

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

ERYVELTON DE SOUZA FRANCO

**Avaliação Pré-Clínica da Toxicidade Dérmica e Reparação Tecidual
de uma Formulação Semi-Sólida do Óleo de Linhaça (*Linum
usitatissimum* L.) em Roedores e Coelhos**

Recife

2011

ERYVELTON DE SOUZA FRANCO

**Avaliação Pré-Clínica da Toxicidade Dérmica e Reparação Tecidual
de uma Formulação Semi-Sólida do Óleo de Linhaça (*Linum
usitatissimum* L.) em Roedores e Coelhos**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Mestre em Inovação Terapêutica**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Bernadete de
Sousa Maia**

**Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre José da
Silva Góes**

Recife

2011

Franco, Eryvelto de Souza

Avaliação pré-clínica da toxicidade dérmica de reparação tecidual de uma formulação semi-sólida do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) em roedores e coelhos/ Eryvelto de Souza Franco . – Recife: O Autor, 2011.

89 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Bernadete de Sousa Maia

Co-orientador: Alexandre José da Silva Góes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2011.

Inclui bibliografia e anexos

1. Linhaça 2. Ácidos graxos essenciais 3. Ferimentos I.
Título.

572.57

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-175

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Franco, Eryvelton de Souza

Título: Avaliação pré-clínica da toxicidade dérmica e reparação tecidual de uma formulação semi-sólida do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) em roedores e coelhos

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 18 de Fevereiro de 2011

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia - Orientadora

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Profa. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus, o criador e a quem devo minhas vitórias, por ter permitido que chegasse até aqui...

A minha orientadora, Professora Bernadete Maia, que não teve receio de abrir as portas do seu laboratório para uma pessoa que até então era desconhecida. Espero ter retribuído à altura toda a confiança depositada...

Ao Professor Alexandre Góes pelas orientações e diálogos de encorajamento...

Agradeço as Professoras Paloma Medeiros e Liriane Evêncio, ambas do departamento de Histologia e Embriologia, com as quais aprendi muitas das técnicas e manobras utilizadas para a realização dessa pesquisa.

Ao Professor Nicodemus Pontes Filho (Coordenador do Programa de Pós Graduação em Patologia - POSPAT) pela disponibilidade possibilitando assim a realização desse trabalho...

Aos estagiários e alunos de iniciação científica que muito colaboraram para a conclusão desse trabalho (cronologicamente): Priscila, Camilla, Edrienny, Ângela, Helaine, Thiane, Klédson... O convívio com vocês, apesar de alguns contratempos foi muito bom, cada um com sua particularidade...

“Camillinha” lógico que teria que agradecer de forma especial sua colaboração que foi de grande relevância... Pelos finais de semanas de muito trabalho, dentro do laboratório, espero que possa ter também contribuído de alguma forma com sua formação...

Aos meus amigos de laboratório (Mestrandos, Doutorandos e Pós-doutorandos), que aos poucos foram chegando e assim foi possível construir um ambiente harmônico e produtivo (cronologicamente):

Thiago - POSPAT, Ricardo - PPGIT, Raphael - PPGIT, Rafaella - POSPAT, Anacássia - POSPAT, Solma - PPGIT, Rosa Lúcia- Universidade do Porto, Ana Paula-POSPAT, Francisco – POSPAT, Glícia-PPGBF, Ana Catarina-RENORBIO.

Agradeço também a Rejane Silva, nossa técnica e braço direito no laboratório, por estar sempre disposta a ajudar;

Sr. Fredson e Sr. Tiago, que mantêm o ambiente limpo e saudável para que possamos desenvolver as atividades;

A Fátima (Histologia e Embriologia) e Silvânia (POSPAT), ambas técnicas em histologia, as quais tenho muito o que agradecer;

Agradeço a minha tia de coração e toda a sua família maravilhosa, da qual posso também considerar-me membro, pelas tarde e noites de amparo após longas jornadas de trabalho na UFPE: Tia Lúcia, Sr. Jaime, Luciene, Laine e Joelmir;

A minha amiga xgg Cirleide (Cici) e sua família Dona Helena (sua mãe), Glemerson (John seu esposo) que sempre estão a me dar força e ensinamentos cristãos;

Devo como sempre, um (MUITOS) agradecimento (S) especial (AIS) a minha fortaleza meu porto seguro:

Minha mãe (Zélia Dias) e irmã (Eneida Franco) que sempre estão a apoiar-me, permitindo assim que “viva a viajar” navegue no desconhecido mundo da pesquisa e do conhecimento.

À minha tia avó, tia Quina que com a graça de Deus estar presente para comigo compartilhar mais esse momento.

A todos meu muitoooooooooooooooooooooooooooooooooooo obrigado...

...“De Deus dependem a minha
salvação e a minha glória;
estão em Deus a minha forte
rocha e o meu refúgio. Confiai
nele, ó povo, em todo tempo;
derramai perante ele o vosso
coração; Deus é o nosso
refúgio”...

Salmo 62:7,8

RESUMO

FRANCO, E.S. Avaliação Pré-Clínica da Toxicidade Dérmica e Reparação Tecidual de uma Formulação Semi-Sólida do Óleo de Linhaça (*Linum usitatissimum* L.) em Roedores e Coelhos. 2011. 89f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O óleo de *Linum usitatissimum* L. (linhaça) é rico em ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) como os ácidos graxos essenciais (linolênico (ω -3), linoléico (ω -6)) e ácido graxo monoinsaturado (AGMI) oléico (ω -9). Considerando a importância dos AGPI e AGMI na manutenção da integridade da pele e processos inflamatórios, este teve como objetivo avaliar a toxicidade dérmica e reparação tecidual de uma formulação semi-sólida do óleo de linhaça (FSSOL) em roedores e coelhos. Para a avaliação da toxicidade foram utilizados a FSSOL (1%, 5%, 10% ou 50%) ou óleo de linhaça, em diferentes modelos experimentais, a partir dos **protocolos 402** em camundongo Swiss (n=6); **404** em coelhos albinos (n=4); **405** em coelhos albinos (n=4) e **406** em guinea pig (n=6), publicados pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), bem como outros aspectos preconizados pelo *Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A FSSOL em diferentes concentrações (1%, 5% ou 10%) ou óleo de linhaça foram avaliados em modelos experimentais de ferida excisional (durante 14 dias) e incisional (durante 10 dias) em ratos Wistar (n=6) e comparado com grupos controles negativo (vaselina) e positivo (Dersani[®]). Através dos modelos de feridas, excisional e incisional, foram avaliados respectivamente, a contração / reepitelização da ferida e resistência à tração mecânica. Os resultados obtidos revelam que nas diferentes concentrações testadas, a FSSOL não apresenta toxicidade (dérmica ou ocular) ou sensibilização dérmica, nos modelos animais utilizados. No que se refere à reparação tecidual, os grupos tratados com as FSSOL (1% ou 5%) apresentaram processo de reepitelização já bem visualizado a partir do 6º dia de tratamento, enquanto os grupos controle (negativo e positivo) só foi verificado a partir do 7º dia de tratamento. No 14º dia os grupos tratados com a FSSOL (1% ou 5%) e controle positivo apresentaram 100% (06 animais) de reepitelização contra 33,33% (02 animais) apresentado pelo grupo controle negativo. Na avaliação da resistência à tração mecânica não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com a FSSOL (1%, 5% ou 10%) e controles (negativo e positivo). Nossos resultados demonstram que, a administração tópica da FSSOL (1% ou 5%) em feridas experimentais excisionais, possibilitou a reepitelização em 100% dos animais e não causou danos a pele íntegra durante os ensaios de segurança em roedores e coelhos.

Palavras-chaves: *Linum usitatissimum*, Linaceae, toxicidade dérmica, feridas cutâneas, ácidos graxos essenciais, reparação tecidual

ABSTRACT

FRANCO, E.S. Preclinical Evaluation of Toxicity and Dermal Tissue Repair Formulation of a Semi-Solid Oil Linseed (*Linum usitatissimum* L.) in Rats and Rabbits. 2011. 89f. Thesis (Masters). Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Linum usitatissimum L. (Linseed) oil is rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) and essential fatty acids (linolenic (ω -3), linoleic (ω -6)) and monounsaturated fatty acid (MUFA) oleic acid (ω -9). Considering the importance of MUFA and PUFA in skin integrity maintenance and inflammatory processes, the aim was to evaluate the dermal toxicity and tissue repair in a semi-solid formulation of linseed oil (SSFLO) in rodents and rabbits. For the evaluation of toxicity were used SSFLO (1%, 5%, 10% or 50%) or linseed oil in different experimental models, from the **protocols 402** in Swiss mice (n=6); **404** in albino rabbits (n=4); **405** in albino rabbits (n=4) and **406** in guinea pig (n=6), published by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), as well as other aspects recommended by the *Guide for the execution studies of pre-clinical toxicity of herbal medicines* from the National Agency for Sanitary Surveillance (NASS). The SSFLO at different concentrations (1%, 5% or 10%) or linseed oil were evaluated in experimental excisional (14 days) and incisional (10 days) wound in Wistar rats (n=6) and compared with negative (Petrolatum jelly) and positive (Dersani[®]) control groups. Through the wound models, excisional and incisional, were evaluated respectively, the contraction / reepithelization of the wound and tensile mechanical strength. The results show that on the tested concentrations, the SSFLO presented no toxicity (dermal or ocular) nor dermal sensitization on the used animal models. Regarding tissue repair, the groups treated with SSFLO (1% or 5%) showed well viewed reepithelization process from the 6th day of treatment, while on the control groups (negative and positive) were only observed from the 7th day of treatment. On day 14, the groups treated with SSFLO (1% or 5%) and positive control showed 100% (06 animals) of reepithelization against 33.33% (02 animals) presented by the negative control group. Evaluating the tensile mechanical strength no statistically significant difference between the groups treated with SSFLO (1%, 5% or 10%) and controls (negative and positive) were found. Our results demonstrate that topical administration of SSFLO (1% or 5%) in experimental excisional wounds, allowed reepithelization in 100% of the animals and caused no damage to intact skin during the safety tests in rodents and rabbits.

Keywords: *Linum usitatissimum* L., Linaceae, dermal toxicity, skin wounds, essential fatty acids, tissue repair.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Linhaça.....	13
2.1.1 Composição química da linhaça.....	13
2.1.2 O óleo de linhaça.....	14
2.1.3 Ácidos graxos presente na linhaça	15
2.2 Os ácidos graxos com atividade terapêutica.....	16
2.3 Fitoterápicos e produtos contendo AGE utilizados na cicatrização de feridas cutâneas.....	17
2.4 Cicatrização.....	19
2.5 Avaliação da segurança dos fitoterápicos de uso tópico: Resoluções vigentes no Brasil.	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 Metodologia	28
4.1 Avaliação da toxicidade da formulação semi-sólida do óleo de linhaça.....	28
4.1.1 Formulação semi-sólida	28
4.1.2 Toxicidade dérmica aguda.....	28
4.1.3 Toxicidade dérmica sub-crônica	28
4.1.4 Teste de irritação dérmica	29
4.1.5 Teste de irritação ocular	30
4.1.6 Sensibilização dérmica.....	30
4.2 Avaliação da eficácia farmacológica da formulação semi-sólida do óleo de linhaça	31
4.2.1 Preparação da forma farmacêutica	31
4.2.2 Modelos biológicos	31
4.2.3 Modelo de ferida excisional	32
4.2.4 Análise macroscópica do fechamento da ferida	32
4.2.5 Análise microscópica morfométrica.....	32

4.2.6 Modelo de ferida incisional.....	33
4.2.7 Análise Estatística	34
4 REFERÊNCIAS	35
5 RESULTADOS	1
5.1 Artigo I.....	1
5.2 Artigo II.....	1
6 CONCLUSÃO	83
7 ANEXOS.....	84

1 INTRODUÇÃO

A linhaça, semente do linho (*Linum usitatissimum* L.) apresenta elevado teor de lipídios (32 a 38%), sendo que destes 50 a 55% são do ácido graxo poliinsaturado linolênico, (família ω -3) e ácido linoléico (família ω -6) caracterizados como ácidos graxos essenciais (AGE), contêm ainda ácidos graxos monoinsaturados como ácido oléico (família ω -9). Além de minerais (potássio, sódio, magnésio, fósforo, ferro, cobre, zinco, manganês e selênio), vitaminas (A, E, B1, B6, B12), proteínas e fibras (lignanas) (GÓMEZ, 2003; LAMPE et al., 2006).

Os ácidos linoléico e linolênico são conhecidos como AGE porque o organismo humano não é capaz de sintetizá-los, sendo necessária a ingestão através da dieta (ESCAMILLA, 2003). Eles são essenciais para as funções celulares, e atuam como precursores na síntese de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa como o ácido eicosatetraenóico: ácido araquidônico (AA), eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), que participam de numerosas funções celulares (ex. integridade e fluidez das membranas, síntese de eicosanóides, etc). Estes últimos com importante participação nas respostas inflamatórias e imunológicas, acelerando o processo de granulação tecidual (MARSZALEK e LODISH, 2005).

No processo de reparação tecidual três etapas são evidenciadas: fase inflamatória, proliferativa e de maturação (SABISTON et al, 2006). De acordo com o tipo da lesão, o mecanismo de reparo tecidual possibilitará a cicatrização ou regeneração, bem como o procedimento a ser adotado durante o tratamento (FIGUEIREDO, 2003).

Entre os procedimentos que devem ser adotados no tratamento de feridas abertas, a manutenção do meio úmido e limpo entre o leito da ferida e a cobertura primária favorecem a cicatrização. Para a obtenção desse resultado é recomendada a utilização de produtos com ação enzimática, tais como as collagenases e proteinases, que possibilitam o debridaçã dos tecidos desvitalizados, possibilitando assim à migração celular para as áreas úmidas onde há fibrina. E como a reepitelização ocorre através da proliferação e migração celular, o meio úmido favorece as condições fisiológicas para a cicatrização (DANTAS e JORGE, 2003). A fim de manter a hidratação do leito da ferida, Declair (1994) propôs a utilização de triglicérides de cadeia média (TCM) no tratamento de feridas abertas, enquanto Dantas e Jorge (2003) sugeriram a utilização de AGE, pois além de suprir essa necessidade ainda

atuariam como agentes pró-inflamatórios durante a fase inflamatória do processo de cicatrização, contribuindo para acelerar o reparo tecidual.

Algúns produtos que possibilitam a manutenção do leito das feridas úmida são provenientes de fontes lipídicas de origem vegetal (ex: óleo de girassol, óleo de babaçu, manteiga de cacau entre outros), o que leva a constante investigação de plantas e produtos destas extraídos no que concerne o potencial terapêutico no tratamento de diversas patologias, incluindo o reparo tecidual. Todavia, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear efeitos tóxicos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). Desta forma, a avaliação do binômio risco/benefício no emprego de toda e qualquer preparação farmacêutica (alopática, homeopática, fitoterápica) é um dos principais objetivos dos estudos farmacológicos e toxicológicos, pré-clínicos e clínicos (PONTE, 2003).

Os testes de toxicidade pré-clínicos são delineados não somente para demonstrar que um fitoterápico é seguro, mas para caracterizar possíveis efeitos tóxicos do produto. O desenho do protocolo experimental para os ensaios toxicológicos pré-clínicos depende da via e período de administração, em humanos (KLAASSEN e WATKINS, 2001) e seguem normatizações específicas como as descritas no *Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos* publicado na Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004).

Tendo em vista o exposto, o presente estudo objetivou avaliar a toxicidade dérmica (aguda e sub-crônica), irritação dérmica e ocular e sensibilidade dérmica e atividade sob a reparação tecidual de uma formulação semi-sólida do óleo de linhaça, em roedores e coelhos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Linhaça

O *Linum usitatissimum* L. é uma herbácea pertencente à família Linaceae, popularmente conhecida por linho ou linhaça, nativa da Europa, Ásia e Região Mediterrânea. Suas sementes são consideradas alimento funcional no Brasil, onde a variedade mais comum é a que apresenta semente de cor marrom escura brilhante, rica em substâncias benéficas à saúde. A semente da linhaça é usada como matéria-prima para a produção de óleo e farelo, sendo rica em fibras, proteínas e gordura (NESBITT e THOMPSON, 1997); seu óleo é comprovadamente um dos mais ricos em ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) como os ácidos graxos essenciais (AGE), com 56,6% de ω -3 [ácido linolênico (C18: 3cis 9,12,15)] e 13,2% de ω -6 [ácido linoléico (C18:2 cis 9,12)], além do ácido graxo monoinsaturado (AGMI) ω -9 com 17,8% [ácido oléico (C18:1 cis9)] (OTRANTO et al., 2010).

O óleo de linhaça está presente no formulário nacional da Farmacopéia Brasileira na forma de linimento óleo calcáreo, cuja indicação de uso é para os casos de dermatoses pruriginosas e queimaduras (BRASIL, 2005) e segundo a Medicina tradicional Chinesa e a Medicina “Ayurveda”, este óleo possui indicações para o tratamento de feridas e como hidratante, antioxidante dérmico entre outros (DATTA et al., 2009). As atribuições farmacológicas do óleo de linhaça são inferidas aos AGPI e AGMI nele presente, os quais atuam como um poderoso mediador pró-inflamatório, estimulando a produção de fatores de crescimento, a fibroplasia e a neovascularização (MARQUES et al., 2004; HATANAKA e CURI, 2007).

2.1.1 Composição química da linhaça

Análises laboratoriais constataram que no grão de linhaça encontra-se aproximadamente 35% de lipídio, 26% de proteína, 14% de fibra alimentar, 12% de mucilagem, 9% de água e 4% de cinzas, as quais são constituídas por 0,7% de potássio, 0,7% de fósforo, 0,3% de magnésio, 0,2% de cálcio, 0,2% de enxofre, entre outros (MARQUES, 2008).

A linhaça é uma boa fonte de proteína vegetal, sendo constituída principalmente pelos aminoácidos metionina e cisteína. Ela tem como aminoácidos limitantes lisina, treonina e tirosina, possuindo um valor nutricional comparável com a soja (OOMAH e MAZZA, 2000).

É considerada a maior fonte de lignanas (secoisolariciresinol e matairesinol), que são convertidas por ação bacteriana no trato gastrointestinal à enterolactona e enterodiol. As lignanas são fitoestrógenos presentes nas paredes celulares dos vegetais que apresentam, nos humanos, propriedades anticarcinogênicas e antioxidantes. (OOMAH e MAZZA, 2000; BOMBO, 2006; CORDEIRO et al., 2009). Por serem semelhantes ao estrogênio, as lignanas também têm sido relacionadas positivamente à menopausa e ao câncer de mama. Estudo realizado com 30 mulheres demonstrou que 36,4% tiveram os sintomas da menopausa aliviados, quando consumiram 10g/dia de semente de linhaça durante cinco meses (COLPO et al., 2006).

A fibra alimentar presente nos grãos de linhaça apresenta boa proporção entre fibra solúvel e insolúvel (BOMBO, 2006). Sendo benéfica no tratamento da constipação, da síndrome do intestino irritável e da doença diverticular (TARPILA et al., 2005). Por outro lado, sabe-se que as fibras solúveis são em parte fermentadas pelas bactérias do cólon e que desempenham, no organismo, atividades hipoglicemiantes, hipocolesterolêmicas e hipotriglicéridêmicas, além de atuarem na prevenção da obesidade, aumentando o poder de saciedade da refeição e ativando o metabolismo digestivo (RUIZ-ROSO, 2001; FILISETTI, 2007).

Fazem parte ainda da composição do grão os ácidos fenólicos, que apresentam relatos de atividade antioxidantes, antimicrobiana e anticancerígena, os flavonóides que inibem a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária, a permeabilidade e a fragilidade capilar e a atividade de determinados sistemas enzimáticos, como a lipoxigenase e o ácido fítico, que é a principal forma de armazenamento de fosfato das plantas (OOMAH e MAZZA, 2000).

2.1.2 O óleo de linhaça

Aproximadamente 40% do peso das sementes de linhaça é composto por óleo, o qual é extraído por compressão a frio, técnica que preserva suas propriedades como alimento funcional. Ao contrário da maioria dos óleos vegetais que são boas fontes de ω -6, o óleo de linhaça é rico em ω -3 (Tabela 1) (CHOO et al., 2007; OTRANTO et al., 2010). Estudos têm sido realizados utilizando o óleo de linhaça por via oral, como forma alternativa do tratamento da Síndrome de Sjögren “olho seco” por diminuir a inflamação da superfície ocular (PINHEIRO-JR. et al., 2007). Entretanto, também pode ser acrescido a formulações tópicas para o tratamento de eczema, psoríase, rosácea, acne e envelhecimento da pele. O uso tópico

do óleo permite ao corpo absorver alguns dos ácidos graxos essenciais necessários para uma atividade celular saudável. Ele ainda pode amaciar e cicatrizar abrasões da pele, diminuir o eritema e edema de lesões cutâneas, e promover a saúde e a hidratação da pele (ARTECHE-GARCÍA, 1994).

Tabela 1 – Ácidos graxos presente no óleo de linhaça

Ácidos Graxos	%
Saturado (AGS)	
Ácido palmítico (C16: 0)	6,6
Ácido esteárico (C18: 0)	4,9
Ácido araquídico (C20: 0)	0,1
Ácido palmitoléico (C16: 1, cis 9)	0,1
Ácido vaccênico (C18: 1 cis-11)	0,2
Monoinsaturado (AGMI)	
Ácido oléico (C18: 1 cis-9) (n-9)	17,8
Poliinsaturado (AGPI)	
Ácido linoléico (C18: 2 cis 9,12) (n-6)	13,2
Ácido linolênico (C18: 3 cis 9,12,15) (n-3)	56,6

Fonte: OTRANTO et al., 2010

2.1.3 Ácidos graxos presente na linhaça

Entre os AGPI presente na linhaça, o ácido linolênico (ω -3), compõe cerca de 56,6% do peso do grão e, em menor quantidade está o AGMI oléico (ω -9), com aproximadamente 17,8%, destacando-se na constituição da linhaça (OTRANTO et al., 2010). Os AGPI ω -3 e ω -6, denominados de ácidos graxos essenciais (AGE), são precursores dos demais ácidos das famílias n-3 e n-6. O ω -3, entre suas diversas funções biológicas, é usado como fonte energética e matéria-prima do tecido nervoso e de substâncias que regulam a pressão arterial e frequência cardíaca, a coagulação, a dilatação vascular e a lipólise (MARTIN et al., 2006; YODIM et al., 2006). Tanto o ω -3 como o ω -6 podem ser convertidos nos ácidos eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3), que por sua vez são transformados em prostaglandinas e leucotrienos, com atividades imunomoduladoras. Esses processos são mediados pelas enzimas elongases e dessaturases. Como as mesmas enzimas fazem as conversões tanto de ω -3 como de ω -6, tem-se como resultado uma competição

metabólica entre os dois grupos (WIESENFELD et al., 2003). O ácido linoléico (ω -6) pode ainda ser metabolizado em ácidos gama-linolênico e araquidônico (YOSHIARA, 2007).

O consumo excessivo de ω -6 e a alta relação (ω -6: ω -3) podem favorecer o desenvolvimento de quadros patológicos, tais como doenças cardiovasculares, cânceres, doenças auto-imunes e doenças inflamatórias, enquanto o aumento da ingestão de ω -3 e conseqüente redução de (ω -6: ω -3) exercem o efeito oposto (SIMOPOULOS, 2008). As conseqüências negativas relacionadas ao alto consumo de ω -6 são devidas à produção excessiva de ácido araquidônico e seus produtos eicosanóides, assim como pela diminuição na produção de EPA e de DHA provenientes do ácido linolênico (TARPILA et al., 2005).

2.2 Os ácidos graxos com atividade terapêutica

Os ácidos graxos foram vistos, até o início do século XX, exclusivamente como uma forma eficiente de armazenar energia, podendo ser sintetizados pelo organismo a partir de proteínas e carboidratos. Entretanto, várias evidências apontaram que dieta pobre em ácido graxo estava associada à síndrome, que em ratos caracterizavam-se por: descamação anormal da pele e formação de caspa, inchaço da cauda, que evolui para necrose, inchaço das patas traseiras, perda de pêlo, aparecimento de feridas, deformação renal, aparecimento de sangue na urina, parada de crescimento do animal, alterações ou interrupção na ovulação, infertilidade masculina, alto consumo de água, alta permeabilidade da pele, elevado metabolismo, alto quociente respiratório, entre outros sintomas que culminam na morte do rato (BURR e BURR, 1929; BURR e BURR, 1930; MEAD et al., 1986). Criou-se então o conceito de AGE. Que são imprescindíveis ao organismo, contudo não podem ser sintetizados pelo mesmo, portanto, devem ser oferecidos na alimentação.

A importância dos ácidos graxos ω -6 é conhecida desde os meados de 1930. Já os ácidos graxos ω -3, somente após 1980, tiveram a sua necessidade associada à prevenção, principalmente, de distúrbios neurológicos e visuais. Os AGE são precursores para a síntese de AGPI de cadeia longa: ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosaexaenoico que fazem parte da estrutura dos fosfolipídeos e são componentes importantes das membranas e da matriz estrutural de todas as células. Além de seu papel estrutural, esses lipídeos podem também modular a função celular ao atuarem como mediadores intracelulares da transdução de sinais e como moduladores das interações entre

células. A composição dos fosfolípidos de membranas na forma de ácidos graxos é, em parte, determinada pela composição dos AGE da alimentação (CARMO e CORREIA, 2009).

A efetividade dos AGE nos problemas relacionados às lesões de pele, em humanos, tem sido estudada desde 1929, quando foram realizadas as primeiras observações de lesões de pele provocadas por uma deficiência nos níveis de AGE nos alimentos que eram preparados (MARQUES et al., 2004). No homem adulto, a carência é rara, mas se manifesta mais frequentemente por problemas cutâneos como dermatoses eczematiformes, retardo na cicatrização e problemas de equilíbrio lipídico do soro, de coagulação e função plaquetária (MINAZZI-RODRIGUES et al., 1991).

Para Cardoso et al. (2004) os AGPI também exercem papel estrutural podendo modular a interação célula-célula e a transdução do sinal. O ácido linoléico e linolênico estimulam a proliferação de células epitelial *in vitro*, com papel crucial no processo inflamatório, contração vascular, quimiotaxia, adesão, ativação e transmigração celular. O ácido araquidônico e o ácido linoléico são mediadores de uma série de eventos durante a cicatrização como crescimento celular, angiogênese e síntese da matriz extracelular. Os produtos provenientes do metabolismo do ácido linoléico estão envolvidos na transdução do sinal mitogênico do EGF (fator de crescimento epidérmico) para o núcleo do fibroblasto, responsável pela formação de prostaglandinas (DERVICHIAN, apud HOLMAN, 1954). Além de atuar como mediador de leucócitos sendo, portanto quimiotático e estimulador de neutrófilos (MOCH et al., 1990).

2.3 Fitoterápicos e produtos contendo AGE utilizados na cicatrização de feridas cutâneas

A fitoterapia é uma terapêutica alopática reconhecida e estimulada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e estudada por diversas instituições, como Centros de Pesquisa e Universidades. Foi citada na 10ª Conferência Nacional de Saúde, a qual determina que “As Secretarias Municipais de Saúde devem garantir a atenção integral à saúde, e para isso devem incorporar no SUS, em todo país, práticas de Saúde como a fitoterapia”. A Resolução-RDC 17 de 2000, dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, trazendo definições e processos de elaboração dos mesmos (BRASIL, 2000). Há diferentes passos para uma planta tornar-se um medicamento, o que exige um complexo trabalho multiprofissional envolvendo

pesquisa quanto à toxicidade, com estudos pré-clínicos e clínicos para garantir ao final qualidade, segurança e eficácia do produto (DANTAS e JORGE, 2003).

Dentre os produtos naturais amplamente estudados e utilizados para a cicatrização de feridas cutâneas destacam-se o mel, a própolis, a babosa (*Aloe vera* L.) o alecrim (*Rosmarinus officinallis* L.), o barbatimão (*Strynodendro barbatimão* Mart), a calêndula (*Calendula officinalis* L.), cardo-santo (*Carduus benedictus*), o confrei (*Symphytum officinale*), a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Martius), a guaçatonga (*Parietaria officinalis*), o rubim (*Leonorus sibiricus*) e a tanchagem (*Plantago media* L.) (SILVEIRA e RAISER, 1995; ORYAN e ZAKER, 1998)

Entre os produtos industrializados disponíveis no Brasil utilizados no tratamento de feridas, genericamente denominadas pelos profissionais como AGE, pode-se elencar: Dersani[®] (Saniplan), Sommacare[®] (LM Farma) e Dermosan[®] (Sunny Day).

- Dersani[®] emulsão oleosa de girassol, rico em: ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, lecitina de soja, vitamina A, vitamina E, ácido capróico e ácido linoléico;

- Sommacare[®] emulsão oleosa de soja hidrolisada e óleo de girassol, rico em: ácido linoléico, triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico.

- Dermosan[®] emulsão oleosa de girassol e soja, rica em: ácido cáprico, ácido láurico, ácido linoléico, ácido caprílico, ácido capróico, ácido palmítico, ácido mirístico, lecitina de soja, palmitato de retinol (vitamina A) e acetato de tocoferol (vitamina E).

O que deixa evidente que nas formulações apenas um dos AGE encontram-se presente, no caso, o ácido linoléico (ω -6). Entretanto, na apresentação comercial é feita a divulgação como contendo ácidos graxos essenciais. Levando ao entendimento que se trata do linoléico e linolênico (MANHEZI et al., 2008).

Os demais triacilgliceróis, como os ácidos cáprico e caprílico, são adicionados às formulações por ter ação no tratamento e prevenção de dermatite amoniacal e de úlceras de decúbito, por formarem uma barreira protetora para a pele, impedindo a maceração, além de ter importante ação nos processos de inflamação celular, proporcionando alívio após a primeira aplicação, nutrição celular local e possuir grande capacidade de regenerar tecido (D'AGOSTINI, 2001).

Já os ácidos graxos de cadeia média, como os monoacilgliceróis, são relevante nas formulações, por apresentar ação antimicrobiana elevada (80%) na redução de formação de cáries dentárias em estudo realizado em animais de laboratório (D'AGOSTINO, 2001). Além

de estudos demonstrarem que o uso tópico de ácidos insaturados contribuía para a eliminação de bactérias na pele intacta (KODICEK, 1956).

A vitamina E, além das funções antioxidantes, desempenha função especial estrutural. Controla a peroxidação lipídica em células imunológicas, modula a produção de eicosanóides, estimula produção de IL-2, além de estimular a proliferação de linfócitos (TRABER e PACKER, 1998).

A vitamina A (ácido retinóico) interfere na cicatrização, provocando lise das membranas lisossômicas e epitelização (HATANAKA e CURI, 2007).

2.4 Cicatrização

Cicatrização é, em geral, uma resposta tecidual a uma lesão, aos processos inflamatórios nos órgãos interno, ou necrose celular em órgãos incapazes de regeneração. O processo de cicatrização envolve componentes da matriz extracelular, células residentes (queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células nervosas), leucócitos (neutrófilos, macrófagos/monócitos, linfócitos), assim como mediadores de natureza lipídica (prostaglandinas, leucotrienos, fator de agregação plaquetária) e protéica (citocinas e fatores de crescimento) (CONTRAN et al., 2000). Segundo Clark (1993), o reparo tecidual ocorre em três fases: (I) inflamatória, (II) de granulação com deposição de matriz extracelular e (III) remodelação. Entretanto, mais importante é compreender que a cicatrização não consiste em uma série de eventos isolados, e sim, em um “concerto” de processos de ocorrência simultânea, alguns dos quais continuam por muitos anos após o restabelecimento da integridade física do tecido lesado.

Segundo Weissman (1992), existem três tipos principais de lesões da pele:

- a) lesão superficial: quando atinge somente o epitélio sem comprometer a camada basal da derme, existe reepitelização por deslocamento das células sem resultar em cicatriz;
- b) lesão profunda: constituída por ferida incisa limpa com perda inapreciável de tecido, mínima hemorragia, ausência de infecção e com bordas bem justapostas;
- c) lesão aberta: com perda de substância, com ou sem infecção, bordas irregulares com ou sem justaposição, havendo preenchimento do espaço por uma massa de vasos e células neoformadas que constitui o tecido de granulação com posterior reorganização e conversão em tecido fibroso.

Embora o tipo de ferimento, o tempo de evolução, o órgão ou tecido envolvido e as técnicas utilizadas interfiram na cicatrização, o processo é basicamente o mesmo. Este processo ocorre em todo o organismo. Em termos clínicos, pode ser classificada em primeira, segunda ou terceira intenção (CONTRAN et al., 2000):

- a) primeira intenção: quando os bordos são deixados unidos utilizando sutura;
- b) segunda intenção: quando não é possível unir os bordos; o próprio organismo preenche o espaço necessário à cicatrização;
- c) terceira intenção: está evoluindo por segunda intenção e sutura-se para ajudar.

A cicatrização por primeira intenção é a mais rápida e forma cicatrizes menores, visto que a fenda da ferida é mais estreita e a destruição tecidual nas suas bordas é menor. O exemplo clássico é o das feridas cirúrgicas (WEISSMAN, 1992).

A cicatrização por segunda intenção ocorre quando há: perda e/ou dano excessivo de tecidos, como queimaduras, ou infecção da lesão. Nestes casos, as bordas da ferida não podem ser aproximadas, e o curativo é utilizado para tratamento da lesão, sendo indispensável a manutenção do leito da ferida úmido. Neste processo a cicatrização leva mais tempo do que a anterior e inevitavelmente resulta em maior quantidade de tecido cicatricial. Quando a perda tecidual é muito grande, ela pode resultar em deformidade ou disfunção (TIAGO, 1995).

Já a de terceira intenção, ocorre quando qualquer fator retarda o processo de cicatrização, e passa a ser necessário deixar a lesão aberta para drenagem ou para debelar possível infecção. Uma vez tratada, a ferida poderá ser fechada por primeira intenção (POLETTI, 2000).

Como já foi dito, a cicatrização é um evento biológico complexo, envolvendo inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação e remodelação (MELLEGA, 1992). Se a ferida constitui a solução de continuidade, a cicatriz corresponde à tentativa biológica a que o organismo recorre para restaurar sua integridade, do ponto de vista funcional e estético (KOOPMANN, 1993). A finalidade da cicatrização é, em primeiro lugar, a remoção das partes necrosadas, sendo reabsorvidas pelas células fagocíticas; em segundo lugar uma crescente proliferação de um tecido germinativo vascularizado penetra pelas fendas da ferida e limpa-as em uma ação conjunta com o tecido de granulação que acompanha tal crescimento proliferativo. Quando termina a reabsorção dos tecidos necrosados, o tecido de granulação jovem regressa para tecido cicatricial, ao mesmo tempo em que começa a reepitelização a partir dos bordos (GONÇALVES e PARIZOTO, 1998).

A cicatrização é composta pelas fases: coagulativa; inflamatória; fibroplasia ou proliferativa; maturativa ou remodelação. A fase coagulativa tem início imediato ao surgimento da ferida, é dependente de atividade plaquetária e da cascata de coagulação. Ocorre uma complexa liberação de produtos como substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e protease. A formação de coágulo serve não apenas para coaptar as bordas das feridas, mas também para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida, (MANDELBAUM et al., 2003). A fase inflamatória depende, além de inúmeros mediadores químicos das células inflamatórias, da presença dos leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos. Os PMN chegam ao momento da injúria tissular e ficam por período que varia de três a cinco dias, sendo eles os responsáveis pela fagocitose das bactérias no início da reação inflamatória. O macrófago é a célula inflamatória mais importante dessa fase, que por sua vez permanece do terceiro ao décimo dia, realizando a fagocitose das bactérias, corpos estranhos e direcionando o desenvolvimento de tecido de granulação (MANDELBAUM et al., 2003).

Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fase inflamatória conta com o importante papel da fibronectina sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, tendo por função realizar a aderência da fibrina ao colágeno, funcionando assim como um aderente para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes da matriz, (MANDELBAUM et al., 2003).

Dois grupos de células são importantes na fase inflamatória; uma delas são os neutrófilos que infiltram o local em grande número nas primeiras horas após a lesão, predominam no primeiro e segundo dia e desaparecem após 72 horas. Suas funções primárias são: a fagocitose (desbridamento inicial), liberação de seus grânulos para a rede de fibrina, provocando hidrólise enzimática da matriz extracelular, digestão dos tecidos desvitalizados e bactérias, de modo a promover limpeza da área lesada e possibilitar o início da fase seguinte (CONTRAN et al., 2000). Porém, se os leucócitos conseguirem em seis horas limpar a ferida, não haverá produção de piócitos, que são prejudiciais ao processo de cicatrização (KOOPMANN, 1993).

As outras células são os monócitos, que por sua vez são as segundas células a aparecer no local da lesão; marginalizam-se nos capilares e vênulas, migram através do endotélio e uma vez no local amadurecem e transformam-se em macrófagos. Estes são fundamentais para o

processo de cicatrização e sua depleção diminui a resposta reparadora. Estas células predominam entre o terceiro e o quinto dia após a lesão. Têm papel primordial na transição entre a fase inflamatória e a segunda fase. Auxiliam os neutrófilos na fagocitose de bactéria e restos celulares, também produzem e liberam fatores (monocinas) que controlam a formação do tecido de granulação; influenciam na angiogênese; estimulam a proliferação de células mesenquimais e proliferação de fibroblastos; produzem proteases que digerem a fibrina e o colágeno desvitalizado e remove os neutrófilos, dando lugar a proliferação celular (KOOPMANN, 1993).

Na fase proliferativa ocorre neoangiogênese, produção de colágeno pelos fibroblastos e intensa migração celular, principalmente de queratinócitos, promovendo a reepitelização. Inicialmente, a migração e ativação de fibroblastos são intensificadas em decorrência da liberação de mediadores liberados, principalmente, por macrófagos, destacando-se fatores de crescimento como o TGF- α (Fator de crescimento transformante-alfa) e o VEGF-A (Fator de crescimento vascular-endotelial-A). Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e elástico. Este processo é denominado de fibroplasia. Sua eficiência é dependente da ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, é necessária a neovascularização da região (HARTLAPP et al., 2001; KNIGHTON et al., 1981).

Com a angiogênese e a fibroplasia inicia-se a formação do tecido de granulação composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que estão suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipos I e II. Este tecido é edematoso e caracterizado pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos, os quais são extremamente exudativos e sangram com facilidade. Sob estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores, as células endoteliais do interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar collagenase e ativador do plasminogênio. Essas substâncias promovem aberturas na membrana basal que permitem a migração das células endoteliais que, atravessando a parede do vaso e utilizando como substrato a matriz extracelular provisoriamente produzida, seguem em direção à região da lesão (WERNER e GROSE, 2003). A própria natureza anatômica da ferida proporciona um estímulo para a migração e proliferação de fibroblastos, células epiteliais e queratinócitos a partir das suas margens, fenômeno este denominado de efeitos de vizinhança livre. As células epidérmicas

possuem potencial mitótico latente. Com a ocorrência de uma lesão, o mecanismo inibitório (inibição por contato) desaparece e as células entram em processo mitótico (MONTESANO e ORCI, 1988).

Ao final desta etapa, o leito da ferida está totalmente preenchido por tecido de granulação. A rede linfática passa por regeneração e a circulação é restabelecida por neovascularização. Lentamente, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas o que dá à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa (MONTESANO e ORCI, 1988).

Por último, na fase de maturação ou remodelação ocorre dois eventos bem nítidos: o primeiro corresponde à deposição, agrupamento e remodelação do colágeno, enquanto o segundo corresponde à regressão endotelial. Identifica-se, assim, um substrato histológico que caracteriza o tecido conectivo com fibrócitos, fibrilas colágenas e pequena quantidade de vasos sanguíneos. A remodelação da matriz e do colágeno inicia-se na formação do tecido de granulação e continua progressivamente, por meses após ter ocorrido a reepitelização. Há uma progressiva digestão do colágeno pela collagenase e outras proteases, produzidas localmente por macrófagos, neutrófilos e células epidérmicas e que atuam preferencialmente sobre as fibras de colágeno defeituosas (CONTRAN et al., 2000).

Nas cicatrizes cutâneas, a regressão endotelial pode ser confirmada pela observação da coloração local que, gradualmente, passa do rosado para o esbranquiçado em decorrência da redução da vasculatura do tecido conectivo. Nesta fase, ocorre uma diminuição progressiva dos vasos de neoformação, bem como dos elementos celulares, inclusive fibroblastos. O epitélio mono-estratificado transforma-se em pluri-estratificado. A diminuição de todos os elementos do tecido conectivo ocorre de maneira progressiva até a formação da cicatriz definitiva, constituída apenas por fibrilas colágenas (GRABB, 1992). O processo de remodelação é lento e a força tênsil que depende basicamente do colágeno leva tempo para se desenvolver. Duas semanas após a lesão, a cicatriz é frágil, tendo 5% da força normal, ocorrendo um aumento progressivo até um ano após a lesão, mas terá sempre, no máximo 80% da força tênsil normal (KOOPMANN, 1993).

2.5 Avaliação da segurança dos fitoterápicos de uso tópico: Resoluções vigentes no Brasil.

Produtos derivados de plantas são amplamente estudados quanto ao seu potencial terapêutico no tratamento de diversas patologias. No entanto, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear efeitos tóxicos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). A tradicionalidade do uso de plantas não é suficiente para validá-las cientificamente como medicamentos eficazes e seguros. Uma vez que, os produtos naturais, como produtos bioativos, sofrem biotransformação, o que pode promover o aparecimento de compostos potencialmente tóxicos ou induzir resposta inflamatória exacerbada, sendo necessário então comprovar sua eficácia e segurança a partir dos ensaios pré-clínicos, evitando assim danos ao organismo humano após sua utilização (CEVALLOS, 1996). Desta forma, a avaliação do binômio risco/benefício no emprego de toda e qualquer preparação farmacêutica (alopática, homeopática, fitoterápica) é um dos principais objetivos dos estudos farmacológicos e toxicológicos, pré-clínicos e clínicos (PONTE, 2003).

O processo legal da regulamentação e legislação das plantas medicinais difere de país a país (CALIXTO, 2000). No Brasil, o controle do uso de plantas com finalidade terapêutica foi regulamentada inicialmente, com a publicação da Portaria nº 06/1995 da Secretaria de Vigilância Sanitária (ANVISA). A partir desta publicação foi estipulado um prazo de cinco anos para sua implementação nos setores farmacêuticos, no que se refere à realização dos estudos toxicológicos e farmacológicos (segurança e/ou eficácia) das plantas medicinais e fitoterápicos. Contudo, muitas das normatizações referentes a tais estudos remetem a Resolução nº1/88 do Conselho Nacional de Saúde, no que concerne as doses utilizadas, vias de administração, duração dos estudos, espécies, sexo e quantidade de animais de experimentação utilizados (BRASIL, 1995).

Em virtude da necessidade de normatizar os estudos toxicológicos e de eficácia de produtos fitoterápicos, a ANVISA, através da Portaria no 116/96, elaborou um roteiro técnico de estudos toxicológicos pré-clínicos e clínicos, complementada novamente por preceitos gerais para estudos de eficácia terapêutica descrita na Resolução nº1/88 (BRASIL, 1996). Atualmente no Brasil está em vigor o *Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos* publicado na Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004). Neste guia encontram-se os principais testes (Quadro 1) a serem realizados para avaliar a segurança dos produtos fitoterápicos de acordo com as normas brasileiras. Vale

ressaltar que estes testes devem ser utilizados inclusive nos produtos de uso tópico, pois o emprego de uma substância de uso terapêutico ou não pode ser nociva quer pela ação direta, modificando qualquer das características normais da pele (pH, teor de gordura, grau de umidade, trocas gasosas) ou provocar irritação dérmica (lesões eczematizantes pela irritação direta), quer por mecanismos de sensibilização dérmica (eczemas de contato). E por fim através da absorção cutânea as substâncias podem atingir a circulação sistêmica, após atravessarem a epiderme e alcançarem os vasos sanguíneos da derme (SILVA, 2010).

A escolha dos modelos biológicos estão diretamente relacionados às características anatomo-fisiológica de cada modelo (animal), no qual se propõem avaliar a resposta toxicológica de um produto a ser testado. Desta forma, os ensaios de toxicidade pré-clínico são padronizados quanto à utilização de três espécies de mamíferos, sendo uma delas não roedora. Entre as espécies de roedores amplamente utilizados estão os camundongos e os ratos, por possuir características fisiológicas bem conhecidas e ciclo de vida relativamente curto, que favorece acompanhamento a identificação dos sinais de intoxicação (LAPA et al., 2000; LEON, 2005).

Na avaliação da irritação dérmica ou ocular o modelo biológico preconizado são os coelhos, além de atender a exigência de utilizar uma espécie não roedora, os coelhos apresentam como particularidade, a alta concentração de histamina nas plaquetas o que não é observado nos outros animais. Esta particularidade permite uma expressiva reatividade histaminérgica no local da aplicação com conseqüente aparecimento de eritema (HARKNESS e WAGNER, 1993; MONTENEGRO e FRANCO, 2004).

Os primeiros testes de sensibilidade dérmica foram descritos por Landsteiner e Di-Somma (1935), através do modelo de dermatite de contato intra-dérmica em cobaias, posteriormente sendo adaptado por Magnusson e Kligmann (1969), para modelo oclusivo. O modelo de sensibilização oclusiva possibilitou a verificação de resultados, semelhantes aos obtidos em teste de sensibilização em humanos. Caracterizando assim a cobaia como modelo ideal para a avaliação *in vivo* dos testes de sensibilização dérmica (MAGNUSSON e KLIGMANN, 1969; HARKNESS e WAGNER, 1993).

Quadro 1. Principais testes para avaliação da segurança de produtos fitoterápicos de uso tópico.						
TOXICIDADE AGUDA (BRASIL, 2004)						
Definição: Avalia a toxicidade após exposição à dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 h.						
Espécie animal	Sexo / Quantidade amostral	Grupos		Idade	Via de administração	Dose
Mamífero	♀ (6) e ♂ (6)	- Experimental - Controle referência (positivo) - Controle placebo (negativo)		Adulto jovem	A mesma proposta para o uso do produto	Suficiente para estimar efeitos e determinar DL ₅₀
Forma de avaliação: Sinais de toxicidade incluindo tempo de aparecimento e reversibilidade. Comportamento do animal e variação de peso e o consumo de alimentos.						
Período de observação: Nas primeiras 24h (0, 15, 30 e 60 minutos) e a cada 4 horas e diariamente durante 14 dias após administração. Ao final todos os animais sobreviventes devem ser sacrificados e autopsiados.						
TOXICIDADE EM DOSES REPETIDAS (BRASIL, 2004)						
Definição: Avalia a toxicidade após exposição a doses repetidas, as quais irão variar conforme o tempo de exposição (30 dias toxicidade sub-crônica) ou (90 dias toxicidade crônica)						
Espécie animal	Sexo / Quantidade amostral	Grupo	Idade	Via de administração	Dose	
Duas espécies de mamíferos: roedora e não-roedora	Roedora: ♀ (10) e ♂ (10)	Experimental	Adulto jovem	A mesma proposta para o uso do produto	Três doses Maior sem efeito deletério; Menor terapêutica; Média das duas anteriores	
	Não roedora: ♀ (3) e ♂ (3)					
Forma de avaliação: Alterações comportamentais, variação do peso corpóreo (semanal), o hemograma completo e análises da bioquímica sérica, exames macro e microscopicamente dos órgãos: fígado, rins, pulmão, coração, esôfago e estômago, intestinos, órgãos sexuais, pâncreas, adrenal, tireóide.						
SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA (BUEHLER, 1965; MAGNUSSON e KLIGMANN, 1969)						
Definição: São realizadas aplicações tópicas da menor dose não irritante por um período de 3 semanas (fase de indução). Após um período de repouso, procede-se à aplicação tópica da maior dose não irritante (fase de desafio).						
Espécie animal	Sexo / Quantidade amostral	Grupo	Idade	Via de administração	Dose	
Mamífero: Guinéa pig	Roedora: ♀ (6) e ♂ (6)	Experimental	Adulto jovem	Dérmica	Duas doses Maior sem efeito deletério; Menor dose terapêutica;	
IRRITAÇÃO DÉRMICA PRIMÁRIA (DRAIZE et al., 1944; DRAIZE, 1965)						
Definição: Consiste na aplicação única do produto a ser testado no dorso de coelhos. É aplicado um <i>patch</i> oclusivo por 4h e, após esse período o produto é retirado. Procede-se a graduação das lesões (eritema e edema), 24 e 72h após a aplicação.						
Espécie animal	Sexo / Quantidade amostral	Grupo	Idade	Via de administração	Dose	
Mamífero: Coelhos	Não-roedora: ♀ (3) e ♂ (3)	Experimental	Adulto jovem	Dérmica	Três doses Maior sem efeito deletério; Menor terapêutica; Média das duas anteriores	
IRRITAÇÃO OCULAR (KAY e CALÁNDRA, 1962; DRAIZE et al., 1965)						
Definição: Consiste na aplicação única do produto no saco conjuntival de coelhos, com observações da evolução das lesões em 24, 48, 72h e 7 dias após a instilação. São graduadas as alterações de conjuntiva (secreção, hiperemia e quimose), íris (irite) e córnea (densidade e área de opacidade).						
Espécie animal	Sexo / Quantidade amostral	Grupo	Idade	Via de administração	Dose	
Mamífero: Coelhos	Não-roedora: ♀ (3) e ♂ (3)	Experimental	Adulto jovem	Dérmica	Três doses Maior sem efeito deletério; Menor terapêutica; Média das duas anteriores	

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade dérmica e influência de uma Formulação Semi-Sólida do Óleo de Linhaça (*Linum usitatissimum* L.) FSSOL no processo de reparação tecidual de ferida excisional e incisional.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade dérmica aguda e determinar a DL₅₀ de uma FSSOL em camundongos Swiss;
- Avaliar a toxicidade dérmica sub-crônica de uma FSSOL em ratos Wistar;
- Avaliar a sensibilidade dérmica de uma FSSOL em cobaias *Cavia porcellus*;
- Avaliar a irritação dérmica e ocular de uma FSSOL em coelhos Nova Zelândia albino;
- Avaliar a atividade de uma FSSOL frente ao processo de reparação tecidual de ferida cutânea, excisionais e incisionais, em ratos Wistar.

4 Metodologia

4.1 Avaliação da toxicidade da formulação semi-sólida do óleo de linhaça

4.1.1 Formulação semi-sólida

A formulação semi-sólida, utilizando vaselina sólida como veículo, foi produzida a partir do óleo comercial, extraído por prensagem das sementes da linhaça (*L.usitatissimum*), sendo manipulada dentro dos padrões e controle de qualidade para medicamentos no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM) da Faculdade de Farmácia na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As concentrações utilizadas foram de 1%, 5%, 10% e 50%, além do óleo puro de linhaça. Como controle foi utilizado o veículo da formulação (vaselina sólida).

4.1.2 Toxicidade dérmica aguda

Foram utilizados 36 camundongos, machos e fêmeas, divididos aleatoriamente em seis grupos (n=6), cada animal foi mantido separadamente em gaiolas metabólicas, e tiveram 10% da região dorsal depilada (na linha mediana cervical), 24 horas antes do procedimento experimental. Decorrido o tempo, foi aplicado topicamente, na área depilada, 95 mg da formulação semi-sólida do óleo de linhaça (FSSOL) nas concentrações de (1%, 5%, 10% ou 50%) ou óleo de linhaça ou veículo, em cada animal de seus respectivos grupos. Seguida a aplicação os animais foram atentamente observados aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos e a cada 24 horas durante 14 dias. As observações incluíram a avaliação da pele e pêlo, olhos, salivação, tremores, convulsões, atividade motora, resposta a estímulos sensoriais, bem como outros sinais clínicos de toxicidade (MALONE, 1977) ou morte. Ao final do ensaio, os animais sobreviventes foram eutanasiados em câmara de CO₂ e examinados macroscopicamente quanto a possíveis alterações em suas vísceras (coração, pulmões, rins, fígado, estômago, ovários, úteros e testículos) (OECD - 402, 1987).

4.1.3 Toxicidade dérmica sub-crônica

Foram utilizados 40 ratos Wistar machos e fêmeas (200-250 g; n=10) divididos aleatoriamente em quatro grupos, cada animal foi mantido separadamente em gaiolas metabólicas, e tiveram 10% da região dorsal depilada (na linha mediana cervical). Três grupos

receberam diariamente, durante 35 dias na região depilada, a FSSOL (1%, 5% ou 10%), enquanto que o quarto grupo (controle) recebeu na mesma região e período, o veículo. Os animais foram diariamente observados para registro de possíveis alterações fisiológicas e/ou comportamentais ou morte. O peso corpóreo de todos os animais foi determinado antes do início do tratamento e semanalmente até a conclusão do mesmo. No final do experimento, amostras de sangue de todos os animais, submetidos a prévio jejum de 12 horas, foram coletadas através da punção do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro, para análise de variáveis hematológicas (hemograma completo) e bioquímicas. Finalizada a coleta de sangue, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as vísceras (fígado, coração, rins, baço, pulmões, testículos e útero) foram removidas, pesadas e examinadas macroscopicamente.

Os parâmetros hematológicos (eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito) e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta através do analisador automático de células hematológicas Couyer STKS. A contagem diferencial de leucócitos (neutrófilo, eosinófilo, basófilo, linfócitos e monócitos) foi realizada em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa.

Os parâmetros bioquímicos (gama-glutamiltanspeptidase, aminotransferases, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicérides, glicose, proteínas totais e bilirrubina) foram determinados com o auxílio do analisador automático Architect[®] com sistemas comerciais da Abbot.

4.1.4 Teste de irritação dérmica

Para a avaliação da irritação dérmica da FSSOL foram utilizados 24 coelhos albinos (Nova Zelândia) machos e fêmeas divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=6 animais/grupo), cada animal foi mantido separadamente em gaiolas. Para o ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Auletta (1995), cada animal teve duas áreas na região dorsal depilada (aproximadamente 6 cm²) uma para aplicação da FSSOL (lado direito), nas concentrações de 1%, 5%, 10% ou veículo, de acordo com o grupo pertencente, e na segunda área (lado esquerdo) nada foi aplicado permitindo assim que o animal fosse seu próprio controle. Quatro horas após a aplicação a área de teste foi examinada em intervalos de 1, 24,

48 e 72h, para avaliação da presença de eritema e/ou edema (mensuração da prega cutânea antes e após a aplicação com paquímetro digital) a partir de um sistema de escores concebido por Draize (1965): (0-não há edema ou eritema; 1-eritema ou edema perceptível; 2- eritema bem definido ou discreto edema; 3: eritema de moderada a severo ou edema moderado; 4: eritema ou edema severo). O índice de irritação primária (PII) foi calculado dividindo-se a soma dos escores de eritema e edema dos diferentes intervalos pelo o número de sítios teste (6) e multiplicando pelo número de intervalos de observação (4). A FSSOL foi, então, classificada como ligeiramente irritante (se $PII < 2$), moderadamente irritantes (se $2 \leq PII \leq 5$) ou irritante severo (se $PII > 5$) (OECD - 404, 2002).

4.1.5 Teste de irritação ocular

Foram utilizados 16 coelhos albinos (Nova Zelândia) machos e fêmeas divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=4 animais/grupo), cada animal foi mantido separadamente em gaiolas. Os animais receberam no saco conjuntival do olho direito, 0,1 ml (aproximadamente 94 mg) da FSSOL nas concentrações de 1%, 5%, 10% ou veículo, de acordo com o grupo pertencente, enquanto os olhos esquerdos não tratados funcionaram como controle. Após a administração ocular, os animais tiveram seus olhos cuidadosamente analisados nos seguintes intervalos de tempo 1, 24, 48, 72h para verificação de possíveis lesões a nível de córnea, conjuntiva e íris ou qualquer outra lesão ocular sendo classificada conforme tabela classificatória (0, 1, 2 e 3) descrita no OECD - 405 (2002).

4.1.6 Sensibilização dérmica

Conforme a metodologia descrita por Robson et al. (1990) foram utilizados doze cobaias (*Cavia porcellus*) albinas, adultas, machos e fêmeas, saudáveis, sem injúrias externas e sem alterações patológicas detectáveis, divididos aleatoriamente em dois grupos (n=6 animais/grupo), cada animal foi mantido separadamente em gaiolas de metabolismo. Na primeira fase (indução) os animais do grupo tratamento receberam durante três semanas uma aplicação por semana, na pele da região dorso previamente depilado, a FSSOL 1%. O grupo controle foi tratado da mesma forma. Duas semanas após a realização desse procedimento, os animais pertencentes ao grupo tratamento e controle receberam novamente uma aplicação dérmica (em região diferente daquela utilizada na fase de indução) sendo no grupo tratamento aplicada a FSSOL 10% e no grupo controle, o veículo (fase de estimulação). Vinte quatro

horas e quarenta e oito horas após a aplicação, as reações para edema e eritema foram analisadas conforme escala classificatória proposta por Magnusson e Kligmann (1969): 0 - nenhuma alteração visível, 1-eritema discreto ou irregular; 2- eritema moderado e confluyente; 3- eritema intenso e edema. Nesse teste, uma resposta de 15% ou mais no grupo estimulado quando comparado ao controle está no limiar para classificação como R43 (pode causar sensibilização dérmica em contato com a pele) (OECD – 406, 1992).

4.2 Avaliação da eficácia farmacológica da formulação semi-sólida do óleo de linhaça

4.2.1 Preparação da forma farmacêutica

A formulação semi-sólida, utilizando vaselina sólida como veículo, foi produzida a partir do óleo comercial, extraído por prensagem das sementes da linhaça (*L. usitatissimum*), sendo manipulada dentro dos padrões e controle de qualidade para medicamentos no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos da Faculdade de Farmácia na Universidade Federal de Pernambuco. As concentrações utilizadas foram de 1%, 5% e 10%, além do óleo puro de linhaça. Como controle negativo foi utilizado o veículo da formulação (vaselina sólida) e como positivo foi utilizado uma emulsão oleosa a base de óleo de girassol rica em AGE¹ (EOG).

4.2.2 Modelos biológicos

Foram utilizados 72 ratos Wistar, machos e fêmeas (200-300 g), provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos com seis animais cada e mantidos individualmente em gaiolas metabólicas de aço inoxidável, em ambiente a 22±2°C com ração e água *ad libitum*, a partir das 48 horas que antecedeu o procedimento cirúrgico para que ocorresse a adaptação. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética para experimentação animal processo nº23076007695/2009-19, da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

¹ Dersani[®] Emulsão oleosa a base de óleo de girassol rica em AGE (ácidos graxos essenciais) vitamina A e E

4.2.3 Modelo de ferida excisional

Foram utilizados 36 ratos Wistar os quais foram pesados e anestesiados com xilazina (3mg kg^{-1}) e cetamina (10mg kg^{-1}), por via intramuscular, (ANDRADE, 2002). Posteriormente foram posicionados em decúbito ventral. Em seguida realizada a tricotomia manual e antissepsia com álcool iodado 0,1%, na linha média dorsal da região cervical de cada animal, a área incidida foi demarcada usando caneta cirúrgica e molde metálico vazado ($\pm 78,5\text{ mm}^2$). No procedimento cirúrgico para retirada da pele, tecido subcutâneo, panículo carnoso e fáscia utilizou-se tesoura reta de íris e pinça de Adson. Após a incisão, foi suturado um aro de contenção confeccionado em silicone atóxico e hipoalergênico, utilizando-se seis pontos isolados simples com fio monofilamentoso de náilon 4.0 agulhado, distribuídos simetricamente (GALIANO et al., 2004), de modo que a ferida cirúrgica permanecesse no centro.

Após a cirurgia, os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos com seis animais cada um: Grupo I (FSSOL 1%); Grupo II (FSSOL 5%); Grupo III (FSSOL 10%); Grupo IV (óleo de linhaça); Grupo V (EOG – controle positivo) e Grupo VI (vaselina – controle negativo) em todos os grupos os respectivos produtos foram aplicados ($\pm 95\text{mg}$) diariamente, durante 14 dias, utilizando espátula metálica. No sétimo dia, as crostas das feridas de cada animal foram removidas para permitir a avaliação do tecido que se encontrava abaixo das mesmas e o valor real da área da ferida remanescente.

4.2.4 Análise macroscópica do fechamento da ferida

Para avaliar a contração das feridas tratadas com os diferentes produtos, as mesmas foram mensuradas diariamente utilizando um paquímetro digital (0-150 mm, Mitutoyo®). Utilizou-se a equação formulada por Prata et al. (1988), $A = \pi \cdot R \cdot r$, onde A representa a área (mm^2); “R”, o raio maior e “r”, o raio menor. As avaliações foram feitas pelo mesmo examinador, estando os animais em sob contensão física. As feridas foram avaliadas também quanto à presença de exsudato, formação de crosta, início da reepitelização e presença de fibrina (esfacelos).

4.2.5 Análise microscópica morfométrica

Ao final do 14º dia de tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 , em seguida foram mantidos em mesa cirúrgica para a coleta das lesões cutâneas. Todas as

amostras obtidas foram fixadas em formol tamponado a 10% por um período mínimo de 24 h, e posteriormente foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol, processados para inclusão em parafina pelos métodos de rotina, e cortados em micrótomo tipo Minot ajustado para 4µm. O material obtido foi colocado em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer.

Após a secagem, os cortes foram corados em hematoxilina-eosina - HE (LUNA, 1968) para observações da morfologia geral do tecido e tricrômico de Masson - TM (MICHALANY, 1980) para analisar a organização das fibrilas de colágeno da derme. As lâminas foram analisadas sob microscópio óptico, cinco imagens por campo (área de 0,0018mm²) foram capturadas com câmera digital (ampliação total de 400x) por uma câmera fotográfica acoplado ao microscópio óptico de luz e câmera Olympus® BX-49. As imagens foram arquivadas e submetidas à contagem de células inflamatórias, células fibroblástica, número de vasos sanguíneos e avaliação da densidade de colágeno de todas as lesões com auxílio de marcação digital (ROCHA et al., 2006; MIOT e BRIANEZI, 2010).

4.2.6 Modelo de ferida incisional

Foram utilizados 36 ratos Wistar os quais foram pesados e anestesiados com xilazina (3 mg kg⁻¹) e cetamina (10 mg kg⁻¹) por via intramuscular (ANDRADE, 2002). Posteriormente foram posicionados em decúbito ventral. Em seguida, foi realizada a tricotomia manual e antisepsia com álcool iodado 0,1%, na região da linha média dorsal. Posteriormente, realizou-se uma incisão utilizando lâmina de bisturi nº15, paralela a coluna vertebral de três centímetros de comprimento. O retalho cutâneo preestabelecido foi constituído pela pele, tecido subcutâneo, fáscia superficial até atingir o panículo carnososo. O local foi dissecado com dissecção romba para deslocamento do plano músculo-aponeurótico adjacente, em seguida reposicionado e suturado com dois pontos simples interrompido utilizando fio monofilamentoso de náilon 4.0 agulhado (EHRLICH e HUNT et al., 1968). Após a cirurgia, os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos com seis animais cada um: Grupo I (FSSOL 1%); Grupo II (FSSOL 5%); Grupo III (FSSOL 10%); Grupo IV (óleo de linhaça); Grupo V (EOG – controle positivo) e Grupo VI (vaselina sólida – controle negativo) em todos os grupos os respectivos produtos foram aplicados (±95mg) diariamente durante 10 dias. As suturas foram removidas no oitavo dia e as feridas continuaram a ser tratadas até a avaliação da resistência da pele no 10º dia. Para tal avaliação os animais foram

eutanasiados em câmara de CO₂ e a pele do local da ferida foi removida e avaliada quanto à resistência em máquina universal de ensaio mecânico (Máquina Universal de ensaio mecânico, modelo DL2000, EMIC[®] Trd 24 capacidade para 5kgf), com garras de pressão ajustável manualmente e sistema eletrônico de aquisição de dados computadorizado (URDIALES, 2006).

4.2.7 Análise Estatística

As variáveis quantitativas (área das feridas, células inflamatórias, células fibroblásticas, número de vasos sanguíneos, densidade de colágeno e força de tensão da pele) e as variáveis qualitativas (presença de crosta, presença de exudato e presença de tecido de reepitelização), foram expressas por média $\pm$ desvio padrão e submetidas a ANOVA uma via (variáveis qualitativa) ou duas vias (variáveis quantitativa) seguidas de pós teste *Bonferroni* comparando os grupos tratamentos FSSOL (1%, 5% ou 10%) ou óleo de linhaça aos controles vaselina e EOG, considerando-se significativo os valores de ($p < 0,05$). Os dados foram analisados pelo programa Graph Pad versão Instant 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

4 REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinário**. São Paulo: Roca; 2002. 697 p.
- ARTECHE-GARCÍA A. Y col.: **Fitoterapia: Vademecum de prescripción**. Cita S. A. 2ª Ed. Barcelona, 1994.
- AULETTA, C.S. **Acute, subchronic, and chronic toxicology**. In: DERELANKO MJ, HOLLINGER MJ, Handbook of Toxicology. CRC Press Inc., London, 1995, p. 51–162.
- BOMBO, A.J. **Obtenção e caracterização nutricional de snacks de milho (*Zea mays* L.) e linhaça (*Linum usitatissimum* L.)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- BRASIL 1995. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. *Portaria nº 6/95 de 31/01/1995. Normatização de registro de fitoterápicos*. Diário Oficial da União, Brasília.
- BRASIL 1996. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 116 de 08 de agosto. **Norma para Estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos**.
- BRASIL 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº90, de 16 de março. **Guia para realização de estudos de toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos**.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Formulário nacional da farmacopéia brasileira**. Brasília: ANVISA, 2005.
- BUEHLER, E. V. Delayed contact hypersensitivity in the guinea pig. **Arch Dermatol**. v.91, p.171-77, 1965.
- BURR, G.O. ; BURR, M.M. On the nature and role of the effect of the fatty acids essential in nutrition. **J Biol Chem** v.86, p.587-621, 1930.
- BURR, G.O.; BURR, M.M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. **J Biol Chem** v.32, p.345-367, 1929.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.179-89, 2000.
- CARDOSO, C.R.B. et al. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound Repair Regener**, v.12, n.2, p.235-243, 2004.

CARMO, M.C.N.S.; CORREIA, M.I.T.D. A importância dos ácidos graxos ômega-3 no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n.3, p.279-287, 2009.

CEVALLOS, G.C. Estudios de toxicologia pré-clínica para nuevos fármacos. **Archivos de Neurociências**, v.1, n.2, p.118-21, 1996.

CHOO, W.S.; BIRCH, J.; DUFOUR, J.P. Physicochemical and quality characteristics of coldpressed flaxseed oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.3, p.202-211, 2007.

CLARK, R.A. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. **Am. J. Med. Sci.**, v. 306, p. 42-48, 1993.

COLPO, E. et al. Benefícios do uso da semente de linhaça. **Nutrição em Pauta**, n.81, p.25-28, 2006.

CONTRAN, R S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.44-100, 2001.

CORDEIRO, R.; FERNANDES, P.L.; BARBOSA, L.A. Semente de linhaça e o efeito de seus compostos sobre as células mamárias. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.3, p.727-732, 2009.

D'AGOSTINI, D. **Obtenção de lipídios estruturados por intereterificação de triacilglicerois de cadeia média e longa**. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2001.

DANTAS, S.R.P.E; JORGE, S.A. **Abordagem Multiprofissional de Tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2003.

DATTA, H.S.; MITRA, S.K.; PATWARDHAN, B. Wound Healing Activity of Topical Application Forms Based on Ayurveda. **Ecam**, v.27, p.1-10, 2009.

DERVICHIAN, D.G. The surface properties of fatty acid and allied substances. In: HOLMAN, R.T.; LUNDBERG, W.A.; MALKIN, T. **Chemistry of fats and other lipids**. London: Academic Press, v.2, p.193-242, 1954.

DRAIZE, J. H. Appraisal of the safety of chemicals. **Foods, drugs and cosmetics**, OECD 404, p.46-49, 1965.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.82, p.377-390. 1944.

EHRLICH, H.P.; HUNT, T.K. Effect of cortisone and vitamin A on wound healing. **Ann Surg.** 1968; 167: 324–8.

FILISSETTI, T.M.C.C.; LOBO, A.R. Fibra alimentar e seu efeito na biodisponibilidade de minerais, cap. 7, p. 175-215. In: COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2. ed., Barueri: Manole Ltda, 2007.

GALIANO, R.D., JOSEPH-MICHAELS, V., DOBRYANSKY, M., LEVINE, J. P., GURTNER, G.C. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair Regen** 2004; 12(4): 485-92.

GONÇALVES, G.; PARIZOTO, N. Fisiopatologia da recuperação cutânea: atuação da fisioterapia. **Ver. Brás. Fisiot.** v.3, n.1, p.5-13, 1998.

GRABB, S. **Plastic surgery**: Saunders. 1992.

HARKNESS, J.E.; WAGNER, J.E. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. In: Biologia e manejo. 3.ed, São Paulo: ROCA, p.9-27, 1993.

HARTLAPP, I. et al., Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. **FASEB J**, v.15, n.12, p.2215-2224, 2001.

HATANAKA, E.; CURI, R. Fatty acids and wound healing: a review. **Rev Bras Farm**, v.88, n.2, p.53-58, 2007.

KAY, J. H.; CALANDRA, J. C. Interpretation of eye irritation tests. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v.13, p.281-289. 1962.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Toxicologia**: a ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull. 5.ed. Lisboa: McGraw-Hill de Portugal, 2001. 280 p.

KNIGHTON, D.R., SILVER, I.A.; HUNT, T.K. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery** v.90, n.2, p.262-270, 1981.

KODICEK, E. **The effect of unsaturated fatty acids, of vitamin D and other steroids on gram-positive bacteria**. In: POPJAK, G.Le Breton E. Biochem. Probi. Lipids. London: Butterworths, p.401-406, 1956.

KOOPMANN, JR.C. Wound healing: a review of factors affecting wound repair. **Otolaryngology**. Lippincot, 1993.

LANDSTEINER, K.M.D.; DI-SOMMA, A.A. Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. **J. Exp. Med.**, n.61, p.505-512, 1935.

- LAPA, A.J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M.T., GODINHO, R.O., LIMA, T.C.M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O.(org). **Farmacologia da planta ao medicamento**. 2. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2000. p. 181-196.
- LEON, L.R. The use of gene knockout mice in thermoregulation studies. **J Therm Biol**, v.30, p.273-288, 2005.
- LUNA, L.G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3a ed. New York: McGraw-Hill; 1968. 258 p.
- MAGNUSSON, B., KLIGMANN, A. M. The identification of contact allergens by animal assay. **J. Invest. Dermatol.** v.52, n.3, p.268-276, 1969.
- MALONE, R.A. Pharmacological Approach to Natural Products Screening and Evaluation. In: Warner H, Wolf P, New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, **Biological for Therapeutically Activity**. Springer – Verlag: Berlim, 1977, 24-53p.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-parte I. **Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v.78, n.4, p.393-408, 2003.
- MANHEZI, A.C.; BACHION, M.M.; PEREIRA, A.L. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. **Rev Bras Enferm**, v.61, n.5, p.620-629, 2008.
- MARQUES, A.C. **Propriedades funcionais da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) em diferentes condições de preparo e de uso em alimentos**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio Grande do Sul, 2008
- MARQUES, S.R. et al. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. **Acta Cirur Bras**, v.19, n.3, p.196-209, 2004.
- MARTIN, C.A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados omega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.6, p.761-770, 2006.
- MEAD, J.F. et al. **Chemistry, bichemistry and nutrition**. Plenum Press, New York, p.132-147, 1986.
- MELLEGA, J. **Cirurgia Plástica Reparadora e Estética**. 2 ed., Rio de Janeiro: Medsi Editora, 1992.
- MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 1a ed. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária Ltda; 1980. 277 p.

MINAZZI-RODRIGUES, R.S.; PENTEADO, M.V.C.; MANCINI-FILHO, J. Importância dos óleos de peixe em nutrição e fisiologia humana. **Cad Nutrição** v.3, 1991.

MIOT, H.A., BRIANEZI, G. Morphometric analysis of dermal collagen by color clusters segmentation. **An Bras Dermatol.** v.85, n.3, p.361-364, 2010.

MOCH, D. et al. The linoleic acid metabolite 9Ds-hydroxy-10,12(E,Z)-octadecadienoic acid is a strong proinflammatory mediator in an experimental wound healing model of the rat. **Biomed Biochim Acta**, v.49, n.4, p.201-207, 1990.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia processos gerais**. In: NETTO-BARRETO, M., SANTOS, J.L., MONTENEGRO, M.R. Perturbações circulatórias. 4ªed. São Paulo: Atheneu, p. 95-107, 2004.

MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor b stimulates collagenmatrix contraction by fibroblasts: imolications for wound healing. **Prc Nati Acad Sci**, v.85, n.13, p. 4894-4897, 1988.

NESBITT, P.D.; THOMPSON, L.U. Lignans in homemade and commercial products containing flaxseed. **Nutr Câncer**, v.29, p.222-227, 1997

OECD (Organization for economic co-operation and development) 1987. **Guideline for Testing of Chemicals: Cute Derml Toxicity**. Guideline: 402. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740201e.pdf?expires=1292260727&id=0000&accn=freeContent&checksum=FFE50787ABC6877F92A174AAC758F402>. Acesso em: 15 nov. 2010.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2002. **Guideline for Testing of Chemicals: Cute Derml Irrittion/Corrosion**. Guideline: 404. [http://www.wam.go.jp/wamappl/bb11GS20.nsf/0/49256fe9001b533f49256f250024d53e/\\$FILE/9_sankou3_2.pdf](http://www.wam.go.jp/wamappl/bb11GS20.nsf/0/49256fe9001b533f49256f250024d53e/$FILE/9_sankou3_2.pdf). Acesso em: 15 nov. 2010.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2002. **Guideline for Testing of Chemicals: Cute Eye Irrittion/Corrosion**. Guideline: 405. <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg405.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2010.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2002. **Guideline for Testing of Chemicals: Skin Sensitisation**. Guideline: 406. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740601e.pdf?expires=1292261624&id=0000&accn>

ame=freeContent&checksum=B0497FBBAAA43F5CC97C9571DDE7810A. Acesso em: 15 nov. 2010.

OOMAH, B.D.; MAZZA, G. **Productos de linaza para la prevención de enfermedades**. In: MAZZA, G. (Coord.). Alimentos funcionales: aspectos bioquímicos y de procesado, Zaragoza: Acribia, p.457, 2000.

ORYAN, A.; ZAKER, S.R. Effects of topical appication of honey ou cutaneous wound healing in rabbits. **Zentralbl Veterinarmed A**, v.45, n. 3, p.181-188, 1998.

OTRANTO, M.; NASCIMENTO, A.P.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Effects of supplementation with different edible oils on cutaneous wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.18, p.629–636, 2010.

PRATA, M.B., HADDAD, C.M., GOLDENBERG, S., SIMÕES, M.J., MOURA, L.A.R., TRABULSI, L.R. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirur Bras**, v.3, n.2, p.43-48, 1988.

PINHEIRO, J.R. et al. Uso oral do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*) no tratamento do olho seco de pacientes portadores da síndrome de Sjög'ren. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.70, n.4, p.649-655, 2007.

POLETTI, N.A.A. **O cuidado de enfermagem a pacientes com feridas crônicas: a busca de evidências para a prática**. 2000. 269 f. Dissertação (Mestrado) Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

PONTE, F.L.R. **Toxicidade pré-clínica de fitoterápicos à base de mel de abelha própolis e extratos de Mikania glomerata, Eucalyptus globulus ou da associação Zingiber officinale e Allium sativum em roedores**. 2003. 76p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós Graduação em Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ROCHA, JÚNIOR. A.M., OLIVEIRA, R.G., FARIAS, L.C.R., ANDRADE, L.C.R., AARESTRUP, F.M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. **An Bras Derm**, v.81, p.150-156, 2006.

ROBSON MK, NUSAIR TL, FLETCHER ER, HITZ HL. A review of the Buehler guinea pig skin sensitization test and its use in a risk assesement process for human skin sensitization. **Toxicological sciences**, n.6, p.191-107, 1990.

RUIZ-ROSO, B; PÉRES-OLLEROS, L; GARCÍA-CUEVAS, M. Influencia de la fibra dietaria (FD) em la biodisponibilidad de los nutrients, cap. 26, p. 345-370. In: LAJOLO, F M et al. **Fibra dietética en iberoamérica: tecnología y salud**. São Paulo: Varela Ltda, 2001, 472p.

SILVEIRA, L.; RAISER, A. G. Controle microbiológico dos efeitos in vivo de duas apresentações de própolis em feridas contaminadas de cães. **Veterinária Notícias**, v.1, n.1, p.11-17, 1995.

SIMOPOULOS, A.P. The omega-6/omega-3 fatty acids ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.17, p131-134, 2008.

TARPILA, A.; WENNERBERG, T.; TARPILA, S. Flaxseed as a functional food. **Current Topics in Nutraceutical Research**, v.3, n.3, p.167-188, 2005.

TIAGO, F. **Feridas: etiologia e tratamento**. Ribeirão Preto, 2a. edição, 1995.

TRABER, M.G.; PACKER, L. Vitamin E: beyond antioxidant function. In: SIDEROVA, V.S.; CARPENTIER, Y.A. **Vitamina E em pacientes que recebem nutrição parenteral total (NPT): necessidade de um suplemento de alfa-tocoferol**. [S.I.: s.n.], 1998. (Medicine in Focus, 3).

TUROLLA, M.S., NASCIMENTO, E.S. Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** n.42, v.2, 289-306, 2006.

URDIALES, A.I.A. **Ocreotide na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos** **Dissertação** [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Departamento de Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde; 2006.

WEISSMAN, G. **Inflammation: Historical perspectives**. In: Gallin, J.I., et al. (eds.): **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**, 2 ed. New York, Raven Press, p 5-13, 1992.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev** v.83, n.3, p.835-870, 2003.

WIESENFELD, P.W. et al. Flaxseed increased Y-linolenic and eicosapentaenoic acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dams and offspring. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, n.6, p.841-855, 2003.

YOSHIARA, L.Y. **Efeito do método de cocção sobre o teor de ômega 3 em pescado.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2007.

YOU DIM, K.A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J.A. **Essential fatty acids and the brain: possible health implications.** International Journal of Developmental Neuroscience, v.1, n.4, p.386-399, 2006.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo I

Avaliação da toxicidade e sensibilidade dérmica de uma formulação semi-sólida do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum* L. Linaceae)

FRANCO, E.S.¹, AQUINO, C.M.F.¹, BRASILEIRO, C.F.¹, OLIVEIRA, A.P.¹,
GÓES, A.J.S.², MAIA, M.B.S.^{1*}

¹Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil.

²Laboratório de Síntese de Substâncias de Interesse Terapêutico do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, CEP: 50670-901, Recife-PE, Brasil.

*Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos - Avenida Professor Moraes Rêgo, S/N, Cidade Universitária, CEP: 50670-901, Recife-PE. Tel.: (81) 2126 8530, mbsm@ufpe.br

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade dérmica de uma Formulação Semi-Sólida do Óleo de Linhaça (*Linum usitatissimum* L.) FSSOL (1%, 5%, 10% ou 50%) ou óleo de linhaça, utilizando os protocolos 402 em camundongo Swiss (n=6); 404 em coelhos albinos (n=4); 405 em coelhos albinos (n=4) e 406 em guinea pig (n=6), publicados pela *Organization for Economic Co-operation and Development* OECD e toxicidade dérmica sub-crônica em ratos Wistar (n=10) segundo o *Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de*

fitoterápicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Os resultados obtidos revelam que a FSSOL, nas concentrações e via administrada, não apresentaram toxicidade (dérmica e ocular) ou sensibilização dérmica, nos modelos animais utilizando.

Palavras-chaves: Toxicidade dérmica, Óleo de linhaça, Medicina tradicional.

Evaluation of toxicity and skin sensitivity of a semisolid formulation of linseed (*Linum usitatissimum* L. Linaceae)

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the dermal toxicity of a Semi-Solid Formulation of Linseed Oil (*Linum usitatissimum* L.) SSFLO (1%, 5%, 10% or 50%) or linseed oil, using the protocols 402 in Swiss mice (n=6); 404 in albino rabbits (n=4); 405 in albino rabbits (n=4) and 406 in guinea pig (n=6), published by the Organization for Economic Co-operation and Development OECD and sub-chronic dermal toxicity in Wistar rats (n=10) according to the *Guide to the studies of pre-clinical toxicity of herbal medicines* from the National Agency for Sanitary Surveillance. The results show that SSFLO, on the administered via and concentrations showed no toxicity (dermal or ocular) or dermal sensitization in used animal models.

Keywords: dermal toxicity, linseed oil, traditional medicine.

INTRODUÇÃO

Produtos derivados de plantas são amplamente estudados quanto ao seu potencial terapêutico no tratamento de diversas patologias. No entanto, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear efeitos

tóxicos (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006). Desta forma, a avaliação do binômio risco/benefício no emprego de toda e qualquer preparação farmacêutica (alopática, homeopática, fitoterápica) é um dos principais objetivos dos estudos farmacológicos e toxicológicos, pré-clínicos e clínicos (PONTE, 2003). A tradicionalidade do uso de plantas não é suficiente para validá-las cientificamente como medicamentos eficazes e seguros. Uma vez que, os produtos naturais como produto bioativo, sofrem biotransformação, o que pode promover o aparecimento de compostos potencialmente tóxicos ou sensibilizantes, sendo necessário então comprovar sua eficácia e segurança a partir dos ensaios pré-clínicos, evitando assim danos ao organismo humano após sua utilização (CEVALLOS, 1996).

Os processos legais da regulamentação e legislação das plantas medicinais diferem de país a país (CALIXTO, 2000). No Brasil, o controle do uso de plantas com finalidade terapêutica foi regulamentada inicialmente, com a publicação da Portaria nº 06/1995 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A partir desta publicação foi estipulado um prazo de cinco anos para sua implementação nos setores farmacêuticos, no que se refere à realização dos estudos toxicológicos e farmacológicos (segurança e/ou eficácia) das plantas medicinais e fitoterápicos. Contudo, muitas das normatizações referentes a tais estudos remetem a Resolução nº1/88 do Conselho Nacional de Saúde, no que concerne as doses utilizadas, vias de administração, duração dos estudos, espécies, sexo e quantidade de animais de experimentação utilizados (BRASIL, 1995).

Em virtude da necessidade de normatizar os estudos toxicológicos e de eficácia de produtos fitoterápicos, a ANVISA, através da Portaria no 116/96, elaborou um roteiro técnico de estudos toxicológicos pré-clínicos e clínicos,

complementado pelos estudos de eficácia terapêutica descrita na Resolução nº1/88 (BRASIL, 1996). Entretanto, atualmente no Brasil está em vigor o *Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos* publicado na Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004).

Realmente, é inegável que os produtos de origem natural formam uma importante categoria de ativos para cosmeceuticos e fitoterápicos encontrados hoje no mercado. Os produtos são obtidos de folhas, raízes, frutos, sementes, caules, cascas e flores, e podem ser facilmente adicionados a sabonetes, hidratantes, cremes de tratamento, cosméticos coloridos e máscaras faciais (DRAELOS, 2005), na maioria dos casos respaldados no conhecimento popular. Estes fatos justificam a necessidade de maior atenção dos órgãos competentes no que concerne a fiscalização destes produtos, os quais em sua maioria não dispõem de informações adequadas sobre a sua segurança, eficácia, testes físico-químicos e microbiológicos e muito menos estudos de estabilidade, quando todos estes parâmetros são fundamentais para promover e garantir um produto final inócuo e de qualidade à saúde humana (SILVA et al., 2005).

Muitas das espécies vegetais atualmente utilizadas, com base no conhecimento tradicional, respaldado pela medicina tradicional indiana, entre outras culturas, ainda necessitam passar por testes de segurança preconizados pela RE nº90. Dentre estas espécies encontra-se o *Linum usitatissimum* L. pertencente à família Linaceae, popularmente conhecida como linhaça, cujo óleo extraído das suas sementes é comprovadamente um dos óleos de origem vegetal mais rico em ácidos graxos essenciais com 56,6% de ácido linolênico (ω -3 [C18: 3cis 9,12,15]) e 13,2% de ácido linoléico (ω -6 [C18:2 cis 9,12]), além do ácido graxo oléico com 17,8% (ω -9

[C18:1 cis9]) (OTRANTO et al., 2010). O óleo de linhaça está presente no formulário nacional da Farmacopéia Brasileira na forma de linimento óleo calcáreo cuja indicação de uso é para os casos de dermatoses pruriginosas e queimaduras (BRASIL, 2005). Segundo a medicina chinesa e a medicina “Ayurveda” o óleo de linhaça possui indicações para o tratamento de feridas, como hidratante e antioxidante dérmico entre outros (DATTAL et al., 2009).

Objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade dérmica e sensibilidade pré-clínica de uma formulação semi-sólida do óleo de linhaça *Linum usitatissimum* L. em modelos animais (roedores e não roedores).

MATERIAL E MÉTODOS

Modelos experimentais: Para a realização do experimento foram utilizados ratos da linhagem Wistar (200-250g) e camundongos albinos Swiss (25-30g) machos e fêmeas, provenientes respectivamente do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (CCB/UFPE) e do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). Os animais receberam água e dieta (Labina[®]) *ad libitum*. Cobaias (*Cavia porcellus*) (350-450g) e coelhos albinos Nova Zelândia (500-900g) machos e fêmeas, proveniente da associação de cunicultores do Recife – PE. Antes dos procedimentos experimentais os animais foram mantidos em observação durante 15 dias para aclimação e verificação do estado de saúde, acondicionados individualmente em gaiolas no biotério do Departamento de Bioquímica (CCB/UFPE) tendo livre acesso à ração (Purina[®]) e água potável. O manejo e cuidado com os animais seguiram os princípios éticos da experimentação

animal segundo os critérios estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Criação de Animais de Laboratório – SBCAL tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob o nº protocolo 23076.007695/2009-19.

Formulação semi-sólida de óleo de linhaça (FSSOL):

A FSSOL foi produzida a partir do óleo comercial, extraído a frio por prensagem das sementes da linhaça (*L. usitatissimum*), utilizando como veículo a vaselina sólida. A FSSOL (1%, 5%, 10% e 50%) foi manipulada dentro dos padrões e controle de qualidade para medicamentos no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos da Faculdade de Farmácia na Universidade Federal de Pernambuco. Foi utilizado também o óleo de linhaça puro e como controle foi utilizado o veículo da formulação (vaselina sólida)

Toxicidade dérmica aguda: 36 camundongos Swiss (machos e fêmeas; (n=6animais/grupo) foram mantidos separadamente em gaiolas metabólicas, e tiveram 10% da região dorsal depilada (na linha mediana cervical), 24 horas antes do procedimento experimental. Decorrido esse tempo, foi aplicado topicamente 95 mg da FSSOL (1%, 5%, 10% ou 50%) ou óleo de linhaça ou veículo (controle), em cada animal de seus respectivos grupos, na área depilada. Em seguida, os animais foram atentamente observados aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos e a cada 24 horas durante 14 dias. As observações incluíram a avaliação da pele e pêlo, olhos, salivação, tremores, convulsões, atividade motora, resposta a estímulos sensoriais, bem como outros sinais clínicos de toxicidade (MALONE, 1977) ou morte. Ao final

do ensaio, os animais sobreviventes foram eutanasiados em câmara de CO₂ e examinados macroscopicamente quanto a possíveis alterações em suas vísceras (coração, pulmões, rins, fígado, estômago, ovários, úteros e testículos) (OECD - 402, 1987).

Toxicidade dérmica sub-crônica: 40 ratos Wistar (machos e fêmeas; n=10 animais/grupo) foram mantidos separadamente em gaiolas de metabólicas, e tiveram 10% da região dorsal depilada (na linha mediana cervical). Três grupos receberam diariamente, durante 35 dias na região depilada, a FSSOL (1%, 5% ou 10%), enquanto que o quarto grupo (controle) recebeu o veículo. Os animais foram diariamente observados para registro de possíveis alterações fisiológicas e/ou comportamentais ou morte. O peso corpóreo de todos os animais foi determinado antes do início do tratamento e semanalmente até a conclusão do mesmo. No final do experimento, amostra de sangue de cada animal, submetido a prévio jejum de 12 horas, foi coletada através da punção do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro, para análise de variáveis hematológicas (hemograma completo) e bioquímicas. Finalizada a coleta os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as vísceras (fígado, coração, rins, baço, pulmões, testículos e útero) foram removidas, pesadas e examinadas macroscopicamente.

Os parâmetros hematológicos (eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito) e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta através do analisador automático de células hematológicas Couyer STKS. A contagem

diferencial de leucócitos (neutrófilo, eosinófilo, basófilo, linfócitos e monócitos) foi realizada em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa.

Os parâmetros bioquímicos (gama-glutamiltanspeptidase, aminotransferases, fosfatase alcalina, uréia, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicérides, glicose, proteínas totais e bilirrubina) foram determinados com o auxílio do analisador automático Architect® com sistemas comerciais da Abbot.

Teste de irritação dérmica: 16 coelhos Nova Zelândia albino (machos e fêmeas), foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=4 animais/grupo), sendo mantidos em gaiolas separadas. Cada animal teve duas áreas na região dorsal depilada (aproximadamente 6 cm²) uma para aplicação da FSSOL (lado direito), nas concentrações de 1%, 5%, 10% ou veículo, de acordo com o grupo pertencente. Na área oposta (lado esquerdo) nada foi aplicado permitindo assim que o animal fosse seu próprio controle (AULETTA, 1995). Quatro horas após a aplicação a área de teste foi examinada em intervalos de 1, 24, 48 e 72h, para avaliação da presença de eritema e/ou edema a partir de um sistema de escores concebido por Draize (1959) e a partir desde calculado o índice de irritação primária. Que possibilitou classificar a FSSOL como não irritante, ligeiramente irritante, moderadamente irritante ou irritante severo (OECD - 404, 2002).

Teste de irritação ocular: 16 coelhos Nova Zelândia albino (machos e fêmeas), foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=4 animais/grupo) e mantidos em gaiolas separadas. Cada animal recebeu no saco conjuntival do olho direito, 94mg da FSSOL (1%, 5% ou 10%) ou veículo (controle) enquanto o olho

esquerdo não tratado funcionou como controle. Após a administração ocular, os animais tiveram seus olhos cuidadosamente analisados nos seguintes intervalos de tempo 1, 24, 48, 72h para verificação de possíveis lesões em nível de córnea, conjuntiva e íris ou qualquer outra lesão ocular, possibilitando classificar a FSSOL como não irritante, ligeiramente irritante, moderadamente irritante ou irritante severo (OECD - 405, 2002).

Sensibilização dérmica: 12 cobaias albinas, adultas (machos e fêmeas), foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=6 animais/grupo), cada animal foi mantido em gaiola separada. Na primeira fase (indução) os animais do grupo tratamento receberam durante três semanas uma aplicação por semana, na pele da região dorso previamente depilado, a FSSOL 1%. O grupo controle foi tratado com o veículo. Duas semanas após a realização desse procedimento, os animais pertencentes ao grupo tratamento e controle receberam novamente uma aplicação dérmica (em região diferente daquela utilizada na fase de indução) sendo no grupo tratamento aplicada a FSSOL 10% e no grupo controle, novamente o veículo (fase de estimulação). Sendo então avaliados 24 e 48 horas após a aplicação, quanta a presença de edema e eritema conforme escala classificatória proposta por Magnusson & Kligmann (1969), possibilitando classificar a FSSOL como sensibilizante ou não sensibilizante dérmico (ROBSON et al., 1990; OECD – 406, 1992).

Análise estatística: Os resultados quantitativos, obtidos, foram expressos por média $\pm$ erro padrão da média, submetidos à ANOVA duas vias, ($p < 0,05$) e pós teste

Boferroni, uma vez que se comparou os grupos tratamentos ao controle de forma isolada, considerando-se o sexo. Nas análises, foi utilizado o Programa GraphPad Prism[®] versão 5.0, 2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento agudo dos camundongos utilizando a FSSOL nas diferentes concentrações, por via dérmica, não afetou a integridade dermoepitelial nem provocou óbitos nos mesmos. A nível sistêmico, utilizando como parâmetro a avaliação macroscópica dos órgãos vitais, não foi observado indício de danos nos órgãos dos animais dos diferentes grupos tratamento quando comparados com o controle. Os testes que avaliam a toxicidade aguda são utilizados para classificar e rotular substâncias de acordo com o seu potencial de toxicidade ou letalidade (VALADARES, 2006). Os resultados obtidos no teste de toxicidade dérmica aguda permitem inferir a respeito das concentrações seguras do produto a serem avaliadas em testes de toxicidade adicinais. Uma vez que, a ocorrência de óbitos neste ensaio durante às 72 horas iniciais são utilizados para determinar a DL₅₀ (BRASIL, 2004), que corresponde ao valor de letalidade de 50% da população exposta ao produto testado.

Para a obtenção dos resultados deste experimento, adotou-se protocolos internacionalmente aceitos, como os publicados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development-OECD*), de forma que poderão ser considerados válidos pelas agências regulatórias dos países. No presente estudo, adotou-se o Guia OECD 402 (OECD - 402 1987), que apresentou uma boa reprodutibilidade, utilizando-se de

poucos animais sendo capaz de classificar a FSSOL em inócua quando aplicada por via dérmica, de forma aguda em camundongos.

A Resolução nº1/88 define como ensaio de toxicidade sub-crônica, aquele cujo período de administração decorre em no mínimo de 30 dias consecutivos, sendo a via utilizada aquela preconizada para a administração em humanos (BRASIL, 1996). Pode-se observar que a aplicação tópica durante 35 dias da FSSOL nas diferentes concentrações não afetou a ingestão de água ou alimentos, nem causou reações clínicas significativas como: prurido intenso, edema, eritema, diarreia, vômitos, mudanças de comportamento, ou mortes. As médias do peso corporal dos animais, machos e fêmeas, dos grupos tratamentos não apresentaram diferença estatisticamente significante quando comparado ao controle (Figura 1 a e b).

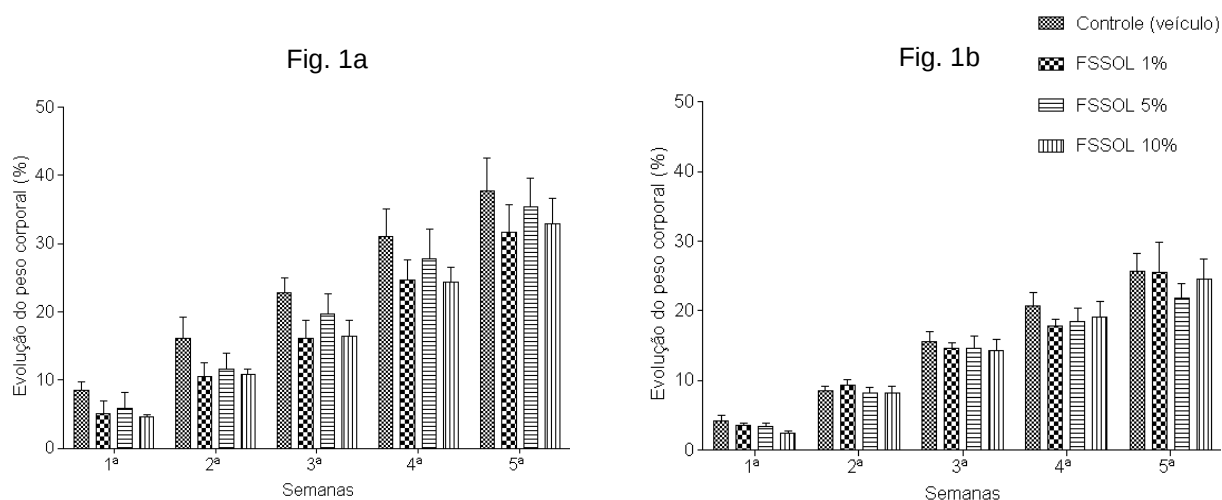


FIGURA 1 – Evolução do peso corporal dos ratos Wistar (machos fig.1a (n=5) e fêmeas fig.1b (n=5)), tratados com a FSSOL (1%, 5% ou 10%) ou controle (veículo), por via dérmica durante cinco semanas. Valores submetidos à ANOVA duas vias com pós-teste Boferroni significância *(p<0,05).

A avaliação macroscópica e peso dos órgãos vitais (g/100g de peso dos animais) dos grupos tratamentos não diferenciaram estatisticamente do controle (Figura 2 a e b).

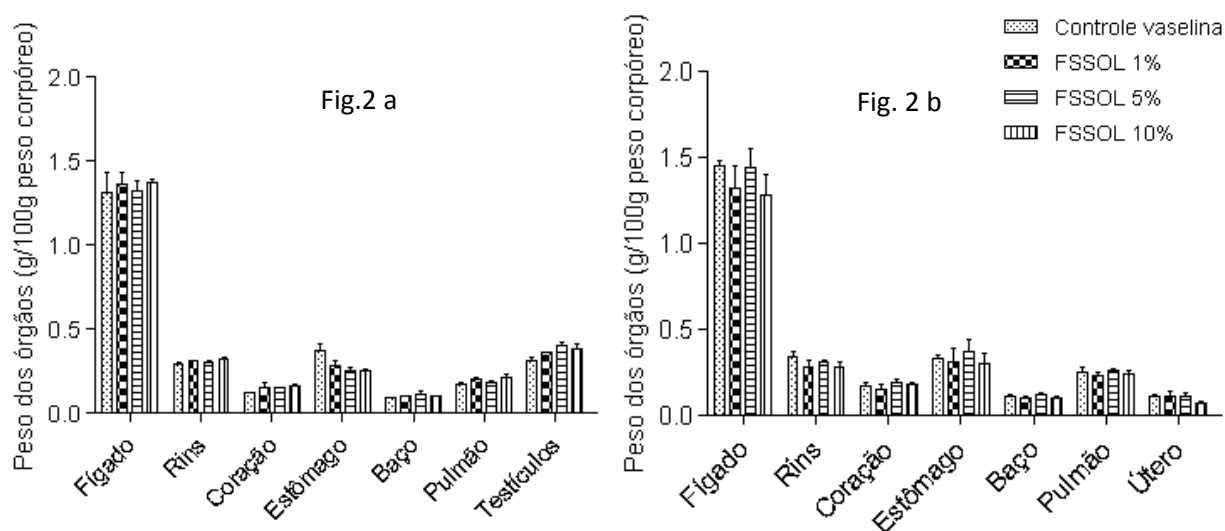


FIGURA 2 – Peso dos órgãos (g/100g peso corpóreo) dos ratos Wistar (machos Fig. 2a (n=5) e fêmeas Fig. 2b (n=5)) tratados com a FSSOL (1%, 5% ou 10%) ou controle (veículo), por via dérmica durante 35 dias. Valores submetidos à ANOVA duas vias com pós-teste Boferroni significância *(p<0,05).

Klaassen & Watkins (2001) relatam que o ensaio da toxicidade sub-crônica permite estabelecer a existência ou não de efeitos adversos e posteriormente, identificar e caracterizar o(s) órgão(s) afetado(s) determinado pelo efeito cumulativo da substância administrada, e que segundo Jahn & Günzel, (1997) o acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de substâncias exógenas. De acordo com Brito (1995), animais que apresentam lesões dermatológicas acompanhadas de prurido e dor não se alimentam bem e apresentam perda de peso. Este fato não foi observado nos animais que foram submetidos ao tratamento durante 35 dias, tendo em vista estes apresentarem ganho de peso semelhante ao grupo controle.

Quanto à avaliação laboratorial, os perfis hematológico e bioquímico (Tabela 1 e 2 respectivamente) não apresentaram diferença estatisticamente significativa dos valores mensurados dos diferentes grupos tratamento (diferenciado pelo sexo), quando comparado ao grupo controle. Alguns autores (LOPES et al., 1996) relatam quanto a importância da avaliação hematológica, de forma especial o leucograma, pois este quando se encontra alterado, quantitativa e/ou morfológicamente, pode estar associado a processos patológicos, como por exemplo necrose ou lesão tecidual.

TABELA 1 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar (machos (n=5) e fêmeas (n=5)) tratados com a FSSOL (1%, 5% ou 10%) ou controle (veículo), por via dérmica durante 35 dias.

Parâmetro/Unid	Controle (veículo)		Formulação Semi-Sólida de Óleo de Linhaça (FSSOL)					
			1%		5%		10%	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Hemácias (mil/mm ³)	7,53±0,15	7,67±0,41	7,36±0,16	7,08±0,17	7,33±0,10	7,56±0,14	6,80±0,27	7,61±0,14
Hemoglobina (g/dL)	14,87±0,38	15,53±0,64	14,57±0,37	14,43±0,26	14,20±0,21	14,83±0,23	14,27±0,33	15,53±0,12
Hematócrito (%)	44,43±1,42	46,33±1,95	42,90±1,52	42,00±0,82	41,67±0,55	43,37±0,92	41,23±0,63	44,97±0,74
VCM (µm ³)	57,97±0,95	60,43±0,95	58,23±1,03	59,27±1,48	56,77±0,12	57,37±1,71	60,70±1,98	59,03±0,50
HCM (pg)	19,70±0,26	20,27±0,37	19,83±0,37	20,37±0,32	19,40±0,06	19,63±0,38	21,03±0,55	20,40±0,23
CHCM (g/dL)	33,43±0,52	33,57±0,12	34,00±0,51	34,33±0,27	34,13±0,09	34,23±0,39	34,67±0,32	34,53±0,26
RDW (%)	13,83±0,23	12,27±0,22	15,47±0,69	12,77±0,64	17,03±0,99	13,90±0,75	15,57±0,37	14,00±0,67
Plaquetas (mil/mm ³)	777000±8327	609667±51200	795000±11930	579667±71326	812333±52327	657000±80649	741667±42838	614667±65973
Leucócitos (mm ³)	10800±1201	16733±3426	10100±2055	11933±1533	9500±1750	11500±1650	9400±1343	12733±2236
Neutrófilos (mm ³)	831±110	1101±344	1339±348	927±467	1109±385	732±77	1143±187	1904±1058
Eosinófilos (mm ³)	109±45	38±20	175±67	20±10	41±21	33±18	81±9	13±2
Basófilos (mm ³)	75±69	128±43	18±2	33±13	10±7	49±5	22±14	35±19
Linfócitos TIP (mm ³)	9773±1164	12357±4494	8475±2316	9433±1778	8268±1348	9900±1535	8144±1241	10414±1714

Valores submetidos à ANOVA duas vias com pós-teste Boferroni significância * (p<0,05).

TABELA 2 - Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar (machos (n=5) e fêmeas (n=5)) tratados com a FSSOL (1%, 5% ou 10%) ou controle (veículo), por via dérmica durante 35 dias.

Parâmetro/Unid.	Controle (veículo)		Formulação Semi-Sólida de Óleo de Linhaça (FSSOL)					
			1%		5%		10%	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Fosfatase alcalina (U/L)	5,33±0,17	5,00±0,00	6,40±1,30	5,00±0,00	5,20±0,42	5,00±0,00	5,47±0,26	5,00±0,00
Alanina aminotransferase (U/L)	45,67±1,76	30,40±7,62	47,00±4,51	28,00±2,65	44,67±3,71	27,00±2,52	44,00±1,15	41,00±1,00
Aspartato aminotransferase (U/L)	82,33±5,49	77,67±0,88	95,67±3,18	80,33±11,86	71,67±1,76	81,67±6,69	95,00±1,15	91,00±7,37
Bilirrubina total (mg/dL)	0,14±0,02	0,11±0,01	0,15±0,01	0,11±0,01	0,15±0,00	0,11±0,01	0,11±0,00	0,14±0,01
Colesterol (mg/dL)	87,23±3,83	64,57±1,20	71,97±9,33	53,27±1,98	65,77±8,43	68,13±0,83	70,17±7,17	64,83±4,07
Creatinina (mg/dL)	0,50±0,06	0,47±0,03	0,47±0,03	0,40±0,00	0,50±0,00	0,40±0,00	0,43±0,03	0,47±0,03
Gama Glutamiltransferase (U/L)	4,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00	4,33±0,33	4,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00
Glicose (mg/dL)	141,33±18,40	139,70±4,68	158,23±4,13	126,80±5,16	147,93±15,99	133,70±8,97	161,73±1,37	142,00±9,20
Proteínas totais (g/dL)	5,77±0,09	5,80±0,15	5,73±0,07	5,00±0,12	5,77±0,12	5,50±0,21	5,73±0,07	5,73±0,03
Triglicérides (mg/dL)	51,40±6,93	31,17±2,90	53,67±9,35	26,00±0,81	52,33±12,18	31,63±4,49	50,17±5,51	31,47±4,80
Uréia (mg/dL)	43,80±5,18	28,23±0,35	36,67±6,05	26,90±4,61	35,00±3,79	27,93±1,58	31,53±2,54	32,77±1,19
Ác. Úrico (mg/dL)	1,50±0,47	0,67±0,09	0,67±0,07	0,53±0,03	1,20±0,25	1,40±0,90	0,67±0,03	0,53±0,03

Valores submetidos à ANOVA duas vias com pós-teste Boferroni significância * (p<0,05).

Na avaliação do perfil hematológico, o hematócrito é um importante parâmetro laboratorial para se registrar a ocorrência de anemia, pois através dele se obtêm informações a respeito do volume globular (%) e a coloração do plasma. Este tipo de avaliação nos oferece respaldo quanto ao grau de hidratação e até possíveis aspectos nutricionais, pois uma redução que ultrapasse o limite fisiológico pode indicar redução no consumo de água e alimento (LOPES et al., 1996; FELDMAN, 2000), portanto, a não ocorrência de alteração deste, bem como dos demais parâmetros hematológicos, permite-nos inferir que a FSSOL, nas diferentes concentrações, não acarretou prejuízos em termo hematológico.

A avaliação dos parâmetros da bioquímica sérica possibilita identificar possíveis efeitos tóxicos sistêmicos e, em alguns casos, indicar qual órgão estaria sendo agredido durante um teste de toxicidade. Como, em nosso estudo não foi observado alteração nos parâmetros bioquímicos, quando comparado os tratamentos com o controle, e o perfil bioquímico permaneceu dentro dos padrões normais para ratos Wistar segundo Harkness & Wagner (1985), Anderson (1998) e Thrall et al., (2004), assim sendo a administração tópica durante 30 dias da FSSOL parece não apresenta efeito tóxico sistêmico.

O teste da sensibilidade dérmica realizado em cobaias (*Carvia porcelus*) utilizando a FSSOL (1%) na fase de indução e (10%) na fase de desafio, não demonstrou, características alergênicas nem de sensibilização dérmica quando comparado ao controle, nas respectivas fases do teste.

Ao final do teste de irritação dérmica e ocular realizados nos coelhos Nova Zelândia albino, observamos que as FSSOL quando em contato direto com a pele ou olhos não foram capazes de desenvolver reação irritante

persistente. No decorrer de duas horas do contato ocular inicial com as FSSOL, os leves sinais de irritação desapareceram.

Os ensaios pré-clínicos, empregados para avaliar a segurança de uso da formulação semi-sólida do óleo de linhaça, demonstraram que a mesma não apresenta riscos quando administrado por via dérmica ou ocular nas concentrações e modelos testados. Sendo um resultado estimulante para futuras pesquisas no que concerne à avaliação da eficácia farmacológica, haja vista, tratar-se de um produto com indicações terapêuticas pela medicina popular.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON NL. Criação e medicina básica dos animais de estimação de bolso. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Clinica de Pequenos Animais**. Manual Saubders. São Paulo: Roca, 1998, 1523-52p.
- AULETTA CS. Acute, subchronic, and chronic toxicology. In: DERELANKO MJ, HOLLINGER MJ, **Handbook of Toxicology**. CRC Press Inc., London, 1995, p. 51–162.
- BRASIL 1995. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. *Portaria nº 6/95 de 31/01/1995. Normatização de registro de fitoterápicos*. Diário Oficial da União, Brasília.
- BRASIL 1996. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria Nº 116 de 08 de agosto. **Norma para Estudo da Toxicidade e da Eficácia de Produtos Fitoterápicos**.
- BRASIL 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº90, de 16 de março. **Guia para realização de estudos de toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos**.
- BRITO ARMS. Toxicologia pré-clínica de plantas medicinais In: DI STASE, L.C. **Plantas Medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Unesp, 1995, p.100-7.
- CALIXTO JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.179-89, 2000.
- CEVALLOS GC. Estudios de toxicologia preclínica para nuevos fármacos. **Archivos de Neurociências**, v.1, n.2, p.118-21, 1996.

DATTA HS, MITRA SK, PATWARDHAN B. Wound Healing Activity of Topical Application Forms Based on Ayurveda. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.27, p.1-10, 2009.

DRAELOS ZD. **Cosmecêuticos**. São Paulo: Elsevier, 2005.

DRAIZE JH. **Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics**. Association of Food and Drug Officials of the United States, Austin, TX. 1959, 46p.

FELDMAN BF. **Veterinary Hematology**. 5ed. New York: Lippincott Williams e Williams, 2000, 1344p.

HARKNESS JE, WAGNER JE. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. São Paulo: Roca, 1985, 230p.

JAHN AI, GÜNZEL PKH. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reprod Toxicol**, v.11, p.171-78, 1997.

KLAASSEN CD, WATKINS JB. **Toxicologia: A ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull**. 5° ed. Lisboa: McGraw-Hill de Portugal, 2001, 864p..

LOPES STA et al. **Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, 1996, 166p.

MAGNUSSON B, KLIGMANN AM. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *Journal of Investigative. Journal of Investigative Dermatology* n.52, p268–276, 1969.

MALONE RA. Pharmacological Approach to Natural Products Screening and Evaluation. In: Warner H, Wolf P, New Natural Products and Plant Drugs with

Pharmacological, **Biological for Therapeutically Activity**. Springer – Verlag: Berlim, 1977, 24-53p.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 1987. **Guideline for Testing of Chemicals: Cute Derml Toxicity**. Guideline: 402. [http://www.oecd-](http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740201e.pdf?expires=1292260727&id=0000&accname=freeContent&checksum=FFE50787ABC6877F92A174AAC758F402)

[ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740201e.pdf?expires=1292260727&id=0000&accname=freeContent&checksum=FFE50787ABC6877F92A174AAC758F402](http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740201e.pdf?expires=1292260727&id=0000&accname=freeContent&checksum=FFE50787ABC6877F92A174AAC758F402). Acesso em: 15 nov. 2010.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2002. **Guideline for Testing of Chemicals: Cute Derml Irrittion/Corrosion**. Guideline: 404.

[http://www.wam.go.jp/wamappl/bb11GS20.nsf/0/49256fe9001b533f49256f250024d53e/\\$FILE/9_sankou3_2.pdf](http://www.wam.go.jp/wamappl/bb11GS20.nsf/0/49256fe9001b533f49256f250024d53e/$FILE/9_sankou3_2.pdf). Acesso em: 15 nov. 2010.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2002. **Guideline for Testing of Chemicals: Cute Eye Irrittion/Corrosion**. Guideline: 405. <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg405.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2010.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2002. **Guideline for Testing of Chemicals: Skin Sensitisation**. Guideline: 406. [http://www.oecd-](http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740601e.pdf?expires=1292261624&id=0000&accname=freeContent&checksum=B0497FBBAAA43F5CC97C9571DDE7810A)

[ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740601e.pdf?expires=1292261624&id=0000&accname=freeContent&checksum=B0497FBBAAA43F5CC97C9571DDE7810A](http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9740601e.pdf?expires=1292261624&id=0000&accname=freeContent&checksum=B0497FBBAAA43F5CC97C9571DDE7810A). Acesso em: 15 nov. 2010.

OTRANTO M, NASCIMENTO AP, MONTE-ALTO-COSTA A. Effects of supplementation with different edible oils on cutaneous wound healing. **Wound Repair and Regeneration** n.18, p.629–36, 2010.

PONTE FLR. **Toxicidade pré-clínica de fitoterápicos à base de mel de abelha própolis e extratos de Mikania glomerata, Eucalyptus globulus ou da associação Zingiber officinale e Allium sativum em roedores.** 2003. 76p. Dissertação (Mestrado-Programa de Pós Graduação em Fisiologia), Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ROBSON MK, NUSAIR TL, FLETCHER ER, HITZ HL. A review of the Buehler guinea pig skin sensitization test and its use in a risk assessment process for human skin sensitization. **Toxicological sciences**, n.6, p.191-107, 1990.

SILVA CCA, MIRANDA EM, OLIVEIRA IG. Desenvolvimento de Fitoderivados oriundos da espécie *Dimorphandra mollis*. **Rev. Iniciação Científica** n.3, p. 225-34, 2005.

THRALL, M.A. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 518p.

TUROLLA MS, NASCIMENTO ES. Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** n.42, v.2, 289-306, 2006.

VALADARES MC. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia** n.3, v.2, p.93-8, 2006.

5.2 Artigo II

Effect of a semi-solid formulation of *Linum usitatissimum* L. (linseed) oil on the repair of skin wounds

Eryvelton de Souza Franco¹, Camilla Maria Ferreira de Aquino¹, Paloma Lys de Medeiros², Liriane Baratella Evêncio², Alexandre José da Silva Góes³, Maria Bernadete de Sousa Maia^{1*}

¹ Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, ²Department of Histology and Embryology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, ³ Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^{1*}Address: Federal University of Pernambuco, Department of Physiology and Pharmacology, Laboratory of Pharmacology of Bioactive Products - Avenida Professor Moraes Rêgo, S/N, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil. Phone: ++55 (81) 2126 8530, mbsm@ufpe.br

The purpose of this study was to investigate the effects of a semi-solid formulation of linseed oil - SSFLO (1%, 5% or 10%) or *in natura* linseed oil on skin wounds of rats. We used wound models, incisional and excisional, to evaluate respectively the contraction/reepithelialization of the wound and resistance to mechanical traction. The groups (n = 6) treated with SSFLO (1% or 5%) began the process of reepithelialization, to a significant extent ($p < 0.05$), on the sixth day, when compared to the petroleum jelly control. On day 14th for the groups treated with SSFLO (1% or 5%), 100% re-epithelialization was found, while in the petroleum jelly control group, this was only 33.33%. Our study showed that topical administration of SSFLO (1% or 5%) in excisional wounds allowed re-epithelialization in 100% of treated animals. Therefore, a therapeutic potential of linseed oil, when used at low concentrations in the solid pharmaceutical formulations, is suggested for the process of dermal repair.

Keywords: linseed oil, epithelialization, wound healing, essential fatty acids

INTRODUCTION

Linum usitatissimum L. is an herb belonging to the Linaceae family, popularly known as flax or linseed, which is native to Europe, Asia and the Mediterranean region. The seeds of flax are used as the source material for the production of oil and meal, which is rich in fiber, protein and fat (1). Its oil is arguably one of the richest in polyunsaturated fatty acids (PUFA) and essential fatty acids (EFA), with 56.6% linolenic acid [ω -3 (C18: 3cis 9,12,15)] and 13.2% linoleic acid [ω -6 (C18:2 cis 9,12)], in addition to 17.8% monounsaturated fatty acid (MUFA) oleic acid [ω -9 (C18: 1 cis9)] (2).

Linseed oil is present in the Brazilian national pharmacopoeia in the form of calcareous liniment oil, which is indicated for use in cases of pruritic dermatoses and burns (3). According to Chinese traditional medicine and Ayurvedic medicine, linseed oil is indicated for the treatment of wounds and as a moisturizer and dermal antioxidant, among other uses (4). The pharmacological properties of linseed oil are attributed to the presence of PUFA and MUFA in

its composition, which act stimulating production of growth factors, fibroplasia, and neovascularization (5, 6).

Previous authors report that linoleic acid (ω -6) exhibits pro-inflammatory characteristics, whereas linolenic acid (ω -3) and oleic acid (ω -9) have an anti-inflammatory effect (7). In a study evaluating the effect of topical administration of purified linolenic, linoleic and oleic acid, in the process of wound healing in rats, Cardoso et al. (8) observed that in the groups treated topically with MUFA oleic or PUFA linoleic showed significant reduction in wound area when compared with the group treated with PUFA linolenic acid, suggesting a favorable effect of MUFA oleic and PUFA linoleic acids in the process of tissue repair, specifically as pro-inflammatory agents during the inflammatory phase of the healing process (8, 9). It is noteworthy that linoleic acid (ω -6) is the direct precursor of arachidonic acid, which is part of the membrane phospholipids that prevents transepidermal water loss, provides elasticity, skin integrity and fluidity (10), and serves as a substrate for the synthesis of eicosanoids such as prostaglandins, leukotrienes and thromboxanes (11). These, in turn, modulate immunological and inflammatory responses by altering leukocyte functions and accelerating the process of tissue granulation (12).

Taking into consideration the scientific background regarding the chemical composition of linseed oil as a major source of ω -3 and ω -6 PUFA, we undertook this study to explore two cases of healing activity using a semi-solid formulation of linseed oil in experimental models of skin wounds.

METHODS

Preparation of the pharmaceutical formulation

The semi-solid formulation of linseed oil (SSFLO) was composed of commercial linseed oil² (*L. usitatissimum*), extracted by cold-pressing the seeds, and a vehicle (petroleum jelly), in sufficient amount to obtain 100g of SSFLO (1%, 5% and 10%). The procedure was handled within the standards and quality control for medicines from the Medical Technology Laboratory, Pharmaceutical Faculty of the Federal University of Pernambuco. As a negative control the formulation vehicle (petroleum jelly) was used and as a positive control, an oil emulsion based on sunflower oil rich in EFA³ (ESO).

Biological models

A total of 72 Wistar rats (males and females (200-300g)), from the vivarium of the Department of Pharmacology and Physiology of the Federal University of Pernambuco were used. The animals were randomly divided into groups (n=6 animals) and kept individually in metabolic cages, with food and water *ad libitum*.

Bioethical considerations

The study was approved by the ethics committee for animal experimentation (# 23076007695/2009-19) of the Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

Excisional wound model

Wistar rats (n=36) were weighed and anesthetized with xylazine (3mg kg⁻¹) and ketamine (10mg kg⁻¹ i.m.) (13). Subsequently the animals were placed in a prone position and underwent manual trichotomy and antisepsis with 0.1% iodine alcohol along the dorsal midline of the cervical region of each animal. The incision area was marked using a surgical pen and metal mold castings ($\pm 78.5 \text{ mm}^2$). To remove the skin, subcutaneous tissue, fascia and fleshy panniculus, straight iris scissors and Adson forceps were used. After the incision, a containment ring made of nontoxic and hypoallergenic silicone was sutured into place, using six simple,

² Cisbra vegetable oils LTDA, Ijuí- Rio Grande do Sul, Brazil

³ Dersani[®]

isolated stitches with 4.0 nylon monofilament, arranged symmetrically (14), so that the surgical wound remained in the center (Figure 1 a and b).



Figure 1. (a) Excision wound on day 1 (control group animal).

(b) Excision wound on day 14 (control group animal).

After surgery, the animals were divided randomly into six groups (n=6 animals/group) and treated over 14 consecutive days with 1% SSFLO, 5% SSFLO, 10% SSFLO, *in natura* linseed oil, ESO (positive control) or petroleum jelly (negative control). The topical application of each product (95mg) was done using a metal spatula. On the seventh day, the scabs of the wounds on each animal were removed to allow evaluation of the tissue that was below them and the true value of the remaining wound area.

Macroscopic analysis of wound closure

To assess the contraction of wounds treated with the different products, the wounds were measured daily using a digital caliper according to the equation formulated by Prata et al. (15), $A = \pi \cdot R \cdot r$, where A represents the area (mm²), "R", the larger radius and "r", the smaller radius. The assessments were made by the same examiner, with the animals under physical restraint. The wounds were also evaluated for the presence of exudate, scab formation, early re-epithelialization and the presence of fibrin (slough).

Microscopic morphometric analysis

At the end of the experiment (14th day of treatment), the animals were euthanized in a CO₂ chamber and then placed on an operating table for the collection of material for the morphometric analysis of the skin lesions. All the samples obtained were fixed in 10% buffered formalin for a minimum period of 24 hours, and subsequently dehydrated in ethanol and cleared in xylene. Next, the samples were processed for inclusion in paraffin by routine methods, and cut using a Minot-type microtome set to 4µm. The material obtained was placed on slides previously coated with Mayer albumin.

After drying, the sections were stained with hematoxylin-eosin (16) for observations of general tissue morphology and Masson Trichrome (17) to analyze the organization of collagen fibrils in the dermis. The slides were examined under light microscope, five images per field (0.0018mm² area) were captured with a digital camera (total magnification 400 ×) attached to the microscope⁴. The images were stored and subjected to counting of inflammatory cells, fibroblast cells, number of blood vessels and evaluation of collagen density of all lesions with the aid of digital marking (18, 19).

Incisional wound model

Wistar rats (n=36) were weighed and intramuscularly anesthetized with xylazine (3mg kg⁻¹) and ketamine (10mg kg⁻¹) (13). The animals were then placed in a prone position and subjected to manual trichotomy and antisepsis with 0.1% iodine alcohol in the region of the dorsal midline. Later, an incision was made using a #15 scalpel blade, parallel to the spine three centimeters in length. The pre-established skin flap was comprised of the skin, subcutaneous tissue, and superficial fascia to the point of the fleshy panniculus. The site was dissected with blunt dissection to offset the adjacent muscle-aponeurotic plane then repositioned and sutured with two simple stitches using 4.0 nylon monofilament (20). After surgery, the animals were

⁴ Olympus® BX-49 light microscope and camera

divided randomly into six groups (n=6 animals/group) and treated over 10 consecutive days with 1% SSFLO, 5% SSFLO, 10% SSFLO, *in natura* linseed oil, ESO (positive control) or petroleum jelly (negative control). The sutures were removed on the eighth day and the wounds continued to be treated until the evaluation of skin resistance on the tenth day. For this assessment, the animals were euthanized in a CO₂ chamber and the skin of the wound site was removed and evaluated for resistance using a universal mechanical test, with manually adjustable pressure application and a computerized system of data acquisition (21).

Statistical Analysis

The variables (wound area, inflammatory cells, fibroblast cells, number of blood vessels, collagen density and tensile strength of the skin) and variables (presence of scabs, the presence of exudate and the presence of tissue reepithelialization), were expressed as mean $\pm$ standard deviation and subjected respectively to one-way ANOVA (quantification of the variables on the last day of treatment) or two-way ANOVA (presence of the variables during each day of treatment (quantity $\times$ time) followed by the *Bonferroni's* multiple test comparing the SSFLO treatment groups (1%, 5% or 10%) or linseed oil to the petroleum jelly and ESO controls, considering significant values ($p < 0.05$). Data were analyzed using Graph Pad Instant version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

Development of excisional wounds

To assess whether treatment with SSFLO (1%, 5% or 10%) or *in natura* linseed oil influenced the closing time of second intention wounds, compared to the ESO or petroleum jelly control groups, the wounds of each animal were measured daily. We observed a significant reduction ($p < 0.05$) of wound contraction in the group treated with linseed oil when compared to the petroleum jelly control on the fourth and fifth days of treatment (Fig. 2 a and b). However,

from the sixth day of treatment, tissue repair occurred uniformly in all groups, with no observed significant difference in wound contraction.

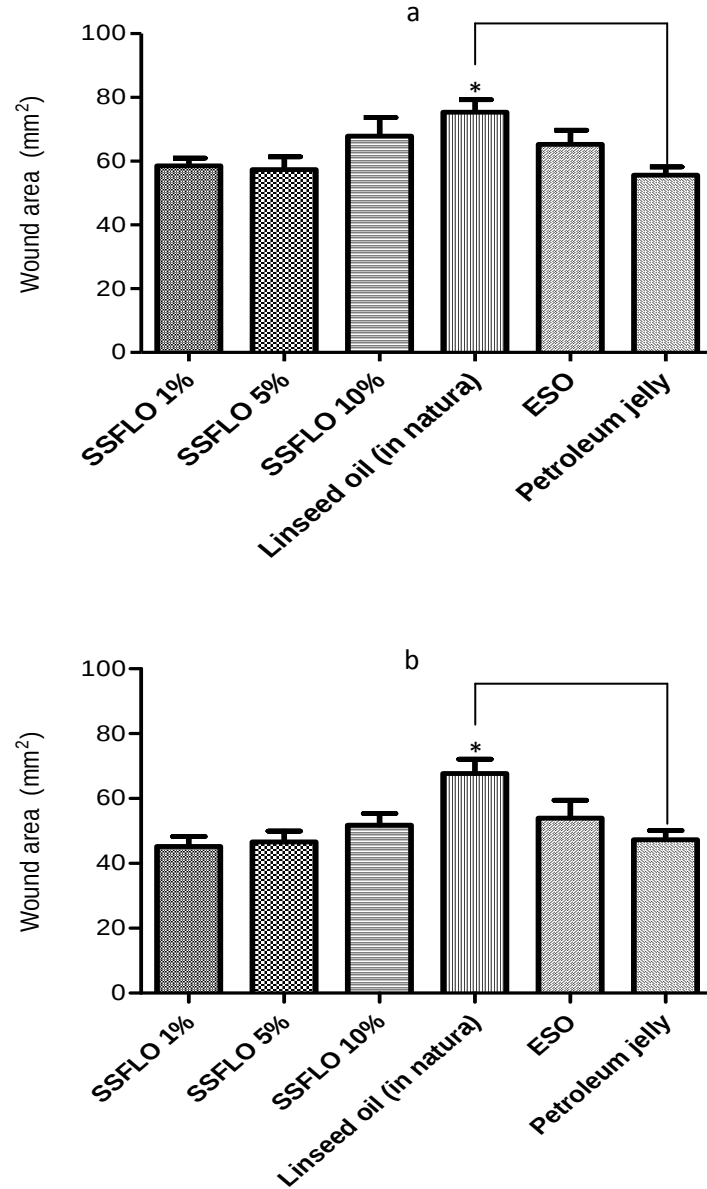


Figure 2. Effect of treatment with SSFLO (1%, 5% or 10%) compared to control groups ESO and petroleum jelly in reducing the area of wounds, excision model. (a) After four days of treatment, (b) After five days of treatment. * ($p < 0.05$)

There was a significant decrease ($p<0.05$) in the presence of scabs in the group treated with 1% SSFLO on the second day (one animal - 16.67%) when compared to the ESO control group (five animals - 83.33%). For the group treated with *in natura* linseed oil, we observed a significant increase in the presence of scabs ($p<0.05$) on the third day (six animals - 100%), when compared to the petroleum jelly control (two animals - 33.33%). On the other days, there was no significant difference regarding the presence or absence of scabs, when comparing the treatment groups to the controls.

In all groups a serous exudate was observed in the early hours after surgery. However, during the fourteen-day trial there was no significant difference regarding the presence of exudate in the treated groups compared to the controls.

The removal of the scab was necessary on the seventh day, to allow for better contact of the SSFLO (1%, 5% and 10%) or *in natura* linseed oil and visualization of the wound bed (22). With this removal, it was possible to assess, macroscopically, the type of tissue present. A significant ($p<0.05$) increase in the presence of fibrin (slough) was found in the groups treated with SSFLO 1% (three animals - 50%) in SSFLO 5% (one animal - 16.67%) or 10% (two animals - 33.33%) compared with the ESO control group, which did not show formation of slough in the wound bed. On the same day, a significant ($p<0.05$) presence of slough in the group treated with SSFLO 1% (three animals - 50%) compared to the petroleum jelly control (one animal - 16.67%).

A significant ($p<0.05$) increase in tissue reepithelialization was seen from the sixth day, in groups treated with SSFLO 1% (four animals - 66.67%) or 5% (four animals - 66.67%) compared to the ESO control group (two animals - 33.33%). This same variable was significantly ($p<0.05$) lower on the sixth day, in groups treated with 10% SSFLO (three animals - 50%) or *in natura* linseed oil (three animals - 50%) compared to the petroleum jelly control group (five animals - 83.33%).

Microscopic morphometric analysis: To determine whether treatment with SSFLO (1%, 5% or 10%) or *in natura* linseed oil influenced the second intention repair process of wounds in terms of reepithelialization, presence of dermal papillae, number of blood vessels, number of fibroblast cells and collagen density, we evaluated the histological morphology of the dermal region after 14 days of treatment and compared it to the ESO and petroleum jelly control groups.

It was observed that 100% of animals in groups treated with SSFLO (1% or 5%) showed complete reepithelialization at the end of the experiment, this result was significant ($p<0.05$) when compared with the petroleum jelly control group (Figure 3).

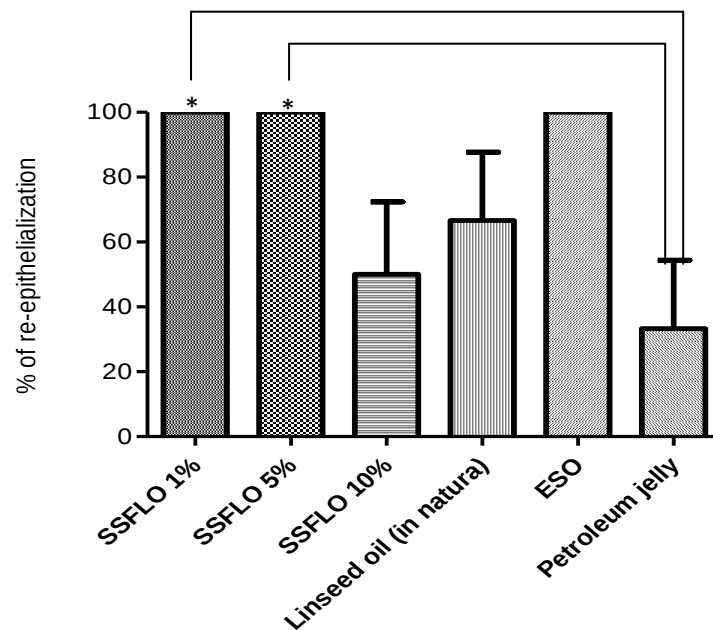


Figure 3. Effect of treatment with SSFLO (1%, 5% or 10%) compared to control groups petroleum jelly and ESO on the re-epithelialization (%) of excisional wound model, after 14 days. * ($p<0.05$)

In the morphometric evaluation a significant increase ($p<0.05$) in the number of inflammatory cells in the group treated with 10% SSFLO was observed compared to the ESO

control group (Figure 4). Among the remaining variables, there were no significant differences observed.

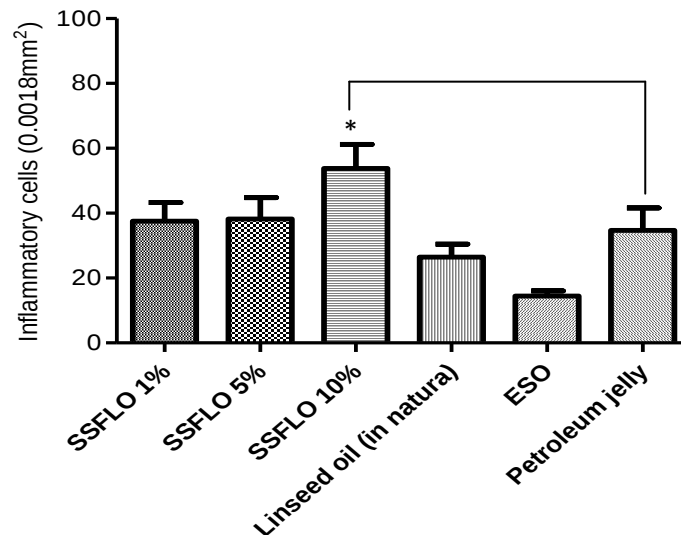


Figure 4. Effect of treatment with SSFLO (1%, 5% or 10%) compared to the control group petroleum jelly and ESO with the amount of inflammatory cells in scar tissue, excisional wound model, after 14 days. * ($p < 0.05$)

Tensile strength study of cutaneous wounds

Tensile strength evaluation seems highly relevant, since it has been used in several studies of healing, and being a physical parameter that, in connection with the histological evaluation, allows us to infer about the quality of the healing process, as well as the resistance of the skin to the tension suffered. There was no significant difference in tensile strength among the different experimental groups.

DISCUSSION

In the present study, standardized surgical wounds were prepared, which were submitted to the repair process in the first intention (incisional model) and second intention

(excisional model) for ten or 14 days of treatment, respectively, with SSFLO (1%, 5% or 10%) or *in natura* linseed oil. Howel & Maquart (23) defined as cure or wound repair the healing process, which may occur in the first intention, where there is immediate union of the edges or, in the second intention, where the edges are separated and there is need to form scar tissue. The use of models allows the evaluation of the effect of the products concerned, on the action mechanism of wound contraction, through possible stimulation of tissue repair and resistance to the pull of the skin, which would be associated with the stimulation of collagen synthesis (4, 24).

We observed a significant increase in the area of the wounds treated with *in natura* linseed oil on the fourth and fifth days, when compared to the petroleum jelly control. This result can be explained by the occlusive and moisturizing action of petroleum jelly that, through this mechanism, prevents tissue loss from drying and prevents ischemia of deeper tissues, preventing the increase of the lesion (25). This result does not occur with *in natura* linseed oil, as it occurs in liquid form and is rapidly absorbed, allowing the wound bed to become more exposed to the environment. These findings are supported by the observation of a significant presence of scabs in the early days, in the wounds treated with *in natura* linseed oil or ESO. Since the two products occur in liquid form, they allow for faster absorption, however, increased exposure of the wound bed to the drying environment leads consequently to the formation of scabs. Demling & Desanti (26) reported that the use of dressings has several purposes, the first being the protection of the wound to minimize the chances of infection and loss of water and electrolytes, with consequent dehydration of the wound bed.

Bates-Jensen (27) reported that the presence of exudate in the first 48 to 72 hours after an incision is normal, however, after this period, any further exudate is a sign of damage to the healing process. When exudate persists, disintegration of the scab occurs which favors the growth of microorganisms between it and the granulation tissue (28). In our study we observed exudate in the first 48 h in all groups, the absence of exudate could be related to the

antimicrobial activity attributed to essential fatty acids. According to Declair, EFA has bactericidal action due to its pH, which interferes with the permeability of the bacterial membrane, in addition to the fact that linoleic acid, when used in venous ulcers, allowed the elimination of infection in the lesions (29).

In animals treated with SSFLO (1%, 5% or 10%) we observed a significant amount of fibrin (slough) compared to the ESO control. According to Kentlloyd (30), low oxygen tension, stemming from the closure of wounds, promotes the accumulation of fibrin in the center of the lesion and stimulates the proliferation and centripetal migration of fibroblasts along the fibrin mesh. Thus, the difference was significant in the products that had petroleum jelly as a vehicle, which allowed for greater occlusion of the lesion with stimulation at low oxygen tension. Our results were similar to those of Otranto et al. (2), who evaluated the healing activity in rats and found a significant difference in the amount of fibrin (slough) in animals that were orally supplemented with linseed oil when compared with the control group, supplemented with water. The same authors also warned that the use of linseed and fish oil should be avoided whenever there is a tendency to fibrosis, as in hypertrophic scars and keloids.

The appearance of granulation tissue around of the wound significantly earlier in animals treated with the 1% or 5% SSFLO, when compared to the ESO control group, can probably be attributed to the semi-solid formulation, which presents in its composition an emollient and occlusive vehicle (petroleum jelly), which allowed the wound to remain hydrated, due to the occlusion process that decreased the net loss to the environment (31).

Histological analysis performed at the end of the experiment (day 14) revealed that the groups treated with SSFLO (1% or 5%) showed significant re-epithelialization compared to negative control (petroleum jelly), but the same was not observed in groups treated with 10% SSFLO or *in natura* linseed oil. One possible explanation for the absence of significant reepithelialization in these groups can be attributed to the presence of a high concentration of ω -3 PUFA in relation to the preparations of 1% and 5% SSFLO. According to Silva (31), the

active compounds present in the formulations for dermatological use pass through the corneal stratum by passive diffusion. As this mode of transport is concentration-dependent, it would imply a greater dermal absorption of the PUFAs present in 10% SSFLO and in *in natura* linseed oil. Studies by Cardoso et al. (8) showed that high concentrations of ω -3 PUFA promote delayed healing of skin wounds in rats treated topically with this product. Additionally, Scardino et al. (32) also showed delayed wound healing as reflected in the decrease of reepithelialization of skin wounds in dogs fed a diet rich in ω -3 PUFA. According to Altavilla et al. (33) the delay in the healing process could be due to the presence of greater numbers of unsaturated bonds in ω -3 PUFA, which is predisposed to lipid oxidation and consequently a delay in wound healing.

In the present work, we have also observed a significant amount of inflammatory cells in the group treated with 10% SSFLO. These results corroborate those found by Otranto et al. (2), which demonstrated a significant amount of inflammatory cells in skin flaps of rats given a diet rich in linseed oil during the process of tissue repair. According to McDaniel et al. (34), people supplemented with a diet rich in ω -3 PUFA levels showed elevated proinflammatory cytokines in skin tissue. Studies have shown that PUFAs are main precursors of many lipid mediators involved in the inflammatory response, such as vascular contraction, chemotaxis, adhesion, transmigration and cell activation, and these are important functions of the inflammatory phase of tissue repair (35, 36).

We did not observe significant differences with respect to the density of collagen and skin resistance to mechanical traction in the groups treated with SSFLO (1%, 5% or 10%) when compared to the ESO and petroleum jelly control groups. Our results are consistent with those of Albina et al. (37) who studied the influence of a diet rich in ω -3 PUFA in the deposition of collagen (after 30 days) and mechanical resistance of rat skin to traction (after ten days) of the incision, and who found no significant difference between groups.

Our study showed that topical administration of SSFLO (1% or 5%) in experimental excisional wounds promotes re-epithelialization in 100% of the animals treated, therefore indicating the potential for therapeutic action of linseed oil (Figure 5), when used at low concentrations in the preparation of dermatological formulas with a solid base to be used in the process of dermatological reparations.

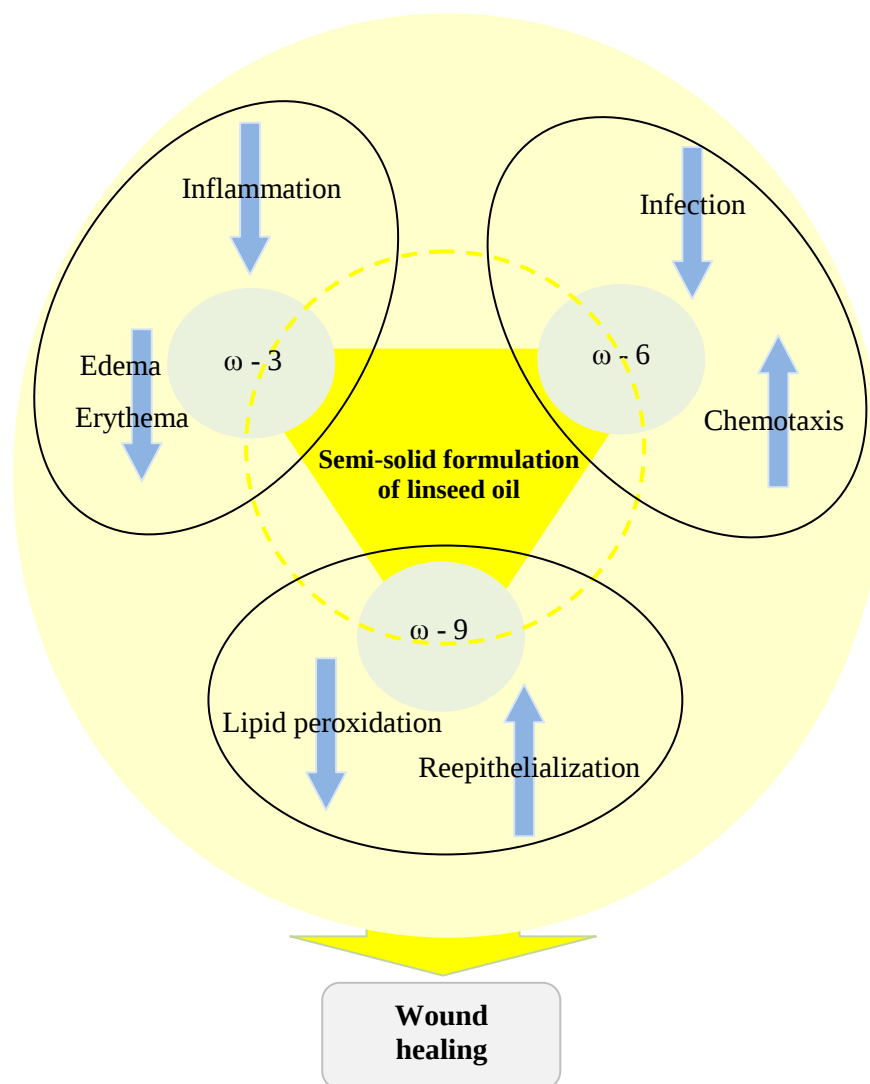


Figure 5. Possible role of the fatty acids linolenic acid (ω -3), linoleic acid (ω -6) and oleic acid (ω -9) present in semi-solid formulation of linseed oil on wound repair.

REFERENCES

- [1] Nesbitt PD, Thompson LU. Lignans in homemade and commercial products containing linseed. *Nutr Câncer*. 1997; 29: 222-7.
- [2] Otranto M, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. Effects of supplementation with different edible oils on cutaneous wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2010; 18: 629–636.
- [3] Ministério da Saúde (Brasil), Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Formulário nacional*. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.
- [4] Datta HS, Mitra SK, Patwardhan B. Wound Healing Activity of Topical Application Forms Based on Ayurveda. *eCAM*. 2009; 27: 1-10.
- [5] Marques SR, Peixoto CA, Messias JB, Albuquerque AR, Silva Junior VA. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. *Acta Cirur Bras*. 2004; 19(3): 196-209.
- [6] Hatanaka, E.; Curi, R. Fatty acids and wound healing: a review. *Rev Bras Farm*. 2007; 88(2): 53-8.
- [7] Azevedo RB, Silva LP, Lemos, APC, Miyasaka CK, Laçava ZGM. Controle da resposta inflamatória por ácidos graxos. In: Curi R, Pompéia C, Miyasaka CK, Procopio J. Entendendo a gordura os ácidos graxos. São Paulo: Manole; 2001. p. 381-92.
- [8] Cardoso CR, Souza MA, Ferro EA, Favoreto S Jr & Pena JD. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 2004; 12(2): 235-43.
- [9] Hatanaka E, Leonardo MP, Martins EF, Liberti EA, Farsky SHP, Curi R, Pithon-Curi TC. Evidências do efeito pró-inflamatório dos ácidos oleico e linoléico no processo de cicatrização em ratos. In: II Simpósio sobre ácidos graxos e saúde; São Paulo: 2006: p. 70-2.
- [10] Belda MCR, Pourchet-Campos MA. Ácidos Graxos Essenciais em nutrição: uma visão atualizada. *Cien Tecnol Alimentos* 1991; 11(1): 3-4.

- [11] Moreira NX, Curi R, Mancini Filho J. Ácidos graxos: uma revisão. *Nutrire: Rev Soc Bras Aliment Nutrição*. 2002; 24: 105-23.
- [12] Jorge AS, Dantas SRPE. Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas. São Paulo: Atheneu; 2005.
- [13] Andrade SF. Manual de terapêutica veterinário. São Paulo: Roca; 2002. 697 p.
- [14] Galiano RD, Joseph-Michaels V, Dobryansky M, Levine J P, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen* 2004; 12(4): 485-92.
- [15] Prata M.B, Haddad CM, Goldenberg S, Simões MJ, Moura LAR, Trabulsi LR. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirur Bras* 1988; 3(2): 43-8.
- [16] Luna LG. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3a ed. New York: McGraw-Hill; 1968. 258 p.
- [17] Michalany J. Técnica histológica em anatomia patológica. 1a ed. São Paulo: Ed. Pedagógica e Universitária Ltda; 1980. 277 p.
- [18] Rocha Júnior AM, Oliveira RG, Farias LCR, Andrade LCR, Aarestrup FM. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *An Bras Derm*. 2006; 81: 150-6.
- [19] Miot HA, Brianezi, G. Morphometric analysis of dermal collagen by color clusters segmentation. *An Bras Dermatol*. 2010; 85(3): 361-4.
- [20] Ehrlich HP, Hunt TK. Effect of cortisone and vitamin A on wound healing. *Ann Surg*. 1968; 167: 324-8.
- [21] Urdiales AIA. Ocreotide na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos Dissertação [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Departamento de Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde; 2006.
- [22] Oliveira ST, et al. Formulações de confrei (*Symphytum Officinale* L.) Na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. *Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro. Uruguiana*. 2000/01; 7/8(1): 18-23.
- [23] Howel JP, Maquart FX. La cicatriscation. *La Reserch*. 1991; 22(236): 1174-81.

- [24] Shetty S, Udupa S, Udupa L. Evaluation of antioxidant and wound healing effects of alcoholic and aqueous extract of *Ocimum sanctum* Linn in rats. *eCAM*. 2008; 5: 95–101.
- [25] Nichter LS, Sobieski MW, Morgan RF, Rodeheaver G, Edlich RF. Quantitation of skin-flap survival: a computer-based method. *Plast Reconstr Surg*. 1984; 73: 684-6.
- [26] Demling RH, DeSanti L. Management of partial thickness facial burns (comparison of topical antibiotics and bio-engineered skin substitutes). *Burns*. 1999; 25: 256-61.
- [27] Bates-Jensen BM. Management of exsudate and infection. In: Sussman C, Bates-Jensen BM. Wound care: a collaborative practice manual for physical therapists and nurses. Gaithersburg: Aspen Publishers; 1998. p. 159-77.
- [28] Oliveira HP. Traumatismos nos animais domésticos. *Cad Téc Esc Vet*. 1992; 1(7):1-57.
- [29] Declair V. Tratamento de úlceras crônicas de difícil cicatrização com ácido linoleico. *J Bras Med*. 2002; 82(6): 36-41.
- [30] Kentlloyd KD. Wound healing. In: Auer JA, Stick JA: Equine Surgery. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992. p. 38-45.
- [31] Silva, P. Farmacologia. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. p. 1223-31.
- [32] Scardino ME, Swaim SF, Sartin EA, Hoffman CE, Oglivie GK, Hanson RA, Coolman SL, Davenport DJ. The effects of omega-3 fatty acid diet enrichment on wound healing. *Vet Dermatol*. 1999; 10: 283–90.
- [33] Altavilla D, Saitta A, Ucinotta D, Galeano M, Deodato B, Colonna M, Torre V, Russo G, Sardella A, Urna G, Campo GM, Cavallari V, Squadrito G, Squadrito F. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. *Diabetes*. 2001; 50: 667–74.
- [34] McDaniel JC, Belury M, Ahijevych K, Blakely W. Omega-3 fatty acids effect on wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008; 16: 337–45.
- [35] Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? *Nutr Res* 2001; 21:309–41.

Artigo II - submetido à revista “*Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine – eCAM*”

[36] Anggard E. Nitric oxide mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994; 343:1199–206.

[37] Albina JE, Gladden P, Walsh WR. Detrimental effects of na omega-3 fatty acid-enriched diet on wound healing. *J Parenter Enteral Nutr.* 1993; 7: 519–21.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- A administração tópica da FSSOL (1%, 5%, 10% ou 50%) não provoca nenhum indício de toxicidade aguda ou sub-crônica em roedores ou coelhos.

- A presença dos ácidos graxos essenciais (ω -3 e ω -6) ou óleo de linhaça não influenciou no tempo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. Entretanto, parecem favorecer a reepitelização no processo de reparação tecidual.

- O tratamento sub-crônico (14 dias consecutivo) com a FSSO (1%, 5% ou 10%) ou óleo de linhaça não provocou alteração na resistência da pele de ratos Wistar à tração mecânica no modelo de ferida incisional.

Baseados nesses resultados, o óleo de linhaça pode se apresentar como um potencial candidato a ser utilizado em preparações dermatológicas de base sólida, uma vez que este através do favorecimento da reepitelização influenciou na qualidade da reparação tecidual de feridas cutâneas excisionais de ratos Wistar.

7 ANEXOS

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 12 de agosto de 2009.

Ofício nº 172/09

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Prof^a: Maria Bernadete de Sousa Maia**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 007695 / 2009 - 19

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado ***"Avaliação pré-clínica da toxicidade dérmica e atividade cicatrizante de uma formulação semi-sólida do óleo de linhaça (Linum Usitatissimum) em roedores."***

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

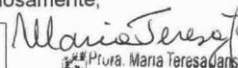
Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,

Observação:

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia; Animais: Ratos Wistar, Camundongos Albinos Swiss e Coelho Albinos Nova Zelândia; Sexo: Machos e Fêmeas; Idade: Adultos; Nº de Animais: 60 ratos, 30 camundongos, 18 coelhos.


Prof^a. Maria Teresa Dias
Presidente do CEEA
UFPE

CCB: Integrar para desenvolver

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A *Revista Brasileira de Plantas Medicinais - RBPM* é publicação trimestral e destina-se à divulgação de trabalhos científicos originais, revisões bibliográficas e notas prévias, que deverão ser inéditos e contemplar as grandes áreas relativas ao estudo de plantas medicinais. Manuscritos que envolvam ensaios clínicos deverão vir acompanhados de autorização de Comissão de Ética constituída, para realização dos experimentos. Os artigos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol, sendo sempre obrigatória a apresentação do resumo em português e em inglês, independente do idioma utilizado. Os artigos devem ser enviados por e-mail: rbpm@ibb.unesp.br, com letra Arial 12, espaço duplo, margens de 2 cm, em Word for Windows. Artigos muito extensos, fotografias e gráficos coloridos podem ser publicados, a critério do Corpo Editorial, se o autor se comprometer, mediante entendimentos prévios, a cobrir parte das despesas de publicação. No e-mail, enviar telefone para contatos mais urgentes.

REVISÕES BIBLIOGRÁFICAS E NOTAS PRÉVIAS

Revisões e Notas prévias deverão ser organizadas basicamente em: Título, Autores, Resumo, Palavras-chave, Abstract, Key words, Texto, Agradecimento (se houver) e Referência.

ARTIGO CIENTÍFICO

Os artigos deverão ser organizados em:

TÍTULO: Deverá ser claro e conciso, escrito apenas com a inicial maiúscula, negrito, centralizado, na parte superior da página. Se houver subtítulo, deverá ser em seguida ao título, em minúscula, podendo ser precedido de um número de ordem em algarismo romano. Os nomes comuns das plantas medicinais devem ser seguidos pelo nome científico entre parênteses, verificado em www.tropicos.org e www.ipni.org.

AUTORES: Começar pelo último sobrenome dos autores por extenso (nomes intermediários somente iniciais, sem espaço entre elas) em letras maiúsculas, 2 linhas abaixo do título. Após o nome de cada autor deverá ser colocado um número sobrescrito que deverá corresponder instituição e endereço (CEP, cidade, país). Indicar o autor que deverá receber a correspondência, com e-mail. Os autores devem ser separados com ponto e vírgula.

RESUMO: Deverá constar da mesma página onde estão o título e os autores, duas linhas abaixo dos

autores. O resumo deverá ser escrito em um único parágrafo, contendo objetivo, resumo do material e método, principais resultados e conclusão. Não deverá apresentar citação bibliográfica.

Palavras-chave: Deverão ser colocadas uma linha abaixo do resumo, na margem esquerda, podendo constar até cinco palavras, separadas com vírgula.

ABSTRACT: Apresentar o título e resumo em inglês, no mesmo formato do redigido em português, com exceção do título, em negrito, apenas com a inicial em maiúscula, que virá após a palavra **ABSTRACT**.

Key words: Abaixo do abstract deverão ser colocadas as palavras-chave em inglês, podendo constar até cinco palavras, separadas com vírgula.

INTRODUÇÃO: Na introdução deverá constar breve revisão de literatura e os objetivos do trabalho. As citações de autores no texto deverão ser feitas de acordo com os seguintes exemplos: Silva (1996); Pereira & Antunes (1985); (Souza & Silva, 1986) ou quando houver mais de dois autores Santos et al. (1996).

MATERIAL E MÉTODO: Deverá ser feita apresentação completa das técnicas originais empregadas ou com referências de trabalhos anteriores que as descrevam. As análises estatísticas deverão ser igualmente referenciadas. Na metodologia deverão constar os seguintes dados da espécie estudada: nome científico com autor; nome do herbário onde a excisada está depositada e o respectivo número (*Voucher Number*).

RESULTADO E DISCUSSÃO: Poderão ser apresentados separados ou como um só capítulo, podendo conter no final conclusão sumariada.

AGRADECIMENTO: deverá ser colocado neste capítulo (quando houver).

REFERÊNCIA: As referências devem seguir os exemplos:

Periódicos:

AUTOR(ES) separados por ponto e vírgula, sem espaço entre as iniciais. Título do artigo. Nome da Revista, por extenso, volume, número, página inicial-página final, ano.

KAWAGISHI, H. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydrate Research*, v.186, n.2, p.267-73, 1989.

Livros :

AUTOR. **Título do livro.** Edição. Local de publicação: Editora, Ano. Total de páginas.
MURRIA, R.D.H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S.A. **The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry** 3.ed. Chinchester: John Wiley & Sons, 1982. 702p.

Capítulos de livros:

AUTOR(ES) DO CAPÍTULO. **Título do Capítulo.** In: AUTOR (ES) do LIVRO. **Título do livro:** subtítulo. Edição. Local de Publicação: Editora, ano, página inicial-página final.
HUFFAKER, R.C. Protein metabolism. In: STEWARD, F.C. (Ed.). **Plant physiology: a treatise.** Orlando: Academic Press, 1983. p.267-33.

Tese ou Dissertação:

AUTOR. **Título em destaque:** subtítulo. Ano. Total de páginas. Categoria (grau e área de concentração) - Instituição, Universidade, Local.
OLIVEIRA, A.F.M. **Caracterização de Acanthaceae medicinais conhecidas como anador no nordeste do Brasil.** 1995. 125p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Botânica) - Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Trabalho de Evento:

AUTOR(ES). **Título do trabalho.** In: Nome do evento em caixa alta, número, ano, local. **Tipo de publicação em destaque...** Local: Editora, ano, página inicial-página final.
VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no Cerrado. In: INTERNATIONAL SAVANNA SYMPOSIUM, 3., 1996, Brasília. **Proceedings...** Brasília: Embrapa, 1996.

p.169-71.

Publicação Eletrônica:

AUTOR(ES). **Título do artigo. Título do periódico em destaque,** volume, número, página inicial-página final, ano. Local: editora, ano. Páginas. Disponível em: <http://www.....>. Acesso em: dia mês (abreviado) ano.
PEREIRA, R.S. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-8, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso em: 18 abr. 2005.

Não citar resumos e relatórios de pesquisa a não ser que a informação seja muito importante e não tenha sido publicada de outra forma. Comunicações pessoais devem ser colocadas no rodapé da página onde aparecem no texto e evitadas se possível. Devem ser, também, evitadas citações do tipo Almeida (1994) citado por Souza (1997).

TABELAS: Devem ser inseridas no texto, com letra do tipo Arial 10, espaço simples. A palavra TABELA (Arial 12) deve ser em letras maiúsculas, seguidas por algarismo arábico, quando citadas no texto devem ser em letras minúsculas (Tabela).

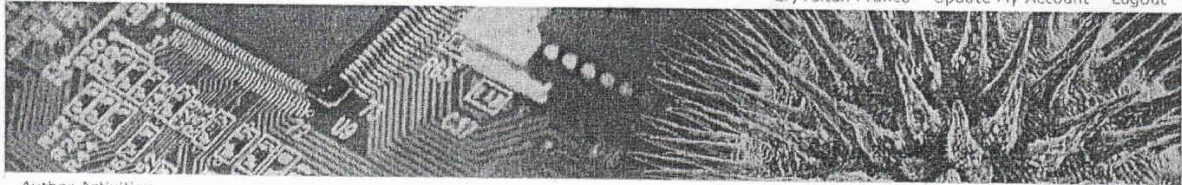
FIGURAS: As ilustrações (gráficas, fotográficas, desenhos, mapas) devem ser em letras maiúsculas seguidas por algarismo arábico, Arial 12, inseridas no texto. Quando citadas no texto devem ser em letras minúsculas (Figura). As legendas e eixos devem ser em Arial 10, enviadas em arquivos separados, com resolução 300 DPI, 800 x 600, com extensão JPEG, para impressão de publicação.

Processo de avaliação: Os manuscritos são analisados por pelo menos dois pareceristas, segundo roteiro de análise, baseado principalmente no conteúdo científico. Os pareceristas recomendarão a aceitação, com ou sem necessidade de retornar; recusa ou sugerir reformulações, que neste caso, o artigo reformulado retornará aos pareceristas para avaliação final. Quando no mínimo 2 pareceristas aprovarem, sem necessidade de retornar, o artigo estará pronto para ser publicado. Os nomes dos pareceristas permanecerão em sigilo, omitindo-se também perante estes os nomes dos autores.

Direitos autorais: Ao encaminhar um manuscrito para a revista, os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para a Revista Brasileira de Plantas Medicinais. A revista não recusará as solicitações legítimas dos autores para reproduzir seus artigos.

ATENÇÃO: Artigos que não estiverem de acordo com essas normas serão devolvidos.

Observação: São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos. Contudo, reserva-se ao Corpo Editorial, o direito de sugerir ou solicitar modificações que julgarem necessárias.



Author Activities

ECAM/270752.v1 (Research Article)

Title	 Effect of a semi-solid formulation of <i>Linum usitatissimum</i> L. (flaxseed) oil on the repair of skin wounds
Journal	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Issue	Regular
Manuscript Number	270752.v1 (Research Article)
Submitted On	2011-02-03
Authors	 Eryvelton Franco,  Camilla Aquino,  Paloma Medeiros,  Liriane Evêncio,   Alexandre Góes,  Maria Bernadete Souza Maia
Editor	
Editorial Recommendation	Decision not finalized

II - Instruções aos autores – Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine - eCAM



[About this Journal](#) [Submit a Manuscript](#) [Table of Contents](#)

Journal Menu

[Abstracting and Indexing](#)
[Aims and Scope](#)
[Article Processing Charges](#)
[Articles in Press](#)
[Author Guidelines](#)
[Bibliographic Information](#)
[Contact Information](#)
[Editorial Board](#)
[Editorial Workflow](#)
[Free eTOC Alerts](#)
[Reviewers Acknowledgment](#)
[Subscription Information](#)

[Open Special Issues](#)
[Special Issue Guidelines](#)

Author Guidelines

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact ecam@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, or thesis) and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to ecam@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. Submissions will be considered by an editor and—if not rejected right away—by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Article Processing Charges

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, please visit the [Article Processing Charges Information](#) page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 150 words.