manuscrito] / Leila Maria</p>
Leal	<p>Parente . – 2008. xiii, 56 f. : il. ; figs., tabs, grfs., qd.</p>
Orienta-	<p>Orientadora: Profa. Dra. Neusa Margarida Paulo : Co-orientadores: Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito, Prof. Dr. José Realino de Paula.</p>
Realino	<p>Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2008.</p>
Paulo,	<p>Bibliografia. Inclui lista de figuras, tabelas, quadro e de abreviaturas. Apêndice.</p>
José	<p>1. Plantas medicinais 2. Calêndula – Cicatrização I. Paulo, Neusa Margarida II. Brito, Luiz Augusto Batista III. Paula, José Realino. IV. Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária. V. Título.</p>
de Veterinária.	CDU: 633.88

LEILA MARIA LEAL PARENTE

Tese defendida e aprovada em 11/09/2008 pela Banca Examinadora constituída pelos professores:


Profa. Dra. Neusa Margarida Paulo
(ORIENTADOR (A))


Profa. Dra. Viviane Mayumi Maruo - UFT/Tocantins-TO


Prof. Dr. Raimundo Alberto Tostes - CESUMAR - Maringá/PR


Profa. Dra. Moema Pacheco Chediak Matos


Profa. Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura -memoria

OFEREÇO

A Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de poder compartilhar com pessoas tão especiais, essa importante e bela etapa da minha vida.

DEDICO

Ao meu marido Paulo e aos meus filhos, Leandro e Athos, queridos, que com muito amor e carinho me incentivaram e apoiaram durante a execução deste trabalho, e sem os quais, eu não teria conseguido chegar até o fim.

Aos meus pais, Leila e Aquiles, pelo amor incondicional e por suas orações, que me fortaleceram e me animaram nos poucos momentos de dúvidas. Aos meus irmãos, José Aquiles e Guilherme, e as minhas irmãs, Lívia e Diana, pelo carinho, apoio e torcida para que tudo corresse bem.

AGRADECIMENTOS

A autora expressa os seus sinceros agradecimentos

aos integrantes da banca examinadora;

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos que foi de suma importância durante estes 36 meses de doutorado. À FUNAPE pelos auxílios que tive para realização das viagens a congressos.

à Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade proporcionada à realização deste curso;

à Professora Neusa Margarida Paulo pela orientação, amizade, apoio, alegria e tolerância durante todo este período;

ao Professor Luiz Augusto Batista Brito, pelo apoio incondicional, incentivo, paciência e pelos fundamentais momentos de correções;

à todos os colegas de pós-graduação, Liliana, Marcelo, Marina, Andréia, Leandro, Flávia, Lívia, Júlia, Ingrid, Karina, Renata, Ana Paula e Regiane, pelo companheirismo, apoio e incentivo, e sobretudo, pelos sinceros sorrisos, que tiveram e continuam a ter, o poder de transformar qualquer dia de chuva em lindas manhãs de sol.

à professora Moema Pacheco Chediak Matos, pela amizade, carinho, incentivo e por ter me emprestado um lugar tranquilo e sossegado, um pouso, para que eu pudesse organizar as idéias e escrever este trabalho;

à professora Maria da Conceição, pela amizade, companheirismo, compreensão, presença, apoio, incentivo em todas as etapas da realização deste trabalho.

À professora Maria Auxiliadora Andrade, pela amizade, alegria, correções, companheirismo, apoio e incentivo em todas as etapas deste trabalho.

ao professor José Henrique Stringhini, pela amizade, incentivo, gentileza e apoio;

à professora Maria Lúcia Gambarini Meirinhos, pela amizade, interesse e incentivo;

à professora Maria Clorinda S. Fioravanti, pela atenção, amizade e incentivo;

à professora Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura, pelas boas idéias, apoio, gentileza e atenção;

ao professor Eugênio Gonçalves de Araújo, pelo interesse, atenção e gentileza;

aos meus grandes e queridos amigos da Faculdade de Farmácia e do Instituto de Ciências Biológicas, Leonice Manrique F. Trevenzol, José Realino de Paula e Élson Alves Costa, companheiros de longas datas no estudo de plantas medicinais, pelo apoio, incentivo, clareza de idéias, confiança e carinho;

ao professor Ruy de Souza Lino Júnior, pela preciosa participação em todas as etapas do trabalho, pelo interesse, apoio, incentivo, amizade e atenção;

aos docentes e funcionários da Escola de Veterinária – UFG, que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

“Quando você partir, em direção a Ítaca,
que sua jornada seja longa,
repleta de aventuras, plena de conhecimento.

Não tema Laestrigones e Ciclopes nem o furioso Poseidon;
você não irá encontrá-los durante o caminho, se
o pensamento estiver elevado, se a emoção
jamais abandonar seu corpo e seu espírito.
Laestrigones e Ciclopes, e o furioso Poseidon
não estarão em seu caminho
se você não carregá-los em sua alma,
se sua alma não os colocar diante de seus passos.

Espero que sua estrada seja longa.
que sejam muitas as manhãs de verão,
que o prazer de ver os primeiros portos
traga uma alegria nunca vista.
Procure visitar os empórios da Fenícia,
recolha o que há de melhor.
Vá às cidades do Egito,
aprenda com um povo que tem tanto a ensinar.

Não perca Ítaca de vista,
pois chegar lá é o seu destino.
Mas não apresse os seus passos;
é melhor que a jornada demore muitos anos
e seu barco só ancore na ilha
quando você já estiver enriquecido
com o que conheceu no caminho.

Não espere que Ítaca lhe dê mais riquezas,
Ítaca já lhe deu uma longa viagem;
sem Ítaca, você jamais teria partido.
Ele já lhe deu tudo, e nada mais pode lhe dar.

Se, no final, você achar que Ítaca é pobre,
não pense que ela o enganou.
Porque você tornou-se um sábio, viveu uma vida intensa,
e este é o significado de Ítaca”.

Konstantinos Kavafis

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
REFERÊNCIAS.....	7
CAPÍTULO 2 – Atividade Angiogênica do extrato etanólico e das frações das flores da <i>Calendula officinalis</i> cultivadas no Brasil.....	12
RESUMO.....	13
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	19
DISCUSSÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 3 – Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da <i>Calendula officinalis</i> L. cultivada no Brasil.....	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	31
INTRODUÇÃO.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	48
CAPÍTULO 4 – Considerações finais.....	52
APÊNDICE	55

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – Flores da <i>Calendula officinalis</i> L. cultivadas no Brasil.....	3
--	---

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – Membrana corioalantóide à fresco evidenciando a influência do controle positivo 1% β -estradiol na porcentagem da área vascular.5x.....	20
FIGURA 2 – Membrana corioalantóide à fresco evidenciando a influência dos tratamentos na porcentagem da área vascular. (A) controle solvente (etanol a 70%), (B) extrato etanólico 1%, (C) fração diclorometano 1% e (D) fração hexânica 1%. 5x.....	21
FIGURA 3 — Efeito do controle solvente etanol a 70% (CS), controle positivo 17 β -estradiol 1% (CP), extrato etanólico 1% (EEC), fração diclorometano 1% (FDC) e fração hexânica 1% (FHC) no número de vasos sanguíneos da MCA de ovos embrionados de galinha.....	22
FIGURA 4 – Fotomicrografia do fragmento de MCA tratada com controle positivo 17 β -estradiol 1% mostrando inúmeros vasos sanguíneos (setas). Hematoxilina-eosina, 200x.....	23
FIGURA 5 – Fotomicrografia dos fragmentos de MCAs tratadas com: (A) controle solvente etanol a 70%, (B) extrato etanólico 1%, (C) fração diclorometano 1% e (D) fração hexânica 1% mostrando variações no número de vasos sanguíneos (setas). Hematoxilina-eosina, 200x.....	24
FIGURA 7 – Fotomicrografia da derme de rato no 7° dia do pós-operatório. (A) Controle solvente. (B) Extrato etanólico das flores da <i>C. officinalis</i> . Observar a quantidade de vasos com marcação positiva para VEGF (setas) na derme dos animais dos diferentes grupos. IHQ, 400x.....	25

CAPÍTULO 3

FIGURA 1– Médias da contração das feridas cutâneas em ratos (%) (n=6) aos 4º e 7º dias PO. Teste t pareado ($p < 0,05$).....	40
FIGURA 2 – Fotomicrografias das feridas cutâneas em ratos (n=6) aos 4 (A) e 7 (B) dias PO, evidenciando fibrina (Fb). A1 e B1 referem-se ao controle e A2 e B2 ao EEC, respectivamente. Hematoxilina-eosina.....	41
FIGURA 3 – Fotomicrografia da ferida cutânea em ratos (n=6) aos 4 (A) e 7 (B) dias PO, evidenciando hiperemia. Grupos controle (A1 e B1) e EEC (A2 e B2), respectivamente. Hematoxilina-eosina.....	42
FIGURA 4 - Fotomicrografia da ferida cutânea de ratos (n=6) evidenciando a hiperplasia epidermal (contorno). Grupos controle (A1) e EEC (A2) ao 14º dia PO. Hematoxilina-eosina.....	43
FIGURA 5 -Fotomicrografia de ferida cutânea em ratos (n=6) aos 4 (A) e 7 (B) dias PO. A1 (controle): produção de colágeno tipo III evidenciado pela coloração verde em luz polarizada; A2 (EEC): intensa produção de colágeno tipo III; B1 (controle): produção de colágeno tipo I evidenciado pela coloração amarela-alaranjado em luz polarizada; B2 (EEC): intensa produção de colágeno tipo I. Coloração Picrossírius.....	45

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 Morfometria das MCAs a fresco de ovos embrionados de galinha (n=10) tratadas com controle solvente etanol 70% (CS), controle positivo 1% 17 β -estradiol (CP), extrato etanólico das flores da <i>C. officinalis</i> 1% (EEC), fração diclorometano 1% (FDC) e fração hexânica 1% (FHC).....	20
TABELA 2 -. Influência dos tratamentos sobre o número de vasos sanguíneos na MCA de ovos embrionados de galinha. Valores médios e erro padrão da média.....	22
TABELA 3 – Influência dos tratamentos sobre o número de vasos sanguíneos na derme de ratos. Valores médios e erro padrão da média.....	24

CAPÍTULO 3

TABELA 1 – Valores médios e desvio padrão da contração das feridas cutâneas em ratos (%) (n=6) dos grupos controle e EEC aos 4° e 7° dias PO.....	39
TABELA 2 - Medianas das variáveis histológicas avaliadas ao 4° dia PO dos grupos controle e EEC. (n=6).....	40
TABELA 3 - Medianas das variáveis histológicas avaliadas ao 7° dia PO dos grupos controle e EEC (n=6).....	41
TABELA 4 - Medianas da variável hiperplasia epidermal avaliada ao 14° dia PO dos grupos controle e EEC (n=6).....	43
TABELA 5 - Medianas da variável colágeno, avaliada por morfometria, ao 4° e 7° dias PO dos grupos controle e EEC (n=6).....	44

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 3

QUADRO 1 – Atividade antimicrobiana com oito diluições em placa do extrato etanólico (EEC) e frações diclorometano (FDC) e hexânica (FHC) e leitura até 24 horas, avaliada pela concentração inibitória mínima CIM.....

47

LISTA DE ABREVIATURAS

CAM – membrana corioalantóide

CIM – concentração inibitória mínima

C.officinalis – *Calendula officinalis*

COX – ciclooxigenase

CP – controle positivo

CS – controle solvente

EEC – extrato etanólico das flores da *Calendula officinalis*

FDC – fração diclorometano do EEC

FHC – fração hexânica do EEC

FGF – fator de crescimento de fibroblastos

IHQ – imunoistoquímica

IL-8 – interleucina 8

TGF- β – fator de crescimento e transformação β

TNF- α – fator de necrose tumoral α

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

A *Calendula officinalis* L. é uma herbácea anual, originária da região Mediterrânea, pertencente à família Asteraceae e conhecida popularmente como calêndula. Apresenta flores alaranjadas ou amareladas, às quais são atribuídas propriedades medicinais, com destaque à atividade cicatrizante. Neste trabalho, o extrato etanólico das flores da *C. officinalis* cultivada no Brasil foi preparado por maceração à frio e fracionado para obtenção das frações diclorometano e hexânica. A atividade angiogênica do extrato e frações foi avaliada, utilizando-se o modelo da membrana corioalantóide em ovos embrionados de galinha. Já o efeito cicatrizante do extrato foi avaliado pelo modelo de feridas cutâneas em ratos, com avaliação das características macroscópicas e microscópicas. Nesse modelo, a atividade angiogênica do extrato etanólico na derme de ratos também foi avaliada por imunistoquímica, sendo mensurada a intensidade de expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A atividade antibacteriana *in vitro* do extrato e das frações foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em placa. O extrato etanólico e as frações da calêndula apresentaram acentuada atividade angiogênica, evidenciada nos dois modelos experimentais utilizados. Esta atividade evidenciada não foi relacionada ao aumento da intensidade da expressão do VEGF, podendo estar relacionada a outros fatores pró-angiogênicos. No modelo das feridas cutâneas em ratos o extrato etanólico apresentou atividade antiinflamatória, demonstrada pela diminuição da exsudação serosa, da hiperemia, da deposição de fibrina e da hiperplasia epidermal, além da presença de crostas mais delgadas e umedecidas em relação ao grupo controle. Houve aumento na quantidade de colágeno no tecido de granulação e foi observada atividade antibacteriana, principalmente sobre bactérias gram-positivas. Ainda, a *C. officinalis* atuou de forma positiva sobre o processo de neoformação vascular e da atividade cicatricial em feridas cutâneas em ratos, e apresentou ainda atividade antibacteriana *in vitro*. Desta forma, justifica-se o efeito cicatrizante atribuído a essa espécie vegetal.

Palavras-chaves: reparo, neovascularização, calêndula, planta medicinal.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os animais, tanto selvagens quanto domésticos, procuram naturalmente as plantas quando apresentam alterações digestivas, como é o caso de cães que comem grama e determinadas ervas. Acredita-se que foi a partir da observação dos efeitos que algumas plantas exerciam tanto sobre o organismo humano quanto animal, que cada grupo de pessoas adquiriu certo conhecimento sobre o tipo de medicação herbácea a ser administrada para cada tipo de doença. Essa informação foi então passada de geração para geração, por transmissão oral. Assim toda cultura, tribo e/ou todo local geográfico adquiriu um conhecimento herbáceo próprio sobre o uso das plantas medicinais (STEIN, 1998).

A antiga prática do homem e dos animais de utilizar as plantas medicinais no tratamento de diversas enfermidades, antecede em muitos anos os estudos científicos para comprovação da sua eficácia terapêutica. Diferentemente dos testes clínicos sobre as pesquisas farmacológicas, os efeitos das plantas medicinais são testados de forma empírica e primeiramente no homem, para que então estudos posteriores sejam realizados em modelos animais (SCHULZ et al., 2002).

Normalmente, a escolha de uma planta medicinal a ser avaliada cientificamente é feita a partir de uma abordagem etnofarmacológica, onde a seleção ocorre de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico (MACIEL et al., 2002). O mesmo ocorre no caso da etnoveterinária. McGAW & ELOFF (2008) em um artigo de revisão sobre o uso etnoveterinário de plantas medicinais da África do Sul, ressaltaram o uso do extrato diclorometano de *Allium sativa* no controle de carrapatos. Dessa forma, é a partir do uso popular das plantas que pesquisas são iniciadas, as quais podem levar a descoberta de novos compostos ativos. Estudos que visam comprovar a autenticidade das informações populares estão sendo continuamente desenvolvidos. Como resultado desses estudos, uma gama de fármacos de origem vegetal, inicialmente restritos ao uso popular e até mesmo considerada tóxica, está sendo incorporada ao arsenal terapêutico (FREIRE, 1992). Entretanto, é interessante observar que das 250 a 500 mil espécies de plantas existentes no mundo, apenas cerca de 5%

tem sido investigado de forma fitoquímica e a fração submetida a estudos biológicos ou farmacológicos é ainda menor (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

Na antigüidade já eram conhecidas propriedades medicinais atribuídas às flores da *Calendula officinalis* L.(*C.officinalis*) (Figura 1), pertencente à família Asteraceae. É uma planta originada da região Mediterrânea e acredita-se que tenha sido introduzida na Inglaterra no século XIII (CORBET et al., 2001). É uma herbácea anual, muito aromática com flores reunidas em capítulos e corolas de coloração amarelada ou alaranjada. As flores da calêndula foram usadas tanto na guerra civil norte-americana quanto na primeira guerra mundial, na forma de unguento e pomadas, com atividade anti-séptica e antiinflamatória. Estas são utilizadas ainda como: cicatrizante, antiespasmódica, colerética, sudorífica, emética, hipotensora, antiinflamatória, antibiótica e anti-séptica, entre outras atividades (ALONSO, 1998; LORENZI & SOUZA, 1999; WHO, 2002). Outra atividade relatada é seu efeito indutor sobre a angiogênese (PATRICK et al., 1996). Autoridades sanitárias alemãs recomendam o uso tópico da planta para feridas e úlceras nas pernas, sendo o uso interno indicado apenas em lesões inflamatórias da mucosa oral e faríngea (BROWN & DATTNER, 1998; ALONSO, 1998).



Figura 1 – *Calendula officinalis* L.

ALONSO (1998) descreveu de forma detalhada os componentes químicos presentes nas flores da *C. officinalis*. O óleo essencial apresenta uma grande quantidade de mono e sesquiterpenos oxigenados, compostos principalmente por: carvona, geranilacetona, mentona, isomentona, cariofileno, α e β -iononas, penduculatina e dihidroactinidiólido. Os carotenóides, compostos relativamente estáveis, solúveis em gordura e insolúveis em água, apresentaram calendulina, caroteno, licopeno, rubixantina, violaxantina, zeína entre outros. As saponinas são calendulosídeos A, D, D₂, F. Os flavonóides encontrados foram os derivados do quercetol (quercetin-3-o-glicídio) e do isorrhamnetol. Os álcoois triterpenos pentacíclicos apresentaram principalmente: arnidiol, faradiol, ácido faradiol-3-mirístico, lupeol, taraxasterol e ácido faradiol-3 - palmítico. Outros componentes encontrados foram: ácido málico, mucilagem, resina, goma (calendulina), substância amarga (calendeno e calendina), tanino, poliacetilenos, esteróis sitoesteróis, estigmasterol, isofucosterol, campesterol, metil-(enecolesterol e colesterol), ácido salicílico.

O lado místico e mágico da *C. officinalis* foi ressaltado por UYLDERT (1995). Ela é considerada uma planta da vida e da morte e do conflito entre elas. O unguento da planta é indicado no tratamento de ferimentos sujos, com inflamação e supuração, bem como em feridas cancerosas e com mau cheiro. Por apresentar força lunar, ela cria novas células que substituem as células danificadas. Com sua força solar, ela forma um plano para novas estruturas, um padrão para elaboração de células saudáveis. Os maiores poderes curativos podem ser observados na variedade que cresce em vinhedos da França. Essa planta tem o poder de fortalecer o coração, o fígado, estimular os rins e promover a eliminação de toxinas por transpiração. Atua combatendo o enjôo, a constipação, debilidade do sistema nervoso e auxilia na menstruação. No jardim de um asilo para idosos na Holanda foi encontrado a *C. officinalis*. Embora essa planta não ocorra freqüentemente neste país, ela continuou a aparecer no jardim durante duas primaveras. Das pessoas que moravam ali, três delas apresentavam câncer. Após a morte dessas pessoas, a planta não mais apareceu. Assim, segundo a medicina popular, quando o ciclo se completou para o homem a planta desapareceu. Apresenta flores semelhantes a raios de glória, razão pela qual sua flor foi consagrada à Virgem Maria. Atualmente na Índia, seguindo uma velha

tradição, são feitas grinaldas de flores da planta em honra das divindades Mahadevi (deusa-mãe) e Durga (deusa poderosa criada da combinação de forças da fúria de inúmeros deuses) e essas mesmas flores adornam as piras funerárias antes de serem incendiadas (ALONSO, 1998).

A *C. officinalis* é uma espécie exótica adaptada ao Brasil. Plantas exóticas podem apresentar um perfil metabólico diferente quando aclimatadas em outros locais geográficos (FONTE, 2004). No processo de cultivo, alguns fatores edafoclimáticos como variações sazonais, idade e desenvolvimento da planta, disponibilidade hídrica, altitude, temperatura, índice pluviométrico entre outros, atuam em cada espécie vegetal em particular (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Todos estes fatores podem afetar de forma significativa a qualidade e a quantidade de compostos ativos produzidos pelas plantas, pelo fato de rotas metabólicas poderem ser ativadas ou inativadas, levando à produção de diversos produtos do metabolismo secundário em cada situação (SILVA et al., 1995). É importante observar que como os vegetais encontram-se presos ao solo e não podem se deslocar, eles não respondem às alterações no ambiente da mesma forma que os animais. É através da síntese de metabólitos secundários que esses conseguem se adaptar às variações ambientais e sobreviver (DI STASI, 1996; SALASTINO, 2001).

Os trabalhos encontrados na literatura sobre a *C. officinalis* fundamentam-se em estudos realizados principalmente na Europa e na Ásia, como na Alemanha (WAGNER et al., 1985; ZIETTERL-EGLSEER et al., 1997), Bulgária (KALVATCHEV et al., 1997), Egito (YOSHIKAWA et al., 2001), Hungria (VARLJEN et al., 1989), Índia (PREETHI et al., 2006), Inglaterra (PATRICK et al., 1996; CORBET et al., 2001), Itália (MASCOLO et al., 1987), Irã (AMIRGOFRAM et al., 2000), Japão (AKIHISA et al., 1996; YOSHIKAWA et al., 2001), Paquistão (QAMAR et al., 1998), Polônia (SLIWOWSKI et al., 1973; MATYSIK et al., 2005), República Tcheca (HAMBURGUER et al., 2003), Sérvia e Montenegro (CETKOVIĆ et al., 2004) e Eslováquia (BEZAKOVA et al., 1996). Poucos estudos foram desenvolvidos sobre essa espécie vegetal nas Américas, como no México (PÉREZ-CARRÉON et al., 2002), em Cuba (RAMOS et al., 1998), na Venezuela (KALVATCHEV et al., 1997) e no Brasil (MARTINS et al., 2003; SARTORI et al., 2003; VOLPATO, 2005).

A principal atividade biológica atribuída às flores da *C. officinalis* é a cicatrizante (ALONSO, 1998). Durante o processo de cicatrização ocorre integração entre as células sanguíneas, componentes da matriz extracelular e os mensageiros químicos, no sentido de restaurar a integridade tecidual. O processo se desenvolve em etapas simultâneas e superpostas que correspondem as fases de coagulação, inflamação, proliferação, contração e de remodelação (MANDELBAUM et al, 2003; CORAZZA, 2005). Cada uma destas fases é caracterizada pela presença de infiltrados de células em locais específicos, e isso ocorre de forma integrada e coordenada por mediadores químicos, no sentido de otimizar o reparo. Durante a formação de um novo tecido, acontece proliferação fibroblástica e angioblástica, sendo esta última fase denominada também de angiogênese ou neovascularização (MARTINEZ-HERNANDES et al., 2000; BIAN et al., 2004; BOUIS et al., 2006; KRISHNAN, 2006).

Alterações na cicatrização de feridas podem vir a apresentar um alto custo para a sociedade, pelo fato de diminuir a qualidade de vida de milhões de pessoas no mundo todo. Dessa forma, tem-se voltado atenção para a investigação de estratégias terapêuticas efetivas, acessíveis e alternativas empregadas para favorecer a cicatrização (KRISHNAN, 2006).

A atividade antiinflamatória das flores da *C. officinalis* cultivada na Europa e na Ásia foi avaliada e evidenciada, por meio do modelo da indução do edema de orelha por óleo de cróton e do modelo do edema de pata induzido pela carragenina (DELLA-LOGGLIA et al., 1990; DELLA-LOGGLIA et al., 1994; ZITTERL-EGLSEERL et al., 1997; ALONSO, 1999; WHO, 2002; HAMBURGUER et al., 2003). A atividade sobre a angiogênese de um extrato aquoso da calêndula cultivada na Inglaterra foi testada e comprovada por PATRICK et al. (1996).

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar as atividades antibacteriana *in vitro* e angiogênica, pelo modelo da membrana corioalantóide e de feridas cutâneas em ratos, do extrato etanólico, obtido por maceração à frio, e das frações diclorometano e hexânica das flores da *C. officinalis* cultivadas no Brasil. A atividade cicatrizante do extrato etanólico também foi avaliada, detalhando os efeitos macro e microscópicos do extrato nas fases antiinflamatória e proliferativa (angiogênese e fibroplasia) e da contração das feridas. A avaliação

do conteúdo de colágeno foi realizada pela coloração especial Picrossírius segundo Harris.

REFERÊNCIAS

1. AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S. Triterpene alcohols from the flowers of Compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, v. 43, n.6, p.1255-1260, 1996.
2. ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina: Bases clínicas y Farmacológicas**. Buenos Aires: Isis Ediciones, 1998, p.327-331.
3. AMIRGHOFRAN, Z.; AZADBAKHT, M.; KARIMI, M. H. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p.167-172, 2000.
4. BEZAKOVA, L.; MASTEROVA, I.; PAULIKOVA, I.; PSENAK, M. Inibitory activity of ishorhamnetin glycosides from *Calendula officinalis* on the activity of lipoxygenase. **Pharmazie**, v. 51, issue 2, p.126-127, 1996.
5. BIAN, X.W.; CHEN, J.H.; JIANG, X.F.; BAI, J.S.; WANG, Q.L.; ZHANG, X. Angiogenesis as a immunopharmacologic target in inflammation and câncer. **International Immunopharmacology**, v.4, p.1537-1547, 2004.
6. BOUIS, D.; KUSUMANT, Y.; MEIJER, C.; MULDER N. H.; HOSPERS G. A. P. A review on pro-and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. **Pharmacological Research**, v.53, p.89-103, 2006.
7. BROWN, D. J.; DATTNER, A. M. Phytotherapeutic Approaches to Common Dermatologic Conditions. **Achta Dermatological**, v 134, p.1401-1404, 1998.
8. CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, 1998.
9. 'CETKOVIÉ, G. S.; DIJLAS, S. M.; 'CANADANOVI'C-BRUNET, M.; TUMBAS, V.T. Antioxidant properties of marigold extracts. **Food Research International**, v.37, p.643-650, 2004.
10. CORAZZA, A.V. **Fotobiomodulação comparativa entre o Laser e o LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos**. 2005. 89 f.

Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. Disponível em: www.ibict.org. Acesso: 10 abr.2007.

11. CORBET, S. A.; BEE, J.; DASMAHAPATRA, K.; GALE, S.; GORRINGES, E.; FERLA, B.; MOORHOUSE, T.; TREVAIL, A.; BERGEN, Y. V. Native or Exotic ? Double or Single ? Evaluating plants for Pollinatos-friendly gadens. **Annals of Botany**, v. 87, p. 232-231, 2001.

12. DELLA-LOGGIA, R.; BECKER, H.; ISAAC, O.; TUBARO, A. Topical Anti-Inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Extracts. **Planta Médica**, v. 56, p.658, 1990.

13. DELLA-LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; ISAAC, O. The Role of Triterpenoids in the Topical Anti-inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Flowers. **Planta Medica**, v. 60, p. 516-520, 1994.

14. DI STASI, L.C. Química dos Produtos Naturais: principais constituintes químicos. In: DI STASI, L.C. (Org.). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência, um estudo multidisciplinar**, 1ª ed. São Paulo, Editora da Universidade Estadual Paulista, p.110-127, 1996.

15. FREIRE, S. M. F. **Atividades analgésica, antiinflamatória e cardiovascular da *Scoparia dulcis* L.(vassourinha). Estudos químicos e farmacológicos.** 1992.120p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

16. FONTE, N. N. **A Complexidade das Plantas Medicinais: algumas questões atuais de sua produção e comercialização.** 2004. 199 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Disponível em: www.ibict.org. Acesso: 15 jan. 2008.

17. GOBBO-NETO L.; LOPES N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, issue 2, p.374-381, 2007.

18. HAMBURGUER, M.; ADLER, S.; BAUMANN, D.; FORG, A.; WEINREICH, B. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid ester from Marigold (*Calendula officinalis*). **Fitoterapia**, v. 74, p. 328-338, 2003.

19. KALVATCHEV, Z.; WALDER,R.; GARZARO, D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. **Biomed & Pharmacother**, v. 51, p. 176-180, 1997.

20. KRISHNAN, P. The scientific study of herbal wound healing therapies: Current state of play. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 17, issue1-2, p.21-27, 2006.

21. LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustiva, herbácea e trepadeira.** 2ª ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1999, p. 398-399.

22. MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JÚNIOR, V. F. V.; ECHEVARRIA, N. F. G. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
23. MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N. Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, (2008), doi:10.1016/j.jep.2008.06.013.
24. MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, S.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v.78, p.393-410, 2003.
25. MARTINS, P. S.; ALVES, A.L.G.; HUSSNI, C.A.; SEQUEIRA, J.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A. Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2003.
26. MARTINEZ-HERNADES, A. In: Rubin E. (Org.). **Patologia**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 72-101.
27. MASCOLO, N.; AUTORE, G.; CAPASSO, F.; MENGHINI, A.; FASULO, M. P. Biological Screening of Italian Medicinal Plants for Anti-inflammatory Activity. **Phytotherapy Research**, vol. 1, issue 1, p. 28-31, 1987.
28. MATYSIK, G.; WÓJCIAK-KOSIOR, M.; PADUCH, R. The influence of *Calendula officinalis* flos extracts on cell cultures, and the chromatographic analysis of extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p.285-292, 2005.
29. PATRICK, K.F. M.; KUMAR, S.; EDWARDSON, P.A.D.; HUTCHINSON, J.J. Induction of vascularisation by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L., the European marigold. **Phytomedicine**, v. 3, issue 1, p.11-18, 1996.
30. PÉREZ-CARRÉON, J.I.; CRUZ-JIMÉNEZ, G.; LICEA-VEJA, J.A.; POPOCA, A. E.; FAZENDA, F. S.; VILLA-TRVIÑO, S. Genotoxic and Anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. **Toxicology in vitro**, v. 6, issue 16, p.253-258, 2002.
31. PREETHI, K.C.; KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Antioxidant Potential of an Extract of *Calendula officinalis* Flowers in Vitro and in Vivo. **Pharmaceutical Biology**, v.44, n. 9, p.691-697, 2006.
32. QAMAR, F., KALHORO, M.A.; BADAR, Y. Antihelminthic Properties of some indigenous plants. **Hamdard Karachi**, v. 41, issue 1, p.115-117, 1998.
33. RAMOS, A.; EDREIRA, A.; VIZOSO, A.; BETANCOURT, J.; LÓPEZ, M.; DÉCALO, M. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* . **Journal of Ethnopharmacology**. Havana, v.61, p.49-55, 1998.

34. SALASTINO, A. A Composição Molecular das células vegetais. In: RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHORN, S. E (Org.). **Biologia Vegetal**, 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001. cap. 2, p.16-39.
35. SARTORI, L.C.; FERREIRA, M.S.; PERAZZO, F.F.; MANDALHO, L.L.; CARVALHO, J.C.T. Atividade antiinflamatória do granulado de *Calendula officinalis* L. e *Matricaria recutita* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p.17-19, 2003.
37. SILVA, I.; FRANCO, S. L.; MOLINARI, S. L.; CONEGERO, C. I.; NETO, M. H. M.; CARDOSO, M. L. C.; SANT'ANA, D. M. G.; IWANKO, N. S. **Noções sobre organismo humano e utilização de Plantas Medicinais**. 4ª ed. Cascavel: Assoeste, 1995, p.200-234.
38. SLIWOWSKI, J.; DZIEWANOMSKA, K.; KASPRZYK, Z. Usardiol: a new triterpene diol from *Calendula officinalis* flowers. **Phytochemistry**, v.12, p.157-160, 1973.
39. STEIN, D. **A cura natural para cães e gatos**. São Paulo: Ground, 1998, p.130-155.
40. UYLDERT, M. **A Magia das Plantas: As Plantas e seu relacionamento esotérico com o Homem**. São Paulo: Editora Pensamentos, 1995. p.68-72.
41. VARLJEN, J.; LIPTÁK, A.; WAGNER, H. Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno-stimulating activity from *Calendula officinalis*. **Phytochemistry**, v. 28, n.9, p.2379-2383, 1989.
42. VOLPATO, A. M. M. **Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico**. 2005. 133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Química, Universidade Federal do Paraná.
43. YOSHIKAWA, M.; MRAKAMI, T.; KISHI, A.; KAGEURA, T.; MATSUDA, H.. Medicinal Flowers.III. Marigold (1): Hipoglycemic, Gastric Emptying Inibitory, and Gastroprotective Principles and New Oleanane-Type Triterpene Oligoglycosides, Calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, issue 7, p. 863-870, 2001.
44. WAGNER, H.; HIKINO, H.; FARNSWORTH, N. R. **Economic and Medicinal Plant Research**, v.1. London: Academic Press, 1985, 130-145.
45. **WHO Monographs on: selected medicinal plants**, v. 2. Geneva: World Health Organization, 2002, p. 35-44.
46. ZITTERL- EGLSEER, K.; SOSA, S.; JURENITSCH, J.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; LOGGIA, R. Della; TUBARO, A.; BERTOLDI, M.; FRANZ, C.

Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). **Journal Ethnopharmacology**, v.57, p.139-144, 1997

Capítulo 2

Artigo a ser submetido à Pharmaceutical Biology.

www.informaworld.com/smpp/title~content=t713721640

Atividade angiogênica do extrato etanólico e frações das flores da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil

PARENTE, L. M. L.^{1*}, ANDRADE, M.¹, BRITO, L. A.¹, MIGUEL, M.P.¹, MOURA, V. M.B.D.¹, LINO-JÚNIOR, R.S.², TREVENZOL, L. F. M.³, PAULA, J. R.³, PAULO, N. M.¹.

¹ Escola de Veterinária, ²Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, ³Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

Resumo

Propriedades medicinais são atribuídas às flores da *Calendula officinalis* L. (Asteraceae), conhecida popularmente como calêndula, destacando-se a atividade cicatrizante. No reparo de uma ferida, sucedem-se fases sobrepostas e simultâneas e, entre essas, há a angiogênese. Neste trabalho foi avaliada a atividade angiogênica do extrato etanólico (EEC) e das frações diclorometano e hexânica das flores da *C. officinalis* cultivada no Brasil. Foram utilizados os modelos da membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha e de feridas cutâneas em ratos. O efeito proliferativo vascular foi testado a partir do estudo imunoistoquímico, realizado para verificar a intensidade da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na derme de ratos. A atividade angiogênica do extrato e das frações foi evidenciada nos dois modelos experimentais empregados. Verificou-se que este efeito não está diretamente relacionado à expressão do VEGF, podendo estar associado a outros fatores pró-angiogênicos. Conclui-se que a atividade cicatrizante referida à *C. officinalis* está relacionada ao seu efeito positivo sobre a angiogênese, este caracterizado pela indução de neovascularização.

Palavras-chave: calêndula, cicatrização, neovascularização, plantas medicinais.

INTRODUÇÃO

Desde a antigüidade são atribuídas propriedades medicinais às flores da *Calendula officinalis* L. (*C. officinalis*) pertencente à família Asteraceae e conhecida popularmente como calêndula. Seu uso parece ter sido mais difundido a partir do século XIII, tendo sido utilizada inicialmente na cicatrização de feridas. Foi usada na forma de unguento e pomadas, como anti-séptico e antiinflamatório, tanto na guerra civil norte-americana quanto na primeira guerra mundial (Alonso, 1998; Lorenzi & Souza, 1999; Evans, 2002; WHO, 2002).

^{1*} Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Campus II - Samambaia - Caixa Postal 131 - CEP: 74001- 970 Goiânia - Goiás – Brasil. E-mail: lathosvet@hotmail.com

Na literatura disponível, apenas dois modelos experimentais foram conduzidos para a avaliação da atividade antiinflamatória da *C. officinalis*. Um pela indução do edema de orelha por óleo de cróton e outro utilizando-se do edema de pata induzido pela carragenina (Della-Loggia et al., 1990; Della-Loggia et al., 1994; Zitterl-Eglssten et al., 1997; Alonso, 1998; WHO, 2002; Hamburguer et al., 2003).

Patrick et al. (1996) em estudo realizado com flores da *C. officinalis* cultivada na Europa utilizando o modelo da membrana corioalantóide (MCA) de ovo embrionado de galinha demonstrou o papel indutor desta planta sobre a microvascularização. A MCA tem sido freqüentemente utilizada em avaliações de substâncias com atividades pró-angiogênicas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), bem como anti-angiogênicas, como a endostatina (Hazel, 2003; Bouis et al., 2006; Tabruyn & Griffioen, 2007).

A MCA é transparente, composta por uma mesoderme ricamente vascularizada, que faz parte das três membranas extra-embriônicas que protegem e nutrem o embrião (Ribatti et al., 2000). A utilização da MCA como modelo experimental é justificada por sua simplicidade e baixo custo em comparação ao uso de mamíferos. A FDA (*United States Food and Drug Administration*) aprovou a realização de avaliações pré-clínicas utilizando esse modelo experimental em estudos de substâncias empregadas no tratamento de úlceras crônicas cutâneas e feridas por queimaduras (Hazel, 2003; Vargas et al., 2007). A quantificação da resposta angiogênica na MCA pode ser feita por meio de escore manual, morfometria com o auxílio de softwares ou contagem de pontos de imagens fotografadas (Doukas et al., 2006; Hosgood, 2006).

No processo de cicatrização ocorrem etapas simultâneas e sobrepostas correspondentes à coagulação, inflamação, proliferação, contração e remodelação (Mandelbaum et al., 2003). Neste trabalho foi avaliada a atividade angiogênica do extrato etanólico e de suas frações oriundas de flores da *C. officinalis* (EEC) cultivada no Brasil. Utilizaram-se os modelos da MCA de ovos embrionados de galinha e de feridas cutâneas em ratos. A imunoistoquímica foi realizada para avaliar o efeito do EEC na angiogênese e na intensidade da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na derme de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Preparação do extrato e das frações

Flores secas e pulverizadas da *C. officinalis* originadas do Estado do Paraná (fevereiro, 2006) foram obtidas da Empresa Clorophila (Goiânia, Goiás, Brasil). Para o controle de qualidade foi realizada a avaliação farmacognóstica dessa espécie vegetal no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, de acordo com técnicas descritas na Farmacopéia Brasileira IV (2001) e nas Monografias da Organização Mundial de Saúde - WHO (2002).

Para a obtenção do extrato etanólico (EEC), 200g das flores pulverizadas foram extraídos com 1000 mL de etanol PA 96° GL, por maceração (3 dias) à temperatura ambiente, com agitação ocasional e concentrado em evaporador rotativo à 40°C.

As frações hexânica e diclorometano foram obtidas a partir de 10g do EEC que foi solubilizado em uma mistura metanol/H₂O (7:1) e extraída por três vezes com 50 mL de hexano e posteriormente, extraída por três vezes com 50 mL de diclorometano. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo (Ferri, 1996). Soluções a 1% do extrato etanólico e das frações diclorometano e hexânica solubilizadas em etanol a 70% foram preparadas para a avaliação da atividade angiogênica na MCA. Para avaliação da atividade angiogênica em feridas cutâneas na derme de ratos, foi preparada diariamente uma solução aquosa de EEC a 1%.

2. Animais experimentais

Foram utilizados 12 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, fêmeas, com 60 dias de idade, peso entre 160 a 190 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás. Os animais foram adaptados no Biotério de Cirurgia Experimental da Escola de Veterinária da UFG, por um período de dez dias e mantidos em gaiolas individuais de polietileno, forradas com maravalha, sob condições ambientais controladas (temperatura 23 ±

2^oC, umidade relativa do ar entre 50 e 70% e fotoperíodo claro/escuro de 12h). Água e ração foram fornecidos *ad libitum*.

O protocolo experimental com os animais utilizados neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, sob o n° 019/2007.

3. Modelo da Membrana Corioalantóide (MCA)

3.1 Preparo da MCA

A MCA foi preparada para avaliação da atividade angiogênica segundo metodologia adaptada de Larger et al. (2004). Foram utilizados 75 ovos embrionados de galinha da linhagem Cobb, com dois dias de idade, obtidos de matrizes com idade entre 34 e 35 semanas de idade. Os ovos foram acomodados em incubadoras (Premium Ecológica IP-130), sob umidade constante (67,5%) e temperatura de 37°C, distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de quinze ovos cada, sendo submetidos aos seguintes tratamentos: CS - controle solvente (etanol 70%); CP - controle positivo a 1% (17 β-estradiol); EEC - extrato etanólico 1%; FDC - fração diclorometano 1% e FHC - fração hexânica 1%.

A abertura da casca, a retirada do albume e os tratamentos foram realizados em uma câmara de segurança biológica tipo II. No terceiro dia de incubação, através de uma pequena abertura na casca, removeram-se 2 a 3mL de albume e, posteriormente, o orifício foi selado com parafina histológica em ponto de fusão. A incubação continuou até o 10^o dia, quando os ovos foram tratados com 0,1mL do preparado referente a cada grupo, instilado sobre a superfície da MCA. Os ovos foram novamente selados e incubados por mais dois dias. Após a eutanásia dos embriões por secção medular na região atlanto-occipital, fragmentos da MCA de cada ovo foram colhidos para análise morfométrica e quantificação do número de vasos sanguíneos.

3.2 Avaliação Morfométrica da MCA

A morte embrionária é um evento comumente observado em ovos fertilizados de aves. A mortalidade precoce, verificada até o 4^o dia de incubação,

ocorre em cerca de 5 a 10% dos ovos férteis (Boleli, 2003). Pelo fato da interferência na fase inicial da incubação das aves para o preparo da MCA, foram utilizados 15 ovos embrionados por grupo com o objetivo de obter 10 ovos viáveis.

Para a análise morfométrica, um fragmento da MCA à fresco de 10 ovos de cada grupo foi coletado e distendido sobre uma lâmina de vidro e sobre este fragmento se sobrepôs uma lamínula.

A leitura das lâminas foi realizada com auxílio do sistema de análise digital de imagem. Esse sistema consiste de uma videocâmara digital Sony Cyber-Shot 3.2 MP modelo DSC-P71 que transmite a imagem capturada do microscópio Carl Zeiss®, (modelo Jenaval com objetivas planacromáticas) a um computador Pentium®4 CPU 3,20 GHz e 1GB de memória RAM, equipado com uma placa digitalizadora e o software Image J 1.3.1 (NIH, Estados Unidos). Calculou-se a porcentagem da área vascular por campo, correspondente a área marcada em vermelho, trabalhando em ambiente Windows, sendo fotografados 30 campos aleatórios que apresentavam vasos sanguíneos.

3.3 Avaliação das células inflamatórias e do número de vasos sanguíneos da MCA.

As membranas fixadas em formalina tamponada foram processadas, incluídas em parafina e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (Luna, 1968). As imagens foram capturadas utilizando-se os mesmos procedimentos de captura de imagens descritas acima, sendo fotografados 20 campos escolhidos ao acaso, onde foram avaliadas as células inflamatórias presentes na MCA. Os resultados foram classificados visualmente de acordo com a intensidade encontrada, e os dados foram transformados em variáveis quantitativas, pela atribuição de escore: ausente (0), discreto (1 a 25%), moderado (25 a 50%) e acentuado (acima de 50%).

A contagem do número de vasos sanguíneos da mesoderme da MCA foi realizada utilizando-se a planimetria por contagem de pontos com o auxílio do software GIMP 2.4.3. Um retículo quadrangular composto por 25 pontos foi superposto à imagem histológica e apenas foram contados os vasos nas

intersecções presentes no campo visual, conforme modelos propostos por Ribatti et al. (2000) e Prado et al. (2006).

4. Modelo de feridas cutâneas de ratos

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de seis animais cada, sendo submetidos aos seguintes tratamentos: CS - controle solvente (água destilada) e EEC - extrato etanólico 1%.

Para a indução da ferida utilizou-se um *punch* metálico circular de 1 cm de diâmetro na região dorso-cervical de cada animal. A anestesia consistiu da administração por via intramuscular da associação de cetamina e xilazina, nas doses de 70mg/Kg e 10mg/Kg respectivamente. Logo após a cirurgia e diariamente no mesmo horário, 100µL da solução teste (EEC) e do solvente foram instiladas nas feridas dos animais. No 7º dia do pós-operatório os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂, para a colheita de fragmento de pele na área da ferida cirúrgica, o qual foi conservado em formol tamponado a 10%.

Cortes de 5µm foram distendidos em lâminas histológicas silanizadas (3, *aminopropyl-triethoxysilane*, Sigma Aldrich, USA), mantidos em estufa a 36°C, para melhor adesão do tecido à lâmina, seguindo-se a desparafinização e reidratação dos cortes. Na seqüência, realizou-se a recuperação antigênica em solução de citrato pH 6,0, em banho-maria a 95°C, por 30 minutos, seguindo-se com o bloqueio da peroxidase endógena e, para bloquear marcação inespecífica, incubaram-se as lâminas em albumina bovina (BSA) a 3%, por uma hora, em temperatura ambiente e em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram incubadas em anticorpo primário, VEGF (147) (Santa Cruz Biotechnology – 507), na diluição 1:500, em câmara úmida, *overnight* e a 4°C. Após esta etapa, instilou-se sobre as lâminas o complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase (kit LSAB – Dako K0690), por 20 minutos cada reação, em câmara úmida e à temperatura ambiente. A reação foi revelada com solução de diaminobenzidina (DAB), durante um minuto. Solução de PBS foi utilizada para as lavagens entre as etapas. Os cortes foram então contra-corados com hematoxilina de Mayer, por 30 segundos, e as lâminas montadas com resina sintética (Sigma Aldrich, USA) e lamínulas histológicas.

As imagens da área da derme foram capturadas utilizando-se os mesmos procedimentos de captura de imagens descritos para MCA. Já a contagem dos vasos sanguíneos foi realizada por meio da planimetria por contagem de pontos, sendo avaliada a intensidade da expressão do VEGF em células endoteliais.

O preparo das lâminas histológicas, as fotomicrografias dos fragmentos da MCA à fresco, a análise morfométrica e a planimetria por contagem de pontos foram realizados por um mesmo indivíduo. O número de campos fotografados de cada amostra para análise morfométrica e planimetria foi determinado de acordo com o proposto por Williams (1977).

5. Análise estatística

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se o programa GraphPad InStat (Version 3.05 for Windows). A partir do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, os dados da MCAs foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. A análise dos dados da imunistoquímica dos fragmentos de pele de ratos foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância foi de $p < 0,05$ (Sampaio, 1998).

RESULTADOS

1. Membrana corioalantóide

A análise morfométrica demonstrou aumento na área vascular, porcentagem da área marcada em vermelho, nas MCAs tratadas com controle positivo 1% (17 β -estradiol), extrato etanólico 1%, fração diclorometano 1% e fração hexânica 1% em relação ao controle solvente (etanol 70%). Não foram observadas diferenças significativas em relação ao mesmo parâmetro entre os grupos controle positivo 1%, extrato etanólico 1%, fração diclorometano 1% e fração hexânica 1% (Tabela 1, Figuras 1 e 2).

Tabela 1 – Morfometria das MCAs à fresco de ovos embrionados de galinha (n=10) tratadas com (CS) controle positivo 17 β -estradiol 1% (CP), extrato etanólico 1% (EEC), fração diclorometano 1% (FDC) e fração hexânica 1% (FHC).

Comparações entre os tratamentos	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (<i>H</i>)	Valor de P
CS x CP	195,69	98,5	* P<0,05
CS x EEC	278,53	98,5	* P<0,05
CS x FDC	264,17	98,5	* P<0,05
CS x FHC	237,78	98,5	* P<0,05

P = nível de significância *p<0,05 diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

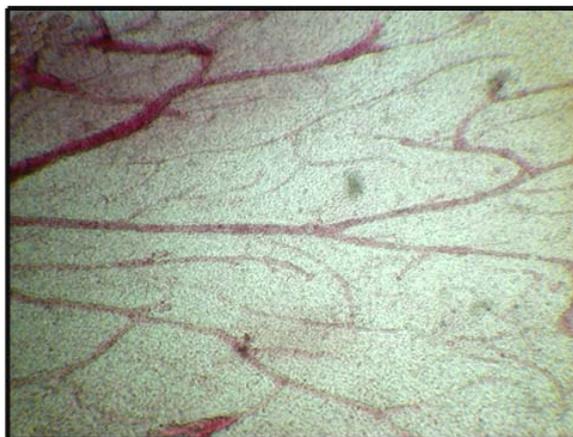


Figura 1 – Membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha (n=10) à fresco evidenciando a influência do controle positivo 1% β -estradiol na porcentagem da área vascular. 5x.

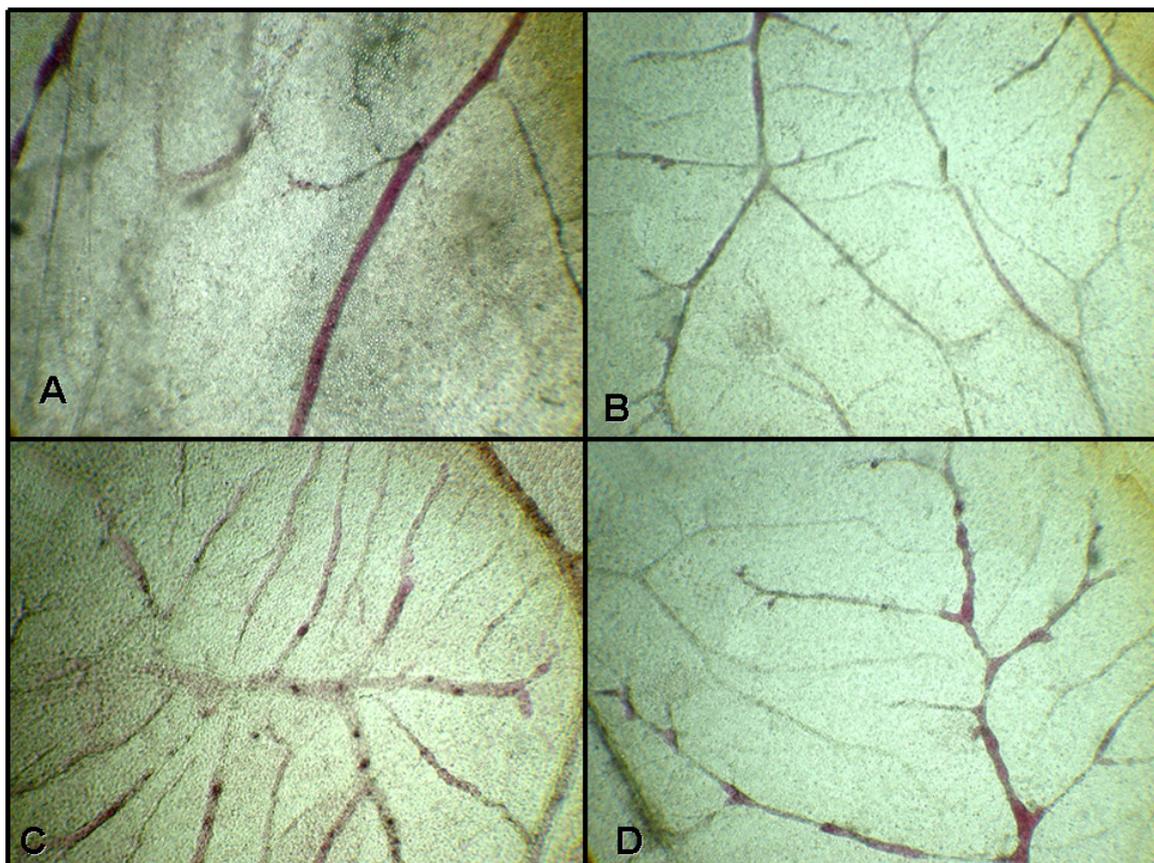


Figura 2 – Membranas corioalantóides de ovos embrionados de galinha (n=10) à fresco evidenciando a influência dos tratamentos na porcentagem na área vascular. (A) controle solvente (etanol a 70%), (B) extrato etanólico 1% das flores da *C.officinalis*, (C) fração diclorometano 1% e (D) fração hexânica 1%. 5x.

A avaliação da presença de células inflamatórias na MCA corada com Hematoxilina-eosina foi considerada discreta em todos os grupos avaliados, havendo predominância de polimorfonucleares heterófilos.

A quantificação dos vasos sanguíneos realizada por planimetria em MCAs coradas com Hematoxilina-eosina e tratadas com controle positivo 1% (17 β -estradiol), extrato etanólico 1% das flores da *C.officinalis*, fração diclorometano 1% e fração hexânica 1% indicou um aumento no número de vasos em relação ao controle solvente (etanol 70%). Não foram observadas diferenças significativas em relação ao mesmo parâmetro entre os grupos controle positivo 1%, extrato etanólico 1%, fração diclorometano 1% e fração hexânica 1% (Tabela 2, Figuras 3 e 4).

Tabela 2 – Influência dos tratamentos sobre o número de vasos sanguíneos na mesoderme das MCAs de ovos embrionados de galinha (n=10) coradas com Hematoxilina-eosina.

Comparações entre os tratamentos	Diferença entre média dos postos	Valor crítico (<i>H</i>)	Valor de P
CS x CP	175,59	116,85	* P<0,05
CS x EEC	130,49	116,85	* P<0,05
CS x FDC	192,46	116,85	* P<0,05
CS x FHC	125,05	116,85	* P<0,05

(CS) controle positivo 17 β -estradiol 1% (CP), extrato etanólico 1% da *C.officinalis* (EEC), fração diclorometano 1% (FDC) e fração hexânica 1% (FHC). P = nível de significância *p<0,05 diferença significativa em relação ao grupo controle (Teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

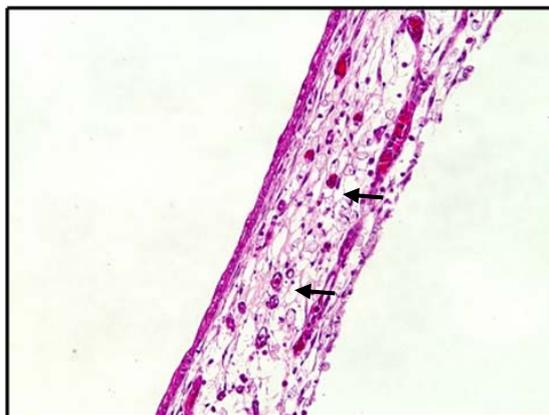


Figura 3 - Fotomicrografia do fragmento de MCA tratada com controle positivo 17 β -estradiol 1% mostrando numerosos vasos sanguíneos na mesoderme (setas). Hematoxilina-eosina, 200x.

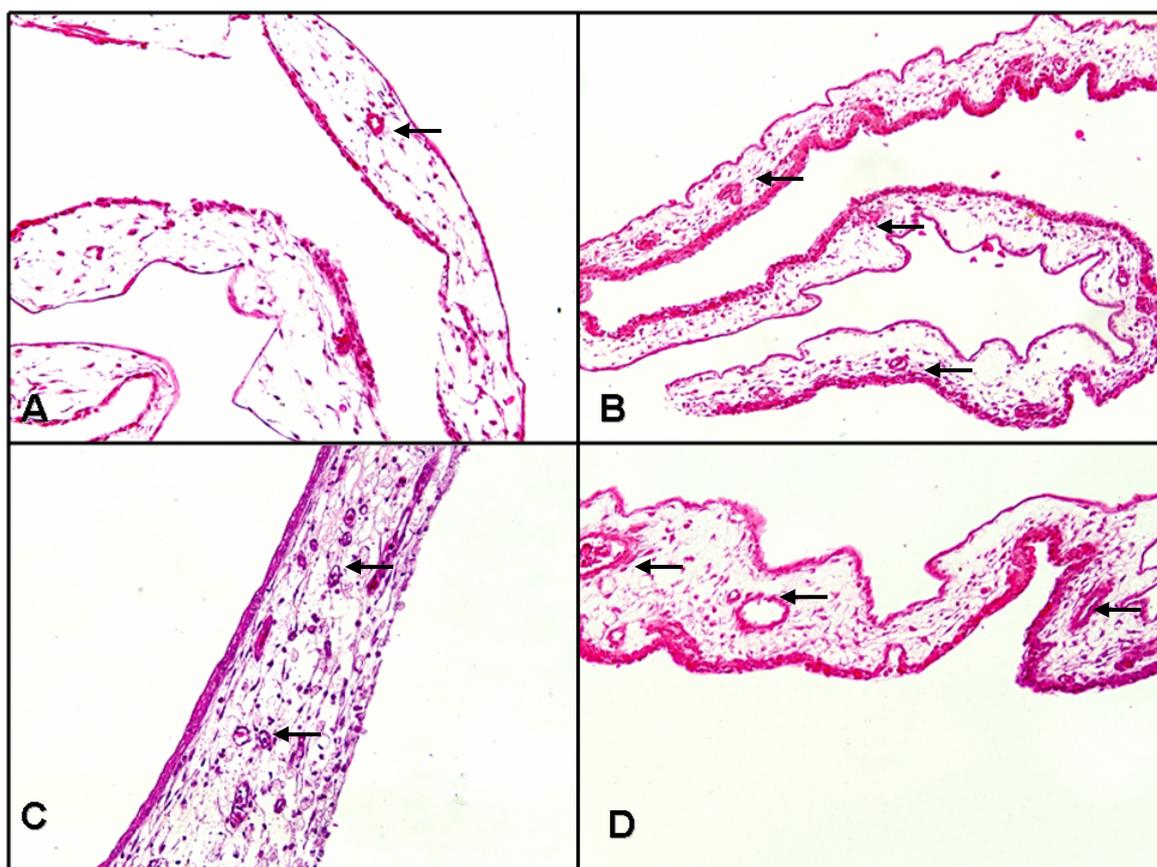


Figura 4. Fotomicrografia dos fragmentos de MCAs tratadas com: (A) controle solvente etanol a 70%, (B) extrato etanólico 1%, (C) fração diclorometano 1% e (D) fração hexânica 1% mostrando variações no número de vasos sanguíneos na mesoderme (setas). Hematoxilina-eosina, 200x.

2. Feridas cutâneas em ratos

À planimetria digital por contagem de pontos, realizada na derme de ratos tratada com extrato etanólico 1%, observou-se aumento no número de vasos sanguíneos em relação ao controle solvente (Tabela 3, Figuras 5 e 6), sendo verificada diferença significativa entre os grupos. Já quanto à intensidade de expressão do VEGF nas células endoteliais, não houve diferença significativa entre os dois grupos.

Tabela 3 – Influência dos tratamentos sobre o número de vasos sanguíneos na derme de ratos no 7º dia do pós-operatório (n=6). Valores das medianas.

	Tratamentos		p < 0,05
	Cs	EEC	
Medianas	1,0	2,0	

(CS) controle solvente (água destilada) e (EEC) extrato etanólico 1% das flores da *C. officinalis*. *p < 0,05 em relação ao grupo controle (Teste de Mann-Whitney).

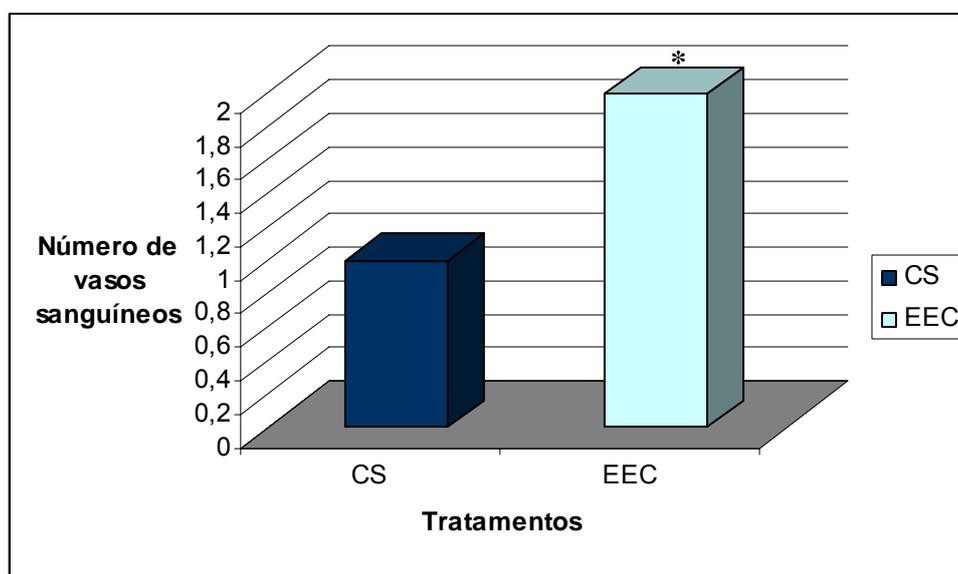


Figura 5 - Efeito do (CS) controle solvente (água destilada) e do (EEC) extrato etanólico 1% das flores da *C. officinalis* nas medianas do número de vasos sanguíneos da derme de ratos no 7º dia do pós-operatório (n=6). Teste de Mann-Whitney (*p < 0,05).

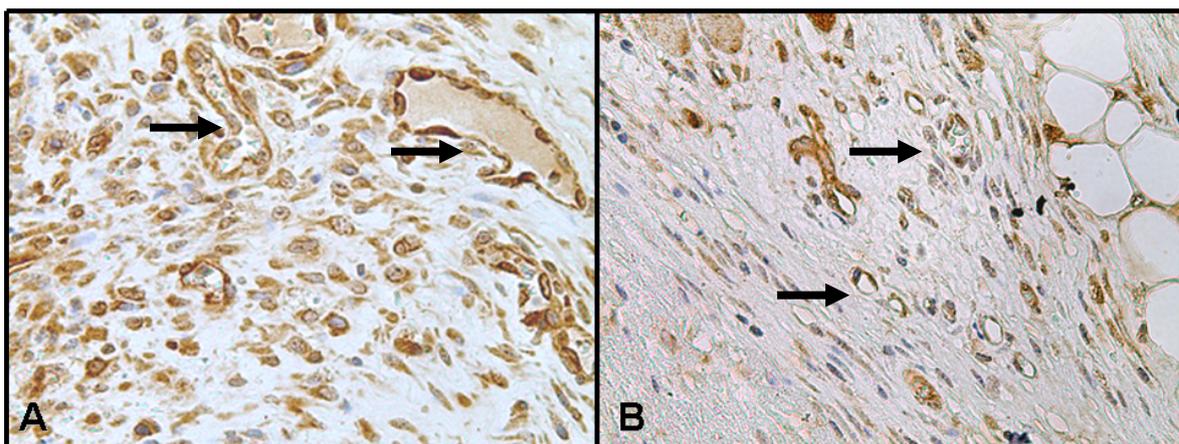


Figura 6 - Fotomicrografia da derme de ratos no 7º dia do pós-operatório (n=6). (A) Controle solvente (água destilada). (B) Extrato etanólico a 1% das flores da *C. officinalis*. Observar os vasos sanguíneos com marcação positiva para VEGF (setas) na derme dos animais dos dois grupos. IHQ, 400x.

DISCUSSÃO

O aumento da área vascular nas MCAs dos grupos EEC, FDC e FHC, inicialmente indicou um efeito positivo destes compostos sobre a angiogênese. Esta atividade foi confirmada pela quantificação dos vasos sanguíneos nas MCAs nos cortes histológicos. Os resultados demonstram que o extrato etanólico e as frações diclorometano e hexânica da *C. officinalis*, apresentaram efeito indutor sobre o processo de angiogênese, similarmente ao descrito por Patrick et al. (1996), quando utilizaram um extrato aquoso das flores da *C. officinalis* cultivada na Inglaterra.

A partir do fracionamento do EEC é possível obter as frações diclorometano, hexânica, acetato de etila e metanol-água. Visto que estudos ressaltaram que compostos menos polares, como saponinas e flavonóides, podem apresentar atividade angiogênica (Moom et al., 1999; Hsu, 2005; Leung et al., 2007) e como a atividade do extrato aquoso da calêndula já havia sido avaliada por Patrick et al (1996), neste experimento, foram testados apenas os efeitos angiogênicos do extrato etanólico e das frações diclorometano e hexânica.

No extrato de uma planta podem estar presentes vários compostos que, juntos ou não, são responsáveis por determinada atividade biológica (Williamson, 2001). Neste estudo, verificou-se efeito angiogênico sobre a MCA do

extrato etanólico e frações FDC e FHC da *C. officinalis*, sugerindo que estes apresentem compostos responsáveis pelos efeitos proliferativos vasculares observados. Não tendo sido ainda verificada ação conjunta de substâncias polares e apolares de características físico-químicas diferentes, mas com efeitos semelhantes, já que o efeito positivo sobre a angiogênese foi verificado tanto a partir do EEC quanto das frações FDC e FHC. Neste contexto, por meio de estudos cromatográficos, Volpato (2005) determinou que ambas as frações diclorometano e hexânica das flores da *C. officinalis* do Brasil são ricas em esteróides e triterpenos. Della-Loggia et al (1994) relacionaram a atividade antiinflamatória da calêndula a presença de triterpenos. Dessa forma, sugere-se que a atividade angiogênica evidenciada neste trabalho possa estar relacionada a estas duas classes de compostos, os esteróides e triterpenóides, presentes nas flores da calêndula.

Quando substâncias são administradas sobre a superfície da MCA podem ocorrer reações inflamatórias inespecíficas, induzindo a uma resposta vasoproliferativa secundária (Ribatti et al., 2000). Neste trabalho, as MCAs tratadas com calêndula, na forma de extrato ou das suas frações, apresentaram discreto infiltrado inflamatório. Pode-se inferir que o aumento da neovascularização observado na MCA deve-se a atuação direta da *C. officinalis* sobre a mesma e não está relacionado à reação inflamatória, confirmando os achados obtidos por Patrick et al. (1996).

O aumento no número de vasos sanguíneos na derme de ratos tratados com extrato etanólico e verificado pela marcação imunoistoquímica positiva para VEGF, ratificou a intensa atividade sobre a neovascularização promovida pelo EEC no modelo da MCA. A técnica de imunoistoquímica, como forma viável de avaliação de angiogênese pela marcação positiva para o VEGF neste modelo experimental, indicou que a atividade angiogênica do EEC não está diretamente relacionada ao aumento na intensidade da expressão deste fator de crescimento. Outros fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), ou de citocinas angiogênicas, como a interleucina 8 (IL-8), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o fator de crescimento e transformação- β (TGF- β) (Carmeliet, 2000; Carmeliet, 2003), podem estar relacionados à atividade angiogênica da calêndula evidenciada neste trabalho.

A *C. officinalis* cultivada no Brasil apresentou acentuada atividade angiogênica nos modelos utilizados, da membrana corioalantóide em ovos embrionados de galinha e da indução de feridas cutâneas em ratos. Assim, considerando-se que uma das atividades biológicas atribuídas a esta planta é a de cicatrização (Alonso, 1998), e admitindo-se que a angiogênese é um mecanismo essencial no processo cicatricial, pode-se inferir que esta ação da *C. officinalis* relatada está relacionada a uma atividade positiva sobre o processo de neoformação vascular.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com a colaboração dos Setores de Patologia Animal e Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária, do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia e do Setor de Patologia Geral do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, todos da Universidade Federal de Goiás e da Empresa Perdigão S/A (Rio Verde-GO).

REFERÊNCIAS

- Alonso J R (1998): *Tratado de Fitomedicina: Bases clínicas y Farmacológicas*. Buenos Aires, Isis Ediciones, pp. 327-331.
- Boleli I C (2003): Estresse, mortalidade e malformações embrionárias. In: Mascari M *Manejo de Incubação*. São Paulo: FACTA, pp.394-434.
- Bouis D, Kusumanto Y, Meijer C, Mulder H N, Hospers G A P (2006): A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention. *Pharm Res* 53: 89-103.
- Carmeliet P (2000): Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis - Review. *Nature America* 6(3) 389-395.
- Carmeliet P (2003): Angiogenesis in health and disease - Review. *Nature Medicine* 9 (6): 653-660.
- Della-Loggia R, Becker H, Isaac O, Tubaro A (1990): Topical Anti-Inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Extracts. *Planta Med* 56: 658.

Della-Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Isaac O (1994): The Role of Triterpenoids in the Topical Anti-inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Flowers. *Planta Med* 60: 516-520.

Doukas C N, Maglogiannis L, Chatziannou A, Papapetropoulos A (2006): Automated Angiogenesis Quantification through advanced Image Processing Techniques. In: 28th IEEE, EMBS Annual International Conference, New York City, USA, 3: 2345-2348.

Evans W C (2002) *Pharmacognosy*. London, W B Saunder, pp.289-314.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV (2001). São Paulo, Ateneu, p.134.

Hamburguer M, Adler S, Baumann D, Forg A, Weinreich B (2003): Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid ester from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia* 74: 328-338.

Hazel S J (2003): A novel early chorioallantoic membrane assay demonstrates quantitative and qualitative changes caused by antiangiogenic substances. *J Lab Clin Med* 141:217-228.

Hosgood G (2006): Stages of Wound Healing and Their Clinical Relevance. *Vet Clin Small An. Practice* 36: 667-685.

Hsu S (2005): Green tea and the skin. *Journal of American Academy of Dermatology* 52: 1049-1059.

Leung K W, Leung F P, Huang Y, Mak N K, Wong R N S (2007): Non-genomic effects of ginsenoside-Re in endothelial cells via glucocorticoid receptor. *FEBS Letters* 58: 2423-2428.

Lorenzi H, Souza H M (1999): *Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, pp. 398-399.

Luna L G (1968): *Manual of Histology Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York: McGraw-Hill, pp.345-360.

Mandelbaum S H, Di Santis E P, Mandelbaum M H S (2003): Cicatrização – conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. *An Bras Dermatol* 78(4): 393-410.

Moom E J, Lee Y M, Lee O H, Lee M J, Lee S K, Chung M H (1999): A novel angiogenic factor derived from Aloe vera gel: b-sitosterol, a plant sterol. *Angiogenesis* 3: 117-123.

Patrick K F M, Kumar S, Edwardson P A D, Hutchinson J J (1996): Induction of vascularisation by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L., the European marigold. *Phytomedicine* 3 (1): 11-18.

Prado F A, Ambinder A L, Jaime A P G, Lima A P, Balducci I (2006): Defeitos ósseos em tibias de ratos: padronização do modelo experimental. *Rev Odontol Universidade Cidade de São Paulo* 18: 7-13.

Ribattil D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F (2000): The Chick Embryo Membrane as Model for in vivo Research on Anti-Angiogenesis. *Current Pharm Biotechnol* 1: 73-82.

Sampaio I B M. (1998). *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, p. 221.

Tabruyn S P, Griffioen A W (2007): Molecular pathways of angiogenesis inhibition – Mini review. *Biochem Biophys Res Com* 355: 1–5.

Vargas A, Labouèbe M, Langue N, Gurny R, Delie F (2007): The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Del Rev* 59: 1162-1176.

Volpato A M M (2005): *Avaliação do potencial antibacteriano de Calendula officinalis (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico*. 13 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Química, Universidade Federal do Paraná.

WHO Monographs on: Selected medicinal plants (2002): Geneve 2, pp. 35-44.

Williams M A (1977): Quantitative methods in Biology. In: Glaubert A M. *Practical methods in electron microscopy*. Amsterdam: Elsevier North-Holland Biomedical Press, 233 p.

Williamson E M (2001): Synergy and other interactions in phytomedicines – review. *Phytomedicine* 8(5): 401-409.

Zitterl-Eglssten K, Sosa S, Jurenitsch J, Schubert-Zsilavecz CHUBERT M, Loggia Della R, Tubaro A, Bertoldi M, Franz C (1997): Anti-oedematous activities of the main triterpene diol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J Ethnopharmacol* 57: 139-144.

Capítulo 3

Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.

www.ibb.unesp.br/rbpm/

Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil

PARENTE, L. M. L.^{1*}; SILVA, M. S. B.¹; BRITO, L. A. B.¹; LINO-JÚNIOR, R. S.²; PAULA, J. R.³; TREVENZOL, L. M. F.³; ZATTA, D.T.³; PAULO, N. M.¹

¹Departamento de Medicina Veterinária / Escola de Veterinária / Universidade Federal de Goiás - UFG. Campus Samambaia (Campus II). Caixa postal 131 - CEP: 74001-970 - Goiânia -GO *lathosvet@hotmail.com. ²Setor de Patologia Geral / Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / UFG. ³Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais / Faculdade de Farmácia / UFG.

RESUMO

Desde a antiguidade propriedades medicinais são atribuídas às flores da *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) destacando-se a atividade cicatrizante. Estudos sobre a atividade geral de plantas medicinais na cicatrização vêm sendo realizados, sem especificar sobre qual das fases da cicatrização a planta atua. Neste trabalho a atividade cicatrizante e antiinflamatória do extrato etanólico das flores da *C. officinalis* cultivada no Brasil foi avaliada em feridas cutâneas de ratos Wistar, por meio de avaliação macroscópica e histológica. A atividade antimicrobiana do extrato e das frações hexânica e diclorometano também foi avaliada. A atividade antiinflamatória do extrato etanólico da calêndula foi atribuída à diminuição da exsudação serosa, da hiperemia, da deposição de fibrina e da hiperplasia epidermal, além de resultar em crostas mais delgadas e umedecidas. Foi também observado aumento de colágeno no tecido de granulação e efeito antibacteriano. Assim, o extrato etanólico da calêndula atuou de forma positiva sobre a atividade cicatricial em feridas cutâneas de ratos, bem como apresentou atividade antibacteriana *in vitro*.

Palavras-chave: reparo, calêndula, fases da cicatrização, plantas medicinais.

ABSTRACT -

Since ancient history medicinal properties are attributed to flowers of *Calendula officinalis* L., mainly about its healing activity. Studies about the general activity of medicinal plants in healing wounds have been accomplished without specifying in which of the phases of healing the plant acts. In this work the healing activity of *C. officinalis* ethanolic extract from Brazil was evaluated in cutaneous wounds in Wistar mice, through macroscopic and histological evaluation. The antibacterial activity of the extract and the activity of dichloromethane and hexane fractions were evaluated. Results indicated that calendula presented anti-inflammatory activity reducing plasmatic exudation, crusts formation and wounds were less edematous. There was also a smaller amount of fibrin and epithelial hyperplasia by increasing the content of collagen in the granulation tissue. Therefore, the effects indicated that calendula acted in a positive way on the inflammation phases of healing process and it also presented *in vitro* antibacterial activity.

Key words: repair, pot marigold, healing phases.

INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização dérmica inicia-se logo após a lesão, ocorrendo formação do coágulo sanguíneo que atua como tampão hemostático e substrato para a organização da ferida e estabelecimento do tecido de granulação (Midwood et al., 2004; Balbino et al., 2005; Hosgood, 2006).

Durante séculos tem-se buscado nas plantas medicinais alternativas para o tratamento de diversas doenças dermatológicas (Raskin et al., 2002), principalmente naquelas que apresentam processos cicatriciais de difícil resolução (Hsu, 2005).

Na Antigüidade de forma empírica já eram conhecidas algumas propriedades medicinais atribuídas às flores da *Calendula officinalis* L (*C.officinalis*), popularmente conhecida como calêndula. Sendo esta uma planta herbácea anual, originária da região Mediterrânea, pertencente à família Asteraceae (Alonso, 1998).

A calêndula tem sido usada rotineiramente em aplicações tópicas, tanto em cosmetologia como em dermatologia (Della-Loggia et al., 1994; Zitterl-Eglseer et al., 1997; Hamburguer et al., 2003). Entre as suas atribuições terapêuticas mais difundidas estão a reepitelização e cicatrização de feridas (Alonso, 1998; Duran et al., 2005), sendo ainda utilizadas em equimoses, erupções e em outras lesões da pele. Apresenta efeito positivo sobre angiogênese (Patrick et al., 1996). A medicina popular européia recomenda seu uso no tratamento de eczemas (Brown & Dattner, 1998).

Os resultados de pesquisas da atuação farmacológica das plantas medicinais na cicatrização envolvendo animais e humanos, na sua maioria não especificam sobre quais das fases desse processo a atividade foi evidenciada

(Krishnan, 2007). Com base nos relatos da literatura e no sentido de investigar em qual das fases da cicatrização a calêndula age, a proposta do presente trabalho fundamentou-se em avaliar o efeito do extrato etanólico das flores da *C. officinalis* cultivadas no Brasil na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Avaliou-se também a atividade antibacteriana do extrato etanólico e das frações hexânica e diclorometano.

Materiais e Métodos

1. Obtenção do extrato etanólico (EEC) e das frações diclorometano (FDC) e hexânica (FHC)

Utilizaram-se flores secas e pulverizadas da *C.officinalis*, originadas do Estado do Paraná (fevereiro, 2002) e obtidas da Empresa Clorophila, sediada em Goiânia, GO (Laudo de Análise nº 6733/02). Para o controle de qualidade da calêndula foi realizada a avaliação farmacognóstica no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os dados obtidos estão de acordo com técnicas descritas na Farmacopéia Brasileira IV (2001) e nas Monografias da Organização Mundial de Saúde - WHO (2002) para essa espécie vegetal.

Para a preparação do extrato etanólico (EEC), 200g das flores pulverizadas foram extraídos com 1000 mL de etanol PA 96° GL, por maceração, durante três dias, à temperatura ambiente, com agitação ocasional e concentrado em evaporador rotativo a 40°C (Ferri, 1996).

Para a obtenção das frações hexânica e diclorometano, 10g do EEC foi solubilizado em uma mistura metanol/H₂O (7:1) e extraída por três vezes com 50mL de hexano e, posteriormente, extraída por três vezes com 50mL de

diclorometano. Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo (Ferri, 1996). Uma solução aquosa do extrato etanólico a 1% foi preparada diariamente para avaliação da atividade cicatrizante. O extrato etanólico e as frações concentradas foram solubilizados em DMSO para a verificação da atividade antimicrobiana.

2. Atividade cicatrizante

Foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, fêmeas, com 60 dias de idade, peso entre 160 a 190 g no início do experimento, provenientes do Biotério Central da UFG. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, sob o protocolo n° 019/2007.

Os animais foram adaptados no Biotério de Cirurgia Experimental da Escola de Veterinária da UFG, por um período de dez dias e mantidos em gaiolas individuais de polietileno, forradas com maravalha, sob condições ambientais controladas (temperatura $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar entre 50 e 70% e fotoperíodo claro/escuro de 12h). Água e ração foram fornecidos *ad libitum*.

Os animais foram pesados e divididos de forma aleatória, em dois grupos com 18 ratas e subdivididos em três subgrupos (n=6), para serem estudados de acordo com o seguinte protocolo de avaliação pós-operatória (PO):

Grupo 1 – Controle (C), animais tratados com água destilada, sendo C1 (4° dia PO), C2 (7° dia PO) e C3 (14° dia PO).

Grupo 2 – EEC, animais tratados com solução aquosa do extrato etanólico a 1%, sendo EEC1 (4° dia PO), EEC2 (7° dia PO) e EEC3 (14° dia PO).

Para a indução da ferida utilizou-se um *punch* metálico circular de 1cm de diâmetro na região dorso-cervical de cada animal. A anestesia consistiu da administração, por via intramuscular, da associação de cetamina e xilazina, nas doses de 70mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente (Pachaly, 2006).

Logo após a cirurgia e diariamente no mesmo horário, 100µL da solução teste (EEC) e do solvente foram instiladas nas feridas dos animais.

Todos os animais foram examinados diariamente quanto ao aspecto geral, ocasião em que se procedia a avaliação macroscópica da ferida, observando-se a presença ou ausência de hemorragia, exsudato e crosta, sendo os dados registrados em fichas individuais. Os animais foram pesados e eutanaziados em câmara de CO₂ aos 4, 7 e 14 dias do PO, conforme protocolos preconizados por Lopes et al. (2005) e Garros et al. (2006).

Para a análise morfométrica, as feridas foram fotografadas nos dias zero, 4, 7 e 14 do PO, utilizando-se de uma câmera digital acoplada em tripé, mantida a uma distância constante de 27 cm da ferida, e em seguida, as imagens foram digitalizadas em microcomputador, com o auxílio do Software Image J 1.3.1 (NIH, Estados Unidos). O grau de contração da área (GC) da ferida foi calculado por meio da fórmula demonstrada por Oliveira et al (2000):

$$GC = \frac{\text{Área } T^0 - \text{Área } T^{\text{dia sacrifício}}}{\text{Área } T^0} \times 100$$

Onde: T^0 = dia zero
 $T^{\text{dia sacrifício}}$ = dias 4, 7 ou 14 PO.

Para a avaliação histológica, um fragmento de cada ferida foi retirado, fixado em formol tamponado a 10%, processado e corado com Hematoxilina e Eosina (HE), de acordo com Luna (1968). Utilizou-se também a coloração especial de Picrosúrio para a quantificação do colágeno, sob luz polarizada (López & Rojkind, 1985), calculando-se a porcentagem de área marcada em verde ou amarelo-avermelhada por campo, por meio do software Image J 1.3.1 (NIH, Estados Unidos).

Ao exame histológico, nos dias 4, 7 e 14 PO, foram avaliadas as variáveis fibrina, hemorragia, hiperemia, infiltrado inflamatório, reepitelização e hiperplasia epitelial. Adotaram-se escores adaptados de Biondo-Simões et al. (2006), onde:

- Para fibrina, hemorragia, hiperemia e infiltrado inflamatório utilizaram-se os escores ausente (0), discreto (1 a 25%), moderado (25 a 50%) e acentuado (acima de 50%), avaliados aos 4º e 7º dias PO. Para a hiperplasia epidermal utilizaram-se os mesmos escores, avaliada no 14º dia PO;

- Para a reepitelização utilizaram-se os escores total ou parcial, avaliada no 14º dia do PO;

3. Atividade antibacteriana *in vitro*

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada utilizando cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) e isolados pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG. Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), foram utilizadas culturas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6532), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13048), *Micrococcus roseus* (ATCC 1740), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Bacillus cereus* (ATCC 14576), *Bacillus*

stearothermophilus (ATCC 1262), *Enterobacter cloacae* (HMA/FTA 502), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Serratia marcescens* (ATCC 14756) e método de diluição em placa.

Os microrganismos foram reativados em caldo tioglicolato (Difco), incubados a 37°C, por 24-48 horas e, em seguida, repicados em ágar simples inclinado (Difco). Para preparação do inóculo das bactérias a serem utilizados no aplicador de Steers, as bactérias foram suspensas em solução salina estéril e a turvação comparada com padrão 0,5 da Escala 1 da Mac Farland (NCCLS, 2003).

Para avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em placa, 1000 mg do extrato etanólico bruto das flores de calêndula, 500 mg da fração hexânica e 350 mg da fração diclorometano foram colocados em tubos de ensaio contendo 1,0 mL de DMSO. Após solubilização adicionou-se 1,0 mL de solução salina e realizou-se uma diluição seriada 1:2 para cada amostra. A cada tubo adicionou-se 19 mL de ágar Mueller Hinton, de modo a se obter placas com concentrações de 50 a 0,39 mg/mL para o extrato bruto, 25 a 0,195 mg/mL para fração hexânica e 17,5 a 0,125 mg/mL para a fração diclorometano. Para controle do solvente, uma placa contendo 1 mL de DMSO foi preparada nas mesmas condições. Os inóculos microbianos foram aplicados nas placas com o auxílio do inoculador de Steers (Steers et al., 1959). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para as bactérias. Foi considerada CIM a menor concentração dos extratos que inibiu o crescimento das bactérias.

4. Análise estatística

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se do programa GraphPad InStat (Version 3.05 for Windows). Para análise das variáveis paramétricas foi utilizado o teste t pareado e o teste de Mann Whitney para as não-paramétricas. O nível de significância foi de $p < 0,05$ (Sampaio, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Atividade cicatrizante

O procedimento operatório e o tratamento pós-operatório transcorreram sem complicações. Todos os animais recuperaram-se bem da anestesia, demonstrando bom estado geral e atividades física e comportamental normais para a espécie. Não foi observado exsudato purulento em nenhuma das feridas cutâneas, mas constatou-se exsudação serosa nos animais do grupo EEC até o 4º dia, e no grupo controle até o 7º dia PO.

As crostas começaram a se formar no 3º dia, sendo que no grupo EEC apresentaram-se mais delgadas e umedecidas em relação ao grupo controle, que se demonstraram espessas e ressecadas. Ao 7º dia PO, nos dois grupos, as crostas começaram a se destacar, havendo sinais de epitelização da ferida. No 14º PO foi verificada cicatrização completa das feridas em ambos os grupos.

Martins et al. (2003), ao tratarem feridas cutâneas em cavalos com uma solução hidroalcolica de *C. officinalis* cultivada no Brasil, observaram que na fase inflamatória as crostas apresentavam-se serosas e lisas, com bordos mais delgados em relação ao controle, o que também foi verificado nas feridas cutâneas dos ratos tratados com EEC deste estudo. Apesar de a resposta

cicatricial ser naturalmente diferente nas espécies estudadas, reitera-se o efeito antiinflamatório verificado nas feridas cutâneas de cavalos e ratos tratados com extratos da calêndula. Não fosse isso, possivelmente as feridas cutâneas dos eqüinos não teriam apresentado reação cicatricial mais discreta naqueles animais tratados com uma solução hidroalcoólica de calêndula, já que preparações tópicas freqüentemente são irritantes e estimulam tecido de granulação exuberante naquela espécie (White, 1995).

A área da ferida cutânea na derme dos ratos diminuiu gradativamente com a evolução do processo de cicatrização nos dois grupos e não houve diferença significativa (Tabela 1). Contudo, a observação macroscópica diária e os valores médios obtidos nas mensurações de contração de ferida permitiram concluir que a retração centrípeta foi beneficiada, especialmente aos 4º e 7º dias PO (Figura 1). Resultado semelhante também foi obtido por Martins et al. (2003), quando mensuraram área de feridas cutâneas de eqüinos tratadas com solução hidroalcoólica de calêndula.

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão da contração das feridas cutâneas em ratos (%) (n=6) dos grupos controle e EEC aos 4º e 7º dias PO.

Grupos	Dias PO	
	4º	7º
Controle	36,60 ± 7,73 ^a	42,24 ± 9,12 ^a
EEC	43,51 ± 9,97 ^a	47,91 ± 19,26 ^a

Letras iguais não diferem entre si. Teste t pareado (P<0,05)

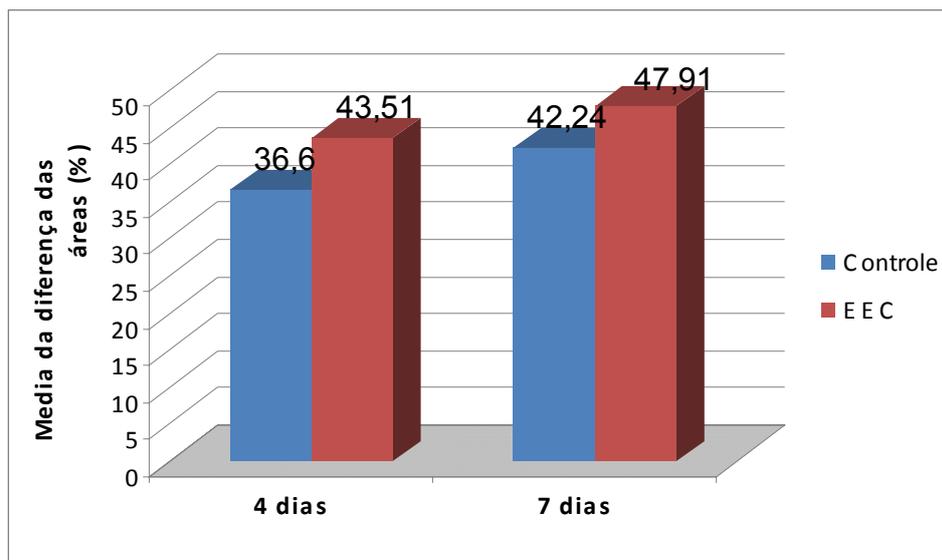


Figura 1 – Médias da contração das feridas cutâneas em ratos (%) (n=6) aos 4^o e 7^o dias PO. Teste t pareado (p<0,05).

Observou-se que as variáveis fibrina e hiperemia aos 4^o e 7^o dias PO apresentaram diferença significativa quando comparadas com o controle (Tabelas 2 e 3, Figuras 2 e 3).

Tabela 2 – Medianas das variáveis histológicas avaliadas ao 4^o dia PO dos grupos controle e EEC (n=6).

Variáveis histológicas	Controle	EEC	P
Fibrina	3,0 ^a	1,0 ^b	0,026
Hiperemia	2,5 ^a	1,0 ^b	0,015
Hemorragia	3,0 ^a	3,0 ^a	0,930
Infiltrado inflamatório (PMN)	3,0 ^a	3,0 ^a	0,999

P = nível de significância. Letras iguais não diferem entre si (Teste de Mann-Whitney, p<0,05).

Tabela 3 – Medianas das variáveis histológicas avaliadas ao 7º dia PO dos grupos controle e EEC (n=6).

Variáveis histológicas	Controle	EEC	P
Fibrina	3,0 ^a	2,0 ^b	0,041
Hiperemia	2,5 ^a	1,5 ^b	0,026
Hemorragia	3,0 ^a	3,0 ^a	0,999
Infiltrado inflamatório (PMN)	3,0 ^a	3,0 ^a	0,937

P= nível de significância. Letras iguais não diferem entre si (Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$)

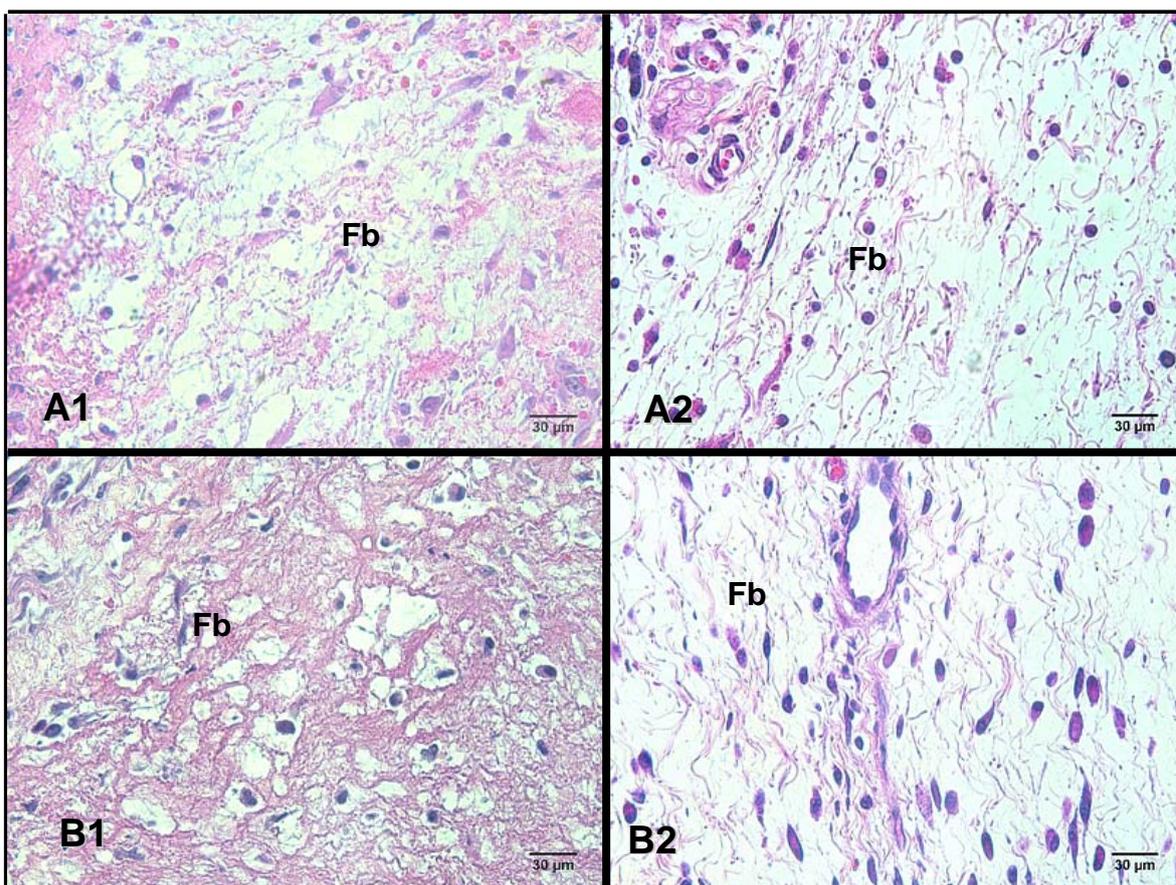


Figura 2 - Fotomicrografias das feridas cutâneas em ratos aos 4 (A) e 7 (B) dias PO, evidenciando fibrina (Fb). A1 e B1 referem-se ao controle e A2 e B2 ao EEC, respectivamente. Hematoxilina-eosina.

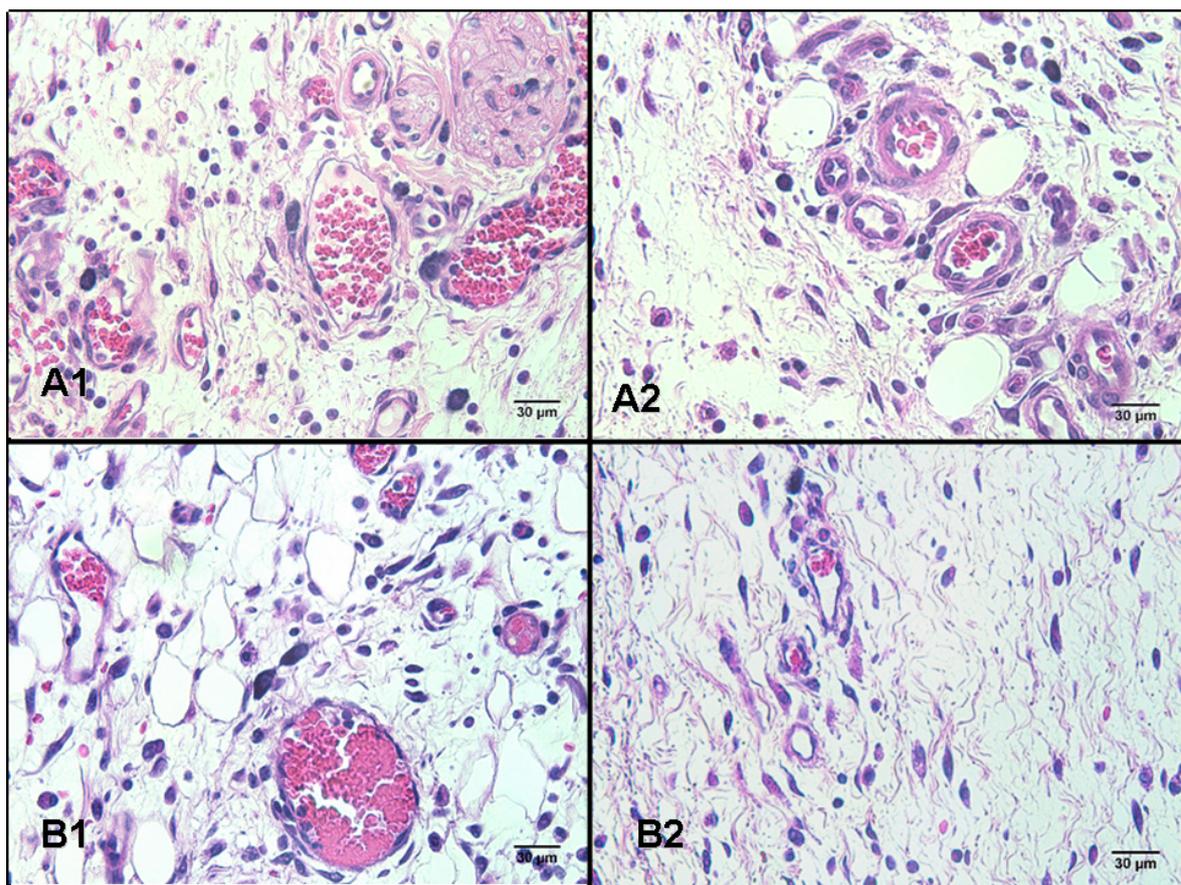


Figura 3 - Fotomicrografia da ferida cutânea em ratos aos 4 (A) e 7 (B) dias PO evidenciando hiperemia. Grupos controle (A1 e B1) e EEC (A2 e B2), respectivamente. Hematoxilina-eosina.

A atividade antiinflamatória da calêndula foi anteriormente evidenciada em camundongos por Della-Loggia et al. (1990), Della-Loggia et al. (1994), Zitterl-Eglseer et al. (1997), Alonso (1998), WHO (2002), Hamburguer et al. (2003) e Ukiya et al. (2006), utilizando modelos de indução de edema de orelha por óleo de cróton e de edema de pata por carragenina. Esses testes avaliam substâncias que apresentam atividade sobre os produtos da ciclooxigenase (COX), principalmente as prostaglandinas, pelo fato do óleo de cróton e da carragenina produzirem edema mediado por esses compostos (Lapa et al., 2003). Assim,

supõe-se que a atividade antiinflamatória da *C. officinalis* esteja relacionada a sua atividade sobre os derivados da COX.

Neste trabalho a atividade antiinflamatória da calêndula também foi constatada, já que houve diferença significativa quanto às variáveis fibrina e hiperemia, que compreendem alterações circulatórias diretamente relacionadas à inflamação.

No 14º dia PO observou-se reepitelização total da ferida nos dois grupos e diferença significativa quanto à hiperplasia epidermal (Tabela 4 e Figura 4).

Tabela 4 – Medianas da variável hiperplasia epidermal avaliada ao 14º dia PO dos grupos controle e EEC (n=6).

Variável histológica	Controle	EEC	P
Hiperplasia epitelial	3,0 ^a	1,0 ^b	0,046

P= nível de significância. Letras diferentes diferem entre si (Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

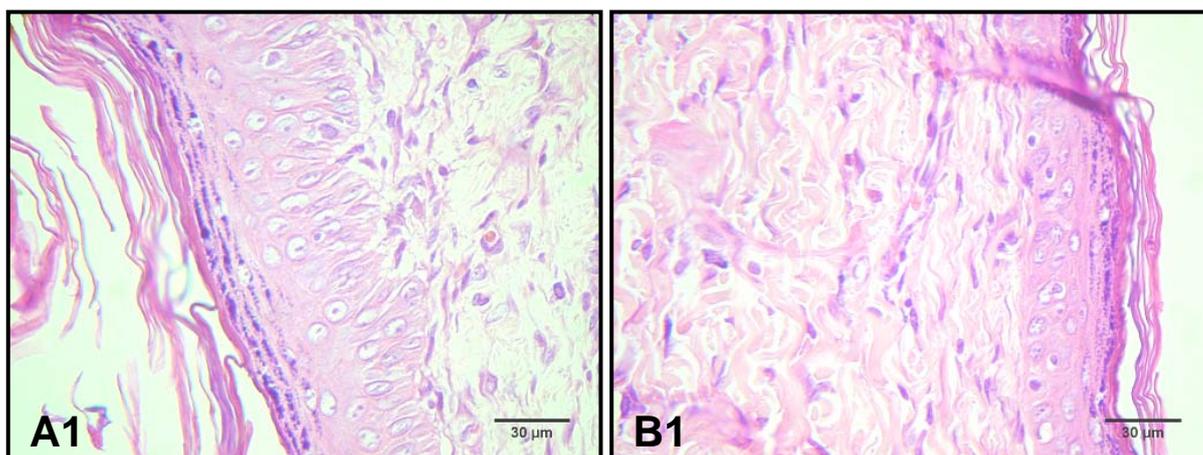


Figura 4 - Fotomicrografia da ferida cutânea de ratos (n=6) evidenciando a hiperplasia epidermal. Grupos controle (A1) e EEC (A2) ao 14º dia PO. Hematoxilina-eosina.

A hiperplasia corresponde ao aumento no número de células em consequência do aumento no ritmo de divisão celular com manutenção do padrão

morfofuncional. No caso de hiperplasias que ocorrem junto ao processo inflamatório, estas têm sua gênese a partir de fenômenos intrínsecos da inflamação, como a hiperemia e a síntese de substâncias que estimulam a divisão celular. Dessa forma, quanto maior e mais duradoura for a resposta inflamatória, maior será a reação hiperplásica das células envolvidas no processo (Kumar et al., 2005).

Nesse âmbito, a menor reação hiperplásica epidermal, verificada nas feridas cutâneas de ratos tratados com EEC e constatada estatisticamente, possivelmente relaciona-se à atividade antiinflamatória da calêndula, já que as feridas cutâneas de ratos tratadas com EEC apresentaram resposta inflamatória reduzida quando comparada ao grupo controle e evidenciada pela menor hiperemia e deposição de fibrina junto à reação inflamatória.

À morfometria, houve diferença significativa quanto à quantidade de colágeno entre os grupos controle e EEC aos 4º e 7º dias PO (Tabelas 5 e Figura 5). No 4º dia PO foi evidenciada coloração verde brilhante do colágeno nos dois grupos e no 7º dia PO coloração amarelo-avermelhada, principalmente observada no grupo EEC.

Tabela 5 – Medianas da variável colágeno, avaliada por morfometria, ao 4º e 7º dias PO dos grupos controle e EEC (n=6).

Tempo de avaliação (PO)	Controle	EEC	P
4º dia	5,33 ^a	8,27 ^b	0,025
7º dia	4,31 ^a	6,23 ^b	0,015

P= nível de significância. Letras diferentes diferem significativamente (Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

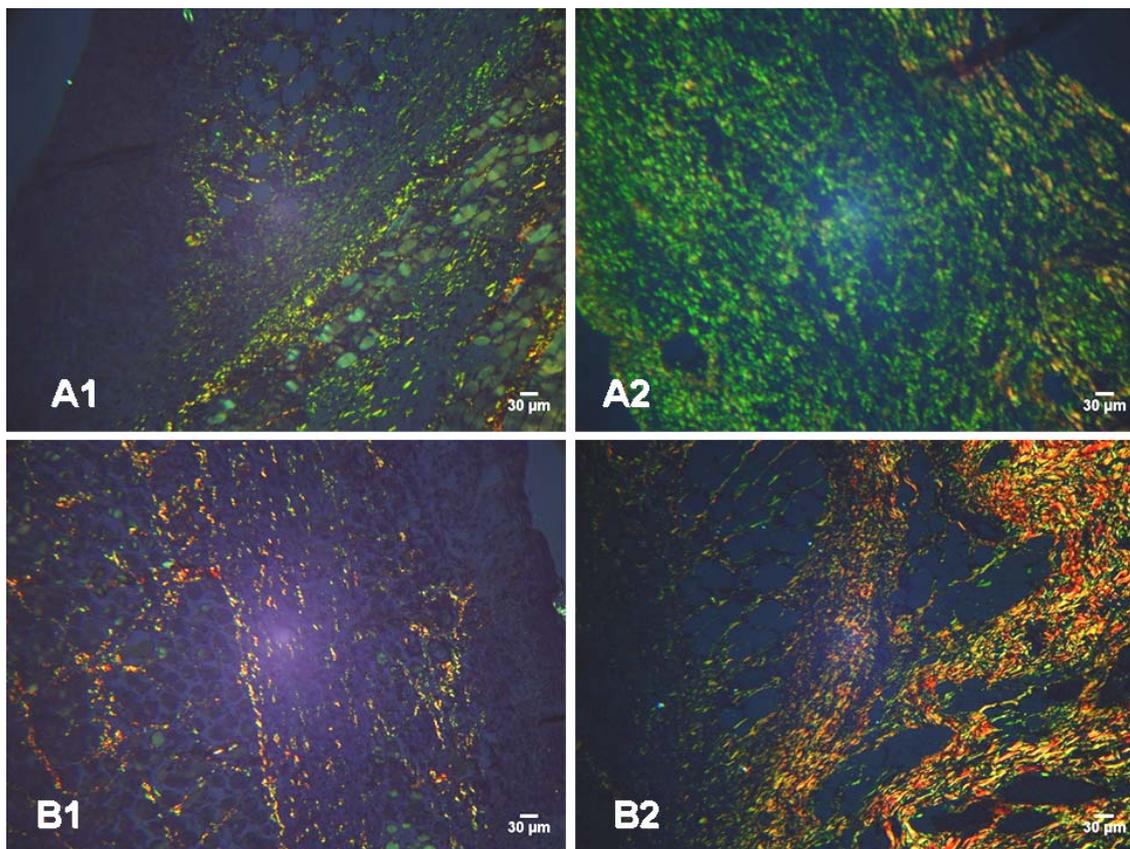


FIGURA 5- Fotomicrografia de ferida cutânea em ratos (n=6) aos 4 (A) e 7 (B) dias PO. A1 (controle): produção de colágeno tipo III evidenciado pela coloração verde em luz polarizada; A2 (EEC): intensa produção de colágeno tipo III; B1 (controle): produção de colágeno tipo I evidenciado pela coloração amarela-alaranjado em luz polarizada; B2 (EEC): intensa produção de colágeno tipo I. Coloração Picrossírius.

Observou-se que, no decorrer do processo de reparo da ferida, o colágeno tipo III foi gradativamente substituído pelo colágeno tipo I, sendo esse efeito evidenciado pela mudança de coloração do colágeno de verde para amarelo-avermelhado. Borges et al. (2007) descrevem que o colágeno é o principal constituinte do tecido conectivo e pode ser bem evidenciado pela coloração Picrossírius. Nesse método, as fibras colágenas mais delgadas e menos organizadas, que correspondem ao colágeno tipo III, apresentam coloração verde brilhante devido à menor birrefringência. O colágeno tipo I, que é

mais organizado e possui maior birrefringência, apresenta coloração amarelada ou avermelhada. Não foram encontradas referências na literatura sobre mensuração de colágeno pelo Picrossírius em feridas cutâneas tratadas com *C. officinalis*. Neste trabalho, a confirmação estatística do aumento da concentração de colágeno nas feridas tratadas com EEC aos 4º e 7º dias PO (Tabelas 5 e 6), indica que o EEC colaborou para uma maior síntese colágena, atuando assim, de forma positiva no processo da cicatrização das feridas cutâneas.

2. Atividade antibacteriana *in vitro*

O EEC e a fração hexânica apresentaram maior atividade antibacteriana, mostrando-se mais efetivos frente a bactérias Gram-positivas do que a fração diclorometano. As menores concentrações dos extratos que inibiram o crescimento dos microrganismos testados foram: EEC, CIM de 0,39 mg/mL, frente a *S. aureus* 13048 e *B. stearo thermophilus*; FDC, CIM de 4,37 mg/mL, frente a *S.aureus* 6532 e *S.aureus* 13048, CIM de 1,08 mg/mL, frente a *B. stearo thermophilus* e *B. cereus*, CIM de 0,5 mg/mL, frente a *M. roseus*; e FHC, CIM de 0,19 mg/mL, frente a *S. aureus* 13048 (Quadro 1).

QUADRO 1- Atividade antimicrobiana com oito diluições em placa do extrato etanólico (EEC) e frações diclorometano (FDC) e hexânica (FHC) e leitura até 24 horas, avaliada pela concentração inibitória mínima.

Bactérias Gram positivas não-esporuladas	EEC CIM (mg/mL)	FDC CIM (mg/mL)	FHC CIM (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6532	50,0	4,37	> 25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13048	0,39	4,37	0,19
<i>Micrococcus roseus</i> ATCC 1740	50,0	0,50	> 25
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	50,0	2,18	> 25
Bactérias Gram positivas esporuladas			
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14576	50,0	1,08	0,19
<i>Bacillus stearo thermophilus</i> ATCC 1262	0,39	1,08	> 25
Bactérias Gram negativas			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	50,0	> 17,5	> 25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	50,0	> 17,5	> 25
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	50,0	> 17,5	> 25
<i>Enterobacter cloacae</i> HMA/FT 502	50,0	> 17,5	> 25
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	50,0	> 17,5	> 25

Feridas abertas estão propensas a contaminações por bactérias, podendo representar uma porta de entrada para infecções sistêmicas. Quando ocorre contaminação, há formação de uma grande quantidade de exsudato e produção de toxinas, retardando o reparo da ferida (Houghton et al., 2005).

Dados da CIM indicaram que o extrato etanólico e as frações diclorometano e hexânica da calêndula apresentaram atividade antibacteriana, principalmente sobre bactérias gram-positivas. Resultado semelhante foi observado por Volpato (2005) ao avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e das frações hexânica e diclorometano de *C.officinalis*, utilizando a metodologia da cavidade em placa e extração em aparelho de Soxhlet. Apesar

das diferenças metodológicas, os resultados obtidos em ambos os experimentos reiteram a atividade antibacteriana da calêndula.

Conclui-se que as flores da *C. officinalis* cultivada apresentam efeitos positivos sobre a atividade cicatricial em feridas cutâneas de ratos, bem como sobre a atividade antibacteriana *in vitro*.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com a colaboração dos Setores de Patologia Animal e Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária, do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia e do Setor de Patologia Geral do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública todos da Universidade Federal de Goiás.

REFERÊNCIAS

ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina: Bases clínicas y Farmacológicas**. Buenos Aires, Isis Ediciones, 1998, p. 327-331.

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

BIONDO-SIMÕES, M.L.P; ALCANTARA, E.M.; DALLAGNOL, J.C.; YOSHIZUMI, K.O.; TORRES, L.F.; BORSATOS, K.S. Cicatrização de feridas: estudos comparativo em ratos hipertensos não tratados e tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.33, n.2, p.74-78, 2006.

BORGES, L. F. et al. Picrossírius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions. **Mícron**,v.38, p.580–583, 2007.

BROWN, D. J.; DATNER, A. M. Phytotherapeutic Approaches to Common Dermatologic Conditions. **Achta Dermatological**, v 134, p.1401-1404, 1998.

DELLA-LOGGIA, R. et al. Topical Anti-Inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Extracts. **Planta Médica**, v. 56, p.658, 1990.

DELLA-LOGGIA, R. et al. The Role of Triterpenoids in the Topical Anti-inflammatory Activity of *Calendula officinalis* Flowers. **Planta Medica**, v.60, p. 516-520, 1994.

DURAN, V.; JOVANOVC, M.; MIMICA, N.; GAJINOV, Z.; POLJACKI, M.; BOZA, P.

Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. **International Journal of Tissue Reaction**, v. 27, issue 3, p. 101-106, 2005.

FARIA, J. L. et al. **Patologia Geral – Fundamentos das Doenças com Aplicações Clínicas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p.154-238.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV (2001). São Paulo, Ateneu, p.134.

FERRI, P. H. Química dos Produtos Naturais: Métodos Gerais. In: Di Satsi L C **Plantas Mediciniais: arte e ciência, um guia de estudos interdisciplinares**. São Paulo: Editora da UEP, 1996, p.132-140.

GARROS, I.C. et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21 (suplemento 3), p.55-65, 2006.

HAMBURGUER, M. et al. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid ester from Marigold (*Calendula officinalis*). **Fitoterapia**, v. 74, p. 328-338, 2003.

HOSGOOD, G. Stages of Wound Healing and Their Clinical Relevance. **Veterinary Clinics, Small An. Practice**, v. 36, p.667-685, 2006.

HOUGHTON, P.J. et al. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.100-107, 2005.

HSU, S. Green tea and the skin. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 52, p.1049-1059, 2005.

KRISHNAN, P. The scientific study of herbal wound healing therapies: Current state of play. **Current Anesthesia & Critical Care**, v. 17: 21-27, 2007.

KUMAR, V.; FAUSTO, N.; ABBAS, A.K. Robbins & Cotran – Patologia. 7ª ed. São Paulo: Elsevier, 2005, 1616 pp.

LAPA, A.J. et al. **Métodos para avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Porto Alegre: Metrópole, 2003, p.99-118.

LOPES, G.C. et al. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.265-272, 2005.

LÓPEZ de LEON, N.A.; ROJKIND, M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.33, p.737-743, 1985.

LUNA, L. G. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.

MARTINS, P. S. et al. Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2003.

MIDWOOD, K.S.; WILLIAMS, L.V.; SCHWARZBAUER, J.E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p. 1031–1037, 2004.

MONTENEGRO, J.F.; FRANCO, M. **Patologia – Processos Gerais**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p.209-222.

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards. In: **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Villanova-PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, Publication M6-T, 2003.

OLIVEIRA, S.T. et al. Formulações do confrei (*Symphytum officinalis* L.) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.7, n.1, p.61-65, 2000.

PACHALY, J.R. Terapêutica por extrapolação alométrica. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R. & CATÃO-DIAS, J.L. (Org.) **Tratado de Animais selvagens - Medicina Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006, p.1215-1223.

PATRICK, K.F. M.; KUMAR, S.; EDWARDSON, P.A.D.; HUTCHINSON, J.J. Induction of vascularisation by an aqueous extract of the flowers of *Calendula officinalis* L., the European marigold. **Phytomedicine**, v. 3, issue 1, p.11-18, 1996

RASKIN, L. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology** v.20, n.12, p.522-531, 2002.

SAMPAIO, I B M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, p. 221, 1998.

STEERS, E; Foltz, E.L.; GRAVES, V.S. An inocula replicating apparatus for continue testing of bacterial susceptibility to antibiotics. **Antibiotic and Chemotherapy**, v.9, p.307-311, 1959.

UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. Anti-Inflammatory, Anti-Tumor-Promoting, and Cytotoxic Activities of Constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers. **Journal of Natural Products**, v.69, p.1692-1696, 2006.

VOLPATO, A. M. M. **Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico.**2005.133 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Química, Universidade Federal do Paraná.

WHO Monographs on: selected medicinal plants, v. 2. Geneva: World Health Organization, 2002, p. 35-44.

WHITE, G.W. Maltodextran, NF POWDER: a new concept in equine wound healing. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.15, p.296-298, 1995.

ZITTERL-EGLSEER, K. et al. Anti-oedematous activities of the main triterpenoid esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). **Journal Ethnopharmacology**, v.57, p.139-144, 1997.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversas formas de avaliações têm sido propostas para validar os remédios utilizados pela etnobotânica e etnoveterinária, incluindo estudos da literatura, testes clínicos e laboratoriais, bem como o estudo da atividade que esses compostos exercem sobre o organismo. As flores da *Calendula officinalis* têm sido utilizadas pelo homem desde a Antiguidade, principalmente devido a seu efeito cicatrizante.

De posse dos resultados obtidos com as flores da *Calendula officinalis* cultivadas no Brasil, foi possível estabelecer que:

- 1) O extrato etanólico e as frações diclorometano e hexânica estimularam a neovascularização na membrana corioalantóide em ovos embrionados de galinha, avaliada por meio da morfometria, planimetria por contagem de pontos e avaliação histológica.
- 2) O extrato etanólico aumentou o número de vasos sanguíneos na derme de ratos. Esse fato ratificou a intensa neovascularização promovida pelo extrato no modelo da membrana corioalantóide
- 3) O efeito angiogênico do EEC evidenciado na derme de ratos pela imunistoquímica neste trabalho não está relacionado ao aumento na intensidade da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).
- 4) O efeito angiogênico observado pode estar associado à expressão de outros fatores pró-angiogênicos e não o VEGF, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), ou citocinas angiogênicas, a interleucina 8 (IL-8), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o fator de crescimento e transformação- β (TGF- β).

5) O extrato etanólico exerceu atividade antiinflamatória nas feridas cutâneas em ratos. Esse efeito foi atribuído à diminuição da exsudação serosa, da hiperemia, da deposição de fibrina e da hiperplasia epidermal, além de resultar em crostas mais delgadas e umedecidas.

6) O extrato etanólico aumentou a quantidade de colágeno no tecido de granulação nas feridas cutâneas de ratos, evidenciado pela coloração Picrossírius.

7) O extrato etanólico e as frações diclorometano e hexânica apresentaram atividade antibacteriana, principalmente sobre bactérias gram-positivas.

APÉNDICE

Depósitos de Pedido de Patente: Privilégio de Inovação

Como produto do desenvolvimento deste trabalho, foi realizado o depósito de dois pedidos de patente: Privilégio de Inovação, intituladas:

- Fração diclorometano do Extrato Etanólico das flores da *Calendula officinalis* cultivadas no Brasil. Registro de Depósito nº PI0801621-6. Data de Depósito: 05 de maio de 2008.

- Fração hexânica do Extrato Etanólico das flores da *Calendula officinalis* cultivadas no Brasil. Registro de Depósito nº PI0802020-5. Data de Depósito: 07 de maio de 2008.

- Extrato etanólico das flores da *Calendula officinalis* cultivada no Brasil. Registro de Depósito nº PI0706242-7. Data de Depósito: 02 de fevereiro de 2007.