

**Potencial terapêutico de Fármacos com ativos de *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum* no
tratamento de lesões térmicas**

**Therapeutic Potential of *Bixa orellana* L. and *Triticum aestivum* active drugs in the
treatment of thermal lesions**

**Potencial terapêutico de *Bixa orellana* L. y *Triticum aestivum* Fármacos activos en el
tratamiento de lesiones térmicas**

Recebido: 10/12/2019 | Revisado: 11/12/2019 | Aceito: 16/12/2019 | Publicado: 22/12/2019

Sabrina de Oliveira Capella

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8252-2096>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: capellas.oliveira@gmail.com

Fernanda Dagmar Martins Krug

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9123-9399>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: fernandadmkrug@gmail.com

Mariana Teixeira Tillmann

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8693-2567>

Universidade do Oeste de Santa Catarina, Brasil

E-mail: mariana.tillmann@unoesc.edu.br

Renato Vianna

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0604-4867>

Universidade Católica de Pelotas, Brasil

E-mail: renatoviannafarm@hotmail.com

Bianca Camargo Aranha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3478-4478>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: bianca_camargo@live.com

Fábio Clasen Chaves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5773-0800>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: chavesfc@gmail.com

Rogério Antonio Freitag

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3714-2080>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: rafreitag@gmail.com

Fábio Raphael Pascoti Bruhn

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4191-965X>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: fabio_rpb@yahoo.com.br

Cristina Gevehr Fernandes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0729-2099>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: crisgevf@yahoo.com.br

Márcia de Oliveira Nobre

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3284-9167>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: marciaonobre@gmail.com

Resumo

Lesões térmicas configuram um tipo diferenciado de ferida cutânea, necessitando de atenção adequada. Sendo assim, objetivou-se avaliar a ação terapêutica de extratos de *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum* como ativos em formulações tópicas frente a lesões térmicas de 2º grau em modelo experimental. Primeiramente, identificou-se os compostos do óleo de urucum. No ensaio, feridas induzidas experimentalmente foram tratadas diariamente com: fórmula contendo óleo de urucum e extrato aquoso de trigo (LCFT 2001), fórmula com óleo de urucum e extrato etanólico de trigo (LCFT 2002), pomada comercial (CP), ausência de tratamento (CN). Aos dois, cinco, oito, 14 e 25 dias, avaliou-se clinicamente a presença de exsudato, edema, necrose, crosta, granulação e epitelização. Também, determinou-se a área de lesão, e amostras de pele foram coletadas para avaliação histológica e tensiométrica. Clinicamente, aos oito dias, as fórmulas apresentaram menor percentual de crosta que os grupos controle e ainda LCFT 2001 demonstrou maior percentual de granulação. Histologicamente, aos cinco dias o LCFT 2002 apresentou angiogênese semelhante ao CP, porém menor inflamação. Aos oito dias, as fórmulas continham angiogênese em arcos, enquanto os grupos controle angiogênese fina e o LCFT 2001 demonstrou inflamação exuberante, enquanto o CP com inflamação moderada. Conclui-se que formulações contendo extratos de trigo e urucum, estimulam a cicatrização de lesões térmicas.

Palavras-chave: Queimadura; Pequenos animais; Cicatrização; Inflamação.

Abstract

Thermal lesions constitute a differentiated type of skin wound, requiring adequate attention. Thus, the objective of this study was to evaluate the therapeutic action of *Bixa orellana* L. and *Triticum aestivum* extracts as active in topical formulations against 2nd degree thermal lesions in an experimental model. First, the annatto oil compounds were identified. In the trial, experimentally induced wounds were treated daily with: formula containing annatto oil and aqueous wheat extract (LCFT 2001), formula containing annatto oil and ethanolic wheat extract (LCFT 2002), commercial ointment (CP), no treatment (CN). At two, five, eight, 14 and 25 days, the presence of exudate, edema, necrosis, crust, granulation and epithelialization was clinically evaluated. Also, the lesion area was determined, and skin samples were collected for histological and tensiometric evaluation. Clinically, at eight days, the formulas presented lower percentage of crust than the control groups and LCFT 2001 showed higher percentage of granulation. Histologically, at five days, LCFT 2002 presented angiogenesis similar to CP, but less inflammation. At eight days, the formulas contained angiogenesis in arches, whereas the control groups fine angiogenesis and the LCFT 2001 showed exuberant inflammation, while the CP with moderate inflammation. It is concluded that formulations containing extracts of wheat and annatto stimulate the healing of thermal lesions.

Keywords: Burn; Small animals; Healing; Inflammation.

Resumen

Las lesiones térmicas constituyen un tipo diferenciado de herida en la piel, que requiere atención adecuada. Así, el objetivo de este estudio fue evaluar la acción terapéutica de los extractos de *Bixa orellana* L. y *Triticum aestivum* como activos en formulaciones tópicas contra lesiones térmicas de segundo grado en un modelo experimental. Primero, se identificaron los compuestos de aceite de annato. En el ensayo, las heridas inducidas experimentalmente se trataron diariamente con: fórmula que contiene aceite de achiote y extracto acuoso de trigo (LCFT 2001), fórmula que contiene aceite de achiote y extracto de trigo etanólico (LCFT 2002), pomada comercial (CP), sin tratamiento (CN) A los dos, cinco, ocho, 14 y 25 días, se evaluó clínicamente la presencia de exudado, edema, necrosis, corteza, granulación y epitelización. Además, se determinó el área de la lesión y se recogieron muestras de piel para evaluación histológica y tensiométrica. Clínicamente, a los ocho días, las fórmulas presentaron un menor porcentaje de corteza que los grupos de control y LCFT

2001 mostrou un mayor porcentaje de granulaci3n. Histol3gicamente, a los cinco d3as, LCFT 2002 present3 una angiog3nesis similar a la CP, pero menos inflamaci3n. A los ocho d3as, las f3rmulas conten3an angiog3nesis en arcos, mientras que los grupos de control de angiog3nesis fina y el LCFT 2001 mostraron inflamaci3n exuberante, mientras que la CP con inflamaci3n moderada. Se concluye que las formulaciones que contienen extractos de trigo y anato estimulan la curaci3n de las lesiones t3rmicas.

Palabras clave: Quemaduras; Pequeños animales; Curaci3n; Inflamaci3n.

1. Introdu3o

Les3es t3rmicas ocorrem em consequ3ncia de acidentes dom3sticos, como mordidas em fios el3tricos, uso de colch3es t3rmicos e inc3ndios. Mesmo que comumente elas n3o levem risco de vida ao paciente, este tipo de les3o pode levar a complica33es sist3micas graves (Pavletic, 2018). Ap3s a ocorr3ncia de um acidente t3rmico o organismo sofre uma necrose de coagula33o que segue em expans3o por at3 48 horas ap3s a inj3ria. Conforme a intensidade do calor e tempo de contato com a pele se determina a profundidade da les3o que 3 didaticamente dividida em primeiro, segundo e terceiro grau (Vale, 2005).

A queimadura de primeiro grau acomete apenas a epiderme, apresenta eritema, dor e calor, e n3o desenvolve complica33es sist3micas. Enquanto as les3es de segundo grau acometem toda epiderme e a derme de forma superficial ou profunda, decorrem com dor, eritema, calor e eros3o, e podem apresentar complica33es sist3micas. J3 as de terceiro grau atingem a epiderme, derme e hipoderme at3 o subcut3neo, com caracter3sticas escura e firme com grandes chances de apresentar complica33es sist3micas (Vale, 2005).

Dessa forma, les3es t3rmicas s3o um desafio para o m3dico veterin3rio, que necessita conhecer sua fisiopatologia e as condi33es de cada afec33o para que possa efetuar o tratamento adequado (Vaughn & Beckel, 2012). Entre os diversos tratamentos t3picos dispon3veis no mercado, o uso de compostos naturais 3 cada vez mais explorado, j3 se tem conhecimento do uso de babosa, cal3ndula, berberis e erva de s3o jo3o em les3es cut3neas, inclusive na medicina veterin3ria (Vujanovic & Vujanovic, 2013; Drudi et al, 2018).

Al3m dessas plantas, estudos apontam potencial a33o cicatrizante de extratos de urucum em feridas abertas, com efeito pr3-inflamat3rio e indutor de angiog3nese (Santos et al, 2014; Sharma & Roy, 2014; Capella et al, 2016). E, tamb3m, a a33o de extratos de trigo como um estimulante da fibroplasia (Tillmann et al, 2014; Sanguigno et al, 2015; Tillmann et al, 2018). Por isso, objetivou-se avaliar a a33o terap3utica de extratos de *Bixa orellana* L. e

Triticum aestivum como ativos em formulações tópicas frente a lesões térmicas de 2º grau em modelo experimental.

2. Metodologia

Os extratos vegetais foram obtidos a partir de sementes das plantas *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum*, adquiridas comercialmente com origem certificada e ficha técnica. As sementes das plantas foram secas e trituradas para aumentar a superfície de contato, favorecendo as extrações. Para as sementes de *Bixa orellana* L. utilizou-se a técnica Sohlet com hexano como solvente, a uma temperatura de 68°C, por seis horas. O óleo fixo obtido passou pelo evaporador rotativo para remoção do solvente e obtenção do óleo de urucum purificado. O óleo foi, então, acondicionado em refrigerador (4°C), ao abrigo da luz, até sua utilização. Enquanto para as sementes de *Triticum aestivum* utilizou-se duas formas distintas. A primeira pela técnica de sonificação por ultra-som, utilizando 50 gramas de trigo em 500 ml de água destilada mantidos em sonificação durante 30 minutos, obtendo um extrato aquoso. Após, o extrato foi filtrado, liofilizado e armazenado em ultrafreezer -80°C. A segunda técnica utilizada para a obtenção de um extrato etanólico, ocorreu pela mesma técnica de sonificação por ultra-som, utilizando 25g de sementes em 150mL de solvente álcool etílico, mantidos em sonificação durante 30 minutos. Após, o solvente foi eliminado em rotaevaporador e o extrato armazenado em ultrafreezer -80°C.

Para a quantificação e identificação dos compostos presentes no extrato oleoso de *Bixa orellana* L. utilizou-se equipamento Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra com autoinjeter AOC-20i e biblioteca de espectro de massas NIST 2011. Parâmetros de injeção, cromatografia e espectrometria de massas seguiram o método proposto por Lisec *et al.* (2006), no qual 1µL de amostra foram injetados a 230°C para temperatura do injetor e razão de *split* para injeção de 1:100. Além disso, obteve-se o perfil de ácidos graxos totais do extrato, sendo determinada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, seguindo o método descrito pelo COI (2015).

Nas amostras de trigo (extrato aquoso e etanólico) a obtenção dos metabólitos e as condições analíticas ocorreram com base no método proposto por De Vos *et al.* (2007). A matriz gerada foi processada no software MetaboAnalyst 4.0 no formato .csv e a normalização dos dados para o modo negativo foi realizada pela mediana e escalonamento de Pareto. Para a análise univariada foram utilizados Teste-t ($p \leq 0,01$) e Fold Change [$\log_2(\text{FC})$] ($+3,0 \leq x \leq -3,0$). Os íons que apresentaram diferença pelo Test-t e $\log_2(\text{FC})$ foram

identificados através da comparação dos valores de m/z experimental com os valores de m/z teóricos e perfil de fragmentação obtidos em bases de dados online como FooBD (<http://foodb.ca/spectra/ms/search>), METLIN (<https://metlin.scripps.edu>), HMDB (<http://www.hmdb.ca/spectra/ms/search>) e PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) com um intervalo de precisão de 10 ppm. As fórmulas moleculares sugeridas nas bases de dados foram comparadas com as fórmulas obtidas através do SmartFormula, ferramenta disponível no software DataAnalysis 4.2, que disponibiliza uma lista com a razão m/z, íon formula e padrão isotópico das possíveis fórmulas moleculares.

A confecção das formulações se deu com os três extratos vegetais em diferentes combinações. O primeiro contendo o extrato oleoso de *B. orellana* L. e extrato aquoso de *T. aestivum* (fórmula LCFT-2001), o segundo apresentando o extrato oleoso de *B. orellana* L. e o extrato etanólico de *T. aestivum* (fórmula LCFT-2002), sendo todos os extratos utilizados em concentrações habilitadas em estudos anteriores (Tillmann et al, 2014; Capella et al, 2016). Apresentação de ambas formulações foi em creme, visto que se elaborou emulsões formadas por uma fase hidrofílica (contendo os diferentes extratos de *T. aestivum*) e uma fase lipofílica (contendo o extrato oleoso de *B. orellana* L.). Na elaboração dos produtos difundiu-se os compostos ácido esteárico, monoestearato de glicerila, lanolina, vaselina sólida, vaselina líquida, metilparabeno, propilparabeno, propilenoglicol, trietanolamina, extrato oleoso de *B. orellana* L. e o extrato aquoso de *T. aestivum* (fórmula LCFT-2001) ou o extrato etanólico de *T. aestivum* (fórmula LCFT-2002).

Para este estudo foram utilizados *Rattus norvegicus albinus* oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Todos machos (60 dias) da linhagem Wistar, os quais foram mantidos com água e ração específica *ad libitum* durante todo período experimental. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal – UFPel, sob processo nº 23110.001878/2016-96 recebendo o código nº 1872-2016. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, de acordo com o tratamento recebido: fórmula LCFT-2001 (grupo LCFT-2001), fórmula LCFT-2002 (grupo LCFT-2002), formulação comercial a base de colagenase (grupo controle positivo - CP) e ausência de tratamento (grupo controle negativo - CN). Os animais receberam anestesia dissociativa com associação de xilazina (10mg/kg) e cetamina (100mg/kg), por via intraperitoneal, para a confecção de duas lesões térmicas de segundo grau no dorso, utilizando equipamento de ponta cúbica metálica a uma temperatura de 100°C durante 20 segundos de acordo com o descrito por Capella *et al.* (2018). Os animais receberam cloridrato de tramadol (5mg/Kg), via subcutânea no transoperatório, 12 e 24 horas após o procedimento, afim de estabelecer

analgésia aos mesmos. Cada ferida foi tratada imediatamente após o procedimento cirúrgico e diariamente com a aplicação de 0,1mL dos tratamentos propostos. O período experimental totalizou 25 dias de tratamento e aos dois, cinco, oito, 14 e 25 dias, parte dos animais foi eutanasiada (conforme anexo da resolução normativa nº 37, de janeiro de 2018, CFMV) para avaliação clínica, histopatológica e tensiométrica das lesões.

Na avaliação clínica, as lesões de cada grupo nos diferentes tempos de tratamento, foram observadas quanto à presença/ausência de exsudato, crosta, tecido de granulação, tecido necrótico, edema e epitelização. Para a análise de retração cicatricial, realizou-se o registro fotográfico das lesões utilizando-se câmera fotográfica digital (Samsung ES17) fixada ao tripé, de modo a mantê-la a 15cm de distância da ferida. A imagem obtida tratada no programa GIMP 2[®] para obtenção de uma camada única da lesão e posteriormente, no programa Image J[®] onde determinou-se a área da lesão em mm².

As amostras de tecido coletadas na necropsia foram fixadas em formol 10%, processadas, coradas em hematoxilina-eosina e avaliadas, atribuindo-se escores aos seguintes parâmetros: epitelização, padrão de colágeno, inflamação e angiogênese. Para a avaliação tensiométrica, utilizou-se um molde em formato de ampulheta para que as amostras de pele contivessem duas extremidades para fixação ao equipamento e a ferida não apresentasse pele íntegra adjacente. Utilizou-se dez amostras de cada grupo de tratamento aos 25 dias, nas quais se verificou a tensão (Pascal) máxima suportada pela área da lesão no momento da deformação, por meio da máquina universal de ensaio (DL 500).

Para os dados contínuos (área e tensiometria) as diferenças entre os tratamentos nos diferentes tempos foram avaliados por meio de testes Anova com dois fatores (tratamento e tempo), seguidos de comparação múltipla por meio de teste de LSD, depois de aplicados os testes de normalidade de Kolmogorov-smirnov e Homoscedasticidade de Levene. Já as avaliações histopatológicas avaliadas em escore foram comparadas por meio de teste de Friedmann seguidas de comparação múltipla pelo teste de Dunn. O efeitos dos diferentes tratamentos sobre os parâmetros clínicos (presença/ausência), nos diferentes tempos foram avaliados por testes exato de Fisher. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio dos softwares SPSS[®] 20.0 e Epiinfo[®] 7.2.2.6. Considerou-se o valor mínimo de confiança de 95% em todas as análises estatísticas.

3. Resultados

Na análise cromatográfica metabolômica obteve-se os compostos do extrato oleoso de *Bixa orellana* L. descritos na tabela 1. Também realizou-se a análise de ácidos graxos presentes nesse extrato identificando os compostos citados na tabela 2.

Tabela-1: Metabólitos identificados por GC/MS no extrato de *Bixa orellana* L.

Identificação	Tempo de Retenção
Benzene, 1-ethyl-4-methyl-	3.324
Undecane, 3,8-dimethyl-	4.318
Dodecane, 2,6,10-trimethyl-	4.438
Benzene, 1,3-bis(1-methylethyl)-	5.079
Benzene, 1,4-bis(1-methylethyl)-	5.307
Anethole	6.485
Cyclohexene, 4-ethenyl-4-methyl-3-(1-methylethenyl)-1-(1-methylethyl)-, (3R-trans)-	6.996
.alpha.-Cubebene	7.114
.alfa.-Copaene	7.384
.gamma.-Muurolene	7.507
(-)-Aristolene	7.778
Bicyclo[5.2.0]nonane, 2-methylene-4,8,8-trimethyl-4-vinyl-	7.810
.beta.-copaene	7.883
.alpha.-Guaiene	8.232
Isoledene	8.662
(-).alpha.-Panasinsen	8.754
1,4-Benzenediol, 2,3,5-trimethyl-	9.100
Selina-6-en-4-ol	9.485
(-)-Globulol	9.927
1,3a-Ethano(1H)inden-4-ol, octahydro-2,2,4,7a-tetramethyl-	10.080
Isoledene	11.914
Hexadecanoic acid, ethyl ester	11.953
geranyl-.alpha.-terpinene	11.990
Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	12.281
Epiglobulol	12.511
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	12.616

9,12-Octadecadienoic acid, ethyl ester	13.021
Hexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-ol, 3,7,11,16-tetramethyl- trans-Geranylgeraniol	13.249
Squalene	13.394
.gamma.-Tocopherol	16.532
2-(3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienyl)-4-methoxy-phenol	17.619
Ergost-5-en-3-ol, (3.beta.)-	17.701
Stigmasterol	18.545
.gamma.-Sitosterol	18.691
Fucosterol	18.995
Stigmast-4-en-3-one	19.087
Stigmasta-4,24(28)-dien-3-one, (24E)-	19.807
Farnesyl bromide	19.907
	20.037

Tabela-2: Identificação de ácidos graxos presentes no extrato oleoso de *Bixa orellana* L.

Identificação	Tempo de Retenção
Capric acid	8,704
2-Decenoic acid	8,961
2-Hexadecenoic acid	10,212
6-Octadecenoic acid	12,773
Pentadecanoic acidr	13,075
9-Hexadecenoic acid	14,565
Hexadecanoic acid	15,168
Linoleic acid	20,716
Linolenic acid	20,816
Oleic acid	21,116
Elaidic acid	21,362
Stearic acid	22,286
cis-11-Eicosenoic acid	24,212
Eicosanoic acid, methyl ester	24,424
Heneicosanoic acid	26,854

No *Triticum aestivum* identificou-se os principais compostos distintos entre os extratos etanólico e aquoso em uma análise metabolômica (tabela 3) e de compostos fenólicos presentes em ambos extratos (tabela4).

Tabela-3: Metabólitos detectados por LC-MS/MS que apresentaram diferença significativa ($p \leq 0.01$ e fold-change (FC) ≥ 3.0) entre os tratamentos

Identificação tentativa	Extrato Aquoso x Etanólico	
	Log2(FC)	p-valor
(-)-Pinellic acid	-3,31	9,44e-09
Maleic acid	-3,68	1,55e-08
5-5'-Dehydrodiferulic acid	-1,68	3,02e-08
9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid	-3,88	3,58e-07
Ricinoleic acid	3,21	8,08e-07
Mallic acid	-3,65	2,77e-06
Pinellic acid	-2,34	7,01e-06
hydroxy-hexadecanoic acid	1,78	0,00016
9-hydroperoxy-10E,12-octadecadienoic acid	2,92	0,00018
9,10-Epoxy-18-hydroxy-octadecanoic acid	2,09	0,00069
Octadeca-2,9-dienoic acid	1,92	0,00105

Tabela-4: Teor de compostos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$) em extratos de trigo

Identificação	Extrato	
	Aquoso	Etanólico
Ácido Hidroxibenzoico	ND	17.53±2.65
Ácido cafeico	ND	0.96
Catequina	3.28±0.10	ND
Ácido ferúlico	24.64±0.81	154.79±24.80
Ácido p-coumárico	2.18±0.01	5.23±0.61
Ácido sinápico	ND	14.86±2.10
Ácido siríngico	5.14±0.14	10.05±2.14
Ácido vanílico	26.39±3.43	72.54±15.19
Ácido salicílico	6.39±1.16	157.67±15.27

ND- Não detectado

Na avaliação clínica de lesões térmicas, analisando as lesões de cada grupo, nos diferentes tempos de tratamento, quanto à presença/ausência de exsudato, crosta, tecido de granulação, tecido necrótico, edema e epitelização, obteve-se resultados promissores em relação aos fármacos testados. Quanto aos parâmetros exsudato e reepitelização, as lesões não diferiram entre os grupos de tratamento, apresentando valores semelhantes ao longo do tempo de cicatrização (Fig. 1). A formulação LCFT 2002 apresentou maior presença de edema aos dois dias de tratamento, diferindo estatisticamente dos grupos LCFT 2001 e controle positivo ($p=0,02$) (Fig. 1). Contudo, essa diferença não manteve-se nos demais momentos de avaliação em que os grupos apresentaram-se de forma similar. Quanto a presença de tecido necrótico, tecido de granulação e crosta, o LCFT 2002 apresentou, já aos dois dias de tratamento, menor presença de tecido necrótico e maior presença de tecido de granulação diferindo dos grupos LCFT 2001 ($p=0,01$ e $p=0,05$) e controle negativo ($p=0,03$ e $p=0,05$), sugerindo uma aceleração do processo cicatricial (Fig. 1).

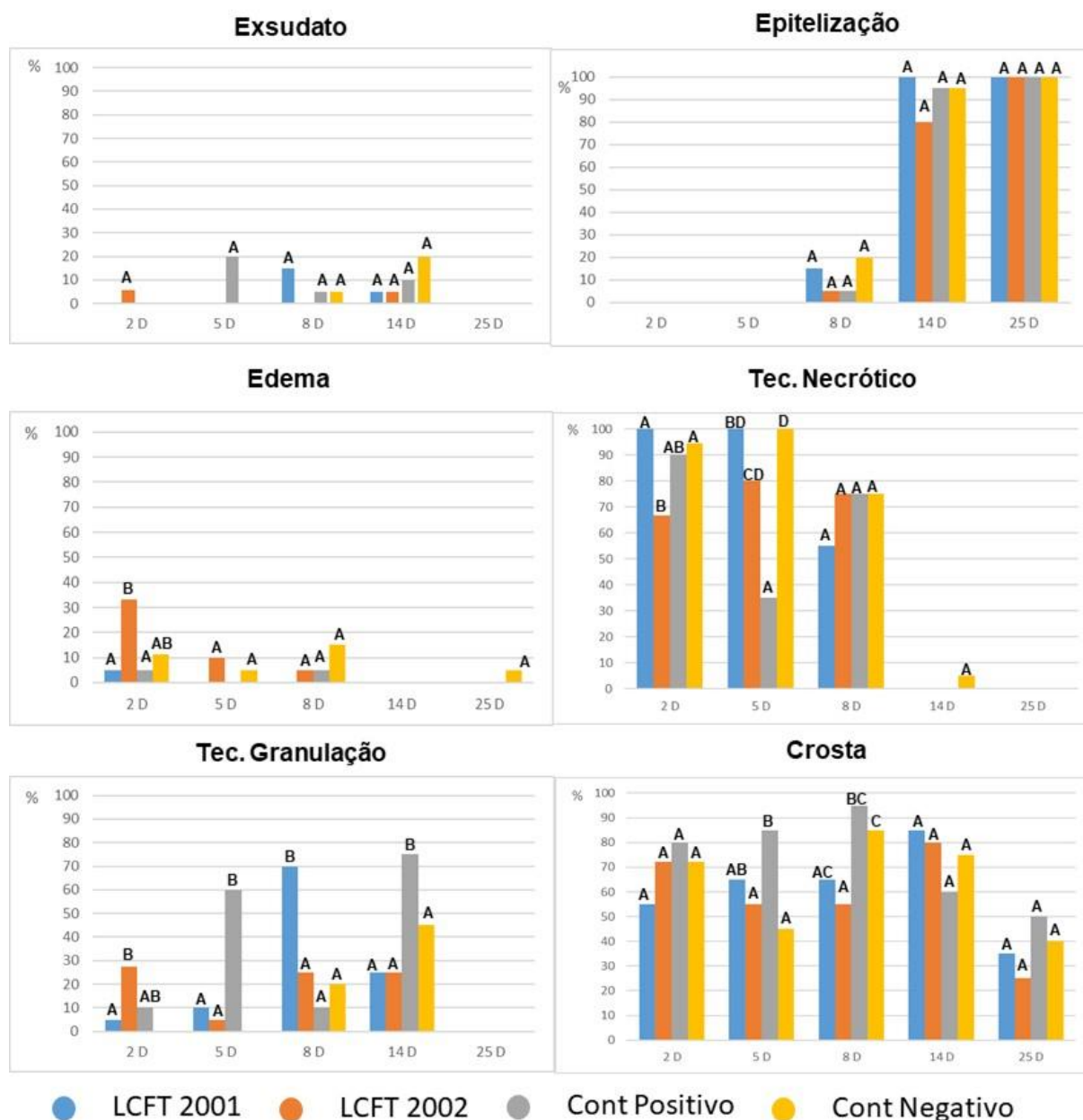


Figura 1. Percentual de presença de exsudato, epitelização, edema, tecido necrótico, tecido de granulação e crosta de feridas tratadas com LCFT 2001, LCFT 2002, produto comercial e sem tratamento, aos dois, cinco, oito, 14 e 25 dias. Letras diferentes representam frequências estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Aos cinco dias a evolução cicatricial era próxima entre os grupos de tratamento, sendo o grupo controle positivo com significativa menor presença de tecido necrótico e maior presença de crosta e tecido de granulação quando comparado aos demais grupos ($p \leq 0,05$). Já aos oito dias o grupo controle positivo (GP) manteve a alta presença de crostas, enquanto os grupos tratados com as formulações testes foram significativamente menores (Fig. 1). Além

disso, o grupo LCFT 2001 apresentou a maior presença de granulação diferindo dos demais grupos ($p \leq 0,004$), sugerindo a maior regeneração do tecido cutâneo em relação aos demais tratamentos.

Aos 14 dias os tratamentos testados mostraram valores semelhantes ao controle positivo nos parâmetros: tecido necrótico e crosta. Enquanto o grupo controle positivo apresentou maior presença de tecido de granulação diferindo dos demais grupos neste momento de avaliação ($p \leq 0,05$). Aos 25 dias não foi observado presença de tecido necrótico e/ou de granulação nas lesões cutâneas. Ainda neste período o grupo GP., apresentou maior presença de crosta em relação aos demais grupos apesar de não diferir estatisticamente dos demais grupos (Fig. 1).

Quanto a área de lesão observou-se que aos dois dias de tratamento todos os grupos apresentaram lesões de tamanho semelhantes, não diferindo entre si. Já aos cinco dias o grupo controle negativo expressou menor área diferindo do grupo controle positivo ($p=0,005$) e LCFT 2002 ($p=0,005$), e o grupo controle positivo com maior área em relação ao grupo LCFT 2001 ($p=0,005$). Enquanto aos oito dias de tratamento o grupo LCFT 2001 demonstrou menor área de lesão em média diferindo dos demais grupos ($p=0,005$). Esta diferença não manteve-se nos demais momentos de avaliação, com a redução da área de lesão em todos os grupos de forma semelhante expressando a evolução cicatricial de todos os grupos.

Na avaliação tensiométrica todos os grupos de tratamento apresentaram resistência semelhantes, não diferindo estatisticamente, sendo o grupo tratado com LCFT 2002 apresentando valores numéricos maiores quando comparado aos demais grupos de tratamento (Tab 5).

Tabela 5. Tensão média suportada pelas amostras de tecido cutâneo com lesão térmica de 2º grau, que receberam os diferentes tratamentos durante o período de 25 dias.

Grupo de Tratamento	Tensão média suportada (Pa)
LCFT 2001	0,22
LCFT 2002	0,27
C P	0,26
C N	0,24

Histologicamente, quando observadas as amostras de pele, verificou-se, em todos os grupos, a evolução cicatricial dentro dos padrões fisiológicos. Aos dois dias de tratamento todos os grupos apresentaram ausência de colágeno, reepitelização, de angiogênese e

quantidade de inflamação moderada não diferindo entre si. Aos cinco dias de tratamento todos os grupo apresentaram reepitelização inicial, não diferindo entre si (Fig. 2). Quanto ao padrão colágeno, o grupo controle positivo demonstrou alta quantidade de colágeno tipo fino, sendo similar ao grupo LCFT 2002, mas diferindo significativamente dos grupos LCFT 2001 ($p=0,001$) e controle negativo ($p=0,006$) em que prevaleceu a ausência de colágeno (Fig. 2). Da mesma forma na avaliação de angiogênese o grupo controle positivo diferiu dos grupos controle negativo ($p=0,006$) e LCFT 2001 ($p=0,047$), apresentando alta quantidade de vasos novos em padrão fino enquanto os demais ainda tinham ausência de angiogênese (Fig. 2). Já o grupo LCFT 2002, também apresentou uma angiogênese mais avançada diferindo do grupo controle negativo ($p=0,029$). Ainda aos cinco dias de tratamento o grupo controle positivo exibiu uma inflamação exuberante, diferindo do grupo LCFT 2001 que tinha inflamação leve ($p=0,000$). Os grupos LCFT 2002 e controle negativo demonstraram inflamação moderada semelhante ao grupo controle positivo, não diferindo estatisticamente. (Fig. 2).

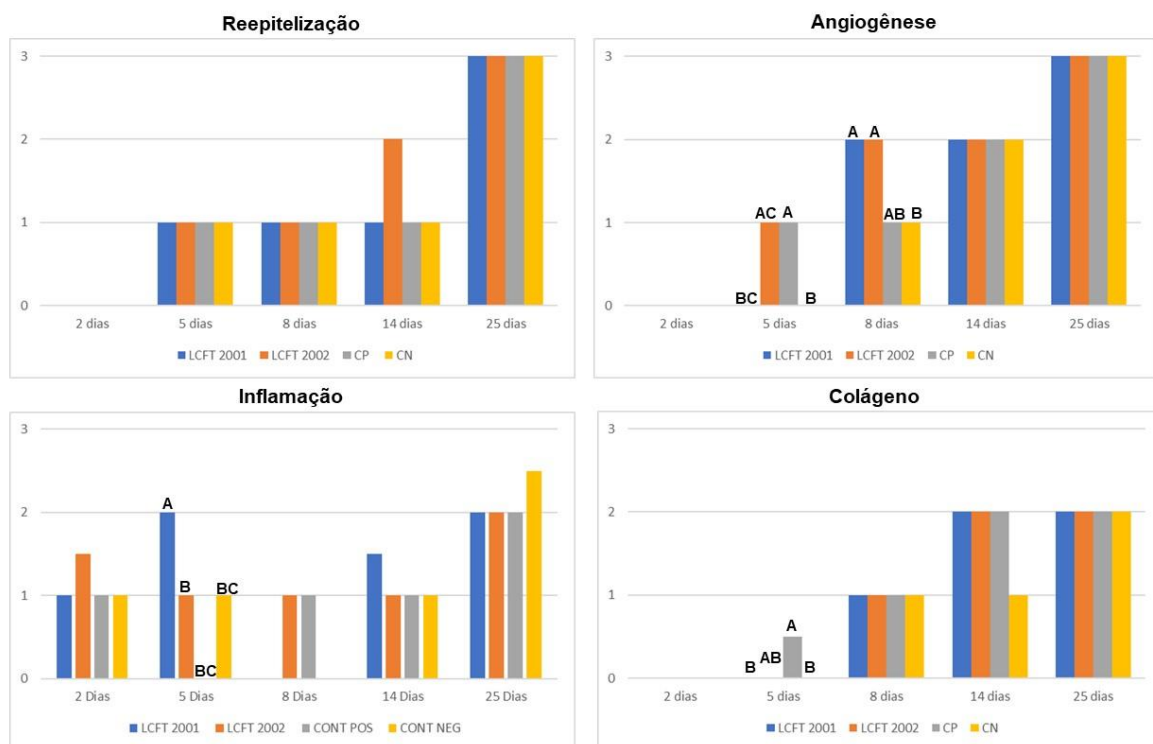


Figura 2. Demonstração da mediana de reepitelização, indicando ausência (0), inicial (1), moderada (2), completa (3); de angiogênese, indicando ausência (0), padrão alto/fino (1), padrão alto/arcos (2), baixo/grosso (3); de inflamação, indicando exuberante (0), moderada (1), discreta (2), ausência (3); de colágeno, indicando ausência (0), padrão alto/fino (1), padrão alto/denso (2), baixo/denso (3); de feridas tratadas com LCFT 2001, LCFT 2002,

colagenase e sem tratamento, aos dois, cinco, oito, 14 e 25 dias. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Aos oito dias de tratamento todos os grupos de tratamento estavam com alta quantidade de colágeno de padrão fino e com reepitelização inicial. Já nas avaliações de angiogênese os grupos testes diferiram significativamente do grupo controle negativo ($p \leq 0,01$) (Fig. 2). As lesões tratadas com LCFT 2001 e LCFT 2002 apresentaram alta quantidade de novos vasos sanguíneos do tipo em arcos, enquanto os grupos controles está angiogênese era alta, mas ainda de vasos finos. Além disso, os grupos LCFT 2001 e controle negativo demonstraram inflamação exuberante em suas lesões, enquanto os grupo controle positivo e LCFT 2002 estavam com inflamação moderada diferindo entre eles ($p = 0,05$) (Fig. 2).

Aos 14 dias as amostras tratadas com as fórmulas tópicas e o grupo controle positivo se equipararam, com colágeno denso em alta quantidade, enquanto no grupo controle negativo o colágeno ainda era padrão fino em alta quantidade, porém sem diferenças estatísticas. Além disso, o grupo LCFT 2002 demonstrou uma reepitelização moderada nesse momento, enquanto os demais grupos permaneciam com reepitelização inicial, mas também sem diferenças estatísticas significativas. Para a angiogênese, todos os tratamentos expressaram um padrão de alta quantidade de vasos sanguíneos do tipo em arcos. E ainda aos 14 dias todos os grupos apresentaram inflamação moderada.

Por fim, aos 25 dias de tratamento todos os grupos demonstraram aspectos semelhantes dos parâmetros analisados na histopatologia, estando com padrão de colágeno denso em alta quantidade, reepitelização completa, baixa quantidade de novos vasos sanguíneos do tipo maduros e leve inflamação (Fig. 2).

4. Discussão

Os resultados gerados neste estudo mostram que o tratamento de feridas cutâneas com as formulações tópicas contendo os ativos *Triticum aestivum* e *Bixa orellana* L. são capazes de acelerar a cicatrização. Neste estudo, aos cinco dias de tratamento as formulações tópicas contendo os ativos dos extratos vegetais demonstraram clinicamente maior percentual de tecido necrótico e menores percentuais de crosta e tecido de granulação quando comparados ao grupo controle positivo. Assim como na avaliação histopatológica em que o grupo controle positivo apresentou maior infiltrado inflamatório, angiogênese e colágeno em relação aos grupos testes. Ainda, em relação a área de lesão, os grupos testes e o grupo controle positivo

expandiram suas áreas diferindo do grupo controle negativo. Nesse momento observando em conjunto às análises realizadas, o grupo controle positivo comportou-se conforme o esperado para este tipo de lesão cutânea, visto que a colagenase é uma enzima que atua na desnaturação das estruturas de colágeno, assim possui comprovada ação terapêutica na cicatrização de lesões térmicas agindo no desbridamento da lesão (Hussein Ali E Adnan, 2018).

De forma menos evidente os grupos tratados com as fórmulas tópicas expressaram pequena ação cicatrizante. Os compostos identificados no extrato oleoso de *Bixa orellana* L. possuem conhecida ação terapêutica, como os terpenos com ação anti-inflamatória, analgésica e antibiótica (Silva *et al.*, 2018) e os ácidos graxos que são amplamente utilizados no tratamento de lesões cutâneas em geral estimulando a cicatrização (Mota *et al.*, 2015).

Ainda aos cinco dias de tratamento, em relação aos grupos testes observou-se que o LCFT 2002 demonstrou menor percentual de tecido necrótico em relação ao LCFT 2001, demonstrando uma melhor evolução na cicatrização, o que também é evidenciado na histologia com maior índice de angiogênese e de infiltrado inflamatório possivelmente pela ação dos diferentes extratos do ativo de *Triticum aestivum*. O extrato etanólico presente na fórmula LCFT 2002 apresentou maiores concentrações dos compostos Ácido salicílico e Ácido Hidroxibenzoico, os quais apresentam ação esfoliante, promovendo a descamação da pele e removendo o tecido desvitalizado (Arif, 2015). Além disso, o extrato etanólico apresentou maiores concentrações de Ácido ferúlico, Ácido 5-5'-dihidroferulico, Ácido maleico e Ácido pinélico, conhecidos antioxidantes que impedem a degradação de fibras estruturais como colágeno e elastina, auxiliando na regeneração do tecido epitelial (Silva *et al.*, 2017).

Aos oito dias de tratamento é visível a ação das formulações tópicas, que apresentaram clinicamente menor percentual de crosta e maior de tecido de granulação e na histopatologia uma angiogênese mais avançada e um padrão de colágeno semelhante ao grupo controle positivo. Ainda destaca-se o tratamento com LCFT 2001 que nesse momentos, demonstrou uma inflamação exuberante e a menor área de lesão, indicando intensa atividade do organismo. Os ácidos graxos presentes no ativo *Bixa orellana* L. estimulam a ação de mediadores quimiotáticos para neutrófilos e macrófagos e a produção de fatores de crescimento, que vão promover um efeito pró-inflamatório, limpeza do local lesionado e permitir a reconstituição do tecido (Lania *et al.*, 2019). Campelo *et al.* (2015), demonstrou o aumento da proliferação celular e a redução da área de lesões térmicas tratadas com misturas de ácidos graxos, em sete dias de tratamento. Entretanto, o estudo de Campelo *et al.* (2015)

fez a administração dos tratamentos via oral, diferindo da forma proposta neste estudo, possibilitando a ação destes compostos por outras vias, que não a tópica local.

Alguns fatores locais podem prejudicar a cicatrização, como a presença de resíduos no interior da lesão, este é o caso das lesões térmicas que apresentam uma espessa camada de tecido necrótico atuando como uma barreira física para a reconstituição do tecido (Oliveira & Dias, 2012). Assim, explica-se a menor ação das formulações tópicas nos primeiros momentos de avaliação (dois e cinco dias), enquanto o tratamento com colagenase demonstrou-se efetivo. Entretanto, aos oito dias de tratamento com a remoção do tecido necrótico as formulações atuaram de forma expressiva, superando ou equiparando-se ao grupo controle positivo em diversos pontos de avaliação, como mencionado anteriormente, e esta atuação manteve-se até o final do período de tratamento.

Aos 25 dias de tratamento todos os grupos continham reepitelização completa, com padrão colágeno denso mas em alta quantidade, e com mesma força de resistência suportada na avaliação tensiométrica, indicando um tecido ainda imaturo. Porque no processo de maturação tecidual as fibras colágenas tornam-se espessas e vão entremeando-se, sendo esta condição essencial na qualidade da cicatriz, pois quanto mais maduro o colágeno mais resistente é a lesão (Oliveira & Dias, 2012).

Por fim, os produtos LCFT 2001 e LCFT 2002 demonstraram potencial terapêutico no tratamento de lesões térmicas, com a exacerbação da inflamação e da angiogênese aos oito dias de tratamento, permitindo maior perfusão do infiltrado inflamatório e a intensificação deste, agindo de forma expressiva, o que reflete um efeito pró-inflamatório superior aos tratamentos controles. Contudo, pelo atraso de atuação nos primeiros dias de tratamento, todos os grupos apresentavam características cicatriciais semelhantes ao final dos 25 dias de tratamento.

5. Conclusão

Conclui-se que as formulações tópicas propostas nesse estudo contendo extrato oleoso de *Bixa orellana* L., aquoso e etanólico *Triticum aestivum* demonstram uma dificuldade no desbridamento das lesões removendo o tecido necrótico nos primeiros dias de tratamento, porém no decorrer do tratamento as formulações apresentaram importante ação pró-inflamatória promovendo a aceleração da regeneração tecidual. Assim as formulações deste estudo possuem um potencial cicatrizante semelhante a colagenase para o tratamento de lesões térmicas.

6. Agradecimentos

A CAPES e CNPq (310619 / 2016-5) pela concessão de bolsas e apoio financeiro.

Referências

Arif, T. (2015). Salicylic acid as a peeling agent: a comprehensive review. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 2015 (8), 455-461.

Campelo, A.P.B.S.; Campelo, M.W.S.; Brito, G.A.C.; Jamaru, F. V. F.; Leitão, R. F. C.; Vasconcelos, P. R. L. (2015). Oil mixes omega 9, 6 and 3, enriched with seaweed, promoted reduction of thermal burned modulating NF-kB and Ki-67. *Acta Cir. Bras.*, 30 (6), 430-438.

Capella, S.O.; Tillmann, M.T.; Félix, A.O.C.; Fontoura, E. G.; Fernandes, C. G.; Freitag, R. A.; Santos, M.A.Z.; Félix, S. R.; Nobre, M. O. (2016). Potencial cicatricial da Bixa orellana L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* (Online), 68, 104-112.

Capella, S. O. Tillmann, M. T.; Fernandes; C. G.; Brito, M. F. W.; Santana, G. M.; Félix, A. O. C.; Nobre, M. O. (2018). Methodological parameters to induction of second-degree thermal injuries in experimental model. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 5 (11), 757-764.

De Vos, R. C., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J. J., Bino, R. J., Hall, R. D. (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature protocols*, 2 (4), 778-791.

Drudi, D.; Tinto, D.; Ferranti, D.; Fiorelli, F.; Pozzo, M. D.; Capitani, O. (2018). *Aloe barbadensis* Miller versus silver sulfadiazine creams for wound healing by secondary intention in dogs and cats: a randomized controlled study. *Res. Vet. Sci.*, 117, 1-9.

Hussein Ali, E.; Adnan, S.S. (2018). Effect of Collagenase ointment versus Mebointment on healing of full-thickness burns in mice by removing of necrotic tissue. *Dermatol. Ther.*, 32 (1), 1-3.

Lania, B.G.; Morari, J.; Almeida, A.R.; Silva, M. N.; Damiani, G. V.; Lins, K. A.; César, C. L.; Velloso, L. A.; Maia, N. B.; Cintra, M. L.; Velho, P. E. N. F. (2019). Topical essential fatty acid oil on wounds: Local and systemic effects. *PloS One*, 14 (1), 1-15.

Lisec, J.; Schauer, N.; Kopka, J. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat. Protoc.* 1 (1), 387-396.

Mota, D.; Menezes, G.D.; Santos, I.C.M.C.; Carvalho, M. S.; Santana, M. D. A.; Gama, W. O.; Pinheiro, F. G. M. S. (2015). Evidências na utilização dos ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. *Ciências Biológicas e de Saúde Unit*, 2 (3), 55-64.

Oliveira, I.V.P.M.; Dias, R.V.C. (2012). Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. *Acta Vet. Bras.*, 6 (4), 267-271.

Pavletic, M. M. (2018). *Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery*. (4^a ed.) New Jersey: Hoboken, 866p.

Santos, J. A.A.; Sousa, M.F.A.M.; Silva, E.L.V.; Aguiar Junior, F.C.A. (2014). Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 16 (3), 637-643.

Sanguigno, L.; Minale, M.; Vannini, E.; Arato, G.; Riccio, R.; Casapullo, A.; Monti, M. C.; Riccio, R.; Formisano, S.; Di Renzo, G.; Cuomo, O. (2015). Oligosaccharidic fractions derived from *Triticum vulgare* extract accelerate tissutal repairing processes in in vitro and in vivo models of skin lesions. *J. Ethnopharmacology*, 159, 198-208.

Silva, F.A.; Bizerra, A.M.C.; Fernandes, P.R.D. (2018). Testes fitoquímicos em extratos orgânicos de *bixa orellana l* (urucum). *Holos*, 2 (34), 484-498.

Silva, S. A. M.; Leonardi, G. R. (2017). An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. *An. Bras. Dermatol*, 92 (3), 367-374.

Sharma, V.; Roy, S. K. (2014). Pharmacological Studies of Annatto (*Bixa orellana L.*). *Int. J. Phar. & Biomed. Rese.*, 1 (1), 17-20.

Tillmann, M.T.; Mendes, C.B.M.; Fischer, G.; Varela Júnior, A. S.; Fernandes, C. G.; Nobre, M. O. (2018). *Triticum aestivum* in open skin wounds: cytotoxicity and collagen histopathology. *Semina: Cienc. Agrar.*, 39 (4), 1547-1554.

Tillmann, M.T.; Felix, A.O.C.; Mueller, E.N.; Felix, S. R.; Alves, G. H.; Ramos, T.S.; Freitag, R.A.; Fernandes, C. G.; Nobre, M. O. (2014). Use of *Triticum aestivum* in open wound healing: a clinical, pathological, and tensiometric assessment in the rabbit model. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 66 (6), 1757-1761.

Vale, E.C.S. (2005). Primeiro atendimento em queimaduras: a abordagem do dermatologista. *An Bras Dermatol*, 80 (1), 9-19.

Vaughn, L.; Beckel, N. (2012) Severe burn injury, burn shock, and smoke inhalation injury in small animals. Part 1: Burn classification and pathophysiology. *J. Vet. Emer. Crit. Car.*, 22 (2), 179-186.

Vujanovic, S.; Vujanovic, J. (2013). Bioresources in the pharmacotherapy and healing of burns: A mini-review. *Burns*, 39, 1031-1038.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Sabrina de Oliveira Capella – 30%

Fernanda Dagmar Martins Krug – 5%

Mariana Teixeira Tillmann – 5%

Renato Vianna – 10%

Bianca Camargo Aranha – 5%

Fábio Clasen Chaves – 5%

Rogério Antonio Freitag – 5%

Fábio Raphael Pascoti Bruhn – 5%

Cristina Gevehr Fernandes – 10%

Márcia de Oliveira Nobre – 20%