

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**UTILIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DE
CAJUEIRO (*Anacardium occidentale L*) EM CICATRIZAÇÃO
CUTÂNEA EXPERIMENTAL**

MESTRANDA: Maria das Graças Paiva
ORIENTADORAS: Prof^ª Dra. Ana Lúcia F. Porto
Prof^ª Dra. Ana M^a dos Anjos C. Leão

RECIFE
2003

MARIA DAS GRAÇAS PAIVA

UTILIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DO
CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L) EM CICATRIZAÇÃO
CUTÂNEA EXPERIMENTAL.

Dissertação apresentada para o cumprimento formal das exigências para
obtenção do título de Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal de
Pernambuco.

Aprovado por: DISTINÇÃO -----

Data: 28/02/2003

UTILIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DA GOMA DE CAJUEIRO
(*Anacardium occidentale* L) EM CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA
EXPERIMENTAL.

MARIA DAS GRAÇAS PAIVA

BANCA EXAMINADORA

1. Prof^o Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
2. Prof^a Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha
3. Prof^a Dra. Rejane Jurema Mansur Custódio Nogueira

A memória de José Benedito Paiva, meu querido pai, que perdi no tempo, mas, o reencontro nas lembranças dos valores éticos, morais, culturais, e , nos sonhos além da vida.

ÍNDICE ANALÍTICO

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUÇÃO	
1.1 ASPECTOS GERAIS DA PELE	9
1.2 CICATRIZAÇÃO: ASPECTOS BIOLÓGICOS, BIODINÂMICOS E FISIOLÓGICOS	11
1.3 TRATAMENTO DE FERIDAS	16
1.4 BIOMATERIAIS	18
1.5 POLISSACARÍDEOS	21
1.6 POLISSACARÍDEOS E CICATRIZAÇÃO	22
1.7 GOMA DE CAJUEIRO	23
2.0 JUSTIFICATIVA	25
3.0 OBJETIVOS	26
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

AGRADECIMENTOS

A Deus, causa primária de todas as coisas .

À minha mãe, Rosário Paiva, a meus irmãos, Leide, Paiva Filho e Jeane, ao nosso anjo guardião, Maria, minha sobrinha Sarah e aos cunhados Kátia e Jaime, por representarem meu porto seguro.

Ao meu companheiro, Valério Vieira e minha filhinha Mariana, por tudo que vivemos em nosso dia-a-dia.

Aos amigos Jacqueline Nóbrega, Sandra Fonseca, Álvaro Badaró, Marcos André, Francisca Motta, Cláudia Fonseca e Ana Karlla Albuquerque pelas boas vibrações e solidariedade.

Às minhas orientadoras Prof^a Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto e Prof. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, pelos ensinamentos constantemente transmitidos.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica, em especial, aos Professores Nicácio Henrique da Silva, Luiz Bezerra de Carvalho Filho, Elizabeth Chaves e Maria da Paz C. da Silva pelos ensinamentos e palavras de incentivo.

À Coordenação do Mestrado em Bioquímica, na pessoa da atual coordenadora Prof^a. Dra. Vera L. Menezes, pela boa acolhida.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial, José Miron de Oliveira, Neide Ferreira e Djalma Gomes da Silva, pela dedicação e atenção dispensadas.

Aos colegas da turma do Mestrado, que tornaram inesquecíveis os momentos de união e solidariedade vivenciados, em especial, a minha amiga Nadejda Nóbrega (NAD) .

À Direção do LIKA, na pessoa do Prof^o. Dr. José Luiz de Lima Filho, pelo acesso as suas dependências.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia do LIKA, Giuliana Schirato, Flaviane Monteiro e Flávio Oliveira, pela inestimável colaboração.

Aos Funcionários do LIKA, em especial, Luiz Felipe, Maria Helena Madruga, Otaviano e Moisés Melo, por viabilizar recursos necessários à realização deste trabalho.

Aos colaboradores de última hora, Éricka Albuquerque, Mário Rodrigues Melo Júnior e Prof^o Frederico Celso Maia, pelo altruísmo.

Ao meu eterno mestre Prof^o Gordon Cummings (Georgia State University – USA), um dos incentivadores dessa busca e da qual serei eterna aluna, thank you!

LISTA DE FIGURAS

PARTE I - INTRODUÇÃO

Figura 1 Desenvolvimento Histórico de Biomateriais e Previsão para o Futuro 19

PARTE II -List of Captions 46

Figura 1 Demonstração de aspectos macroscópicos entre os grupos controle e teste no 2º dia pós-operatório, considerando os sinais inflamatórios .. 47

Figura 2 Demonstração de aspectos macroscópicos entre grupos controle e teste no 7º dia , considerando padrões de cicatrização. 48

Figura 3 Demonstração de aspectos macroscópicos entre grupos controle e teste no 12º dia , considerando padrões de cicatrização 49

Figura 4 Representação da contração da ferida (%) dos grupos, depois do tratamento tópico com NaCl, Ácido Ascórbico, Furacin® e Emulsões (75mg/ml, 150mg/ml e 225mg/ml)... 50

Figura 5 Representação da área da ferida (cm²) e do tempo (dias) depois do tratamento tópico com NaCl, Ácido Ascórbico, Furacin® e Emulsões (75mg/ml, 150mg/ml e 225mg/ml)... 51

Figura 6 Aspectos microscópicos dos grupos controle e teste corados com Tricrômico de Masson, aumento de 100x. A- NaCl (2º dia); B – Ácido Ascórbico (2º dia) e C – NaCl (12º dia). 53

Figura 7 Aspectos microscópicos das feridas tratadas com Furacin® coradas com Tricrômico de Masson, aumento de 100x. A(2º dia) e B (12º dia). 54

Figura 8 Aspectos microscópicos das feridas tratadas com P-JU 2. A- coloração HE, aumento 40x e B , coradas com Tricrômico de Masson, 100x (2º dia); C e D (7º dia) com 100 e 40x respectivamente, e, E e F(12º dia), com 100 e 40 x respectivamente. 55

LISTA DE TABELAS

PARTE I- Revisão de Literatura

TABELA 1 – Principais Eventos da Reparação de Feridas	16
---	-----------

PARTE II – List of Captions

TABELA 1 – Observações histológicas entre grupos Controle e Teste.....	52
--	-----------

RESUMO

O processo de cicatrização de ferida é uma resposta fundamental à lesão tecidual que envolve extensos eventos celulares, moleculares, fisiológicos e bioquímico, tradicionalmente dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e remodeladora, que se sobrepõem, resultando na restauração da integridade do tecido. Com o objetivo de otimizar a cicatrização *in vivo*, foi avaliado o efeito do tratamento tópico com o polissacarídeo da Goma do cajueiro (P-JU; *Anacardium occidentale* L), em lesões cutâneas experimentais. A cicatrização foi avaliada em camundongos fêmeas albino suíços, pesando 30 ± 5 g, com idade de 8 semanas, dividido em 6 grupos ($n=15$ /grupo), sendo três grupos controle (NaCl, Ácido Ascórbico e Furacin[®]) e três grupos teste (emulsão Ácido Ascórbico + P-JU) em diferentes concentrações (75mg/ml, 150mg/ml e 214,3mg/ml). Uma lesão de 1cm^2 de diâmetro foi realizada na região torácica dorsal e topicamente tratada em dose única (200 μ l) da substância correspondente, no pós-operatório imediato, como descrito. Cada ferida foi avaliada diariamente do ponto de vista clínico. A contração da ferida foi calculada como descrito por Prata (1998). Os resultados foram submetidos à análise estatística usando Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Ao exame macroscópico, considerando: sinais inflamatórios, tecido de granulação e características da crosta. Observou-se que, entre os grupos teste (150mg/ml e 214,3mg/ml) feridas com aspecto seco, menos hiperêmicas e sem edema, enquanto que, as do grupo controle, apresentaram intensa hiperemia, edema e aspecto úmido. Quanto às características da crosta, o grupo teste apresentou, aspecto delgado, distribuição uniforme e com desprendimento em torno do 8º dia, quanto aos grupos controle, desenvolveram crostas espessa, irregulares e com desprendimento em torno do 10º dia, algumas se conservando até o 12º dia, final do experimento. Quanto à análise histopatológica, procedeu-se a biópsias no 2º, 7º e 12º dias de pós-operatório. No 2º dia os grupos teste (150mg/ml e 214,3mg/ml) apresentaram maior vascularização, menor volume de exsudato e infiltrados neutrofílicos e eosinofílicos discretos. No 7º dia os referidos grupos mostraram padrão fibrovascular de organização, enquanto que, a angiogênese era marcante nos grupos controle. Finalmente, no 12º dia as amostras tratadas com P-JU já se apresentavam reepitelizadas e com um padrão mais ordenado de colagenização. O presente estudo sugere que o P-JU aplicado topicamente em feridas cutâneas abertas, acelera o processo de cicatrização.

ABSTRACT

The wound healing is a fundamental response to tissue injury that involves a wide of cellular, molecular, physiological and biochemical events, traditionally divided into three phases: inflammatory, proliferative and remodeling, that overlapping, resulting in restoration of tissue integrity. The aim this study was to optimize the healing *in vivo* was evaluated of topical treatment with cashew gum polysaccharide (P-JU; *Anacardium occidentale* L) in experimental cutaneous wound. The healing were evaluated using female swiss mice, weighting 30 ± 5 g, 8 weeks of age, divided into six groups (n=15/ group), where three control groups (NaCl, Ascorbic acid and Furacin[®]) and three test group emulsion (Ascorbic acid +P-JU) in differents concentrations (75mg/ml, 150mg/ml and 214,3mg/ml). A standard wound of uniform 1cm^2 diameter was formed on the dorsal region and topically treated by unique dose (200 μ l) immediately after surgery, as described. Each wound was evaluated daily of clinical point of view. The wound contraction was calculated as described by Prata (1998). The results were submitted statistical analysis using Tukey Test's ($p \leq 0.05$). The macroscopical analysis considering: inflammatory signals, granulation tissue and scab characteristics. Between test group (150mg/ml and 214,3 mg/ml) was observated wound with dry aspects, fewer hyperemia and without oedema, although, the control groups presented intense hyperemia, oedema and moist aspect. The scab characteristic, the test groups presented thin, uniform distribution and detachment by 8th day, the control groups developed tick scab, irregular, and detachment by 10th day, some of them stayed until finish experiment. The histopathological analysis, proceed the biopsies in 2nd, 7th and 12th days after surgery. In the 2nd day, the test groups (150mg/ml and 214,3mg/ml) presented more vascular, fewer exudate volume and inflammatory cell infiltrates discret (lymphocytes and eosinophiles) . In 7th the day, the test group showed fibrous-vascular pattern of organization, although the angiogenesis was marked in the control group. Finally in the 12th day the samples treated with P-JU presented re-epithelialisation and with collagenization pattern more orderly. The present study suggest that cashew gum polysaccharide applied topically on open wound accelerates the healing process.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DA PELE

A pele é o maior órgão multifuncional do corpo, e o conhecimento das suas estruturas e função é essencial para os clínicos e pesquisadores. O tecido é constituído por três camadas: a epiderme (externamente), a derme e a subderme ou hipoderme (Wysochi, 1999; Magalhães, 2000).

A epiderme, região mais externa e avascular, é formada por tecido epitelial estratificado plano queratinizado, ou seja, por uma camada superior constituída por células queratinizadas mortas, e uma camada inferior, formada por células vivas não queratinizadas (Henrikson et al., 1999). Estas células são produzidas na camada mais inferior da epiderme (camada basal ou germinativa) e em sua evolução em direção à superfície, sofrem o processo de queratinização ou corneificação, o que dá origem à camada córnea. A renovação celular constante da epiderme faz com que as células da camada córnea sejam gradativamente eliminadas e substituídas por outras. Além dos queratinócitos, encontram-se também na epiderme os melanócitos, que produzem o pigmento responsável pela cor da pele (melanina) e células de defesa imunológica (células de Langerhans). A epiderme dá origem aos anexos cutâneos: unhas, pêlos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (Lima, 2002)

Situada abaixo da epiderme, a derme é formada por tecido conjuntivo apresentando colágeno, elástico e reticular, sendo responsável pela resistência e elasticidade da pele. Foliculos pilosos, glândulas, vasos sanguíneos e linfáticos e nervos estão presentes nesta região (Calhoun & Stinson, 1982). O tipo celular predominante é o fibroblasto, o qual sintetiza a maior parte dos constituintes da matriz extracelular e participa no processo de cicatrização da pele (Borojevic e Serricella, 1999; Henrikson et. al., 1999).

A hipoderme é uma camada de tecido conjuntivo que ancora a derme aos músculos ou aos ossos subjacentes (Calhoun & Stinson, 1982). É também denominada de tecido celular subcutâneo, apresentando a porção mais profunda da pele composta por feixes de tecido conjuntivo que envolvem células gordurosas (adipócitos) e formam lobos de gordura (Lima, 2002).

A matriz extracelular (MEC) corresponde aos complexos macromoleculares relativamente estáveis, constituídos por moléculas de diferentes naturezas que são produzidas, exportadas e complexadas pelas células, tendo a importante função de modular a estrutura fisiológica e biomecânica dos tecidos. É especialmente abundante nos tecidos conjuntivos, podendo ser dividida em três componentes principais: os componentes fibrilares (colágeno e elastina), os componentes não fibrilares (proteoglicanos e glicoproteínas não colagênicas) e as microfibrilas (formadas pelo colágeno tipo IV e microfibrilas associadas à elastina). Essa matriz pode ser abundante e mecanicamente importante para o tecido ósseo e tendões ou escassa nos tecidos como o muscular ou epidérmico, onde o próprio citoesqueleto dessas células suporta a carga mecânica. A maior ou menor resistência desses tecidos é dada, principalmente, pelo colágeno, a principal proteína fibrosa do tecido conjuntivo (Alberts et al., 1997).

Enquanto o colágeno fornece resistência ao estiramento, outro grupo de moléculas da MEC, os proteoglicanos, promovem a resistência à compressão e preenchem espaços. Estes proteoglicanos são formados por proteínas extracelulares ligadas a uma classe especial de um complexo polissacarídico negativamente carregado, os glicosaminoglicanos (GAGs) e variam quanto ao tamanho, forma e composição química. Comumente muitas cadeias de GAGs, compostos fortemente hidrofílicos, estão ligadas a uma única proteína central e esta por sua vez pode estar ligada em uma extremidade de um GAG (ácido hialurônico), criando uma enorme molécula semelhante a uma escova (Alberts et al., 1997).

A função da pele é servir como uma barreira protetora contra o meio ambiente. A perda de integridade de grandes porções da pele, como resultado de lesões, pode levar desde a incapacidade até a morte (Singer, 1999)

No transcorrer da vida o ser humano é freqüentemente submetido a lesões todavia, dependendo do grau de lesão resultante, graças a processos fisiológicos, defende-se e recupera sua integridade. Sem dúvida, a cicatrização é um destes processos para os quais o organismo apela, a fim de restaurar sua arquitetura (Melega et al., 1992).

Algumas formas de vidas inferiores como os protozoários, podem regenerar alguma parte das suas estruturas unicelulares enquanto que, os vertebrados inferiores conservam a habilidade de regenerar um membro amputado ou cauda; são células pluripotenciais; entretanto, o sistema dos mamíferos é hábil somente para substituir certos tecidos, tais

como, um defeito na epiderme e conseqüentemente reparar o dano a outras estruturas pela formação da cicatriz (Regan & Barbul, 1994).

O reparo tecidual, na maioria dos casos, ocorre através da associação de dois processos distintos: a regeneração e a cicatrização, também chamada de fibroplasia. Ambos são eventos que ocorrem na intimidade dos tecidos danificados sendo caracterizados pela migração, proliferação e diferenciação celular, fenômenos determinados por interações específicas entre as células e a matriz extracelular. A regeneração é um processo de reparo que leva à substituição do tecido lesado por células parenquimais do mesmo tipo das células perdidas, restituindo a estrutura e a fisiologia do tecido. A cicatrização representa a substituição do tecido lesado por um tecido conjuntivo de natureza fibroplástica (Dantas, 2000).

1.2 CICATRIZAÇÃO: ASPECTOS BIOLÓGICOS, BIODINÂMICOS E FISIOLÓGICOS

Em muitas circunstâncias, o organismo pode sofrer injúrias que podem ser causadas por agentes físicos, químicos ou biológicos, como vírus, bactérias, fungos ou protozoários (Magalhães, 2000).

Depois do ferimento, inicia-se no local da injúria um processo complexo envolvendo respostas integradas por diferentes tipos de células a partir de alterações locais e sistêmicas (Clark, 1993; Wright et al., 1992; Singer, 1999).

Se a ferida constitui a solução de continuidade anátomo-fisiológica da área lesada, a cicatriz corresponde à tentativa biológica para qual o organismo recorre para restaurar sua integridade (Cohen et al., 1992).

A palavra cicatriz, originada do latim, *cicatrice*, significa a marca deixada na estrutura anatômica. É o resultado final de um conjunto de acontecimentos biológicos que

se seguem à ferida, agressão ou injúria, finalizando sempre pela formação de colágeno e epitelização, binômio sem o qual não existe cicatriz (Silva,2000).

O processo pelo qual a reparação tecidual lança mão é chamado de cicatrização da ferida e é composto de uma seqüência contínua, de inflamação e reparação, na qual células epiteliais, endoteliais, inflamatórias, plaquetas e fibroblastos, vão para restaurar as suas semelhanças e funções normais. O processo difere um pouco de um tipo de tecido para outro e é geralmente independente da forma de lesão (Regan & Barbul,1994) .

Na cirurgia, a cicatrização de feridas tem sido classificada em: cicatrização por primeira intenção ou união primária, e, por segunda intenção ou união secundária. Na cicatrização por primeira intenção, os tecidos são aproximados por fios de suturas, ou grampos e as de segunda intenção ocorrem quando as margens abertas se aproximam pelo processo biológico da contração, permitindo o fechamento espontâneo ou secundário da ferida (Cohen et al., 1992).

A divisão do processo cicatricial em fases pode variar muito de autor para autor, alguns a dividem em três fases (hemostasia, inflamação e reparação propriamente dita), outros em quatro fases (coagulação, processo inflamatório, fibroplasia e remodelamento) e há ainda àqueles que consideram cinco fases (inflamação, fibroplasia, angiogênese, síntese do tecido conjuntivo e epitelização ou inflamação, epitelização, formação de tecido de granulação, neovascularização e contração da ferida), (Hunt & Goodson, 1993, McKinney & Cunningham, 1989, Cohen et al, 1992, Singer, 1999, Fazik et al., 2000).

O plano básico do processo de cicatrização, de uma maneira geral, é sempre o mesmo, tradicionalmente dividido em três fases:inflamatória, proliferativa e remodeladora tendo como objetivo preencher aquele espaço e selá-lo com uma cicatriz (Majno & Joris, 1996, Yamaguchi & Yoshikawa, 2001).

A resposta cicatricial é iniciada no momento do trauma, quando feridas cirúrgicas ou traumáticas rompem a arquitetura tecidual (Kaplan, 1993). A lesão do tecido causa a ruptura dos vasos sangüíneos e extravasamento dos elementos constituintes do sangue. O coágulo sangüíneo restabelece a hemostasia e abastece a matriz extracelular por migração de células (Heldin & Westmark,1996).

O processo inflamatório caracteriza-se pela migração sequencial de leucócitos para a ferida. No prazo de 24 horas, a ferida apresenta predominância de leucócitos polimorfonucleares (PMN) seguidos da preponderância de macrófagos (Cohen et al., 1992).

Os neutrófilos e os macrófagos são as primeiras células a chegar ao sítio da lesão. O papel principal destas células é prevenir a infecção do tecido agredido, bem como, eliminar detritos da matriz extracelular e corpos estranhos. Os macrófagos se destacam por comandarem as demais células durante os eventos que determinam o reparo tecidual, devido à capacidade de produzirem numerosas citocinas como: Fator de Crescimento Derivados de Plaqueta (PGDF), Fator de Crescimento Transformante $-\beta$ (TGF- β), Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGF) e outras. As citocinas produzidas por macrófagos e linfócitos provocam o influxo de neutrófilos, bem como, a migração e proliferação de células endoteliais, fibroblastos e células indiferenciadas que começarão a repopular o sítio da lesão, os macrófagos desempenham um papel central entre reparo e inflamação (Riches, 1996, Dantas, 2000).

A fase proliferativa consiste principalmente da formação de tecido de granulação, reepitelização e contração da ferida, todos desempenham papéis importantes na cicatrização normal. O processo de proliferação de fibroblastos e atividade sintética é chamado de fibroplasia. A fase fibroplásica é caracterizada por um aumento do número de fibroblastos, que iniciam a síntese e secreção de componentes da matriz extracelular (principalmente glicosaminoglicanos e colágenos tipo I e III seguida pela proliferação e crescimento interno dos capilares (angiogênese) (Steed, 1997; Cotran et al., 2000; Regan & Barbul, 1994).

Há no local do trauma um afluxo de fibroblastos que se depositam, multiplicam e sintetizam substâncias. Ocorre intensa proliferação endotelial de maneira que se constitui num tecido denominado granulação, que por sua capacidade contrátil, as feridas diminuem a área de superfície cruenta, facilitando a epitelização. O tecido de granulação formado durante a fase fibroplásica é rico em vasos, a formação de novos vasos sanguíneos é necessária para sustentar esse tecido, tem um aspecto úmido e sua função primordial é preencher o espaço deixado pela ferida, servindo também como barreira a microorganismos (Modolin, 1992). (Madri et al., 1990).

A neovascularização das feridas, denominada de angiogênese, é o processo de brotamento de vasos a partir de vasos preexistentes e tem como função suprir de nutrientes o tecido de cicatrização. Na angiogênese, as células endoteliais crescem para fora, em direção à margem da ferida aparentemente em resposta a sinais quimiotáticos e mitogênicos das plaquetas e macrófagos (Hunt & Goodson, 1993). O estímulo responsável pela angiogênese é multifatorial e relacionado à liberação de diversos fatores solúveis (peptídeos) na ferida. Tais fatores de crescimento têm potentes propriedades biológicas de quimioatração e mitogênicas demonstradas através de sistemas experimentais *in vitro* e ensaios *in vivo* (Fazik, 2000).

Depois da migração em direção à ferida, os fibroblastos começam a síntese da matriz extracelular. O abastecimento da matriz extracelular é gradualmente substituído por matriz colagenosa. Uma vez que a matriz colagenosa abundante tenha sido depositada na ferida, os fibroblastos param de produzir colágeno e o tecido de granulação rico em fibroblastos é substituído por uma cicatriz relativamente acelular (Clark et al., 1995; Desmoulière, 1995, Singer, 1999). Quando a ferida está preenchida pelo tecido de granulação, a angiogênese cessa e muitos dos vasos desintegram-se como resultado de apoptose (Ilan et al., 1998).

Enquanto estes fenômenos estão ocorrendo na profundidade da ferida, a restauração da integridade epitelial está ocorrendo na superfície da mesma. A reepitelização da ferida começa poucas horas depois da lesão e faz-se pelo aumento de tamanho, da divisão e da migração da camada basal da epiderme por sobre a área de reparação de tecido conjuntivo subjacentes (Regan & Barbul, 1994; Diegelman, 1981).

A contração de feridas, envolve uma interação orquestrada complexa de células, matriz celular e citocinas (Clark, 1999). Durante os primeiros dias é a crosta que contrai. A crosta consiste principalmente de fibrina seca, formando-se quando o exsudato escapa da mesma, coagula e resseca. Isto ocorre porque o coágulo é exposto ao ar atmosférico. A função dessa crosta é selar a ferida, isolando-a do meio ambiente, não permitindo a penetração de bactérias. A crosta pode reduzir a superfície de uma ferida pequena aberta (Peacock, 1984; Dantas, 2000).

A reparação de uma ferida aberta apresenta um problema especial devido a sua perda de substância, que de alguma forma deve ser preenchida. O organismo é capaz de

sintetizar algum preenchimento, como o tecido de granulação, porém, tem um mecanismo coadjuvante mais rápido. Após um período que varia de 5 a 9 dias, as margens da ferida movem-se uma contra a outra, como se houvesse uma força invisível de tração. Este fenômeno é conhecido por “contração da ferida”, definida como movimento centrípeto das bordas de um ferida de profundidade total, a fim de facilitar o fechamento do defeito cutâneo (Stegman et al.,1982). Em qualquer cicatrização, a maior quantidade de tecido de granulação fará com que o fenômeno ocorra de maneira quantitativamente mais exuberante (Peacock, 1984). A contração é um fator importante que contribui para o fechamento efetivo, quando as feridas podem cicatrizar secundariamente. Dependendo da localização esse fenômeno pode ser de 39% a 62% (média de 45%) da área do defeito cutâneo (Lawrence et al.,1988).

Singer et al,(1984), descreveram uma estrutura – o fibronexo – que consiste numa associação muito íntima, através da membrana citoplasmática do miofibroblasto, de microfilamentos semelhantes a actinas intracelulares e fibras de fibronectinas extracelulares. Tais fibras de fibronectina formam conexões com fibras colágenas e outros fibroblastos. Assim como os filamentos de actina na contração de miofibrobalastos, o fibronexo transmite a força para o processo de granulação do tecido A aparência do miofibroblasto corresponde ao começo da compactação do tecido conectivo e contração da ferida (Montesano & Orci, 1988; Fazik, 2000).

A remodelação do colágeno durante a transição do tecido de granulação à cicatriz é dependente da síntese e catabolismo de colágeno em velocidade baixa, A degradação do colágeno na ferida é controlada por muitas enzimas proteolíticas designadas metaloproteinases, as quais são secretadas pelos macrófagos, células epidermais, assim como fibrobalstos . Esse evento de remodelação do colágeno é responsável pelo aumento da força de tensão e da diminuição do tamanho da cicatriz. O resultado normal da fase de remodelação da cicatrização é uma cicatriz com aproximadamente 80% da força de tensão da pele íntegra (Fazik, 2000; Mignati et al., 1996).

Uma síntese dos principais eventos da reparação de feridas está representado na Tabela 1.

TABELA 1 Principais Eventos da Reparação de Feridas (extraído de Stadelman *et al.*, 1998).

Eventos	Ocorrências
Eventos imediatos	Hemostasia e geração de estímulo à inflamação
Inflamação	Vasodilatação, vasopermeabilidade aumentada, infiltração de leucócitos, morte de bactérias, produção de macrófagos para estimular a proliferação celular e síntese de proteínas
Proliferação celular e migração	Fibroblastos, endotélio (angiogênese), epitélio
Síntese Molecular	Colágeno e proteoglicanos
Polimerização de Colágeno e ligação cruzada	Força física adquirida
Remodelação	Colagenólise, mudanças mecânicas aparentes e remodelação vascular
Contração (ferida aberta)	

1.3 TRATAMENTO DAS FERIDAS

Já nos primórdios da Medicina, era registrada a preocupação com a cicatrização das feridas que, tal como atualmente, era considerada essencial à saúde, pois poderia ocorrer a morte por infecções adquiridas através dos ferimentos. Os índios Navajos escolhiam o canto apropriado para convencer os deuses a acelerarem a cicatrização (Room, 1984). No Egito, no ano de 5000 A.C., os médicos consultavam o que veio a ser denominado de “Papiro de Edwin Smith“, que constitui no mais antigo documento cirúrgico conhecido e que se destaca pelas suas orientações sobre o tratamento de infecções (Knustson et al., 1986)

A manipulação das feridas, objetivando melhores resultados cicatriciais, tornou-se um desafio para os cirurgiões cujas atitudes, se modificaram ao longo dos séculos. Identificam-se quatro épocas que se caracterizam por medidas terapêuticas peculiares. Na primeira, que evoluiu até aos primórdios do Cristianismo, o médico era um mero espectador, e o princípio do tratamento embasava-se na interferência mínima com aplicação de toalhas limpas e mel sobre o ferimento, aguardando a sua resolução à custa do que se entende, atualmente, como cicatrização por segunda intenção. Na época seguinte, os cirurgiões preconizavam o uso de óleo fervente ou metais aquecidos sobre as feridas; prevalecia o conceito paradoxal de que a presença de secreções purulentas era benéfica, pois, supunha-se que ela acelerava a cicatrização. Tais conceitos permaneceram até 1586, quando Ambroise Paré retomou o “Princípio de Interferência Mínima”, o que foi consubstanciado na seguinte frase “... a natureza fará a cicatrização desde que o médico não atrapalhe sua evolução”. À proposta de Paré somaram-se as de Halsted e Carrel que aprimoraram técnicas de limpeza minuciosa das feridas e o uso de suturas para aproximação de suas bordas. Evidenciaram-se, dentro desta época, Lister, Pasteur e Semmelweis, cujos princípios de assepsia e anti-sepsia permitiram o controle das infecções e, por conseguinte, facilitavam a cicatrização. Finalmente, graças às aquisições de conhecimentos em bioquímica e nutrição, surgiu uma nova época na qual se pretende interferir na biologia molecular, influenciando na síntese de moléculas envolvidas nos fenômenos cicatriciais; entretanto, na área lesada, persiste o princípio de interferência mínima (Melega, et al., 1992).

O emprego de produtos medicinais de origem natural no tratamento de certas doenças tem sido amplamente utilizado pela população, mas poucas pesquisas têm sido realizadas a fim de atribuir a estes os seus efeitos terapêuticos. Alguns estudiosos mencionaram que elementos existentes na natureza poderiam constituir materiais alternativos para o tratamento local das feridas, já que os curativos disponíveis, sintéticos ou biossintéticos, utilizados tanto no homem como em outras espécies são onerosos. (Silva et al., 2000).

Chega-se então, ao emprego de materiais que possam mimetizar as propriedades da pele, como os biomateriais que podem ser definidos como um “material interativo” capaz

de estabelecer uma afinidade apropriada com o tecido vizinho sem indução de uma resposta adversa ao hospedeiro” (Palapura & Kohn, 1992).

Substâncias biologicamente ativas capazes de modificar a resposta imune têm sido estudadas objetivando melhorar a resposta às enfermidades. Definidos como modificadores da resposta biológica (MRB) alguns tipos de biomateriais têm sido amplamente utilizados devido aos seus efeitos anti-tumorais, a exemplo dos polissacarídeos que são capazes de estimular o sistema imune, produzindo respostas a nível humoral e celular (Fields & Koeller, 1993; Mitchell, 1988 e Abbas et al., 2000).

1.4 BIOMATERIAIS

Os Biomateriais exercem um papel central no campo da engenharia dos tecidos. Polímeros sintéticos biomiméticos têm sido criados para estimular funções celulares específicas e para dirigir interações célula-célula. Polímeros naturais têm também exercido um papel importante neste esforço, e polímeros recombinantes , que combinam aspectos benéficos de polímeros naturais com muitos dos aspectos desejáveis de polímeros sintéticos têm sido projetados e produzidos. Os biomateriais têm sido empregados para conduzir e acelerar de outra maneira naturalmente ocorrendo fenômenos, tais como: regeneração de tecidos na cicatrização das feridas; induzir a resposta celular que não deve normalmente estar presente; assim como a cicatrização num indivíduo doente ou a produzir um novo leito para receber futuros transplantes e para bloquear o fenômeno natural, como a rejeição imune de transplante da célula de outras espécies ou a transmissão de sinais de fatores de crescimento que estimulam a formação da cicatriz (Hubbel, 1995).

A expansão do campo da Engenharia dos tecidos tem acelerado a demanda por materiais os quais são tecidos compatíveis, biodegradáveis e com propriedades mecânicas próximas ao tecido alvo. O controle do nível molecular da atividade biológica, é também um aspecto altamente desejável (Chupa et al., 2000). Um esquema demonstrando a evolução do uso de biomateriais pode ser observado na Figura 1.

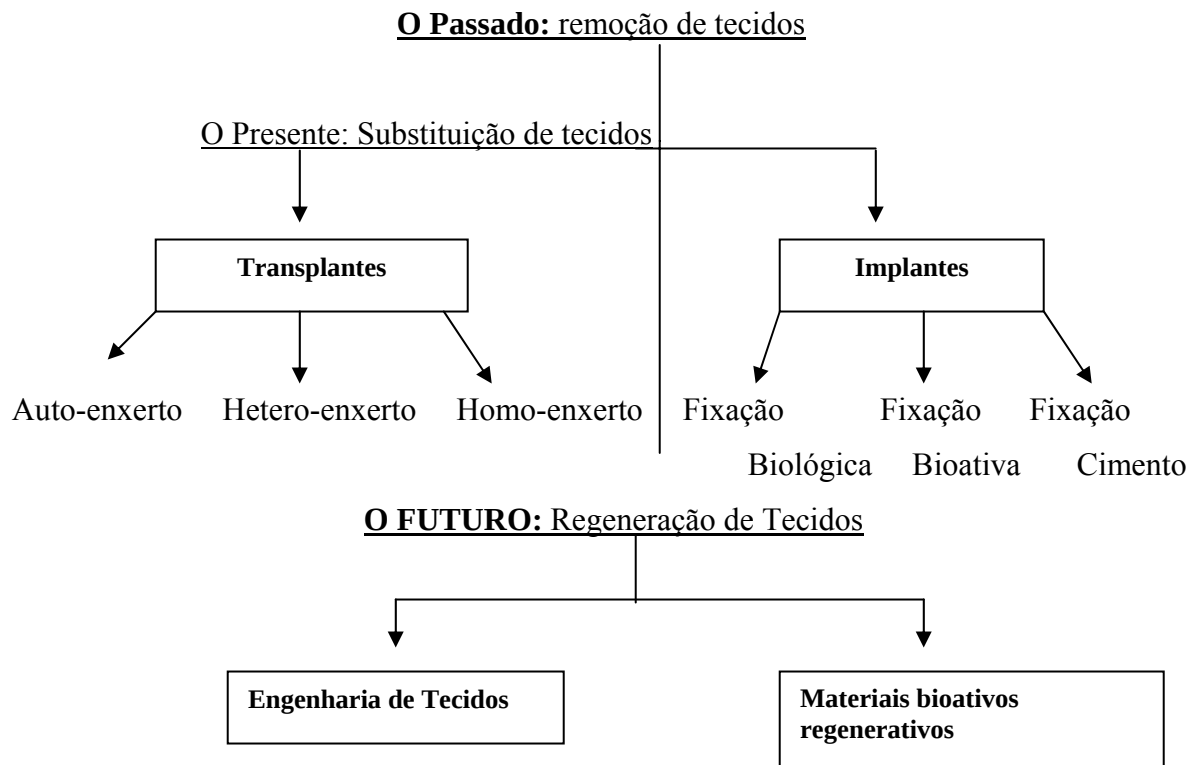


Figura 1. Desenvolvimento Histórico dos Biomateriais e Previsão para o Futuro (Hench, 1998).

O campo dos biomateriais resultou de um casamento de disciplinas incluindo ciências da vida, medicina, ciências materiais e engenharia (Seal, 2001)

Esforços estão sendo feitos em todo o mundo para descobrir agentes que possam promover a cicatrização e assim reduzir o custo de hospitalização e proteger o paciente das amputações ou outras complicações severas (Shukla, 1999).

As evidências precoces do uso de plantas para cicatrização pela humanidade é datada do período Neanderthal (Kleiner, 1998). O uso de plantas como medicamento volta à Antiguidade. As grandes civilizações dos antigos Chineses, Indianos e Norte-africanos fornecem evidências escritas da ingenuidade do homem na utilização de plantas para o tratamento de uma larga variedade de doenças. Na Antiga Grécia, por exemplo, estudiosos classificavam as plantas e davam descrições delas, desse modo, cuidando do processo de

identificação. Theophrastus tem sido descrito por alguns como pai da Botânica (Phillipson, 2001).

Muitas plantas são afamadas pelo seu uso na cicatrização de feridas num sistema de medicina tradicional. Estes remédios de plantas são usados desde os tempos antigos, mas, o mecanismo de ação e eficácia tem sido muito pouco avaliado cientificamente (Nagappa & Cheriyan, 2001). Alguns exemplos podem ser citados, como o uso de *Aloe vera*, *Carica papaya*, *Centella asiática*, em grande variedade de condições, desde a utilização em processos inflamatórios, insuficiência venosa até o tratamento de queimaduras (Starley et al., 1999; Brinkhaus et al., 2000; Vogler & Ernst, 1999).

No século XVI, jardins botânicos foram criados para cultivar plantas medicinais para escolas de Medicina (Akerele, 1993). A prática da Medicina com ervas floresceu até o Século XVII quando maior quantidade de remédios farmacológicos “científicos” foram favorecidos (Trevelyan, 1993).

Nos Estados Unidos, a história do uso de ervas começa nos primórdios dos dias da colonização quando os cuidados com a saúde eram feitos pelas mulheres em casa. Inicialmente, elas usavam remédios botânicos feitos em casa e mais tarde adquiriram produtos similares com “patentes medicinais”. No início do Século XIX, métodos científicos tornaram-se mais avançados e preferidos, e a prática de botânica cicatrizante foi rejeitada como charlatanismo. Nos anos 60, com o interesse sobre os efeitos iatrogênicos da medicina convencional e o desejo por maior auto-confiança, interesse na “saúde natural” e o uso de produtos herbais aumentou (Trevelyan, 1993).

As plantas são de relevância para dermatologia por seus efeitos adversos e benéficos na pele e nas desordens da pele respectivamente. Virtualmente todas as culturas do mundo inteiro têm confiado historicamente, ou continuam a confiar nas plantas medicinais para cuidados primários da saúde. Aproximadamente 1/3 de toda medicina tradicional são para tratamento de feridas ou para desordens na pele, comparado somente a 1 – 3% de drogas modernas. O uso desses extratos de plantas medicinais para tratamento de desordens têm sido baseados largamente em evidências históricas anedóticas, tem-se bem poucos dados disponíveis na literatura científica, particularmente com respeito à eficácia de extratos de plantas em experiências clínicas controladas. Os aspectos benéficos de plantas

sobre a pele incluem: cicatrização de feridas e lesões de queimaduras (especialmente *Aloe vera*); antifúngica; anti-viral; anti-bacteriana e atividade acaricida contra infecções da pele como acne, herpes e cicatrizes; atividades contra desordens inflamatórias/imune afetando a pele (psoríase); anti-tumoral promovendo atividade contra câncer de pele (Mantle et al., 2001)

O uso de polissacarídeos como biomaterial é vantajoso uma vez que, tais substâncias apresentam livre administração, simplicidade de operação e diminuem os custos de produtos (Shigemasa & Minami, 1995).

1.5 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos consistem de longas cadeias contendo centenas ou milhares de unidades de monossacarídeos. Também denominados glicanos, os polissacarídeos diferem entre si no tipo de unidade monossacarídicas e nos tipos de ligação glicosídica, no comprimento das suas cadeias e no grau de ramificação das mesmas. Os homopolissacarídeos contêm apenas um único tipo de unidades monoméricas; os heteropolissacarídeos contêm dois ou mais tipos diferentes de unidades monoméricas (Lehninger et al., 2000).

Os polissacarídeos são componentes de quase todos os seres vivos exercendo diversas funções, como por exemplo: fazem parte da estrutura das paredes celulares de plantas superiores ou algas marinhas (celulose, hemicelulose e pectina); são abundantes em fungos exoesqueletos de insetos e crustáceos (quitina); são reservas metabólicas nas plantas, animais e microrganismos (amido, dextranas, frutanas e glicogênio); importantes constituintes de cápsulas que envolvem diferentes microrganismos; componentes da matriz extracelular e cartilagens em animais (Calazans, 1997; Lehninger et al., 2000; Whistler & Smart, 1953).

Os polissacarídeos e seus derivados encontram numerosas aplicações em uma variedade de campos, incluindo a indústria têxtil e de papel, indústria de alimentos e cosméticos, bem como, indústria química e farmacêutica. O alto potencial para explorar estes biopolímeros com suas propriedades estruturais físico-química e funcionais têm estimulado a pesquisa de novos polissacarídeos (Geresh et al., 2000).

Yoshida (2001) relata em seu trabalho de revisão que os primeiros estudos a respeito do uso de biomateriais utilizados na medicina são datados de 1958 onde se avaliou a ação antiviral de polissacarídeos extraídos de algas marinhas. Posteriormente foi observado que polissacarídeos sulfatados obtidos em extratos de algas marinhas inibiram a transcriptase reversa de alguns tipos de vírus e replicação do HIV “in vitro”; sendo aceito que a atividade anti-HIV de polissacarídeos sulfatados inibem a ligação do HIV com as células T nos primeiros estágios da infecção.

1.6 POLISSACARÍDEOS E CICATRIZAÇÃO

Desde que em geral, polissacarídeos naturais têm estrutura complexa devido à sua heterogeneidade incluindo muitos tipos de unidades monossacarídicas, e isto dificulta a elucidação da relação entre estrutura e atividade Polissacarídeos ou derivados de polissacarídeos podem participar ativamente no processo de cicatrização de feridas Recentemente foi reconhecido que os polissacarídeos podem ser usados para tratamento sistêmico, como também, participam ativamente no processo de cicatrização de feridas (Marques, 1991; Yoshida, 2001; Lloyd, et al., 1998).

A história da quitina (e seus derivados) como aceleradora da cicatrização começou com os estudos de Prudden et al., em 1957, que relataram a aceleração do processo cicatricial de feridas, pelo uso da cartilagem de tubarão, sugerindo que a eficácia da glicosamina, um de seus componentes como acelerador (Ueno, Mori & Fujinaga, 2001).

A quitina ou (1→4)-2-acetamido-2-deoxi-β-D-glucana, é um polissacarídeo de estrutura linear presente na concha de crustáceos e parede celular de fungos, e seu derivado desacetilado, a quitosana, têm sido usados como biomateriais por possuírem propriedades bioativas benéficas no processo de reparação de feridas. Em modelos animais, foi demonstrado que a quitina/quitosana podem influenciar todos os estágios da reparação de feridas (Mattioli–Belmonte *et al.*, 1997; Howling et al., 2001).

Uma razão postulada para esse uso da quitosana é a sua biodegradabilidade. Tanto a quitina, como a quitosana e seus derivados aumentam a atividade de macrófagos, os quais irão influenciar o processo de cicatrização de feridas (Lloyd et al., 1998).

1.7 GOMA DO CAJUEIRO (*Anacardium occidentale* L)

O cajueiro, amplamente distribuído em regiões litorâneas do Nordeste brasileiro, pertence ao gênero *Anacardium* composto por 21 espécies descritas na botânica clássica (Johnson 1973; Lima, 1988). Posteriormente, este número reduziu-se a nove no trabalho de Mitchell & Mori (1988), sendo descrita mais uma nova espécie, totalizando dez.

Trata-se de uma árvore de folhas perenes, simples, inteiras e alternadas, com ramificações baixas (Soares, 1986).

A planta produz 178-2000 g/ano, com um valor médio de 700g/ano (Bandeira, 1991). Dada a importância da cultura da árvore do cajueiro, alguma regiões de países como o Brasil (400.000 – 450.000 há da planta) (Lima, 1988).

Várias espécies de *A.occidentale* apresentam casca resinosa contendo uma goma que é constituída principalmente por um heteropolissacarídeo ramificado ácido, utilizado como substituto da goma arábica. A caracterização dos exsudatos gomosos é muito importante, devido que estes polímeros têm muitas aplicações industriais (alimentícias, farmacêuticas, têxtil, cosmética, vinícola, etc...). Estes polímeros hidrocolóides, ácidos heteropolissacarídeos, são secretados por espécies que crescem em áreas tropicais e subtropicais como resposta a uma ferida a nível do talo, remoção de ramos ou pela presença de insetos, bactérias ou fungos (Rincón et al., 1999). Propriedades adesivas, atividades inseticidas e emulsificantes, são apontadas como justificativa para possíveis uso da goma do cajueiro. Esta contém como constituintes principais os monossacarídeos galactose (61%), arabinose (14%), ramnose (7%), glucose (8%), ácido glicurônico (5%), além de pequenas quantidades (2% cada) de manose, xilose e ácido metilglicurônico (Paula & Rodrigues, 1996; Menestrina *et al.*, 1998).

Este polissacarídeo com massa molecular de $1,1 \times 10^5$ Da, apresenta uma cadeia principal formada por unidades de D-Galp unidas por ligações glicosídicas β -(1→3), substituídos em O-6. Foi relatada a presença de quatro substituintes distintos a saber: a) β -

D-GlcpA-(1→6)-β-D-Galp-(1→6)-β-D-Galp-(1→6)-; b) α-D-Galp-(1→6)-D-Galp; c) α-L-Araf-(1→6)-D-Galp e d) α-L-Rhap-(1→4)-β-D-GlcpA (Menestrina et al.,1998).

Entre os polissacarídeos biologicamente ativos, a molécula obtida da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale*) tem sido utilizada em diversas pesquisas e apresentado resultados terapêuticos satisfatórios, frente ao Sarcoma 180 *in vivo* (Menestrina *et al.*, 1998), células HeLa *in vitro* (Stevan et al., 2000) e à infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* (Gadelha et al.,2001).

A ciência moderna e a tecnologia estão oferecendo nova introspecção em direção à cicatrização de feridas e levando a novas maneiras de influenciá-la, incluindo uso tópico de fatores de crescimento, pele artificial, cultura de epitélio com ou sem componentes dermais e estimulação elétrica. O futuro da cicatrização de feridas reúne um melhor entendimento de eventos fisiológicos complexos que ocorre e tradução em direção aos cuidados da ferida ativa e interativa biologicamente (Waldorf, 1995).

2.0 JUSTIFICATIVA

A proposta desse trabalho é a utilização do polissacarídeos da goma de cajuero (*Anacardium occidentale L*) em lesões cutâneas experimentais em camundongos, como meio de otimizar o processo cicatricial, justificada pelos seguintes aspectos:

- existe considerável interesse na utilização de agentes terapêuticos que promovam reparação ou aumentem a resistência de feridas;
- este polissacarídeo tem demonstrado atividade biológica frente a vários modelos experimentais;
- ressalta-se a sua biodisponibilidade na natureza, por ser uma árvore nativa da região Nordeste cultivada amplamente, e
- trata-se de um recurso natural que pode ser explorado sem agressões ambientais.

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do polissacarídeo da goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L) em lesões cutâneas experimentais em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o polissacarídeo da goma do cajueiro para utilização como biomaterial no processo de cicatrização.
- Formular emulsões para uso tópico contendo o P-JU.
- Avaliar o efeito do tratamento tópico com as formulações obtidas na indução do processo cicatricial cutâneo em camundongos, sob o ponto de vista clínico e histopatológico.

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. Imunity to tumors. In: ABBAS, A K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S.(eds.). **Cellular and molecular immunology**, 4ed., Philadelphia: W.B.Saunders, 2000c.

AKERELE, O. Nature's medicinal bounty: don't throw it away. **World Health Forum**, 1993; 14: 390-395.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; *et al.* **Biologia Molecular da Célula**, 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

BANDEIRA, C. T. Relatório Técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – **EMBRAPA – CNPCa**, v.6, p. 1-2, 1991.

BOROJEVIC, R.; SERRICELLA, P. Próteses vivas de pele humana. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 7, p. 16-18, jan/fev. 1999.

BRINKHAUS, B.; LINDNER, M.; SCHUPPAN, D.; HAHN, E. G. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. **Phytomedicine**, v.7, n.5, p. 427-48, 2000.

CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R. C.; FRANÇA, F. P.; LOPES, C. E. Mollecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 247-7, 1997.

CALHOUN, M. L. STINSON, A W. O Tegumento. In: DELLMANN, H. & BROWN, E. M. **Histologia Veterinária**. 1ed. , Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 1982, cap.18, p.360-87.

CLARK, R. A. Overview and general considerations of wound repair. In: CLARK, R A F. ; HENSON, P. M. (eds). **The molecular and cellular biology of wound repair** . Plenum, New York, p. 3-23, 1988.

CLARK, R. A. Biology of dermal wound repair. **Dermatol. Clin.**, n.1164, p. 647-66, 1993.

CLARK, R.A F.; NIELSEN, L. D.; WELCH, M. P.; McPHERSON, J. M. Collagen matrices attenuate the collagen – synthetic response of cultured fibroblasts to TGF- β . **J Cell Sci**, v. 108, p. 1251-61, 1995.

COHEN, J.K. DIEGELMANN, R.F.; LINDBLAD, W.J. (eds.). **Wound healing: biochemical and clinical aspects**. Philadelphia: Saunders, 1992.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Neoplasia. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.(eds.). **Pathologic basis of disease**. 6 ed., Philadelphia: Saunders, 2000.

CHUPA, J.M.; FOSTER, A. M.; SUMMER, S.R.; MADIHALLY, S.V.; MATTHEW, H.W.T. Vascular cell responses to polysaccharide materials: *in vitro* and *in vivo* evaluations. **Biomaterials**, v.21, p.2315-2322, 2000.

DANTAS, C.J.S. Reparação Tecidual. In: **Mecanismos Celulares e Musculares da Inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, cap.17, p.197-225, 2000.

DESMOULIÈRE, A ; REDARP, M.; DARBY, J.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transitions between granulation tissue and scar. **Am.J. Pathol.**, v.146, n.1, p.56-66, 1995.

DIEGELMAN, R.F.; COHEN, I. K.; KAPLAN, A M. The role of macrophages in wound repair. **Plast. Reconst. Surg.**; v.68, n.107, 1981.

FAZIK, M. J.; ZITE, J.A ; GOSLEN, J.B. Cicatrização das Feridas. In: COLEMAN, W.P. & HANKE, W. **Cirurgia Cosmética Princípios e Técnicas**, 2ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2000, cap.3, p. 18-38.

FIELDS, S. M.; KOELLER, J.M. Biologic agents. In: WEISS, G.R. **Clinical Oncology**. New Jersey: Prentice Hall, p. 119-128, 1993.

GADELHA, M.M.S.; PROCÓPIO, A. E. A. ; ARAÚJO, R.V.S.; SANTANA, J.V.; MALAGEÑO, E.; IACOMINI, M.; MAGALHÃES, N.S.S.; CARNEIRO-LEÃO, A. M.A. ; Effect of free and liposome encapsulated heteropolysaccharide from *Anacardium occidentale* L . against experimental *Schistosoma mansoni* infection. In: **PHARMATEC**, 6., 2001, RECIFE. Proceeding... Recife: Sociedade Brasileira de Tecnologia Farmacêutica, 2001.

GERESH, S.; DAWADI, R.P. ARAO, S.M. Chemical modification of biopolymers: quaternization of the extracellular polysaccharide of the red microalga *Porphyridium sp.* **Carbohydrate polymers**, v.36, p. 75-80, 2000.

HELDIN, C.H.; WESTMARK, B. Role of platelet – derived growth factor *in vivo*. In: . In: CLARK, R A F. ; (ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair** . Plenum, New York, p. 249-73, 1996.

HENCH, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, n.19, p. 1419-23, 1998.

HENRIKSON, R.C.; KAYE, G.I.; MAZURKIEVCZ, J.E. National Medical Series para estudo Independente. **Histologia**, 4 ed., Rio de janeiro : Guanabara Koogan, 1999, cap. 20, p. 228-244.

HOWLING, G.I.; DETTMAR, P.W.; GODDARD, P.A.; HAMPSON, F.C.; DORNISH, M.; WOOD, E. J. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblast and keratinocytes *in vitro*. **Biomaterials**, v. 13, n. 56, 2001.

HUBBEL, J. A. **Biomaterials in tissue engineering.Bio/Technology**, v. 13, n. 6, p. 565 – 76, 1995.

HUNT, T. K.; GOODSON, W. H. Cicatrização das Feridas. In: WAY, L. W. **Cirurgia, Diagnóstico e Tratamento**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, cap. 8, p. 67-75.

ILAN, N.; MAHOOTI, S. MADRI, J. A. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of *in vitro* angiogenesis. **J. Cell. Sci.**, n.11, p. 3621 –31, 1998.

JOHNSON, D. The botany origin and spread of the cashew *Anacardium occidentale* L. **J. Plant. Corps.**, v.1, p. 1-7, 1973.

KAPLAN , A P. Hageman factor dependent pathways: mechanism of initiation and bradikinin formation . **Fred. Proc.**, n. 42, p. 3123-3127, 1993.

KLEINER, S. M. The true nature of herbs. **Phys. Sport. Med.**, v.23, p. 13-14, 1995.

KNUSTSON, R. A; MERBITZ, L. A ; CREEKMORE, M. A ; SNIPES, I.G. Use of sugar and povidine to enhance wound healing:five yeras experience. **South Med. J.**, n. 69, p. 431-5, 1986.

LAWRENCE, W.T. Physiology of the acute wound. **Clin. Plast. Surg.**, v. 25, n.3, p. 321-40, 1988.

LEHNINGER, A L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**.São Paulo: Sarvier, 2000.

LIMA, V. P. M. S. Botânica. In; LIMA, V. P. M. S. **A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil**. Fortaleza, Banco do nordeste Brasil, ETENE, p. 15-61, 1988.

LIMA, R.B. A pele é o maior órgão do corpo humano. 2002. Disponível em: <http://www.dermatologia.net.com.br/artigos/saúde> e beleza da pele> acesso em 05/07/2002.

LLOYD, L.L. *et.al.*, Carbohydrates polymers as wound management aids. **Carbohydr. Polym.** v.37, p. 317-322, 1998.

MADRI, J. A. ; KOCHER, O. ; MERWIN, J.R.; BELL, L.; TUCKENS, A. Iteraction of vasccular cells with transforming growth factors β . **Ann Ny Acad. Sci.**, v. 593, p. 243-258, 1990.
MAGALHÃES, J. B. S. **Cosmetologia**. Rio de Janeiro: Rubio, 2000.

MAJNO, G.; JORIS, J. Cells tissues and disease.Principles of general pathology. **Blackwell Science**, p. 462-482, 1996.

MANTLE, D.; GOK, M. A; LENNARD, T.W. Adverse and beneficial effects of plant extracts of skin and skin disorders. **Adv. Drug. React, Toxicol. Rev.**, v. 20, n. 2, p. 89-103, 2001.

MARQUES, M.R.; XAVIER-FILHO, J. Ezymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate. **Phytochemistry**, v.3, n.5, p. 1431-1433, 1991.

MATTIOLI-BELMONTE, M.; MUZZARELLI, R. A. A. A. Chitin and chitosan wound healing and other biomedical applications. **Carbohydr. Europe**, v.9, p. 30-6, 1997.

MELEGA, J.M.; PSILLAKIS, J.M.; ZANINI, S. A R. **Cirurgia Plástica reparadora e estética**, 2ed., São Paulo: Medsi, 1992.

McKINNEY, P.; CUNNINGHAM, B.L.Wound healing. **Handbook of plastic Surgery**,p. 55 – 70, 1989.

MENESTRINA, J.M.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. Similiarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structure in gum exudate of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v.47, n.5, p. 715-721, 1998.

MIGNATTI, P.; RIFKIN, D.B.; WELGUS, H.G.; PARKS, W.C. Proteinases and tissue remodeling. In: . In: CLARK, R A F. (ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair** . Plenum, New York, 1996, p. 171-194.

MITCHELL, M. S. Combining chemotherapy with bilogical response modifiers in treatment of cancer. **J Natl. Cancer Inst.**, v. 80, p. 1445-1450, 1988.

MODOLIN, M. Biologia da Cicatrização dos Tecidos. In: MELEGA, J.M.; PSILLAKIS, J.M.; ZANINI, S. A. R. **Cirurgia Plástica reparadora e estética**, 2ed., São Paulo: Medsi, p. 9-25, 1992.

MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor- β stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implication for wound healing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 85, p. 4894–7, 1988.

NAGAPPA, A. N., CHERIYAN, B. Wound healing activity of the aqueous extract of *Thespesia polpunea*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 503-6, 2001.

PALAPURA, S.; KOHN, J. Trends in the development of bioresorbable polymers for medical application. **Journal of Biomaterial Applications**, v. 6, p. 216-250, 1992.

PAULA, R.; RODRIGUES, J.F. Composition and rheological properties of cashew tree gum, the exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. **Carbohydr. Polym.**, v.26, p. 177-181, 1996.

PEACOCK, E.E. **Wound repair**- 3ed. Philadelphia: Saunders, 1984.

PHILLIPSON, J.D. Phitochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, n.3, v.56, p. 237-43, 2001.

PRUDDEN, J.F.; NISHIHARA, G.; BAKER, L. The acceleration of wound healing with cartilage. **J. Surg. Gynec. Obstet.**, n. 105, p. 283-6, 1957.

REGAN, M. C.; BARBUL, A. The cellular biology of wound healing. In: **Fibrin sealing in surgical and nonsurgical Fields: wound healing**. G. Schalag, H. Redl (eds), Springer-Verlag Berlin – Heildelberg, p.3-17, 1994.

RICHES, D.W.H. macrophages involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R A F. (ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair** . Plenum, New York, 1996, p. 95-141.

RINCÓN , F.; CLAMENS, C.; BELTRÁN, O. SANABRIA, L. PINTO, G.; MARTÍNEZ, M. Evaluación del rendimiento y caracterización físicímica de los exudados gomosos de especies diseminados en el Estado Zulia, Venezuela. **Rev. Fac. Agron.**, v. 16, p.56-63, 1999.

ROOM, S. Tratamento de Feridas. **Clin. Cir. Am. N.** n.4, p. 635-65, 1984.

SEAL, B.L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration materials. **Science and Engineering Reports**, v. 34, p. 147-230, 2001.

SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, p. 383-420, 1995.

SHUKLA, A. D.; DUBEY, M.P.; SRIVASTAVA, B.S. Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic models. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.17, n. 244, p.434-9, 1999.

SINGER, I. I.; KAWKA, D.W.; KAZAKIS, D. M. *et al* In vivocodistribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblasts surface.. **J. Cell Biol**, v. 98, n. 2091, 1984.

SINGER, A. J. ; CLARK, R. Cutaneous wound healing. **New England J. Med.**, v. 341, p.739-746, 1999.

SILVA, J. G. *et al*. Correção de cicatrizes. In: MELEGA, J.M. **Cirurgia Plástica Reparadora e Estética**, São Paulo: Medsi, 2000.

SOARES, J.B. **O caju: aspectos tecnológicos**. Fortaleza, Banco Nordeste do Brasil, 1986, 256p.

STADELMAN, W. K. *et al*. Physiology and Healing Dynamic of Chronic Cutaneous Wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176, (Suppl 2A), p.26S – 38S,1998.

STARLEY , I. F.; MOHAMMED, P.; SCHNEIDER, G.; BICKLER, S. W. The treatment of paedriatic burns using topical *papaya*. **Burns**, v. 25, n.7, p. 636-9, 1999.

STEED, O L. Papel dos fatores de crescimento na cicatrização das feridas. In: BARBUL, A. **Clínica Cirúrgica da América do Norte**.Rio de janeiro: Interlivros, v.3, p. 571-582, 1997. STEGMAN, S.J.; TROMOVITCH, T. A.; GLOGAV, R. G. Grafts. In: Basics of dermatologic surgery. St Louis: Mosby, 1982.

STEVAN, F.R.; MENESTRINA, J. M.; VEIGA, S.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Biological activities of polysaccharide from *Anacardium occidentale* exsudate against Hela cells. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**, 29. , 2000, Caxambu. Anais ... São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2000, p.11.

TREVELYAN, J. Herbal medicine. **Nurs. Times**, n. 89, p. 36-38, 1993.

UENO, H.; TAKASHI, M.; FUJINAGA, T. Topical formulation and wound healing application of chitosan. **Adv. Drug. Del. Rev.**, n.1, p.000-000, 2001

VOGLER, B. K.; ERNST, E. *Aloe vera*: a systematic review of its clinical effectiveness. **Br J Gen. Pract.**, v. 49, n. 447, p. 823-8, 1999.

WALDORF, H.; FEWKES, J. Wound healing. **Adv. Dermatol.** n.10, p. 77-96, 1995.

WHISTLER, R. L.; SMART, C. L. **Polysaccharide Chemistry** . New York: Academic Press INC., 1953

WRIGHT, T.E.; ROBSON, M.C.; WACHETT, T.L.; KUHN, M. Initiating the inflammatory phase of incisional healing prior to tissue injury. **Journal of Surgical Research**, v.92, n.1, 1992.

WYSOCHI, A B. Skin anatomy, physiology and pathophysiology. **Nurs. Clin. North. Am.**, v.34, n. 4, p. 777-97, 1999.

YAMAGUCHI, Y.; YOSHIKAWA, K. Cutaneous wound healing: an update. **The Journal of Dermatology**, v.28, p. 521-534, 2001.

YOSHIDA, T. Synthesis of polysaccharides having specific biologic activities. **Prog. Polym. Sci.**, v.26, p.379-441, 2001.

Utilization of cashew gum polysaccharide (*Anacardium occidentale* L) in experimental cutaneous healing

^{a,b} M. G. Paiva ^{a,b}, ^d G. V. Schirato, ^b M. M. Ribeiro- Júnior, ^b C. L. B. Cavalcanti ^b, ^b J. L. Lima-Filho, ^{b,c} A M. ^a Carneiro-Leão ; ^{b,c*} A L. F. Porto.

^a *Physical Therapy Department– Federal University of Pernambuco – Recife – Pernambuco – Brazil*

^b *Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA) – Recife- Pernambuco – Brazil*

^c *Animal Morphology and Physiology Department – Federal Rural University of Pernambuco - Recife- Pernambuco- Brazil.*

^d *PIBIC – CNPq –Federal Rural University of Pernambuco- Recife- Pernambuco – Brazil.*

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of the topical treatment using cashew gum polysaccharide (*Anacardium occidentale* L; P-JU) in cutaneous wound healing. Wound healing was evaluated clinically and histopathologically for 12 days in female albino Swiss mice (n=15/group) which were single topically treated immediately after aseptic surgery using 150mM NaCl, 75mg/ml ascorbic acid, 0.2% nitrofurazone (control groups) and P-JU/ascorbic acid emulsions (75mg/ml, 150mg/ml and 225 mg/ml). Wounds treated using P-JU emulsion 150 mg/ml showed an improved evolution than those of the control groups considering clinical (inflammatory signals and wound contraction) and microscopic characteristics (granulation tissue, re-epithelization). These results suggest that cashew gum polysaccharide can be applied topically on open wounds to accelerate the healing process.

Keywords: Wound; Wound healing; Polysaccharide; *Anacardium occidentale*

1. Introduction

Human skin is the largest multifunctional organ of body and the knowledge of its structure and function is essential to clinical and research. It provides protection, sensation, thermoregulation, biochemical, metabolic and immune functions (Wysochi, 1999). The response of living tissue to injury is the basis for all surgical practice. Following operative or traumatic tissue disruption the major priorities of any organism are: cessation of hemorrhage, prevention of infection and restoring of tissue integrity and function. The process by which repair takes place is called wound healing and is comprised of a continuous sequence of inflammation and repair in which epithelial, endothelial, inflammatory cells, platelets and fibroblasts briefly come together from their normal domains to interact and restore normal morphology and function (Regann and Barbul, 1994).

Efforts have been developed to discover agents which improve healing in order to reduce hospitalization costs and to save patient from amputation or other severe complications (Shukla et al., 1998), as the topical use of growth factors, artificial skin, culture epithelium in the presence or absence of dermal components and electrical stimulation (Waldorf and Fewkes, 1995). Much of development has resulted from the great understanding of the process involved in wound healing coupled with technology to produce biocompatible materials showing the adequate physical and chemical characteristics for enhancement of healing process (Lloyd et al., 1998). Naturally derived materials offer many mechanical, chemical and biological advantages over synthetic materials and hold an important potential for use in tissue engineering therapies (Schmidt and Baier, 2000). Polysaccharides are naturally occurring molecules which perform some different functions in living organism and may participate in the process of wound healing (Lloyd et al., 1998).

Cashew gum is the bark exudate of *Anacardium occidentale*, a tree that grows wildly in many tropical and subtropical countries. Exudate are generally produced by wounding the tree during pruning or as a direct result of attack by insect or microorganisms. Each plant produces 178-2000 of gum/year and considering the importance of cashew tree culture to countries as Brazil (400.000 a 450.000 ha of plant), India, Mozambique, Tanzania and Kenya, studies concerning the properties of the gum are

of the potential industrial interest (Marques and Xavier- Filho, 1991; Bandeira, 1991; Paula and Rodrigues, 1996; Zakaria and Rhaman, 1996; Lima, 1998).

The gum exudate from the Brazilian cashew-nut tree is mainly composed by a branched heteropolysaccharide (P-JU; Mw $1,1 \times 10^5$ Da). Rhamnose (0.005%), arabinose (0.03%), glucose (0.02%) and three oligosaccharides (0.021%) are components of the side-chain of P-JU, which has a main chain of (1→3)-linked β -D-Galp units (Menestrina et al., 1998). This polysaccharide has showed to promote antihelmintic *in vivo* activity against *Schistosoma mansoni* infection and has used to obtain protein purification in aqueous two-phase systems (Gadelha et al., 2001; Sarubbo et al., 2000; Oliveira et al., 2001; Oliveira et al., 2002).

The aim of this work was to investigate the effect of the topical treatment using cashew P-JU emulsions in cutaneous wound healing.

2. Material and methods

2.1. Preparation of emulsions

Gum was collected from *Anacardium occidentale* L tree from south coast of Pernambuco (Tamandaré beach), Brazil. The cashew gum polysaccharide (P-JU) was extracted according to Menestrina et al. (1998) and emulsions were prepared according Shigemasa and Minami (1995). Briefly, P-JU was added to 75mg/ml ascorbic acid, solubilized in distilled water and pH was adjusted to 5.0 by adding 1N NaOH in order to obtain final concentrations of 75, 150 and 225 mg/ml (P-JU 1, P-JU 2 and P-JU 3, respectively).

2.2. In vivo wound healing tests

The wound healing was evaluated using a mouse model and all experiments were completed with the approval of the Federal University of Pernambuco's Ethical Committee.

Female albino Swiss mice (25-35g weight and 8 weeks-old) were housed using individual cages in standard conditions of temperature, humidity and light and fed with standard rodent diet and water *ad libitum*. Animals were divided into six groups

(n=15/group), subcutaneously anaesthetized using 2% xilazine chloridate (10 mg/Kg) and 10% ketamine chloridate (115 mg/Kg). Each animal was placed in prone position and prepared for aseptic surgery. A standard wound (1cm²) was formed on the dorsal thoracic region using scalpel and curved blade surgical scissors after remotion of epidermal and dermal layers with minimal bleeding.

Each wound was single topically treated (200μL) immediately after surgery, as follows: 150mM NaCl (NaCl group); 75 mg/ml ascorbic acid (AA group); 0.2% nitrofurazone (Furacin[®], Schering-Plough Coopers, F group); P-JU 1; P-JU 2 and P-JU 3 groups.

The surface area of the wound was evaluated daily by tracing the boundary of still open wound on transparent paper and by calculation of area as described by Prata (1988) as follows: $A = \pi.R.r$, where A, R and r mean area, large ray and small ray, respectively.

2.3. Histological analysis

Samples of wound tissue were collected for histological observation on the 2nd, 7th and 12th days after surgery after subcutaneous anesthesia as previously described. Excised wound sites were formalin fixed, routinely processed and embedded into wax. Thick sections were stained using haematoxyline and eosin (HE) and Masson's Trichrome stains and examined by light microscopy.

2.5. Statistical analysis

The results obtained were expressed as mean $\pm$ standard deviation (M $\pm$ sd), submitted to variance analysis and to the Tukey test, accepting as statically significant the values compared at signification level of 5%.

3. Results

3.1 Macroscopic observations

Clinical evaluation of a healing process is important to characterize the effect of a particular drug over each stage considering its singular characteristics. Previous reports described the evaluation of morphometrical parameters in cutaneous wounds limited to calculate wound area and its contraction percentile.

At the 2nd day, clinical evaluation showed the presence of the signs of acute inflammatory phase as depicted in Figure 1. Hyperemia, due to dilatation of vascular beds within the injured area, was stronger in control groups, namely ascorbic acid and Furacin® (80%, respectively) and NaCl (60%). Among test groups, approximately 53.3% of mice showed hyperemia, when treated using P-JU 1 and 2.

Oedema was observed in control groups, specially in ascorbic acid treated mice (80%) and in 53.8% of P-JU 1 treated animals. No oedema, which is a consequence of accumulation of fluid and plasma proteins in extravascular spaces, was detected by using higher doses of P-JU (150mg/ml and 225mg/ml).

The exsudative characteristics of this phase could be also accomplished through the dry aspect of the wounds. It was observed in 60%, 86.6% and 40% of mice from control groups (NaCl, Ascorbic Acid and Furacin®), respectively. In the test groups dry wounds were observed in 77.7%, 100% and 100 % (P-JU 1, 2 and 3, respectively) of mice. Among control and test groups at the 2nd day, one could observe that test groups showed less oedema and hyperemia and a more drier aspect.

Between the 2nd and 7th days after injury, the cleaning process performed by inflammatory cells (neutrophils and macrophages) allow for enhanced epithelial proliferation and for the induction of the granulation tissue. This proliferative phase is characterized by the beginning of epithelial regeneration and by wound contraction, which play central roles in ordinary wound healing. In the 7th day the experimental wounds were meanly characterized by the presence of a scab, which was classified according to its thickness, distribution (irregular or uniform) and detachment signals as showed in Figure 2.

A thicker aspect of the scabs was observed specially in control groups (80%, 50% and 40% for NaCl, Ascorbic Acid and Furacin®, respectively) and poor uniformity (30%) and detachment signals (10% and 30% for NaCl and Furacin®, respectively). However, one could observe the presence of thinner scabs in test groups (10%, 50% and 20% for P-JU 1, 2 and 3, respectively), which were more uniform and showed many detachment signals in 60% and 50% of mice treated using P-JU 2 e 3, respectively. Among all groups at this phase P-JU 2 treated wounds presented more detachment and uniform distribution of a thin scab, suggesting an advanced reparation process.

In the last phase of this study, between 7th and 12th days, wound contraction and total healing were observed, as depicted in Figures 3 and 4. In the control groups it was observed a total wound contraction in 20% and 40% of mice (NaCl and Furacin®, respectively). In the test groups, a total healing was observed in 40%, 80% and 20% of animals (P-JU 1, 2 and 3, respectively). It is important to observe that none of the treated lesions with ascorbic acid showed this response and 80% of mice maintained their scabs until the finish of the experiment.

3.2 Wound Contraction

The progress of wound repair under such treatments were expressed as area changes along 12 days, as showed in Figures 4 and 5. Immediately after the wound was produced, its area increased by an average of 160% due to the mobility of the mouse skin, its elasticity and the surrounding skin tension. Similar results were described by Teo and Naylor (1995) and Cross (2000) who used rat as a model. At the 2nd day, there was a little change in the size of the wounds, which entered into a phase of a rapid contraction until the 4th day. After then, the wound area appear to decrease at an average rate of 0.24 cm²/day for the control groups and P-JU 1 and 3. P-JU 2 treated wounds decreased with a rate of 0.27 cm²/day, which progressively declined towards the 10th and 12th days, when the wound area approached to zero.

3.3 Histological analysis

Samples of the wounds were collected at 2nd, 7th and 12th days after surgery in order to analyze their microscopic patterns, as depicted in Table 1. Histological findings on 2nd day of control groups (NaCl, AA and Furacin®) were characteristic of an acute inflammatory phase, showing the presence of a predominant neutrophil infiltrate and few macrophages, besides an exudate and some angiogenesis. In P-JU 2 treated mice, one could observe an increased blood vessel formation and enhanced proliferation of cells similar to granulation tissue.

In the 7th day, soft granulation tissue was present in all groups, showing a fibrous-vascular pattern and an intense angiogenesis more evident in P-JU 2 treated wounds. The beginning of epithelial regeneration, only observed in this group.

In the 12th day one could observe the evolution of the fibro-vascular granulation tissue to a fibrous one, with poor collagen organization in NaCl and AA groups. Furacin group showed re-epithelialisation without complete repair of granulation tissue, which demonstrated a fibro-vascular pattern treated mice presented a well-advanced organization of granulation tissue and on-going epithelialisation.

4. Discussion

Over the years the wound management, especially of chronic wounds, has showed marked social and economic implications worldwide (Natarajan et al., 2000). Wound healing is a complex process characterized by hemostasia, re-epithelialisation, granulation tissue development and remodeling extracellular matrix. Since healing process takes place by itself and does not require much help, it is important medical care to avoid risk factors such as infection, malnourishment, aging, as systemic diseases (eg. diabetes, immunocompromised conditions). In order to improve wound healing, the medical literature has been described drug research and the use of many *in vitro* and *in vivo* wound-healing models. The selection of an animal model depends on a number of factors including

availability, cost, ease of handling, investigator familiarity and anatomical/functional similarity to humans (Sullivan et al., 2001).

The earliest evidence of human's use of plants for healing dates back to the Neanderthal period and virtually all cultures worldwide have been relied on medicinal plants for primary health care (Kleiner, 1995). Many medicinal plants extracts for the treatment of skin disorders (both single plant or **multiherbal preparations**) have been used since ancient times even if their mechanisms of action and efficacious have not been completely evaluated (Nagappa and Cheriyan, 2001; Mantle, 2001). Some Brazilian plants have been used in wound healing, applied directly to wounds, *in natura* as poultices, as dried powders or as water extracts (teas) for bathing (Grierson and Afolayan, 1999).

In the present study, a single topical application of cashew gum polysaccharide (P-JU) significantly improved macroscopic and microscopic wound healing, increasing the percentage of wound contraction and complete wound healing by 12th day as suggested by rapid epithelialization and collagen synthesis. The group treated with P-JU containing emulsion showed a thin and transparent scab which detached until the 8th day with no bleeding. Control groups presented a rigid thick and irregular scab detached until 10th day. Sometimes no detach was observed (80%, 100% and 60%, for NaCl, AA and Furacin groups, respectively). Similar results were described by Leite (2002) who treated topically male and female guinea pig using *Vernonia scorpioides* hydrogel and ethanol gel. The first one showed a rigid, dark and thick crust, and was observed in the other group a thin and transparent scab that detached and bled until 10th day.

Lewis Wistar albino rats of either sex treated with topical application of *Heliotropium indicum* increased the percentage of wound contraction and completed wound healing by 14th day. When these rodents were treated with topical application of *Plumbago zeylanicum* and *Alcalypha indica* the wound contraction was completed by 18th day (Reddy et al., 2002). In the other study using Wistar rats of either sex when the wound were treated topically with extract from *Thespesia populnea*, the complete epithelialization occurred in 19.17 days (Nagappa and Cheriyan, 2001). When the extract of *Datura alba* leaves were investigated for the evaluations of its prohealing activity on burn models in male Albino rats (wistar strains), complete wound closure was observed within 12th days in treated rats (Prya et al., 2002).

Treatment of guinea pig wound with asiaticoside isolated from *Centella asiatica* led to reduced, oedema, necrosis and polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) and mononuclear infiltration (Shukla, 1998).

Acknowledgments

We are thankful to, Federal University of Pernambuco for support to carry out this research in this institution. CNPq/PIBIC-UFRPE for G. V. S. fellowship. Luiz Felipe Viegas and Otaviano Tavares da Costa for their technical assistance and Dr. Frederico Celso Maia for his encouragement.

5. Conclusions

Emulsions containing the polysaccharide from *Anacardium occidentale* exhibited significant prohealing activity when single topically applied on cutaneous wounds in mice. The present results offers a preliminary pharmacological evidence on the use of cashew gum polysaccharide.

References

Bandeira CT. Relatório Técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA-CNPc, 1991; 6: 1-2.

Cross SE, Naylor IL, Coleman RA, Teo TC. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *British Journal of Plastic Surgery*, 1995; 48: 198-206.

Gadelha, MMS.; Procópio, AEA. ; Araújo, RVS.; Santana, JV.; Malaguenõ, E.; IACOMINI, M.; MAGALHÃES, NNS.; CARNEIRO-LEÃO, AMA. ; Effect of free and liposome encapsulated heteropolysaccharide from *Anacardium occidentale* L . against experimental *Schistosoma mansoni* infection. In: **PHARMATEC**, 6., 2001, RECIFE. Proceeding... Recife: Sociedade Brasileira de Tecnologia Farmacêutica, 2001.

Grierson JD, Afolayan AJ. Antibacterial activity of some indigenous plants used for the treatment of wound in the Eastern Cape, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999; 66: 103-6.

Kleiner S. The true nature of herbs. *Phys. Sport. Med.*, 1995; 23: p. 13-14.

Lima VPMS. Botânica. In: Lima VPMS. A Cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil, ETENE, 1998: 15-61.

Lloyd, J. F. Kennedy, P. Methacanon, M. Paterson and C. J. Knill. Carbohydrates polymers as wound management aids. *Carbohydr polym*, 1998; 37: 317-22.

Leite SN, Palhano G, Almeida S, Biavatti MW. Wound healing activity and systemic effects of *Vernonia scorpioides* extract in guinea pig. *Fitoterapia*, 2002; 73: 496-500.

Marques MR, Xavier-Filho J. Enzymatic and Inhibitory Activities of Cashew Tree Gum Exudate. *Phytochemistry*, 1991; 30: 1431-33.

Mantle D, Gok MA, Lenard TW. Adverse and beneficial effects of plant extracts of skin and skin disorders. *Adv. Drug. React, Toxicol. Rev.*, 2001; 20: 89-10.

Menestrina JM, Iacomini M, Gorin PAJ. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structure in gum of *Anacardium occidentale* L. *Phytochemistry*, 1998; 47:714-21.

Nagappa AN, Cheriyan B. Wound healing activity of the aqueous extract of *Thespesia populnea* fruit. *Fitoterapia*, 2001; 72: 503-506.

Natarajan S, Williamson D, Stiltz AJ, Harding K. Advances in wound care and healing technology. *Am J Clin*, 2000; 1: 269-75.

Oliveira LA, Sarubbo LA, Porto ALF, Lima-Filho JL, Campos-Takaki GM, Tambourgi EB. Physical and rheological characterisation of polyethylene glycol cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, 2001; 766: 27-36.

Oliveira LA, Sarubbo LA, Porto ALF, Campos-Takaki GM, Tambourgi EB. Participation of trypsin in aqueous two-phase system of polyethylene glycol and cashew-nut tree gum. *Process Bioch*, 2002 1-7 (in press).

Paula R, Rodrigues JF. Composition and Rheological Properties of Cashew Trees Gum, the Exudate polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Carbohy Polym*, 1996; 26: 117-181.

Prata MB, Haddad CM. Uso tópico do açúcar em feridas cutâneas estudo experimental em ratos. *Acta Cir Bras*, 1988; 3: 43-8.

Priya KS, Gnanamani A, Radhakrishnan N, Babu M. Healing potential of *Datura alba* on burn wounds in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002; 83: 193-196.

Regan MC, Barbul A. The Cellular Biology of Wound Healing. In: Fibrin Sealing in Surgical and Nonsurgical Fields: wound healing. G.Schlag, H. Redls (eds). Springer- Verlag Berlin- Heidelberg, 1994: 3-17.

Reddy JS, Rao PR, Reddy MS. Wound healing effects of *Heliotropium indicum*, *Plumbago zeylanicum* and *Alcalypha indica* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002; 79: 249-251.

Sarubbo LA, Oliveira LA, Porto ALF, Lima-Filho JL, Leão AMAC, Duarte HS, Campos-Takaki GM, Tambourgi EB. A new aqueous system based on cashew-nut tree gum and polyethylene glycol. *Journal of Chromathography –B*, 2000; 743:79-84.

Shigemasa Y, Minami S. Application if chitin and chitosan for biomaterials. *Biotech and Genet Eng Rev*, 1995; 13:383-420.

Schmidt Ce, Baier JM. Acellular vascular tissues natural biomaterials for tissu repair and tissue engineering. *Biomasterials*, 2000; 21: 2215-2231.

Shukla AD, Dubley MP, Srivastava R, Srivastava BS. Differential expression of proteins during healing of cutaneous wounds in experimental normal and chronic model. *Biochem Biophys Res Commum*, 1998; 244: 434-9.

Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen*, 2001; 9: 66-76.

Teo TC, Naylor IL. Modification to the rate of wound contraction by allopurinol. *British Journal of Plastic Surgery*, 1995; 48, 198-202.

Waldorf h, Fewkes j. Wound healing. *Adv Dermatol*, 1995; 10: 77-96.

Wysochi AB. Skin anatomy. Physiology and pathophysiology. *Nurs Clin North Am*, 1999; 34: 777-97.

Zakaria MB, Rahman ZA. Rheological properties of Cashew Gum. *Carbohy polym*, 1996; 29: 25-7.

List of captions

Fig.1. Demonstration macroscopical aspects between control and test group day 2 postwounding, considering inflammatory signals, hyperemia, oedema and scab

Fig 2. Demonstration macroscopical aspects between control and test group day 7 postwounding, considering patterns healing

Fig. 3. Demonstration macroscopical aspects between control and test group day 12 postwounding, considering patterns healing

Fig. 4. Wound contraction (%) of Groups after topical treatment with NaCl, Ascorbic acid, Furacim[®], Emulsion (75mg/ml, 150 mg/ml and 225mg/ml).

Fig.5. Wound area (cm²) and time (days) after topical treatment with NaCl, Ascorbic acid, Furacim[®], Emulsion (75mg/ml, 150 mg/ml and 225mg/ml).

Table 1 Histological observations among Control and Test Groups.

Fig.6. Microscopic aspects of control groups. Masson trichrome, 100x. A, NaCl, 2nd day; B, AA, NaCl 12th s, blood vessel; g-granulation tissue; m-muscle; d-dermis; i-cell infiltrate; c-scab and ep-epidermis.

Fig.7. Microscopic aspects of Furacin[®] treated wounds. Masson trichrome, 100x. A, 2nd day; B 12th s, blood vessel; g-granulation tissue; m-muscle; d-dermis; i-cell infiltrate; c-scab and e-epithelium and q-keratin.

Fig.8. Histological aspects of P_JU 2 treated wounds. A (HE40x) and B [Masson Thricrome(MT), 100x]; 2nd day; C (100x) and D (400x), 7th day; E (100x) and F (400x), 12th s, blood vessel; g-granulation tissue; m-muscle; d-dermis; i-cell infiltrate; c-scab and e-epithelium and q-keratin; d-dermis; f-pilous follicle; α-sebaceous gland and * -collagen.

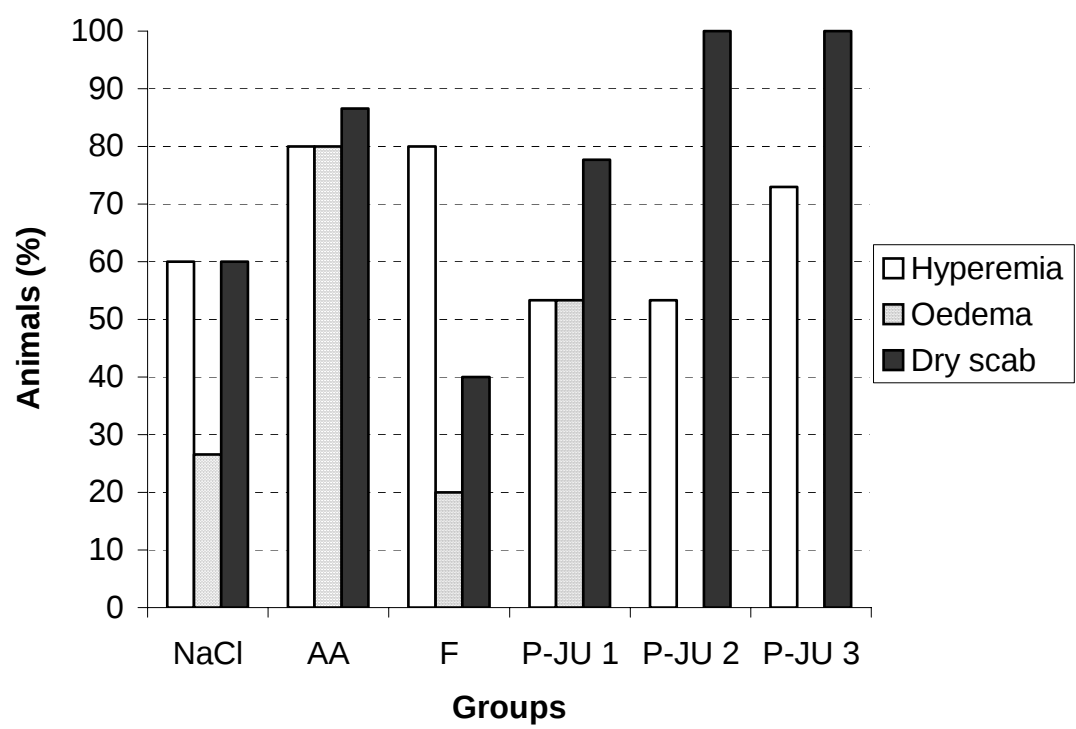


Fig. 1

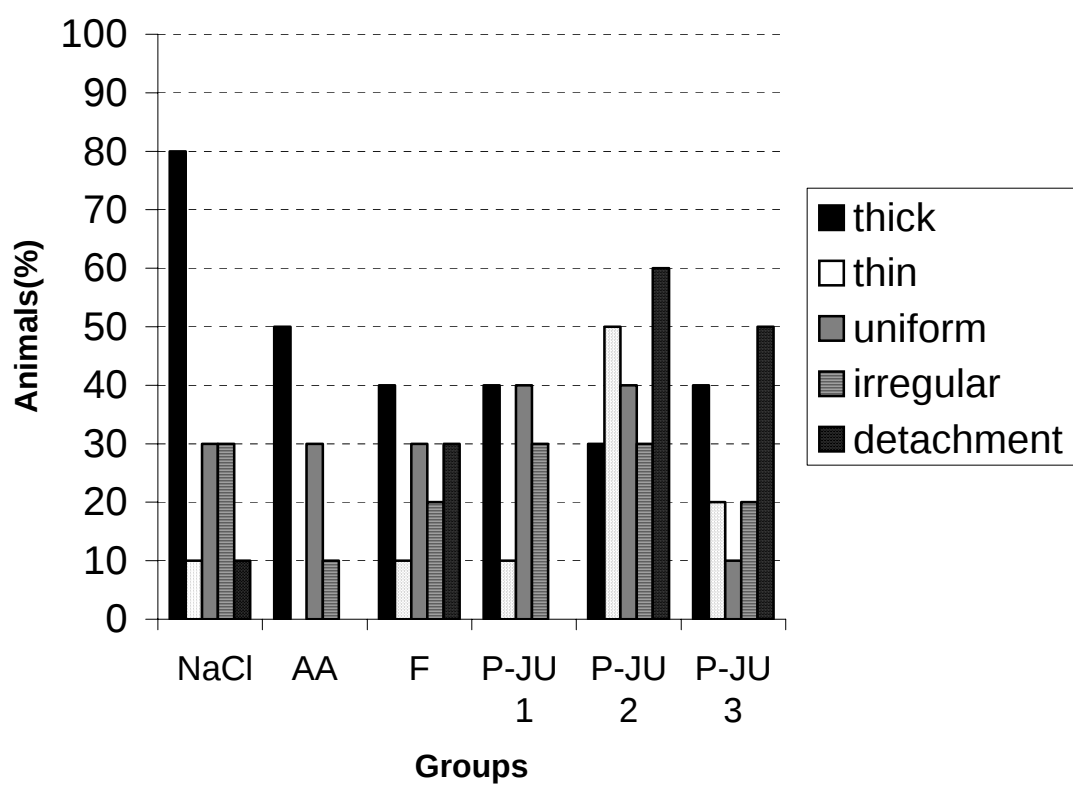


Fig. 2

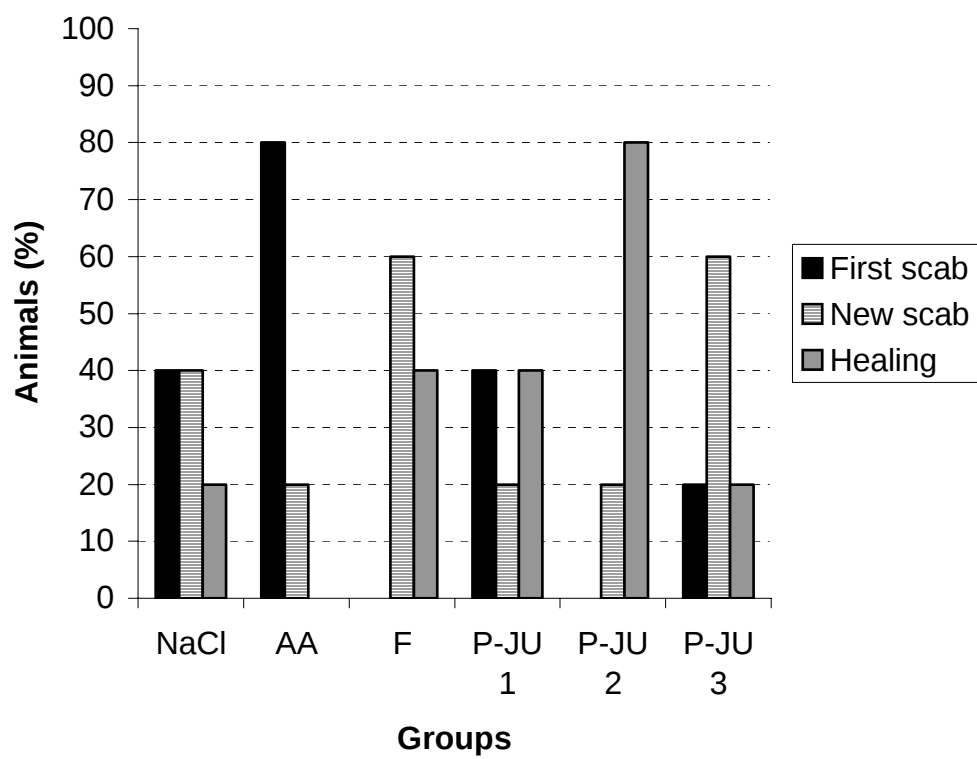


Fig.3

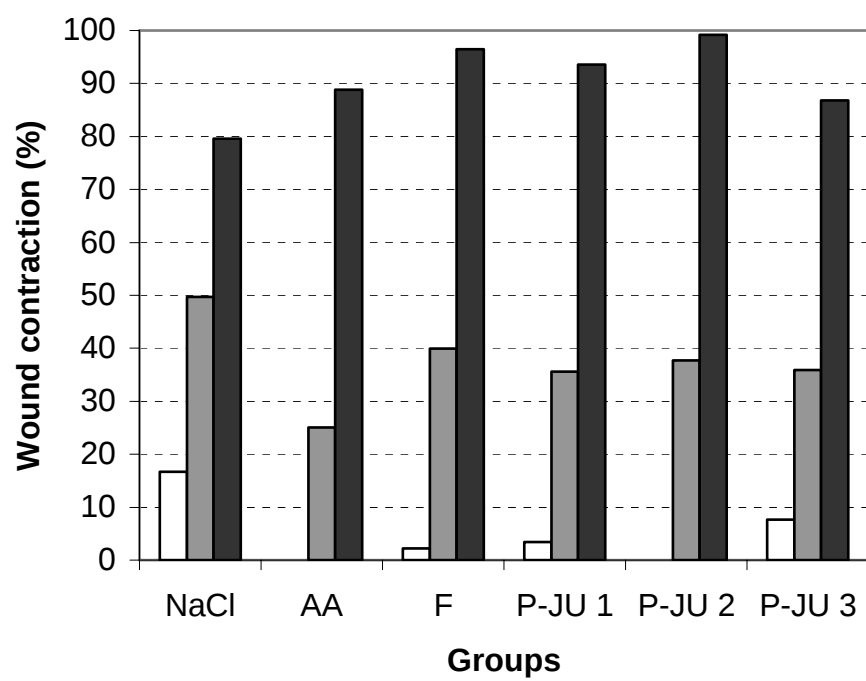


Fig. 4

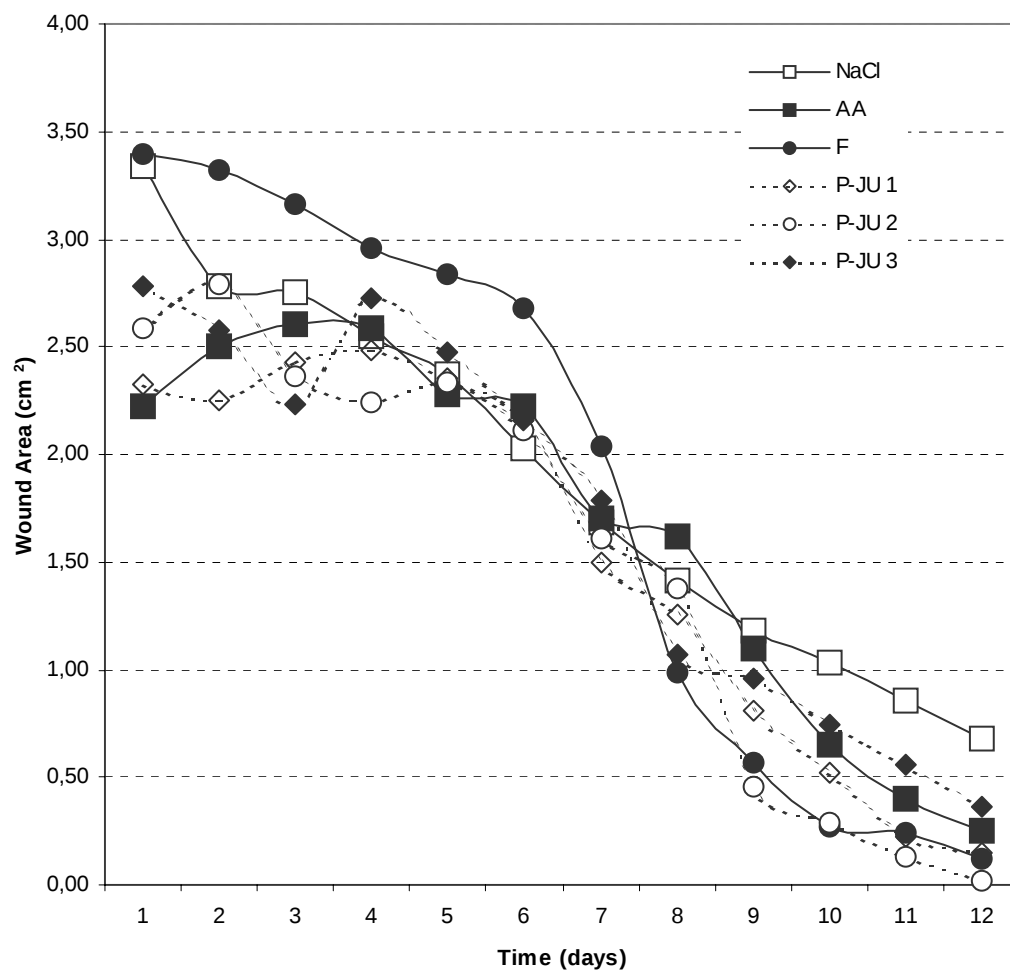


Fig.5

Table 1 Histological observations among Control and Test Groups.

GROUPS	2 nd day	7 th day	12 th day
NaCl	Intense cell infiltrate (neutrophil polymorphs and macrophages) and angiogenesis	Granulation tissue showing a fibrous-vascular pattern and an intense angiogenesis	Granulation tissue showing a disorganized fibrous-vascular pattern. Poor epithelial regeneration.
AA	Marked vascular pattern and presence of few exudate	Similar to NaCl group.	Fibrous aspect of granulation tissue. Absence of epithelial regeneration.
F	Less exudate among control groups and some collagen fibers were observed	Partial epithelial regeneration and granulation tissue showing a regressive vascular pattern	Complete epithelial regeneration and presence of fibrous vascular granulation tissue.
P-JU 1	Vascular pattern similar to AA, absence of exudate and presence of more organized fibers of traction	Granulation tissue showed a well-arranged fibrous-vascular pattern.	Cicatricial tissue and well arranged collagen fibers.
P-JU 2	Similar to P-JU 1	The pattern of granulation tissue is more fibrous, similar to the remodeling phase.	Cicatricial tissue and the best resolution process among all groups.
P-JU 3	Similar to P-JU 1 and 2	Similar to P-JU 1	Similar to P-JU 1

NaCl, 150 mM NaCl; AA, 75 mg/ml ascorbic acid; Furacin, F; P-JU 1, 75mg/ml; P-JU 2, 150mg/ml e P-JU 3, 214,3mg/ml.

Table 1

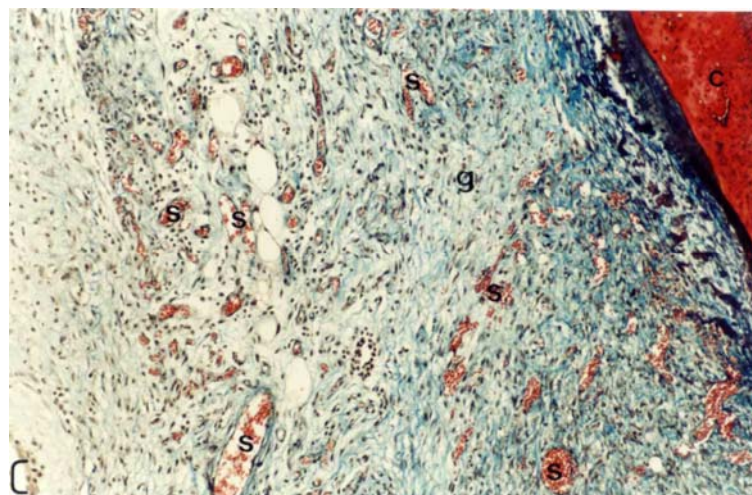
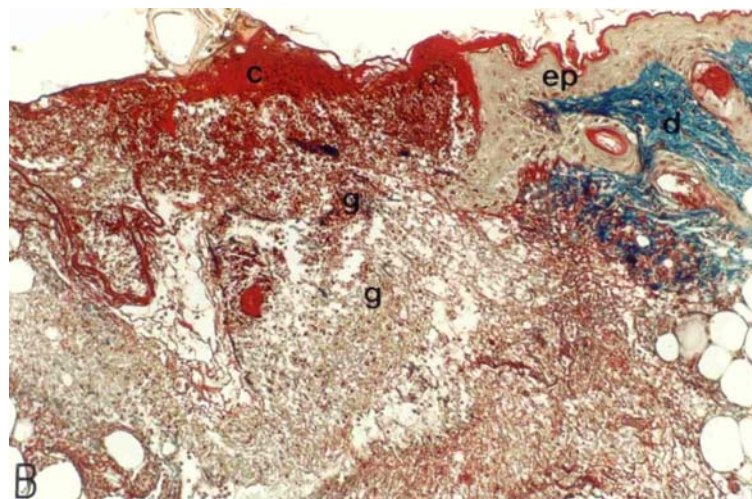
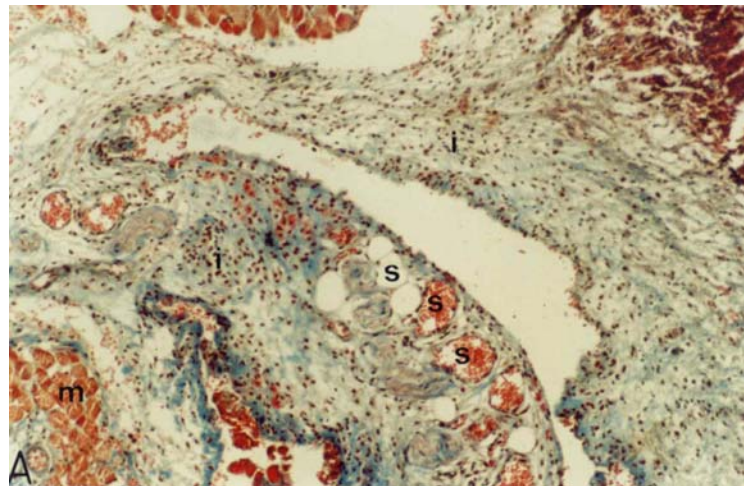


Figure 6

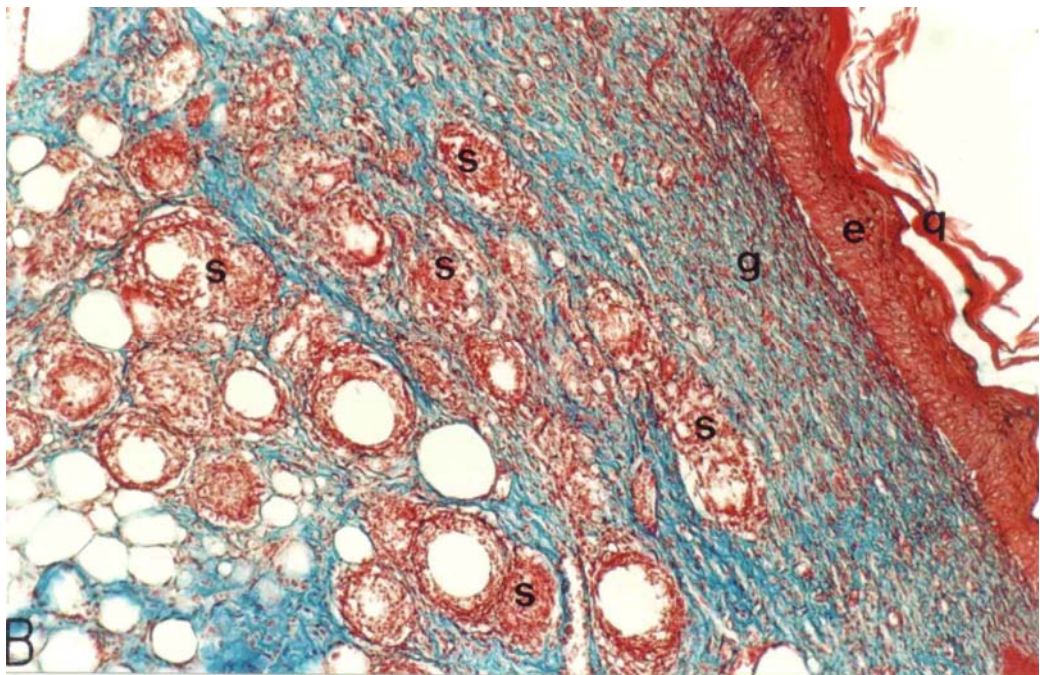
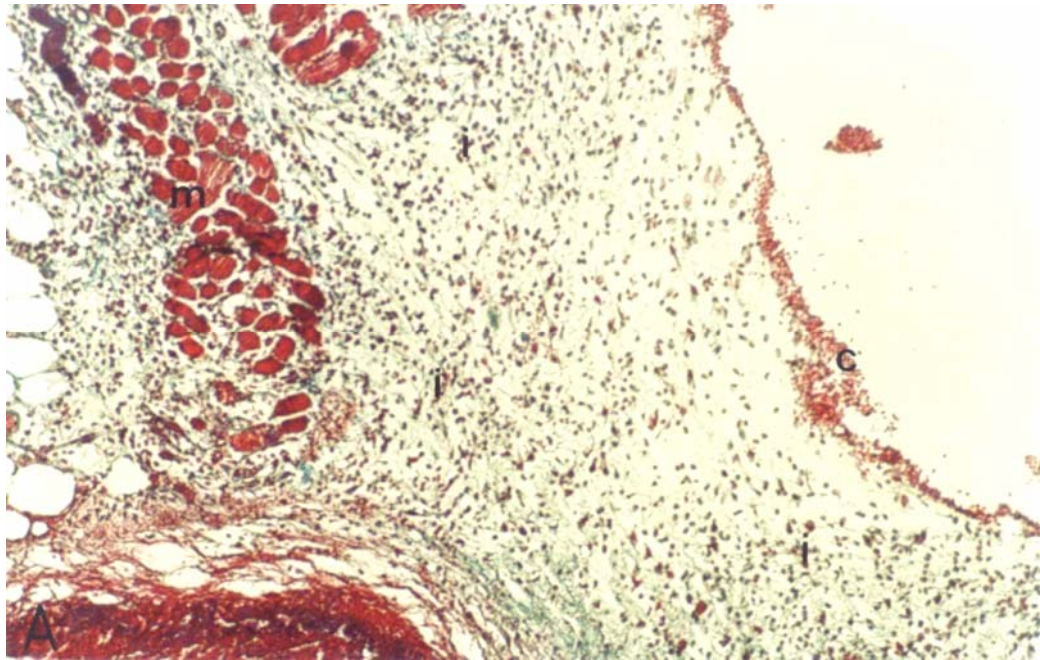


figure 7

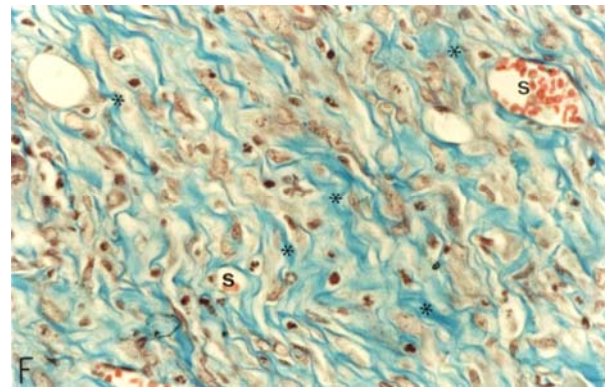
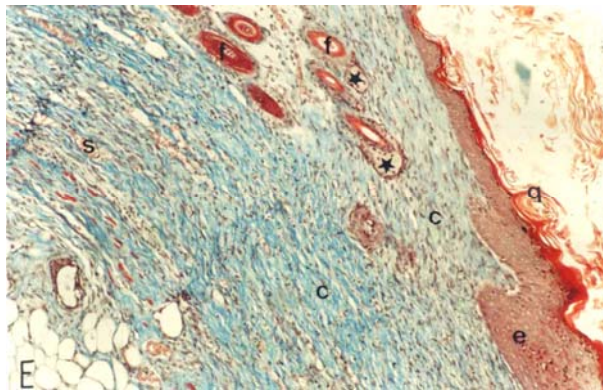
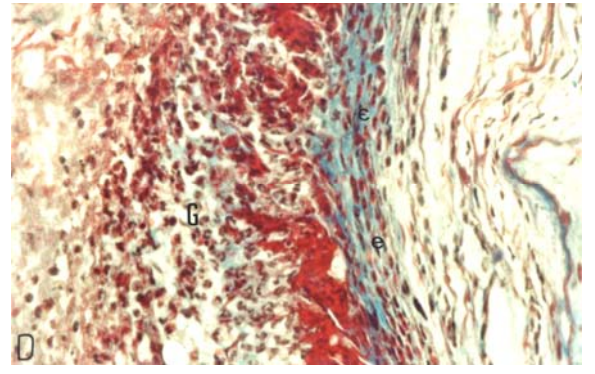
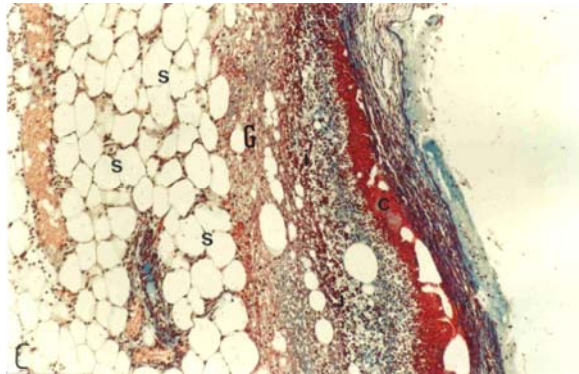
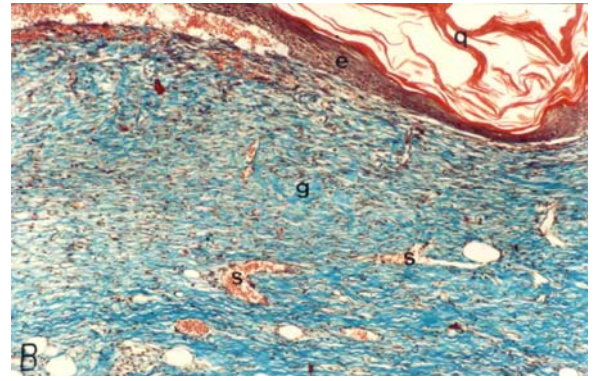
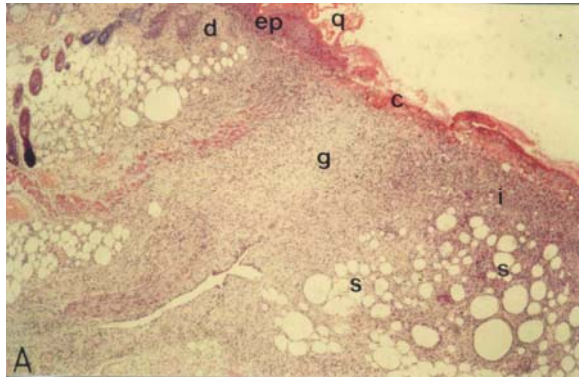


Figure 8

6.0 CONCLUSÕES

Emulsões contendo, o polissacarídeo de *Anacardium occidentale* exibiram significativa atividade pró-cicatrização quando aplicada topicamente uma única vez sobre feridas em camundongos. O presente estudo oferece evidência farmacológica preliminar sobre o uso do polissacarídeo da goma de cajueiro.