

Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos

SANTOS, J.A.A.¹; SOUSA, M.F.A.M.¹; SILVA, E.L.V.¹; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A.^{1*}.

Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Centro Acadêmico de Vitória. CEP: 55608-680 – Vitória de Santo Antão – Brasil *famanajas@yahoo.com.br.

RESUMO: A norbixina é um carotenóide dicarboxílico hidrofílico presente no pericarpo das sementes do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.). O urucum é comumente utilizado na indústria alimentícia e cosmética como corante natural. O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de reparo cicatricial de feridas cutâneas abertas de ratos tratadas com extrato aquoso de urucum contendo 2,5% de norbixina através de análise histomorfométrica. Para tanto, realizou-se feridas cutâneas no dorso de 32 ratos Wistar machos. Estas foram tratadas com extrato de urucum (grupo experimental, n = 16) e solução salina 0,9% (grupo controle, n = 16). Aos 3, 7, 14 e 21 dias após realização do procedimento cirúrgico, os animais foram sacrificados. Os preparados histológicos obtidos foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E.) para contagem de células inflamatórias e de fibroblastos; corados pelo azul de toluidina 1% para contagem dos mastócitos e com picrossirius-red para avaliação das fibras colágenas totais. As imagens histológicas destas lâminas foram capturadas por câmera digital acoplada ao microscópio óptico, sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 10 campos por lâmina com aumento final de 400X. As fotomicrografias foram avaliadas através do software ImageJ. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste t de student sendo o valor de p considerado significativo para $p < 0,05$. O tratamento tópico com extrato de urucum utilizado aumentou o infiltrado inflamatório durante o 3º, 14º e 21º dia pós-operatório. O grupo tratado apresentou maior densidade vascular quando comparado ao controle a partir do 7º e menor quantidade de fibroblastos até o 14º dia pós-cirúrgico. Conclui-se que o extrato de urucum contendo 2,5% de norbixina não é inócua aos tecidos cutâneos e possui efeitos pró-inflamatórios e pró-angiogênicos durante o processo de reparo tecidual cutâneo em ratos, interferindo no processo fisiológico de cicatrização.

Palavras-chave: histologia, urucum, úlceras, pele.

ABSTRACT: **Histomorphometric evaluation of the effects of the aqueous extract of annatto (norbixin) on wound skin healing in rats.** Norbixin is a dicarboxylic water-soluble carotenoid present in the pericarp of the achiote (*Bixa orellana* L.) seed. Annatto is commonly used by the food and cosmetic industries as a natural pigment. The aim of this study was to evaluate the healing process of open dermal wounds of rats treated with an aqueous solution of annatto containing 2.5% of norbixin carried out by histomorphometric analysis. For this end, cutaneous wounds were made on the back of 32 male Wistar rats. The wounds were treated with annatto solution (experimental group, n = 16) and saline solution 0.9% (control group, n = 16). At 3, 7, 14 and 21 days after the surgical procedure, the animals were sacrificed. After histological preparation, the histological material was submitted to the staining technique with hematoxylin-eosin for the counting of inflammatory cells and fibroblasts, with toluidine blue 1% for mast cell counting and with picrosirius red for the total collagen fibers. The images of those histological slides were captured by a digital camera connected to an optical microscope, with fixed focal length and clear field; 10 fields were captured from each slide with final zoom of 400X. The photomicrographs were analyzed by the ImageJ software. The results were submitted to the Student's t-test and the value of $p < 0.05$ was considered as relevant. The topical treatment with the annatto solution increased the inflammatory infiltrate during the 3rd, 14th and 21st days after surgery. The experimental group presented increased vascular density compared to the control

group after the 7th day and a smaller amount of fibroblasts up to the 14th day after surgery. We concluded that the annatto solution containing 2.5% of norbixin is not innocuous to skin tissues and has proinflammatory and proangiogenic effects during the process of skin wound healing in rats, interfering in the physiological healing process.

Keywords: histology; annatto; ulcers; skin.

INTRODUÇÃO

O urucuzeiro é um arbusto de 3 a 5 m de altura, comumente encontrado no Brasil. Seus frutos são do tipo cápsula deiscente, ovóides, com 2 ou 3 carpelos, cobertos de espículos flexíveis, de cor vermelha, esverdeada ou parda, contendo muitas sementes pretas cobertas por um arilo ceroso de cor vermelha e odor característico (Costa, 2007).

Suas sementes apresentam na composição celulose (40-45%), açúcares (3,5 - 5,2%), óleo essencial (3%), óleo fixo (4,5 -5,5%), proteínas (13 -16%), vitaminas (B1, B2, C e A), e minerais (cálcio, ferro, fósforo e zinco) (Costa, 2007). Contêm lipídios como ácido linoleico, e, em menor quantidade, alfa-linoléico e oléico; aminoácidos tais como: aspartato, glutamato e leucina. Também são encontrados diversos carotenóides: bixina, isobixina, norbixina, alfa e beta carotenos e criptoxantina (Rodríguez et al., 2007).

A partir do pericarpo seco das sementes do urucum é extraído um corante amarelo-avermelhado. Este pode ser obtido por processos mecânicos através de atrito ou raspagem das sementes, através de solventes, ou ainda através de processos enzimáticos. Sendo de baixo custo de produção, também conhecido internacionalmente como “annatto”, é utilizado em vários setores industriais em substituição a muitos corantes sintéticos (Anselmo et al., 2008).

O uso do urucum é amplamente difundido em nossa cultura, particularmente na alimentação; no entanto, ainda é utilizado na medicina popular para o tratamento de diabetes, infecções cutâneas, queimaduras, febre, diarreia e asma (Pérez & Sánches, 2010). Os produtos naturais como plantas e minerais continuam sendo utilizados de formas individualizadas ou associadas e constituem maior fonte para obtenção de produtos bioativos para diversas finalidades (Jagetia & Rajanikant, 2004). Diversos fitoterápicos vêm sendo investigados e usados no tratamento de feridas no intuito de acelerar ou influenciar beneficemente o processo de reparo cicatricial (Santos et al., 2006).

A cicatrização é o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado. Há inicialmente a instalação de uma reação inflamatória cujo exsudato de células fagocitárias reabsorve o sangue extravasado e os

produtos da destruição tecidual. Em seguida, ocorre a proliferação fibroblástica e endotelial que forma o tecido conjuntivo cicatricial. Posteriormente, o tecido cicatricial sofre remodelação, que resulta em diminuição do volume cicatricial, podendo chegar até seu desaparecimento (Parente et al., 2009).

A norbixina (C₂₄H₂₈O₄) é um carotenóide dicarboxílico hidrofílico encontrado em pequena quantidade no urucum. Para fins industriais, a norbixina pode ser obtida a partir da bixina, que é mais abundante, através da hidrólise alcalina do grupamento éster em uma reação de saponificação (Silva et al., 2009).

Uma das principais características dos carotenóides é a sua capacidade de reagir com radicais livres, principalmente com oxi-radicais como o superperóxido, radicais hidroperoxila e hidroxila. Estes radicais podem ser formados em decorrência de processos fisiológicos e patológicos como a fagocitose ou em decorrência de influências externas, como por exemplo, a exposição à radiação ultravioleta. A atuação como fotoprotetor e como quimiopreventivo do câncer, além de suas funções nutricionais já estabelecidas, justificam os diversos estudos sobre o potencial biológico destes compostos (Bouayed & Bohn, 2010).

Estudos avaliando a toxicidade do urucum em modelos animais indicam não haver efeitos genotóxicos, teratogênicos, mutagênicos ou clastogênicos (Lima et al., 2003). Camundongos submetidos à dieta com altas concentrações norbixina apresentaram hiperglicemia (Fernandes et al., 2002). Estudos *in vitro* atribuíram à norbixina propriedades antioxidantes por diminuir o efeito mutagênico do peróxido de hidrogênio na molécula de DNA (Silva Junior et al., 2005), além de possuir ação antimicrobiana frente à bactéria *Staphylococcus aureus* (Galindo-Cuspineira & Rankin, 2005).

São escassos os relatos na literatura de estudos que avaliem os efeitos e as propriedades biológicas do urucum, e, particularmente, de seu carotenóide norbixina nos tecidos animais. Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o processo de reparo cicatricial de feridas cutâneas abertas de ratos tratadas com extrato aquoso de urucum contendo 2,5% de norbixina através de análise histomorfométrica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 32 ratos de linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus Albinus*), machos, adultos jovens, pesando entre 200g e 300g e oriundos do Biotério do Departamento de Nutrição – Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos durante 10 dias no Biotério do Centro Acadêmico de Vitória – CAV/UFPE para adaptação ao novo ambiente e durante todo o período experimental receberam ração e água *ad libitum*. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais de Ciências Biológicas da UFPE, sob processo nº 23076.020774/2011-30.

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos (cada grupo com 16 animais). No grupo teste, após a confecção da ferida cirúrgica, a mesma foi tratada durante 3 dias com o extrato líquido de urucum adquirido comercialmente como corante natural (2,5% de Norbixina – Marca Baculerê). O grupo controle teve a ferida umedecida com solução fisiológica 0,9%.

Os animais foram pesados para determinação da quantidade de solução anestésica a ser empregada para cada animal, e, portanto, sendo anestesiados pela aplicação por via intraperitoneal de cloridrato de cetamina na razão de 0,1ml por 100g de peso corporal e cloridrato de xilazina na razão de 0,05ml por 100g de peso. Em seguida, procedeu-se a tricotomia na região dorsal mediana dos animais. Com a pele exposta, a área foi limpa e foi realizada a anti-sepsia com solução de álcool 70%. As feridas cirúrgicas foram realizadas através da incisão de bisturi número 15 no dorso do animal, paralelamente ao eixo da coluna vertebral. As mesmas foram realizadas com diâmetro de 2 cm, padronizando-se o tamanho e a forma através de um molde metálico, conduzida em igual profundidade, até o alcance do plano muscular.

Decorridos 3, 7, 14 e 21 dias após o ato cirúrgico, 4 animais de cada grupo (teste e controle) foram escolhidos aleatoriamente e sacrificados pela aplicação por via intraperitoneal de anestésica em dose letal. Imediatamente após, um fragmento contendo a ferida cirúrgica em toda sua extensão e profundidade foi retirada através de um bisturi número 11.

O material coletado foi clivado e mergulhado em uma solução de formol a 10 % neutro tamponado (NBF), permanecendo nesta solução pelo período de 48 horas. Após esse procedimento, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo ajustado para 5µm. Assim, os cortes obtidos foram colocados em lâminas untadas com albumina e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, por 24 horas para

secagem.

Os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E.) para contagem de células inflamatórias e de fibroblastos, corados pelo azul de toluidina 1% para contagem dos mastócitos, picrossirius-red para avaliação das fibras colágenas totais. As imagens histológicas destas lâminas foram capturadas por câmera digital (Moticam 3000) acoplada ao microscópio óptico (Nikon E-200), sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 10 campos por lâmina com aumento final de 400X. As fotomicrografias foram avaliadas através do software ImageJ versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.), os plugins “colour deconvolution”, “cell counter” e “threshold” foram utilizados na contagem celular e quantificação de fibras colágenas totais nos cortes histológicos.

Os dados obtidos da avaliação histomorfométrica foram normalizados para o controle (Controle=100%) e comparados estatisticamente através do teste t de student com o software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 15.0 com o intuito de se verificar possíveis diferenças entre os grupos nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias. Foi adotado o nível de significância de 5% ou $p < 0,05$.

RESULTADO E DISCUSSÃO

O reparo de feridas é um processo fisiológico complexo e progressivo que envolve diversos eventos celulares, teciduais e bioquímicos que se iniciam após o dano tecidual com a finalidade de devolver a integridade e a função dos tecidos lesados (Kapor et al., 2011). Durante este processo, três estágios histomorfológicos interdependentes podem ser observados: inicialmente há um estágio inflamatório, seguido por um de proliferação e finalizando o reparo em um estágio de remodelação. Embora possuam características próprias, há certa sobreposição dos estágios tornando concomitante a ocorrência destes (Mandelbaum et al., 2003).

Embora o uso do urucum como corante seja amplamente difundido devido às suas propriedades tintoriais e baixo custo de produção, inclusive pela indústria cosmética no preparo de loções, protetores solares, cremes e xampus (Paumgarten et al., 2002), poucos são os relatos de seus efeitos biológicos nos tecidos animais, particularmente durante a cicatrização cutânea. O pigmento norbixina é um carotenoide pouco abundante nas sementes do urucum. Apresenta duas configurações estereoquímicas, *cis* e *trans*. Nos extratos, a configuração *trans* é obtida através de aquecimento sendo mais estável ao calor e menos sensível a luz (Pimentel & Stringheta, 1999). Sua concentração em

formulações aquosas comerciais pode variar de 0,6 a 41% (Scotter et al., 1998).

Não foram identificados microscopicamente focos de exsudação purulenta ou de reação de corpo estranho nas feridas tratadas com o extrato de urucum contendo norbixina. Constatou-se a formação de crosta fibrinoleucocitária mais espessa neste grupo, que permaneceu aderida ao leito cirúrgico em cronologia idêntica ao observado no grupo controle. O processo de reepitelização e a cronologia de fechamento da ferida também não diferiram entre os grupos.

Notou-se que nos animais tratados houve um aumento significativo do infiltrado inflamatório, inicialmente com predomínio de polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e em seguida de mononucleares (macrófagos e linfócitos) (3º dia e a partir do 14º dia pós-operatório respectivamente, Figura 1).

Embora o efeito antiinflamatório seja comumente associado ao urucum (Morais et al., 2005; Nascimento & Conceição, 2011), constatamos que a aplicação tópica do extrato no leito cruento da ferida induziu ao maior recrutamento e acúmulo de células inflamatórias até as fases mais tardias do processo de cicatrização.

As células inflamatórias assumem papel fundamental durante o processo de reparo: destruindo e neutralizando microorganismos e outras partículas e substâncias estranhas, promovendo a resolução do coágulo de fibrina e da matriz extracelular provisória, liberando inúmeras citocinas e fatores de crescimento, e induzindo a angiogênese e reepitelização (Shaw & Martin, 2009). No entanto, a persistência de células inflamatórias durante o processo de remodelação da ferida pode atuar de forma deletéria no processo de reparo

(Diegelmann & Evans, 2004).

A densidade de mastócitos embora aumentada no grupo tratado, não diferiu significativamente (Figura 1). Estas células inflamatórias atuam nas três fases do reparo promovendo liberação de mediadores vasoativos (histamina, citocinas e proteases de serina, entre outros), e atuando na remodelação do colágeno ao término do processo de reparação tecidual (Azevedo et al., 2009).

Quanto à formação de novos vasos sanguíneos, encontrou-se aumento significativo e gradativo no grupo tratado após o 7º dia pós-operatório. Foi observado ao final do processo de reparo um aumento de cerca de 100% na média da densidade vascular quando comparado ao controle (Figura 1). A angiogênese é um passo crítico no processo de reparo cicatricial, visto que permite maior aporte de nutrientes e oxigênio que sustentam o metabolismo celular; além disso, estabelece um caminho para eliminação de detritos e produtos metabólicos (Majewska & Gendaszewska-Darmach, 2011).

A formação de novos capilares é estimulada localmente pela hipóxia tecidual e também por fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), liberado principalmente por macrófagos (Falanga, 2005). O potencial curativo da maioria dos fitoterápicos no tratamento de feridas é comumente atribuído aos efeitos angiogênicos do mesmo (Majewska & Gendaszewska-Darmach, 2011).

A ação pró-angiogênica observada pode ser atribuída em parte, pelo aumento de macrófagos e de outras células inflamatórias ocasionando maior liberação de fatores de crescimento, ou mesmo

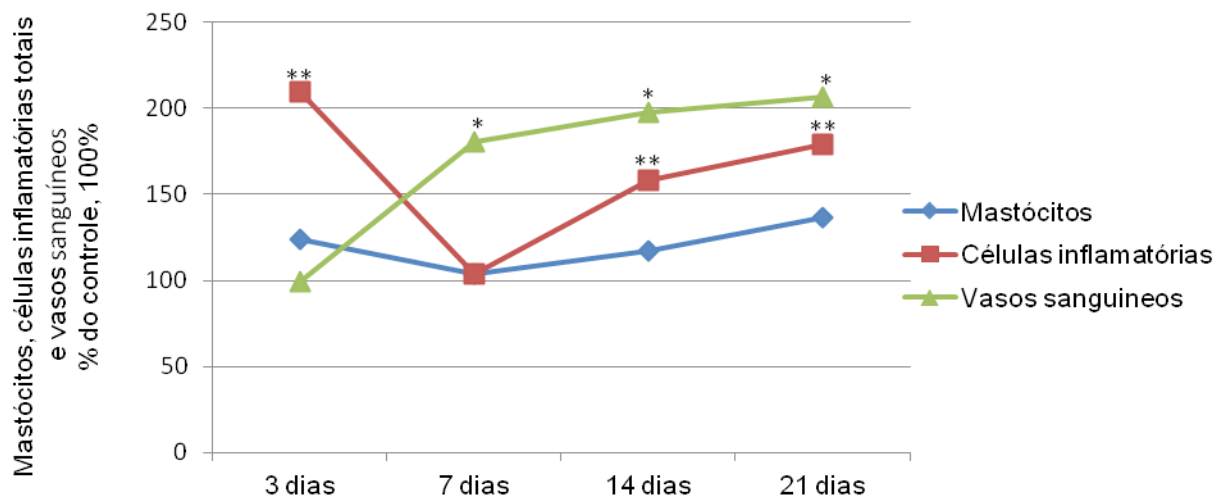


FIGURA 1. Valor médio percentual da densidade de mastócitos, células inflamatórias totais e vasos sanguíneos do grupo tratado em comparação com o grupo controle. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

por uma ação direta da norbixina que merece ser melhor elucidada. Além disso, o complexo processo de angiogênese está intimamente relacionado com a formação de tecido de granulação e da ação de enzimas proteolíticas que permitem a degradação da matriz extracelular permitindo a proliferação e migração das células endoteliais visando à formação de novos vasos nos locais de lesão (Gillitzer & Goebeler, 2001).

Analisando a eficácia do tratamento no número de fibroblastos e na quantidade de deposição total de colágeno observamos que até o 14º dia pós-cirúrgico ocorreu diminuição significativa de 50 a 60 % na média do número de fibroblastos. Sendo que, no 21º dia de reparo houve aumento de cerca de 50% na média da quantidade destas células (Figura 2). Os fibroblastos são células importantes e fundamentais no processo de cicatrização cutânea, visto que estão diretamente relacionados com a formação do tecido de granulação. Produzem colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanas, elastina e proteases, ocasionando deposição e remodelação da matriz extracelular no leito da ferida (Hildebrand et al., 2005).

Um estudo *in vitro* realizado por Kovary et al. (2001) demonstrou que a norbixina não possui efeitos citotóxicos ou genotóxicos diretos em fibroblastos murinos, no entanto, sua capacidade em proteger o DNA contra o estresse oxidativo induzido por água oxigenada é inversamente proporcional à sua concentração. Desta forma, altas concentrações de norbixina foram capazes de permitir maior lesão no DNA celular.

Embora o tratamento com a norbixina tenha ocasionado uma marcada variação na média da quantidade de fibroblastos nos diferentes períodos

de reparo, a quantidade de colágeno depositada se manteve similar à observada no grupo controle (Figura 2). A formação e deposição de colágeno é um passo inicial do processo de cicatrização de feridas. A maciça proliferação de fibroblastos é a primeira manifestação da deposição de matriz extracelular inicial, observada particularmente após atenuação da resposta inflamatória inicial (Richardson, 2004), fato que ocorreu tardiamente grupo tratado. No entanto, não observamos diminuição na quantidade de fibras de colágeno totais durante o reparo.

Uma alta tensão de oxigênio é necessária para a hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina nas cadeias polipeptídicas do colágeno montadas no citoplasma dos fibroblastos (Balbino et al., 2005). Esta maior oferta de oxigênio, facilitada pela maior rede de capilares neoformados pode ter atuado de forma benéfica na formação de fibras colágenas entre o 3º e 14º dias pós-operatórios, compensando a menor quantidade de fibroblastos no grupo tratado.

A utilização de substâncias naturais biologicamente ativas na reparação tecidual é uma fonte alternativa e inesgotável para pesquisas. De forma geral, os resultados do presente estudo permitem concluir que o uso do extrato aquoso de urucum contendo 2,5% de norbixina influenciou todas as fases do reparo tecidual em feridas abertas induzidas na pele de ratos. Não se observou atraso no processo de reepitelização e fibroplasia. No entanto, um relevante efeito pró-inflamatório e indutor de angiogênese pode ser constatado, indicando que o extrato de urucum não é inócua aos tecidos cutâneo de animais.

É importante salientar, que mais estudos são necessários visando validar os efeitos observados e

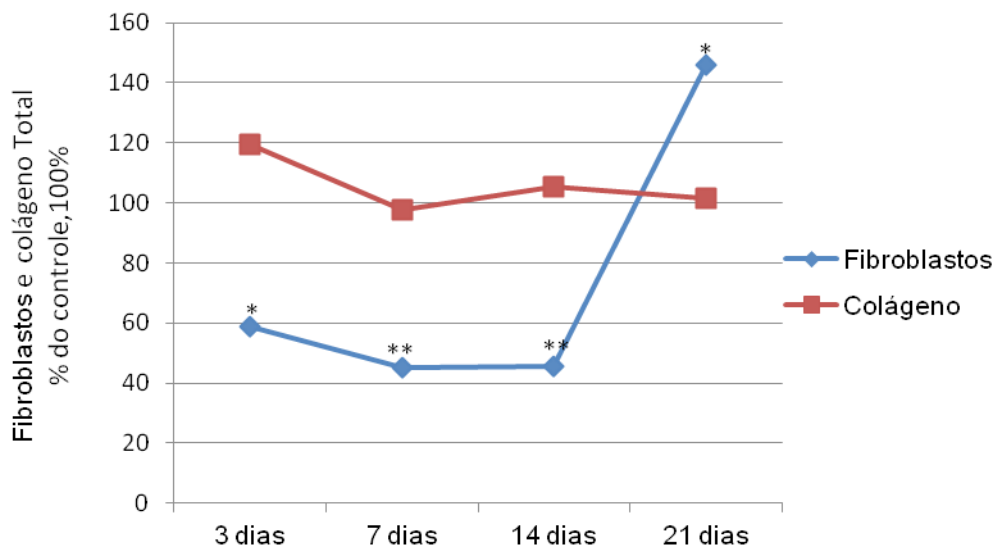


FIGURA 2. Valor médio percentual da quantidade de fibroblastos e fibras colágenas totais do grupo tratado em comparação com o grupo controle. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

inclusive com diferentes dosagens do carotenoide norbixina.

REFERÊNCIA

- ANSELMO, GCS; MATA, MEMRC.; RODRIGUES, E. Comportamento Higroscópico do Extrato seco de Urucum (*Bixa Orellana* L). **Ciências agrotécnicas**. v. 32, n. 6, p. 1888-1892, 2008.
- AZEVEDO, LH; SOUSA, SCOM; CORREA, L; EDUARDO, CP; DAGLI, MLZ; ROMANOS, G; MIGLIARI, DA. Mast cell concentration in the wound healing process of incisions made by different instruments. **Lasers Medicis Science**, v. 24, p. 585-590, 2009.
- BALDOCHI, PJ. Estudo hematológico em ratos sob ação de plantas medicinais. XXXVIII. Ação da bixina um corante alimentar natural extraído da *Bixa orellana* L. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. v. 8, n. 4, p. 157-161, 2006
- BALBINO, CA; PEREIRA, LM.; CURI, R. Mecanismos envolvido na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BOUAYED, J; BOHN, T. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxid Med Cell Longev**. v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.
- COSTA, C.K. **Estudo Fitoquímico de Bixa orellana L., Bixaceae e Aplicação de seu óleo em Formulação Cosmética**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- DIEGELMANN, RF; EVANS, MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front Bioscience**. v. 9, p. 283–289, 2004.
- FALANGA V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. **Lancet**. v. 366, p. 1736–1743, 2005.
- FERNANDES, A.C.S.; ALMEIDA, C.A.; ALBANO, F. Norbixin ingestion did not induce any detectable DNA breakage in liver and kidney but caused a considerable impairment in plasmaglucoase levels of rats and mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v.13, p. 411–420, 2002.
- GALINDO-CUSPINERA, V; RANKIN, SA. Bioautography and Chemical Characterization of Antimicrobial Compound(s) in Commercial Water-Soluble Annatto Extracts. **Journal. Agriculture Food Chemical**. v. 53, p. 2524-2529: 2005.
- GILLITZER R; GOEBELER M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal Leukocyte Biological**. v. 69, n. 4, p. 513-21, 2001.
- GOMES, MF; SILVA, VTB; LAVERDE JRA; TAKEMURA, OS. Avaliação da atividade antioxidante de extratos das folhas de *Bixa orellana* (Bixaceae) e *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Arquivos Ciências da Saúde**. v. 12, n. 3, p. 169-173, 2008
- HETZEL, de la C.; PÉREZ, L.; SÁNCHEZ, GM. La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. **Revista Cubana de Farmacia**. v. 44, n 2, p. 231-234, 2010.
- HILDEBRAND, KA et al. The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. **Sport Med. Arthosc**. v.13, n. 3, p. 136-144, 2005.
- JAGETIA GC; RAJANIKANT GK. Role of curcumin, a naturally occurring phenolic compound of turmeric in accelerating the repair of excision wound, in mice whole-body exposed to various doses of gamma-radiation, **J Surg Res**. v. 120, p. 127–138, 2004.
- KOVARY K; LOUVAIN TS; COSTA SMC; ALBANO F; PIRES BB; LARANJA GA, LAGE CL; FELZENSZWALB I. Biochemical behaviour of norbixin during in vitro DNA damage induced by reactive oxygen species. **Br J Nutr**. v. 85, n. 4, p. 431-40, 2001.
- LIMA, ROA; AZEVEDO, L.; RIBEIRO, LR; SALVADORI, DMF. Study on themutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 189–192, 2003.
- MAJEWSKA I, GENDASZEWSKA-DARMACH E. Proangiogenic activity of plant extracts in accelerating wound healing - a new face of old phytomedicines. **Acta Biochim Pol**. v. 58, n. 4, p. 449-60, 2011.
- MANDELBAUM, SH; DI SANTIS, EP; MANDELBAUM, MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros Dermatologia**. v. 78, n. 4, p.393-410, 2003.
- MORAIS, SM; DANTAS, JDP; SILVA, ARA; MAGALHÃES, EF. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.
- NASCIMENTO, JA; CONCEIÇÃO, GM. Plantas medicinais e indicações terapêuticas da comunidade quilombola olho d'água do Raposo, Caxias, Maranhão, Brasil. **Rev. BioFar**. v. 6, n. 2, p. 138-151, 2011.
- PARENTE, LML; SILVA, MSB; BRITO, LAB; LINO-JÚNIOR, RS; PAULA, JR; TREVENZOL, L. MF. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. v.11, n.4, p.383-391, 2009
- PEREZ, HL de la C; SANCHEZ, GM. La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. **Revista Cubana Farmacia**. v. 44, n.2, p. 231-244, 2010.
- PIMENTEL, FA; STRINGHETA, PC. Produção de corantes de urucum em pó, por meio de precipitação ácida, a partir de extratos obtidos em diferentes soluções extratoras. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v.3, p.53-57, 1999.
- RODRÍGUES S.; SOARES V; DE OLIVEIRA T; GESTEIRA A.; OTONI W; COSTA M. Isolation and purification of RNA from tissues rich in poliphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). **Molecular Biotechnology**. v. 37, p. 220-224, 2007.
- RICHARDSON, M. (2004). Acute wounds: an overview of the physiological healing process. **Nurse Times**. v. 100, p. 50–53, 2004.
- SANTOS MFS; CZEZKO NG; NASSIF PAN; RIBAS-FILHO JM; ALENCAR BLF; MALAFAIA O; RIBAS CAPM; TRAUTWEIN VM; HENRIQUES GS; MAIA JMA; BITTENCOURT RCA. Evaluation of the use of raw extract of *Jatropha gossypifolia* L. in the healing process of skin wounds in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.3, p. 21:2-7, 2006.
- SCOTTER MJ; WILSON LA; APPLETON GP; CASTLE

- L. Analysis of annatto (Bixa orellana) food coloring formulations. 2. Determination of Coloring Components and Colored Thermal Degradation Products by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection. **J Agric Food Chem.** v. 46, p. 1031-1038, 1998.
- SHAW TJ; MARTIN P. Wound repair at a glance. **Journal Cell Science.** v.15, n. 122, p. 3209-13, 2009.
- SILVA, PI; NACHTIGALL, AM; STRINGHETA, PC. Fatores que influenciam a reação de saponificação dos carotenóides presentes no urucum (Bixa orellana L.) **Ciências Agrotécnicas Lavras,** v. 33, Ed. Especial, p. 1892-1897, 2009.
- SILVA JÚNIOR, C.T.S; ASAD, L.B.M.O; OLIVEIRA, E.B. Antigenotoxic and antimutagenic potential of an annatto pigment (norbixin) against oxidative stress. **Genetic Molecular Research.** v.4, n. 1, p. 94-98, 2005.
- YOKE KEONG, Y; ARIFAH A. K.; SUKARDI S; ROSILDA AH.; SOMCHIT MN.; ZURAINI A. Bixa orellana leaves extract inhibits bradykinin-induced inflammation through suppression of nitric oxide production. **Medical Principal Practice.** v. 20, n. 2, 2011.