

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI – UFSJ
Departamento de Ciências Naturais – DCNAT
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais – PPGCM

Renan Diniz Ferreira

Efeitos do uso tópico do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. no processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos

São João del-Rei

2023

Renan Diniz Ferreira

Efeitos do uso tópico do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. no processo de cicatrização de feridas cutâneas de camundongos

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Prof^a. Dra. Flávia Carmo Horta Pinto

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Priscila Totarelli Monteforte

São João del-Rei

2023

Renan Diniz Ferreira

Efeitos do uso tópico do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. no processo de cicatrização de feridas cutâneas de camundongos

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, da Universidade Federal de São João del-Rei, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

São João del-Rei, 30 de agosto de 2023.

Prof^a. Dra. Flávia Carmo Horta Pinto
Universidade Federal de São João del-Rei – UFSJ
Presidente da Banca e Orientadora

Prof^a. Dra. Priscila Totarelli Monteforte
Universidade Federal de São João del-Rei – UFSJ
Co-orientadora

Prof^a. Dra. Laila Cristina Moreira Damázio
Universidade Federal de São João del-Rei – UFSJ
Examinadora Interna

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Examinador Externo




PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL - REI / UFSJ
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - M.Sc.

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA CONCESSÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

Aos 30 dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e três, às 14h, na Sala C.314, DCNAT, Campus Dom Bosco/UFSJ, Praça Dom Helvécio 74, São João del-Rei e com transmissão pela plataforma Google Meet link meet.google.com/zun-xekp-rfc, foi instalada a banca examinadora de dissertação de mestrado do discente **Renan Diniz Ferreira**. A banca examinadora foi composta pelo professor Dr. Wanderson Geraldo de Lima, (UFOP), examinador externo, pela professora Dra. Laila Cristina Moreira Damázio (UFSJ), examinadora interna ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais, pela professora Dra. Priscila Totarelli Monteforte (UFSJ), coorientadora, e pela professora Dra. Flávia Carmo Horta Pinto. A professora Dra. Flávia Carmo Horta Pinto, Presidente da Banca, fez a abertura dos trabalhos e, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, solicitou ao candidato que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada "**Efeitos do uso tópico do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* no processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos**", marcando um tempo de até sessenta minutos para a apresentação. Concluída a exposição, a Profa. Flávia Carmo Horta Pinto, presidente, passou a palavra ao examinador externo, Prof. Wanderson Geraldo de Lima, para arguir o candidato, e, em seguida, à examinadora interna, Profa. Laila Cristina Moreira Damázio, e à coorientadora, Profa. Priscila Totarelli Monteforte, para que fizessem o mesmo. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, o resultado da avaliação da banca, conforme as normas vigentes na Universidade Federal de São João del-Rei, foi: APROVADA a defesa SEM a necessidade de alterações na dissertação. A versão final da dissertação, deverá ser entregue ao programa no prazo de 90 (noventa) dias, a contar a partir da data da defesa (Resolução Consu N° 062, de 07 de novembro de 2011, modificada pela Resolução CONSU N° 005, de 29 de fevereiro de 2016). O candidato não terá o título senão cumprir as exigências acima descritas.

Documento assinado digitalmente
 **WANDERSON GERALDO DE LIMA**
Data: 01/09/2023 14:12:08-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>


Dr. Wanderson Geraldo de Lima

Documento assinado digitalmente
 **PRISCILA TOTARELLI MONTEFORTE**
Data: 31/08/2023 16:13:14-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Priscila Totarelli Monteforte

Documento assinado digitalmente
 **LAILA CRISTINA MOREIRA DAMAZIO**
Data: 01/09/2023 18:36:53-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Laila Cristina Moreira Damázio

Documento assinado digitalmente
 **FLAVIA CARMO HORTA PINTO**
Data: 31/08/2023 15:21:08-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Flávia Carmo Horta Pinto

O presente trabalho foi realizado no departamento de Ciências Naturais da Universidade Federal de São João del-Rei. No Laboratório de Patologia Experimental (LAPAE); no Laboratório de Biomateriais (LBM); Laboratório Multiusuário do PPGCM (LCM); Biotério Setorial; Laboratório de Pesquisa em Reprodução (LAPER) e no laboratório de Microscopia. Foi realizado também no Laboratório de Reabilitação (LABRE) do Departamento da Medicina da UFSJ e no Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC.

Dedico,

Aos raizeiros, indígenas, ribeirinhos e quilombolas por seu vasto saber sobre as Plantas Medicinais; aos apaixonados pelas Plantas Medicinais; e a todos que encontram na natureza a matéria-prima para a cura de suas enfermidades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora a Professora **Dra. Flávia Carmo Horta** Pinto por ter me oportunizado trabalhar ao seu lado. Outrora, realizando um sonho de realizar uma iniciação científica. Agora, me concedendo a oportunidade de ter um título que sempre sonhei. Não tenho palavras para agradecer o carinho, a dedicação, o compromisso e o apoio comigo durante todo esse tempo que estivemos juntos. Me ensinando que muito além de resultados gerados, o mestrado gera dentro de nós uma mudança pessoal. Nos faz ver a vida, problemas e obstáculos com outros olhos. Por vezes, não encontramos respostas para tudo, mas certamente faremos mais perguntas e encontraremos um novo caminho a seguir. A essa professora inspiradora, que ama a sala de aula e o laboratório, quero dizer que na minha trajetória docente, desde 2008 quando entrava pela primeira vez em uma sala de aula, tem muito de você! A essa mestra sou eternamente grato!

À co-orientadora Professora **Dra. Priscila Totarelli Monteforte**, farmacêutica assim como eu, agradeço por ter me ouvido falar tantas vezes da desvalorização da nossa profissão. Essa desvalorização do profissional farmacêutico só me fez ter mais forças para correr atrás do sonho de me qualificar para a carreira acadêmica. Agradeço por ter contribuído de forma significativa no desenvolvimento desse trabalho, e, dentre outras coisas, fornecendo a planta medicinal que popularmente invoca um nome tão querido: erva de São-João. Obrigado por me oportunizar realizar esse trabalho!

Aos **professores** do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, agradeço por serem guias, nos inspirando para sermos melhores profissionais e nos ensinando de maneira exemplar. Na oportunidade agradeço à coordenação do programa e ao professor **Dr. Marcos Augusto de Sá**, da UFMG, que mesmo distante me acompanhou nesse processo de aprendizagem, sendo meu professor avaliador e contribuindo com ideias para a realização dessa pesquisa. Um agradecimento especial ao professor **Dr. Paulo Henrique Almeida Campos-Junior** por me oportunizar a realização da imuno-histoquímica desse trabalho. Agradeço também a professora **Karen Helaine Mendes Bertolin** e toda a equipe do laboratório de patologia, pela contribuição nesse trabalho. Agradeço também ao professor **Dr. João Lago** e seu orientando **Felipe Sales** da Universidade Federal do ABC pela realização da CG; ao professor **Dr. Luiz Gustavo** e sua aluna **MSc. Stefanny**, da

UFSJ, pela oportunidade de extração do óleo essencial. Não posso deixar de mencionar aqui os protagonistas dessa história: os **camundongos**. Por vezes eu olhava para eles em suas caixinhas e agradecia por estarem ali me oportunizando crescer profissionalmente. Animais que colocaram as suas vidas para o avanço e progresso da ciência. Com todo o respeito que eles merecem, meu mais profundo agradecimento.

Agradeço aos meus nobres colegas de laboratório que me ajudaram nessa caminhada. Em especial agradeço a **Elisângela** que esteve comigo desde o início, me ensinando os primeiros passos dentro da UFSJ e me ajudando nas análises. Agradeço também aos que contribuíram com seu tempo para a execução desse estudo, desde a alimentação e cuidados aos animais até a ajuda nas análises: **Amanda, Ellen, Maria Eduarda e Milena**, muito obrigado! Aos **colegas de laboratório** que chegaram depois, fica registrado também meu agradecimento! Agradeço imensamente aos meus colegas de turma: **Isabela, Emanuel, Bruna e Ana Paula** pelo convívio nesses dois anos. Às **meninas do LAPER** pela receptividade, muito obrigado!

Não citei até esse momento a instituição que me recebeu com tanto carinho, a Universidade Federal de São João del-Rei. Aos seus funcionários, técnicos administrativos, terceirizados e a **todos que criaram condições favoráveis**, diretamente ou indiretamente, para realização desse trabalho, muito obrigado! Ao secretário do programa **Thallysson Alves** pela prontidão em nos atender e esclarecer nossas dúvidas, muito obrigado!

Chegou a hora de um agradecimento muito especial. Agradeço ao meu amor **Matheus Phillippe de Almeida Silva** por sonhar esse sonho junto comigo. Um companheiro que apoia as minhas ideias e está sempre ao meu lado torcendo para que tudo dê certo. Aquela frase popular nunca caiu tão bem em um agradecimento: “um sonho que se sonha só é só um sonho, mas o sonho que se sonha junto é realidade”. Por esse apoio incondicional, amor e carinho, meu mais profundo agradecimento, te amo!

Eu sou a soma dos meus familiares e amigos. Agradeço aos meus pais **Geraldo e Valéria** por acreditarem em mim e me apoiarem. Me colocando em suas orações para que eu tenha forças de seguir e para que o futuro seja promissor. Peço a Deus que os abençoe e agradeço ao dom da vida! Espero ser um filho que dê muito orgulho a vocês! Aos meus **irmãos**, que mesmo muitas vezes em seus cantos, sei

que torceram por mim, obrigado! Aos meus padrinhos **Elisabeth, Luís Roberto e Marisa**, meu carinho e agradecimento também por, de alguma forma, me oportunizarem chegar até aqui. A **Elanir** que mesmo de longe acreditou em mim e meu deu forças para participar da seleção do Programa de Pós-Graduação, obrigado! Aos meus **amigos**, de longa data ou os que chegaram agora: gratidão!

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho e que aqui não foram citados. Guardo todos no coração! Aos que torceram, festejaram e estiveram comigo, nos bons e nos não tão bons momentos. Agradeço as risadas, as palavras de carinho e a presença!

Ao maestro que orquestra todos os nossos passos. A essa Força superior que ninguém explica, mas que nos guia em nossas escolhas. A essa **inteligência suprema, causa primeira de todas as coisas**, agradeço! Agradeço a vida e ao universo por estar aqui! Luz!

As folhas da planta que você ferve e bebe podem te transformar. É de dentro pra fora que ela age, colocando tudo em seu lugar (ditado popular brasileiro).

“Há neste país uma erva que, pela semelhança que tem com o mentrasto de Portugal, lhe deram o mesmo nome. Ela, pois, nasce pelos lugares mimosos e lavrados: o seu tronco, talos e folhas em tudo sê semelhantes ao de Portugal, com a única diferença de representarem figura maior. Virtudes e uso. Não só é muito bom resolutivo, mas, juntamente, anti-histórico. A sua aplicação é em banhos do cozimento das suas folhas e talos.” (Francisco Antônio de Sampaio 17?? - 17??. Eu Observo e Descrevo. Ed. e Pesq. AP Martins. Dantes, Rio de Janeiro. Publicação original 1780, página 28).

RESUMO

Em seres humanos, o reparo dos tecidos pode ocorrer de duas formas: pela regeneração ou pela cicatrização, onde há perda da funcionalidade tecidual. Na tentativa de tornar mais eficiente esse processo, os produtos de origem natural têm se tornado uma alternativa para melhorar a cicatrização das feridas. O *Ageratum conyzoides* (AC) é popularmente conhecido como "Erva de São João" e tradicionalmente utilizado como anti-inflamatório, analgésico e no alívio de cólicas menstruais e intestinais. Estudos relatam que o uso do extrato etanólico dessa erva aumenta a proliferação celular de queratinócitos e a síntese de colágeno. Outros estudos também apontam que o extrato metanólico induz a contração da ferida. Com isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito tópico do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* no processo de cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos. Para isso, foram utilizados 72 camundongos machos, distribuídos de forma aleatória em quatro grupos, sendo (i) grupo salina, que recebeu aplicação tópica de salina fisiológica; (ii) grupo DMSO, que recebeu aplicação tópica de DMSO; (iii) grupo TOX, que recebeu aplicação tópica do óleo essencial de AC diluído em DMSO, na concentração de 0,01mg/10000µl; e (iv) grupo TOY, que recebeu aplicação tópica do óleo essencial de AC diluído em DMSO, na concentração de 0,001mg/10000µl. Cada grupo foi subdividido em outros três subgrupos, nos tempos de 1, 5 e 7 dias de tratamento, sendo n = 6. Além disso, mais 18 camundongos machos foram distribuídos de forma aleatória em três outros grupos: DMSO, TOX e TOY, seguindo os mesmos tratamentos anteriormente descritos, no tempo de 28 dias. As feridas excisionais foram induzidas, os animais tratados, e após cada tempo de tratamento, as lesões foram coletadas, processadas e analisadas macroscopicamente e microscopicamente, através de técnicas histológicas, histoquímicas e imuno-histoquímicas, para avaliação histopatológica e morfométrica do: infiltrado inflamatório, reepitelização e crostas, mastócitos, novos vasos sanguíneos, deposição de fibras colágenas e macrófagos. Os resultados mostram que macroscopicamente, ao final de sete dias, a área da lesão do grupo TOX foi significativamente menor que o grupo tratado com salina e o grupo TOY. A aplicação tópica do óleo essencial de AC reduziu o infiltrado inflamatório, após 1, 5 e 7 dias de tratamento e após um dia, células fibroblásticas e macrófagos já foram observados na área das lesões. Já aos 28 dias de tratamento, houve um aumento no número de mastócitos e melhor deposição de fibras colágenas nos grupos tratados com o óleo essencial. Dessa forma, conclui-se que a aplicação tópica do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* interfere positivamente no processo de cicatrização de feridas.

Palavras-chaves: cicatrização de feridas, óleo essencial, *Ageratum conyzoides*.

ABSTRACT

In humans, tissue repair can occur in two ways: by regeneration or by healing, where there is loss of tissue functionality. In an attempt to make this process more efficient, products of natural origin have become an alternative to improve wound healing. *Ageratum conyzoides* (AC) is popularly known as "Erva de São João" and traditionally used as an anti-inflammatory, analgesic and to relieve menstrual and intestinal cramps. Studies report that the use of the ethanolic extract of this herb increases the cell proliferation of keratinocytes and collagen synthesis. Other studies also indicate that methanolic extract induces wound contraction. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the topical effect of *Ageratum conyzoides* essential oil on the healing process of excisional cutaneous wounds in mice. For this, 72 male mice were randomly distributed into four groups: (i) saline group, which received topical application of physiological saline; (ii) DMSO group, which received topical application of DMSO; (iii) TOX group, which received topical application of AC essential oil diluted in DMSO, at a concentration of 0.01mg/10000 μ l; and (iv) TOY group, which received topical application of AC essential oil diluted in DMSO, at a concentration of 0.001mg/10000 μ l. Each group was subdivided into three other subgroups, at times of 1, 5 and 7 days of treatment, with n = 6. In addition, 18 more male mice were randomly distributed into three groups: DMSO, TOX and TOY, following the same treatments previously described, in the time of 28 days. The excisional wounds were induced, the animals treated, and after each treatment period, the lesions were collected, processed and analyzed macroscopically and microscopically, through histological, histochemical and immunohistochemical techniques, for histopathological and morphometric evaluation of: inflammatory infiltrate, re-epithelialization and crusts, mast cells, new blood vessels, deposition of collagen fibers and macrophages. The results show that macroscopically, at the end of seven days, the area of the lesion in the TOX group was significantly smaller than in the saline-treated group and the TOY group. Topical application of AC essential oil reduced the inflammatory infiltrate, after 1, 5 and 7 days of treatment and after one day, fibroblastic cells and macrophages were already observed in the area of lesions. At 28 days of treatment, there was an increase in the number of mast cells and better deposition of collagen fibers. Thus, it is concluded that the topical application of the essential oil of *Ageratum conyzoides* interferes positively in the wound healing process.

Keywords: wound healing, essential oil, *Ageratum conyzoides*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>A. conyzoides</i> . Família Asteraceae.....	26
Figura 2 - Fenômenos químicos, vasculares e celulares da fase inflamatória da cicatrização.....	36
Figura 3 – Fenômenos químicos, vasculares e celulares da fase proliferativa da cicatrização.....	39
Figura 4 – Fenômenos químicos, vasculares e celulares da fase de remodelamento da cicatrização.....	41
Figura 5 – Obtenção do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> e caracterização por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.....	50
Figura 6 – Equação para o cálculo do rendimento do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	50
Figura 7 – Esquema de cores para identificar os animais em seus respectivos grupos.....	53
Figura 8 – Técnica anestésica.....	54
Figura 9 – Técnica cirúrgica.....	55
Figura 10 – Resultado da confecção de ferida.....	56
Figura 11 – Tratamento do grupo com salina, DMSO e dos grupos tratados TOX e TOY com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	57
Figura 12 – Protocolo experimental.....	57
Figura 13 – Equação para cálculo da área da lesão.....	59
Figura 14 – Equação para cálculo da área de fechamento da lesão em %.....	59
Figura 15 – Vasos sanguíneos considerados para quantificação da neovascularização.....	63
Figura 16 – Áreas da lesão onde foram quantificados os leucócitos e os novos vasos.....	63
Figura 17 – Área da lesão onde foram quantificados os mastócitos.....	64
Figura 18 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>A. conyzoides</i>	69
Figura 19 – Espectro de massas do constituinte β -cariofileno.....	69
Figura 20 – Espectro de massas do constituinte α -humuleno.....	70
Figura 21 – Espectro de massas do constituinte 6-demetoxi-ageratocromeno.....	70

Figura 22 – Espectro de massas do constituinte germacreno.....	71
Figura 23 – Espectro de massas do constituinte ageracromeno.....	71
Figura 24 – O tratamento tópico com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> após 28 dias de aplicação interfere positivamente no fechamento das lesões excisionais em camundongos.....	75
Figura 25 – O tratamento tópico com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> interfere positivamente na taxa de fechamento das lesões excisionais em camundongos Swiss.....	76
Figura 26 – O tratamento tópico com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> após um dia de aplicação diminuiu qualitativamente o infiltrado inflamatório nos animais do grupo TOX e TOY.....	79
Figura 27 – O tratamento tópico com DMSO e o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> após cinco dias de aplicações diminuiu o infiltrado inflamatório e aumentaram o número de células fibroblásticas qualitativamente.....	82
Figura 28 – O tratamento tópico com DMSO e o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> após sete dias de aplicações diminuiu o infiltrado inflamatório e aumentaram o número de células fibroblásticas qualitativamente.....	84
Figura 29 – O tratamento tópico com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> após 28 dias, epitelizou todos os animais do grupo TOX e TOY.....	86
Figura 30 – Após 28 dias de tratamento tópico com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> , os animais dos grupos TOX e TOY não apresentavam mais crostas. ...	87
Figura 31 – Após 28 dias de tratamento tópico com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> , todos os animais dos grupos TOX e TOY apresentavam completa epitelização.....	88
Figura 32 – A aplicação tópica do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> diminuiu o infiltrado inflamatório dos grupos TOX e TOY após um dia de tratamento.....	90
Figura 33 – A aplicação tópica do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> diminuiu o infiltrado inflamatório dos grupos DMSO, TOX e TOY após cinco dias de tratamento.....	91
Figura 34 – A aplicação tópica do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> diminuiu o infiltrado inflamatório dos grupos DMSO, TOX e TOY após sete dias de tratamento.....	92
Figura 35 – A aplicação tópica do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> não altera o número de mastócitos nos tempos de 1, 5 e 7 dias.....	94

Figura 36 – A aplicação tópica do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> altera o número de mastócitos no tempo de 28 dias.....	95
Figura 37 – A aplicação tópica do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> não altera o número de novos vasos nos tempos de 5 e 7 dias.	97
Figura 38 – Deposição das fibras colágenas nos grupos TOX e TOY, após 28 dias de tratamento, apresentam fibras mais espessas.	99
Figura 39 – Imunomarcacão com o anticorpo F480, nas feridas excisionais, no tempo de um dia.	100
Figura 40 – A aplicação tópica do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> não altera o peso do fígado dos animais em contato com a substância em pesquisada	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Scores morfológicos das crostas em cortes histológicos de lesões excisionais coradas com HE.	61
Tabela 2 – Scores morfológicos da formação do novo epitélio em cortes histológicos de lesões excisionais coradas com HE	61
Tabela 3 – Rendimento do óleo essencial das folhas de <i>A. conyzoides</i>	67
Tabela 4 – Composição química do óleo essencial das folhas de <i>A. conyzoides</i>	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Uso de plantas medicinais: da antiguidade aos dias atuais.....	22
1.2 <i>A. conyzoides</i> : uso popular e alguns estudos científicos.....	25
1.3 A pele: breve estudo sobre sua morfologia e funções	28
1.3.1 A epiderme	28
1.3.2 A derme	30
1.4 CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS	32
1.4.1 A fase inflamatória.....	33
1.4.2 A fase Proliferativa.....	36
1.4.3 A fase do remodelamento.....	39
1.4.4 Implicações no tratamento de feridas cutâneas	41
1.4.5 Compostos Naturais: uma solução para melhorar a cicatrização de feridas.....	43
2. JUSTIFICATIVA	45
3. OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos Específicos.....	47
4. METODOLOGIA	49
4.1 Identificação do <i>A. conyzoides</i> e confecção da exalcata	49
4.2 Obtenção do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	49
4.3 Caracterização do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	50
4.4 Animais	51
4.5 Distribuição dos animais.....	52
4.6 Confecção da lesão excisional	53
4.7 Tratamento.....	56

4.8 Avaliação macroscópica das lesões excisionais	58
4.9 Avaliação macroscópica dos fígados.....	59
4.10 Coleta e processamento das amostras de pele e fígado	60
4.11 Análise morfológica por escore da reepitelização e das crostas	60
4.12 Avaliação histopatológica das amostras de pele e fígado	62
4.13 Avaliação morfométrica dos leucócitos, mastócitos e dos vasos sanguíneos nas lesões excisionais tratadas com óleo essencial de <i>A.</i> <i>conyzoides</i>	62
4.14 Avaliação da deposição de colágeno nas lesões excisionais tratadas com óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	64
4.15 Avaliação imuno-histoquímica dos macrófagos nas lesões excisionais tratadas com óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	65
4.16 Análise estatística.....	66
5. RESULTADOS.....	67
PARTE I – RESULTADOS DA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	67
5.1 Rendimento do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	67
5.2 Análise dos constituintes do óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	67
PARTE II – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA LESÃO EXCISIONAL	72
5.3 Avaliação macroscópica qualitativa das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	72
5.4 Avaliação da área das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	73
5.5 Taxa de fechamento das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	73
PARTE III – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DA LESÃO EXCISIONAL	77

5.6 Avaliação histopatológica qualitativa das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	77
5.6.1 A avaliação histopatológica qualitativa das lesões excisionais após um dia de tratamento com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> revelou um menor infiltrado inflamatório no grupo TOX.....	77
5.6.2 Avaliação histopatológica qualitativa das lesões excisionais após 5 dias de tratamento com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> revela um atraso na deposição do tecido de granulação nos grupos TOX e TOY	80
5.6.3 Avaliação histopatológica qualitativa das lesões excisionais após 7 dias de tratamento com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> revela uma diminuição do padrão inflamatório e aumento dos neovasos em todos os grupos	83
5.6.4 Avaliação histopatológica qualitativa das lesões excisionais após 28 dias de tratamento com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> mostrou completa reepitelização nos animais do grupo TOX e TOY	85
5.7 Avaliação da reepitelização e da crosta das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	87
5.8 Avaliação morfométrica dos leucócitos das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	88
5.9 Avaliação morfométrica dos mastócitos das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> revela um aumento no número dessas células após 28 dias de tratamento nos grupos TOX e TOY	93
5.10 Avaliação morfométrica dos vasos sanguíneos das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i> nos tempos de 5 e 7	96
5.11 Avaliação da deposição das fibras colágenas das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	98
5.12 Avaliação Imuno-histoquímica dos macrófagos na lesão excisional nos animais tratados com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	100
5.13 Avaliação macroscópica e histopatológica dos fígados dos animais tratados com o óleo essencial de <i>A. conyzoides</i>	101
6. DISCUSSÃO.....	103
6.1 Extração e caracterização do óleo essencial	103

6.2 Avaliação macroscópica da lesão excisional	105
6.3 Constituintes do <i>A. conyzoides</i> e sua relação com as células Inflamatórias e a cicatrização	106
6.4 Principais leucócitos envolvidos na cicatrização.....	107
6.5 Papel dos mastócitos envolvidos na cicatrização de feridas.....	108
6.6 A formação de novos vasos sanguíneos	110
6.7 Deposição do colágeno e formação da cicatriz.....	110
6.8 Fibroblastos e macrófagos	111
6.9 Escolha do DMSO como agente solubilizante do óleo essencial de <i>A.</i> <i>conyzoides</i> e seu uso no processo de cicatrização de feridas.....	112
7. CONCLUSÃO.....	113
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	114
REFERÊNCIAS.....	115

1. INTRODUÇÃO

1.1 Uso de plantas medicinais: da antiguidade aos dias atuais

A humanidade, no transcorrer de sua história, sempre utilizou da natureza, mais precisamente do Reino Vegetal, a seu favor (FIRMO *et al.*, 2011) o que faz o consumo das ervas medicinais ser tão antigo quanto a humanidade (STURBELLE *et al.*, 2010; LEITE *et al.*, 2020). As plantas são, desde então, empregadas para curar diversas enfermidades (FIRMO *et al.*, 2011). Ao longo de toda essa história, a base dos medicamentos sempre foram os produtos naturais (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2019).

Inicialmente a prática curativa por meio das ervas medicinais era empírica e inspirada na observação de outros animais. Vários animais possuem o hábito de consumir plantas diante das diversas patologias enfrentadas. Ao observar esse hábito, os primeiros hominídeos começaram a sistematizar o uso de plantas medicinais (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Atualmente, uma planta é considerada como medicinal, quando possui efeitos farmacológicos comprovados, pois nela encontram-se compostos químicos, aos quais muitas vezes, não se sabe quais deles, estão atuando frente determinada enfermidade (STURBELLE *et al.*, 2010). O sinergismo entre os componentes químicos produzidos pelo vegetal, constituem o fundamento essencial, para a compreensão da ação terapêutica das plantas medicinais nos sistemas biológicos (CASANOVA e COSTA, 2017).

Dessa forma, o homem tem interagido com o meio ambiente em que vive a fim de modificá-lo e acumular saberes. Desde que começou a fazer uso de plantas medicinais, o homem tem feito empiricamente experimentações, a fim de aumentar seu conhecimento sobre esse recurso (VIEIRA *et al.*, 2021). Todavia, torna-se necessário garantir a segurança e a qualidade do uso das plantas medicinais para a população, como recurso terapêutico. Por isso, as pesquisas voltadas para o uso dessas ervas são fundamentais para validação dos saberes populares (ARGENTA *et al.*, 2011).

O Brasil é um país que possui uma grande variedade de espécies vegetais, muitas delas com propriedades medicinais (FLOR e BARBOSA, 2015). As populações tradicionais brasileiras, tais como povos indígenas, quilombolas, pescadores e

raizeiros apresentam grande conhecimento sobre as plantas medicinais e seus ambientes, o que os fazem empregá-las na medicina tradicional brasileira (CARMIGNAN *et al.*, 2020). Somado a isso, estudos etnofarmacológicos e etnobotânicos têm permitido investigar o uso dessas plantas nessas populações (VIEIRA *et al.*, 2021).

Na Conferência Internacional sobre Atenção Primária em Saúde, que ocorreu em Genebra no ano de 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS) alertou aos países participantes da necessidade de políticas públicas de promoção à saúde e da regulamentação da utilização de medicamentos tradicionais. Sabe-se que muitos países e seus povos ainda dependem da medicina tradicional na atenção básica à saúde (BRASIL, 2016).

Dessa forma, em 2006, foi aprovado pelo Ministério da Saúde Brasileiro o decreto Federal número 5.813 que institui a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, sendo esta uma estratégia essencial de políticas públicas para o uso das ervas medicinais. A partir disso, o cultivo e o uso de plantas medicinais tornou-se mais seguro, aumentando o conhecimento sobre plantas, permitindo que em 2020 fossem incluídos medicamentos fitoterápicos na 10ª edição da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, mostrando a importância destes produtos terapêuticos (VIEIRA *et al.*, 2021). Outra portaria que garante o uso seguro de plantas medicinais e estende seu uso como direito da população é a número 971, de 03 de maio de 2006, que institui a fitoterapia dentro da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, PNPIC, no Sistema Único de Saúde Brasileiro (BRASIL, 2019).

O Brasil detém cerca de 15% da biodiversidade do mundo. Esse rico patrimônio biológico e sua diversidade cultural, faz o país se firmar soberano no uso de plantas medicinais, de forma sustentável e ética, respeitando os recursos naturais e os compromissos firmados internacionalmente. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos visa então garantir à população brasileira, acesso às plantas medicinais e fitoterápicos de forma segura, com sua qualidade e eficiência comprovadas (BRASIL, 2016). Pesquisas evidenciam o aumento do uso de medicamentos à base de plantas na rede básica de atenção à saúde (CACCIA-BAVA, *et al.*, 2017). A partir daí, existem municípios que destinam recursos para implementação de políticas, a fim de oferecerem tratamentos à base de plantas medicinais e fitoterápicos. Em alguns municípios do Brasil, a fitoterapia se apresenta como uma opção terapêutica para os prescritores. Em alguns casos, chega a ser a

única opção para o tratamento das doenças (BRANDÃO, 2023). Somado a isso, vários cursos da área da saúde apresentam a fitoterapia em suas grades curriculares, contribuindo com a disseminação de informações verídicas, científicas e confiáveis sobre o uso desses recursos naturais (FIGUEREDO, GURGEL e JUNIOR, 2014).

O uso de plantas medicinais tem aumentado e as pesquisas apontam que essa utilização ocorre por indicação de amigos e familiares (COLET *et al.*, 2015), corroborando que a maior parte da transmissão de conhecimentos sobre o seu uso é o saber popular (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Dessa forma, pesquisas com ervas medicinais vêm sendo realizadas intensamente nos últimos tempos para tratamento de diversas enfermidades e problemas relacionados à saúde como: obesidade (LAW *et al.*, 2022); colite (LI *et al.*, 2022); envenenamentos (RAEESZADEH *et al.*, 2022); diabetes (ISMAIL *et al.*, 2022; TEHSEEN *et al.*, 2022); inflamação (DANNA *et al.*, 2022); arritmias (KABOUA *et al.*, 2021; JUNIOR *et al.*, 2022); neoplasias (NILASH, JAHANBANI, JOLEHAR, 2023); infecções (TABESH *et al.*, 2022); diarreias (AYALEW *et al.*, 2022); depressão (SHARMA *et al.*, 2022); ansiedade (OLIVEIRA *et al.*, 2021); COVID-19 (HEPPY *et al.*, 2023) e dor (AYANAW, YESUF, BIRRU, 2023). Esses artigos corroboram com a ideia de que as plantas medicinais têm um potencial terapêutico desconhecido. Tal potencial vem sendo descoberto progressivamente através dos estudos científicos (PEDROSO, ANDRADE, REGINA, 2021).

Pesquisas também revelam que muitas plantas não tiveram sua qualidade, eficácia e segurança testadas. Apenas uma pequena parte de um total de 300.000 espécies de plantas superiores que ocorrem no mundo foram testadas em estudos farmacológicos e fitoquímicos (NEWMAN e CRAGG, 2016). Soma-se a isso que muitas espécies que são largamente utilizadas pela população ainda não fazem parte da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, da Farmacopeia Brasileira ou precisam ser mais estudadas, entre elas temos o *A. conyzoides*. 1.2 *A. conyzoides*: uso popular e alguns estudos científicos

A família Asteraceae compreende inúmeras espécies, entre elas temos a espécie *A. conyzoides* (Figura 01), sendo encontrada em diferentes continentes, como América, África e Ásia (SANTOS *et al.*, 2016). No Brasil, é encontrada na maioria dos estados (ROSÁRIO *et al.*, 2021), sendo popularmente conhecida como erva de São João, mentrasto (MAIA e ARAÚJO, 2016), picão branco, Maria-preta, picão roxo, erva de São José e erva de Santa Lúcia (BOSI *et al.*, 2013). Seu nome origina-se da palavra de origem grega a *gera*, que significa longevidade ou não envelhece e *konyz*, também

de origem grega, trata-se de uma denominação da espécie *Inula helenium* a qual o *A. conyzoides* se assemelha (OKUNADE, 2002).

A sua ampla distribuição e boa adaptação em diferentes climas, permite que o *A. conyzoides* seja utilizado em diferentes regiões. Popularmente ela é utilizada para tratar a dor (OLIVEIRA *et al.*, 2022), problemas estomacais, ginecológicos, artrose, pneumonia, diarreia, febre, hemorragias e feridas de pele (OKUNADE, 2002; KAMBOJ e SALUJA, 2008). No Brasil, o uso mais comum dessa erva é na forma de chá, sendo utilizado como anti-inflamatório, analgésico e no alívio de cólicas menstruais e intestinais (OKUNADE, 2002; LORENZI e MATOS, 2012). É descrito na literatura que o suco de suas folhas é tradicionalmente aplicado externamente em cortes e feridas recentes no olho (DAS, DUTTA e SHARMA, 2008).



Figura 1 - *A. conyzoides*. Família Asteraceae. Nome popular: erva de São João. Fonte: RABELLO, 2021.

A. conyzoides é uma planta herbácea anual e que atinge em média um metro de altura. Os caules são cobertos por pêlos brancos e as folhas apresentam-se ásperas, opostas e longo-pecioladas (CABRERA e KLEIN, 1989; SANTOS *et al.*, 2016). O caule é verde, porém nas plantas mais velhas pode obter a coloração marrom. Na sua porção terminal, apresentam inflorescência lilás ou branca, do tipo

capítulo conforme visto na figura 01 (SANTOS *et al.*, 2016). É encontrada em pastos, terrenos baldios e em zonas rurais (CABRERA e KLEIN, 1989).

Muitos trabalhos científicos demonstram seus diferentes efeitos, dentre eles o de ROSÁRIO *et al.*, (2021) onde “já se mostrou eficaz contra *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Shigella flexner*”. Também são relatadas propriedades anti-inflamatória, antiparasitária, antifúngica (SANTOS *et al.*, 2016), analgésica, antitumoral, relaxante muscular (MAIA e ARAÚJO, 2016), ação vasoconstritora, cicatrizante em queimaduras, para diarreia, flatulência, cólicas e reumatismo agudo (MOMENSSO, MOURA e CONSTANTINO, 2009). De acordo com Santos *et al.* (2016), as principais atividades descritas na literatura para o óleo essencial “é o inseticida, mas também se apresenta alelopático e atividades antifúngicas”. Os alcaloides de pirrolizidina, encontrados no *A. conyzoides* isolados no Quênia, possuem atividade hepatotóxica, causando necrose hepática em animais, porém esse evento é raro em seres humanos (BOSI *et al.*, 2013). A literatura também já descreveu que compostos do metabolismo secundário desse vegetal como os: flavonoides, quinolonas, compostos fenólicos, terpenos, monoterpênicos e sesquiterpenos; tem atividade antimicrobiana (ROSÁRIO *et al.*, 2021).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário de algumas plantas. Possuem baixo peso molecular (ROWAN, 2011), porém são misturas complexas de substâncias voláteis e aromáticas. São produzidos e armazenados por quase todas as estruturas dos vegetais (WU, LUO e WANG, 2012). O consumidor tem buscado os óleos essenciais no mercado de plantas medicinais, condimentares e aromáticas, devido às suas mais diversas aplicabilidades. Eles podem ser usados como flavorizantes na indústria de alimentos e medicamentos, como essências para perfumes, na culinária e como terapia (SHADY, NAIR e CRANNELL, 2019).

Os principais componentes dos óleos essenciais relatados na literatura científica são o precoceno I e o precoceno II (OKUNADE, 2002). Estudos relatam o uso do óleo essencial de *A. conyzoides* em algumas infecções como: anti *Schistosoma mansoni* (MELO *et al.*, 2011), antitrofozoítos de *Giardia duodenalis* (PINTONG *et al.*, 2020) e pediculose (SHAILAJAN *et al.*, 2013). As propriedades anti-inflamatórias e antitumoral foram relatadas no estudo de Bayala e colaboradores (2014). Perantoni *et al.*, (2020) demonstraram o efeito do óleo essencial na contratilidade da musculatura lisa. Já outros estudos se concentram na sua atividade

inseticida (JAYA *et al.*, 2014) e como repelentes de insetos (HAZARAKITA *et al.*, 2012).

Em relação, ao efeito de *A. Conyzoides* sobre a cicatrização de feridas, Arulprakash *et al.*, (2012) utilizaram extrato etanólico de *A. conyzoides* para avaliação da cicatrização de feridas em ratos e observaram um aumento da proliferação celular de queratinócitos e síntese de colágeno. Oladejo *et al.*, (2013) observaram as propriedades cicatrizantes do extrato metanólico das folhas de *A. conyzoides* e constataram que a erva induz a contração da ferida. Sukmawan *et al.*, (2021) demonstraram que houve melhora na taxa de fechamento da lesão ao utilizar o *A. conyzoides* de flor roxa, em extrato etanólico, junto a outras ervas medicinais. Até onde foi possível pesquisar, não foram encontrados relatos e/ou estudos do uso do óleo essencial de *A. conyzoides* para tratamento das lesões cutâneas.

1.3 A pele: breve estudo sobre sua morfologia e funções

A pele separa o organismo do meio externo e é uma comunicação do organismo com o meio externo (MENDONÇA e RODRIGUES, 2011; FORTES e SUFFREDINI, 2014). Ela é imprescindível para manter a homeostase do ambiente interno do corpo humano, além de funcionar como uma excelente barreira de proteção contra agentes externos (RAMOS *et al.*, 2021). Essa proteção é exercida por algumas estruturas que compõe a pele como o estrato córneo, tecido conjuntivo, melanina e pelas células de Langerhans responsáveis pela resposta imune local. Além disso, a pele impede a perda de líquidos essenciais, participando da termorregulação corpórea (FORTES e SUFFREDINI, 2014) e contribui na síntese de vitamina D (EL-SHERBENI e NEGM, 2023).

Doze por cento do peso corpóreo corresponde ao peso seco dessa estrutura, sendo o maior sistema exposto ao meio ambiente e o maior órgão do corpo humano. Embriologicamente, tem origem na ectoderme e mesoderme, arranjando-se, posteriormente, em duas camadas distintas: epiderme e derme. Logo abaixo se encontra a hipoderme (FORTES e SUFFREDINI, 2014).

1.3.1 A epiderme

A epiderme é um tecido epitelial de revestimento, queratinizado e estratificado, que ao depender do sítio anatômico apresentará variações funcionais e estruturais. Na epiderme não se encontram vasos sanguíneos e sua nutrição ocorre a partir da derme adjacente, que é altamente vascularizada (MENDONÇA e RODRIGUES, 2011). Quase toda a epiderme é composta por queratinócitos, sendo as células mais abundantes dessa camada e responsáveis pela síntese de queratina. Os queratinócitos agrupam-se nas camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea (BARCAUI *et al.*, 2015).

A camada basal, localizada na epiderme mais profunda, apresenta os queratinócitos em constante diferenciação, originando as células das demais camadas da epiderme (MENDONÇA e RODRIGUES, 2011). A camada espinhosa também é formada em sua maior parte por queratinócitos ligeiramente achatados ou poligonais cuboides, com o núcleo centralizado. Essas células contêm pequenas expansões citoplasmáticas com tonofibrilas. Essas expansões se mantêm unidas a outras células através de estruturas de ligação intercelulares, os desmossomos, o que dá às células dessa camada um aspecto espinhoso. Na camada granulosa são observados grânulos no citoplasma dos queratinócitos. Trata-se da querato-hialina. Esses grânulos não são envolvidos por nenhum tipo de membrana a fim de contribuir nos filamentos de queratina que são encontrados na camada córnea. Abaixo do estrato córneo encontra-se a camada lúcida. Trata-se de uma camada de células achatadas, bem finas, na qual não se encontram mais núcleos e organelas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017). No estrato córneo encontram-se queratinócitos mortos e lipídios que funcionarão como uma barreira de proteção da pele contra a perda de líquidos e da agressão ao meio ambiente (FERNANDES *et al.*, 2023). A perda ou ganho hídrico do indivíduo se relaciona intimamente com a redução ou aumento do estrato córneo. Quanto maior essa camada na pele, mais dificilmente o organismo perderá ou ganhará líquidos. Quinze por cento desse estrato está relacionado ao Fator de Hidratação Natural (FHN), que são substâncias umectantes que mantêm a pele hidratada através da higroscopicidade (ADDOR e AOKI, 2010).

Em relação às células da epiderme, os queratinócitos também podem atuar produzindo citocinas pró-inflamatórias como: as interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-3 e IL-6, além de fatores de necrose tumoral, interferon- α , interferon- β e fatores transformadores de crescimento (BLUME-PEYTAVI, TAN e TENNSTEDT, 2016;

FERNANDES *et al.*, 2023). Em respostas a diferentes estresses, como a inflamação, essas citocinas produzidas pelos queratinócitos são liberadas, a fim de amplificar a resposta inflamatória (FERNANDES *et al.*, 2023)

Já os melanócitos, estão presentes e distribuídos em toda a extensão da camada basal da epiderme. Produzem a melanina, pigmento responsável por dar cor à pele, olhos e cabelos (THAWABTEH *et al.*, 2023; FERNANDES *et al.*, 2023). Os melanócitos, por terem capacidade de absorver luz, funcionam também como filtro contra as radiações solares (MIOT *et al.*, 2009). Essas células estão também distribuídas por várias áreas da pele e do corpo e de acordo com a região anatômica podem conferir colorações diferentes (TAKANO e LIMA, 2010).

Os macrófagos que residem na epiderme são chamados de células de Langerhans (FERNANDES *et al.*, 2023). Elas apresentam função imunológica, sendo responsáveis pelo processamento e apresentação de antígenos aos T presentes na derme (KOSTER e ROOP, 2004; KRUEGER e BOWCOCK, 2004). Essas células quando entram em contato com o antígeno, regulam negativamente a secreção de e-caderina, migrando para a derme (FERNANDES *et al.*, 2023).

Também encontram-se na epiderme as células de Merkel que são responsáveis pela percepção de estímulos sensoriais (EL-SHERBENI e NEGM, 2023). Quando a epiderme se encontra com a derme, através de um formato ondulado, conhecido por papilas dérmicas, aumenta a superfície de contato entre as duas camadas, favorecendo a comunicação entre elas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

1.3.2 A derme

Logo abaixo da epiderme se encontra a derme, estando conectada com os músculos por meio da hipoderme. Nessa camada encontram-se os anexos da pele, que são: os folículos pilosos e pilosebáceos; e as glândulas sebáceas e sudoríparas (MENDONÇA e RODRIGUES, 2011). Por se tratar de um tecido conjuntivo próprio, a derme apresenta uma rica matriz extracelular com uma enorme variedade de células. Nesta matriz são encontradas as fibras colágenas e elásticas, e a substância fundamental amorfa, que conferem à pele elasticidade, resistência e viscosidade.

Protegem a pele contra a “força de cisalhamento, compressão e capacidade de moldagem” (FORTES e SUFFREDINI, p.96, 2014). Os principais componentes celulares da derme são os macrófagos, mastócitos, células dendríticas e fibroblastos (BARCAUI *et al.*, 2014). Na derme também se encontram os vasos sanguíneos responsáveis pela nutrição da pele e pela migração de células inflamatórias, como os neutrófilos e os linfócitos, responsáveis pela proteção do organismo em casos de infecções e lesões (WELSS, BASKETTER e SCHRODER, 2004; RYAN, 2004).

Em relação às células da derme, os macrófagos presentes nessa camada, tem distintas funções como ajudar na recomposição da homeostase e no reparo tecidual promovendo a fagocitose de restos celulares e corpos estranhos (FERNANDES *et al.*, 2023). Já os mastócitos são células do tecido conjuntivo e tendem a ajudar o organismo em suas respostas imunológicas. São responsáveis pelo início da resposta inflamatória e por sua cronicidade, além de estarem envolvidas em reações de hipersensibilidade (BARRETO *et al.*, 2013). Os fibroblastos são células que participam ativamente da produção das fibras de colágeno encontradas na derme. Tais células também sintetizam também a elastina, que é outra fibra menos abundante da derme, bem como proteínas como as proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas a fim de constituírem a matriz extracelular (ECM). O fibrócito é o fibroblasto inativo. Quando exposto a estímulos como os que ocorrem na cicatrização de feridas, mudam a sua morfologia e passam a secretar as fibras colágenas e elásticas (ABBAS *et al.*, 2019).

A derme é dividida em derme reticular e papilar. Na derme papilar, as fibras colágenas são mais finas e delicadas, ao passo que na derme reticular, observam-se feixes mais espessos de fibras colágenas (MENDONÇA e RODRIGUES, 2011; BARCAUI, *et al.*, 2014). O colágeno trata-se de uma proteína fibrosa, grande, rígida e alongada. Estruturalmente tem o formato de uma tripla hélice. Tal formato é conferido ao colágeno pela glicina e prolina (CHAMPE, 2010). A principal função do colágeno na pele humana é conferir resistência e elasticidade. Também ajuda na fixação das células do tecido conjuntivo na matriz extracelular, sendo de extrema importância no processo de cicatrização de feridas (CAMPOS, BORGES-BRANCO e GROTH, 2007). O colágeno tipo I é mais comum em tecidos resistentes como os ossos e tendões. Já o colágeno tipo III é mais comum em tecidos moles como a derme (ROBSON, STEED e FRANZ, 2001).

Abaixo da derme encontra uma camada chamada de hipoderme ou como alguns autores a apresentam: tela subcutânea. Nela encontram-se os adipócitos, que são as células responsáveis por várias funções, como reserva energética do ser humano, proteção contra choques mecânicos, formação de uma manta térmica e modelagem da superfície do corpo (BERNADO, SANTOS e SILVA, 2019). Alguns mediadores químicos são produzidos nessa camada como: mediadores de crescimento e adipocinas (FERNANDES *et al.*, 2023), que são proteínas sintetizadas pelo tecido adiposo como o fator de crescimento (PRADO *et al.*, 2009).

1.4 CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS

Quando ocorre a perda fisiológica e anatômica da continuidade da pele têm-se uma ferida (HERMAN e BORDONI, 2023). Os traumas de pele podem ser acidentais ou cirúrgicos e após esses, os fatores relacionados a reparação tecidual são ativados (TRINDADE *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2020). Esses traumas são responsáveis por uma alta taxa de morbidade impactando diretamente na saúde pública. Soma-se a isso, o grande número de brasileiros com feridas complexas, incapazes, por muitas vezes, de realizarem atividades rotineiras e por possuírem dificuldade ao acesso de medicamentos para cicatrização de feridas, o que pode levar a sérias complicações (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2019).

Em organismos superiores, como é o caso do ser humano, o reparo de tecidos poderá ocorrer de duas formas distintas: pela regeneração, com o retorno da atividade funcional do tecido e; pela cicatrização, onde a homeostasia do tecido é recomposta, porém há perda da funcionalidade tecidual, com formação de um tecido conjuntivo próprio fibroso, rico em fibras colágenas (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005) densas e compactadas (SORG *et al.*, 2017).

Há muitos anos, pesquisadores têm como alvo de seus estudos os processos de cicatrização de feridas (TRINDADE *et al.*, 2015). Ele consiste em um processo multifatorial e complexo (BEHEREGARAY *et al.*, 2017), com uma cascata de eventos celulares, bioquímicos e moleculares, coordenados perfeitamente, (RODRIGUES *et al.*, 2017) para o restabelecimento estrutural da área lesada (LEITE *et al.*, 2020), substituindo as estruturas danificadas e disfuncionais (TRINH *et al.*, 2022). Essa

cascata de eventos ocorre de forma sobreposta uma à outra (CAPELLA *et al.*, 2016). Foi inicialmente Clark que em 1993 dividiu o reparo tecidual em três etapas: “inflamação, formação do tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e remodelamento” (BALBINO, PEREIRA e CURI, p. 28, 2005). Já outros autores, para melhor compreensão, dividem esse processo em quatro fases: homeostasia, inflamação, proliferação e remodelamento (BEHEREGARAY *et al.*, 2017; RAMOS *et al.*, 2021).

1.4.1 A fase inflamatória

A maioria das lesões levam a ruptura de vasos sanguíneos e alterações nas junções de células endoteliais (HERMAN e BORDONI, 2023). Os processos se iniciam com o tamponamento dos vasos, sendo a vasoconstrição a primeira resposta (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005). Os vasos sanguíneos respondem a desgranulação dos mastócitos residentes a fim de que ocorra a contração dos vasos, evitando assim maiores perdas de sangue (MEDZHITOV, 2008).

Segue-se a deposição e o recrutamento de plaquetas. Um agregado plaquetário se forma, ocorrendo a ativação da cascata de coagulação, com formação da fibrina (QUARESMA, 2019). As plaquetas ativadas liberam quimiocinas, proteínas (como o fibrinogênio, tromboplastina e fibronectina) e fatores de crescimento (PDGF e TGF-beta) a fim de se difundir pela matriz provisória, orientando a migração de células e a instauração da resposta inflamatória (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005). A formação desse tampão hemostático é importante pois ele agirá também como uma matriz temporária e um arcabouço permitindo a migração de células para o tecido lesionado (BEANES *et al.*, 2003; QUARESMA 2019; TRINH *et al.*, 2022).

Esses mediadores químicos produzidos pelas plaquetas agem no endotélio dos vasos sanguíneos a fim de aumentarem a permeabilidade celular e recrutarem mais células inflamatórias. Essas células são chamadas de efetoras e compreendem basicamente os neutrófilos, os monócitos e os linfócitos. Aos poucos, elas chegam ao local das lesões, atraídas por essas quimiocinas (MEDZHITOV, 2010). Dessa forma, muitas células com propriedades inflamatórias como os neutrófilos e macrófagos

chegam até o local da lesão a fim provocar e iniciar a fase inflamatória (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Inicia-se então o processo inflamatório com a infiltração maciça de neutrófilos (CAPELLA *et al.*, 2016), que migram até a superfície da ferida para formar uma barreira de proteção contra possíveis patógenos ou partículas estranhas (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005; NGUYEN e SOULIKA, 2019). Os neutrófilos são atraídos inicialmente por mediadores solúveis como as quimiocinas (CXCL2/MIP-2, CXCL1/KC e CCL2/MCP-1) e pelas citocinas e interleucinas (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) a fim de realizarem fagocitose e eliminarem os agentes estranhos ao organismo, como os micro-organismos. Atuam também eliminando os restos celulares da lesão (BEANES *et al.*, 2003). Além de realizarem fagocitose, os neutrófilos no leito da ferida irão também secretar algumas proteases (como a elastase, proteinase 3 e catepsina G) para ajudar na eliminação das bactérias da lesão e remoção dos restos celulares. Essas células também liberam mediadores químicos como as interleucinas IL-1 e IL-6 e o TNF- α que vão ajudar na amplificação da resposta inflamatória. Com isso a IL-8 e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) são estimulados a responder o reparo de cicatrização de lesões cutâneas (EMING, KRIEG e DAVIDSON, 2007).

Logo após a essas etapas iniciais da lesão cutânea, entram em cena os macrófagos com fenótipo M1 (PERDIGUERO *et al.*, 2012). Esses, são induzidos por IFN- γ e lipossacarídeos (FERNANDES *et al.*, 2023). São pró-inflamatórios com papel ativo na primeira fase do processo de cicatrização de feridas cutâneas (PERDIGUERO *et al.*, 2012). Após a migração de macrófagos para a área da lesão, estas células passam a secretar citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, auxiliando os neutrófilos na fagocitose dos restos celulares de possíveis micro-organismos (SANTOS *et al.*, 2020). Os mediadores pró inflamatórios liberados pelos M1 são: IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, TNF α e cicloxigenase-2 (COX2) (PAULEAU *et al.*, 2004). Nos primeiros dias após a lesão, caso o estímulo para atrair neutrófilos cesse, essas células sofrem apoptose, iniciando a resolução do processo inflamatório agudo. Os macrófagos fagocitam os restos de neutrófilos (EMING, KRIEG e DAVIDSON, 2007) e passam a produzir mediadores como fatores de crescimento, citocinas, colagenases e metaloproteases a fim de ajudar no remodelamento da matriz, influenciando assim na fase seguinte (MEDZHITOV, 2010).

Os macrófagos são células extremamente importantes para a mudança de um padrão pró-inflamatório para o anti-inflamatório. Dependendo do seu fenótipo induzem

a melhora do processo de cicatrização (PERDIGUERO *et al.*, 2012). Os macrófagos de fenótipo M2 são induzidos por IL-4, IL-10 e IL-13 (FERNANDES *et al.*, 2023). O fenótipo M2 dessas células, induzem a atividade anti-inflamatória (PAULEAU *at al.*, 2004) e exibem propriedades na reparação de tecidos. Eles atuam como potentes agentes fagocitários, eliminam detritos e restos celulares do leito da ferida a fim de promoverem um melhor resultado na cicatrização. Quando ocorre alguma falha no processo de cicatrização de feridas, não será possível ocorrer a transição do fenótipo do macrófago de M1 para M2, com isso, todo o processo cicatricial será prejudicado (FERNANDES *et al.*, 2023). Estudos corroboram que a ausência dessas células na fase inflamatória ou proliferativa, resultam na má formação do tecido e falha na fase seguinte (LUCAS *et al.*, 2010).

Sabe-se que essas diferentes células do sistema imune, como macrófagos e neutrófilos, residem ou são recrutadas para a pele a fim de manterem a integridade e homeostase desse órgão principalmente durante os processos inflamatórios (KABASHIMA *et al.*, 2019; NGUYEN e SOULIKA, 2019). Nessa fase os sintomas clínicos clássicos e característicos da inflamação como a dor, rubor e edema, são encontrados (TRINH *et al.*, 2022). Na figura 02 encontram-se os principais eventos químicos, vasculares e celulares ocorridos durante a fase inflamatória.

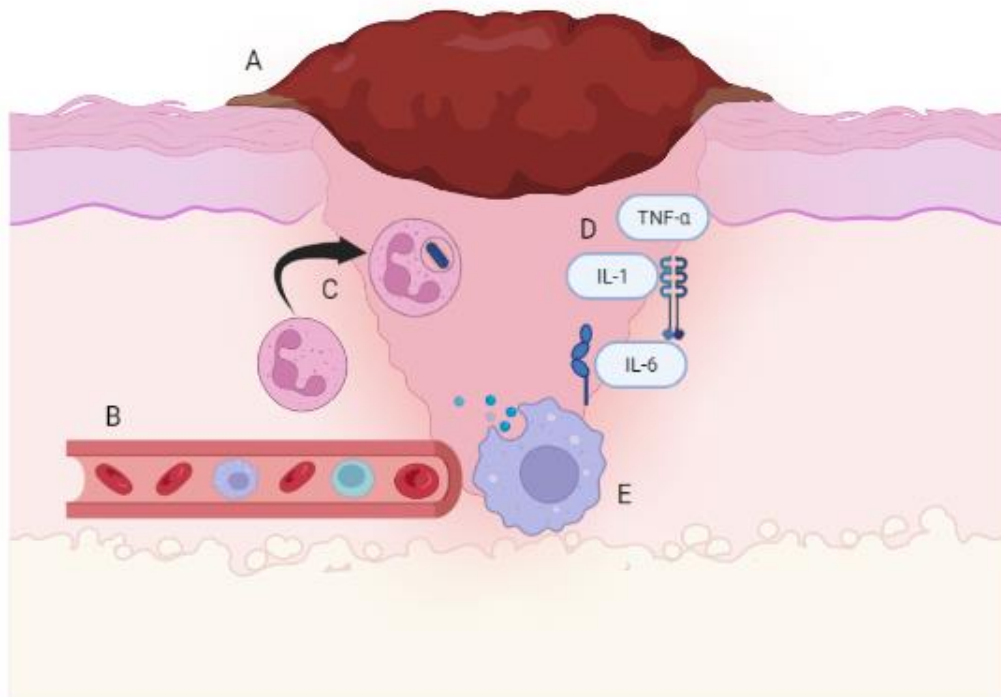


Figura 2 - Fenômenos químicos, vasculares e celulares da fase inflamatória da cicatrização. Em A, formação de um coágulo sanguíneo na área lesionada para o controle da hemorragia, assegurando a homeostasia e para dar início ao processo de reparo do tecido. Um agregado plaquetário se forma e ocorre a ativação da cascata de coagulação, com formação da fibrina. As plaquetas ativadas liberam quimiocinas, proteínas (como o fibrinogênio, tromboplastina e fibronectina) e fatores de crescimento (PDGF e TGF-beta) a fim de se difundirem pela matriz provisória, orientando a migração de células e a instauração da resposta inflamatória. Em B, observa-se a vasodilatação. A lesão desencadeia a vasodilatação, permitindo que as células do sistema imunológico, nutrientes e oxigênio cheguem à área afetada. Em C, observa-se a migração leucocitária de neutrófilos, que são células que migram para a área lesionada para combaterem infecções e removerem detritos celulares. Em D, liberação de citocinas, como TNF- α , IL-1 e IL-6, que ajudam a modular a resposta inflamatória e o reparo do tecido. Em E, início da migração de macrófagos para a área da lesão, que passam a secretar citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, fagocitam os restos celulares e possíveis micro-organismos. Criado com BioRender.com.

1.4.2 A fase Proliferativa

Segue-se então, a fase proliferativa, com deposição da matriz extracelular. Com a migração de macrófagos, ocorre uma intensa ativação de fibroblastos. Esses componentes migram da margem da ferida, onde está o tecido saudável, para o centro

da ferida, levando a substituição da matriz extracelular por um tecido conjuntivo mais elástico e forte, a esse processo dá-se o nome de fibroplastia (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005). Nesse tecido, já se observa a presença de colágeno do Tipo III. Os queratinócitos também se proliferam em torno da ferida para promover a reepitelização (VELNAR, BAILEY e SMRKOL, 2009; BIELEFELD, AMINI-NIK e ALMAN, 2013; SILVA *et al.*, 2018) e dá-se o início da formação da língua epitelial (CANESSO *et al.*, 2014).

Os fibroblastos estão presentes na pele normal de forma adormecida e dispersa. Porém na matriz extracelular encontram-se abundantes e ativos. Eles secretam proteases e migram do tecido sadio até a lesão, alterando a sua morfologia. Os fibroblastos passam então a secretar MMPs (MMP-1, MMP-2 e MMP-9). Já na matriz extracelular, os fibroblastos têm função primordial de produzirem colágeno que serão utilizados na constituição dessa nova matriz (TRINH *et al.*, 2023).

Os fibroblastos da margem da ferida começam a se diferenciar em miofibroblastos, com capacidade retrátil (DARBY *et al.*, 2017). A fibroplastia é, portanto, o início da formação do tecido de granulação. Esse tecido é basicamente composto por fibroblastos, macrófagos e vasos recém-formados (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005). Devido a fibroplastia, as células do tecido de granulação começam a produzir com grande intensidade os componentes da nova matriz extracelular. Fibronectinas e ácido hialurônico são depositados pelos fibroblastos auxiliando na resistência e na movimentação das células ao longo do novo tecido formado. Com o passar dos processos, a concentração de ácido hialurônico reduz e os glicosaminoglicanos sulfatados e os proteoglicanos, presentes na matriz extracelular, aumentam suas concentrações, favorecendo a fixação de células endoteliais para diferenciação em fenótipos de células endoteliais mais maduras. Ao final dessa etapa, todo o leito da lesão/ferida está tomado por esse tecido de granulação (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005). A angiogênese que ocorre durante a fase proliferativa é importante para a nutrição dos fibroblastos que estão proliferando e produzindo o tecido de granulação (BEHEREGARAY, *et al.*, 2017).

Nas etapas iniciais do processo de cicatrização, dentro da fase da inflamação, a ferida encontra-se hipóxia, devido a perda da perfusão celular. Porém com o passar do tempo, e o início da angiogênese na fase de proliferação, a perfusão celular é restabelecida. A angiogênese é, portanto, uma fase crítica dentro da fase proliferativa. Através da formação de novos vasos, chegam até a esse novo tecido provisório

recém-formado, oxigênio e nutrientes. Isso contribui bastante para a proliferação de fibroblastos (DARBY *et al.*, 2017).

Os mastócitos são um tipo de células também comumente encontradas nos processos de cicatrização. São células residentes na pele normal. Porém, logo após uma lesão, se ativam e degranulam, aumentando seu número durante as etapas da cicatrização (CHESKO e WILGUS, 2022). Segundo Chesko e Wilgus, 2022, a falta de resultados mais robustos e de estudos mais consistentes em relação ao papel do mastócito na cicatrização de feridas, acarreta a dificuldade de um constructo de sua função nas etapas da cicatrização.

Das células do sistema imune, os linfócitos são as últimas a aparecerem no leito da ferida (SHORT, WANG e KESWANI, 2022). É notório que as células T cheguem de forma tardia aos processos inflamatórios, porém estudos têm relatado a presença dessas células nas primeiras 24 horas após a lesão (WANG *et al.*, 2019). Então, estudos compreendem que os linfócitos são recrutados na ferida desde a inflamação e persistem na ferida, mesmo que em níveis baixos, por semanas após a lesão (SHORT, WANG e KESWANI, 2022). Na figura 03 encontram-se os principais eventos químicos, vasculares e celulares ocorridos durante a fase proliferativa.

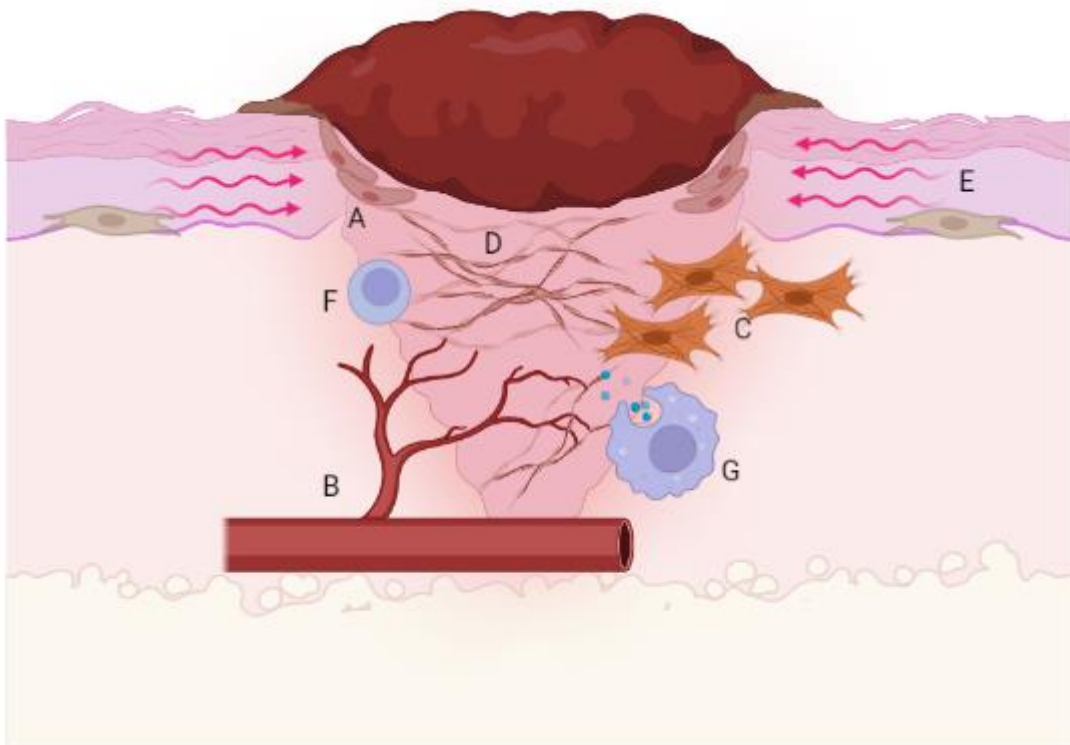


Figura 3 – Fenômenos químicos, vasculares e celulares da fase proliferativa da cicatrização. Em A, formação do tecido de granulação. Esse tecido vai preenchendo o espaço deixado pela lesão. O tecido é rico em fibras de colágeno, células endoteliais, fibroblastos e macrófagos. O tecido de granulação é importante porque serve como uma base para o crescimento de novos tecidos. Em E, os fibroblastos da margem da ferida começam a se diferenciar em miofibroblastos, com capacidade retrátil, ajudando no fechamento da ferida e na redução do tamanho da cicatriz final. Durante a fase proliferativa, os linfócitos, em F, estão presentes na ferida, contribuindo indiretamente para a cicatrização. Em G, os macrófagos removem detritos celulares e bactérias da ferida, além de liberarem fatores de crescimento que estimulam a proliferação de fibroblastos e angiogênese. Os macrófagos também ajudam a modular a resposta inflamatória, reduzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios e estimulando a produção de mediadores anti-inflamatórios, ajudando a promover a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa da cicatrização de feridas. Criado com BioRender.com.

1.4.3 A fase do remodelamento

A próxima fase é a remodelação, também chamada de maturação, onde ocorre a deposição de fibras colágenas de maneira ordenada (SANTOS *et al.*, 2020), com o surgimento das primeiras fibras de colágeno Tipo I. As células envolvidas nas etapas anteriores sofrem apoptose (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005) e ocorre a regressão da neo-vasculatura (XUE e JACKSON, 2015). O objetivo da fase da remodelação, que pode durar por mais de um ano pós-lesão, é tentar ao máximo restaurar a arquitetura

tecidual da pele por meio da formação de uma cicatriz (TRINH *et al.*, 2023). As metaloproteases da matriz (MMPs) são produzidas e secretadas durante a fase da remodelação, por macrófagos remanescentes da lesão. As MMPs têm atividade de se envolver na remodelação da MEC a fim de eliminar o excesso de colágeno que possa ser formado durante essa fase (TRINH *et al.*, 2023).

Não é totalmente interrompida a síntese da matriz extracelular. O que ocorre é uma diminuição dessa síntese e a medida que essa nova matriz é remodelada, os componentes sintetizados são modificados. As fibras elásticas, uma das principais fibras constituintes da matriz, reaparecem nessa etapa, a fim de conferirem elasticidade à pele (DARBY *et al.*, 2017).

Mesmo após o fechamento da ferida macroscopicamente, essa fase ainda persiste por um grande tempo, entendendo-se por meses. O tecido cicatricial torna-se mais compacto e menos celular. A produção de colágeno diminui e a organização das fibras de colágeno tornam-se mais ordenadas, ajudando a aumentar a resistência mecânica do tecido cicatricial (BEANES *et al.*, 2003).

Nas cicatrizes cutâneas não há regeneração dos apêndices da pele como os pêlos e glândulas. O padrão final das fibras colágenas presente na cicatriz são: fibras muito densas, compactadas e preenchendo todo o local da ferida, diferente do padrão reticular que é encontrado na parte da derme que não foi ferida (SORG *et al.*, 2017). Na figura 04 encontram-se os principais eventos químicos, vasculares e celulares ocorridos durante a fase do remodelamento.

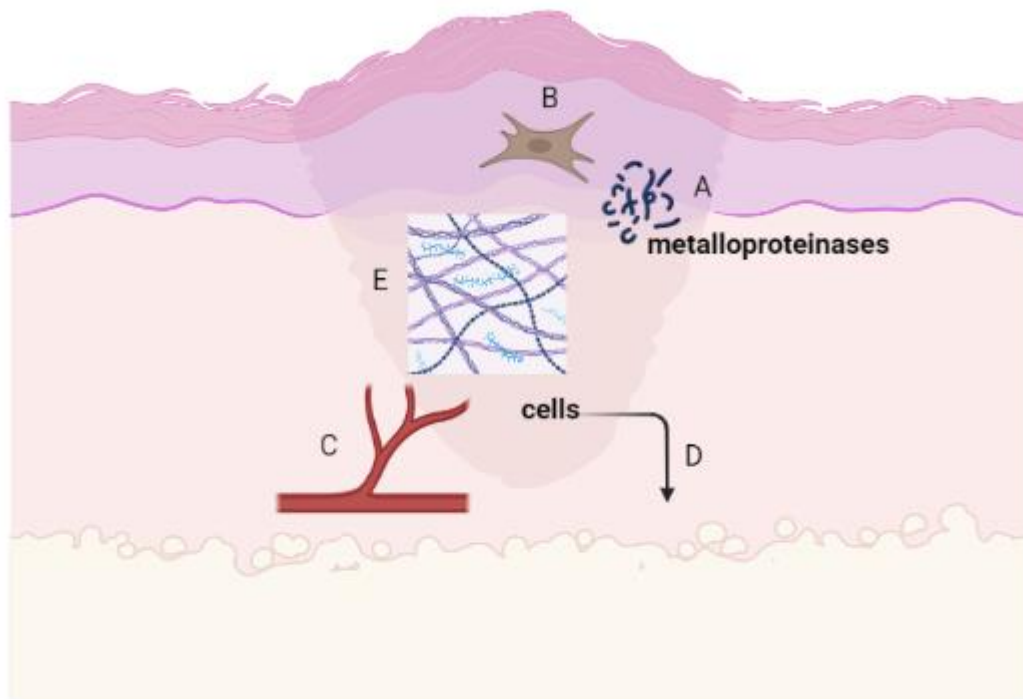


Figura 4 – Fenômenos químicos, vasculares e celulares da fase de remodelamento da cicatrização. Em A, enzimas degradantes, como as metaloproteinases de matriz (MMPs), são produzidas em maior quantidade, o que leva à reorganização da matriz extracelular. Em B, redução da atividade dos fibroblastos. Em C, os vasos sanguíneos formados durante a fase proliferativa começam a diminuir em número, enquanto também percebe-se a presença de um tecido rico em colágeno e proteoglicanos que ajuda a preencher o espaço formando a cicatriz. Essa fase também é conhecida por maturação. Ao longo do tempo, a quantidade de células na ferida diminui figura D, e o tecido cicatricial torna-se mais compacto e menos celular. A produção de colágeno diminui e a organização das fibras de colágeno se torna mais ordenada, o que ajuda a aumentar a resistência mecânica do tecido cicatricial. Em síntese, ocorre então a deposição de fibras colágenas – figura E, de maneira ordenada. As células envolvidas nas etapas anteriores sofrem apoptose. Criado com BioRender.com.

1.4.4 Implicações no tratamento de feridas cutâneas

Considera-se, para melhor compreensão, que feridas agudas são aquelas sem complicações e que seguem o processo de reparo dentro do tempo esperado (RAMOS *et al.*, 2020). As feridas cutâneas quando tratadas em sua fase aguda, tendem a diminuir os casos de sua cronificação, prevenindo a morbidade, além de reduzir os custos envolvidos com a terapia (BEHEREGARAY *et al.*, 2017). Já as feridas crônicas são aquelas em que o reparo não ocorreu no prazo previsto e o processo, por algum motivo, foi interrompido (RAMOS *et al.*, 2020).

Nem sempre as fases clássicas da cicatrização seguem os eventos que se esperam, podendo ser alteradas em diversas situações (TRINDADE *et al.*, 2015). Fala-se em cicatrização prejudicada ou feridas crônicas, quando há um problema em uma das três fases clássicas desse processo. É muito comum, em pacientes com doenças cardiovasculares e diabéticos, feridas que não cicatrizam. Isso se torna um desafio para a saúde pública pois muitos desses pacientes necessitam de hospitalização para tratamentos dessas lesões. O que se sabe é que feridas que não cicatrizam não saem da fase inflamatória (FERNANDES *et al.*, 2023).

Uma das causas para o aumento do tempo de cicatrização das feridas crônicas são as infecções bacterianas (ZHAO *et al.*, 2020). Sendo assim, poderá ocorrer a cronificação da lesão cutânea (TRINDADE, *et al.*, 2015). Essa cronificação leva a sérias complicações, principalmente em casos que o doente apresenta outras patologias como o diabetes (ZHAO *et al.*, 2020), o estado nutricional, a idade, doenças sistêmicas, (TAZIMA, VICENTE e MORIYA, 2008; LEITE *et al.*, 2020), o tabagismo e a obesidade (RAMOS *et al.*, 2020) que também podem dificultar o processo cicatricial (LEITE *et al.*, 2020).

Por isso, muitas vezes é necessário tratar a lesão, fornecendo condições mais adequadas, para favorecer o processo de cicatrização. Isso acarreta um aumento no investimento para desenvolvimento de técnicas, recursos e produtos, a fim de tratar as feridas cutâneas em humanos. Buscando produtos que ajam com segurança, para garantir o reparo tecidual de função e estrutura, o mais próximo possível da pele intacta e em um menor tempo possível de reepitelização (SANTOS *et al.*, 2020).

Existem na clínica médica vários protocolos que visam melhorar o processo de cicatrização, destacando-se a terapia celular, a oxigenoterapia hiperbárica, o desbridamento cirúrgico, o implante de enxertos e de biomateriais (RODRIGUES *et al.*, 2017) e tratamentos tópicos de feridas (CAPELLA *et al.*, 2016). Novos recursos para tratamento de feridas estão em andamento (CARMIGNANA *et al.*, 2020), neste cenário, surge o uso de óleos essenciais de plantas medicinais, com potencial farmacêutico para o reparo de feridas dérmicas (LEITE, *et al.*, 2020).

De maneira geral, fases prolongadas das etapas da cicatrização ou respostas excessivas do organismo, podem levar a diminuição da capacidade de cicatrização da pele. Por isso, torna-se necessário estudos que se dediquem à transição do estágio inflamatório para o estágio proliferativo (LANDÉN, LI e STAHL, 2016).

1.4.5 Compostos Naturais: uma solução para melhorar a cicatrização de feridas

Várias plantas já foram testadas quanto ao potencial cicatrizante com resultados positivos: *Peucedanum ostruthium* L. (DANNA, *et al.*, 2022); *Premna integrifolia* Linn (ALSAREIL, *et al.*, 2022); *Scrophularia striata* Boiss (BAGHERI, *et al.*, 2022); *Lawsonia inermis* (ELEBEEDY, *et al.*, 2022); *Launaea procumbens* (AHMED, *et al.*, 2022); *Zehneria scabra* (FISSEHA, *et al.*, 2022); *Jatropha neopauciflora* (HERNANDEZ, *et al.*, 2021); *Gliricidia sepium* (AULANNI'AM, *et al.*, 2021); *Urtica dioica* L. (KASOUNI, *et al.*, 2021); *Vernonia auriculifera* Hiern (LAMBEBBO, *et al.*, 2021); *Brucea antidysenterica*, *Dodonaea angustifolia* e *Rhamnus prinoides* (TESSEMA e MOLLA, 2021). Essas pesquisas mostram que as plantas medicinais são uma alternativa para a cicatrização de feridas (PIRIZ, *et al.*, 2014), destacando-se desde a antiguidade, por apresentarem principalmente alto poder anti-inflamatório, antioxidante e antibacteriano. Atualmente, esses e outros estudos experimentais, buscam respaldo científico para a segurança de seus usos (SANTOS *et al.*, 2020).

A cicatrização de feridas é um processo importante e crucial que envolve mecanismos que levam a eventos celulares e moleculares de forma integrada e coordenada (TRINH *et al.*, 2022). Nos últimos anos vários avanços têm sido alcançados no desenvolvimento de terapias que permitam processos cicatriciais com maior qualidade de reparo. Porém, abordagens mais seguras e eficientes continuam sendo um desafio constante (FIGUEIRA *et al.*, 2020). Somado a isso, os produtos naturais servem de protótipos para novos fármacos e já têm efeitos comprovados como agentes terapêuticos em processos inflamatórios (DING, JIANG, FANG, 2018). As substâncias de origem natural vêm sendo estudadas por muito tempo para a cura das enfermidades, pois são versáteis, seu uso geralmente é mais seguro, além de apresentarem um ótimo custo-benefício (KABASHIMA *et al.*, 2019).

Quando uma ferida não cicatriza ou tem seu tempo de cicatrização aumentado, os custos com a terapia tendem também a aumentar. Percebe-se além da diminuição da qualidade de vida desses pacientes, implicações de natureza social para as casas de saúde (CACIOPPO e HAWKLEY, 2003; YOUNG e MCNAUGH, 2011). Os produtos de origem natural têm se tornado uma alternativa para melhorar o processo de cicatrização de feridas reduzindo as cicatrizes. Durante milênios o ser humano tem utilizado as plantas medicinais para tratamento das lesões cutâneas. Estudos apontam o uso de diversas plantas medicinais como antioxidantes, anti-

inflamatórias e antimicrobianas nos processos de cicatrização. Um dos prováveis mecanismos de ação apontado por Criollo-Mendonza e colaboradores é que os fitoconstituintes presentes nas plantas podem aumentar a resposta das células imunes, eliminando os antígenos da ferida e conseqüentemente diminuindo a inflamação (CRIOLLO-MENDONZA, *et al.*, 2023).

Compostos naturais podem modular diversos aspectos relacionados a cicatrização de feridas. Estudos relatam compostos químicos produzidos pelas plantas, como os flavonoides, podem controlar a resposta inflamatória por reduzir o tempo gasto para uma completa cicatrização. Substâncias naturais também podem estimular processos como a angiogênese, melhorar o tecido de granulação e a reepitelização (AMCAPORA *et al.*, 2007). Estudos que relacionam feridas de pele tratadas com produtos naturais podem ser a direção a ser tomada a fim de melhorar a cicatrização (KABASHIMA *et al.*, 2019).

1.5 O fígado

O fígado é uma glândula anexa ao sistema digestivo, responsável, pela produção de bile e sua liberação para o tubo digestivo. Anatomicamente, é formado por dois lobos principais: o direito e o esquerdo. Além desses, outros lobos menores, como o quadrado e o caudado, também são visíveis em sua estrutura. Vários vasos nutrem esse órgão, dentre eles a artéria hepática e a veia porta, podem ser destacados como os principais, fazendo parte da formação do hilo hepático (SEELEY, STEPHENS e TATE, 2003).

Os hepatócitos são as células funcionais do fígado. Os lóbulos, são então, formados por essas células, formando as placas de hepatócitos. Entre essas placas, observa-se finos capilares: os capilares sinusóides hepáticos. O fígado tanto processa e sintetiza substâncias, bem como armazena. Também está envolvido, de maneira geral, em processos de desintoxicação e defesa do organismo. Dentre essas funções, destacam-se: a produção de bile, para emulsionar os lipídeos para serem melhores digeridos; armazenamento de glicose sob a forma de gliconeogênio; e no metabolismo

de lipídeos para obtenção de energia (SEELEY, STEPHENS e TATE, 2003; VAN, 2005).

A maioria dos fármacos são metabolizados nesse órgão. Poucos são os fármacos que passam inalterados pelo trato gastrointestinal. Esses fármacos são, na maioria das vezes metabolizados, para que haja produção de metabólitos mais polares, a fim de que sejam mais facilmente excretados (SCHONBORN e GWINNUTT, 2010).

O uso de tratamentos tópicos, visam maximizar ao máximo o efeito local de determinado fármaco, atingindo epiderme ou derme. Esses fármacos podem atingir essas camadas através dos folículos pilosebáceos, ou através das células que compõe a epiderme, ou em torno dessas células (KIREJEV e ERICSON, 2013). A via tópica tem várias vantagens, dentre elas evitar a metabolização do fármaco, também conhecido como efeito de primeira passagem (MOODY, 2010; SINGLA *et al.*, 2012). Por isso, buscou-se avaliar o parênquima hepático dos animais tratados, o fim de notar se houve alguma alteração da morfologia desse órgão, o que indicaria metabolização do extrato vegetal.

2. JUSTIFICATIVA

O homem tem buscado na natureza, desde a antiguidade, meios para a promoção da saúde e a cura das doenças (FEJÓ *et al.*, 2021; BADKE *et al.*, 2021), porém é necessário verificar se as indicações populares têm comprovação científica. Atualmente, há um crescimento na busca de produtos naturais com potencial terapêutico no sistema de saúde (BADKE *et al.*, 2021). Soma-se a isso, o surgimento de políticas públicas que pretendem incentivar o uso de plantas medicinais e resgatar os saberes tradicionais da população (DRESCH, LIBORIO e CZEMAINSKI, 2021; PATRICIO *et al.*, 2022).

Frente a isso, sabendo que nas plantas medicinais encontram-se uma gama de componentes biologicamente ativos, torna-se elucidativo avaliar o efeito do uso do óleo *A. conyzoides* no processo de cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos. Por ser uma planta encontrada facilmente nos estados brasileiros tornar-se-ia uma excelente matéria prima de baixo custo para formulações farmacêuticas.

A comunidade médico-científica tem enorme interesse no aumento da taxa de cicatrização bem como na qualidade do tecido formado na lesão, haja em vista a alta morbidade por ferimentos cutâneos e alta dos custos relacionados à terapia cicatricial. Isso leva ao aumento da procura de terapias complementares e alternativas ao convencional, destacando-se o uso de produtos naturais (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2019). Sendo assim, o uso de plantas medicinais tem se tornado uma importante alternativa para o processo de cicatrização de feridas. Vários estudos comprovam o potencial curativo de diversas drogas vegetais, sugerindo que novos estudos, com novos conhecimentos científicos, possam acrescentar nas evidências clínicas (CARMIGNANA *et al.*, 2020).

As feridas cutâneas tratadas topicamente são essenciais para viabilizar o reparo tecidual (GOUVEIA *et al.*, 2021), além de apresentarem baixo custo quando comparadas a terapias convencionais para tratamento de lesões na pele (COSTA *et al.*, 2021). Por isso, investigar as propriedades cicatrizantes do óleo essencial de *A. conyzoides* é de suma importância, para uma futura aplicação clínica de seu uso, incorporado a uma formulação farmacêutica, para ser utilizado nas lesões cutâneas.

Justifica-se também tal estudo, a fim de garantir à população evidências científicas sobre os benefícios do uso de plantas medicinais, nesse caso específico do *A. conyzoides*, promovendo a saúde e o bem-estar da população (PEDROSO, ANDRADE e PIRES, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* no processo de cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar macroscopicamente, nos tempos de 1, 5, 7 e 28 dias após a confecção das lesões excisionais, a presença de crostas e a área da lesão, após o tratamento tópico diário com óleo essencial de *A. conyzoides*;
- Avaliar microscopicamente, por meio de técnicas histológicas e histoquímicas, o infiltrado inflamatório (leucócitos), após o tratamento tópico diário com óleo essencial de *A. conyzoides* no 1°, 5° e 7° dia após a lesão excisional;
- Avaliar microscopicamente, por meio de técnicas imuno-histoquímicas, os macrófagos, após o tratamento tópico com óleo essencial de *A. conyzoides* no 1° dia após a lesão excisional;
- Avaliar microscopicamente, por meio de técnicas histológicas e histoquímicas, os mastócitos, após o tratamento tópico diário com óleo essencial de *A. conyzoides* no 1°, 5°, 7° e 28° dia após a lesão excisional;
- Avaliar microscopicamente, por meio de técnicas histológicas e histoquímicas, a angiogênese e a área de tecido de granulação, após o tratamento tópico diário com óleo essencial de *A. conyzoides* no 5° e 7° dia após a lesão excisional;
- Avaliar microscopicamente, por meio de técnicas histológicas e histoquímicas, a reepitelização, após o tratamento tópico diário com óleo essencial de *A. conyzoides* nos tempos de 1, 5, 7 e 28 dias após a confecção das lesões excisionais;

- Avaliar microscopicamente, por meio de técnicas histológicas e histoquímicas, a deposição do colágeno, após o tratamento tópico diário com óleo essencial de *A. conyzoides* no tempo de 28 dias após a confecção das lesões excisionais;
 - Analisar macroscopicamente, o fígado dos animais tratados, após 7 e 28 dias, com óleo essencial de *A. conyzoides*, para detecção de possíveis alterações morfológicas e alteração do peso do órgão;
 - Analisar microscopicamente, o parênquima hepático dos animais tratados por 7 e 28 dias, para detecção de possíveis lesões no tecido.

4. METODOLOGIA

4.1 Identificação do *A. conyzoides* e confecção da exsicata

A confecção, incluindo coleta e identificação, foi realizada previamente pelo Prof. Dr. Marcos Eduardo Guerra Sobral e pela Técnica Lívia Lara Alves da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ). A exsicata encontra-se no Herbário do Departamento de Ciências Naturais (DCNAT) da Universidade Federal de São João Del-Rei, *Campus* Dom Bosco, sala C1.10, sob número de depósito HUFSJ 10293. Além disso, a exsicata foi incorporada ao site Splink (<http://www.splink.org.br/>).

4.2 Obtenção do óleo essencial de *A. conyzoides*

Após a coleta, as folhas foram separadas uma a uma e secas em uma estufa, com circulação de ar, a aproximadamente 37°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram empacotadas e armazenadas no Laboratório de Patologia Experimental (LAPAE), Departamento de Ciências Naturais, do *Campus* Dom Bosco.

A extração foi realizada pela técnica de hidrodestilação, a partir de um aparelho de Clevenger modificado e adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 1 litro, segundo GUIMARÃES *et al.*, 2008. As folhas secas de *A. conyzoides* passaram pelo processo de destilação a vapor, foram colocadas em um balão de destilação de fundo redondo, que posteriormente foi preenchido com água destilada e aquecido até a ebulição por 2 horas e meia. Os óleos presentes nas glândulas foliares misturaram-se ao vapor d'água, condensando-se, para formar um hidrolato. Esse posteriormente foi centrifugado em um aparelho de cruzeta horizontal a 965,36g por 5 minutos, para separar as fases aquosas e o óleo orgânico. Após decantação, o óleo foi retirado com uma micropipeta e acondicionado em ampola de vidro âmbar, envolta em papel-alumínio, hermeticamente fechada e mantida sob refrigeração a 4°C.



Figura 5 - Obtenção do óleo essencial de *A. conyzoides* e caracterização por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. As folhas do material fresco foram separadas para a retirada do conteúdo inorgânico como terra e pedras. Após 24h em estufa a 37°C foi hidrodestilada em um aparelho de Clevenger modificado. O hidrolato obtido foi então centrifugado para separação da fase oleosa da aquosa. Posteriormente uma alíquota do óleo foi analisada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Criado com BioRender.com.

Para cálculo do rendimento do óleo essencial de *A. conyzoides*, foi utilizada a equação proposta por Lima, Placedes e Cardoso (2019). Tal equação trata-se da divisão entre o peso do óleo extraído em gramas (g), pela massa seca em gramas (g) das folhas da erva, multiplicando-se esse resultado por 100, conforme ilustração a seguir (Figura 06).

$$R_o = \frac{P_o}{MSDF} \times 100$$

onde:

R_o = Rendimento do óleo essencial

P_o = Peso do óleo essencial pós extração

MSDF = Massa seca das folhas da planta medicinal

Figura 6 – Equação para o cálculo do rendimento do óleo essencial de *A. conyzoides*. O resultado final é expresso em porcentagem.

4.3 Caracterização do óleo essencial de *A. conyzoides*

A caracterização do óleo essencial foi realizada pelo grupo de pesquisa do professor Doutor João Lago e pelo discente Felipe Sales, na Universidade Federal do ABC (UFABC). Esta caracterização foi realizada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, Shimadzu® GCMS-QP2010 *Plus*. Para isso, empregou-se uma coluna DB-5 ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm de espessura do filme)

tendo hélio como gás de arraste em uma vazão de 0,73 mL min⁻¹. As concentrações dos analitos foram expressas pela média da porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos \pm desvio padrão.

Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de n-alcenos (C8-C20) e/ou por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca Wiley e NIST (NIST, 2008) e da literatura (ADAMS, 2017). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Van de Dool & Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção descritos em literatura (ADAMS, 2017).

4.4 Animais

Foram utilizados para esse estudo 90 camundongos machos, da linhagem Swiss, com 8 semanas de vida. Todos os animais foram obtidos do Biotério Central (NUCAL) do *Campus* Tancredo Neves, mediante solicitação ao setor. Durante o período de experimentação, os animais foram alojados no Biotério Setorial, localizado no Laboratório de Reabilitação, sala 4.00, do Departamento de Medicina da UFSJ, *Campus* Dom Bosco, em gaiolas contendo seis animais cada, em um espaço aproximado de 10x30cm. As gaiolas foram mantidas em uma sala separada da área de circulação e experimentação, de acordo com as diretrizes éticas adotadas por essa Universidade. Número do protocolo da CEUA 26/19.

Os animais foram alimentados com ração comercial balanceada à vontade bem como a água. Eles foram submetidos ao controle de ciclos de luminosidade, 12 horas de luz e 12 horas de escuro; temperatura ambiente entre 22°C \pm 2°C e umidade relativa do ar de 45% \pm 15% (DANY, *et. al.*, 2010). Durante todo o experimento as gaiolas que continham os animais e mamadeiras foram lavadas com água e detergente neutro. Também foi realizada a troca da maravalha, reposição de água e ração em dias alternados (sempre às segundas, quartas e sextas-feiras).

4.5 Distribuição dos animais

Setenta e dois animais foram distribuídos de forma aleatória em quatro grupos, sendo um grupo tratado com salina, um grupo tratado com DMSO, um grupo tratado com óleo essencial de *A. conyzoides* na concentração 0,01mg/10000µl (TOX) e um grupo tratado com óleo essencial de *A. conyzoides* na concentração 0,001mg/10000µl (TOY). Cada grupo foi subdividido em três outros subgrupos conforme o período de tratamento: 1, 5 e 7, com n=6 em cada subgrupo.

Posteriormente, dezoito animais foram distribuídos de forma aleatória em três grupos, sendo um grupo tratado com DMSO, um grupo tratado com óleo essencial de *A. conyzoides* na concentração 0,01mg/10000µl (TOX) e um grupo tratado com óleo essencial de *A. conyzoides* na concentração 0,001mg/10000µl (TOY). O período de tratamento para esses animais totalizou 28 dias, com n=6 em cada subgrupo. Importante ressaltar, que esses períodos específicos escolhidos de 1, 5, 7 e 28 dias, deve-se ao objetivo de acompanhar a cinética do processo de cicatrização.

Para cada grupo (Salina, DMSO, TOX ou TOY) foi dada uma cor para facilitar o manuseio e tratamento a fim de diminuir possíveis erros. Os animais do grupo salina foram marcados na cauda com a cor preta, e suas gaiolas receberam etiquetas escritas com a cor preta. Os animais do grupo DMSO foram marcados na cauda com a cor azul (Figura 07) e suas gaiolas receberam etiquetas escritas em azul. Os animais do grupo TOX foram marcados na cauda com a cor verde (Figura 07) e suas gaiolas receberam etiquetas escritas com a cor verde. Já os animais do Grupo TOY foram marcados na cauda com a cor vermelha (Figura 07) e suas gaiolas receberam etiquetas escritas de cor vermelha. Na hora de fotografar os animais para as análises da área da lesão (Figura 10), esse esquema de cor também foi utilizado para confecção de etiquetas, a fim de melhorar a identificação dos animais.



Figura 7 – Esquema de cores para identificar os animais em seus respectivos grupos. Esquema de cores adotado pelo pesquisador a fim de melhorar a identificação dos grupos e eliminar os possíveis erros de tratamento. Fonte: Acervo do Autor.

O primeiro número da sequência de identificação indica a quantidade de dias de tratamento do grupo, no caso dessa imagem foi 1 dia. Em seguida têm-se a letra D que significa dia. Seguido da letra D, têm-se o nome do grupo de acordo com o tratamento recebido, sendo: C (DMSO); TOX (tratamento com o óleo na concentração 0,01mg/10000µl); TOY (tratamento com o óleo na concentração 0,001mg/10000µl) e SAL (salina). O último número da sequência indica o número do animal pertencente ao grupo, sendo que esse número é o mesmo representado por traços na cauda do animal.

4.6 Confeção da lesão excisional

O local onde os animais foram manipulados durante o experimento para realização da técnica cirúrgica da confecção da lesão; do tratamento e da eutanásia; foi uma bancada limpa assepticamente previamente, antes e após cada experimento/cirurgia. Para a manipulação dos animais, foi utilizada a técnica de lavagem das mãos e a utilização dos Equipamentos de Proteção Individual, EPI's, e os Equipamentos de Proteção Coletiva, EPC's, de acordo com as normas de biossegurança da instituição e com os Programas Operacionais Padrões, POP's do Laboratório de Patologia Experimental – LAPAE.

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal (Figura 08) com 0,15mL de solução anestésica contendo cloridrato de xilazina (16,5 mg/Kg), cloridrato de quetamina (97 mg/Kg) e salina fisiológica, na proporção 1:1:2, respectivamente (DANY *et. al.*, 2010).



Figura 8 – Técnica anestésica. Injeção intraperitoneal (i.p.) contendo cloridrato de xilazina (16,5 mg/Kg), cloridrato de quetamina (97 mg/Kg) e salina fisiológica, na proporção 1:1:2. Fonte: Acervo do Autor.

Posteriormente, o animal foi colocado sobre a prancha cirúrgica em decúbito ventral para procedimento operatório. Foi realizada uma higienização dos pelos com álcool 70% (Figura 09 - A) e posteriormente uma tricotomia com lâmina de aço dos pelos dorsais (Figura 09 – B e C), com extensão de 6 cm no comprimento e 4 cm na largura, caudalmente a uma linha imaginária que passa na borda inferior das orelhas. Em seguida o local foi higienizado novamente com álcool 70%. Para confecção das feridas excisionais, foi utilizado um *punch* metálico, contendo lâmina cortante na sua borda inferior, com 7 mm de diâmetro (Figura 09 – D, E e F). Com este instrumento, foi excisionado dois fragmentos cutâneos, na área depilada, até a exposição da fáscia muscular dorsal, uma no antímero direito e outra no antímero esquerdo (Figura 10). Posteriormente, foi realizada uma compressão digital, utilizando-se gaze esterilizada.

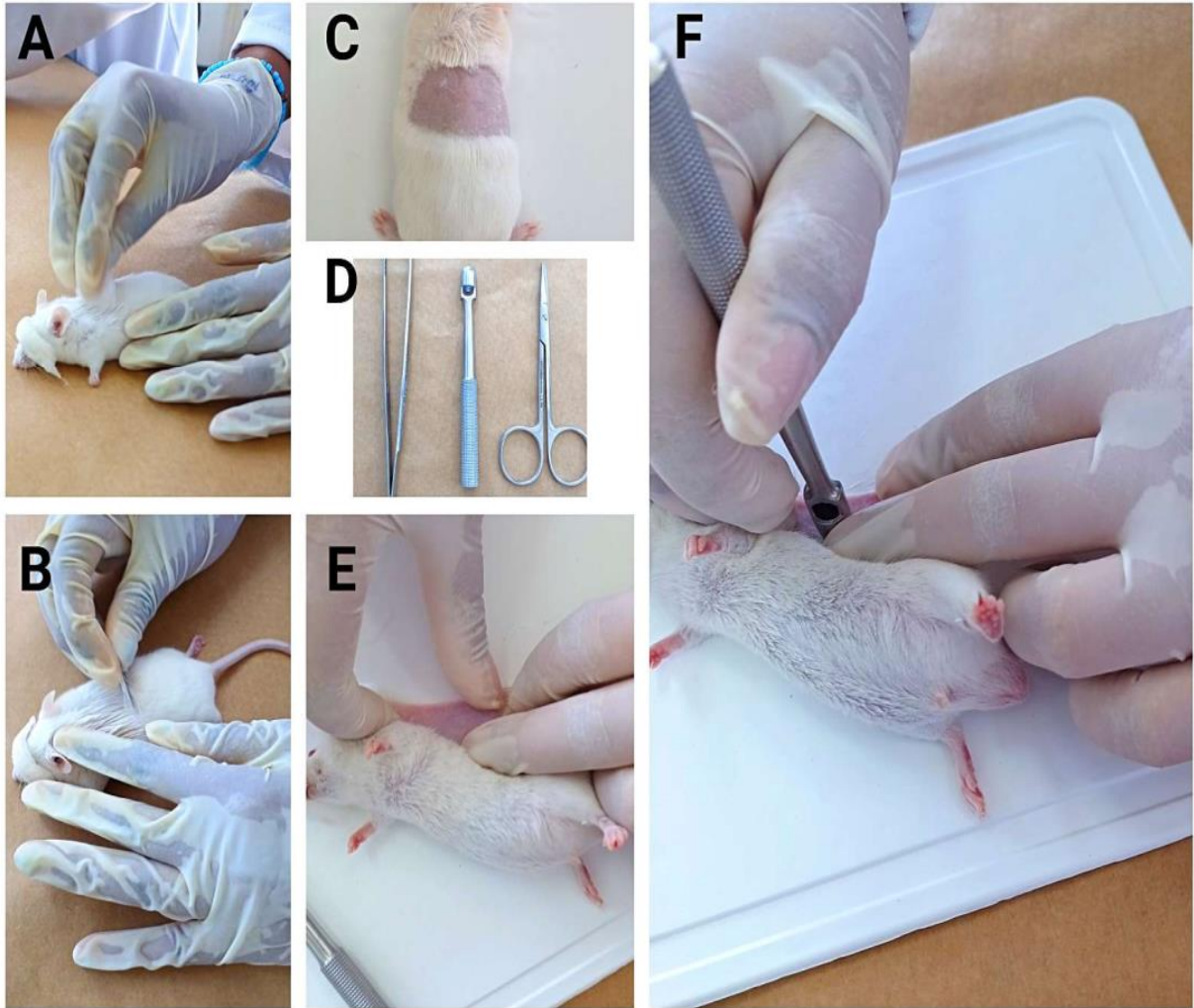


Figura 9 – Técnica cirúrgica. Metodologia empregada pelo grupo de pesquisa para a confecção da lesão excisional. A: Higienização com álcool 70% dos pelos dos animais, B: Tricotomia, C: Animal após a tricotomia, D: Pinça metálica, *punch* metálico 7mm e tesoura metálica, E: Posicionamento do animal sob prancha cirúrgica e F: posicionamento do *punch* dermatológico sobre a pele com auxílio de uma pinça ou dos dedos do pesquisador. Fonte: Acervo do Autor.



Figura 10 – Resultado da confecção de ferida. Lesões excisionais confeccionadas no dorso do animal com exposição da fáscia muscular. Fonte: Acervo do Autor.

4.7 Tratamento

As soluções para o tratamento dos animais foram obtidas pela diluição em dimetilsufóxido (DMSO) do óleo essencial de *A. conyzoides*. Os animais dos grupos tratados, DMSO e Salina, receberam a partir do 1º dia, somente na lesão direita, padronizada em todos os grupos, diariamente, 40µl da solução correspondente.

Os animais do grupo DMSO receberam, diariamente, de acordo com o tempo do grupo de cada animal, duas vezes ao dia (as 08 horas da manhã e as 17 horas), 40µl de DMSO. O mesmo tipo de tratamento foi aplicado aos animais do grupo salina que receberam 40µl de solução salina 0,9% em suas lesões, duas vezes ao dia (as 08 horas da manhã e as 17 horas).

Os animais do Grupo TOX receberam, diariamente, de acordo com o tempo de tratamento de cada animal, duas vezes ao dia, 40µl de solução contendo o óleo essencial de *A. conyzoides* diluído em DMSO na concentração 0,01mg/10000µl. Os animais do Grupo TOY receberam, diariamente, de acordo com o tempo do grupo de cada animal, duas vezes ao dia, 40µl de solução contendo o óleo essencial de *A. conyzoides* diluído em DMSO na concentração 0,001mg/10000µl. A aplicação foi realizada com o auxílio de uma pipeta automática com ponteiros esterilizados (Figura 11).



Figura 11 – Tratamento do grupo com salina, DMSO e dos grupos tratados TOX e TOY com o óleo essencial de *A. conyzoides*. Os tratamentos foram repetidos duas vezes ao dia durante 1, 5, 7 ou 28 dias, conforme cada subgrupo. Para aplicação de 40µl da solução do óleo essencial de *A. conyzoides* diluído em DMSO nas feridas direitas de cada animal foi utilizada uma pipeta automática. Fonte: Acervo do Autor.

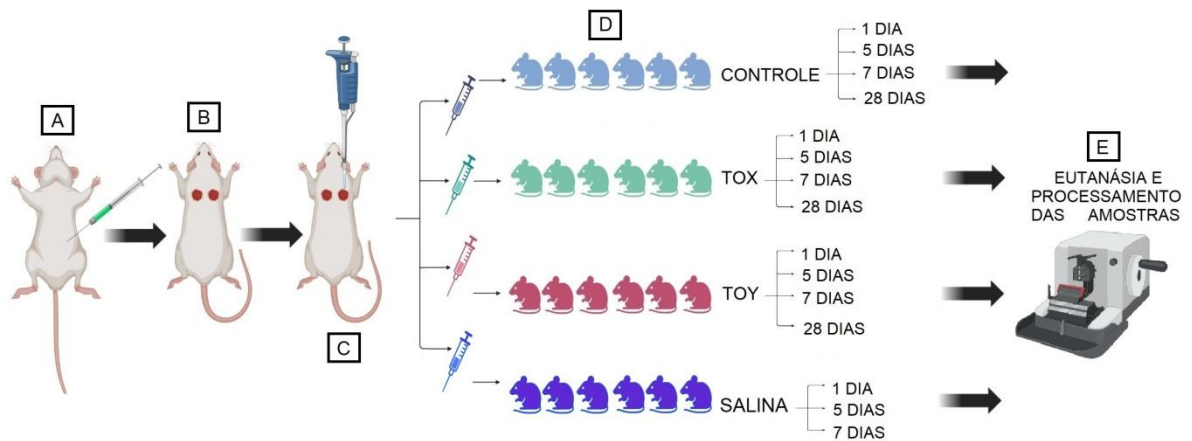


Figura 12 – Protocolo experimental. Em A aplicação i.p. de xilazina e ketamina. Em B confecção da ferida excisional. Em C aplicação dos tratamentos conforme divisão de grupos e tempos demonstrados em D. Após eutanásia, em E processamento das amostras. Criado com Paint e BioRender.com.

4.8 Avaliação macroscópica das lesões excisionais

Cada lesão foi avaliada diariamente, observando-se a presença de sinais inflamatórios, edema e hiperemia, além da presença de crostas e secreções. O tamanho da ferida, no menor e maior eixos, foram mensurados. Também foi mensurada a área total da ferida. Ambas as mensurações foram realizadas através do programa digital ImageJ®. Para isso, o animal foi colocado ao lado de uma régua milimetrada e o registro fotográfico foi realizado com uma câmera digital, fixada em tripé.

As fotos dos animais e das lesões foram tiradas sempre com a mesma câmera, na mesma resolução e sempre na mesma distância do objeto focado. A câmera utilizada foi da Samsung®, versão 12.0.07.0, Galax M53, modelo SM – M536B/DNS e número de série RQCT505914H. Os animais foram posicionados em um fundo azul. Uma identificação para cada animal foi colocada na parte inferior da imagem a ser capturada conforme Figura 07. Para manter sempre a mesma distância da lente da câmera com o objeto focado foi confeccionado um tripé, com 10,5 cm de altura.

As imagens obtidas foram então importadas para o Software de análise de imagem ImageJ® versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Para o cálculo do tamanho da ferida em milímetros quadrados, no dia da confecção da lesão e no dia da eutanásia (exceto o grupo 21 dias que teve a área final da ferida fotografada para o cálculo no 21º dia e eutanásia no 28º dia pós confecção da lesão), uma linha para o maior e o menor eixo foram manualmente traçadas, para cada animal e em cada tempo: 1, 5, 7 e 28 dias após a confecção da lesão. Para determinação da área total da ferida foi utilizada a fórmula (MAEDA *et al.*, 2011) para determinação de uma elipse, conforme indicado na figura 13, onde Pi equivale a 3,14

$$\text{Área da lesão} = \left(\frac{\text{diâmetro maior}}{2} \right) \times \left(\frac{\text{diâmetro menor}}{2} \right) \times \text{Pi}$$

Figura 13 – Equação para cálculo da área da lesão. O maior e o menor eixo de cada lesão foram mensurados no programa de análise de dados ImageJ®. Os dados encontrados foram lançados em planilhas do Excel® para determinação da área da lesão de acordo com a fórmula descrita.

A fim de normalizar os dados, os valores foram lançados em tabelas do Excel® e posteriormente calculados de acordo com a equação da figura 14 (MAEDA *et al.*, 2011), a fim de apresentá-los em porcentagem de fechamento da lesão, relativo ao tamanho inicial da ferida.

$$\% \text{ de fechamento da lesão} = 1 - \frac{\text{área da ferida}}{\text{área original da ferida}} \times 100$$

Figura 14 – Equação para cálculo da área de fechamento da lesão em %. Os dados encontrados para a área da ferida e para a área original da ferida foram lançados em planilhas do Excel® para determinação da área da taxa de fechamento da lesão, em %, lesão de acordo com a equação descrita.

4.9 Avaliação macroscópica dos fígados

Após a eutanásia, os animais que receberam o tratamento por 7 e 28 dias, foram fixados à prancha cirúrgica para a realização da necrópsia, onde tiveram seus fígados retirados. Com auxílio de lupa com 2,5 vezes de aumento foi realizada uma análise macroscópica do fígado para avaliação morfológica de sua superfície quanto a presença de secreções, lesões em sua borda e aspecto de sua superfície. Através de uma balança digital foi realizada a pesagem do fígado de cada animal dos grupos de 7 e 28 dias. Nesses tempos, os achados foram anotados para análises.

4.10 Coleta e processamento das amostras de pele e fígado

Decorridos 1, 5, 7 ou 28 dias após a confecção da lesão excisional, os animais foram eutanasiados por dose letal de anestésicos. Em todos os animais, um fragmento de pele contendo a ferida em toda sua extensão e profundidade foi retirada através de uma pinça e uma tesoura cirúrgica. O fígado dos animais do tempo de 7 e 28 dias também foi retirado com a utilização de uma pinça e tesoura cirúrgica. Todo esse material foi clivado e fixado em solução de formalina a 10% neutro tamponado por 24 horas, armazenado em álcool 70% e posteriormente desidratado em soluções

sucessivas de álcool, diafanizado pelo xilol, impregnado e incluído em parafina, conforme o seguinte protocolo de processamento histológico:

- Desidratação: imersão em álcool 80% - 30 minutos; álcool 90% - 30 minutos; álcool absoluto I – 30 minutos; álcool absoluto II – 30 minutos;
- Diafanização: imersão em xilol I – 30 minutos; xilol II – 30 minutos;
- Infiltração: imersão em parafina I em estufa a 60°C – 30 minutos; imersão em parafina II em estufa a 60°C – 30 minutos;
- Inclusão: em parafina a uma temperatura de 60°C e confecção de blocos em parafina, com devida referência do animal e do grupo experimental.

Os blocos de parafina das amostras de pele e fígado foram seccionados em micrótomo, obtendo-se cortes de 4µm e os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE), Azul de Toluidina e Tricrômico de Masson.

4.11 Análise morfológica por escore da reepitelização e das crostas

Foram avaliados os escores morfológicos da reepitelização e das crostas em cortes histológicos das feridas conforme padronizado por Estevão e colaboradores (2019). Primeiramente, a fim de se avaliar a quantidade da crosta que foi formada na ferida excisional, as lâminas após coloração com HE, foram analisadas na objetiva de 4x e concedido scores morfológicos das crostas para cada animal de cada grupo (DMSO, TOX e TOY) nos tempos 1, 5, 7, 14 e 28 dias, de acordo com a tabela 01.

Tabela 1 - Scores morfológicos das crostas em cortes histológicos de lesões excisionais coradas com HE (adaptado de ESTEVÃO *et al.*, 2019).

Pontuação	Parâmetro
0	Ausência
1	Discreto
2	Moderado
3	Forte

Para análise da reepitelização foi avaliada a formação da nova camada epitelial usando o objetiva de 10x. Foi então concedido scores morfológicos da formação do novo epitélio para cada animal de cada grupo (DMSO, TOX e TOY) nos tempos 1, 5, 7, 14 e 28 dias, de acordo com a tabela 02.

Tabela 2 - Scores morfológicos da formação do novo epitélio em cortes histológicos de lesões excisionais coradas com HE (adaptado de ESTEVÃO *et al.*, 2019).

Pontuação	Parâmetro
0	AUSÊNCIA – sem reepitelização.
1	DISCRETA – Presença de uma pequena nova camada epitelial. A língua epitelial ocupa no máximo 1/3 do espaço da lesão.
2	MODERADA – Reepitelização parcial ou quase completa. A língua epitelial ocupa mais de 1/3 do espaço da ferida.
3	TOTAL – Reepitelização completa.

A pontuação foi conferida aos cortes por um único observador. Os dados foram apresentados em média por grupo. Os gráficos semiquantitativos foram gerados no Excel®.

.12 Avaliação histopatológica das amostras de pele e fígado

Através de um microscópio óptico convencional (Olympus®), as lâminas de pele coradas com Hematoxilina-Eosina foram analisadas para avaliação qualitativa quanto a presença de edema, padrão do infiltrado inflamatório, extensão da lesão, reepitelização e tecido de granulação nos diferentes períodos de observação. O fígado foi avaliado quanto à morfologia do parênquima hepático.

4.13 Avaliação morfológica dos leucócitos, mastócitos e dos vasos sanguíneos nas lesões excisionais tratadas com óleo essencial de *A. conyzoides*

As imagens histológicas das lâminas coradas em HE e Azul de Toluidina, foram capturadas por câmera digital Olympus® EP50, acoplada ao microscópio óptico Olympus® CX23, sob foco fixo e clareza de campo. As fotomicrografias foram avaliadas através do software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Nos cortes histológicos de pele corados em HE foram quantificados os leucócitos nos tempos de 1, 5 e 7 dias, que foram identificados a partir de sua morfologia característica. Os vasos sanguíneos foram quantificados dos tempos de 5 e 7 dias. Foram considerados novos vasos aqueles que possuíam até três células endoteliais em sua parede, conforme figura 15. Os leucócitos e os vasos sanguíneos foram quantificados em 10 campos por caso/lâmina, a um aumento de 400X, sendo 4 campos dispostos no leito da lesão, e 6 campos entre a lesão e a derme adjacente, conforme ilustra a Figura 16.

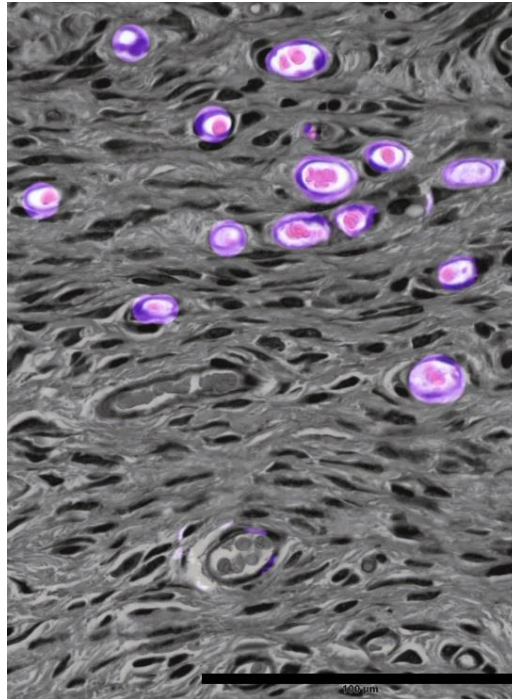


Figura 15 - Vasos sanguíneos considerados para quantificação da neovascularização. Em destaque, com cor, o que foi considerado para a contagem dos novos vasos sanguíneos. Aumento de 400x. Escala de 100 μ m. Imagem com coloração alterada no programa Fotor®. Fonte: Acervo do Autor.

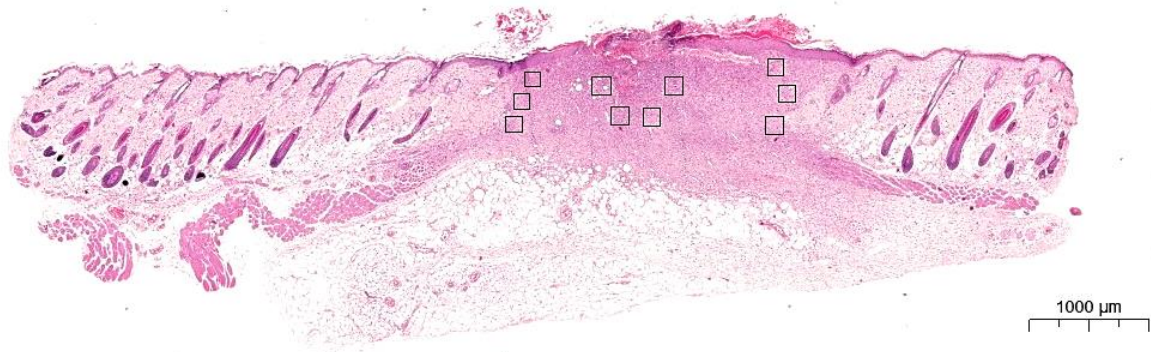


Figura 16 - Áreas da lesão onde foram quantificados os leucócitos e os novos vasos. Em destaque no quadrado, a representação da disposição dos campos (4 campos dispostos no leito da lesão, e 6 campos entre a lesão e a derme adjacente) para a contagem dos leucócitos e dos novos vasos sanguíneos. Coloração em HE. Escala de 1000 μ m. Fonte: FERREIRA, 2022.

Para quantificação dos mastócitos, as lâminas correspondentes aos tempos de 1, 5, 7 e 28 dias foram coradas com azul de toluidina. Foram percorridos todos os campos do leito da ferida bem como a sua margem a um aumento de 400x, conforme ilustra a figura 17. Foram consideradas mastócitos quando essas células

apresentavam morfologia característica dessa linhagem. Posteriormente os resultados foram expressos em número de mastócitos por lesão.

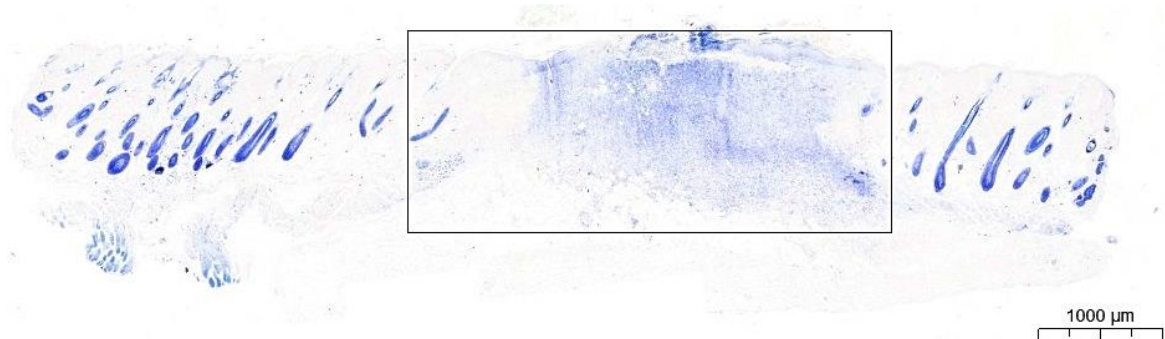


Figura 17 - Área da lesão onde foram quantificados os mastócitos. Em destaque no quadrado, a representação da área da lesão que foi percorrida para a contagem dos mastócitos. Escala de 1000 μ m. Coloração em Azul de Toluidina. Fonte: FERREIRA, 2022.

4.14 Avaliação da deposição de colágeno nas lesões excisionais tratadas com óleo essencial de *A. conyzoides*

As lâminas foram coradas com Tricrômico de Masson e posteriormente foram analisadas para avaliação das fibras colágenas no tempo de 28 dias. Foi utilizado um kit de coloração da empresa Wcor – Corantes e Soluções para Laboratório, seguindo o seguinte protocolo:

- Desparafinizar, alcoolizar e lavar a lâmina com água destilada, suavemente;
- Cobrir o corte com o reagente A e deixar agir por 5 minutos;
- Lavar a lâmina com água destilada, suavemente;
- Cobrir o corte com o reagente B e deixar agir por 3 minutos;
- Cobrir o corte com o reagente C e deixar agir por 15 segundos;
- Lavar a lâmina com água destilada, suavemente;
- Cobrir o corte com o reagente D e deixar agir por 5 minutos;
- Lavar a lâmina com água corrente por 5 minutos e também lavar em água destilada, suavemente;
- Cobrir o corte com o reagente E e deixar agir por 5 minutos;
- Lavar a lâmina com água destilada, suavemente;
- Cobrir o corte com o reagente F e deixar agir por 5 minutos;

- Não lavar. Cobrir o corte com o reagente G e deixar agir por 5 minutos;
- Lavar a lâmina com água destilada, suavemente;
- Lavar a lâmina com água destilada, mergulhar nos alcoóis, xilóis e, usar meio de montagem para montar com lamínula.

As imagens histológicas das lâminas coradas Tricrômico de Masson, foram capturadas por câmera digital Olympus® EP50, acoplada ao microscópio óptico Olympus® CX23, sob foco fixo e clareza de campo. As fotomicrografias foram avaliadas qualitativamente.

4.15 Avaliação imuno-histoquímica dos macrófagos nas lesões excisionais tratadas com óleo essencial de *A. conyzoides*

Após desparafinização e hidratação, as amostras foram aquecidas em tampão citrato para recuperação antigênica por 5 minutos. Após atingirem novamente a temperatura ambiente, as amostras foram deixadas em água corrente por mais cinco minutos. Os cortes foram circulados com uma caneta hidrofóbica. Para inibição endógena da peroxidase, os cortes foram incubados por 30 minutos em uma solução de H₂O₂ 6%. Após esse tempo foram lavados com PBS + Tween a 1%, por três vezes, durante 5 minutos cada lavagem. Em seguida, foram lavados somente com o PBS. Posteriormente, os cortes foram incubados com a solução *Normal Horse Serum 2,5%*, por 30 minutos, para bloqueio das ligações inespecíficas. Após esse tempo, os cortes foram incubados com o anticorpo primário, levado a geladeira para *overnight*.

No dia seguinte, os cortes foram lavados com PBS, durante cinco minutos, por três vezes. Posteriormente os cortes foram incubados com o anticorpo secundário por 40 minutos. Trata-se de um anticorpo biotilado. Mais uma vez, os cortes foram lavados com PBS, durante cinco minutos, por três vezes. Após esse procedimento, adicionou-se Vecastain Elite ABC *complex*, por mais 30 minutos. Mais uma vez, os cortes foram lavados com PBS, durante cinco minutos, por três vezes. O DAB foi colocado sobre os cortes para que ocorra a revelação. Os cortes foram lavados em água corrente por cinco minutos. As amostras foram contracoradas com hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente por mais cinco minutos, e a seguir, desidratados, para a montagem da lâmina.

4.16 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm SEM (erro padrão da média) em cada grupo experimental, sendo comparadas as diferenças entre as médias do Grupos Controles e dos Grupos Tratados. Foi feito o teste de normalidade pelo Shapiro-wilk para confirmar se os valores estarão dentro da normalidade. Para análise estatística foi utilizado o Programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, CA, USA); onde foi utilizado o teste One-Way ANOVA, seguido do pós teste Newman-Keuls, para comparação entre os quatro grupos (Salina, DMSO, TOX e TOY), nos tempos de 1, 5 e 7 dias; e entre os três grupos (DMSO, TOX e TOY), no tempo de 28 dias. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

PARTE I – RESULTADOS DA EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

5.1 Rendimento do óleo essencial de *A. conyzoides*

Ao total foram realizadas cinco extrações do óleo essencial de *A. conyzoides*, depois de diferentes tempos de armazenagem. Em cada extração foram utilizadas 20g da droga vegetal seca. Os maiores rendimentos do óleo essencial de *A. conyzoides* foram observados nas duas primeiras extrações, 1 e 2. Os demais rendimentos do óleo essencial de *A. conyzoides*, (3, 4 e 5), estão expressos na tabela 03.

Tabela 3 - Rendimento do óleo essencial das folhas de *A. conyzoides*

Extração	Rendimento (%)
1	1,025
2	1,065
3	0,81
4	0,695
5	0,545

5.2 Análise dos constituintes do óleo essencial de *A. conyzoides*

Ao avaliar os componentes da amostra, através da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, encontrou-se no óleo essencial de *A. conyzoides* os componentes químicos descritos na tabela 04. Classificando os compostos encontrados em constituintes químicos, tem-se em maior quantidade:

precoceno I, β -cariofileno e precoceno II, sendo eles: β -cariofileno, α -humuleno, 6-demetoxi-ageratocromeno, germacreno D e ageratocromeno.

Tabela 4 - Composição química do óleo essencial das folhas de *A. conyzoides*

n° composto	t_R	IK	Composto	%Rel
1	26,74	1,376	α -copaeno	0,38
2	27,09	1,388	β -bourbonene	0,79
3	27,35	1,388	β -cubebeno	3,46
4	28,89	1,419	β -cariofilneo	13,77
8	30,33	1,454	α -humuleno	5,07
9	30,96	1,463	6-demetoxi-ageratocromeno	37,16
10	31,78	1,48	germacreno D	6,36
11	32,16	1,495	γ -amorfenol	3,18
12	32,32	1,515	cubelol	3,6
13	32,52	1,515	ionol	1,18
16	33,03	1,523	δ -cadineno	1,25
18	33,35	1,522	β -sesquifelandreno	1,22
21	34,9	1,532	(Z)-nerolidol	1,67
23	35,46	1,575	germacreno D-4-ol	0,83
24	35,65	1,583	epoxicariofileno	2,43
27	36,77	1,599	widdrol	0,84
32	38,35	1,647	desmethoxiencecalina	0,67
33	38,8	1,66	ageratocromeno	6,6
34	38,97	1,676	androencecalinol	0,29
39	54,51	1,946	isofitol	0,58

O gráfico do cromatograma com os picos representativos dos compostos encontrados após análise do óleo, estão representados na Figura 18. O β -cariofileno (pico 4), α -humuleno (pico 8), 6-demetoxi-ageratocromeno (pico 9), germacreno D (pico 10) e ageratocromeno (pico 33), estão também representados nos gráficos do espectrômetro de massas, nas figuras 19, 20, 21, 22 e 23, respectivamente.

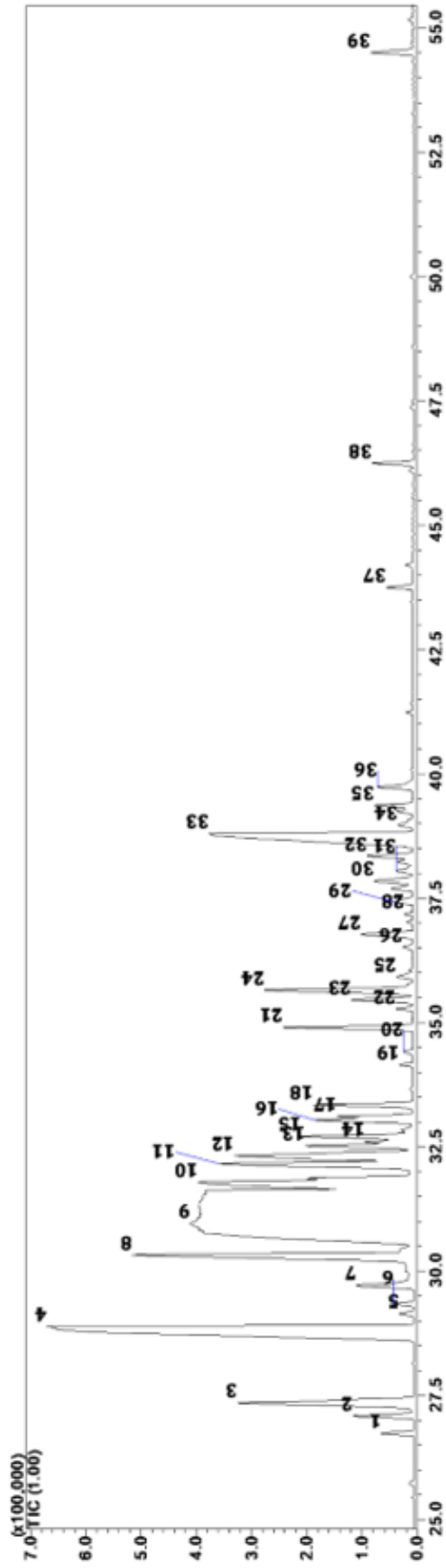


Figura 18 – Cromatograma do óleo essencial das folhas de *A. conyzoides*. Fonte: Acervo do Autor.



Figura 19 – Espectro de massas do constituinte β -cariofileno. Fonte: Acervo do Autor.

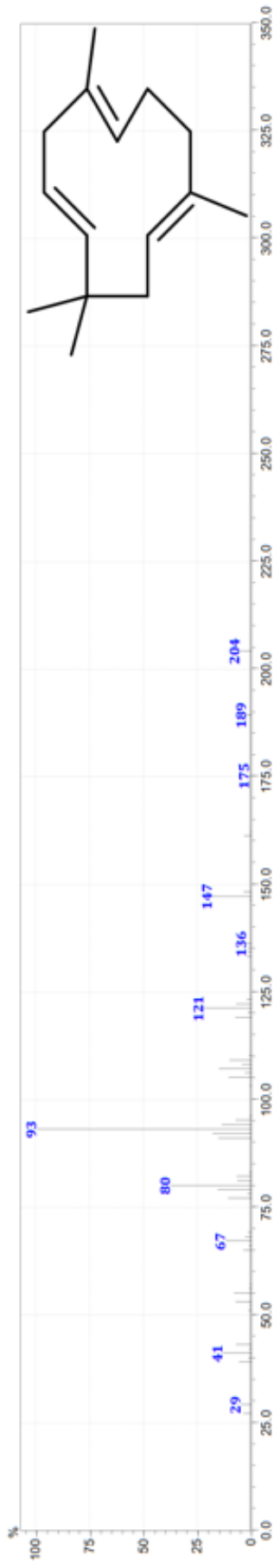


Figura 20 – Espectro de massas do constituinte α -humuleno. Fonte: Acervo do Autor.



Figura 21 – Espectro de massas do constituinte 6-demetoxi-ageratocromeno. Fonte: Acervo do Autor.



Figura 22 – Espectro de massas do constituinte germacreno D. Fonte: Acervo do Autor.

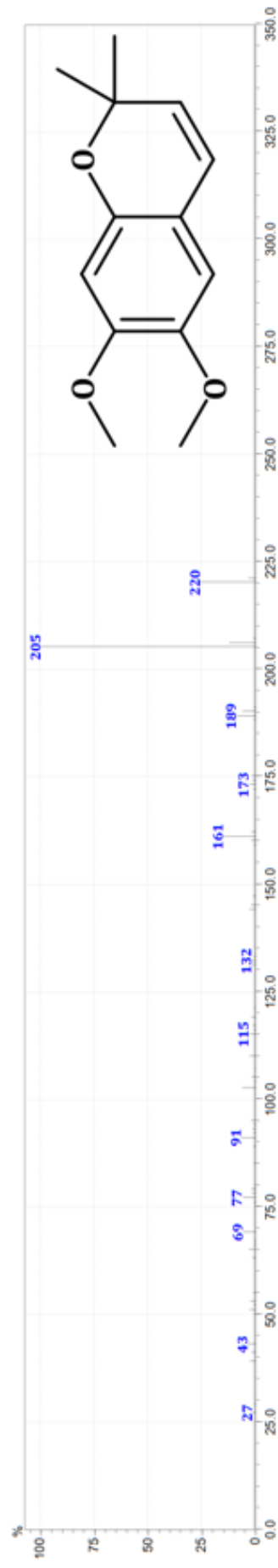


Figura 23 – Espectro de massas do constituinte ageratocromeno. Fonte: Acervo do Autor.

PARTE II – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA LESÃO EXCISIONAL

5.3 Avaliação macroscópica qualitativa das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de *A. conyzoides*

Os parâmetros avaliados na ferida quanto as características macroscópicas após início do tratamento foram: presença de crostas ou sinais de ressecamento e sinais inflamatórios como edema e rubor. A figura 24 mostra as feridas confeccionadas nos animais dos grupos Salina, DMSO, TOX e TOY; e as lesões logo após a eutanásia, de acordo com os dias de tratamento de cada grupo.

Após um dia de aplicação do tratamento tópico, as feridas dos animais de todos os grupos se apresentaram com poucas secreções e com aspecto límpido. A ferida dos animais do grupo TOX já se apresentavam macroscopicamente menores quando comparada aos demais grupos nesse dia.

Após cinco dias de tratamento, as feridas da maioria dos animais, dos grupos DMSO, salina e TOX, apresentavam-se secas, crostas com as bordas já ressecadas, ausência de secreções e crostas em desprendimento. Já no grupo TOY dois animais apresentavam feridas úmidas e sem bordas em desprendimento, enquanto os demais já apresentavam feridas secas e com bordas em desprendimento.

Quanto ao aspecto macroscópico das lesões, após sete dias de tratamento, nos grupos, observava-se feridas secas, crostas com as bordas já ressecadas e ausência de secreções. A maioria das lesões do grupo TOX mantiveram-se visivelmente menores que os demais grupos. Entretanto, no grupo salina, a maioria das lesões, aparentemente maiores que os demais grupos, apresentaram macroscopicamente crostas mais espessas.

Ao final de 28 dias de tratamento, um animal do grupo DMSO apresentava ainda lesão. As cicatrizes dos animais dos grupos TOX e TOY estavam nitidamente menores quando comparadas ao grupo salina e posteriormente ao grupo DMSO (Figura 24).

5.4 Avaliação da área das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de *A. conyzoides*

Após um dia de aplicação dos tratamentos tópicos não foi observada diferença estatística entre as áreas das feridas entre os grupos, DMSO ($39,069 \text{ mm}^2 \pm 2,656$), salina ($45,85 \text{ mm}^2 \pm 3,737$) TOX ($35,968 \text{ mm}^2 \pm 3,058$) e TOY ($44,707 \text{ mm}^2 \pm 3,540$).

Nos grupos que receberam cinco dias de aplicação dos tratamentos tópicos, também não foram observadas diferenças estatísticas entre as áreas das feridas entre os grupos, DMSO ($26,863 \text{ mm}^2 \pm 5,143$), salina ($26,46 \text{ mm}^2 \pm 6,617$) TOX ($24,787 \text{ mm}^2 \pm 4,718$) e TOY ($26,436 \text{ mm}^2 \pm 5,351$).

Aos sete dias de tratamento, observou-se diferença estatística entre a área da lesão em mm^2 , com $p = 0,0112$. O grupo tratado com TOX ($9,291 \text{ mm}^2 \pm 1,455$) foi estatisticamente significativamente melhor que o tratado com salina ($25,26 \text{ mm}^2 \pm 3,201$) e com TOY ($25,198 \text{ mm}^2 \pm 4,830$). Não houve diferença estatística entre TOX vs DMSO ($14,741 \text{ mm}^2 \pm 4,411$), DMSO vs salina, TOY vs salina e TOY vs DMSO.

Ao final dos 28 dias de tratamentos, também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, conforme figura 25 – A.

5.5 Taxa de fechamento das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de *A. conyzoides*

Os resultados da taxa de fechamento da ferida estão expressos na figura 25 – B, para os grupos DMSO, salina, TOX e TOY nos tempos de 1, 5 e 7 dias; e para os grupos DMSO, TOX e TOY no tempo de 28 dias.

Após um dia de tratamento tópico não foi observada diferença estatística entre as porcentagens de fechamento das feridas entre dos grupos, DMSO ($23,67 \% \pm 4,829$), salina ($12,95 \% \pm 3,471$) TOX ($25,73 \% \pm 5,699$) e TOY ($12,46 \% \pm 5,797$).

Após cinco dias de tratamento, também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, DMSO ($50,15 \% \pm 7,892$), salina ($53,36 \% \pm 9,932$) TOX ($46,69 \% \pm 10,66$) e TOY ($52,95 \% \pm 7,131$).

Após sete dias de tratamento tópico, foram observadas diferenças estatísticas da taxa de fechamento da ferida, sendo $p = 0,0026$, entre os grupos: TOX ($80,10 \% \pm$

3,170) e TOY (40,19 % \pm 9,507); DMSO (69,71 % \pm 7,580) e TOY (40,19 % \pm 9,507); Salina (63,48 % \pm 4,288) e TOY (40,19 % \pm 9,507). Entre os demais grupos, salina vs TOX, salina vs DMSO e DMSO vs TOY, não foram observadas diferenças estatísticas.

Ao final de 28 dias, também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos DMSO (99,89 % \pm 0,111), TOX (100 % \pm 0,00) e TOY (100 % \pm 0,00).

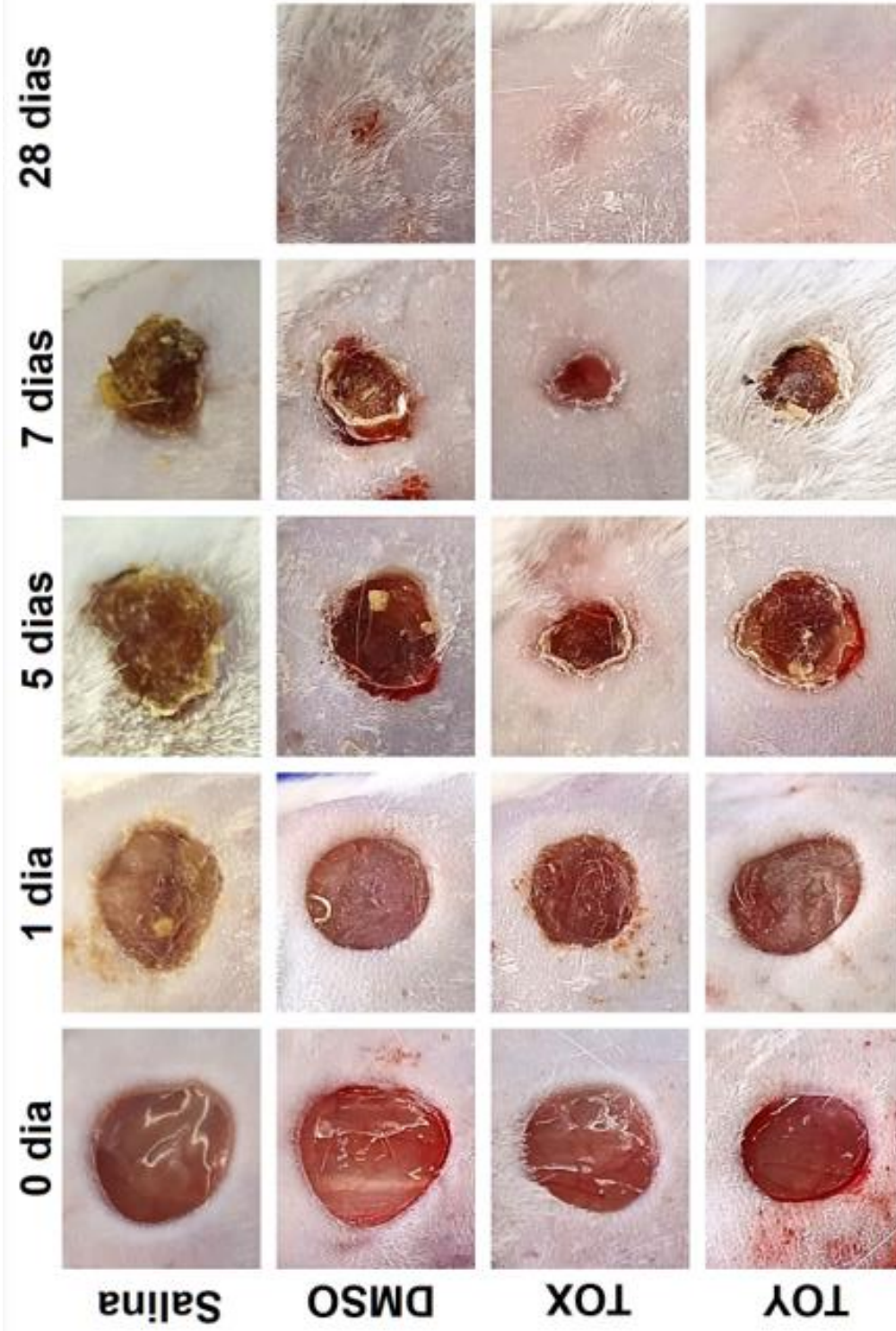


Figura 24 – O tratamento tópico com o óleo essencial de *A. conyzoides* após 28 dias de aplicação interfere positivamente no fechamento das lesões excisionais em camundongos. Após análise macroscópica das lesões podemos inferir que o tratamento com o óleo essencial de *A. conyzoides* interfere positivamente no fechamento da lesão. Na imagem observa-se as fotografias representativas das áreas da lesão em cada grupo e seu respectivo tempo experimental. Zero é o dia da confecção da ferida e 1, 5, 7 e 28 o dia da eutanásia de cada animal. Para o grupo salina, 28 dias, novos experimentos serão realizados.

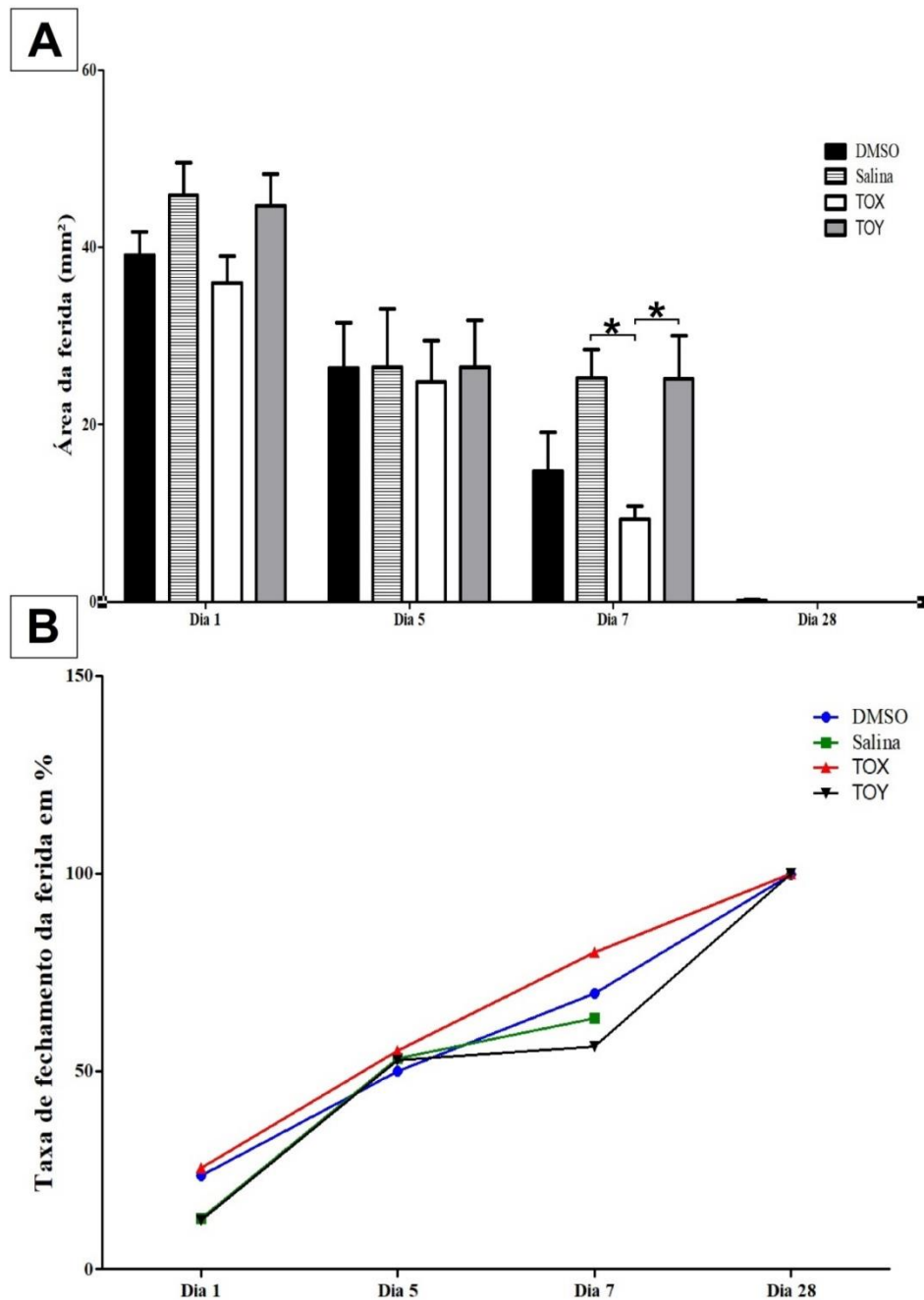


Figura 18 – O tratamento tópico com o óleo essencial de *A. conyzoides* interfere positivamente na taxa de fechamento das lesões excisionais em camundongos Swiss. Em **A** observa-se o gráfico representativo das médias das áreas das feridas em mm² para os períodos de teste. Foi observada diferença estatística entre os grupos TOX e salina; TOX e TOY aos 7 dias ($p=0,0112$). Em **B** observa-se a taxa de fechamento da ferida nos animais expressas em porcentagem (%). Foram encontradas diferenças estatísticas entre TOX e TOY; DMSO e TOY; salina e TOY, ($p = 0,0026$). Percebe-se que no grupo TOX houve uma discreta melhora na taxa de fechamento da lesão excisional desde os primeiros dias de tratamento. Os valores foram expressos com média \pm SEM e com $n=6$. Foi realizado os testes OneWay, ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental. Em seguida foi realizado o pós-teste Newman-Keuls $*p < 0,05$.

PARTE III – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DA LESÃO EXCISIONAL

5.6 Avaliação histopatológica qualitativa das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de *A. conyzoides*

Após a eutanásia dos animais, as lâminas foram confeccionadas, coradas com HE e avaliadas qualitativamente quanto aos aspectos da lesão inicial, como a presença de crosta, restos celulares e infiltrado inflamatório. A partir do quinto dia foram avaliados qualitativamente os novos vasos, fibroblastos e deposição do tecido de granulação. Após 28 dias de tratamento foram avaliados principalmente a deposição das fibras colágenas.

5.6.1 A avaliação histopatológica qualitativa das lesões excisionais após um dia de tratamento com o óleo essencial de *A. conyzoides* revelou um menor infiltrado inflamatório no grupo TOX

Os animais do grupo salina, após um dia de tratamento, apresentaram uma presença marcante de células inflamatórias no leito da ferida e nos tecidos adjacentes, com predominância de neutrófilos. Esse infiltrado inflamatório se apresentava qualitativamente maior quando comparado aos grupos TOX e TOY que receberam o óleo essencial de *A. conyzoides* como tratamento. Havia a presença de um tampão hemostático nas lesões e logo abaixo desse a presença de restos celulares e edema. Os vasos apresentavam-se menos hiperemiados que os grupos DMSO, TOX e TOY, e não era possível detectar células fibroblásticas.

Os animais do grupo DMSO, após um dia de tratamento, apresentaram um tampão rico em fibrinas e restos celulares, próximas a borda da lesão. Os vasos sanguíneos se apresentavam hiperemiados. Observou-se em todos os animais uma área edemaciada com muitos fragmentos celulares abaixo do tampão hemostático. Foi observada a presença de um infiltrado inflamatório nos tecidos adjacentes e no

leito da lesão sobre a rede de fibrinas, com predomínio de neutrófilos, seguido de linfócitos. O infiltrado inflamatório apresentava-se qualitativamente maior quando comparado aos grupos TOX e TOY, e qualitativamente menor quando comparado ao grupo salina. Uma concentração de tecido adiposo foi observada na extensão da lesão na maioria dos animais.

Os animais do grupo TOX, após um dia de tratamento, também apresentaram um tampão hemostático rico em fibrinas e restos celulares. Os vasos sanguíneos apresentavam-se característicos ao grupo DMSO. No leito da ferida e nas adjacências, percebeu-se um infiltrado inflamatório mais discreto quando comparado ao grupo salina e DMSO, com predominância de neutrófilos. Já era possível perceber a presença de células fibroblásticas migrando para o leito da ferida.

Já nos animais do grupo TOY, após um dia de tratamento, observou-se um tampão formado com características próximas aos grupos DMSO e TOX. Abaixo desse tampão hemostático, notava-se um tecido edemaciado e com restos celulares. O infiltrado inflamatório apresentava-se predominantemente com células polimorfonucleares (neutrófilos), em menores quantidades que o grupo salina e DMSO. A maioria dos restos celulares estavam sobre a malha formada no leito da ferida e também havia a presença de alguns leucócitos já nessa área. Notava-se a presença de células fibroblásticas migrando para o leito da lesão.

Todos os sinais acima descritos são característicos da fase inicial do processo de cicatrização: hemostasia e reação inflamatória. Porém, já era possível observar nos grupos TOX e TOY, a presença precoce de células fibroblásticas, além de um infiltrado inflamatório bem menor quando comparado aos grupos salina e DMSO. Tais achados podem ser observados na figura 26.

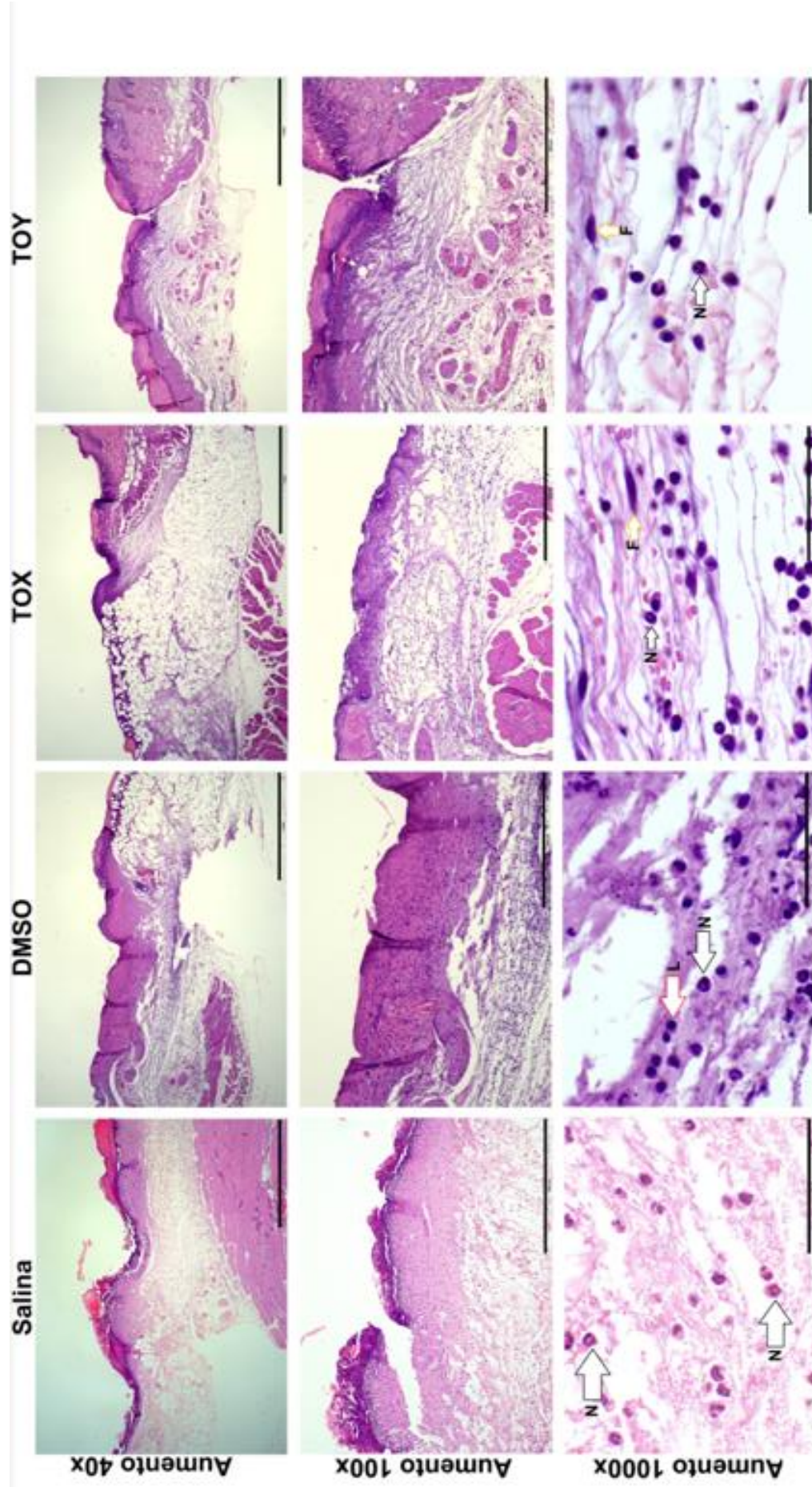


Figura 26 – O tratamento tóxico com o óleo essencial de *A. conyzoides* após um dia de aplicação diminuiu qualitativamente o infiltrado inflamatório nos animais do grupo TOX e TOY. Fotomicrografias das áreas das lesões coradas em HE dos grupos salina, DMSO, TOX e TOY no tempo experimental de um dia. No aumento de 40x, 1mm, acúmulo de células inflamatórias e restos celulares embaixo do tampão hemostático. No aumento de 100x, escala 500µm, observa-se um tecido edemaciado embaixo do tampão com muitos restos celulares no grupo salina e DMSO. Nos grupos TOX e TOY observa-se menor infiltrado inflamatório quando comparado aos demais grupos. No aumento de 1000x, 50µm, presença de linfócito nos grupos tratados. As setas brancas indicam os neutrófilos, as amarelas os fibroblastos e as vermelhas os linfócitos. Coloração em HE.

5.6.2 Avaliação histopatológica qualitativa das lesões excisionais após 5 dias de tratamento com o óleo essencial de *A. conyzoides* revela um atraso na deposição do tecido de granulação nos grupos TOX e TOY

Decorridos cinco dias de tratamento com o óleo essencial de *A. conyzoides* as feridas foram processadas, coradas com HE e analisadas de forma qualitativa. Nos animais tratados durante cinco dias com salina já era possível observar o início da reepitelização. Os animais apresentavam uma crosta mais espessa. Observou-se que esse grupo apresentava uma ligeira melhora na deposição do tecido de granulação no leito da ferida quando comparado aos demais grupos desse tempo. Os vasos sanguíneos apresentavam-se menos hiperemiados, e os tecidos com focos hemorrágicos, principalmente abaixo da crosta. O infiltrado inflamatório era maior que nos demais grupos. Encontrava-se área de edemas próximas a borda da lesão e acima do tecido adiposo. Era possível notar as primeiras células fibroblásticas no leito da ferida, ainda que em menor quantidade quando comparada aos demais grupos.

A reepitelização também foi iniciada nos animais do grupo DMSO. Era possível observar a crosta na superfície da lesão, com poucos restos de celulares abaixo. O leito da ferida estava preenchido com tecido de granulação. Percebia-se um menor número de células inflamatórias em relação ao grupo salina. Além disso, era possível visualizar uma nova vascularização e a presença de células fibroblásticas na área da lesão.

Os animais do grupo TOX apresentavam uma crosta mais espessa, com a presença de edema logo abaixo dela e restos celulares. A reepitelização estava em andamento e as células do epitélio multiplicavam-se em direção ao centro da ferida. Quando comparado ao grupo salina, o depósito do tecido de granulação estava um pouco mais tardio, acumulando-se principalmente nas laterais da ferida. Um tampão de fibrina preenchia toda a área da lesão dos animais. Encontravam-se células fibroblásticas no leito da ferida e poucas células inflamatórias.

Nos animais do grupo TOY a reepitelização encontrava-se bem no início. O depósito do tecido de granulação também era inicial e atrasado em relação a salina, porém estava melhor em relação ao grupo TOX. A presença de neovasos era discreta em relação ao grupo DMSO.

De modo geral, os grupos DMSO, TOX e TOY, apresentaram um menor infiltrado inflamatório e um maior número de células fibroblásticas, quando comparados ao grupo salina. Tais achados podem ser observados na figura 27.

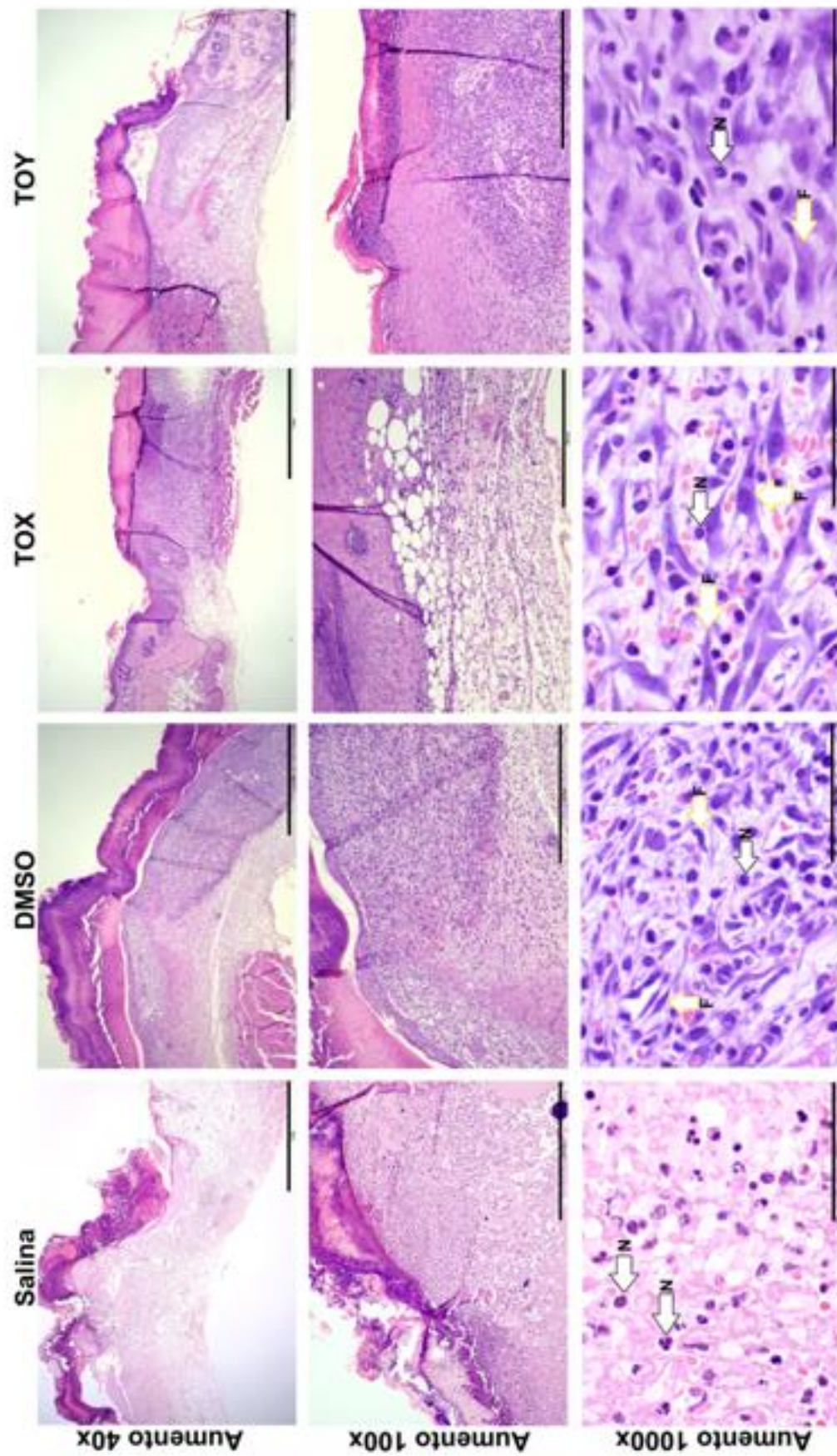


Figura 27 – O tratamento tópico com DMSO e o óleo essencial de *A. conyzoides* após cinco dias de aplicações diminuiu o infiltrado inflamatório e aumentaram o número de células fibroblásticas qualitativamente. Fotomicrografias das áreas das lesões coradas em HE dos grupos salina, DMSO, TOX e TOY no tempo experimental de cinco dias. No aumento de 100x, 500µm, observa-se no grupo salina e DMSO um melhor preenchimento da área da lesão com o tecido de granulação. Já no grupo TOX, percebe-se um início da deposição do tecido de granulação com regiões mais internas, onde encontra-se o tecido adiposo. Destaca-se também a presença de células inflamatórias na área da lesão em todos os grupos. No aumento de 1000x, 50µm, nota-se uma marcante presença de células fibroblásticas nos grupos DMSO, TOX e TOY. As setas brancas indicam os neutrófilos e as amarelas os fibroblastos. Coloração em HE.

5.6.3 Avaliação histopatológica qualitativa das lesões excisionais após 7 dias de tratamento com o óleo essencial de *A. conyzoides* revela uma diminuição do padrão inflamatório e aumento dos neovasos em todos os grupos

Após sete dias da confecção da lesão e tratamento das mesmas, foi observado em todos os grupos a presença do tecido de granulação. No grupo salina era possível notar a presença do tecido de granulação mais depositado nas bordas da lesão. Quando comparado ao grupo DMSO, esse tecido se apresentava menos espesso. Era possível notar, mesmo que qualitativamente, menor número de células fibroblásticas e maior infiltração de neutrófilos. A reepitelização já era observada, porém não completa. Presença de focos de hemorragia e fibrina sob a crosta.

No grupo DMSO notava-se que a reepitelização estava em andamento, porém não completa, apesar de estar mais avançada em alguns animais. Quanto ao tecido de granulação, esse preenchia a área da lesão e era mais espesso, quando comparado ao grupo salina. Presença de um menor infiltrado inflamatório, com predomínio de células mononucleares. Encontrava-se um número elevado células fibroblásticas e de novos vasos quando comparados ao demais grupos.

Quanto ao grupo TOX, a reepitelização também se encontrava em andamento, a deposição do tecido de granulação estava semelhante ao grupo DMSO e o infiltrado inflamatório também estava menor, com predomínio de células mononucleares. No leito da ferida notava-se a presença de neovasos e um número elevado de células fibroblásticas.

No grupo TOY, a reepitelização estava mais tardia e a crosta se apresentava mais espessa. Encontrava-se uma quantidade maior de restos celulares embaixo da crosta quando comparado aos grupos DMSO e TOX. Com fibrina no leito da ferida e início da deposição do tecido de granulação que apresentava atraso. O infiltrado inflamatório apresentava-se também menor. Tais achados podem ser observados na figura 28.

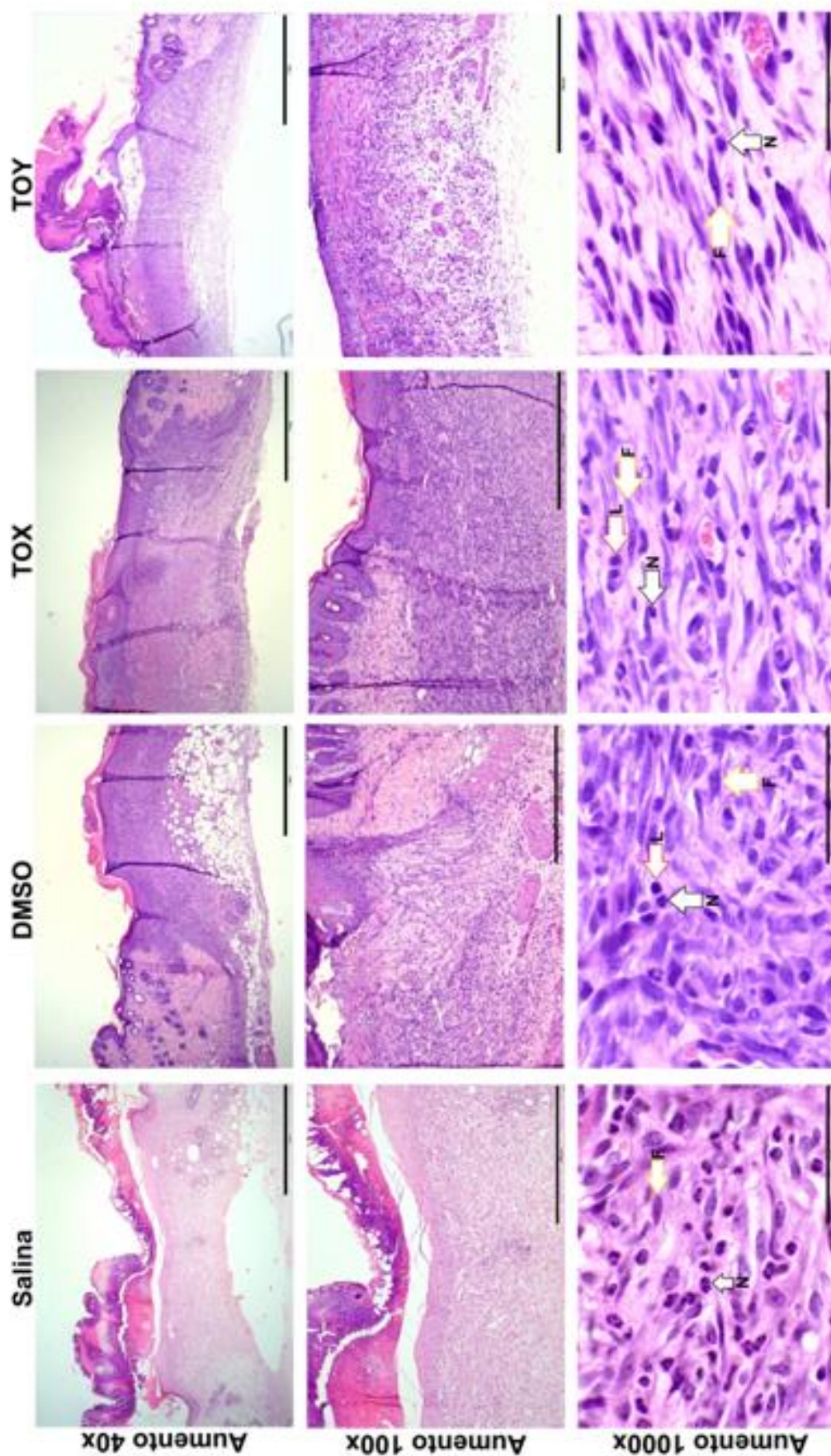


Figura 28 – O tratamento tópico com DMSO e o óleo essencial de *A. conyzoides* diminuiu o infiltrado inflamatório e aumentaram o número de células fibroblásticas qualitativamente. Fotomicrografias das áreas das lesões coradas em HE dos grupos salina, DMSO, TOX e TOY no tempo experimental de sete dias. No aumento de 100x, 500µm, observa-se nos grupos DMSO, TOX e TOY um aumento qualitativo do número de novos vasos formados na área da lesão. Observa-se também uma ligeira diminuição do infiltrado inflamatório, quando comparados a salina. As setas brancas indicam os neutrófilos e as amarelas os fibroblastos. Coloração em HE.

5.6.4 Avaliação histopatológica qualitativa das lesões excisionais após 28 dias de tratamento com o óleo essencial de *A. conyzoides* mostrou completa reepitelização nos animais do grupo TOX e TOY

Ao avaliar qualitativamente e microscopicamente as feridas dos animais do grupo DMSO, após 28 dias de tratamento, notou-se que apenas um animal não apresentava uma completa reepitelização. Tal fato corrobora com a análise macroscópica da lesão. Os demais animais apresentavam um epitélio um pouco mais hiperproliferado. As fibras da derme apresentavam-se densas e era possível notar fibroblastos no leito da cicatriz. Devido a alta densidade das fibras na derme não foi possível fazer a diferenciação quanto à disposição das fibras. No entanto percebe-se que os fibroblastos estão dispostos longitudinalmente.

No grupo TOX todas as lesões estavam cicatrizadas, com um denso depósito de matriz e uma redução no número de fibroblastos quando comparados ao grupo DMSO. Os mesmos apresentam-se dispostos de maneira longitudinal na área de reparo. Observa-se um número reduzido de células inflamatórias e era possível ainda encontrar neovasos no leito da cicatriz.

A maioria dos animais do grupo TOY, após 28 dias de tratamento, apresentavam um epitélio também um pouco hiperproliferado. A matriz depositada encontrava-se semelhante ao grupo TOX. Ainda foram encontrados fibroblastos dispostos em sua maioria de forma longitudinal. Em alguns campos observou-se fibroblastos dispostos de maneira desordenada. Também foi observado um número reduzido de células inflamatórias e a presença de neovasos no leito no novo tecido formado.

Não foi encontrado a presença de nervos, folículos pilosebáceos ou outros anexos na área da cicatriz. Embora todos os animais estivessem em estágio de remodelamento, percebe-se um avanço qualitativo desse estágio nos animais do grupo TOX. Tais achados podem ser observados na figura 29.

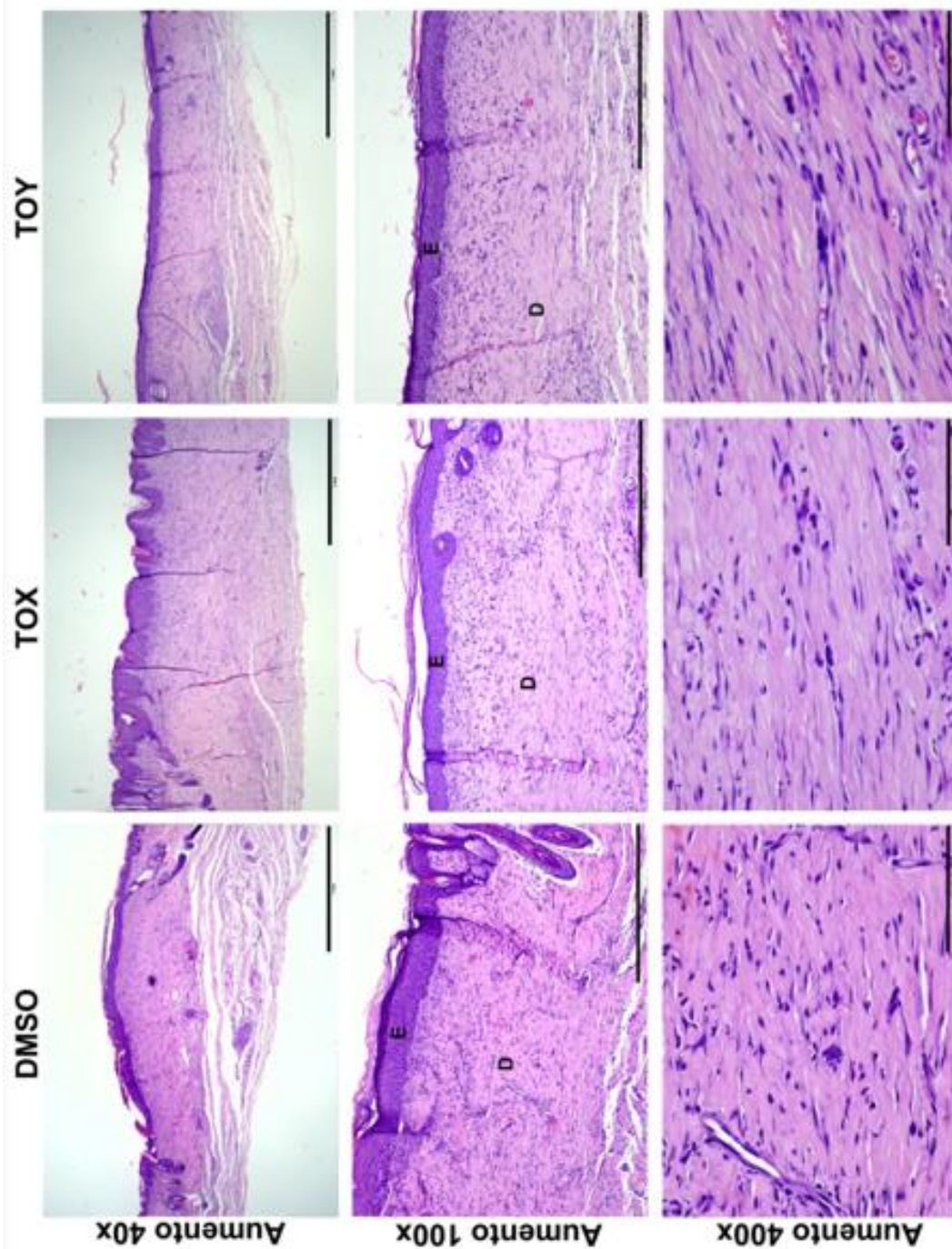


Figura 29 – O tratamento tópico com o óleo essencial de *A. conyzoides* após 28 dias, **epitelizou** todos os animais do grupo TOX e TOY. Fotomicrografias das áreas das lesões coradas em HE dos grupos DMSO, TOX e TOY no tempo experimental de vinte e oito dias. No aumento de 100x, 500µm, nota-se nos animais dos grupos tratados com o óleo essencial, a diminuição do número de fibroblastos. No aumento de 1000x, 50µm, observa-se a deposição das densas fibras da matriz, também nos grupos tratados com o óleo essencial de *A. conyzoides*. Coloração em HE.

5.7 Avaliação da reepitelização e da crosta das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de *A. conyzoides*

Para avaliar a reepitelização e as crostas das lesões excisionais, após processamento e coloração das lâminas em HE, os cortes foram pontuados de acordo com os parâmetros de cada análise morfológica. Dessa forma, após análise dos cortes e pontuação pelo escore, nota-se que os animais dos grupos TOX e TOY, após 28 dias de tratamento com o óleo essencial de *A. conyzoides*, não apresentavam crostas na superfície da lesão, conforme indica a figura 30.

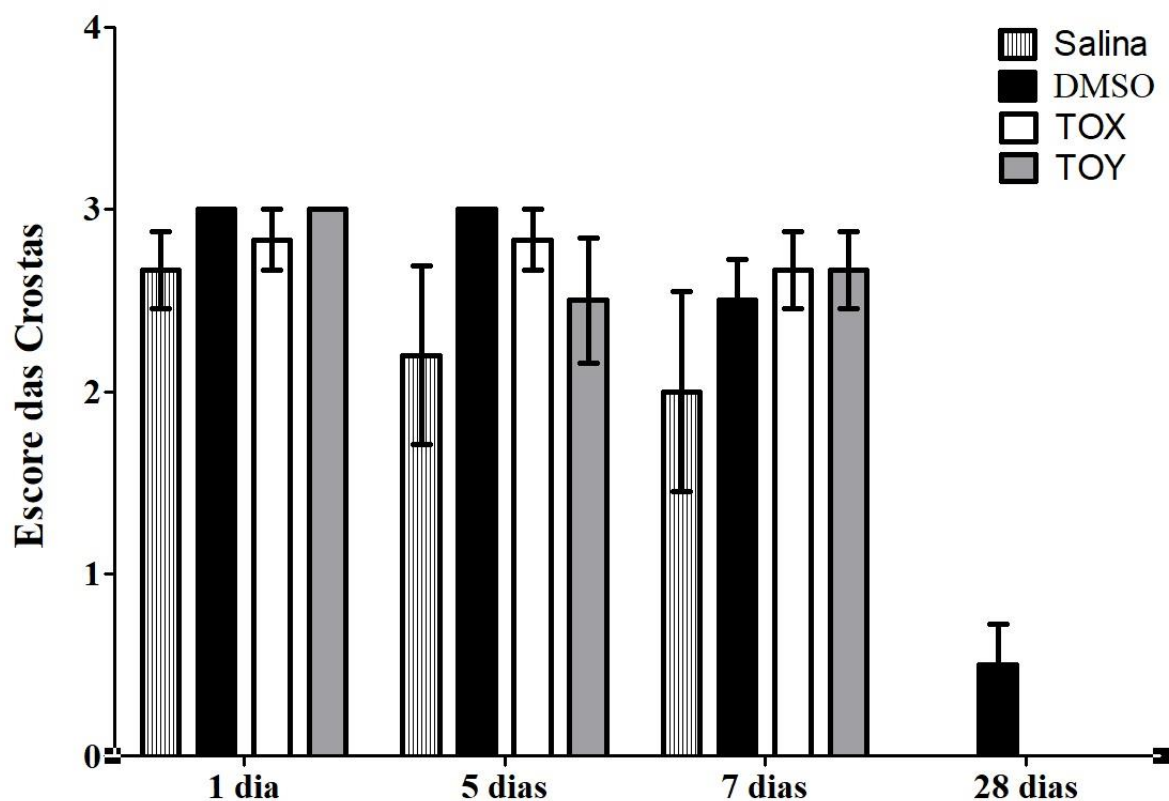


Figura 19 – Após 28 dias de tratamento tópico com o óleo essencial de *A. conyzoides*, os animais dos grupos TOX e TOY não apresentavam mais crostas. Após pontuação do escore, é possível notar que os animais dos grupos TOX e TOY após 28 dias de tratamento, não apresentavam crostas na superfície da lesão.

A partir do quinto dia de tratamento, já era possível observar o início da epitelização nos grupos DMSO, TOX e TOY. A partir do décimo quarto dia de tratamento, essa epitelização se torna completa e uniforme em todos os grupos. Após vinte e oito dias de tratamento, um animal do grupo DMSO não apresentava epitelização completa. Após análise dos cortes e pontuação pelo escore, pode-se observar os resultados na Figura 31.

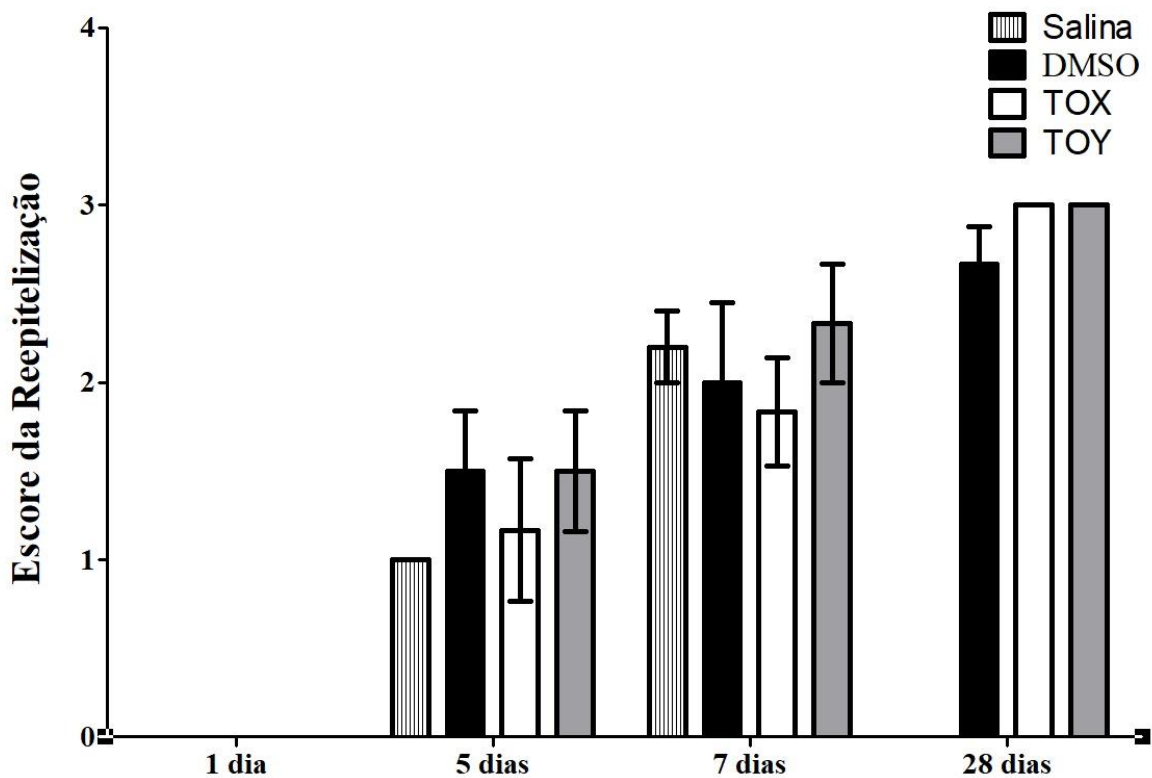


Figura 20 – Após 28 dias de tratamento tópico com o óleo essencial de *A. conyzoides*, todos os animais dos grupos TOX e TOY apresentavam completa epitelização. Após pontuação do escore, é possível notar que os animais dos grupos TOX e TOY após 28 dias de tratamento, apresentavam lesões completamente epitelizadas.

5.8 Avaliação morfométrica dos leucócitos das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de *A. conyzoides*

Após 1, 5 e 7 dias da confecção da lesão, as lâminas histopatológicas coradas com HE foram avaliadas quanto ao número de leucócitos no leito da lesão.

O infiltrado inflamatório após um dia de tratamento foi maior nos grupos salina ($62,76 \pm 10,380$) e DMSO ($60,87 \pm 4,685$). O número de leucócitos mostrou-se estatisticamente menor nos grupos que receberam o tratamento com o óleo essencial de *A. conyzoides*: grupos TOX ($36,85 \pm 3,637$) e TOY ($34,82 \pm 3,990$) em relação ao grupo salina e DMSO, com $p = 0,0042$, conforme ilustra figura 32.

Na morfometria dos leucócitos no tempo de cinco dias foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados, sendo $p = 0,0026$. As diferenças foram observadas entre os grupos DMSO ($27,083 \pm 4,429$), TOX ($27,54 \pm 3,281$) e TOY ($22,537 \pm 1,350$) em relação ao grupo salina ($52,14 \pm 8,791$), conforme ilustra a figura 33.

Após sete dias de tratamento, foram observadas diferenças estatísticas, entre os grupos DMSO ($34,02 \pm 3,115$), TOX ($39,751 \pm 2,927$) e TOY ($28,440 \pm 3,288$) com o grupo salina ($56,800 \pm 7,302$), sendo $p = 0,0022$, conforme ilustra a figura 34.

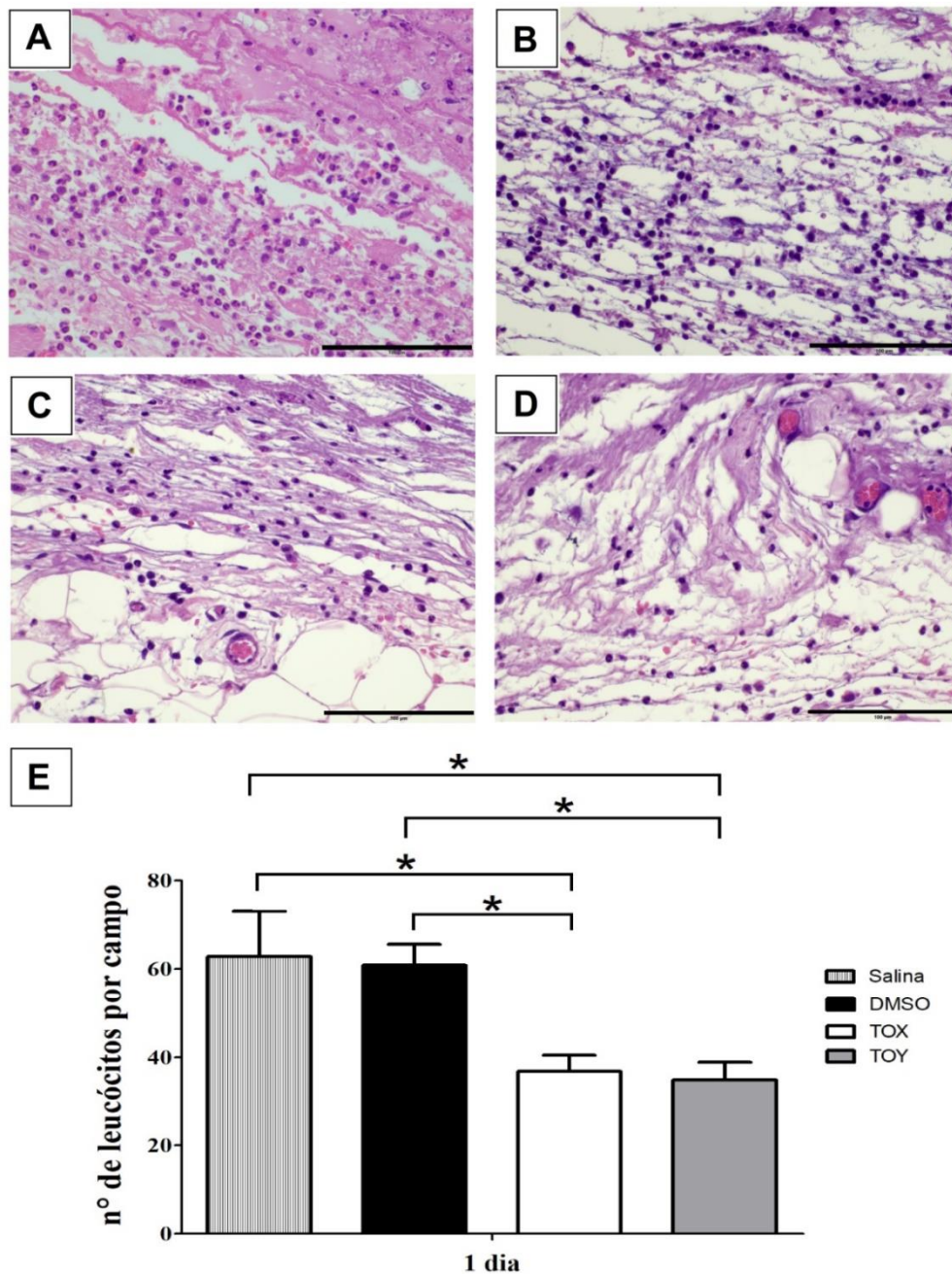


Figura 21 – A aplicação tópica do óleo essencial de *A. conyzoides* diminuiu o infiltrado inflamatório dos grupos TOX e TOY após um dia de tratamento. Em A fotomicrografias representativas da área da lesão, coradas com HE, aumento 400x, escala de 100 μ m, do grupo que recebeu salina. Em B fotomicrografias representativas da área da lesão, coradas com HE, aumento 400x, escala de 100 μ m, do grupo que recebeu DMSO. Em C fotomicrografias representativas da área da lesão, coradas com HE, aumento 400x, escala de 100 μ m, do grupo TOX, tratado com óleo essencial de *A. conyzoides*. Em D fotomicrografias representativas da área da lesão, coradas com HE, aumento 400x, escala de 100 μ m, do grupo TOY, tratado com óleo essencial de *A. conyzoides*. Em E avaliação morfométrica dos leucócitos no tempo de um dia. Observa-se uma redução estatisticamente significativa do infiltrado inflamatório nos grupos que receberam o óleo essencial de *A. conyzoides*, $p = 0,0042$. Os valores foram expressos com média \pm SEM e com $n=6$. Foi realizado os testes OneWay, ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental. Em seguida foi realizado o pós-teste Newman-Keuls sendo considerado $p < 0,05$. As diferenças estatísticas entre os grupos são representadas por um colchete e um asterisco. Coloração em HE.

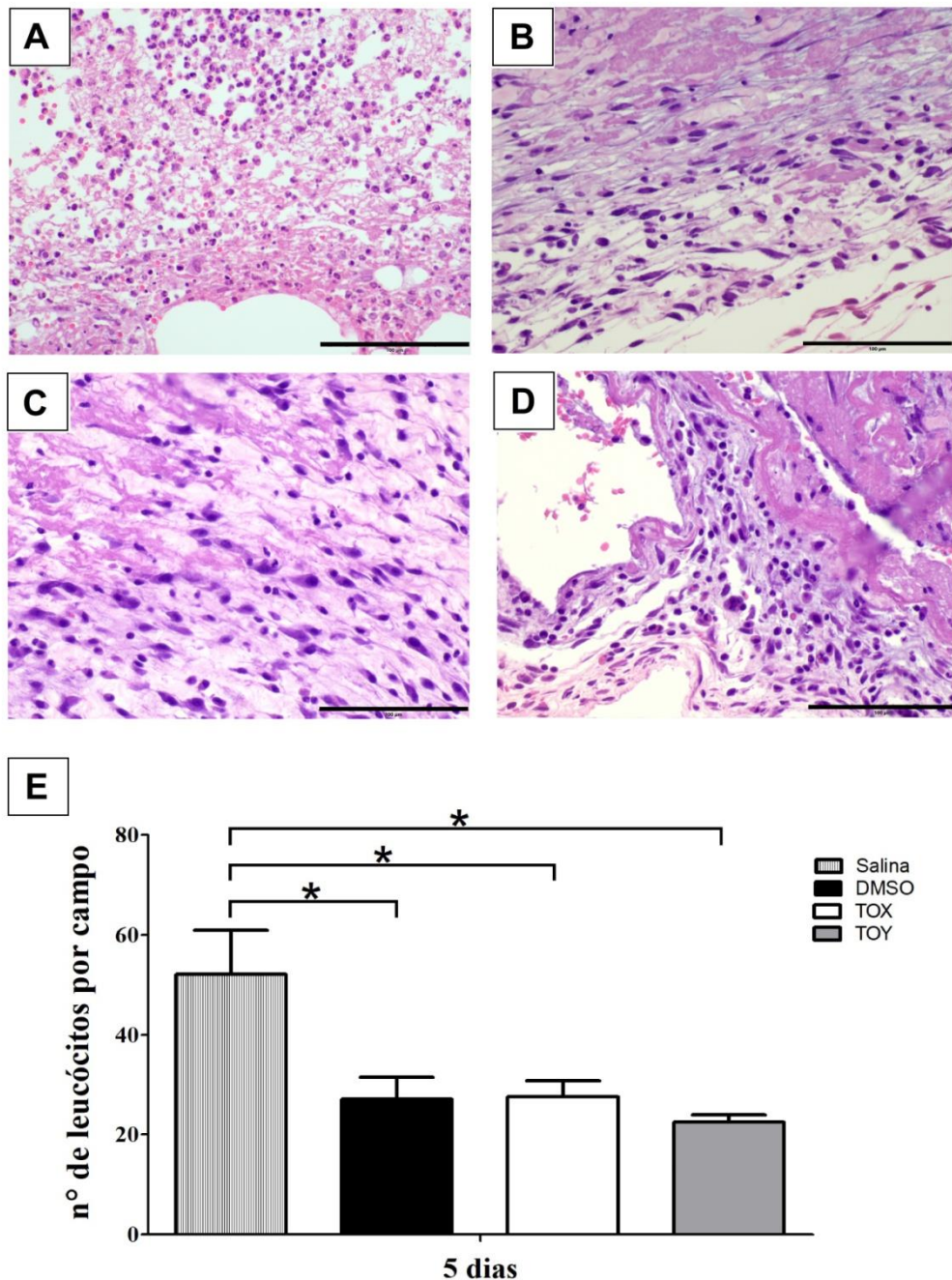


Figura 22 – A aplicação tópica do óleo essencial de *A. conyzoides* diminuiu o infiltrado inflamatório dos grupos DMSO, TOX e TOY após cinco dias de tratamento. Em A fotomicrografias representativas da área da lesão, coradas com HE, aumento 400x, escala de 100 μ m, do grupo que recebeu salina. Em B fotomicrografias representativas da área da lesão, coradas com HE, aumento 400x, escala de 100 μ m, do grupo que recebeu DMSO. Em C fotomicrografias representativas da área da lesão, coradas com HE, aumento 400x, escala de 100 μ m, do grupo TOX, tratado com óleo essencial de *A. conyzoides*. Em D fotomicrografias representativas da área da lesão, coradas com HE, aumento 400x, escala de 100 μ m, do grupo TOY, tratado com óleo essencial de *A. conyzoides*. Em E avaliação morfométrica dos leucócitos no tempo de cinco dias. Observa-se uma redução estatisticamente significativa do infiltrado inflamatório nos grupos DMSO, TOX e TOY, com $p=0,0026$. Os valores foram expressos com média \pm SEM e com $n=6$. Foi realizado os testes OneWay, ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental. Em seguida foi realizado o pós-teste Newman-Keuls sendo considerado $p < 0,05$. As diferenças estatísticas entre os grupos são representadas por um colchete e um asterisco. Coloração em HE.

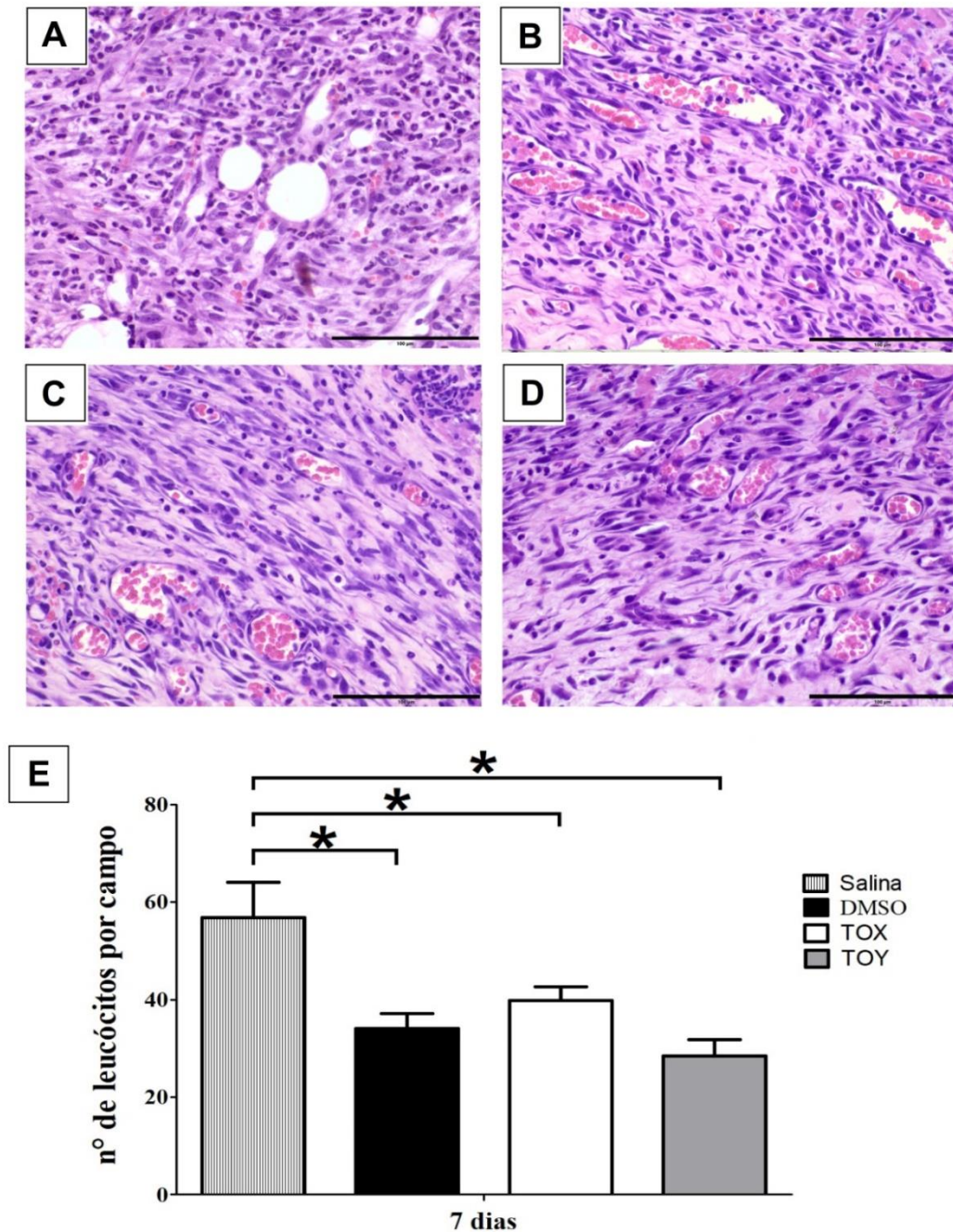


Figura 23 – A aplicação tópica do óleo essencial de *A. conyzoides* diminuiu o infiltrado inflamatório dos grupos DMSO, TOX e TOY após sete dias de tratamento. Em A fotomicrografias representativas da área da lesão, coradas com HE, aumento 400x, escala de 100 μ m, do grupo que recebeu salina. Em B fotomicrografias representativas da área da lesão, coradas com HE, aumento 400x, escala de 100 μ m, do grupo que recebeu DMSO. Em C fotomicrografias representativas da área da lesão, coradas com HE, aumento 400x, escala de 100 μ m, do grupo TOX, tratado com óleo essencial de *A. conyzoides*. Em D fotomicrografias representativas da área da lesão, coradas com HE, aumento 400x, escala de 100 μ m, do grupo TOY, tratado com óleo essencial de *A. conyzoides*. Em E avaliação morfométrica dos leucócitos no tempo de cinco dias. Observa-se uma redução estatisticamente significativa do infiltrado inflamatório nos grupos DMSO, TOX e TOY, com $p=0,0022$. Os valores foram expressos com média \pm SEM e com $n=6$. Foi realizado os testes OneWay, ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental. Em seguida foi realizado o pós-teste Newman-Keuls sendo considerado $p < 0,05$. As diferenças estatísticas entre os grupos são representadas por um colchete e um asterisco. Coloração em HE.

5.9 Avaliação morfológica dos mastócitos das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de *A. conyzoides* revela um aumento no número dessas células após 28 dias de tratamento nos grupos TOX e TOY

Após 1, 5, 7, e 28 dias da confecção da lesão, as lâminas histopatológicas foram coradas com Azul de Toluidina e avaliadas quanto ao número de mastócitos no leito da lesão

Na análise morfológica dos mastócitos, após 1, 5 e 7 dias de tratamento, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados. Em um dia DMSO ($31,25 \pm 3,449$), TOX ($36,25 \pm 3,881$) e TOY ($30,75 \pm 4,888$). Em cinco dias, DMSO ($33,25 \pm 1,548$), TOX ($38,0 \pm 9,609$) e TOY ($39,6 \pm 5,325$). Em sete dias, DMSO ($58,5 \pm 88,55$), TOX ($45,75 \pm 4,211$) e TOY ($40,25 \pm 4,211$). Em relação à distribuição dessas células, em todos os grupos, foi observado um número menor de mastócitos na área da lesão, enquanto as bordas e a derme adjacente apresentaram um número maior dessas células, conforme ilustra a figura 35.

Após o tempo final de 28 dias de tratamento, a análise morfológica dos mastócitos revelou uma diferença estatística entre os grupos TOX ($200,0 \pm 28,0$) vs DMSO ($110,0 \pm 17,24$) e TOY ($179,8 \pm 21,76$) vs DMSO ($110,0 \pm 17,24$), sendo $p = 0,0275$ (Figura 36). Em relação à distribuição dessas células, foi possível notar uma presença marcante de mastócitos no leito da cicatriz e na derma adjacente dos animais dos grupos TOX e TOY. Enquanto os animais do grupo DMSO apresentaram um menor infiltrado de mastócitos.

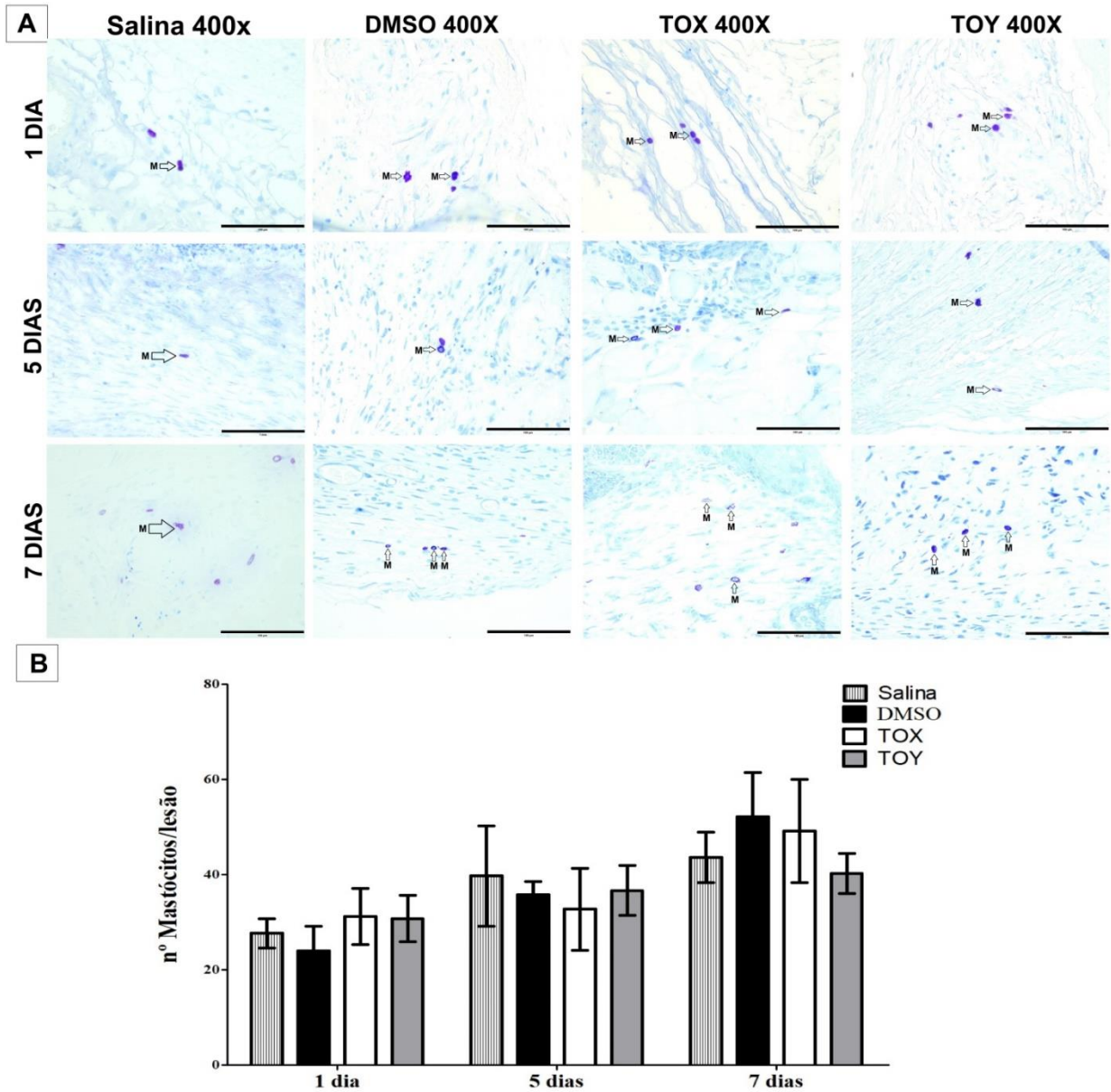


Figura 24 – A aplicação tópica do óleo essencial de *A. conyzoides* não altera o número de mastócitos nos tempos de 1, 5 e 7 dias. Em A, fotomicrografias representativas das lesões excisionais dos animais tratados com salina, DMSO e com o óleo essencial de *A. conyzoides* (grupos TOX e TOY), duas vezes ao dia, nos períodos de 1, 5 e 7 dias, após coloração com azul de toluidina para análise dos mastócitos. As setas pretas indicam os mastócitos. Aumento de 400x. Escala de barras 100µm. Em B, o gráfico estatístico da análise do número de mastócitos por lesão. Os valores foram expressos com média \pm SEM e com n=6. Foi realizado os testes OneWay, ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental. Em seguida foi realizado o pós-teste Newman-Keuls sendo considerado $p < 0,05$. Coloração Azul de Toluidina.

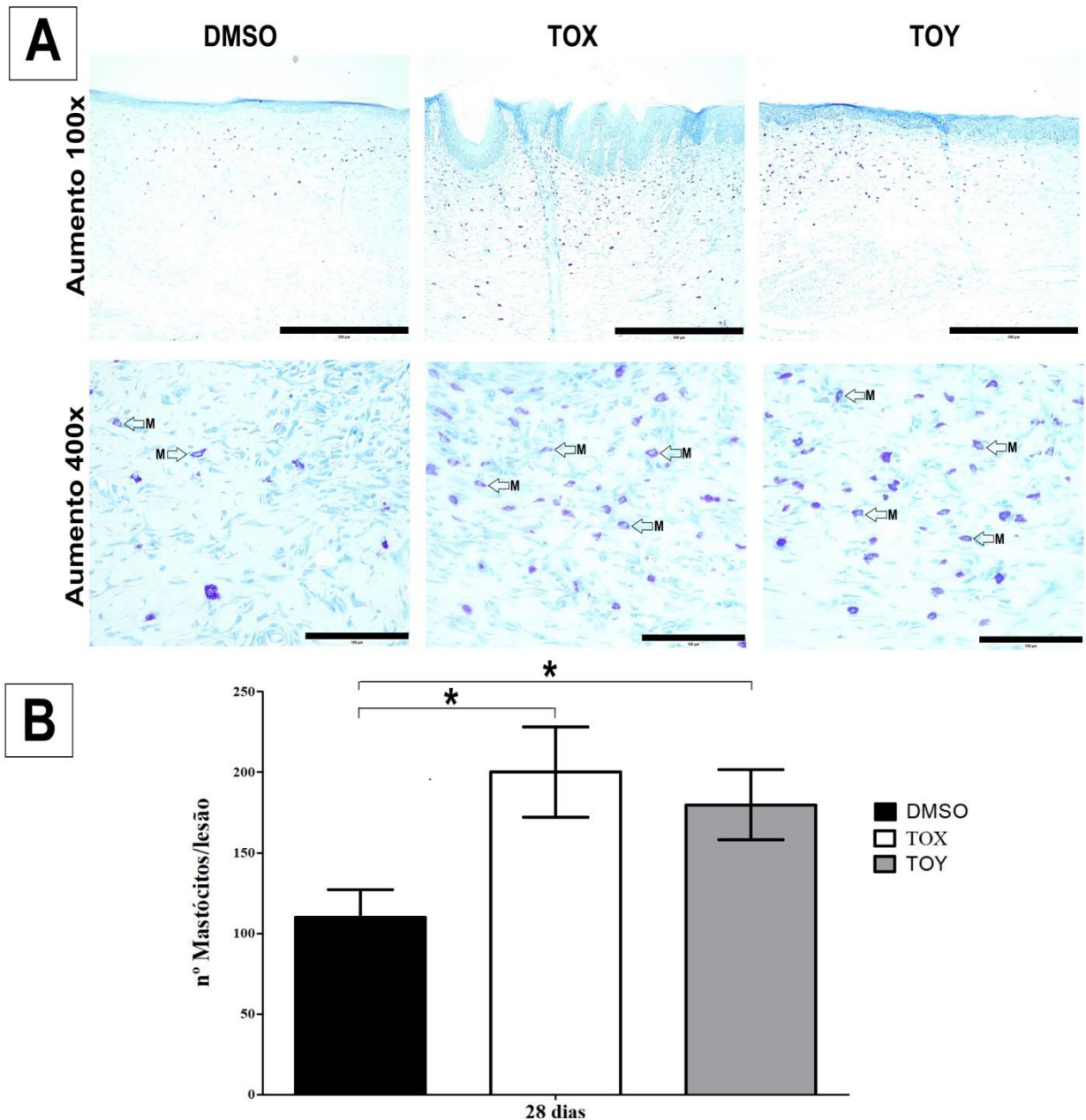


Figura 25 – A aplicação tópica do óleo essencial de *A. conyzoides* altera o número de mastócitos no tempo de 28 dias. Fotomicrografias representativas das lesões excisionais dos animais tratados com DMSO e dos animais tratados com o óleo essencial de *A. conyzoides* (grupos TOX e TOY), duas vezes ao dia, no período de 28 dias, após coloração com azul de toluidina para análise dos mastócitos. Em A, no aumento de 100x, escala de barras 500µm, percebe-se um aumento no número dos mastócitos no leito da lesão dos grupos TOX e TOY. No aumento de 400x, escala de barras 100µm, as setas pretas indicam os mastócitos. Na avaliação morfométrica entre os animais dos grupos controle, TOX e TOY no tempo de 28 dias percebe-se uma diferença estatística entre os grupos TOX vs DMSO e os grupos TOY vs DMSO, sendo $p=0,0275$. Em B o gráfico estatístico da análise do número de mastócitos por lesão. Os valores foram expressos com média \pm SEM e com $n=6$. Foi realizado os testes OneWay, ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental. Em seguida foi realizado o pós-teste Newman-Keuls sendo considerado $p < 0,05$. As diferenças estatísticas entre os grupos são representadas por um colchete e um asterisco. Coloração Azul de Toluidina.

5.10 Avaliação morfométrica dos vasos sanguíneos das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de *A. conyzoides* nos tempos de 5 e 7

No período de 5 e 7 dias foram quantificados os novos vasos sanguíneos visto que nesses tempos já se observava o início do processo da angiogênese. Foi considerado um novo vaso aquele que apresentasse até três células endoteliais em sua parede.

Nos animais dos grupos tratados no tempo de cinco dias não foram observadas diferenças estatísticas, sendo salina ($1,740 \pm 0,4130$), DMSO ($2,067 \pm 0,4264$), TOX ($1,375 \pm 0,2287$) e TOY ($1,883 \pm 0,2688$). Também não foi observada nenhuma diferença estatística na quantidade de novos vasos formados entre os grupos salina ($2,040 \pm 0,2542$), DMSO ($3,425 \pm 0,9437$), TOX ($2,700 \pm 0,3022$) e TOY ($1,872 \pm 0,6420$) no tempo de 7 dias. Tais resultados podem ser observados na figura 37.

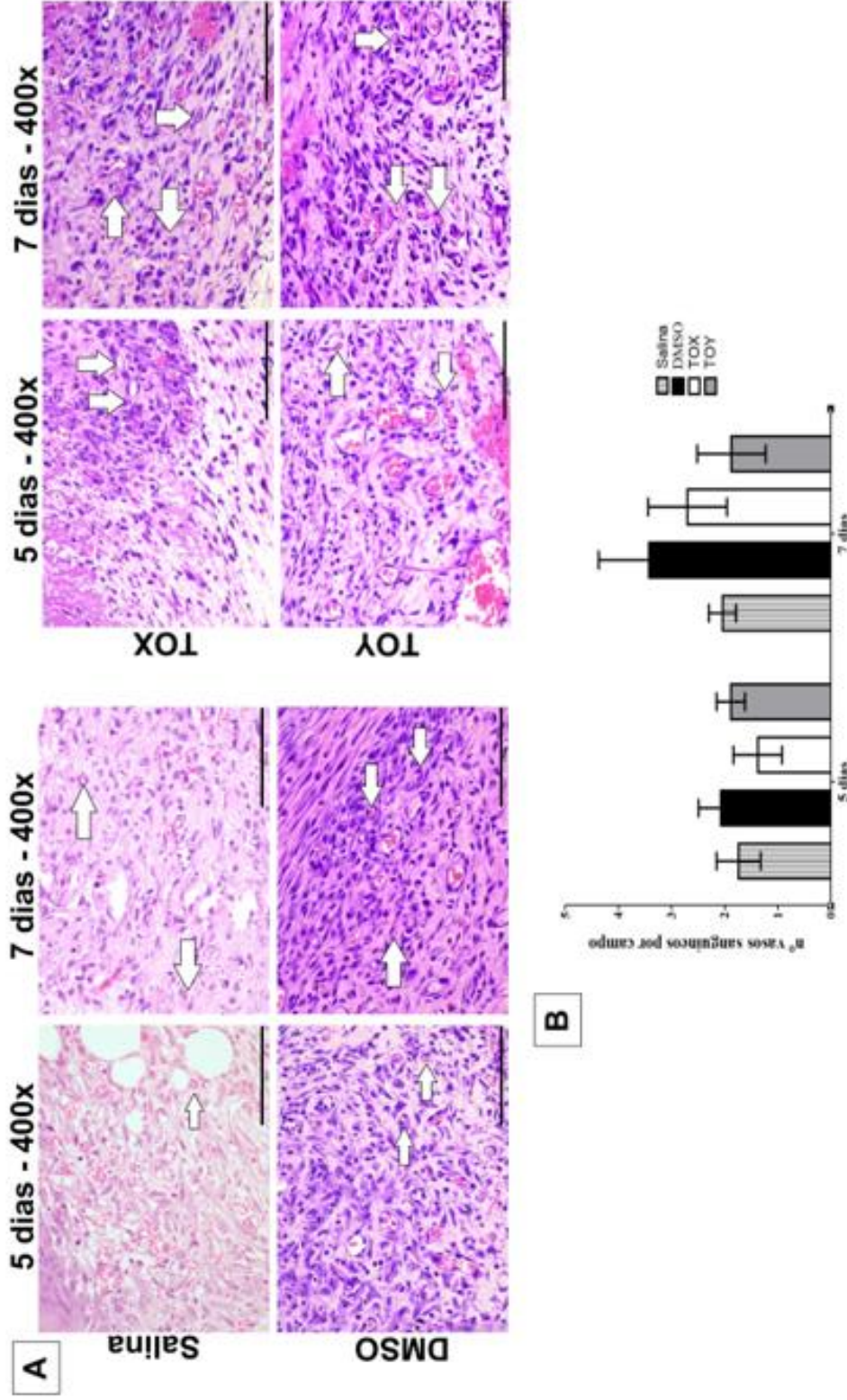


Figura 37 – A aplicação tópica do óleo essencial de *A. conyzoides* não altera o número de novos vasos nos tempos de 5 e 7 dias. Em A, fotomicrografias representativas das lesões excisionais dos animais tratados com salina, DMSO e dos animais tratados com o óleo essencial de *A. conyzoides* (grupos TOX e TOY), duas vezes ao dia, nos períodos de 5 e 7 dias, após coloração com HE. As setas pretas vazadas indicam a formação dos novos vasos. Aumento de 400x. Escala de barras 100 μ m. Em B, na avaliação morfométrica entre os animais dos grupos salina, DMSO, TOX e TOY nos tempos de 5 e 7 dias percebe-se que não houve diferenças estatísticas significativas. Os valores foram expressos com média \pm SEM e com n=6. Foi realizado os testes OneWay, ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental. Em seguida foi realizado o pós-teste Newman-Keuls sendo considerado $p < 0,05$. Coloração em HE.

5.11 Avaliação da deposição das fibras colágenas das lesões excisionais tratadas com o óleo essencial de *A. conyzoides*

Os grupos DMSO, TOX e TOY, foram comparados entre si, após 28 dias de tratamento, por meio da coloração com o tricrômico de Masson, para análise da deposição das fibras colágenas durante a fase de remodelamento.

No 28º dia, as lesões dos animais tratados com DMSO, em relação aos grupos TOX e TOY, apresentaram maior concentração de tecido de granulação, com fibras colágenas mais desorganizadas na região da derme papilar e com fibras colágenas de menor espessura na região da derme reticular. As lesões dos animais do grupo TOX apresentaram uma maior substituição do tecido de granulação por fibras colágenas, que se apresentavam desorganizadas tanto na derme papilar como na derme reticular. As lesões dos animais do grupo TOY apresentaram uma substituição, quase que completa, do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso, com fibras colágenas organizadas, mais espessas e dispostas em paralelo, em todas as regiões da derme, apresentando uma possível ação favorável à deposição e disposição das fibras colágenas, conforme ilustra a figura 38

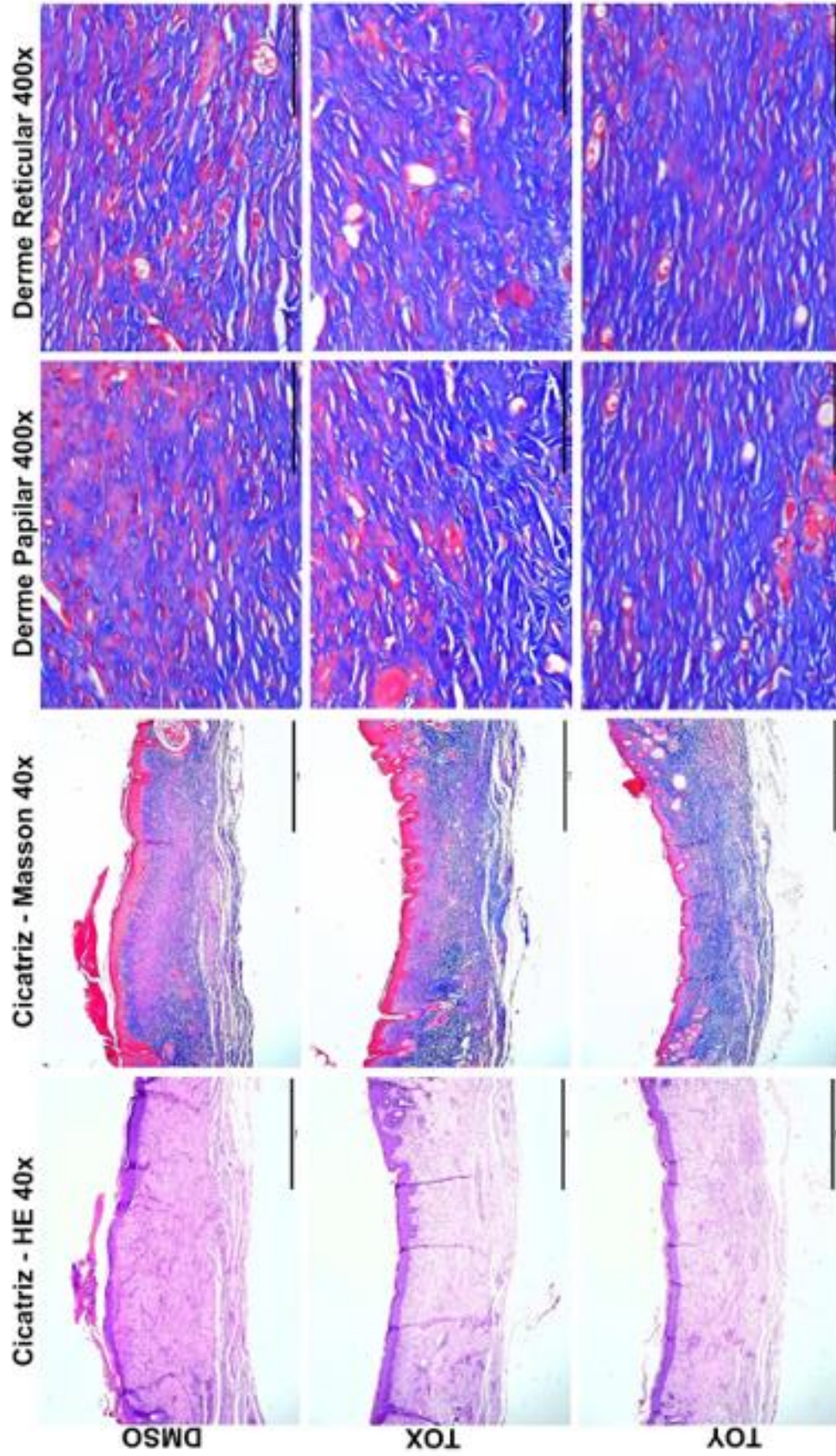


Figura 38 – Deposição das fibras colágenas nos grupos TOX e TOY, após 28 dias de tratamento, apresentam fibras mais espessas. Fotomicrografias dos fragmentos de pele com cicatriz, após 28 dias de tratamento. Observa-se a deposição das fibras colágenas nos grupos DMSO, TOX e TOY, coradas com o tricrômico de Masson, no aumento de 40x, escala 1mm, e comparadas com as fotomicrografias correspondentes coradas com HE, também no aumento de 40x, escala 1mm. Posteriormente observa-se a deposição das fibras colágenas na derme papilar e reticular, no aumento de 400x, escala 100 μ m. Nota-se aparentemente maior densidade das fibras colágenas nos grupos TOX e TOY. Coloração Tricrômico de Masson.

5.12 Avaliação imuno-histoquímica dos macrófagos na lesão excisional nos animais tratados com o óleo essencial de *A. conyzoides*

Foi observado a partir de um dia a presença de macrófagos nas bordas da ferida e no leito da lesão. Para confirmação da presença dessas células, nesse tempo, foi realizada a imuno-histoquímica. Após marcação e análise qualitativa dos macrófagos, percebe-se maior infiltração dessas no grupo DMSO, seguido do grupo TOY, TOX e salina, conforme figura 39.

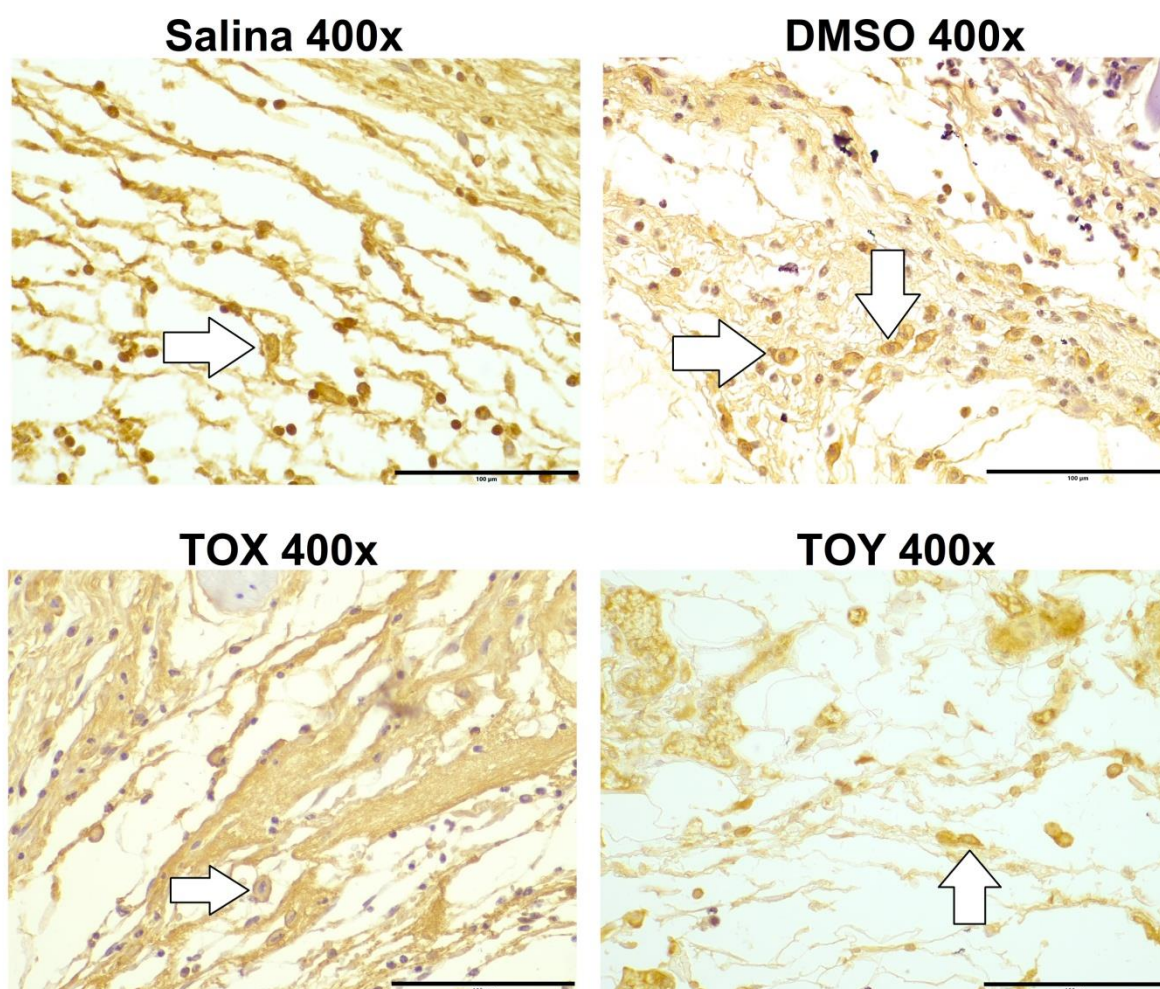


Figura 26 – Imunomarcacão com o anticorpo F480, nas feridas excisionais, no tempo de um dia. Fotomicrografias representativas das lesões excisionais dos animais dos grupos salina, DMSO, TOY e TOY, aumento 400x, escala 100μm. No grupo DMSO evidencia-se qualitativamente uma maior presença de macrófagos. As setas brancas indicam os macrófagos.

PARTE IV – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS FÍGADOS

5.13 Avaliação macroscópica e histopatológica dos fígados dos animais tratados com o óleo essencial de *A. conyzoides*

Após eutanásia, os fígados foram retirados, pesados e processados histologicamente, para avaliação de possíveis lesões hepáticas. Em relação ao peso do órgão, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Após 7 dias de tratamento, os valores encontrados foram: DMSO (2,249 g \pm 0,125), TOX (2,436 g \pm 0,197) e TOY (2,330 g \pm 0,111). Após 28 dias, DMSO (2,230 g \pm 0,079), TOX (1,978 g \pm 0,183) e TOY (2,336 g \pm 0,115), conforme ilustra a figura 40 – B.

Em relação à avaliação anatomopatológica, não foram observadas alterações macro e microscópica na morfologia dos fígados nos tempos de 7 e 28 dias. Macroscopicamente, a arquitetura hepática estava preservada e sem evidências de necrose. Microscopicamente, o parênquima hepático estava preservado, sem a presença de áreas de necrose. Os hepatócitos se apresentavam normais e poliédricos, com citoplasma acidófilo normal devido ao grande número de mitocôndrias nessas células e ausência de acúmulos intracelulares anormais. Os capilares sinusoides não apresentaram sinais de alteração, conforme ilustra a figura 40 - A.

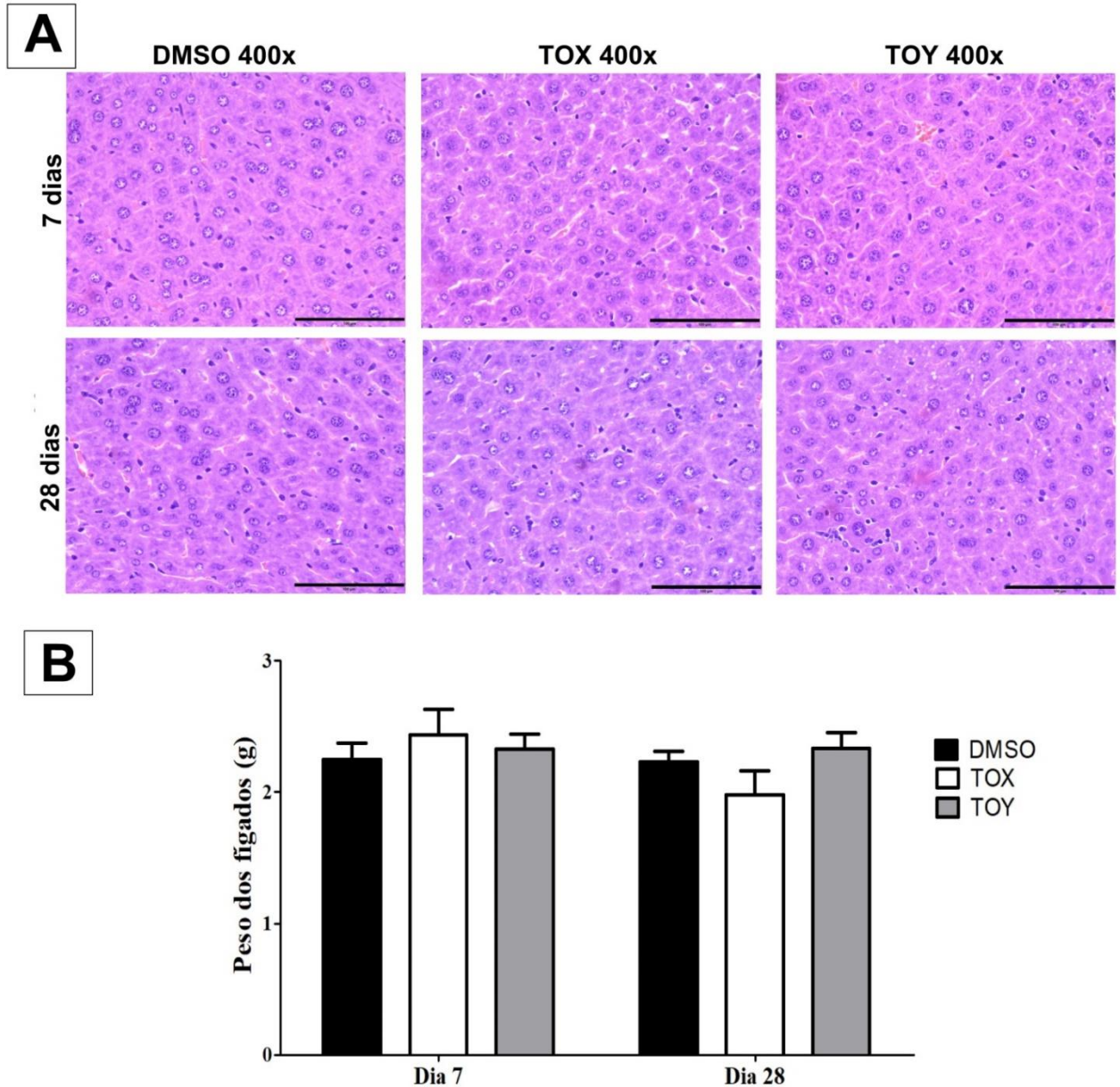


Figura 27 – A aplicação tópica do óleo essencial de *A. conyzoides* não altera o peso do fígado dos animais em contato com a substância em pesquisa. Em A, fotomicrografias representativas do tecido hepático, aumento de 400x, escala 100 μ m, dos grupos DMSO, TOX e TOY nos tempos de 7 e 28 dias. Não se percebe diferença morfológica entre os tecidos. Em B, o gráfico estatístico do peso em gramas (g) do fígado dos animais do grupo DMSO, TOX e TOY nos tempos iniciais e finais do tratamento com o óleo essencial de *A. conyzoides*. Sem diferenças estatísticas significativas do peso do órgão entre os grupos. Os valores foram expressos com média \pm SEM e com n=6. Foi realizado os testes OneWay, ANOVA para análise de variância entre os grupos de cada tempo experimental. Em seguida foi realizado o pós-teste Newman-Keuls sendo considerado $p < 0,05$. Coloração em HE.

6. DISCUSSÃO

6.1 Extração e caracterização do óleo essencial

Uma importante revisão sobre a família Asteraceae, aponta estudos sobre o efeito anti-inflamatório, analgésico, anticancerígeno, antimicrobiano, cicatrizante e radioprotetor dessa família (JAYASUNDERA *et al.*, 2021). Nosso estudo buscou avaliar o efeito do óleo essencial de *A. conyzoides* no processo de cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos. O processo de cicatrização de feridas visa recuperar e restaurar o tecido cutâneo lesado, a fim de substituir as estruturas que foram danificadas e perderam sua funcionalidade (TRINH *et al.*, 2022). Os resultados obtidos nessa pesquisa indicam um efeito benéfico do óleo essencial dessa planta na fase inflamatória e na fase de remodelamento da cicatrização de lesões cutâneas.

Os óleos essenciais são obtidos a partir do metabolismo secundário dos vegetais. São misturas complexas de moléculas orgânicas, como as das classes dos terpenoides e alcaloides. São produzidos e armazenados por quase todas as partes do vegetal, incluindo folhas e flores. Além disso, apresentam-se voláteis e aromáticos (MELO E CROTTI, 2017). Os achados deste estudo mostram que o rendimento do óleo essencial de *A. conyzoides* foi de $0,828 \pm 0,219$ (média \pm desvio padrão). Melo e colaboradores (2011) obtiveram um rendimento menor, de 0,09% para extração do óleo essencial de *A. conyzoides*. Por outro lado, nosso resultado está mais próximo ao de Jaya e colaboradores (2014), que obtiveram 0,5% de rendimento. Estudos apontam que o rendimento após a extração de diferentes óleos essenciais por hidrodestilação são baixos, podendo chegar abaixo de 1% (MONTEIRO *et al.*, 2017; DEGENHARDT *et al.*, 2016), esse valor se correlaciona favoravelmente ao nosso achado.

Soma-se a isso que fatores externos, como hora da colheita do vegetal, localidade (OZCAN e CHALCHAT, 2002), temperatura extrativa e o tempo de extração podem influenciar no rendimento dos óleos essenciais (PRINS, LEMOS e FREITAS, 2006), o que podem explicar as diferenças entre nossos achados e a literatura.

Estudos ainda apontam para diferenças entre o teor de óleo essencial de *A. conyzoides* coletados em localidades distintas. Após a extração, o teor de óleo encontrado para o vegetal coletado em um determinado município brasileiro foi de 0,70% enquanto em outro município foi de 0,48%. Fatores como genética das plantas, podem ter influenciado na quantidade extraída do óleo essencial (CASTRO *et al.*, 2004).

O método de hidrodestilação escolhido para extração do óleo essencial de *A. conyzoides*, não utiliza solventes orgânicos em sua metodologia, o que proporciona um extrato de alta qualidade sem resquícios de solventes químicos. Tal método pode ser empregado industrialmente (SOUZA *et al.*, 2022) o que abre possibilidades futuras de incorporar o óleo de *A. conyzoides* em alguma forma farmacêutica. Porém, faz-se necessário buscar alternativas mais fáceis e acessíveis para melhorar a eficácia do processo extrativo e o rendimento do óleo essencial.

Após extração, o óleo essencial de *A. conyzoides* foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM). Trata-se de uma técnica padrão para quantificar e identificar os compostos do óleo essencial (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2007). Foram encontrados em maior quantidade, os seguintes compostos: precoceno I, β -cariofileno e precoceno II. Esses resultados se correlacionam favoravelmente com os achados de Pintong e colaboradores (2020) e Bayala e colaboradores (2014), que obtiveram também os mesmos componentes químicos majoritários. Nossos resultados também são consistentes com os estudos de Rosário e colaboradores (2019), que obtiveram na extração por hidrodestilação do óleo essencial de *A. conyzoides*, como o principal composto químico, precoceno I. Também confirma nossos achados os estudos de Melo e colaboradores (2011), que obtiveram 74,3% para o composto químico precoceno I e 14,23% para o cariofileno, sendo os componentes majoritários nessa extração.

Em contraste com nossos achados, foi descrito na literatura que a porcentagem de precoceno II, foi majoritária após extração do óleo essencial de *A. conyzoides*, obtidos após propagação de mudas dos municípios de Mariana, Visconde do Rio Branco e Viçosa (CASTRO *et al.*, 2004). As correlações observadas para essa divergência da composição química dos óleos essenciais, são diversas e variam de acordo com características como as condições ambientais e de cultivo, o que pode

afetar a produção desse metabólito secundário pelo vegetal (SIMÕES e SPITZER, 2004). Outros fatores que podem afetar diretamente a composição química dos óleos essenciais são índice de pluviosidade, índice de radiação ultravioleta, idade do vegetal, ataque de patógenos e os nutrientes presentes no solo (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

6.2 Avaliação macroscópica da lesão excisional

Um achado desse estudo é a redução do tamanho da ferida dos animais tratados com o óleo essencial de *A. conyzoides* a partir do quinto dia. Arulprakash e colaboradores (2012) também observaram nos animais tratados com o extrato etanólico de *A. conyzoides* uma redução significativa do tamanho da ferida. Chah e colaboradores (2006), após terem feito uma incisão circular de 20 mm de diâmetro no dorso dos ratos e tratá-las com o extrato metanólico de *A. conyzoides*, notaram uma diminuição da área da ferida nos tempos testados em todos os grupos. Epitelização avançada e o diâmetro das feridas gradativamente mais estreitos, também foram achados apontados em outro estudo que utilizou o extrato de *A. conyzoides* associado ao mel (MUSTAFA *et al.*, 2005) e em nosso estudo foi possível notar uma diminuição da área da ferida no grupo TOX, tratado com o óleo essencial de *A. conyzoides*, já no sétimo dia.

Após 28 dias de tratamento, os grupos que receberam o óleo essencial de *A. conyzoides* estavam completamente epitelizados. Tal achado vai ao encontro de estudos que demonstraram que a administração tópica do extrato etanólico de *A. conyzoides* induziu uma reepitelização rápida nos animais tratados, com feridas mais resistentes à tração quando comparadas ao controle (ARULPRAKASH *et al.*, 2012). Em humanos a reepitelização é a principal responsável pelo fechamento da ferida (SORG *et al.*, 2017). Por isso, além de avaliarmos a reepitelização desses animais, avaliamos também a nova vascularização, a deposição das fibras colágenas, bem como algumas células envolvidas no processo, como os leucócitos e os mastócitos.

6.3 Constituintes do *A. conyzoides* e sua relação com as células inflamatórias e a cicatrização

Estudos mostram que a inflamação em excesso pode prejudicar a cicatrização normal de feridas (WANG *et al.*, 2019). Os animais tratados com o óleo essencial de *A. conyzoides*, mostraram uma redução significativa do infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo salina. Trabalhos realizados em outros modelos experimentais também demonstraram o efeito anti-inflamatório de *A. conyzoides*. O precoceno, principal composto químico encontrado no óleo de *A. conyzoides*, faz parte de um grupo de metabólitos denominado os cromenos (SIMÕES *et al.*, 2004). Os cromenos já foram descritos na literatura como agentes inibitórios do processo inflamatório, o que pode justificar o fato de ter-se observado uma redução no infiltrado inflamatório descrito neste trabalho.

Em um modelo *in vivo* de edema de pata de ratos, induzido pela carragenina, foi possível observar os efeitos anti-inflamatórios dos cromenos (CHUNG *et al.*, 2015). Em outro estudo, de modelo de edema de pata, tratados com derivados cromenos, também mostrou uma redução significativa do edema e conseqüentemente do processo inflamatório (NASEER e HUSAIN, 2019). Outro estudo que comprova a atividade anti-inflamatória de *A. conyzoides* é o de Vikasari e colaboradores (2022), no qual foi utilizado o extrato etanólico de *A. conyzoides*. A inflamação também foi induzida com carragenina. O extrato, em todas as doses do estudo, apresentou uma inibição da resposta inflamatória quando comparado ao controle. Até onde foi possível pesquisar na literatura, nosso estudo é o primeiro a relatar evidências do efeito anti-inflamatório do óleo essencial de *A. conyzoides*, em um modelo de cicatrização de feridas excisionais.

Apesar de outros estudos terem encontrado constituintes da folha de *A. conyzoides*, diferente dos encontrados por nós, eles também observaram uma melhora na cicatrização. Um estudo relata que o tratamento com o extrato etanólico de *A. conyzoides* L. de flores roxas, junto com a *C. asiatica* e o astaxanthin, apresentou uma melhora na atividade cicatrizante de feridas. Os autores discutem que os flavonoides das folhas de *A. conyzoides*, kaempferol e quercetina, foram os responsáveis pelas atividades anti-inflamatórias, imunomoduladora e antioxidante

(SUKMAWAN *et al.*, 2021). Tais flavonoides não foram encontrados no nosso óleo. Acreditamos que, tal fato, pode ter ocorrido pelo modelo extrativo e pelo solvente utilizado. Sukmawan e colaboradores (2021) também descrevem que as saponinas e alcaloides das folhas de *A. conyzoides* têm um importante papel na cicatrização de feridas, sendo eles: a iniciação de fibroblastos, reparação celular e ação anti-inflamatória.

6.4 Principais leucócitos envolvidos na cicatrização

A análise morfométrica dos leucócitos na fase inicial do processo de cicatrização demonstrou uma redução significativa do infiltrado inflamatório nos grupos tratados com óleo essencial em relação ao grupo salina. Os neutrófilos eram os leucócitos predominantes, acredita-se que essas células, no leito da ferida, estejam associadas diretamente ao reparo tecidual por cicatrização (WILGUS, ROY e MCDANIEL, 2013). Há evidências que a atuação dessas células nessa etapa seja a prevenção e a eliminação de microorganismos, até que a barreira epitelial esteja novamente formada. Um atraso na chegada dessas células ao local da ferida poderia retardar a formação da cicatriz (LIU *et al.*, 2014). Após 24 horas, o número total de neutrófilos na ferida começa a diminuir (CAMPOS, BORGES-BRANCO e GROTH, 2007).

Os linfócitos também são células do sistema imune atuantes na fase proliferativa da ferida (WANG *et al.*, 2019) e encontrados em nossos achados. Autores analisaram *in vitro* o efeito do óleo de *Ageratum fastigiatum* na expressão de CD18 em linfócitos. Em concentrações de 12.5×10^{-3} e 6.25×10^{-3} $\mu\text{L/mL}$, o óleo reduziu a expressão de CD18 em linfócitos, CD18 é um marcador presente nas integrinas, importantes moléculas de adesão. Ao reduzir as integrinas na superfície celular, o óleo de *A. fastigiatum* poderia também reduzir a migração de linfócitos para o local da inflamação, agindo dessa forma como anti-inflamatório (SOUZA *et al.*, 2020). De acordo com a abordagem filogenética para o estudo de plantas medicinais, pode-se intuir que o *A. conyzoides* possa apresentar um efeito anti-inflamatório por essa via.

Wang e colaboradores (2019), elucidaram que os linfócitos T CD3⁺ e CD4⁺ estão presentes em todos os processos de reparo da ferida, até o trigésimo dia. Tal estudo vai de encontro ao que foi demonstrado nesse estudo, com achados de células linfoides nos tempos iniciais da lesão. Outro achado desses autores é que a deficiência de linfócitos leva a uma epitelização mais rápida, porém com a formação de um excesso de tecido fibrótico (WANG *et al.*, 2019).

O efeito anti-inflamatório de *A. conyzoides*, além de estar relacionado a capacidade de diminuir a chegada de leucócitos ao local da ferida, também pode estar relacionado a redução da mieloperoxidase (MPO), a adenosina desaminase (ADA) e a redução de mediadores que favorecem o processo inflamatório como as IL-6, IL-10, IL-17A, fator de necrose tumoral e interferon gama (VIGIL DE MELLO *et al.*, 2016). Em um estudo recente, o extrato aquoso de *A. conyzoides*, reduziu os níveis de IL-1 β , IL-18, TNF- α e caspase-1, inibindo dessa forma o processo inflamatório (XU *et al.*, 2023).

Prolongar alguma fase do processo de cicatrização ou obter com os estudos respostas excessivas do organismo, podem prolongar a cicatrização, diminuindo a capacidade de reparo da pele. Estudos que se dediquem a transição da fase inflamatória para a fase da proliferação celular e deposição da matriz, tornam-se extremamente necessários, para evitarem erros durante a cicatrização (LANDÉN, LI e STAHL, 2016).

6.5 Papel dos mastócitos envolvidos na cicatrização de feridas

Observamos nos tempos iniciais o predomínio de mastócitos na borda da lesão. Já após 28 dias de tratamento, essas células predominaram no leito da cicatriz, mais precisamente na derme papilar, sendo estatisticamente encontradas em maiores quantidades nos grupos TOX e TOY. Trautmann e colaboradores (2000), relataram um aumento no número de mastócitos na borda da ferida, nos 10 primeiros dias da lesão. Os autores ainda sugerem, que os mastócitos contribuem para a cicatrização liberando citocinas (IL-4), que visam ajudar no reparo da lesão, bem como na estimulação da proliferação de fibroblastos.

Estudos apontam que o fechamento da ferida foi prejudicado nos animais deficientes de mastócitos, nos seis primeiros dias (WELLER *et al.*, 2006). A importância dos mastócitos, contribuindo de forma significativa no fechamento da lesão, pode ser apoiada em alguns estudos. Após estudos *in vitro*, foi demonstrado que os mastócitos convertem fibroblastos em miofibroblastos com capacidade de contração (GAILIT *et al.*, 2001). Sabe-se também que essas células liberam mediadores que aumentam a vasodilatação e permeabilidade vascular, como a histamina (WELLER *et al.*, 2006). Outro estudo aponta que em torno de sete dias após o término de ativação dos mastócitos, o número de vasos sanguíneos aumentou consideravelmente no mesentério de ratos (NORRBY, JAKOBSSON e SORBO, 1986). Esses indícios nos mostram como os mastócitos estão envolvidos no processo de cicatrização de feridas.

O fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), derivado de mastócitos, atua de forma pró-fibrótica, principalmente na fase proliferativa da cicatrização. Com isso, ele induz a proliferação de fibroblastos e a deposição da matriz. Já o TGF- β 2 derivado do mastócito, aumenta a deposição do colágeno na MEC (ELIEH, WOHRL e BIELORY, 2020). Então, como em nossos resultados foi demonstrado um aumento da deposição de colágeno, nos grupos tratados com o óleo essencial de *A. conyzoides*, após 28 dias, podemos correlacionar esse fato com o aumento de mastócitos encontrados na cicatriz. Tal fato também pode ser confirmado após a coloração com o tricrômico de Masson, coloração histoquímica específica para colágeno. Outra via possível para explicar tais achados é que os mastócitos podem limitar o processo inflamatório durante as etapas da cicatrização, liberando moléculas anti-inflamatórias, o que contribuiria para melhora da cicatrização de feridas (KOMI, KHOMTCHOUK e SANTA MARIA, 2020; WULFF e WILGUS, 2013).

Younan e colaboradores (2011), avaliaram a fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento, em camundongos deficientes de mastócitos, concluindo que essas células participam da proliferação celular, da formação do tecido de granulação, da neovascularização e da maturação das fibras colágenas durante o processo cicatricial.

6.6 A formação de novos vasos sanguíneos

Em linhas gerais, nossos resultados mostram que não houve diferenças significativas no número de neovasos nos tempos de 5, 7 e 14 dias. Estudos apontam que a diminuição da formação de novos vasos impedem que ocorra a cicatrização normal das lesões cutâneas de camundongos (WANG *et al.*, 2019). A neovascularização desempenha um papel importante na proliferação de células epiteliais. Por isso, a formação de neovasos, é um fator importante para avaliar a velocidade de cicatrização das feridas cutâneas (JIANG *et al.*, 2017). Estudos apontam que o aumento na expressão da proteína VEGF pode acelerar o processo da neovascularização (JIANG *et al.*, 2017). Esse aumento na angiogênese pelo VEGF poderá ocorrer através da secreção de angiopoetina-2, ANG-2 (FOLKMAN, 2006).

6.7 Deposição do colágeno e formação da cicatriz

Após 28 dias, observamos qualitativamente, que os animais tratados com óleo essencial de *A. conyzoides*, apresentaram maior substituição do tecido de granulação por fibras colágenas na neoderme. Os animais do grupo TOX, apresentavam um padrão de organização em alguns pontos em rede, enquanto no grupo TOY as fibras estavam mais densas e alinhadas em paralelo. Sabe-se que a síntese do colágeno, bem como sua deposição e degradação, são processos essenciais para uma melhor cicatrização de feridas (JIANG *et al.*, 2017). Estudos têm relatado que após a administração tópica do extrato etanólico de *A. conyzoides*, histologicamente observou-se nas feridas dos animais tratados melhor deposição das fibras colágenas. Bioquimicamente, nesses estudos, foi dosado hexosamina e ácido irônico que são substâncias fundamentais para o depósito do colágeno. Os níveis aumentados dessas substâncias, até o 8º dia, aumentou também o conteúdo de colágeno em até 100%, quando comparado ao grupo controle. Além disso, as feridas tratadas tornaram-se 40% mais resistentes à tração. Os achados dos autores mostram que de modo geral, após a administração tópica do extrato etanólico, as fibras de colágeno apresentavam-

se densamente mais compactas e dispostas em paralelo, nos animais tratados topicamente com o extrato etanólico de *A. conyzoides*. Na MEC dos animais tratados, além da maior deposição de fibras de colágeno, era possível perceber que elas se apresentavam embebidas em fibroblastos proliferativos. Nos animais do grupo controle, as fibras de colágeno estavam frouxamente compactadas e arranjadas de forma irregular (ARULPRAKASH *et al.*, 2012).

Um outro estudo buscou avaliar a interferência do DMSO na deposição do colágeno em feridas de camundongos. Nas feridas tratadas com controle foi observado a presença de um colágeno mais denso e espesso. Já no grupo tratado com DMSO as fibras colágenas apresentavam-se mais finas, revelando atraso na fase do remodelamento (KANT, JANGIR e KUMAR, 2020). Tal achado vai de encontro aos nossos resultados, tendo em vista que nos grupos tratados com o óleo essencial de *A. conyzoides*, observamos fibras mais densas, quando comparado ao grupo tratado com o DMSO.

6.8 Fibroblastos e macrófagos

Neste trabalho foi possível notar a presença de macrófagos e fibroblastos nos grupos tratados com o óleo essencial de *A. conyzoides* a partir do primeiro dia de tratamento. Os macrófagos são células complexas, tradicionalmente envolvidas nos processos de cicatrização de feridas. São divididos de forma tradicional em dois subgrupos, M1 e M2, respectivamente com fenótipos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (XUE *et al.*, 2014). Atualmente acredita-se que os macrófagos são vistos com uma série de fenótipos, a depender dos estímulos e ambiente nos quais estão inseridos (MOSSER e EDWARDS, 2008; SNYDER *et al.*, 2016). Os macrófagos M1 promovem a inflamação, liberando substâncias como espécies reativas de oxigênio, IL-1, IL-6, TNF- α , VEGF e PDGF (MAHDAVIAN DELAVARY *et al.*, 2011). Durante as etapas da cicatrização de feridas, vai ocorrendo uma transição dos macrófagos para o fenótipo M2 (KHALLOU-LASCHET *et al.*, 2010). Esses últimos, expressam L-4, IL-10 e IL-13, que são eficazes no reparo de feridas (EMING, KRIEG e DAVIDSON, 2007; BARRIENTOS *et al.*, 2008).

Estudos apontam que a partir do oitavo dia de tratamento era possível observar a presença de macrófagos e fibroblastos além de moderada deposição de colágeno (ARULPRAKASH *et al.*, 2012). Até onde foi possível pesquisar, nosso estudo é o primeiro a relatar a presença de células fibroblásticas a partir do primeiro dia de tratamento com o óleo essencial de *A. conyzoides*. O aumento de fibroblastos observado qualitativamente neste estudo pode ter ocorrido devido à presença do DMSO e do óleo essencial. Estudos em camundongos apontam que o DMSO promove a proliferação de fibroblastos (GUO *et al.*, 2020). Torna-se necessário, em uma próxima etapa, quantificar o número de fibroblastos entre os grupos salina, DMSO e tratado com o óleo essencial de *A. conyzoides*.

6.9 Escolha do DMSO como agente solubilizante do óleo essencial de *A. conyzoides* e seu uso no processo de cicatrização de feridas

O DMSO foi o agente escolhido neste estudo para diluir o óleo essencial de *A. conyzoides*, pois é amplamente utilizado nas solubilizações de extratos (AMPARO *et al.*, 2018), diluições ou formulações para tratamentos tópicos de feridas. Autores já utilizaram o extrato metanólico de *A. conyzoides* diluído em DMSO, para avaliação da atividade antibacteriana no processo de cicatrização de feridas (CHAH *et al.*, 2006). Estudos também relatam o uso de DMSO associado a sílica amorfa e ao ácido metanossulfônico como agente tópico dessecante para feridas (SCHAWARZER *et al.*, 2021). Wichaiyo e colaboradores (2021), utilizaram DMSO como controle para avaliação do reparo de feridas cutâneas em camundongos (WICHAIYO *et al.*, 2021). Jiang e colaboradores (2017), utilizaram perclorato de dracorodina dissolvido em DMSO e vaselina para avaliar a cicatrização de feridas cutâneas em ratos wistar. Em outra análise, o DMSO promoveu a melhora na cicatrização de camundongos normais e diabéticos (GUO *et al.*, 2020). Esses trabalhos corroboram com a nossa escolha do DMSO como veículo para o óleo essencial de *A. conyzoides*.

Em nosso estudo, os camundongos tratados com o óleo essencial de *A. conyzoides*, apresentaram uma taxa de fechamento macroscópico da ferida mais acelerado. O estudo de Wichaiyo e colaboradores (2021), elucida que os

camundongos tratados com a droga desatinibe, exibiram uma taxa de fechamento da ferida mais rápida quando comparada ao grupo controle DMSO. Em contrapartida, foi observado nos estudos de Jiang e colaboradores (2017), que feridas excisionais tratadas com pomada a base de DMSO, vaselina e perclorato de dracorodina em ratos wistar, apresentaram uma velocidade de cicatrização maior em relação ao grupo controle.

Guo e colaboradores (2020), utilizaram diversas concentrações de DMSO em feridas excisionais em camundongos, demonstrando que em baixas concentrações o DMSO acelera o fechamento de feridas, e em altas concentrações, induz o atraso no processo cicatricial. Em nosso estudo, foi observado no grupo que usou apenas DMSO puro como tratamento, um retardo no processo de cicatrização ao final dos vinte e oito dias, enquanto nos grupos que utilizaram o óleo essencial de *A. conyzoides* diluído em DMSO, o resultado foi melhor. Diferentes doses de DMSO podem explicar resultados diversos como esse (KANT, JANGIR e KUMAR, 2020).

No estudo de Kant, Jangir e Kumar (2020), o DMSO acelerou o fechamento das feridas nos tempos iniciais, 7 e 12 dias, e no tempo de 21 dias foi observado que as feridas não estavam completamente cicatrizadas. Uma opção para aplicação futura deste estudo seria tratar os animais com lesão cutânea apenas nos primeiros dias com DMSO e óleo essencial de *A. conyzoides*, a fim de observar alguma possível interferência no atraso da cicatrização de feridas nos tempos finais.

7. CONCLUSÃO

Nossos dados revelam que o óleo essencial de *A. conyzoides* apresentou resultado positivo e benéfico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em camundongos. Este resultado se manifesta através dos seguintes processos:

- Redução do infiltrado inflamatório na fase inicial do processo de cicatrização, sugerindo que o óleo essencial de *A. conyzoides* tenha um efeito anti-inflamatório;
- Fechamento mais rápido da área da lesão;

- Aumento significativo do número de mastócitos no leito da ferida, refletindo em uma melhor deposição de fibras colágenas.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Acreditamos que o *A. conyzoides* possui um grande potencial terapêutico, quando utilizado no tratamento de feridas de pele. O estudo com plantas medicinais tem se mostrado promissor e importante no desenvolvimento de soluções inovadoras para os desafios da saúde pública. Apesar dos avanços na medicina, existem desafios persistentes na eficácia, segurança e qualidade das terapias para a cicatrização de feridas. Nesse contexto, o óleo essencial de *A. conyzoides*, surge como um candidato atraente para acelerar o processo de cicatrização de feridas, podendo também melhorar os resultados estéticos.

Esse estudo também fornece novas informações para que, em um futuro, possam ser produzidas formulações farmacêuticas à base do óleo essencial de *A. conyzoides* para o tratamento de lesões cutâneas. Dessa forma, os efeitos da inflamação poderiam ser minimizados, bem como uma melhor deposição de colágeno, resultando em cicatrizes com melhor aspecto.

Embora os resultados sejam encorajadores, é fundamental que pesquisas futuras explorem melhor seu potencial terapêutico, bem como seu mecanismo de ação, avaliando a segurança de seu uso nos pacientes. Sugerimos mais estudos na área e com diferentes análises.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2019.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. **Texensis Publishing**, 2017.

ADDOR, F. A. S., AOKI, V. Skin barrier in atopic dermatitis. **The Brazilian Annals of dermatology**. 2010, v.85, n.2.

AHMED, S. R.; MOSTAFA, E. M.; MUSA, A.; RATEB, E. E.; AL-SANEA, M. M.; ABU-BAIH, D. H.; ELREHANY, M. A.; SABER, E. A.; RATEB, M. E.; ABDELMOHSEN, U. R. Wound Healing and Antioxidant Properties of *Launaea procumbens* Supported by Metabolomic Profiling and Molecular Docking. **Antioxidants (Basel)**. 2022 Nov 16;11(11):2258. doi: 10.3390/antiox11112258. PMID: 36421445; PMCID: PMC9687060.

ALSAREII, S. A.; ALZERWI, N. A. N.; AL-ASMARI, M. Y.; ALAMRI, A. M.; MAHNASHI, M. H.; SHAIKH, I. A. Topical Application of *Premna integrifolia* Linn on Skin Wound Injury in Rats Accelerates the Wound Healing Process: Evidence from *In Vitro* and *In Vivo* Experimental Models. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2022 Apr 13;2022:6449550. doi: 10.1155/2022/6449550. PMID: 35463068; PMCID: PMC9020961.

AMCAPORA, A. J. D'., TRAMONTE, R., BURGUR, D., BURGUER, P. J. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arquivos Catarinenses de Medicina** Vol. 36, no . 1, de 2007 .

AMPARO, T. R., BRAGA, V. C. C. V., SEIBERT, J. B., SOUZA, G. H. B., TEIXEIRA, L. F. M. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Revista Infarma Ciências Farmacêuticas**. v. 30, n. 1, p. 50-59, apr. 2018. ISSN 2318-9312.

ARGENTA, S. C.; ARGENTA, L. C.; GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO, V. S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**. Vol.7, N.12: p.51-60, Maio/2011.

ARULPRAKASH, K., MURUGAN, R., PONRASU, T., IYAPPAN, K., GAYATHRI, V. S., SUGUNA, L. Efficacy of *Ageratum conyzoides* on tissue repair and collagen formation in rats. **Clin Exp Dermatol**. 2012 Jun;37(4):418-24. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04285.x. Epub 2012 Mar 27. PMID: 22452483.

AULANNI'AM, A.; ORA, K. M.; ARIADINI, N. A.; WURAGIL, D. K.; PERMATA, F. S.; RIAWAN, W.; BELTRAN, M. A. G. Wound healing properties of *Gliricidia sepium* leaves from Indonesia and the Philippines in rats (*Rattus norvegicus*). **Vet World**. 2021 Mar;14(3):820-824. doi: 10.14202/vetworld.2021.820-824. Epub 2021 Mar 31. PMID: 33935433; PMCID: PMC8076467.

AYALEW, M.; BEKELE, A.; MENGISTIE, M. G.; ATNAFIE, S. A. Evaluation of the antidiarrheal activity of 80% methanol extract and solvent fractions of the leaf of *Bersama abyssinica* fresen (Melianthaceae) in mice. **BMC Complement Med Ther.** 2022 Jan 6;22(1):8. doi: 10.1186/s12906-021-03498-6. PMID: 34991582; PMCID: PMC8734363.

AYANAW, M. A.; YESUF, J. S.; BIRRU, E. M. Evaluation of Analgesic and Anti-inflammatory Activities of Methanolic Leaf and Root Extracts of *Gomphocarpus purpurascens* A. Rich (Asclepiadaceae) in Mice. **J Exp Pharmacol.** 2023 Jan 9;15:1-11. doi: 10.2147/JEP.S361194. PMID: 36643970; PMCID: PMC9838122.

BAGHERI, Z.; LARKI-HARCHEGANI, A.; POURMOSLEMI, S.; NILI-AHMADABADI, A.; BAKHTIARI, E.; SAFARPOUR, H.; FATHI JOUZDANI, A.; SHAMSIZADEH, M. The Antimicrobial and Healing Effect of *Scrophularia striata* Boiss Hydroalcoholic Extract on First- and Second-Grade Pressure Wounds in Patients with Brain and Spinal Cord Injury: A Randomized Clinical Trial. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2022 Nov 28;2022:8522937. doi: 10.1155/2022/8522937. PMID: 36479182; PMCID: PMC9722278.

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

BARCAUI, E. de O. *et. al.* Study of the skin anatomy with high-frequency (22 MHz) ultrasonography and histological correlation; Study developed in the Department of Radiology at School of Medicine, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. **Radiologia Brasileira.** 2015, v. 48, n. 5.

BARRETO, A. L. S., BASTOS, T. S., PIRES, J. A., JÚNIOR, R. L. C. de A., CARDOSO, J. C. Análise quantitativa de mastócitos na cicatrização de feridas tratadas com membranas de colágeno contendo própolis vermelha. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente.** 2013. V.1, N.2, p. 79-90.

BARRIENTOS, S., STOJADINOVIC, O., GOLINKO, M. S., BREM, H., TOMIC-CANIC, M. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen.** 2008 Sep-Oct;16(5):585-601. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x. PMID: 19128254.

BAYALA, B., BASSOLE, I. H., GNOULA, C., NEBIE, R., YONLI, A., MOREL, L., FIGUEREDO, G., NIKIEMA, J. B., LOBACCARO, J. M., SIMPORE, J. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. **PLoS One.** 2014 Mar 24;9(3):e92122. doi: 10.1371/journal.pone.0092122.

BEANES, S. R., DANG, C., SOO, C., TING, K. Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. **Expert Rev Mol Med**, 2003 5(8), 1-22. doi: doi:10.1017/S1462399403005817

BEHEREGARAY, W. K. *t. al.* Células-tronco mesenquimais aplicadas na fases inflamatória e proliferativa da cicatrização de feridas cutâneas. **Arq. Bras. Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2017, vol. 69, n. 6.

BERNADO, A. F. C.; SANTOS K. dos; SILVA, D. P. da. Pele: Alterações Anatômicas Fisiológicas do Nascimento à Maturidade. **Revista Saúde em Foco**, 2019, v. 11.

BIELEFELD, K. A.; AMINI-NIK, S.; ALMAN, B.A. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. **Cellular and molecular life sciences**, 2010, v. 70. n. 12.

BIONDO-SIMÕES, M. de L. P. *et. al.* Análise comparativa dos efeitos do mel, do óleo-serina de copaíba e de um produto comercial (fibronolisina, desoxirribonuclease e cloranfenicol) na cicatrização de segunda intenção em ratos. **Revista Col. Brasileira Cir**, 2019, vol. 46, n.5.

BLUME-PEYTAVI, U., TAN, J., TENNSTEDT, D. Fragility of epidermis in newborns, children and adolescents (vol 30, pg 3, 2016). **J Europ Acade Dermatol Venereol** 30(9):1634–1634.

BRAGA, J. C. B.; SILVA, L. R. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, 2021, v.4, n.1, p.3831-3839.

BRANDÃO, A. SUS: O farmacêutico e a fitoterapia. **Pharmacia Brasileira**. n.98, Jun. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Departamento de Apoio Técnico e Educação Permanente. Comissão Assessora de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Plantas Medicinais e Fitoterápicos. / Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. – São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2019. 4ª edição. 86 p.; 20 cm. ISBN 978-85-9533-023-8

BOSI, C. F. *et. al.* Pyrrolizidine alkaloids in medicinal tea of *Ageratum conyzoides*. Revista **Brasileira de Farmacognosia**, 2013 vol. 23, n. 3.

CABRERA, A. L., KLEIN, R. M. Compostas 4: Tribo Eupatoriae. in REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 10, p. 415-750, 1989.

CACCIA-BAVA, M. do C. G. G.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S.; MARTINEZ E. Z. Disponibilidade de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais nas unidades de atenção básica do Estado de São Paulo: resultados do Programa Nacional de Melhoria do Acesso e da Qualidade da Atenção Básica (PMAQ). **Ciência & Saúde Coletiva**, 2017, 22(5), 1651–1659. <https://doi.org/10.1590/1413-81232017225.16722015>

CACIOPPO, J. T., HAWKLEY, L. C. Social isolation and health, with an emphasis on underlying mechanisms. **Perspect. Biol. Med.** 2003, 46, S39–S52.

CAMPOS, A. C. L., BORGES-BRANCO, GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD. Arquivos Brasileiros De Cirurgia Digestiva**. 2007. 20(1), 51–58. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202007000100010>

CARMIGNAN, F. *et al.* Efficacy of application of Equisetum pyramidale Goldm. Hydrogel for tissue restoration of induced skin lesions in Wistar rats. **Brazilian Journal of Biology**, 2020, v. 80, n. 1.

CASANOVA, L. M., COSTA, S. S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. **Rev. Virtual Quim.**, 2017, 9 (2), 575-595. Data de publicação na Web: 7 de março de 2017.

CASTRO, H. G. de., OLIVEIRA, L. O. de., BARBOSA, L. C. de A., FERREIRA, F. A., SILVA, D. J. H. da., MOSQUIM, P. R., NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, 2004. 27(1), 55–57. DOI:doi.org/10.1590/S0100-40422004000100011

CHAH, K. F., EZE, C. A., EMUELOSI, C. E., ESIMONE, C. O. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**. 2006 Mar 8;104(1-2):164-7. doi: 10.1016/j.jep.2005.08.070. Epub 2005 Oct 13. PMID: 16226414.

CHAMPE, P.C. Bioquímica Ilustrada. 3 ed. Porto Alegre: **Artmed Editora**. 2010.

CHUNG, S. T., HUANG, W. H., HUANG, C. K., LIU, F. C., HUANG, R. Y., WU, C. C., LEE, A. R. Synthesis and anti-inflammatory activities of 4H-chromene and chromeno[2,3-b] pyridine derivatives. **Research on Chemical Intermediates**, Amsterdam, v.42, n p.1195–1215, 2015.

COLET, C. de F.; CAVALHEIRO, C. A. N.; DAL MOLIN, G. T.; CAVINATTO, A. W.; SCHIAVO, M.; SCHWAMBACH, K. H.; OLIVEIRA, K. R. Uso de plantas medicinais por usuários do serviço público de saúde do município de Ijuí/RS. **Rev Bras Med Fam Comunidade** [Internet]. 2015 [citado 20º de maio de 2023];10(36). Disponível em: <https://rbmfc.org.br/rbmfc/article/view/930>

CANESSO, M. C., VIEIRA, A. T., CASTRO, T. B., SCHIRMER, B. GG, CISALPINO, D., MARTINS, F. S., RACHID, M. A., NICOLI, J. R., TEIXEIRA, M. M., BARCELOS, L. S. Skin wound healing is accelerated and scarless in the absence of commensal microbiota. **J Immunol**. 2014 Nov 15;193(10):5171-80. doi: 10.4049/jimmunol.1400625. Epub 2014 Oct 17. PMID: 25326026.

CHESKO, D. M., WILGUS, T. A. Immune Cells in Cutaneous Wound Healing: A Review of Functional Data from Animal Models. **Int J Mol Sci**. 2022 Feb 23;23(5):2444. doi: 10.3390/ijms23052444. PMID: 35269586; PMCID: PMC8910456.

CRIOLLO-MENDONZA, M. S., CONTRERAS-ANGULO, L. A., LEYVA-LÓPEZ, N., GUTIÉRREZ, G. E. P., JIMÉNEZ, O. L. A., HEREDIA, J. B. Wound Healing Properties of Natural Products: Mechanisms of Action. **Molecules**. 2023 Jan

6;28(2):598. doi: 10.3390/molecules28020598. PMID: 36677659; PMCID: PMC9867334.

DANNA, C.; BAZZICALUPO, M.; INGEGNERI, M.; SMERIGLIO, A.; TROMBETTA, D.; BURLANDO, B.; CORNARA, L. Anti-Inflammatory and Wound Healing Properties of Leaf and Rhizome Extracts from the Medicinal Plant *Peucedanum ostruthium* (L.) W. D. J. Koch. **Molecules**. 2022 Jul 2; 27 (13): 4271. doi:10.3390/molecules27134271. PMID: 35807516; PMCID: PMC9268734.

DARBY, I. A., LAVERDET, B., BONTÉ, F., DESMOULIÈRI, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, 2014. 301-311, DOI: 10.2147/CCID.S50046

DAS, A. K., DUTTA, B. K., SHARMA, G.D. Medicinal plants used by different tribes of Cachar district, Assam. **Indian J Tradit Knowl**. 2008;7(3):446-54.

DEGENHARDT, R. T.; FARIAS, I. V.; GRASSI, L. T.; FRANCHI, G. C.; NOWILL, A. E.; BITTENCOURT, C. M. DA S.; WAGNER, T. M. Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p. 56–61, 2016.

ELEBEEDY, D.; GHANEM, A.; EL-SAYED, M.; FAYAD, E.; ABU ALI, O. A.; ALYAMANI, A.; SAYED ABDELGELIEL, A. Synergistic Antimicrobial Effect of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lawsonia inermis* Against *Staphylococcus aureus*. **Infect Drug Resist**. 2022 Feb 19;15:545-554. doi: 10.2147/IDR.S342976. PMID: 35221699; PMCID: PMC8865861.

ELIEH, A. K. D., WOHRL, S., BIELORY, L. Mast Cell Biology at Molecular Level: A Comprehensive Review. **Clin. Rev. Allergy Immunol**. 2020; 58 :342–365. doi: 10.1007/s12016-019-08769-2.

EL-SHERBENI, S. A., NEGM, W. A. The wound healing effect of botanicals and pure natural substances used in in vivo models. **Inflammopharmacology**. 2023 Apr;31(2):755-772. doi: 10.1007/s10787-023-01157-5. Epub 2023 Feb 22. PMID: 36811778; PMCID: PMC10140094.

EMING, S. A., KRIEG, T., DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J Invest Dermatol**, 2007. 127(3), 514-525. doi: 10.1038/sj.jid.5700701

ESTEVIÃO, L. R. DE M., VIEIRA, P. C., LEITE, A. G. B., BULHÕES, A. A. V. DE C., BARCELOS, L. DA S., NETO, J. E. Morphological Evaluation of Wound Healing Events in the Excisional Wound Healing Model in Rats. **Bio-protocol**. 2019. 9 (13): e3285. DOI: 10.21769/BioProtoc.3285.

FIGUEIRA, T. N., BACKES, M. T. S., KNIHS, N. DA. S., MALISKA, I. C. A., AMANTE, L. N., BELLAGUARDA, M. L. DOS. R. Produtos e tecnologias para o tratamento de pacientes com lesões por pressão baseadas em evidências. **Rev Bras Enferm**. 2021;74(5):e20180686. doi.org/10.1590/0034-7167-2018-0

FIGUEREDO, C. A. de; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista De Saúde Coletiva**, 2014, 24(2), 381–400. <https://doi.org/10.1590/S0103-73312014000200004>

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad Pesq São Luís**. 2011; 18 (especial): 90-95.

FISSEHA, N.; HAMMESO, W. W.; NUREYE, D.; TESFAYE, T.; YIMER, T. In-vivo Wound Healing and Anti-Inflammatory Activity of the Solvent Fraction of *Zehneria scabra* L.F. Sond (Cucurbitaceae) Leaves. **J Exp Pharmacol**. 2022 Dec 2;14:367-377. doi: 10.2147/JEP.S387364. PMID: 36483543; PMCID: PMC9725919.

FLOR, A. S. S. O.; BARBOSA, W. L. R. Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá - PA. **Revista Brasileira De Plantas Medicinai**s, 2015, 17(4), 757–768. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_064

FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**. 2006;57:1–18. doi:10.1146/annurev.med.57.121304.131306.

FORTES, T. M. L., SUFFREDINI, I. B. Skin evaluation in elderly: literature review. **Journal Health Sci. Inst**, 2014, vol. 32, n. 1.

GAILIT, J., MARCHESE, M.J., KEW, R.R., GRUBER, B.L. The differentiation and function of myofibroblasts is regulated by mast cell mediators. **J. Investig. Dermatol**. 2001;117:1113–1119. doi: 10.1046/j.1523-1747.2001.15211.x.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quimica Nova**, 2007.

GUO, W., QIU, W., AO, X., LI, W., HE, X., AO, L., HU, X., LI, Z., ZHU, M., LUO, D., XING, W., XU, X. Low-concentration DMSO accelerates skin wound healing by Akt/mTOR-mediated cell proliferation and migration in diabetic mice. **Br J Pharmacol**. 2020 Jul;177(14):3327-3341. doi: 10.1111/bph.15052. Epub 2020 Apr 7. Erratum in: Br J Pharmacol. 2020 Dec;177(23):5433. PMID: 32167156; PMCID: PMC7312275.

HAZARIKA, S., DHIMAN, S., RABHA, B., BHOLA, R. K., SINGH, L. Repellent activity of some essential oils against *Simulium* species in India. **J Insect Sci**. 2012;12:5. doi: 10.1673/031.012.0501. PMID: 22943569; PMCID: PMC3465923

HEPPY, F.; MULYANA, R.; AFRAININ, S. N.; TJANDRAQINATA, R. R. The effect of *Psidium guajava* Leaves' extract for mild and asymptomatic corona virus Disease-19. **Saudi Pharm J**. 2023 Apr;31(4):592-596. doi: 10.1016/j.jsps.2023.02.012. Epub 2023 Mar 7. PMID: 37009425; PMCID: PMC9988311.

HERMAN, T. F., BORDONI, B. Wound classification. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 32119343.

HERNANDEZ, A. B.; ALARCON, A. F. J.; GARCIA, L. M.; RODRIGUEZ, M. M. A.; CANALES, M. M. M. *Jatropha Neopauciflora* Pax Latex Exhibits Wound-Healing Effect in Normal and Diabetic Mice. **J Evid Based Integr Med**. 2021 Jan-Dec;26:2515690X20986762. doi: 10.1177/2515690X20986762. PMID: 33599145; PMCID: PMC7897810.

ISMAIL, Y.; FAHMY, D. M.; GHATTAS, M. H.; AHMED, M. M.; ZEHRY, W.; SALEH, S. M.; ABO-ELMATTY, D. M. Integrating experimental model, LC-MS/MS chemical analysis, and systems biology approach to investigate the possible antidiabetic effect and mechanisms of *Matricaria aurea* (Golden Chamomile) in type 2 diabetes mellitus. **Front Pharmacol**. 2022 Sep 7;13:924478. doi: 10.3389/fphar.2022.924478. PMID: 36160451; PMCID: PMC9490514.

JAYA, SINGH, P., PRAKASH, B., DUBEY, N. K. Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* L., *Coleus aromaticus* Benth. and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit essential oils as fumigant against storage grain insect *Tribolium castaneum* Herbst. **J Food Sci Technol**. 2014 Sep;51(9):2210-5. doi: 10.1007/s13197-012-0698-8.

JAYASUNDERA, M., FLORENTINE, S., TENNAKOON, K. U., CHAUHAN, B.S. Medicinal Value of Three Agricultural Weed Species of the Asteraceae Family: A Review. **Revista Farmacognosia**. 2021;13(1):264-277.

JIANG, X.W., QIAO, L., LIU, L., ZHANG, B. Q., WANG, X. W., HAN, Y. W., YU, W. H. Dracorhodin Perchlorate Accelerates Cutaneous Wound Healing in Wistar Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2017;2017:8950516. doi: 10.1155/2017/8950516. Epub 2017 Dec 3. PMID: 29333188; PMCID: PMC5733224.

JUNIOR, A. J.; LENCINA, J. D. S.; SANTOS, E. D.; MOTA, da S. M. J.; CUMAN, R. K. N.; KONKIEWITZ, E. C.; KASSUYA, C. A. L.; SILVA-FILHO, S. E. Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of Ethanolic Extract of *Piper vicosanum* Leaves. **Pharmaceutics**. 2022 Nov 14;14(11):2455. doi: 10.3390/pharmaceutics14112455. PMID: 36432646; PMCID: PMC9692771.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 13^o edição. Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan, 2017.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A. *Ageratum conyzoides* L: A review on its phytochemical and pharmacological profile. **International Journal of Green Pharmacy**, 2008.

KABOUA, K.; MOUZOU, A.; PAKOUSSI, T.; ASSIH, M.; CHATELIER, A.; DIALLO, A.; BOIS, P.; BESCOND, J. *Hydrocotyle bonariensis* Comm ex Lamm (Araliaceae) leaves extract inhibits IKs not IKr potassium currents: Potential implications for anti-arrhythmic therapy. **J Tradit Complement Med**. 2021 Sep 16;12(4):330-334. doi: 10.1016/j.jtcme.2021.09.004. PMID: 35747353; PMCID: PMC9209821.

KANT, V., JANGIR, B. L., KUMAR, V. Gross and histopathological effects of dimethyl sulfoxide on wound healing in rats. **Wound Medicina**. 2020. V. 30. DOI: doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100194.

KASOUNI, A. I.; CHATZIMITAKOS, T. G.; STALIKAS, C. D.; TRANGAS, T.; PAPOUDOU-BAI, A.; TROGANIS, A. N. The Unexplored Wound Healing Activity of *Urtica dioica* L. Extract: An In Vitro and In Vivo Study. **Molecules**. 2021 Oct 15;26(20):6248. doi: 10.3390/molecules26206248. PMID: 34684829; PMCID: PMC8540079.

KHALLOU-LASCHET, J., VARTHAMAN, A., FORNASEA, G., COMPAIN, C., GASTON, A. T., CLEMENT, M., DUSSIOT, M., LEVILLAIN, O., GRAFF-DUBOIS. S., NICOLETTI, A., CALIGIURI, G. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. **PLoS One**. 2010 Jan 25;5(1):e8852. doi: 10.1371/journal.pone.0008852. PMID: 20111605; PMCID: PMC2810335.

KIREJEV, Vladimir e ERICSON, Marica B. Topical Drug Delivery. 2013.

KOMI, D. E.A., KHOMTCHOUK, K., SANTA MARIA, P. L. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. **Clin Rev Allergy Immunol**. 2020 Jun;58(3):298-312. doi: 10.1007/s12016-019-08729-w. PMID: 30729428

KOSTER, M. I., ROOP, D. R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **Eur. J. Cell Biol.**, 83: 625-629, 2004.

KRUEGER, J. G., BOWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Ann. Rheum. Dis.**, 64: 30-36, 2005.

LANDÉN, N. X., LI, D., STAHL, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cell Mol Life Sci** 2016 ;73:3861-3885.

LAMBEO, M. K.; KIFLE, Z. D.; GURJI, T. B.; YESUF, J. S. Evaluation of Wound Healing Activity of Methanolic Crude Extract and Solvent Fractions of the Leaves of *Vernonia auriculifera* Hiern (Asteraceae) in Mice. **J Exp Pharmacol**. 2021 Jul 23;13:677-692. doi: 10.2147/JEP.S308303. PMID: 34326671; PMCID: PMC8315810.

LAW, S.K.; WANG, Y.; LU, X.; AU, D. C. T.; CHOW, W. Y. L.; LEUNG, A. W. N.; XU, C. Chinese medicinal herbs as potential prodrugs for obesity. **Front Pharmacol**. 2022 Oct 3;13:1016004. doi: 10.3389/fphar.2022.1016004. PMID: 36263142; PMCID: PMC9573959.

LEITE, A. G. B. *et. al.* Avaliação morfo-histológica e morfo-histométrica de feridas cutâneas tratadas com *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski em Ratos. **Arq. Bras. Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2020, vol. 72, n. 6.

LI, T.; Gao, X.; YAN, Z.; WAI, T. S.; YANG, W.; CHEN, J.; YAN, R. Understanding the tonifying and the detoxifying properties of Chinese medicines from their impacts on gut microbiota and host metabolism: a case study with four medicinal herbs in

experimental colitis rat model. **Chin Med.** 2022 Oct 4; 17 (1): 118. doi: 10.1186/s13020-022-00673-w. PMID: 36195889; PMCID: PMC9533630.

LIU, M., XU, R., MERRILL, C., HONG, L., VON LANKEN, C., HUNT, A. G., LI, Q. Q. Integration of developmental and environmental signals via a polyadenylation factor in Arabidopsis. **PLoS One.** 2014 Dec 29;9(12):e115779. doi: 10.1371/journal.pone.0115779. PMID: 25546057; PMCID: PMC4278772.

LIMA, F. B. de., PLACEDES, J., CARDOSO, C. R. Avaliação do rendimento dehidrodestilação para produção de óleo essencial das cascas de Citrus sinensis(L.)Osbeck. **Rev. Bras. Cien., Tec. e Inov.** 2019. v. 4. n. 3. 257-266. DOI: 10.18554/rbcti.v4i3.3728Artigo

LORENZI, H., MATOS, F. de A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. São Paulo: **Instituto Plantarum**, 2008. 188 p.

LUCAS, T., WAISMAN, A., RANJAN, R., ROES, J., KRIEG, T., MULLER, W., ROERS, A., Eming SA. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. **J Immunol.** 2010 Apr 1;184(7):3964-77. doi: 10.4049/jimmunol.0903356. Epub 2010 Feb 22. PMID: 20176743.

MAEDA, S., FUJIMOTO, M., MATSUSHITA, T., HAMAGUCHI, Y., TAKEHARA, K., HASEGAWA, M. Inducible costimulator (ICOS) and ICOS ligand signaling has pivotal roles in skin wound healing via cytokine production. **Am J Pathol**, 2011, 179(5), 2360-2369. doi:10.1016/j.ajpath.2011.07.048

MAHDAVIAN DELAVARY, B., VAN DER VEER, W. M., VAN EGMOND, M., NIESSEN, F. B., BEELEN, R. H. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology.** 2011 Jul;216(7):753-62. doi: 10.1016/j.imbio.2011.01.001. Epub 2011 Jan 8. PMID: 21281986.

MAIA, V. C.; ARAÚJO, L. L. Clinodiplosis agerati (Diptera, Cecidomyiidae), a new galling species associated with Ageratum conyzoides (Asteraceae) from Brazil. **Brazilian Journal of Biolog**, 2016, vol. 76, n. 03.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell.** 2010 Mar 19;140(6):771-6. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.006. PMID: 20303867.

MELO, N. I. DE., MAGALHÃES, L. G., CARVALHO, C. E. DE., WAKABAYASHI, K. A., AGUIAR, G. DE. P., RAMOS, R. C., MANTOVANI, A. L., TURATTI, I. C., RODRIGUES, V., GROppo, M., CUNHA, W. R., VENEZIANI, R. C., CROTTI, A. E. Schistosomicidal activity of the essential oil of Ageratum conyzoides L. (Asteraceae) against adult Schistosoma mansoni worms. **Molecules.** 2011 Jan 18;16(1):762-73. doi: 10.3390/molecules16010762.

MELO, N. I., CROTTI, A. E. M. Óleos voláteis: constituintes químicos e atividades biológicas. In: N. A. J. C. Furtado, R. C. S. Veneziani S. R. Ambrósio (org.). Farmacognosia. São Paulo: Atheneu, p. 293-313, 2017.

MENDONÇA, R. da S. C., RODRIGUES, G. B. de O. As principais alterações dermatológicas em pacientes obesos. **ABC Arq. Bras. Cir. Dig.** 2011, vol. 24, n. 1.

MIOT, L. D. B., *et al.* Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** 2009, v. 84, n. 6.

MOODY, Mary Lynn. Topical Medications in the Treatment of pain. *Pain medicine news.* 2010.

MOMESSO, L. da S.; MOURA, R. M. X. de, CONSTANTINO, D. H. J. Atividade antitumoral do *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia,** 2009, vol. 19, n. 3.

MONTEIRO, J. N. M., ARCHANJO, A. B., PASSOS, G. P., COSTA, A. V., PORFIRIO, L. C., MARTINS, I. V. F. *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil and ethanol extract on control of canine *Ancylostoma* spp. **Semina: Ciências Agrárias,** v. 38, n. 4, p. 1947–1953, 2017.

MOSSER, D. M., EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):958-69. doi: 10.1038/nri2448. Erratum in: **Nat Rev Immunol.** 2010 Jun;10(6):460. PMID: 19029990; PMCID: PMC2724991.

MUSTAFA, M. R., MAHMOOD, A. A., SIDIK, K., NOOR, S. M. Evaluation of wound healing potential of *Ageratum conyzoides* leaf extract in combination with honey in rats as animal model. **International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences.** 2005; 1: 406-410.

NASEER, M.A., HUSAIN, A. Studies on Chromene based 2, 6-disubstituted-Thiazolo [3,2-B] [1,2,4] Triazole derivatives: Synthesis and Biological Evaluation. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics,** v.9, p. 236-242, 2019.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products,** v., n., p., 2016.

NILASH, A. B.; JAHANBANI, J.; JOLEHAR, M. Effect of Nasturtium Extract on Oral Cancer. **Adv Biomed Res.** 2023 Feb 25;12:53. doi: 10.4103/abr.abr_305_21. PMID: 37057243; PMCID: PMC10086664.

NORRBY, K., JAKOBSSON, A., SORBO, J. Mast-cell-mediated angiogenesis: A novel experimental model using the rat mesentery. **Virchows Arch. B.** 1986; 52:195–206. doi: 10.1007/BF02889963.

OKUNADE, A. L., 2002. *Ageratum conyzoides* L. Asteraceae. **Fitoterapia** 73, 1–16.

OLADEJO, O. W. *et al.* A comparative study of the wound healing properties of honey and *Ageratum conyzoides*. **Afr J Med Med Sci.** 2003, v. 32, n.2.

OLIVEIRA, L. S. T.; CUNHA e SILVA, S. L.; TAVARES, D. C.; SANTOS, A.; OLIVEIRA, G. C. B. Uso de plantas medicinais no tratamento de animais. **Encicl Biosfera.** 2009; 5 (8): 1-8

OLIVEIRA, A. C. da S. de, *et. al.* Espécies vegetais de uso popular no tratamento da dor: uma revisão sistemática. **Research Society and Development**, 2022. v. 11, n. 2.

OLIVEIRA, de G.; MOREIRA, K. da S.; TURONES, L. C.; ALMEIDA, de S. D.; MARTINS, A. N.; SILVA, O. T. L.; BARRETO, da S. V.; BORGES, L. L.; COSTA, E. A.; REALINO, de P. J. Mechanism of action involved in the anxiolytic-like effects of Hibalactone isolated from *Hydrocotyle umbellata* L. *J Tradit Complement Med*. 2021 Sep 11;12(4):318-329. doi: 10.1016/j.jtcme.2021.08.012. PMID: 35747359; PMCID: PMC9209824.

OLIVEIRA, S. G. D.; MOURA, F. R. R. de; DEMARCO, F. F.; NASCENTE, P. da S.; PINO, F. A. B. del; LUND, R. G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 140, Issue 2, 2012, Pages 428-437, ISSN 0378-8741, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.054>.

OZACAN, M. CHALCHAT, J. C. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey, Czech. **J. Food. Sci.** 2002, 20, 223-228.

PEDROSO, R. dos S.; ANDRADE, G. P.; REGINA, H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva** [online]. v. 31, n. 02 [Acessado 20 Maio 2023], e310218. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-73312021310218>>. ISSN 1809-4481. <https://doi.org/10.1590/S0103-73312021310218>.

PERATONI, L. G. Z., SPANGLER, L P., RABELO, G. V., VIANA, M., OLIVEIRA, J. A. DE C., LIMA, R. K., MONTEFORTE, P. T. Spasmolytic Effects of *Ageratum conyzoides* in *Vas Deferens*. **Medicinal & Aromatic Plants**. 2020. 9. 4.

PINTONG, A. R., RUANGSITTICHAJ, J., AMPAWONG, S., THIMA, K., SRIWICHAJ, P., KOMALAMISRA, N., POPRUK, S. Efficacy of *Ageratum conyzoides* extracts against *Giardia duodenalis* trophozoites: an experimental study. **BMC Complement Med Ther**. 2020 Feb 28;20(1):63. doi: 10.1186/s12906-020-2860-6.

PIRIZ, M. A.; LIMA, C. A. B.; JARDIM, V. M. R.; MESQUITA, M. K.; SOUZA, A. D. Z.; HECK, R. M. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Rev bras plantas med**, 2014 16(3), 628–636. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_178

PRINS, C. L., LEMOS, C. S. L., FREITAS, S. P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Rev, Bras. Pl. Med**. 2006. v. 8. n. 4. p. 92-95.

RABELO, G. V. Efeito do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* sobre a contração do ducto deferente e do jejuno. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São João del Rei, 2021. 80p.

RAEESZADEH, M.; KARIMI, P.; KHADEMI, N.; MORTAZAVI, P. The Effect of Broccoli Extract in Arsenic-Induced Experimental Poisoning on the Hematological, Biochemical, and Electrophoretic Parameters of the Liver and Kidney of Rats. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2022 Jan 5;2022:3509706. doi: 10.1155/2022/3509706. PMID: 35035501; PMCID: PMC8754608.

RAMOS, F. T., *et. al.* Associação entre a orientação recebida durante a interação e a ocorrência de cicatrização de feridas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, 2021, vol. 74, n. 2.

ROBSON, M.C., STEED, D.L., FRANZ, M.G. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. **Curr Probl Surg**. Chicago, v.38, n.2, p.73-94, 2001.

RODRIGUES, M., KOSARIC, N., BONHAM, C. A., GURTNER. G. C. Wound healing: a cellular perspective. **Physiol Rev**. 2019. 99(1):665–706

ROSÁRIO, C. J. R. M. DO., ROCHA, C. Q. DA., AGUIAR, D. M. DE., LIMA, C. A. A., SILVEIRA, D. P. B., LEITE, J. A. C., COUTINHO, D. F., MELO, F. A. Anti-Ehrlichia properties of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. and its interaction with doxycycline. **AMB Express**. 2019 Apr 29;9(1):58. doi: 10.1186/s13568-019-0780-y.

ROWAN, D. D. Volatile metabolites. **Metabolites**. 2011;1:41–63. doi: 10.3390/metabo1010041.

RYAN, T. The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. **Micron**., 35: 161-171, 2004.

SANTOS, C. E. C. *et. al.* Efeito do extrato de *Bidens Pilosa* L., Mel e pomadas homeopática e alopática na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. **Arq. Bras. Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2020, vol. 72, n. 4.

SANTOS, R. F., NUNES, B. M., SÁ, R. D., SOARES, L. A. L., RANDAU, K. P. Morpho-anatomical study of *Ageratum conyzoides*. **Rev bras farmacogn**. 2016. Nov;26(6):679–87. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.07.002>

SCHAWARZER, S., RADZIETA, M., JENSEN, S. O., MALONE, M. Efficacy of a Topical Wound Agent Methanesulfonic Acid and Dimethylsulfoxide on In Vitro Biofilms. **Int J Mol Sci**. 2021 Aug 31;22(17):9471. doi: 10.3390/ijms22179471. PMID: 34502378; PMCID: PMC8431709.

Schonborn JL, Gwinnutt C. The role of the liver in drug metabolism [tutorial]. *Anaesthesia* 2010.

Seeley RR, Stephens TD, Tate P. Anatomia e Fisiologia Tradução. 6ª ed. (Leal M, Durão MAL, ed). Loures: Lusociência; 2003.

SHADY, K., NAIR, J., CRANNELL, C. Lavender Aromatherapy Examining the effects of lavender oil patches on patients in the hematology-oncology setting. **Clin. J. Oncol. Nurs**. 2019;23(5):502–508. doi: 10.1188/19.cjon.502-508.

SHAILAJAN, S., WADKE, P., JOSHI, H., TIWARI, B. Evaluation of quality and efficacy of an ethnomedicinal plant *Ageratum conyzoides* L. in the management of pediculosis. **J Young Pharm.** 2013 Dec;5(4):139-43. doi: 10.1016/j.jyp.2013.10.005. Epub 2013 Dec 27. PMID: 24563592; PMCID: PMC3930115.

SHARMA A.; SINGH, T.; PATHAK, D.; VIRMANI, T.; KUMAR, G.; ALHALMI, A. Antidepressive-Like Effect of *Aegle marmelos* Leaf Extract in Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression-Like Behaviour in Rats. **Biomed Res Int.** 2022 Dec 24;2022:6479953. doi: 10.1155/2022/6479953. PMID: 36593774; PMCID: PMC9805397.

SHORT, W. D., WANG, X., KESWANI, S.G. The Role of T Lymphocytes in Cutaneous Scarring. **Adv Wound Care (New Rochelle).** 2022 Mar;11(3):121-131. doi: 10.1089/wound.2021.0059. Epub 2021 Aug 27. PMID: 34238032; PMCID: PMC8742284

SILVA, J. R., *et al.* Wound Healing and Omega-6 Fatty Acids: from inflammation to repair. **Mediators Of Inflammation**, [S.L.], v. 2018, p. 1-17, 2018.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 490 p. 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2004. p. 467-495.

SINGLA, Vikas, *et al.* Emulgel: A new platform for topical drug delivery. *International Journal of Pharma and Bio Sciences.* 2012, Vol. 3

SORG, H., TILKORN, D. J., HAGER, S., HAUSER, J., MIRASTSCHIJSKI, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **Eur Surg Res.** 2017, 58 (1-2): 81–94. doi: doi.org/10.1159/000454919

SOUZA, B. E., OTTONI, M. H. F., ALVARENGA, P. G. M. DE, MEIRELES, A. B., SILVEIRA, J. V. W., ALMEIDA, V. G., SANTOS, M. G., DOS, GONZÁLEZ-TORRES, L. A., FUZER GRAEL, C. F., ALVIM B. M. G. E, AVELAR-FREITAS, B. A. Effect of essential oil from *Ageratum fastigiatum* on beta-integrin (CD18) expression on human lymphocytes stimulated with phorbol myristate acetate in vitro. **Nat Prod Res.** 2020 Dec;34(23):3409-3413. doi: 10.1080/14786419.2019.1569653. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30758988.

SOUZA, F. G. DE., CREPALDI, G. A., OLIVEIRA, I. G. DE., SAMPAIO, P. H. O., ROSSO, R. F., MORAES, C. C., JACQUES, A. C. Extração do óleo essencial da casca da laranja 'pera' (*Citrus sinensis* L. Osbeck) por hidrodestilação: avaliação de

rendimento e atividade antioxidante. **Produção Animal e Vegetal: Inovações e Atualidades**. 2022. v. 2. DOI: <https://doi.org/10.53934/9786585062039-60>

STURBELLE, R. T. *et al.* Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da Aloe vera em testes de Allium cepa e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Brazilian Journal de Pharmacognosy**, 2010, v. 20, n. 3.

SUKMAWAN, Y. P., ALIFIAR, I., NURDIANTI, L., NINGSIH, W. R. Wound Healing Effectivity of the Ethanolic Extracts of *Ageratum conyzoides* L. Leaf (White and Purple Flower Type) and *Centella asiatica* and *Astaxanthin Combination Gel* Preparation in Animal Model. **Turk J Pharm Sci**. 2021 Oct 28;18(5):609-615. doi: 10.4274/tjps.galenos.2021.34676. PMID: 34719189; PMCID: PMC8562118.

SNYDER, R. J., LANTIS, J., KIRSNER, R. S., SHAH, V., MOLYNEAUX, M., CARTER, M. J. 2016. Macrophages: a review of their role in wound healing and their therapeutic use. *Wound Repair Regen*. 24, 613–629.

TABESH, M.; SH, M. E.; ETEMADI, M.; NADDAF, F.; HEIDARI, F.; ALIZARGAR, J. The antibacterial activity of nasturtium officinale extract on common oral pathogenic bacteria. **Niger J Clin Pract**. 2022 Sep; 25 (9): 1466 - 1475. doi: 10.4103/njcp.njcp_1887_21. PMID: 36149206.

TAKANO, D. M., LIMA, M. do C. A. e. Estudo de distribuição e morfologia dos melanócitos em pele com e sem exposição solar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2010, v. 46, n. 1.

TEHSEEN, I.; HAQ, T. U.; ILAHI, I.; KHAN, A. A.; ATTAULLAH, M.; ZAMANI, G. Y.; ZAMAN, S.; ISMAIL, I. Antidiabetic and hepato-renal protective effects of medicinal plants in STZ induced diabetic rats. **Braz J Biol**. 2022 Jun 10;84:e260189. doi: 10.1590/1519-6984.260189. PMID: 35703627.

TESSEMA, Z.; MOLLA, Y. Evaluation of the wound healing activity of the crude extract of root bark of *Brucea antidysenterica*, the leaves of *Dodonaea angustifolia* and *Rhamnus prinoides* in mice. *Heliyon*. 2021 Jan 19;7(1):e05901. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e05901. PMID: 33521349; PMCID: PMC7820475.

TI, Y. L., SONG, F., FANG, Z., ZHANG, P. Plants and phytochemicals inhibit scar formation: A systematic review. **Ind. Crops Prod**. 2022, 185, 115113.

TRAUTMANN, A., TOKSOY, A., EENGELHARDT, E., BROCKER, E.B., GILLITZER, R. Mast cell involvement in normal human skin wound healing; expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. **J. Pathol**. 2000;190:100–106. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200001)190:1<100:AID-PATH496>3.0.CO;2-Q.

TRINDADE, L. C. T., *et al.* Diferenciação de miofibroblastos em feridas após uso tópico do metronidazol: estudo experimental. **Revista Col. Brasileira Cir**, 2015, vol. 46, n. 1.

TRINH, X-T., LONG, N-V., ANH, L. T. V., NGA, P. T., GIANG, N. N., CHIEN, P. N., NAN, S-Y., HEO, C-Y. A Comprehensive Review of Natural Compounds for Wound Healing: Targeting Bioactivity Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**. 2023, no. 17: 9573. <https://doi.org/10.3390/ijms23179573>

Van der Plaats A. The Groningen Hypothermic Liver Perfusion System for Improved Preservation in Organ Transplantation [PhD Thesis]. Groningen: University of Groningen; 2005.

VELNAR, T., BAILEY, T., SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: na Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **The Journal of International Medical Research**, 2009, v.37.

VIEIRA, D. S.; OLIVEIRA, F. T. de; SUAREZ, J. A. G.; SILVA, D. P. da; BERNADO, T. H. L.; BASTOS, M. L. de A. Biological activities: anti-infectious, antioxidant and healing of the vegetable species *Jatropha multifida*. **Revista Brasileira de Enfermagem**, 2021, vol. 74, n. 2.

VIGIL DE MELLO, S. V. G., ROSA, J. S. DA, FACCHIN, B. M., LUZ, A. B. G., VICENTE, G., FAQUETI, L. G., ROSA, D. W., BIAVATTI, M. W., FRODE, T. S. Beneficial effect of *Ageratum conyzoides* Linn (Asteraceae) upon inflammatory response induced by carrageenan into the mice pleural cavity. **J Ethnopharmacol**. 2016;194:337–47

VIKASARI, S. N., SUKANDAR, E. Y., SUCIATI, T., ADNYANA, K. Antiinflammation and Antioxidant Effect of Ethanolic Extract of *Ageratum conyzoides* Leaves. **OP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci**. 2022. DOI10.1088/1755-1315/1104/1/012024

VITALE, S., COLANERO, S., PLACIDI, M., DI EMIDIO, G., TATONE, C., AMICARELLI, F., D'ALESSANDRO, A. M. Phytochemistry and Biological Activity of Medicinal Plants in Wound Healing: An Overview of Current Research. **Molecules** 2022, 27, 3566.

XU, Z., JI, R., Zha, X., Zhao, H., ZHOU, S. The aqueous extracts of *Ageratum conyzoides* inhibit inflammation by suppressing NLRP3 inflammasome activation. **J Ethnopharmacol**. 2023 Jun 12;309:116353. doi: 10.1016/j.jep.2023.116353. Epub 2023 Mar 10. PMID: 36907476.

XUE, M. JACKSON, C. J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. **Advances in wound care**, 2015. v. 4, n. 3, p. 119-136, 2015. doi: doi.org/10.1089/wound.2013.0485

XUE, J., SCHMIDT, S. V., SANDER, J., DRAFFEHN, A., KREBS, W., QUESTER, I., DE NARDO, D., GOHEL, T. D., EMDE, M., SCHMIDLEITHNER, L., GANESAN, H., NINO-CASTRO, A., MALLMANN, M. R., LABZIN, L., THEIS, H., KRAUT, M., BEYER, M., LATZ, E., FREEMAN, T. C., ULAS, T., SCHULTZE, J. L. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. **Immunity**. 2014 Feb 20;40(2):274-88. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.006. Epub 2014 Feb 13. PMID: 24530056; PMCID: PMC3991396.

WANG, X., BALAJI, S., STEEN, E. H., LI, H., RAE, M. M., BLUM, A. J., MIAO, Q., BUTTE, M. J., BOLLYKY, P. L., KESWANI, S. G. T lymphocytes attenuate dermal scarring by regulating inflammation, neovascularization, and extracellular matrix remodeling. **Adv Wound Care (New Rochelle)** 2019;8:527–537.

WELLER, K., FOITZIK, K., PAUS, R., SYSKA, W., MAURER, M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J.* 2006;20:2366–2368. doi:10.1096/fj.06-5837fje.

WELSS, T., BASKETTER, D. A., SCHRODER, K. R. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. **Toxicol. In Vitro**, 18: 231-243, 2004.

WICHAIYO, S., SVASTI, S., SUPHARATTANASITTHI, W., MORALES, N. P. Dasatinib induces loss of vascular integrity and promotes cutaneous wound repair in mice. **J. Thromb Haemost.** 2021;19:3154–3167.

WILGUS, T. A., ROY, S., MC DANIEL, J. C. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. **Adv. Wound Care.** 2013. 2:379.

WU, Y., LUO, Y., WANG, Q. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in Zein nanoparticles prepared by liquid–liquid dispersion method. **LWT-Food Sci. Technol.** 2012;48:283–290. doi: 10.1016/j.lwt.2012.03.027.

WULFF, B.C., WILGUS, T. A. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? **Exp Dermatol.** 2013 Aug;22(8):507-10. doi: 10.1111/exd.12169. Epub 2013 Jun 27. PMID: 23802591; PMCID: PMC3723719.

YOUNAN, G. J., HEIT, Y. I., DASTOURI, P., KEKHIA, H., XING, W., GURISH, M. F., OORGIL, D. P. Mast cells are required in the proliferation and remodeling phases of microdeformational wound therapy. **Plast Reconstr Surg.** 2011 Dec;128(6):649e-658e. doi: 10.1097/PRS.0b013e318230c55d. PMID: 22094766.

YOUNG, A., MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery** 2011, 29, 475–479.