

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA  
SAÚDE**

**ANDERSON LEITE FREITAS**

**AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS POR  
HIDROGEL CONTENDO EXTRATO SECO  
PADRONIZADO DE *Hyptis pectinata* (L.) EM RATOS**

**ARACAJU/SE**

**2018**

FREITAS, L.  
ANDERSON.

AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS POR  
HIDROGEL CONTENDO EXTRATO SECO PADRONIZADO  
DE *Hypis pectinata* (L.) EM RATOS

2018

**AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS POR  
HIDROGEL CONTENDO EXTRATO SECO  
PADRONIZADO DE *Hyptis pectinata* (L.) EM RATOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do Grau de Doutor em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Roberto Antonioli

Coorientadora: Prof. Dra. Francilene Amaral da Silva

Aracaju – SE

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

- F866a Freitas, Anderson Leite  
Avaliação da cicatrização de feridas por hidrogel contendo extrato seco padronizado de *Hyptis pectinata* (L.) Em ratos / Anderson Leite Freitas ; Orientador Ângelo Roberto Antonioli ; Coorientadora Francilene Amaral da Silva. – Aracaju, 2018.  
97 f. : il.
- Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2018.
1. Cicatrização
  2. Plantas medicinais
  3. Úlcera varicosa
  4. Meta-análise
  5. *Hyptis pectinata* (L.) I. Antonioli, Ângelo Roberto, orient. II. Silva, Francilene Amaral da, coorient. III. Título.

CDU 61

**ANDERSON LEITE FREITAS**

**AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS POR HIDROGEL  
CONTENDO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *Hyptis pectinata*  
(L.) EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**Coorientadora: Prof. Dra. Francilene Amaral da Silva**

---

**1º Examinador: Prof. Dra. Tamires Cardoso Lima**

---

**2º Examinador: Prof. Dr. Carlos Adriano Santos Souza**

---

**3º Examinador: Prof. Dr. Marco Antônio Padro Nunes**

---

**4º Examinador: Prof. Dr. Marcos Cardoso Rios**

### **Dedicatória**

**Dedico a Deus, que está presente em todos os momentos da minha vida. Aos meus pais, que mesmo com pouco conhecimento intelectual incentivaram com muito carinho e torceram pelas minhas conquistas, frisando sempre a importância da obtenção deste título. Aos meus amigos que foram compreensivos e acolhedores, me confortando nas fases de dificuldades.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de vida.**

**Agradecer a minha mãe e a meu irmão Alexandre pelo incentivo em todas as fases dessa jornada.**

**Agradecer a meu pai que não está mais conosco, porém sempre enfatizou a importância de estudar.**

**Quero agradecer imensamente a minha queridíssima orientadora Francilene Amaral da Silva pela oportunidade, pelo incentivo, pela confiança, pelo tratamento que ela sempre teve comigo.**

**Ao meu queridíssimo reitor Ângelo que permitiu que eu fizesse o doutorado.**

**Ao querido Wellington, pessoa maravilhosa que não posso deixar de agradecer, que me acolheu no mestrado e me incentivou no doutorado.**

**Ao professor Marco Prado e ao professor Ricardo que me ajudaram nessa jornada.**

**Agradecer imensamente a família NuPPNAF, que me acolheu por todos esses anos, Clara, Fernando, Carlos, Aline, Alex, Daiane, Diego Ellen, Laura, Quezia, Ulisses, Alisson, Anderson (bizarro), Emily, Izabela, Tamires em especial para Carla que muito paciente me ajudou a fazer a revisão sistemática, Luiza e Tamires.**

**Agradecer a UFS, a sociedade, a FAPITEC**

**Agradeço por tudo.**

## RESUMO

Avaliação da cicatrização de feridas por hidrogel contendo extrato seco padronizado de *Hyptis pectinata* (L.) Em ratos. Anderson Freitas. 2018.

Úlceras venosas são um problema muito comum e seu tratamento muito caro. A Organização Mundial de Saúde e o Brasil têm incentivado o uso de plantas medicinais. Para tanto temos como objetivo: 1) Realizar uma revisão sistemática acerca dos fitoterápicos com atividade cicatrizante, 2) Desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação do extrato aquoso e produtos derivados de *Hyptis pectinata* (L.), 3) Investigar o potencial cicatrizante do extrato seco padronizado de *H. pectinata* incorporado ao hidrogel em modelo tecidual de ferida excisão em ratos, 4) verificar possíveis alterações do extrato seco padronizado da *H. pectinata* incorporado ao hidrogel, no processo de cicatrização de feridas cutâneas induzidas. A pesquisa buscou em português, inglês e espanhol, nas bases de dados: Cinahl, Lilacs, Medline/Pubmed, Scopus e Web of Science, usando os descritores: Plants, Medicinal, Wound Healing e Varicose Ulcer. A busca da revisão sistemática produziu 3.505 artigos, sendo que sete foram selecionados para inclusão na revisão. Dos estudos incluídos, sete (100%) avaliaram a redução da área de úlcera, quatro (57,14%) avaliaram reepitelização, dois (28,57%) avaliaram a flora bacteriana e um (14,28%) avaliaram a pressão de oxigênio e dióxido de carbono percutâneo. Uma meta-análise foi realizada em dois estudos que analisaram os efeitos do hidrogel incorporado com *Mimosa tenuiflora* no tratamento da úlcera venosa e incluíram 42 pacientes, com idade média de 60,5 anos, e duração média de tratamento de 10,5 semanas. A heterogeneidade foi avaliada utilizando I<sup>2</sup>, resultado em um alto valor de 84%. O hidrogel que incorporou *M. tenuiflora* pareceu ser um candidato promissor para o tratamento de úlceras venosas. Foi desenvolvido e validado um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação de substâncias no extrato aquoso de *H. pectinata* conforme resolução RDC 899 da Anvisa. O método apresentou boa repetibilidade, robustez, exatidão, especificidade, reprodutibilidade e precisão intermediária. Para a avaliação da atividade cicatrizante foram realizados experimentos com 3, 7 e 14 dias em modelos animais. As lesões tratadas com HP5 no tempo de 3 dias obtiveram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (CTL). Nas lesões acompanhadas por 14 dias tratadas com HP5 houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) em relação às lesões do grupo tratado com CTL. Na análise histomorfológica dos scores do grupo tratado por 3,7 e 14 dias não houve diferença significativa entre o grupo CLT e o grupo HP5. Os resultados sugerem que o hidrogel de *H. pectinata* apresentou melhora no reparo cicatricial em modelo animal, mas precisa de mais estudos para corroborar com os achados deste estudo.

Palavras-chave: cicatrização; plantas medicinais; Úlceras varicosas; Meta-análise; *Hyptis pectinata* (L.)

## ABSTRACT

Evaluation of wound healing by hydrogel containing standard dry extract of *Hyptis pectinata* (L.) In rats. Anderson Freitas. 2018

veined ulcers are a very common problem and his very expensive treatment. The World-wide Organization of Health and Brazil they have been stimulating the use of medicinal plants. For so much we have like objective: 1) to Carry out a systematic revision about the fitoterápicos with activity cicatrizante, 2) to Develop and to validate an analytical methodology for quantificação of the aqueous extract and products been derived from *Hyptis pectinata* (L.) 3) to Investigate the potential cicatrizante of the standardized dry extract of *H. pectinata* when to check possible alterations of the standardized dry extract of *H. pectinata* incorporated to a hidrogel, in the process of scarring of induced cutaneous wounds was incorporated to a hidrogel in model tecidual of injured in mice, 4). The inquiry looked in Portuguese, Englishman and Spaniard, in the bases of data: Cinahl, Lilacs, Medline/Pubmed, Scopus and Web of Science, using the descritores: Plants, Medicinal, Wound Healing and Varicose Ulcer. The search of the systematic revision produced 3.505 articles, being that seven were selected for inclusion in the revision. Of the included studies, seven (100 %) valued the reduction of the area of ulcer, four (57,14 %) valued reepitelização, two (28,57 %) valued the bacterial flora and one (14,28 %) valued the pressure of oxygen and carbon dioxide percutâneo. A mark-analysis was carried out in two studies that analysed the effects of the hidrogel incorporated with *Mimosa tenuiflora* in the treatment of the veined ulcer and included 42 patients, with middle age of 60,5 years, and middle duration of treatment of 10,5 weeks. It was valued the heterogeneity using I<sup>2</sup>, when it turned in a high value of 84 %. The hidrogel that it incorporated *M. tenuiflora* seemed to be a promising candidate for the treatment of veined ulcers. An analytical method was developed and validated for cromatografia liquid of high efficiency for the substances quantificação in the aqueous extract of *H. pectinata* according to resolution RDC 899 of the Anvisa. The method presented boa repetibilidade, strength, exactness, especificidade, reproductiveness and intermediary precision. For the evaluation of the activity cicatrizante experiments were carried out with 3, 7 and 14 days in animal models. The injuries treated with HP5 in the time of 3 days obtained a significant reduction ( $p < 0,05$ ) regarding the group control (CTL). In the injuries accompanied by 14 days treated with HP5 there was a significant reduction ( $p < 0,05$ ) regarding the injuries of the group treated with CTL. In the analysis histomorfológica of the scores of the group treated by 3,7 and 14 days there was no significant difference between the group CLT and the group HP5. The results suggest that the hidrogel of *H. pectinata* presented improvement in the repair cicatricial in animal, but precise model of more studies to corroborate with the finds of this study.

Key-words: Plants, Medicinal, Wound Healing; Varicose Ulcer; *Hyptis pectinata* (L.) and Meta-analysis.

## LISTA DE TABELAS

### **O Uso De Plantas Medicinais Em Úlceras Venosas: Uma Revisão Sistemática Com Metaanálise**

Table 1. Seleção dos Artigos	28
Table 2: As principais características dos 7 estudos que entraram para a revisão	30

### **Avaliação da cicatrização de feridas por hidrogel contexto extrato padronizado de *Hyptis pectinata* (L.) em ratos.**

Tabela 1. Composição percentual do extrato secos de <i>H. pectinata</i> (ESHP).	39
Tabela 2. Gradiente de eluição após a otimização do método.	40
Tabela 3 – Critérios histopatológicos considerados para análise do perfil evolutivo morfológico do processo de reparo cicatricial dérmico.	47
Tabela 4 – Resultados de repetibilidade e precisão intermediária da substância de referência rotina analisada por CLAE.	53
Tabela 5 – Resultado dos testes de Exatidão	54

## LISTA DE FIGURAS

### Referencial Teórico

- Figura 1. Representação esquemática da estrutura da pele. 05
- Figura 2- Fases do processo de cicatrização de feridas. 07

### The Use of Medicinal Plants in Venous Ulcers: A Systematic Review with Meta-Analysis

- Figura 1. Avaliação do risco de Viés dos estudos de 7 estudos que entraram para a revisão. 29
- Figura 2. Gráfico de floresta dos artigos de Lammoglia-Ordiales e colaboradores (2012) e Rivera-Arce e colaboradores (2007). 31

### Avaliação da cicatrização de feridas por hidrogel contexto extrato padronizado de *Hyptis pectinata* (L.) em ratos.

- Figura 1 - Cromatograma da SEHP (340 nm). P1: ácido cafêico (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>); P2: quercetina-3-β-D-glicosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>); P3: rutina (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>). 50
- Figura 2 - Curvas de calibração das substâncias de referências equivalentes a cada pico identificado. 51
- Figura 3 - (A) Perfil cromatográfico de extrato seco liofilizado de *Hyptis pectinata* (ESHP), obtido a partir de solução extrativa preparada por decocção; (B) Perfil cromatográfico do hidrogel incorporado ESHP a 5% (m/m); (C) Perfil cromatográfico do hidrogel base. Comprimento de onda de leitura de 340 nm, sistema de eluição em gradiente. 55
- Figura 4 - Efeito do extrato de *H. pectinata* na morfologia da ferida. CLT-3: grupo controle tratado por 3 dias; HP5-3: grupo tratado com hidrogel incorporado com extrato seco de *H. pectinata* tratado por 3 dias; CLT-7: grupo controle tratado por 7 dias; HP5-7: grupo tratado com hidrogel incorporado com extrato seco de *H. pectinata* tratado por 7 dias; CLT-14: grupo controle tratado por 14 dias; HP5-14: grupo tratado com hidrogel incorporado com extrato seco de *H. pectinata* tratado por 14 dias; 58
- Figura 5 – Efeito do extrato de *H. pectinata* na análise histológica de lâminas coradas com hematoxilina-eosina. A e B representam o grupo CTL-3 e as figuras C e D representam o grupo HP5-3, ambos tratados por 3 dias. Presença de infiltrado inflamatório misto em região perimuscular, além de vasos congestionados e edema. 59
- Figura 6 - As figuras A e B são representativas do grupo CTL-7; As figuras C e D representam o grupo HP5-7. 60
- Figura 7 - As figuras A e B representam o grupo CLT – 14, as figuras C e D representam o grupo HP5-14. 50

## LISTA DE ABREVIATURAS

UV	Úlcera Venosa
SEHP	Solução extrativa de <i>Hyptis pectinata</i> (L.)
ESHPI	Extrato seco por aspersão em spray dryer
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTL	Grupo controle
HP5	Extrato Seco de <i>Hyptis pectinata</i> (L.) incorporado ao Hidrogel
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
HE	hematoxilina/eosina
DFS/UFS	Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe
LAFAC	Laboratório de Farmacologia Cardiovascular
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
CEPA	Comitê de Ética em Experimentação Animal em Pesquisa
UFS	Universidade Federal de Sergipe
iNOS	óxido nítrico sintase
COX-2	ciclooxigenase-2
NF-κB	Fator nuclear Kappa B

## SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	2
2-REFERENCIAL TEÓRICO	5
3-OBJETIVOS	22
4-RESULTADOS	24
4.1 - O USO DE PLANTAS MEDICINAIS EM ÚLCERAS VENOSAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA COM METAANÁLISE	24
4.2- AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS POR HIDROGEL CONTEXTO EXTRATO PADRONIZADO DE <i>Hyptis pectinata</i> (L.) EM RATOS.	36
5 - CONCLUSÃO	63
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7. ANEXO	73
7.1- Artigo publicado na International Wound Journal	73
7.2 - SUBMISSÃO A REVISTA: SKIN PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY	78
7.3 - AUTORIZAÇÃO DO CONSELHO DE ÉTICA ANIMAL	85



## 1. INTRODUÇÃO

As úlceras venosas de membros inferiores ou de pernas surgem como consequência da hipertensão venosa, ocasionada pelo acúmulo de sangue decorrente da grande dificuldade de retorno venoso (COUCH et al., 2017).

Estima-se que cerca de 1,5 a 2% da população mundial seja acometida por úlceras venosas, sendo mais incidente em pacientes com mais de 65 anos de idade, podendo atingir 4% desta população (ABBADE et al., 2005; WELLER; EVANS, 2012).

O diagnóstico e o tratamento adequados são vitais para o cuidado de usuários com úlceras venosas, proporcionando maior rapidez da cicatrização e prevenção de recorrências (SILVA et al., 2012).

O tratamento de úlceras venosas ampara-se, majoritariamente, no controle da estase venosa (por meio da terapia compressiva) e tratamento tópico. A terapia compressiva (seja ela elástica ou inelástica) tem se mostrado eficaz por melhorar o retorno venoso. O tratamento tópico compreende o uso de pomada de sulfadiazina prata, gel de papaína entre outros (REZENDE DE CARVALHO; DE OLIVEIRA; RENAUD, 2017; SELLMER et al., 2013). Algumas alternativas biotecnológicas vêm sendo utilizadas entre elas podemos destacar as coberturas de espumas de poliuretano, hidrocolóides, alginato de cálcio e hidrogéis. Estes produtos tem se mostrado mais efetivos, por proporcionar a permeação de princípios ativos, interagir diretamente com as células no local da ferida, favorecendo, assim, o processo de cicatrização (LAMMOGLIA-ORDIALES et al., 2012; MORIMOTO et al., 2015; PARKES, 2015; ROMERO-CERECERO et al., 2013).

Dentre os curativos biomecnológicos, os hidrogéis se apresentam como redes poliméricas capazes de absorver grande quantidade de água e diferentes fluidos biológicos que contenham grande quantidade de água. Por apresentarem propriedades físicas semelhantes as dos tecidos vivos e características como biocompatibilidade e hidrodilifidade, além de serem biodegradáveis e isentos de toxicidade; são empregados como biomateriais. São também utilizados como carreadores de princípios ativos por possuírem a capacidade de prolongar o tempo de permanência para a liberação local (AHMED, 2015; HOFFMAN, 2012; MACHADO, 2010)

Neste contexto, plantas medicinais e seus extratos vem sendo utilizadas popularmente para o tratamento de úlceras venosas. Este uso tem despertado o interesse da comunidade científica para a pesquisa e desenvolvimento de produtos alternativos (SÜNTAR et al., 2012). Entre as espécies investigadas *Hyptis pectinata* (L.), conhecida popularmente como sambacaitá, apresenta uso popular descrito para o tratamento de inflamações, infecções bacterianas, dores e câncer (MELO et al., 2005; PAIXÃO et al., 2015)

Para a espécie são descritas as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antiedematogênica do extrato aquoso das folhas (ARRIGONI-BLANK et al., 2008; BISPO et al., 2001; RAYMUNDO et al., 2011).

A incorporação de extratos aquosos de plantas a produtos de origem natural como o hidrogel apresenta-se como uma alternativa viável e promissoras para potencializar o efeito cicatrizante. (DORNELAS et al., 2008).

Sendo assim este estudo tem por objetivo a investigação do potencial cicatrizante de hidrogel incorporado de *H. pectinata* (L.) em modelo animal.



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

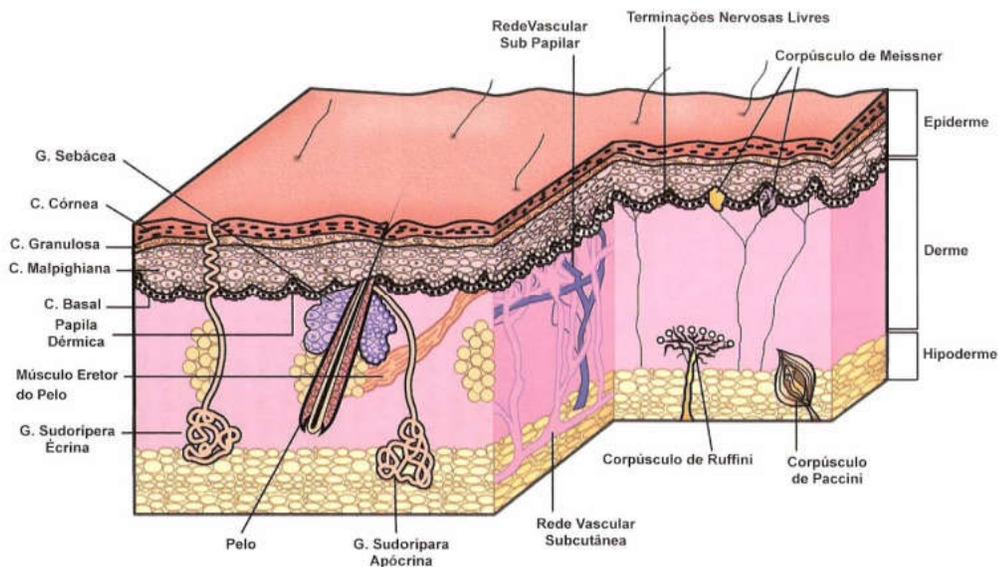
### 2.1. PELE

A pele humana é um órgão de revestimento representando a interface entre o organismo e o meio externo. Trata-se do maior órgão do corpo humano. (MCLAFFERTY; HENDRY; FARLEY, 2012).

Desempenha funções diversas no organismo, estando relacionadas à proteção contra radiação ultravioleta, agressões mecânicas, químicas e térmicas. Além disso, impede a desidratação excessiva, garante a homeostasia corporal, atuando na secreção de substâncias endógenas e na percepção sensorial do meio ambiente (CHEN; TSAO, 2013; PEREIRA; BARTOLO, 2014).

É composta por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme ou tecido subcutâneo (Figura 1)(FORTES; SUFFREDINI, 2014; KAMEL et al., 2016).

Figura 1- Representação esquemática da estrutura da pele (SAMPAIO, 2001).



### 2.1.1. Epiderme

A epiderme é a camada mais superficial da pele com espessura que varia entre 0,6 mm (face) e 1,3 mm (palmas), constituída de tecido epitelial de revestimento pavimentoso queratinizado (CAROLINA DE LOURDES, 2009; TOSATO et al., 2012). A epiderme é subdivida em duas camadas: o estrato córneo e a epiderme viável. O estrato córneo é a principal barreira a passagem substâncias através da pele e a perda de água. Sua estrutura assemelha-se a uma “parede de tijolos”, onde as células de queratina (corneócitos), que representam cerca de 80% do volume da camada córnea, estão imersas em uma matriz lipídica disposta em bicamadas e composta principalmente por ceramidas, colesterol e ácidos graxos (SILVA, 2008; STORPIRTIS et al., 2009). A epiderme viável é formada por células em constante atividade proliferativa, dividida em camadas ou estratos: camada lúcida, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal ou germinativa. Em movimento ascendente de diferenciação da camada basal, as células metabolicamente ativas se alteram, de forma ordenada, originando os corneócitos que se dispõem no estrato córneo (STORPIRTIS et al., 2009). O tempo de renovação epidérmica, desde a divisão celular na camada basal até a passagem dos corneócitos pelo estrato córneo pode ser estimado em 59 a 75 dias (HARRIS, 2009). Na epiderme encontram-se ainda os melanócitos, as células de Langerhans (defesa imunológica) e as células de Merckel (com terminações nervosas e sensoriais) (LIRA et al., 2004).

A derme apresenta-se como uma camada de sustentação, localizada entre a epiderme e hipoderme, com espessura variável entre 2 e 4 mm. É constituída de tecido conjuntivo, constituindo uma densa malha de fibras de colágeno e elastina, produzidas pelos fibroblastos. Na derme estão inseridos os anexos cutâneos, os capilares sanguíneos, os vasos linfáticos, os nervos e terminações nervosas, além de estruturas derivadas da epiderme, os apêndices cutâneos, como os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (BOROJEVIC; SERRICELLA, 1999; SILVA, 2008).

A derme está subdividida em duas camadas: a derme papilar, mais superficial e em contato com a epiderme, que confere maior resistência a pele além de fornecer nutriente a epiderme por difusão, e a derme reticular, que confere elasticidade e resistência à compressão (CAROLINA DE LOURDES,

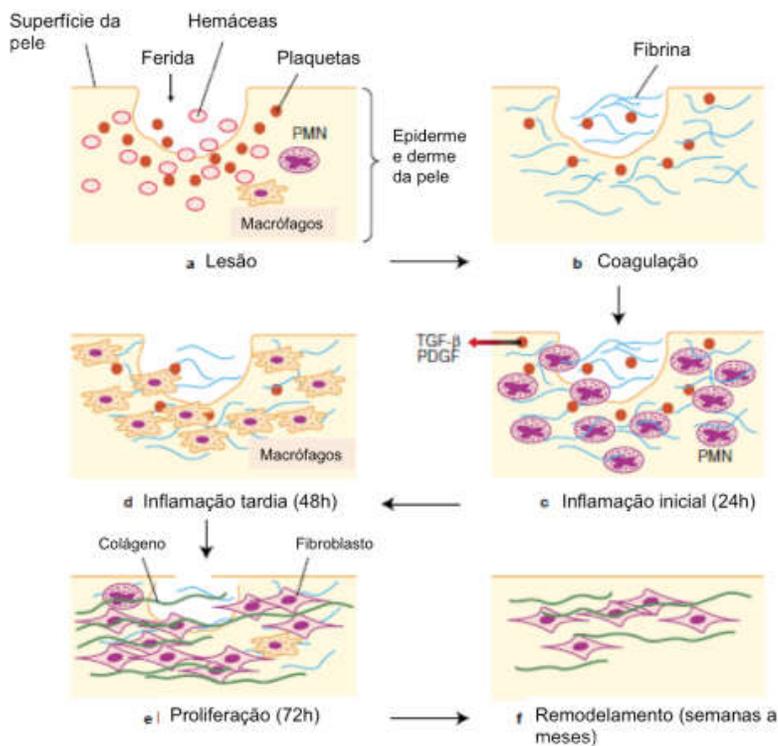
2009; OLIVEIRA et al., 2015). A camada mais profunda da pele é a hipoderme ou tecido subcutâneo, formada por tecido conjuntivo frouxo e pelo tecido adiposo, que quando desenvolvido forma o panículo adiposo, responsável pela modelagem corporal. Além disso, o tecido adiposo confere ainda isolamento térmico e proteção mecânica (LIRA, 2007; TOSATO, 2010).

## 2.2. CICATRIZAÇÃO

Define-se como ferida cutânea qualquer ruptura na integridade da pele, podendo esta apresentar diferentes profundidades, tamanhos ou formas, sendo causada por razões distintas (FERGUNSON & O'KANE, 2004).

O processo de cicatrização compreende um conjunto de eventos bioquímicos desencadeados a fim de reparar o dano. O processo de reparo tecidual é dividido em fases, de limites não muito distintos, mas sobrepostas no tempo a saber: fase inflamatória; fase proliferativa; fase de remodelamento da derme (Figura 2) (REINKE; SORG, 2012; TOLAZZI, 2007).

Figura 2- Fases do processo de cicatrização de feridas. Adaptado de (Beanes, Dang, Soo, & Ting, 2003).



Após a lesão tecidual inicia-se a fase inflamatória. Devido a localização estratégica das células epiteliais entre o corpo e o ambiente externo, ocorre a comunicação e sinalização para a expressão de receptores de reconhecimento molecular, ativação e migração de células necróticas para a lesão. Destas, as citocinas produzidas pelos queratinócitos são os principais contribuintes para o início do processo inflamatório (DIAS, 2015; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Além dos queratinócitos outras células como macrófagos, mastócitos e células endoteliais são ativadas, culminando com a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a permeabilidade vascular e aumentando expressão de moléculas de adesão que levam a ligação com células sanguíneas (neutrófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas) (WANG et al., 2017).

Para conter a hemorragia, ocorre a ativação de agregação plaquetária, levando a formação de um trombo rico em plaquetas. Este trombo sofre infiltração por fibrina, passando a ser denominado de trombo fibroso. A partir daí, eritrócitos são capturados por essa rede fibrosa formando-se, então, o trombo vermelho (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Após ativação das plaquetas ocorre a liberação de fatores de crescimento (como fator de crescimento derivado de plaquetas-PDGF e fator de crescimento transformante beta-TGF- $\beta$ ), além de quimiocinas e outras proteínas. Estes fatores, quando liberados, são importantes na regulação da resposta inflamatória pois estimulam a angiogênese favorecendo, assim, a formação de tecido de granulação (NEVES, 2015).

Durante a fase inflamatória, a agregação plaquetária é seguida pela infiltração de leucócitos. Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para a região da ferida, tendo como objetivo fagocitar e destruir microrganismos (por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio). Esta migração tem início na primeira hora depois da lesão e permanece por até 48 horas (YOUNG; MCNAUGHT, 2011). Além disso, essas células também estão envolvidas na remoção de restos celulares, além de produzir várias citocinas que auxiliarão no processo inflamatório (BABIOR, 1978; CHHABRA et al., 2017).

A menos que o estímulo para recrutamento de neutrófilos continue, o infiltrado destas células cessa, dando início à resolução da inflamação por meio

da fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos. Os macrófagos atingem a concentração de pico em um ferimento em 48-72 horas e mantêm fatores de crescimento, incluindo o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento epidérmico (EGF) (REINKE; SORG, 2012).

A fase proliferativa inicia após a ativação de fibroblastos, pelos mediadores produzidos pelos macrófagos. Estes fibroblastos migram da região das bordas para o centro da ferida, produzindo componentes da matriz extracelular, como colágeno, levando à formação de tecido conjuntivo na região da lesão, processo este denominado de fibroplasia. Para que o processo de fibroplasia seja eficiente é necessária a formação de novos vasos (angiogênese), originando uma rede vascular rica de capilares ao longo da ferida regulados, principalmente, pelo fator de crescimento do endotélio vascular, o que leva ao aumento da oferta de oxigênio para o tecido em formação, melhorando a nutrição de células metabolicamente ativas (SMIGIEL; PARKS, 2018).

O processo continua com a formação de tecido de granulação e a proliferação de fibroblastos, que produzem as fibras elásticas e colágeno. Os macrófagos são células importantes nessa fase pois produzem moléculas que modulam ambos os processos de fibroplasia e angiogênese como o fator de crescimento derivado das plaquetas, exercendo, assim, papel fundamental entre a inflamação e a formação do tecido de granulação na fase proliferativa (DANTAS; JORGE, 2005; GERGER et al., 2009; SILVA et al., 2007).

Os fatores de crescimento e citocinas produzidos durante a formação do tecido de granulação também influenciam na epitelização da região da ferida, por meio da migração e proliferação de células epiteliais, os queratinócitos. Com o avançar do processo a produção de fibras colágenas é intensificada, levando a formação de uma matriz celular mais densa. O leito da ferida passa a ser preenchido, então, com tecido conjuntivo. Neste momento fibroblastos mais especializados (miofibroblastos) promovem a contração da ferida, auxiliando a redução da área de superfície da lesão (LI; CHEN; KIRSNER, 2007)(REINKE; SORG, 2012).

A fase de remodelamento caracteriza-se pela substituição, no tecido de granulação, do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I. As fibras do colágeno tipo I

são mais espessas e resistentes, faxendo com que a lesão assuma a aparências de uma massa fibrótica, característica de uma cicatriz. Essa fase persiste por um grande tempo mesmo após o fechamento da ferida (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; CHHABRA et al., 2017).

### 2.3. *Hyptis pectinata* (L.)

A família Lamiaceae ou Labiatae é uma das mais representativas contendo cerca de 236 gêneros e de 6.900 a 7200 espécies. As plantas dessa família são espécies aromáticas, com emprego alimentar e medicinal. Tradicionalmente são utilizadas para tratar diversas enfermidades tais como tosse, inflamações, infecções, dor de cabeça e até para o tratamento da síndrome do intestino irritável (RAJA, 2012).

O gênero *Hyptis* possui mais de 40 espécies espalhadas em 131 países pelo oeste, centro e sul da América, oeste Africano, oeste Indiano e nas ilhas Fiji (Oceania). É composto por ervas, arbustos, subarbustos ou raramente pequenas árvores. Os caules são geralmente quadrangulares, as folhas opostas, simples ou mais raramente partidas, pecioladas, sésseis ou curtamente pedunculadas, contendo substâncias aromáticas (MICHAELA PIETSCHMANN, OTTO VOSTROWSKY, HANS JÜRGEN BESTMANN, ANIL K. PANT, 1998).

*Hyptis pectinata* (L.), conhecida popularmente como sambacaitá ou canudinho, é uma espécie nativa dos estados de Alagoas e Sergipe. Na medicina popular é utilizada para o tratamento de doenças respiratórias, congestão nasal, distúrbios gástricos, afecções de pele, febre e infecções contagiosas causadas por bactérias e fungos (BUENO et al., 2005; SERAFINI et al., 2012).

Seu uso popular tem despertado o interesse da comunidade científica para a investigação da composição química e atividades farmacológicas para a espécie tanto do óleo essencial como de extratos brutos.

Dentre os estudos que isolaram óleos essenciais a partir da *H. pectinata* (L.), podemos destacar as atividades realizadas por Tchoumboungang e colaboradores (2005) que obtiveram, a partir da hidrodestilação das folhas da planta, o germacreno D (28%) e o  $\beta$ -cariofileno (22,1%) como constituintes majoritários. Serafini e colaboradores (2012) identificaram, adicionalmente,  $\beta$ -

cariofileno (7,03%), cis- $\beta$ -guaieno (5,14%), sendo que a calamusenona (67,84%) foi o composto em maior quantidade.

Também é relatada a presença de  $\beta$ -cariofileno e óxido de cariofileno. Esses dois compostos foram descritos em alguns estudos, como sendo os compostos majoritários do óleo essencial de *H. pectinata* (NASCIMENTO et al., 2008a; RAYMUNDO et al., 2011; SANTOS et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Para o extrato hidroalcolico são relatadas a presença de extratos etanólicos ácido sambacaitárico, ácido 3-O-methyl-sambacaitárico, ácido rosmarinico, ácido 3-O metil-rosmarinico, cafeato de etila, nepetoidina A, nepetoidina B, cirsioliola, circimaritina, 7-O-methyluteolina (FALCAO et al., 2013), pectinolideo A, pectinolideo B, pectinolideo C, pectinolideo H (FRAGOSO-SERRANO; GIBBONS; PEREDA-MIRANDA, 2005) (PEREDA-MIRANDA et al., 1993) e calamusenone (DOS SANTOS et al., 2012). Nos extratos metanólicos foram encontrados hiptolideo (ROJAS et al., 1992); pectinolídeo D; pectinolídeo E; pectinolídeo F; pectinolídeo G (BOALINO et al., 2003).

No que diz respeito as atividades biológicas os estudos pioneiros iniciaram na Universidade Federal de Sergipe com o extrato aquoso da espécie. Foi observada a atividade antinociceptiva e antiedematogênica, além de ausência de toxicidade aguda em modelo animal (BISPO et al., 2001).

O efeito do extrato aquoso sobre a estimulação da regeneração hepática após hepatectomia parcial em animais foi observado nas doses de 100 mg/kg e de 200 mg/kg, sendo potencializado com a adição de terapia a laser. (MELO et al., 2006).

Ainda foi investigado o potencial do referido extrato sobre o Sistema Nervoso Central de roedores nos modelos experimentais de "screening" farmacológico, campo aberto, nado forçado, hipotermia induzida por apomorfina, labirinto em cruz elevado e tempo de sono induzido por tiopental. O extrato não apresentou atividade para os modelos de labirinto em cruz e tempo de sono induzido, sugerindo um possível potencial antidepressivo (BUENO et al., 2006).

A atividade antimicrobiana também foi relatada para o extrato aquoso das folhas (BASÍLIO et al., 2006; FRAGOSO-SERRANO; GIBBONS; PEREDA-MIRANDA, 2005).

Estudos recentes relatam a atividade antioxidante *in vitro* e antinociceptiva orofacial em ratos para o extrato aquoso (PAIXÃO et al., 2013).

Para o óleo essencial da espécie são descritas as atividades antinociceptiva (ARRIGONI-BLANK et al., 2008), anti-inflamatória (FRAGOSO-SERRANO; GIBBONS; PEREDA-MIRANDA, 2005) e antibacteriana contra *Streptococcus mutans* (NASCIMENTO et al., 2008b).

Os extratos de *H. pectinata* particionados com solventes orgânicos também apresentaram atividade biológica descrita. A partição hexano e clorofórmio 3,2% (v/v) apresentou atividade antinociceptiva em modelo animal (LISBOA et al., 2006). Já a partição clorofórmica apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (FRAGOSO-SERRANO; GIBBONS; PEREDA-MIRANDA, 2005).

#### 2.4. Hidrogel

Os hidrogéis são redes poliméricas hidrofílicas que têm grande capacidade de absorver água, desde pequenas quantidades até milhares de vezes o seu peso seco. Esta capacidade se dá pela presença de grupos hidrofílicos como =O, -OH, -COOH, -COONH<sub>2</sub>, -COO<sub>3</sub>H e os grau de reticulação (HOFFMAN, 2012).

Os polímeros que fazem parte da composição de hidrogéis são classificados em sintéticos e naturais. São empregados como polímeros naturais o amido (WANG; WANG, 2010), a quitosana (MA et al., 2012), o alginato (DOURADO, 2016) e a celulose (SENNA; NOVACK; BOTARO, 2014).

A celulose é o polímero natural mais abundante na Terra, sendo o componente presente em maior quantidade na biomassa das plantas (BARUD, 2006). A celulose é um homopolissacarídeo linear cuja estrutura é constituída por unidades de β-D-glicopiranoose (β-glucose) unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1→4) (SANNINO; DEMITRI; MADAGHIELE, 2009).

Os polímeros derivados de celulose apresentam propriedades de intumescimento e liberação prolongada de fármacos, proporcionando a permanência do princípio ativo no local (LI et al., 2009).

Dentre os derivados da celulose a carboximetilcelulose de sódio é um polímero de celulose de B-(1->4)-D-glucopirranose, sintético, aniônico, muito solúvel em água. Apresenta sensibilidade às variações de pH e de força iônica, sendo o único polieletrólito derivado da celulose com esta característica (SANNINO; DEMITRI; MADAGHIELE, 2009).

Devido às características de biocompatibilidade e hidrofiliçidade os hidrogéis vêm sendo amplamente utilizados como curativos de uso tópico em substituição aos curativos tradicionais, que promovem forte aderência ao local da ferida causando dor e outras lesões durante as trocas. Neste sentido, os hidrogéis reduzem a dor dos pacientes tratados através de um efeito de resfriamento e baixa aderência ao tecido (KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018). Podem ser utilizados em várias fases do processo de cicatrização. Sua ação deriva da elevada capacidade de absorção do exsudato em excesso na ferida, pois permitem a manutenção da umidade no ambiente, favorecendo o crescimento celular e, conseqüentemente, o processo de cicatrização (TROVATTI et al., 2017).

A bioatividade adicional pode ser gerada pela combinação de precursores naturais e sintéticos para arquitetar com precisão a estrutura da rede de polímeros do gel, permitindo curativos de feridas com novas características de cicatrização de feridas - liberação controlada do medicamento, por exemplo.

Extratos de plantas incorporados em gel.

A fim de investigar Monica

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBADE, L. P. F. et al. A sociodemographic, clinical study of patients with venous ulcer. **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 12, p. 989–992, 2005.
- AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105–121, mar. 2015.
- ALVES DO NASCIMENTO, M. W. et al. Medicinal plants indications from herbal healers for wound treatment. **Revista Eletronica de Enfermagem**, v. 18, 2016.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. et al. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit.(Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine**, v. 15, n. 5, p. 334–339, 2008.
- ASEKUN, O. T.; EKUNDAYO, O.; ADENIYI, B. A. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 4, p. 440–442, 1999.
- BABIOR, B. M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **New England Journal of Medicine**, v. 298, n. 12, p. 659–668, 1978.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.
- BARUD, H. DA S. Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana. 2006.
- BASÍLIO, I. J. L. D. et al. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 518–525, 2006.
- BISPO, M. D. et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 81–86, 2001.
- BOALINO, D. M. et al. ??-Pyrones and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1303–1307, 2003.
- BOROJEVIC, R.; SERRICELLA, P. Próteses vivas de pele humana. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 7, p. 16–18, 1999.
- BRASIL. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2017.
- BUENO, A. X. et al. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 317–323, 2006.
- BUENO, N. R. et al. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 39–44, 2005.

CAROLINA DE LOURDES, J. V. HISTOFISIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DAS QUEIMADURAS: CONSEQUÊNCIAS LOCAIS E SISTÊMICAS DAS PERDAS TECIDUAIS EM PACIENTES QUEIMADOS. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 3, 2009.

CARVALHO, M. G. et al. Development and Validation of a Simultaneous RP-HPLC/UV/DAD Method for Determination of Polyphenols in Gels Containing *S. terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 50, p. 309–315, 18 abr. 2017.

CHEN, Y. E.; TSAO, H. The skin microbiome: Current perspectives and future challenges. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 1, p. 143–155, 2013.

CHHABRA, S. et al. Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS. **Journal of maxillofacial and oral surgery**, v. 16, n. 4, p. 403–423, dez. 2017.

COUCH, K. S. et al. The International Consolidated Venous Ulcer Guideline Update 2015: Process Improvement, Evidence Analysis, and Future Goals. **Ostomy/wound management**, v. 63, n. 5, p. 42–46, maio 2017.

DANTAS, S.; JORGE, S. A. Feridas e estomas. **Campinas, Edição do autor**, 2005.

DIAS, V. C. B. Fator de crescimento de queratinócito (KGF) na expressão gênica da cicatrização em queratinócitos de pacientes com queimadura. 2015.

DORNELAS, C. B. et al. Avaliação de derivados poliméricos intercalados em montmorilonita organofílica na preparação de novos materiais de uso farmacêutico. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 3, p. 222–229, 2008.

DOS SANTOS, E. A. et al. Bioactivity Evaluation of Plant Extracts Used in Indigenous Medicine against the Snail, *Biomphalaria glabrata*, and the Larvae of *Aedes aegypti*. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2012, p. 846583, 2012.

DOURADO, L. F. N. **Preparação e caracterização de sistemas de liberação controlada de simvastatina a partir de poli (3-hidroxibutirato)**UFVJM, , 2016.

FALCAO, R. A. et al. Antileishmanial phenylpropanoids from the leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

FAQUETI, L. G. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of standardized extract of polymethoxyflavones from *Ageratum conyzoides*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 369–377, dez. 2016.

FORTES, T. M. L.; SUFFREDINI, I. B. Avaliação de pele em idoso: revisão da literatura. **J Health Sci Inst.[Internet]**, v. 32, n. 1, 2014.

FRAGOSO-SERRANO, M.; GIBBONS, S.; PEREDA-MIRANDA, R. Anti-

- staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. **Planta medica**, v. 71, n. 3, p. 278–280, 2005.
- GERGER, A. et al. In vivo confocal laser scanning microscopy in the diagnosis of melanocytic skin tumours. **British Journal of Dermatology**, v. 160, n. 3, p. 475–481, 2009.
- HARRIS, M. I. N. D. E. C. **Pele-estrutura, propriedades e envelhecimento**. [s.l.] Senac, 2009.
- HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, Supple, p. 18–23, dez. 2012.
- JESUS, N. Z. T. et al. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 982–988, 2013.
- KAMEL, R. A. et al. Tissue Engineering of Skin. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 217, n. 3, p. 533–555, 16 maio 2016.
- KOEHLER, J.; BRANDL, F. P.; GOEPFERICH, A. M. Hydrogel Wound Dressings for Bioactive Treatment of Acute and Chronic Wounds. **European Polymer Journal**, 2018.
- LAMMOGLIA-ORDIALES, L. et al. A randomised comparative trial on the use of a hydrogel with tepescohuite extract (*Mimosa tenuiflora* cortex extract-2G) in the treatment of venous leg ulcers. **International Wound Journal**, v. 9, n. 4, p. 412–418, 2012.
- LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9–18, 2007.
- LI, R. et al. Cellulose whiskers extracted from mulberry: A novel biomass production. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 1, p. 94–99, 2009.
- LIRA, A. A. M. et al. Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação in vitro. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 1, p. 35–41, 2004.
- LIRA, A. A. M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele** Universidade de São Paulo, , 2007.
- LISBOA, A. C. C. D. et al. Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. **Fitoterapia**, v. 77, n. 6, p. 439–442, 2006.
- MA, G. et al. Hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte complexes nanofibers prepared by electrospinning. **Materials Letters**, v. 74, p. 78–80, 2012.
- MACHADO, A. C. H. R. **Desenvolvimento e avaliação da incorporação e liberação de óleo de açaí em hidrogéis de poli (N-vinil-2-pirrolidona)** Universidade de São Paulo, , 2010.
- MCLAFFERTY, E.; HENDRY, C.; FARLEY, A. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. **Nursing Standard**, v. 27, n. 3, p. 35–42, 2012.

MELO, G. B. et al. Effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after 70% partial hepatectomy. Preliminary results. **Acta Cir Bras**, v. 16, n. Supl 1, p. 13–15, 2001.

MELO, G. B. et al. Effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver mitochondrial respiration. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 359–362, 2005.

MELO, G. B. et al. Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats 1 Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* na regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. Suplemento 1, p. 33–36, 2006.

MICHAELA PIETSCHMANN, OTTO VOSTROWSKY, HANS JÜRGEN BESTMANN, ANIL K. PANT, C. S. M. Volatile Constituents of *Hyptis pectinata* Poit. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. Vol. 10, n. 5, 1998.

MONACO, J. L.; LAWRENCE, W. T. Acute wound healing an overview. **Clinics in plastic surgery**, v. 30, n. 1, p. 1–12, jan. 2003.

MORIMOTO, N. et al. Exploratory clinical trial of combination wound therapy with a gelatin sheet and platelet-rich plasma in patients with chronic skin ulcers: study protocol. **BMJ open**, v. 5, n. 5, p. e007733, 2015.

NASCIMENTO, P. et al. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti- *Streptococcus mutans* activity. **Oral Diseases**, v. 14, n. 6, p. 485–489, 2008a.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. **Oral diseases**, v. 14, n. 6, p. 485–489, 2008b.

NEVES, E. M. DOS S. F. **Macrófago[sn]**, , 2015.

OLIVEIRA, D. M. et al. Antibacterial mode of action of the hydroethanolic extract of *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. involves bacterial membrane perturbations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 356–363, 2015.

PAIXÃO, M. S. et al. *Hyptis pectinata*: redox protection and orofacial antinociception. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 9, p. 1328–1333, 2013.

PAIXÃO, M. S. et al. *Hyptis pectinata* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 35–41, 2015.

PARK, Y. G. et al. Hydrogel and Platelet-Rich Plasma Combined Treatment to Accelerate Wound Healing in a Nude Mouse Model. **Archives of plastic surgery**, v. 44, n. 3, p. 194–201, maio 2017.

PARKES, J. A clinical in-market evaluation of an alginate fibre dressing. **British Journal of Nursing**, v. 24, p. S28-35, 14 ago. 2015.

PEREDA-MIRANDA, R. et al. Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis pectinata*. **Journal of natural products**, v. 56, n. 4, p. 583–593,

1993.

PEREIRA, R. F.; BARTOLO, P. J. Traditional therapies for skin wound healing. **Advances in Wound Care**, 2014.

RAJA, R. R. LamiaceaeOverview.pdf. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 3, n. 1819–3455, p. 203–213, 2012.

RAYMUNDO, L. J. R. P. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 725–732, 12 abr. 2011.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

REZENDE DE CARVALHO, M.; DE OLIVEIRA, B.; RENAUD, B. G. Terapia compressiva para el tratamiento de úlceras venosas: una revisión sistemática de la literatura. **Enfermería Global**, v. 16, n. 45, p. 574–633, 2017.

ROJAS, A. et al. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 35, n. 3, p. 275–283, 1992.

ROMERO-CERECERO, O. et al. Pharmacological and chemical study to identify wound-healing active compounds in *Ageratina pichinchensis*. **Planta Medica**, v. 79, n. 8, p. 622–627, 2013.

SAMPAIO, S. A. P. Rivitti E. Pele normal: anatomia e fisiologia. **Sampaio SAP, Rivitti E. Dermatologia. 3ª edição. São Paulo Artes Médicas**, p. 3–35, 2001.

SANNINO, A.; DEMITRI, C.; MADAGHIELE, M. Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications. **Materials**, v. 2, n. 2, p. 353–373, 2009.

SANTOS, P. O. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1648–1652, 2008.

SARHEED, O. et al. An investigation and characterization on alginate hydrogel dressing loaded with metronidazole prepared by combined inotropic gelation and freeze-thawing cycles for controlled release. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 3, p. 601–609, jun. 2015.

SELLMER, D. et al. Sistema especialista para apoiar a decisão na terapia tópica de úlceras venosas. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 34, n. 2, p. 154–162, 2013.

SENNA, A. M.; NOVACK, K. M.; BOTARO, V. R. Synthesis and characterization of hydrogels from cellulose acetate by esterification crosslinking with EDTA dianhydride. **Carbohydrate polymers**, v. 114, p. 260–268, 2014.

SERAFINI, M. R. et al. Determination of chemical and physical properties of *Hyptis pectinata* essential oil and their redox active profile. **Free Radical**

**Biology & Medicine**, v. 3, n. March, p. 1–9, 2012.

SILVA, W. J. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3251–3255, 2008.

SILVA, J. A. DA. Desenvolvimento, caracterização e estudo de permeação cutânea de diclofenaco de dietilamônio em sistemas tópicos nanoemulsionados. 2008.

SILVA, M. H. DA et al. Manejo clínico de úlceras venosas na atenção primária à saúde. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 25, n. 3, p. 329–333, 2012.

SILVA, R. C. L. DA et al. Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem. **São Caetano do Sul: Yendis**, 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. [s.l.] Artmed Editora, 2016.

SMIGIEL, K. S.; PARKS, W. C. Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: Recent Insights. **Current rheumatology reports**, v. 20, n. 4, p. 17, mar. 2018.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of separation science**, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.

STORPIRTIS, S. et al. Ciências farmacêuticas: biofarmacotécnica, Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 2009.

SÜNTAR, I. et al. Wound healing and antioxidant properties: do they coexist in plants? **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 2, p. 1–7, 2012.

TCHOUMBOUGNANG, F. et al. Aromatic plants of tropical Central Africa. XLVIII. Comparative study of the essential oils of four *Hyptis* species from Cameroon: *H. lanceolata* Poit., *H. pectinata* (L.) Poit., *H. spicigera* Lam. and *H. suaveolens* Poit. **Flavour and fragrance journal**, v. 20, n. 3, p. 340–343, 2005.

THAKUR, V. K.; THAKUR, M. K. Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 834–847, jan. 2015.

TOLAZZI, A. R. D. Efeito do inibidor de Leucotrieno Montelukaste na cicatrização cutânea em ratos: avaliação tensiométrica, da contração cicatricial e da deposição de colágeno. 2007.

TOSATO, M. G. **Análise dos constituintes da pele humana sob efeitos de cosmecêuticos por espectroscopia Raman**. 105 fDissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)–Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, , 2010.

TOSATO, M. G. et al. Análise da composição bioquímica da pele por espectroscopia Raman. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 28, n. 3, 2012.

TROVATTI, E. et al. Biopolímeros: aplicações farmacêutica e biomédica. **Eclética Química Journal**, v. 41, n. 1, p. 1–31, 2017.

WANG, P.-H. et al. Wound healing. **Journal of the Chinese Medical Association**, 2017.

WANG, W.; WANG, A. Synthesis and swelling properties of pH-sensitive semi-IPN superabsorbent hydrogels based on sodium alginate-g-poly (sodium acrylate) and polyvinylpyrrolidone. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 4, p. 1028–1036, 2010.

WELLER, C.; EVANS, S. Venous leg ulcer management in general practice-practice nurses and evidence based guidelines. **Australian family physician**, v. 41, n. 5, p. 331–337, maio 2012.

YOUNG, A.; MCNAUGHT, C.-E. The physiology of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 29, n. 10, p. 475–479, 2011.



OBJETIVOS

### 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade cicatrizante do extrato aquoso de *Hyptis Pectinata* (L.) incorporado ao hidrogel em modelo animal de feridas cutâneas.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar uma revisão sistemática sobre plantas medicinais com atividade cicatrizante;

Desenvolver e validar uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para a quantificação do extrato aquoso de *Hyptis pectinata* (L.) e produtos derivados;

Investigar o potencial cicatrizante do extrato seco padronizado de *Hyptis pectinata* (L.) incorporado ao hidrogel em modelo tecidual de ferida excisional em ratos;



## 4. RESULTADOS

### 4.1. O USO DE PLANTAS MEDICINAIS EM ÚLCERAS VENOSAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA COM METAANÁLISE (Publicado: International Wound Journal ISSN 1742-4801)

Impact Factor: 2.848

#### RESUMO

O objetivo desse estudo foi realizar uma revisão sistemática sobre o uso de plantas medicinais para o tratamento de úlceras varicosas. As bases de dados utilizadas foram: Medline/Pubmed, Scopus, Cinahl, Lilacs e Web of Science. O processo de seleção foi dividido em duas fases: inicialmente foi realizada a leitura dos títulos e resumos seguida da leitura dos artigos selecionados na íntegra. Os artigos selecionados para leitura na íntegra foram avaliados através do check list da Consolidated Standards of Reporting Trials. A busca inicial resultou em 3505 artigos. Destes, sete artigos atendiam aos critérios da seleção e foram incluídos na revisão sistemática. Dos estudos incluídos, sete (100%) avaliaram a redução da área da úlcera, dos quais quatro (57,14%) avaliaram a pressão de oxigênio e o dióxido de carbono percutâneo. Os níveis de avaliação da evidência indicaram que cinco estudos (71,42%) foram classificados em nível 2 e dois (28,57%) foram classificados em nível 3. A avaliação da qualidade dos artigos se deu pela utilização da escala Jadad. O índice de qualidade do instrumento da escala de Jadad varia de 0 a 5, neste sentido os estudos analisados obtiveram uma média de 2,5. A meta-análise foi realizada com dois estudos que avaliaram os efeitos do hidrogel incorporado com extrato de *Mimosa tenuiflora* no tratamento de úlcera venosa. Ao somar os dois estudos o número de pacientes totalizou 42, com média de idade de 60,5 anos. A média de duração do tratamento foi de 10,5 semanas. A heterogeneidade foi avaliada usando  $I^2$ ; obtendo-se um alto valor de 84%. Podemos concluir que o hidrogel que incorporado com *M. tenuiflora* parece ser candidato promissor para o tratamento de úlceras venosas.

## INTRODUÇÃO

Os problemas relacionados à circulação sanguínea como úlceras venosas crônicas são muito comuns. A doença está associada com a complicação da insuficiência venosa crônica, que é a principal causa de úlceras nos membros inferiores. Úlceras venosas são causadas pelo mau funcionamento das válvulas venosas, o qual afeta o suprimento de oxigênio e nutrientes para os tecidos, propiciando o aparecimento dessas lesões (1). Indivíduos entre 60 e 80 anos são os mais afetados, contudo a maioria das lesões surgem antes dos 60 anos (2). Uma comparação dos dados de alguns países ocidentais indicou uma variação de prevalência epidemiológica de 0,7% à 2,7% (2,3).

O custo de tratamento para essa doença é geralmente alto e resulta em um impacto tanto econômico como social devido ao longo processo de tratamento e cicatrização (2-4). Os principais tratamentos relatados para úlceras venosas de membros inferiores são a terapia de compressão (camada única, altamente elástica ou multicamada) e a tradicional bota de Unna (4-6).

O uso de plantas medicinais parece ser uma alternativa de baixo custo, sendo visto como alternativa quando o tratamento convencional não se mostra eficaz (7). Considerando a prevalência da doença e novas alternativas no tratamento das úlceras venosas, este estudo tem como objetivo realizar uma revisão sistemática sobre o uso de plantas medicinais em úlceras venosas (8,9).

## METODOLOGIA

### Estratégia da Pesquisa

A pesquisa avaliou todos os artigos publicados até agosto de 2016, em português, inglês e espanhol, nas seguintes bases de dados: Cinahl, Lilacs, Medline/Pubmed, Scopus e Web of Science. Os descritores empregados em inglês foram: Plants, Medicinal, Wound Healing e Varicose Ulcer. Em português, os termos foram: Plantas Medicinais; Úlcera Varicosa, Cicatrização e operadores Booleanos foram incluídos entre os termos. A busca individual foi conduzida por dois revisores (ALF e CAS) e, em caso de dúvida, um terceiro revisor foi consultado.

## Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos ensaios clínicos que avaliassem a cicatrização de úlceras venosas com o uso tópico de plantas medicinais. Foram excluídos estudos que avaliassem a cicatrização da úlceras com o uso de plantas medicinais em animais (11), úlceras com outras etiologias (12, 13), estudos de custo benefício (14) e estudos de caso foram excluídos (15).

Estudos que avaliaram a cicatrização de úlceras com fitoterápicos tópicos foram incluídos, mas os estudos que avaliaram os fitoterápicos de uso somente oral foram excluídos (16).

## Extração de dados

Os dados foram extraídos e uma planilha foi preenchida com os itens mais relevantes, como: título, base de dados, lugar de publicação, autor, ano, objetivos, tipo de estudo, processamento de dados por intenção de tratar ou via protocolo, faixa etária dos pacientes, variáveis coletadas e métodos de medição de cura e conclusão do estudo. Os dados foram extraídos de forma independente por dois pesquisadores (ALF e CAS) e os resultados foram comparados.

O *Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT) é um consenso para a descrição de ensaios clínicos; este check list de verificação foi usado para determinar uma pontuação entre 0 e 25 pontos (17).

O risco do viés foi avaliado pela ferramenta *Cochrane Collaboration* para avaliar o viés em ensaios clínicos randomizados, o qual está disponível no programa RevMan (18).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A meta-análise foi realizada, com estudos que utilizaram o mesmo tipo de planta medicinal e forma farmacêutica aplicada no tratamento de úlceras venosas.

Foi realizada uma meta-análise direta e os dados foram coletados pelos autores e transferidos posteriormente para o RevMan, que está disponível gratuitamente na *Cochrane Collaboration*.

Para avaliar a eficácia foram utilizadas variáveis dicotômicas. Adicionalmente, empregou-se o risco relativo como medida do efeito da

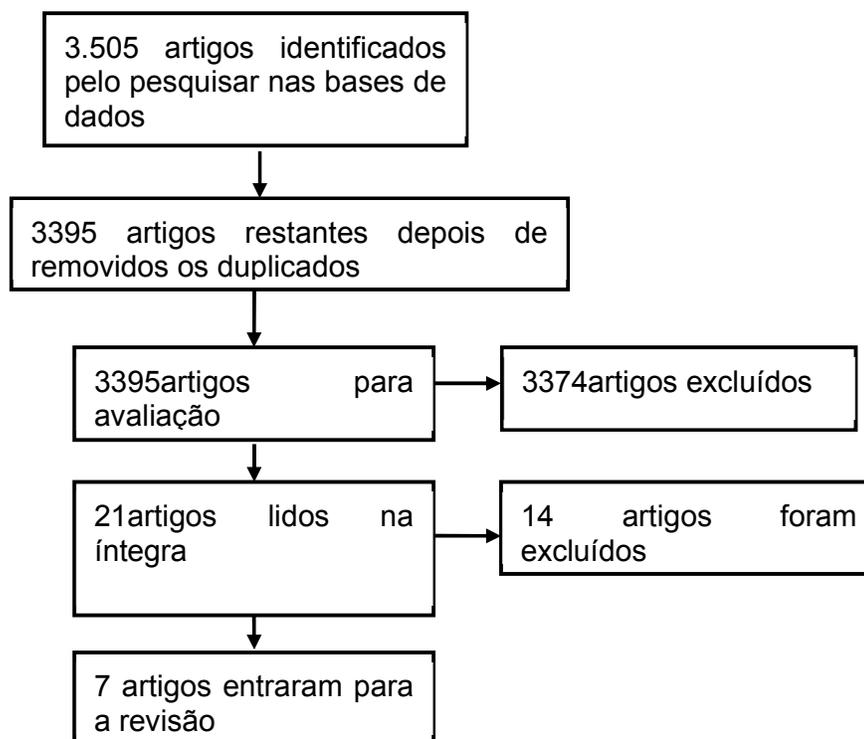
intervenção através do método de Mantel-Haenszel, de efeito aleatório e intervalo de confiança de 95% (19).

A heterogeneidade entre os estudos foi analisada pelo parâmetro estatístico  $I^2$ , que é comumente utilizado por ser de fácil interpretação. O valor  $I^2$  apresenta faixa entre 0% e 100%. A heterogeneidade é considerada baixa quando  $I^2$  é menor ou igual a 25%; os valores de  $I^2$  entre 25% e 50% refletem heterogeneidade moderada entre os estudos e, um valor de  $I^2$  superior a 50% é considerado uma alta heterogeneidade.

## RESULTADOS

Os resultados da pesquisa individual feita pelos dois pesquisadores (ALF e CAS) são demonstrados sequencialmente no fluxograma (Tabela 1). Do total de 3505 artigos, 110 artigos foram excluídos devido à repetição, 3385 resumos foram excluídos durante a fase de leitura de títulos e resumos, 21 artigos foram eliminados durante a fase de leitura na íntegra dos artigos visto que não atenderam aos critérios de inclusão.

Tabela 1. Seleção dos Artigos



#### Caracterização dos estudos

A revisão compreendeu sete artigos principais. Dois estudos (28,57%) abordaram tratamentos tópicos em ensaios clínicos. Entre os estudos de terapia tópica, dois (28,57%) avaliaram tratamentos com hidrogel, dois (28,57%) avaliaram o tratamento com creme, um (14,28%) avaliou o tratamento com gel, um (14,28%) avaliou o tratamento com biomembrana vegetal e um (14,28%) avaliou o tratamento com o pó da cápsula.

As espécies utilizadas nos estudos foram *Mimosa tenuiflora* (dois estudos), *Allii bulbosus*, *Hypericum perforatum* e *Calendula officinalis* (um estudo), *Pinus pinaster* (um estudo), *Calendula officinalis*, *Symphytum officinalis*, *Achilaea millefolium* e *Salvia officinalis* (um estudo), *Hevea brasiliensis* (um estudo) e *Ageratina pichinchensis* (um estudo).

No que se refere ao desenho dos estudos, cinco estudos (71,42%) eram randomizados (dos quais um era um estudo piloto) e dois (28,57%) não eram randomizados (dos quais um era um estudo piloto).

Com relação aos resultados analisados, sete estudos (100%) avaliaram a redução na área da úlcera, quatro (57,14%) avaliaram a reepitelização, dois (28,57%) avaliaram a flora bacteriana e um (14,28%) analisou a pressão do oxigênio e do dióxido de carbono percutâneo.

De acordo com a classificação dos níveis de evidência, cinco estudos (71,42%) foram classificados no nível 2 e dois (28,57%) foram classificados no nível 3 (20).

Para avaliar a descrição dos itens inseridos na revisão, obteve-se uma média de 17,92 (71,68%) pontos. O estudo realizado por Belcaro et al. obteve a pontuação mais baixa e o estudo de Romero-Cerecero et al. obteve a pontuação mais alta (22,5 pontos). O mínimo de pontuação possível foi 0 e o máximo foi de 25 pontos (17,21,22).

O risco de viés foi avaliado pelo RevMan (18); o risco de viés não era claro ou moderado na maioria dos campos havendo alto risco nos campos de randomização e alocação de pacientes. O gráfico obtido é apresentado na Figura 1.

Figura 1. Avaliação do risco de Viés dos estudos de 7 estudos que entraram para a revisão.

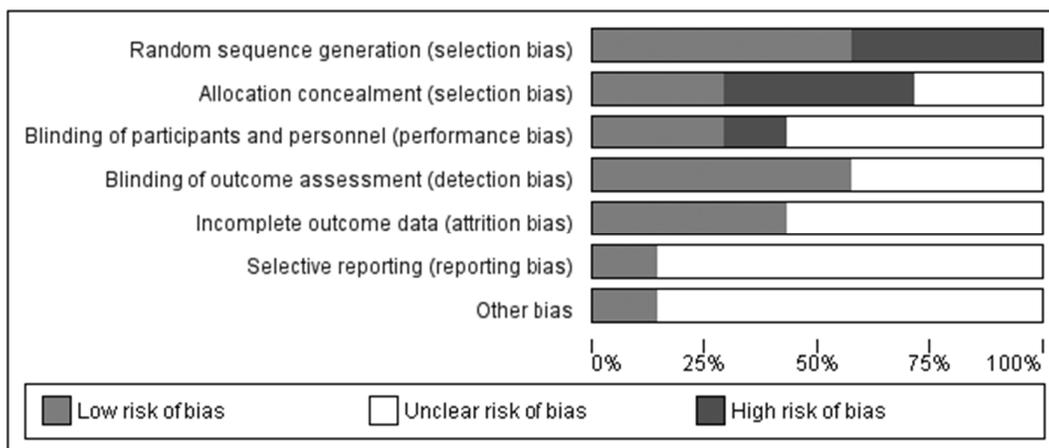


Tabela 2. As principais características dos 7 estudos que entraram para a revisão.

Autor	Idade Média/H e M	Duração	Medida de cicatrização	Média de reepitelização (%)	Planta Usada	AP/AIT	Desenho do estudo	Forma Farmacêutica
Kundakovc et al., 2012 (33)	72,6/10H e 15M	7 semanas	Planimetria em fotografia	99,1	<i>Allii bulbos</i> , <i>Hypericum perforatum</i> , <i>Calendula officinalis</i>	PP	Ensaio clínico piloto não randomizado	Creme
Belcaro et al., 2005 (22)	56,6/10H e 8M	6 semanas	Régua	100	<i>Pinus pinaster</i>	PP	Ensaio clínico	Cápsula em pó
Binic et al., 2010 (26)	66,8/14H e 18M	7 semanas	Régua	11,76	<i>Calendula officinalis</i> , <i>Symphytum officinalis</i> , <i>Achillea millefolium</i> , <i>Salvia officinalis</i>	ITT	Ensaio clínico randomizado e controlado.	Creme
Frade et al., 2012 (5)	62,8/5H e 16M	120 dias	Planimetria em fotografia (Image J)	42	<i>Hevea brasiliensis</i>	ITT	Ensaio clínico randomizado	Biomembrana vegetal
Lammoglia-Ordiales et al., 2012 (24)	60/13H e 19M	8 semanas	Planimetria em fotografia (Image J)	22	<i>Mimosa tenuiflora</i>	PP	Ensaio clínico randomizado duplo-cego.	Hidrogel
Romero-Cerecero O et al., 2013 (30)	61/10H e 24M	10 meses	Planimetria em fotografia	100	<i>Ageratina pichinchensis</i>	ITT	Ensaio clínico randomizado duplo-cego.	Gel
Rivera-Arce et al., 2007 (7)	61/40H e M	13 semanas	Planimetria em fotografia	100	<i>Mimosa tenuiflora</i>	PP	Ensaio clínico randomizado, controlado, duplo-cego.	Hidrogel

Legenda. ITT, análise por intenção de tratar; PP, análise por protocolo; M, mulher. H, homem

Figura 2. Gráfico de floresta dos artigos de Lammoglia-Ordiales e colaboradores (2012) e Rivera-Arce e colaboradores (2007).



Legenda. M-H: método de Mantel-Haenszel; Radom: randomizado; CI: intervalo de confiança, I<sup>2</sup>: heterogeneidade.

A avaliação da qualidade dos estudos foi realizada por meio da escala de Jadad, a qual é amplamente utilizada na literatura. No questionário de Jadad, o índice de qualidade varia de 0 a 5; os estudos analisados tiveram uma média de 2,5 (23).

#### Meta-análise

A meta-análise foi realizada em dois estudos que analisaram os efeitos do hidrogel de *M. tenuiflora* no tratamento da úlcera venosa. Na soma dos dois estudos foram incluídos 42 pacientes com idade média de 60 e 15 anos. A duração média de tratamento foi de 10,5 semanas (7,24). A heterogeneidade foi avaliada empregando o índice I<sup>2</sup> para o qual obteve-se uma classificação de 84%, considerada alta. O gráfico de *Forest Plot* é apresentado abaixo e as principais características dos dois estudos são apresentadas na Figura 2.

#### DISCUSSÃO

A aplicação de terapia compressiva para favorecer a cicatrização de úlceras venosas já é recomendada pelas diretrizes para a prática clínica da Sociedade de Cirurgia Vasculiar (25). A terapia tópica ainda não foi claramente estabelecida; sendo que qualquer bandagem que absorva o exsudato da úlcera representa uma boa alternativa. Não há critérios estabelecidos para a composição da bandagem. A incorporação de produtos naturais nestes curativos tem-se demonstrado como alternativa viável devido ao fato de oferecer potenciais

atividades anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante, que podem auxiliar a cicatrização de úlceras venosas (25-28).

Entre os estudos incluídos, o ensaio clínico descrito por Belcaro et al. usando *P. pinaster* observou 100% de cicatrização de úlceras crônica dentro de seis semanas. O efeito cicatrizante que foi atribuído à atividade antioxidante descrita para a espécie uma vez que o uso de substâncias antioxidantes vem sendo amplamente relacionado à redução da formação de radicais livres e menor dano tecidual em situações hipóxias (21,28,29).

Usando *A. pichinchensis*, Romero-Cerecero et al. também observaram 100% de cicatrização de úlceras venosas dentro de 10 meses. Neste estudo o potencial cicatrizante foi atribuído às atividades antiinflamatória aguda e crônica, além da indução de proliferação celular descrita para *A. pichinchensis* (22,30).

Resultados semelhantes de 100% de cicatrização da úlcera em 13 meses, utilizando *M. tenuiflora* também foram observados por Rivera-Arce et al. (7), sendo correlacionada à presença de taninos na espécie. A função dos taninos no processo de cicatrização não é totalmente clara; no entanto, sabe-se que os taninos possuem propriedades antimicrobianas que ocorrem através de diferentes mecanismos, incluindo inibição da enzima, redução da fosforilação oxidativa e privação de ferro (31).

Apesar de ter usado a mesma planta (*M. tenuiflora*), o estudo de Lammoglia-Ordiales et al., não apresentou os mesmos resultados, observando 22% de cicatrização de úlceras em oito semanas. Isso pode ser explicado pelo fato de que Rivera-Arce et al. não determinaram o tamanho da úlcera inicial, o que pode ter influenciado a taxa de cicatrização. Embora o período de estudo de Lammoglia-Ordiales et al. tenha sido mais curto, já foi estabelecido por Gelfand et al. que um período de monitoramento de quatro a oito semanas é suficiente para prever a cicatrização (7,24,32).

No estudo de Kundakovic et al. os autores encontraram 99,1% de cicatrização em sete semanas, utilizando *A. bulbosus*, *H. perforatum* e *C. officinalis*. A atividade antisséptica e bacteriostática pode ser atribuída à atividade do composto presente em *A. bulbosus* (alicina). *H. perforatum* e *C. officinalis*

apresentara, atividades e propriedades de cura separadas ou em conjunto (33-36).

O estudo de Frade *et al.* encontrou 42% de cicatrização de úlcera em três meses usando *H. brasiliensis*. A espécie promoveu a neoangiogenesis do tecido recém-formado, pois esta cicatrização e as células eram dependentes do suprimento de sangue para manutenção (5,37).

O estudo de Binic *et al.* demonstrou uma taxa de cicatrização de 11,76% em sete semanas, a menor taxa dos estudos incluídos nesta revisão. As espécies empregadas foram *C. officinalis*, *S. officinalis*, *A. millefolium* e *S. officinalis*. Embora *C. officinalis* tenha apresentado atividade anti-inflamatória *in vivo*. Já a planta *S. officinalis* possui atividade anti-inflamatória e anti-exsudativa, o que pode conferir o potencial de cicatrização. Além disso, *A. millefolium* possui atividades curativa e anti-hemorrágica. Outra planta também utilizada na formulação, *S. officinalis*, possui atividades antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória. O uso dessas plantas é relevante em relação à sua atividade individual, mas não garante sua eficácia se usadas em associação (27,38-41).

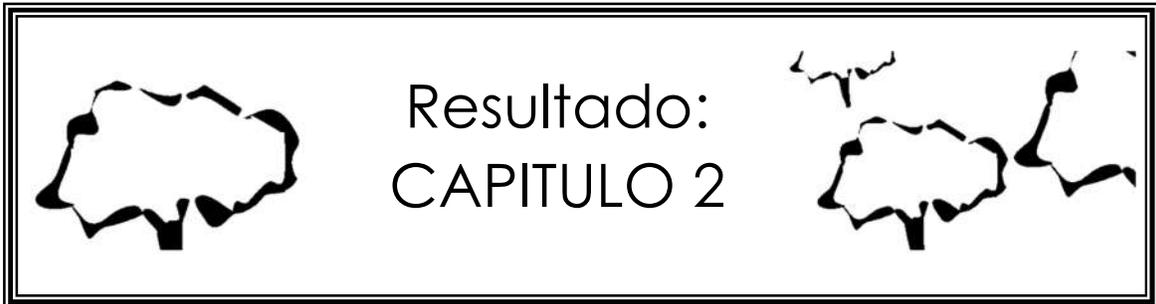
O cálculo das amostras não foi relatado em três estudos, além disso, dois estudos foram ensaios pilotos e outro teve um pequeno tamanho de amostra. O estudo de Frade *et al.* não demonstrou diferenças significativas entre os grupos tratados, o que pode ter ocorrido pelo pequeno número de pacientes. Além disso, sete dos pacientes (50%) sofreram recorrência de úlceras em comparação com o grupo controle, em que apenas dois estudos demonstraram recorrência (28%) (5,27,33,42).

A avaliação da qualidade dos estudos foi realizada por meio da escala de Jadad; o valor médio obtido de 1,4 demonstrou que os artigos apresentaram baixa qualidade metodológica e/ou não descreveram claramente os procedimentos metodológicos.

A avaliação do risco de viés foi pouco clara ou de alto risco, o que ocorreu na maioria dos casos, quando as sugestões para a redação de artigos não estavam de acordo com as diretrizes CONSORT, ou das falhas metodológicas em seus estudos (17,23).

Esta meta-análise, que foi realizada em dois estudos que investigaram o tratamento da úlcera venosa com hidrogel incorporado com *M. tenuiflora*, apresentou resultados heterogêneos. Este resultado pode ser explicado pela alta taxa de descontinuação prematura nos grupos de controle e tratamento (24). A heterogeneidade dos resultados prejudicou a afirmação de que o hidrogel que incorpora *M. tenuiflora* foi um tratamento eficaz para o tratamento de úlceras venosas. No entanto, quando consideramos o efeito fixo e não o modelo de efeitos aleatórios, os resultados foram mais promissores.

Por conseguinte, concluímos que, apesar da eficácia de *A. pichinchensis* incorporada no gel, o hidrogel que incorporou *M. tenuiflora* é um candidato promissor para o tratamento de úlceras venosas.



## 4.2. AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS POR HIDROGEL CONTEXTO EXTRATO PADRONIZADO DE *Hyptis pectinata* (L.) EM RATOS.

### RESUMO

*Hyptis pectinata* (L.), conhecida popularmente como “sambacaitá ou canudinho”, é encontrada em grandes quantidades no nordeste brasileiro, principalmente nos estados de Alagoas e Sergipe. Esta planta é utilizada pela população local para o tratamento de dores, infecções bacterianas, febre e doenças na pele. As atividades farmacológicas e o uso popular da *H. pectinata*, estimulam pesquisadores a desenvolverem estudos para produzir uma formulação farmacêutica com esta planta. Este trabalho utilizou cromatografia líquida de alta eficiência como ferramenta analítica para avaliar compostos fenólicos em extrato aquoso de *Hyptis pectinata* (L.). A solução extrativa foi preparada por decocção das folhas de *H. pectinata* (L.) em uma proporção planta: solvente de 1,5% (m/v), por 15 minutos. A solução extrativa foi seca por nebulização e o produto resultante quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Foram utilizados como marcadores o ácido caféico, quercetina-3-β-D-glicosídeo e rutina foram identificados e quantificados, obtendo teores de 6,89; 46,63 e 61,02 µg/mL na ESHP, respectivamente. O método analítico desenvolvido foi validado de acordo com os parâmetros estabelecidos pela guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (RDC nº 166, ANVISA, 2017) usando a rutina como marcador químico. A linearidade realizada nas concentrações de 2-10 µg/mL apresentou um coeficiente de correlação de 0,9992. Os limites de detecção e de quantificação foram 0,067 e 0,226 µg/mL, respectivamente. O método mostrou excelente precisão (repetibilidade e precisão intermediária) com desvio padrão relativo < 2,0%. O método revelou uma exatidão média percentual de 101,3%, 100,1% e 100,8 % para as análises em baixa (2,0 µg/mL), média (6,0 µg/mL) e alta (10,0 µg/mL) concentração, respectivamente. O método foi robusto para a variação do fluxo e da concentração da fase móvel. Os resultados obtidos demonstram que o método validado é sensível, preciso e eficaz para controle de qualidade de extratos e produtos derivados de *Hyptis pectinata* (L.). Para o ensaio de cicatrização foi preparado um hidrogel o qual foi administrado, por via tópica, em dois grupos distintos: grupo controle (CTL) tratado com veículo, outro grupo tratado hidrogel contendo *H. pectinata* à 5% (HP5), cada grupo contendo 20 ratos wistar e cada subgrupo 10 animais tratados por 3, 7 e 14 dias. A ferida cutânea aberta foi feita com um ferimento no tegumento seguida de remoção completa da epiderme e da derme. As lesões tratadas com HP5 nos tempos de 3 e 14 dias obtiveram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da área da lesão em relação ao grupo CLT. A análise histomorfológica não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Os resultados encontrados sugerem que o hidrogel contendo extrato nebulizado de *Hyptis pectinata* possui ação cicatrizante, mas precisa de mais estudos para corroborar os achados do presente estudo.

Palavras-chave: *Hyptis pectinata* (L.); validação; rutina; cicatrização;

## INTRODUÇÃO

*Hyptis pectinata* (L.), conhecida popularmente no estado de Sergipe como sambacaitá ou canudinho, é utilizada pela população local para o tratamento de inflamações, cicatrização de feridas, infecções bacterianas, dores, câncer e úlcera (JESUS et al., 2013).

O uso popular tem despertado o interesse da comunidade científica para investigar o potencial biológico da espécie. Já são descritas para a espécie as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, antiedematogênica, antioxidante e hepatoprotetora (ASEKUN; EKUNDAYO; ADENIYI, 1999; BISPO et al., 2001; LISBOA et al., 2006; MELO et al., 2001; RAYMUNDO et al., 2011).

Quanto a sua ação cicatrizante, Bastos e colaboradores (2016) avaliaram a ação cicatrizante do extrato etanólico de folhas de *H. pectinata* (L.) em feridas indixidas em ratos. Apesar do extrato desenvolver umacrosta proteora omesmonão demonstrou efetividade superior ao controle positivo. Os autores concluíram que esteas achados mereciam maior investigação quanto ao envolvimento da ação inflamatória, empregando outras partes da planta ou outros processos de extração.

As atividades farmacológicas descritas até o presente momento para *Hyptis pectinata* fazem desta espécie uma matéria-prima promissora para elaboração de um fitoterápico. Portanto, torna-se necessário o estabelecimento de critérios de qualidade, segurança e eficácia a fim de estabelecer seu uso correto em seres humanos.

Neste sentido, torna-se necessário o estabelecimento de uma metodologia analítica reprodutível para a quantificação de compostos químicos em preparações extrativas de *Hyptis pectinata*. Portanto, tornando possível o controle de qualidade de extratos vegetais [15]. Uma vez padronizada a técnica de quantificação analítica tanto para a matéria prima vegetal, como osprodutos derivados será possível a correlação entre atividade biológica e composição da planta.

No Brasil, para realizar a validação de um método analítico por CLAE é comum seguir os parâmetros determinados pela resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017 cujo órgão emissor é a ANVISA. A validação é necessária para fazer o controle de qualidade tanto do extrato quanto dos produtos derivados dele (BRASIL, 2017).

A incorporação de extratos aquosos padronizados de plantas medicinais, a produtos de origem natural como carreadores de fármacos apresenta-se como uma das mais atraentes e promissoras alternativas tecnológicas atuais, visto a maior biocompatibilidade destas substâncias em comparação aos materiais sintéticos, aliado a um menor custo de preparação. Entre as alternativas destacam-se esponjas, hidrogéis e outros biomateriais, em virtude das vantagens relacionadas a uma aceleração do processo de granulação e epitelização e a liberação controlada do produto incorporado diretamente no tecido danificado [7,8].

O hidrogel é constituído por uma rede polimérica que forma uma matriz que permite a liberação de substâncias ativas, podendo acelerar o processo de cicatrização. Adicionalmente mantém um ambiente úmido no leito da ferida, facilitando o debridamento autolítico, fornecendo uma barreira contra microorganismos externos permitindo, assim, melhor a gestão da dor [15,16].

Diante do exposto observamos a necessidade prévia de padronização da matéria-prima vegetal a fim de estabelecer parâmetros de segurança e eficácia de todos os produtos derivados. Por conseguinte, ressalta-se a necessidade de avaliação da matriz proposta incorporada com *Hyptis pectinata* L. quanto ao potencial cicatrizante.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção do extrato seco padronizado de *Hyptis pectinata* L.**

#### **Reagentes e Substâncias de Referência**

Ácido caféico (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>, ≥ 98.0%, Sigma-Aldrich), quercetina 3-β-D-glicosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>, ≥ 90.0%, Sigma-Aldrich) e rutina (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>, ≥ 94.0%, Sigma-Aldrich) foram utilizados para o preparo das soluções de referência. Metanol (grau HPLC, Merck, Darmstadt, Alemanha), ácido acético glacial (Synth, São Paulo, Brasil) e água milli-q (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, EUA) foram utilizados como fase móvel.

#### **Preparo da solução extrativa**

Partes aéreas (folhas e talos) de *Hyptis pectinata* (L.) foram coletadas no Horto de plantas medicinais (10° 18' 20,7" S; 36 ° 39 7.2" W) da Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão, Sergipe, Brasil). A identificação botânica do material vegetal foi realizada pela Dr. Ana Paula Prata e uma exsiccata

representativa da espécie foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da mesma universidade sob número ASE 2626. Após a coleta o material vegetal foi seco em estufa de ar circulante durante 48 horas à temperatura de  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , seguido de trituração em um moinho de facas do tipo Wiley (modelo TE 340) para obtenção da matéria-prima vegetal.

A solução extrativa (SEHP) foi preparada a partir de uma decocção 7,5 % (m/v) durante 15 minutos. Após a decocção, a solução extrativa foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 100 mL tendo seu volume final completado com água destilada..

#### **Obtenção do extrato seco de *H. pectinata* (ESHP)**

O ESHP foi obtido por atomização a partir da solução extrativa (SEHP), empregando Aerosil® como adjuvante de secagem. A SEHP foi submetida a secagem em um aparelho Buchi Modelo 191-secador por atomização, com bocal de dois componentes e fluxo de corrente, sob as seguintes condições de operação: temperatura de entrada 157-160 °C; taxa de alimentação 3 mL/min e pressão de pulverização de 2 bar.

A composição percentual da formulação utilizada na obtenção ESHP secos está descrita na tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual do extrato secos de *H. pectinata* (ESHP).

<b>Composição</b>	<b>ESHP</b>
RS*	70 %
Aerosil ®	30 %

Aerosil®: dióxido de silício coloidal

### **Desenvolvimento de metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjos de fotodiodos (CLAE-PDA)**

#### **Preparo das amostras para análises em CLAE**

A amostra de SEHP foi diluída com uma solução de metanol/água milli-q (50:50 v/v) até a concentração de 0,5 µg/mL. A solução obtida para a análise por CLAE-PDA foi filtrada através de um filtro de membrana PTFE (Millipore-HVHP, MA, EUA) de 0,45 µm antes da injeção no cromatógrafo.

### **Desenvolvimento da metodologia analítica**

As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu, equipado com um degaseificador DGU-20A3, injetor automático SIL-20A, duas bombas LC-20AD e detector de arranjo de diodo SPD-M20Avp (DAD) acoplados a uma interface CBM-20A. A separação analítica foi realizada com uma coluna C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm; diâmetro de partícula 5 µm), acoplada previamente com uma pré-coluna de mesma especificação. O método analítico empregou um sistema de gradiente de eluição utilizando como fase móvel metanol / água milli-q : ácido acético 1,0 %, com uma taxa de fluxo de 0.6 mL/min e um volume de injeção da amostra de 20 µL. Após a otimização do método, o gradiente de eluição variou de 10 a 60% da concentração de metanol, durante 60 minutos (Tabela 2). O comprimento de onda usado para a detecção dos compostos foi de 340 nm.

Tabela 2: Gradiente de eluição após a otimização do método.

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>B% (Metanol)</b>
0,01	10
5	15
10	15
15	20
20	20
25	20
30	40
40	60
45	40
50	20
55	10

Após a otimização da separação dos picos, a fim de identificar os compostos, foram realizadas análises por espectrometria de massas (EM) em um espectrômetro de massas Bruker equipado com uma fonte de ionização “Ion Trap”. A identificação dos compostos foi realizada no modo negativo de ionização ( $m/z$  [M - H]<sup>-</sup>). A ionização “Ion Trap” foi otimizada no modo MRM de análise e as condições foram: pressão nebulizador: 40 psi; fluxo do gás de secagem: 9 L/min; Temperatura do gás de secagem: 300 °C; Taxa de fluxo: 200 µL/min.

Os compostos foram identificados comparando o seu tempo de retenção com o tempo de retenção da sua substância padrão equivalente e pela análise dos seus espectros de massa. As análises quantitativas foram realizadas por meio das curvas de calibração dos padrões.

### **Validação da metodologia analítica**

O método desenvolvido foi validado de acordo com a Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017), empregando os seguintes parâmetros: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

#### **Linearidade e Curva de Calibração**

Linearidade é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2017). A linearidade foi avaliada através da construção de uma curva de calibração com as substâncias de referências correspondentes aos três compostos identificados na solução extrativa: ácido caféico (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>), quercetina-3-β-D-glicosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>) e rutina (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>), respectivamente. As curvas foram determinadas em cinco concentrações diferentes: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg/mL. As soluções foram preparadas em triplicata.

#### **Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)**

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Os LD e LQ são calculados através das equações 1 e 2, respectivamente. As equações estão descritas abaixo:

$$LD = \frac{DPa * 3}{IC} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{DPa * 10}{IC} \quad \text{Equação 2}$$

DPa: desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração.

IC: inclinação da curva de calibração.

### **Precisão**

A precisão do método foi realizada de acordo com a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação. São verificadas no mínimo seis determinações do analito a 100% da concentração do teste. A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes (BRASIL, 2017).

A repetibilidade foi avaliada testando nove determinações na mesma concentração (10,0 µg/mL), durante o mesmo dia, nas mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi avaliada comparando os ensaios em seis determinações na mesma concentração (10,0 µg/mL) durante dois dias diferentes. Os ensaios de precisão (repetibilidade e precisão intermediária) foram expressos de acordo com o desvio padrão relativo (DPR%).

### **Exatidão**

Resolução RE nº 166, de 24 de julho de 2017 (ANVISA, 2017), a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é verificada a partir de no

mínimo nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento. Dessa forma, são analisadas três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas cada.

Para o ensaio de exatidão, amostras do padrão rotina foram preparadas nas seguintes concentrações: 2,0 µg/mL (concentração baixa), 6,0 µg/mL (concentração média) e 10,0 µg/mL (concentração alta). Os resultados foram expressos pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica (Equação 3) e também, pelo desvio padrão relativo (DPR%).

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} * 100 \text{ Equação 3}$$

### **Robustez**

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2017). A robustez do método foi avaliada através de análises do padrão rotina na concentração de 10 µg/mL, fazendo pequenas alterações no fluxo móvel (0,5; 0,6 e 0,7 mL/min) e concentração da fase móvel (metanol:água acidificada com ácido acético a 0,5%, 1% e 2%).

## **Avaliação da Atividade cicatrizante do hidrogel incorporado com ESHP**

### **Material**

Para preparação do hidrogel foi utilizado metilparabeno adquirido da Sigma-Aldrich, EDTA adquirido da Sigma-Aldrich, água purificada, hidroxietilcelulose adquirido da Sigma-Aldrich, imidazolidinil ureia adquirido da Sigma-Aldrich, trietanolamina adquirido da Sigma-Aldrich e o extrato de *Hyptis pectinata* (L.), foi utilizado xilazina na dose de 10 mg/kg, quetamina a 80 mg/kg, povidona tópica a 7,5%, flunixinina e meglumina.

### **Preparação e caracterização do Hidrogel**

Inicialmente foram pesados metilparabeno, EDTA e água purificada. Após a pesagem foram levados para aquecimento em banho-maria à 70°C, durante

10 minutos. Após este período, o sistema foi retirado do aquecimento e adicionada, lentamente, hidroxietilcelulose, homogeneizando até a completa solubilização do polímero. A mistura foi arrefecida sob agitação até atingir temperatura de 40°C, quando o imidazolidinil ureia foi adicionado, previamente solubilizado em água. O sistema permaneceu sob agitação até a formação do gel. Posteriormente, em temperatura ambiente, foi adicionado quantidade suficiente para completar (q.s.p.) com água e o pH foi ajustado com trietanolamina na faixa de 5,0 – 6,0. O ESHP foi levigado em água e incorporado na concentração de 5% em relação à massa do gel.

A caracterização do hidrogel foi realizada por meio da avaliação macroscópica e microscópica, determinação de pH (F. BRAS. IV, 1988), avaliação das características reológicas e doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### **Grupo Experimentais**

Foram utilizados 80 ratos, albinos da linhagem *Wistar*, machos, com peso compreendido entre 200-250 gramas, oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe (DFS/UFS).

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com 45 X 35cm (1575 cm<sup>2</sup>), sob as mesmas condições de temperatura ambiente (22 + 2°C), umidade e ruído, no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LAFAC) do Departamento de Fisiologia, da Universidade Federal de Sergipe com ciclo claro-escuro de 12:00 horas, com a fase clara iniciando às 6 h e terminando às 18 h, recebendo ração comercial (Purina; Labina) e água *ad libitum*, durante todo o período de experimentação científica.

Para a formação dos grupos experimentais os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos distintos: grupo controle (CTL) tratado apenas com hidrogel (veículo) 0,5 mL, grupo tratado com hidrogel contendo o extrato seco de *H. pectinata* (ESHP) a 5% (HP5) 0,5 mL.

Os dois grupos experimentais (CTL, HP5) foram subdividido em três subgrupos (n=10 cada subgrupo) que foram tratados, respectivamente, por 3, 7 e 14 dias consecutivos. a partir da operação até o sacrifício conforme o grupo.

### **Pré-operatório**

Para a realização do procedimento cirúrgico, todos os animais foram pesados e anestesiados (xilazina na dose de 10 mg/kg e quetamina a 80 mg/kg), por via intraperitoneal. Após atingir o plano anestésico, os animais foram tricotomizados na região do dorso e foi realizada a antissepsia com iodopovidona tópica a 7,5% (POVIDONE). Os animais foram, então, colocados sobre mesa cirúrgica, em decúbito ventral e imobilizados com fita elástica.

### **Realização da Ferida Cutânea Aberta (Barreto, Albuquerque-Júnior et al. 2013)**

O modelo de ferida cutânea aberta consiste na confecção de um ferimento do tegumento da região dorso-costal do animal que envolve a remoção completa da epiderme e da derme com a profundidade dos planos faciais ou gordura subcutânea o qual permanece aberto para que possa ocorrer uma cicatrização por segunda intenção.

A técnica operatória seguiu o mesmo procedimento para os animais de todos os grupos experimentais. A excisão total da pele e hipoderme foi realizada com um punch metálico para biópsia com 8 mm de diâmetro (RICHTER) no centro da área depilada. Não foi realizada sutura das feridas. A hemostasia foi feita por compressão digital com compressa de gaze.

### **Pós-operatório**

Ao final do procedimento cirúrgico os animais foram realocados (2 a 2) nas suas respectivas gaiolas com ração e água *ad libitum*. Os animais foram examinados diariamente quanto à mobilidade, as condições da ferida e suas complicações sendo registrado em fichas individuais. Os animais foram anestesiados flunixinina e meglumina na dose de 1,1 mg/Kg por via subcutânea duas vezes por 48 horas.

A aplicação do hidrogel (de tamanho padronizado de 0,8 mm de espessura e diâmetro do punch) por ferida foi feita imediatamente após o procedimento cirúrgico.

### **Avaliação Macroscópica**

Na data estabelecida no protocolo experimental (3, 7, 14 dias respectivamente) para a eutanásia, os animais foram novamente pesados e então, eutanasiados com dose letal de anestésico. Após a eutanásia, os animais foram colocados em mesa cirúrgica e suas feridas fotografadas com câmera digital (SONY cyber-shot 7.2 megapixels, MPEGmovie VX, DSC-W35) e zoom

de 3,0 de aproximação fixada em tripé à distância constante de 33 cm da mesa cirúrgica. Foi realizada a medida do diâmetro da ferida residual no eixo crânio-caudal e látero-lateral com paquímetro digital (MESSEN).

Para a determinação das áreas das feridas, foi utilizada uma variação da fórmula  $A = \pi \cdot R \cdot r$  preconizadas por Prata et al. (1988), onde **A** corresponde a área da ferida; “ $\pi$ ” o pi que é um valor matemático e que foi utilizado até a quarta casa decimal depois da vírgula, ou seja, 3,1415; **R** é o raio maior da ferida e **r** é o raio menor da ferida. Neste experimento R e r corresponderam aos raios das feridas no sentido crânio-caudal e látero-lateral, respectivamente. Os diâmetros obtidos foram divididos por 2, determinando-se, dessa maneira, os raios (BARRETO et al., 2013).

Após esse procedimento, a área pesquisada foi retirada com margem de 1 cm de pele íntegra em torno da lesão com profundidade até a primeira camada muscular. A peça foi colocada em uma placa de Petri e examinada em esteriomicroscópio com aumento de 2X para verificação de crostas, secreções, necroses e cicatrizes hipertróficas. Após análise, cada peça foi afixada por alfinetes em acetato-vinilo de etileno e colocada em recipiente plástico com solução de formol tamponado a 10% (v/V) durante 48 h para a fixação.

Ao final dos protocolos experimentais os animais sacrificados foram acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados como material biológico infectante e armazenados no freezer do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia/UFS até a coleta seletiva de lixo biológico da instituição para descarte adequado de acordo com a legislação vigente.

### **Processamento Histológico**

Decorrido o período de 48h para fixação as peças foram seccionadas transversalmente e foram tratadas convenientemente para a inclusão em parafina e coloração em hematoxilina-eosina (HE) para posterior análise histopatológica.

As lâminas foram avaliadas quanto à proliferação vascular, presença de células mononucleares e polimorfonucleares, proliferação de fibroblastos, presença de colágeno e reepitelização na área de cicatrização.

### **Análise Histomorfológica**

Inicialmente, os espécimes fixados foram desidratados, diafanizados e emblocados em parafina de acordo com técnicas de processamento histológico

de rotina. Foram obtidas secções histológicas de 5 µm de espessura, que foram coradas em hematoxilina/eosina (HE), para análise em morfológica em microscopia de luz convencional e polarizada, respectivamente. Para análise do processo de reparo ao longo do período experimental, foram utilizadas 10 secções seriadas de cada animal. A metodologia de análise seguiu o protocolo proposto por Myers e colaboradores (1961) e Magalhães e colaboradores (2007), com adaptação.

Para tanto, elementos estromais foram analisados de forma semi-quantitativa de acordo com os seguintes scores: 0 (ausente), 1 (quando evidenciadas de forma isolada, dispersas nos campos ópticos), 2 (quando aparecer em maior frequência, constituindo agregados densos, mas possibilitando visualizar áreas livres entre os campos ópticos), 3 (quando houver evidência com grande frequência, constituindo agregados densos e justapostos, sem áreas livres entre os campos ópticos).

Para a obtenção dos scores foram analisados 10 campos histológicos, em magnificação de 200 X, selecionados por casualização sistemática. Dessa forma, a análise teve início sempre na porção superior (externa) da margem esquerda das feridas para cada campo selecionado segue-se para um campo histológico desprezado, até que se atinja a margem direita. O procedimento foi repetido na porção interna da ferida, até que os 20 campos estivessem selecionados, e representassem toda a extensão da lesão. Os escores obtidos na análise de cada parâmetro foram multiplicados por um fator de correção (MYERS et al., 1961), para melhor representar sua relevância para a evolução do reparo, e permitir a determinação de um escore final mais fidedigno do estágio evolutivo do processo de reparo.

**Tabela 3** - Critérios histopatológicos considerados para análise do perfil evolutivo morfológico do processo de reparo cicatricial dérmico.

<b>Critério</b>	<b>Escore</b>	<b>Fator de correção</b>	<b>Escore final</b>
Formação de abscessos		-10	
Inflamação aguda		-4	4
Inflamação crônica		-2	
Regeneração epitelial		+5	

Reação de granulação	+5	
Fibroblastos	+5	6
Colágeno	+10	
Neoformação de anexos dérmicos	+2	
<hr/>		
Escore total		
<hr/>		

### **Análises estatística**

As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 5.3. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste t de Student, dados não pareados, quando os dados consistiam de apenas dois grupos. Quando foram comparados três ou mais grupos foi utilizado a análise de variância (ANOVA). Quando a ANOVA indicou significância, os dados foram analisados utilizando o pós-teste de Newman Keuls para comparação entre os grupos. Two-way ANOVA foi utilizado para análises dos gráficos de linha para verificar interações entre as variáveis independentes tempo e grupos, sendo utilizado o pós-teste de Tukey. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

### **ASPECTOS ÉTICOS**

Todos os protocolos experimentais propostos respeitam os critérios éticos de experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e Internacional Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). O projeto foi encaminhado para o Comitê de Ética em Experimentação Animal em Pesquisa (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS) com o número 19/2015.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

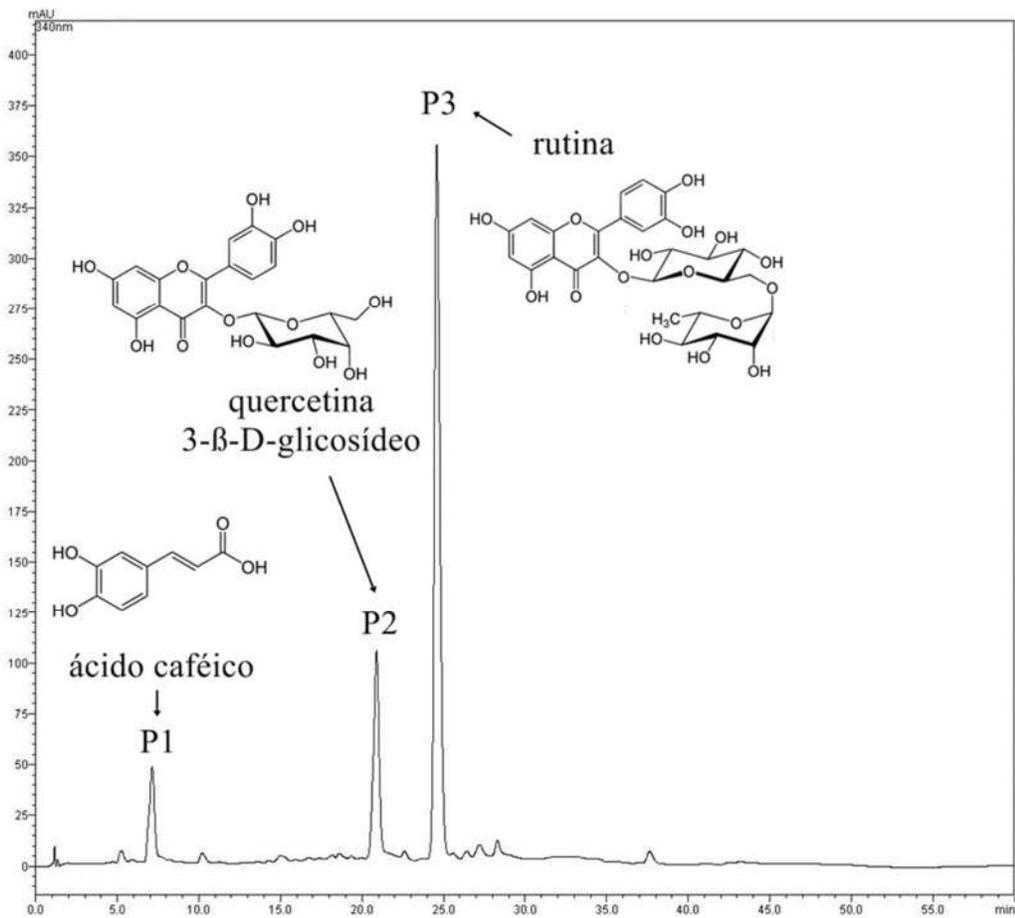
#### ***Análise da SEHP e do ESHP por CLAE***

Devido à complexidade da matriz e ao longo tempo de análise requerido, optou-se pelo emprego de um sistema de eluição em gradiente linear. A fase móvel constituída por uma mistura de metanol:água acidificada com ácido acético a 1,0% (v/v) proporcionou uma adequada resolução e separação dos picos, permitindo, assim, a quantificação das substâncias de referência na

matéria-prima vegetal. O tempo de análise também foi adequado, visto que todos os compostos foram identificados em um tempo inferior a 40 min. Após a varredura da SEHP, selecionou-se o comprimento de onda de 340 nm, 280 nm e 320 nm. Os picos foram identificados pelo tempo de retenção e comparação dos seus espectros de ultravioleta com substâncias de referência (padrões).

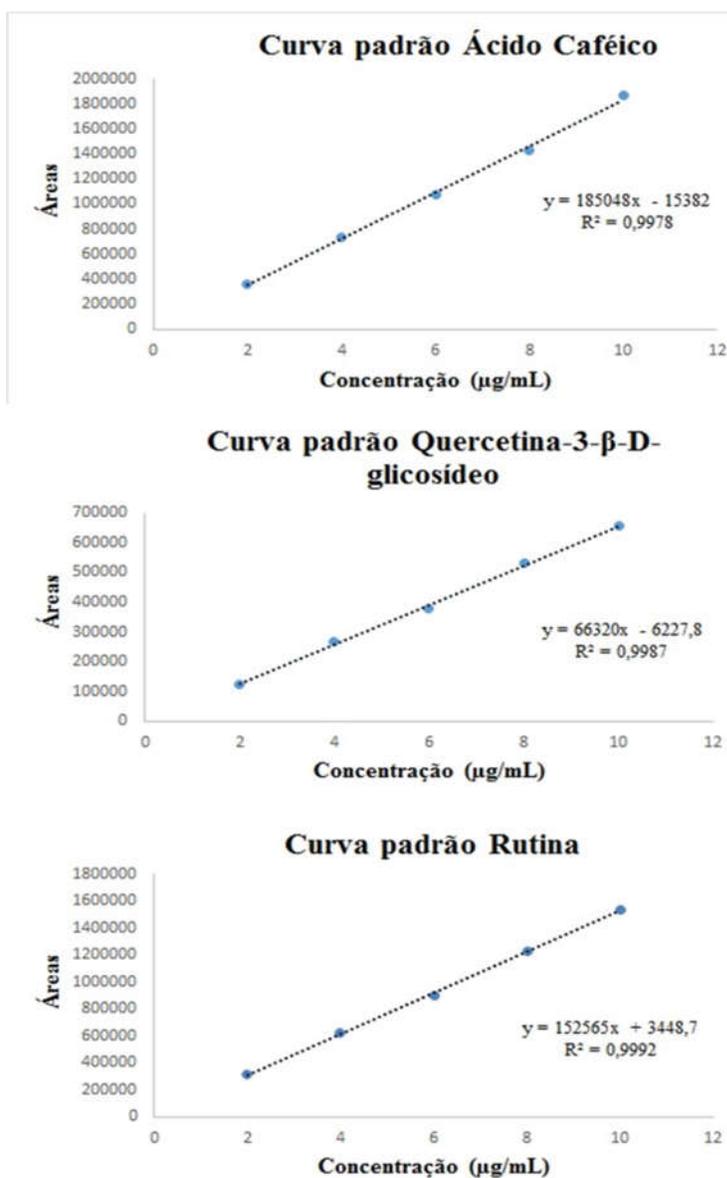
O perfil cromatográfico do SEHP por CLAE revelou a presença de três picos bem separados e com boa resolução. O tempo de retenção (TR) dos picos 1 (P1), 2 (P2) e pico 3 (P3) foram 7, 20 e 23 minutos, respectivamente P1, P2 e P3 foram identificados como ácido caféico, isoquercitrina e rutina, respectivamente (Figura 8).

Figura 1 - Cromatograma da SEHP (340 nm). P1: ácido caféico (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>); P2: quercetina-3-β-D-glicosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>); P3: rutina (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>).



Para a quantificação dos compostos majoritários, foram preparadas curvas de calibração para a substância padrão equivalente a cada composto identificado. As curvas foram preparadas em cinco concentrações diferentes: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg/mL. A curva padrão do ácido caféico apresentou a equação da reta  $y = 185048x - 15382$  e  $R^2 = 0,9978$ . A curva padrão da quercetina-3-β-D-glicosídeo apresentou a equação da reta  $y = 66320x - 6227,8$  e  $R^2 = 0,9987$ . A curva padrão da rutina apresentou a equação da reta  $y = 152565x + 3448,7$  e  $R^2 = 0,9992$  (Figura 02).

Figura 2 - Curvas de calibração das substâncias de referências equivalentes a cada pico identificado.



### ***Validação da metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjos de fotodiodos (CLAE-PDA)***

Validação é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2017).

Marcadores químicos são essenciais como parte da identificação e também do controle de qualidade de produtos à base de plantas. Para a validação da metodologia analítica, a rutina foi utilizada como marcador da ESHP por ser o composto majoritário presente na solução extrativa. A rutina pertence à classe dos flavonóides sendo estes bons marcadores químicos pois apresentam grande diversidade estrutural e serem quimicamente estáveis (STALIKAS, 2007).

A linearidade foi avaliada por análise das curvas de calibração para as três substâncias identificadas na espécie rutina, isoquercitrina e ácido caféico, obtidas em três dias diferentes.

A curva de calibração obtida para a rutina foi linear no intervalo de concentração de 2,0-10,0 µg/ml, com coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,9992, para a isoquercitrina coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,9987 e para o ácido caféico o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,9978. Os limites de detecção e quantificação estabelecidos foram, 0,067 µg/ml e 0,226 µg/ml, respectivamente para os três compostos.

As curvas de calibração obtidas para rutina, ácido caféico e isoquercitrina apresentaram um  $r^2 > 0,990$ , assim como o coeficiente angular foi significativamente diferente de 0, os quais são parâmetros exigidos nas especificações da RDC 166/2017, o que demonstra que as curvas são lineares nas diferentes concentrações.

Para a determinação dos demais parâmetros de validação e, por limitação de disponibilidade dos padrões de referência de todas as substâncias identificadas, empregou-se apenas a rutina.

Os limites de detecção e quantificação estabelecidos para a rutina foram 0,067 µg/mL e 0,226 µg/mL, respectivamente. A RDC 166/2017, especifica o limite de detecção na proporção sinal/ruído de 3/1. O limite de

quantificação foi estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis, contemplando a RDC 166/2017 especificam que pode ser calculado pela proporção sinal-ruído de 10/1.

A determinação da precisão é subdividida em repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade refere-se à precisão do método durante um curto intervalo de tempo, sob as mesmas condições de análise. A precisão intermediária refere-se à habilidade do método de fornecer os mesmos resultados, sob as mesmas condições analíticas, porém em dias diferentes; enquanto a reprodutibilidade é utilizada para demonstrar a precisão do método em laboratórios diferentes.

A repetibilidade, precisão intermédia e exatidão mostraram um coeficiente de variação de acordo com o estabelecido pela RDC 166/2017, cujo limite máximo preconizado é de 5% de desvio padrão relativo. Além disso, não houve diferenças significativas entre os resultados do ensaio, indicando que a precisão do método proposto foi satisfatória.

**Tabela 4** - Resultados de repetibilidade e precisão intermediária da substância de referência rotina analisada por CLAE.

	Média ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ SD (n=3)	DPR %
Repetibilidade	6.06 $\pm$ 0.04	0.66
	Média ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ SD (n=3)	DP %
	6.24 $\pm$ 0.07	1.18
Precisão intermediária	6.14 $\pm$ 0.08	1.35
	6.30 $\pm$ 0.14	2.30

DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo

Para a exatidão realizou-se a análise de três concentrações (2, 6, 10  $\mu\text{g/mL}$ ) de rotina em triplicata (Tabela 5). Os resultados mostraram um coeficiente de variação menor do que o limite máximo preconizado de 5%, estando de acordo com a RDC 166/2017.

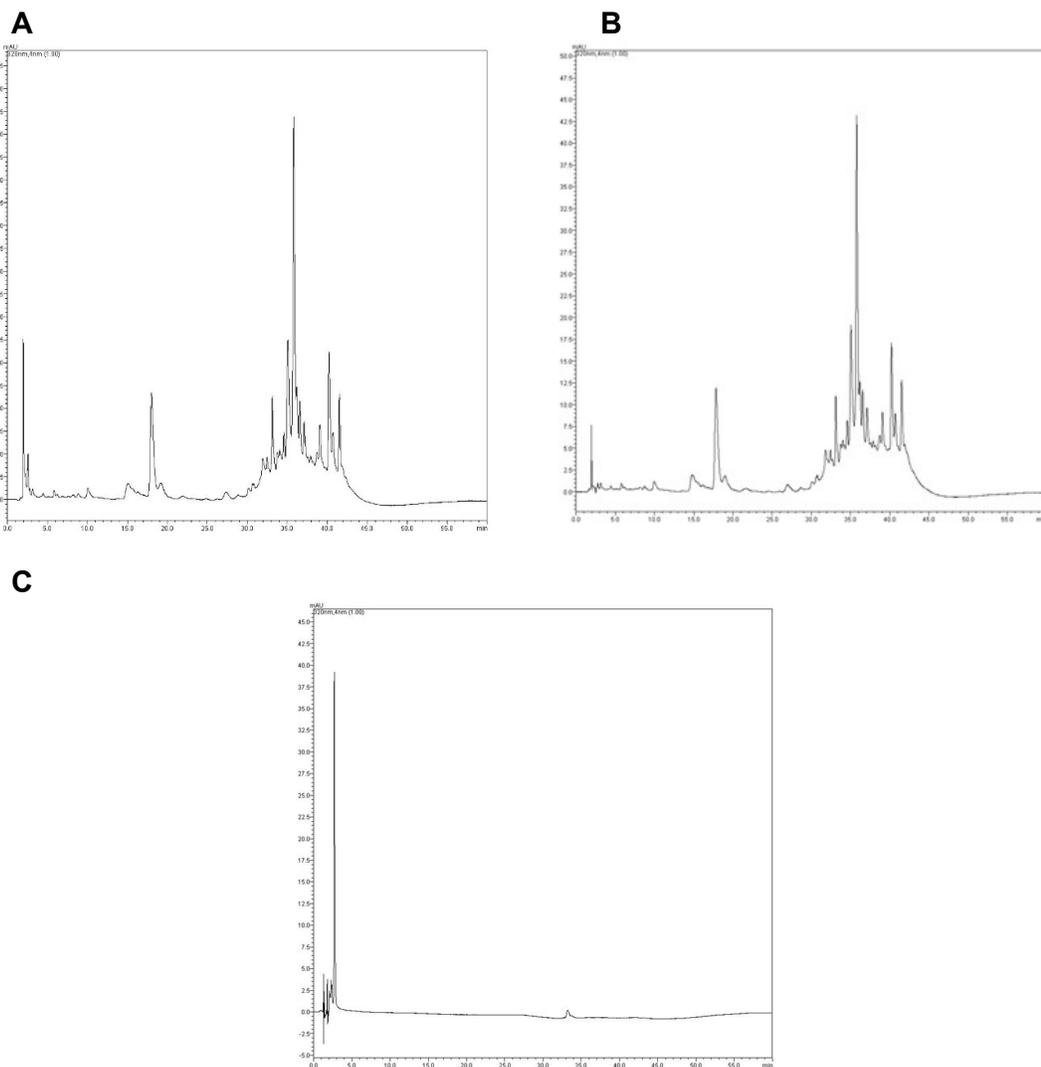
**Tabela 5 - Resultados dos testes de exatidão**

	Concentração experimental	Exatidão	Análise estatística da acurácia em CLAE	
( $\mu\text{g/mL}$ )	( $\mu\text{g/mL}$ )	%	Média $\pm$ S.D. (n=3)	C.V. %
2	2,02	101,0	101,3 $\pm$ 1,04	1,02
	2,05	102,5		
	2,01	100,5		
6	5,98	99,66	100,1 $\pm$ 0,47	0,46
	6,04	100,6		
	6,01	100,1		
10	10,13	101,3	100,8 $\pm$ 0,50	0,49
	10,08	100,8		
	10,03	100,3		

### Caracterização do Hidrogel

A análise qualitativa por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada com amostras do ESHP e hidrogel base e incorporado com ESHP a 5% (m/m). O perfil cromatográfico das amostras está visualizado na figura 3. Podemos observar perfil cromatográfico semelhante tanto para o ESHP quanto para o hidrogel incorporado com ESHP a 5% (m/m). A ausência de picos de degradação sugere que o processo de obtenção da forma farmacêutica não levou a alteração da composição química do extrato. O cromatograma do hidrogel base caracteriza-se pela ausência de picos característicos do extrato de *Hyptis pectinata* (L.). (HOFFMAN, 2012; LAMMOGLIA-ORDIALES et al., 2012; SARHEED et al., 2015)

Figura 3. (A) Perfil cromatográfico de extrato seco liofilizado de *Hypitis pectinata* (ESHP), obtido a partir de solução extrativa preparada por decocção; (B) Perfil cromatográfico do hidrogel incorporado ESHP a 5% (m/m); (C) Perfil cromatográfico do hidrogel base. Comprimento de onda de leitura de 340 nm, sistema de eluição em gradiente.



### **Análise da área da Lesão**

As lesões tratadas com HP5 no tempo de 3 dias obtiveram uma redução na área significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo CTL. Já as lesões tratadas por 7 dias não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparamos as áreas dos grupos HP5 e CTL. No tempo de 14 dias o grupo HP5 reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) quando comparado a área da ferida do grupo CTL.

A cicatrização no período de 3 dias do grupo HP5 houve diferença significativa quando comparamos as áreas dos ferimentos em relação ao controle. Essa cicatrização pode ser atribuída a presença dos polifenóis presentes no extrato já que eles impedem a expressão das citocinas TNF- $\alpha$  que são pró-inflamatórias, como também impede a ação do fator nuclear kappa-beta (NF-Kb), através da inibição da via de sinalização inflamatória intracelular, reduzindo o processo inflamatório, além da regulação negativa da expressão induzível de óxido nítrico sintase (iNOS) e da ciclooxygenase-2 (COX-2) (FAQUETI et al., 2016; SIMÕES et al., 2016).

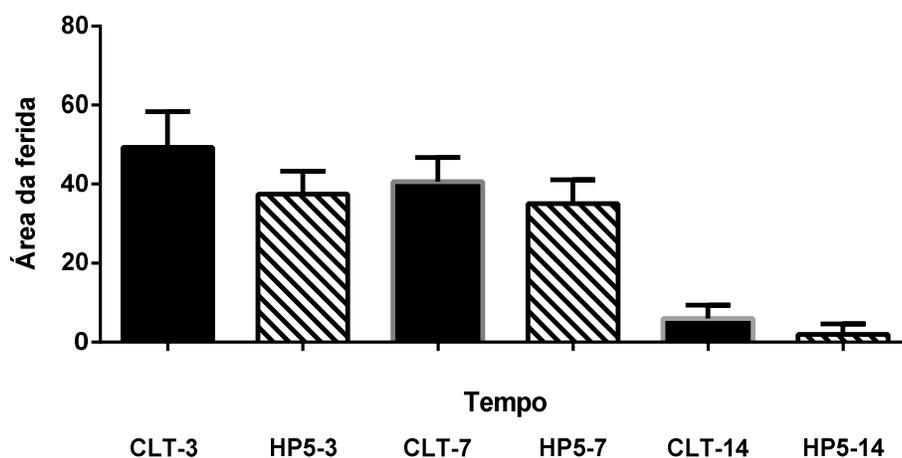
A utilização do hidrogel como veículo para a incorporação do extrato de *Hyptis pectinata* (L.) se mostrou adequado, mostrando reduções significativas das áreas dos ferimentos, o que vem a corroborar com outros estudos que também mostraram resultados positivos quanto a redução de forma significativa da área da lesão utilizando o hidrogel (HE et al., 2008; KOEHLER; BRANDL; GOEPFERICH, 2018; LAMMOGLIA-ORDIALES et al., 2012).

O hidrogel apresenta-se como uma formulação biodegradável, de estrutura reticular tridimensional, hidrofílica, de alto teor molecular, que pode se expandir facilmente em função do seu considerável grau de umidade. O curativo de hidrogel age como um umectante, evitando a formação de uma crosta, mantendo o conteúdo de água da ferida, promovendo a cicatrização no centro do ferimento. Além de não aderir fortemente à superfície da ferida, desta maneira não causa irritação podendo ser facilmente removido, sem dor (PARK et al., 2017; THAKUR; THAKUR, 2015).

Podemos observar na figura 4 que nas lesões acompanhadas por 14 dias tratadas com HP5 houve uma redução significativa do tamanho das mesmas ( $p < 0,05$ ) em relação às lesões do grupo tratado com CTL. Isto nos leva a sugerir que o extrato seco de *H. pectinata* parece ter sua ação cicatrizante baseada na

redução do tempo de cicatrização, mecanismo já relatado e atribuído aos flavonoides (FAQUETI et al., 2016).

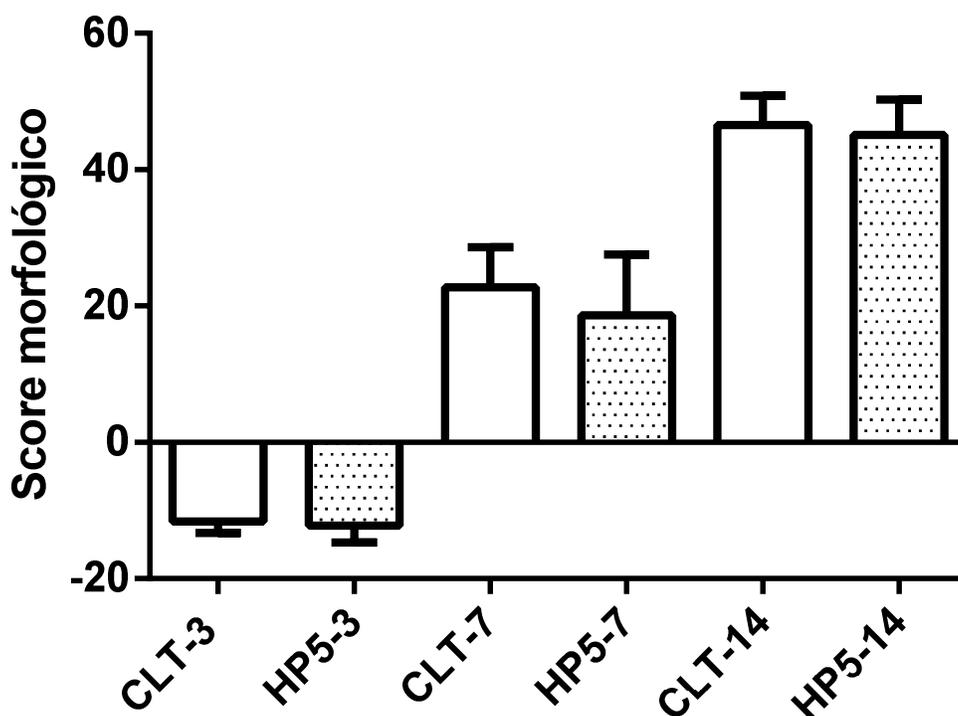
Figura 4. Efeito do hidrogel incorporado com extrato seco de *H. pectinata* sobre a área da ferida em ratos. Grupos tratados: CLT-3: grupo controle tratado por 3 dias; HP5-3: grupo tratado com hidrogel incorporado com extrato seco de *H. pectinata* tratado por 3 dias; CLT-7: grupo controle tratado por 7 dias; HP5-7: grupo tratado com hidrogel incorporado com extrato seco de *H. pectinata* tratado por 7 dias; CLT-14: grupo controle tratado por 14 dias; HP5-14: grupo tratado com hidrogel incorporado com extrato seco de *H. pectinata* tratado por 14 dias. A área da ferida foi medida, com auxílio de paquímetro digital, no sentido crânio-caudal e látero-lateral, respectivamente. Os valores representam a média. \*  $P < 0,05$  comparando com o grupo HP5 e o controle (CLT) ( $n=10$ , por grupo).



### **Análise Histomorfológica das lesões**

A análise mostra que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os scores do grupo CLT e o grupo HP5 no período de 3 e 7 dias, como podemos observar na figura abaixo.

Figura 4. Efeito do extrato de *H. pectinata* na morfologia da ferida. CLT-3: grupo controle tratado por 3 dias; HP5-3: grupo tratado com hidrogel incorporado com extrato seco de *H. pectinata* tratado por 3 dias; CLT-7: grupo controle tratado por 7 dias; HP5-7: grupo tratado com hidrogel incorporado com extrato seco de *H. pectinata* tratado por 7 dias; CLT-14: grupo controle tratado por 14 dias; HP5-14: grupo tratado com hidrogel incorporado com extrato seco de *H. pectinata* tratado por 14 dias;

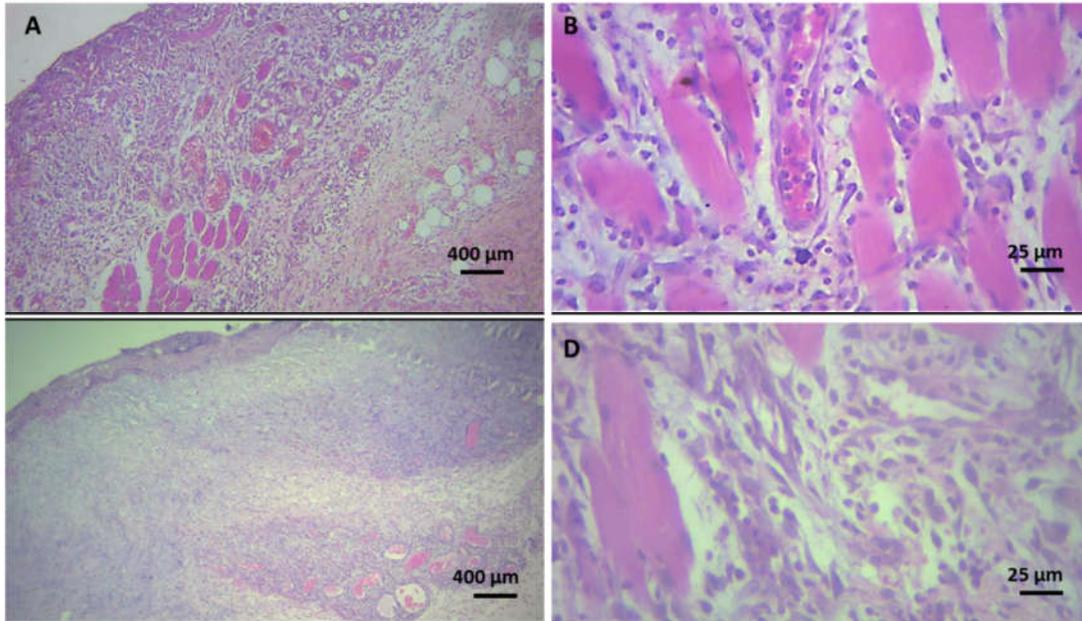


Analisando as lâminas dos tecidos tratados por três dias composto por dois grupos CLT-3 e HP5-3, podemos observar que não houve grandes diferenças com relação aos achados histopatológicos nas duas lâminas, já que as duas lâminas exibem um filtrado inflamatório intersticial que provocou edema em região perimuscular e os vasos estão congestionados quando aproximamos mais podemos destacar a presença de células inflamatórias majoritariamente como os neutrófilos na figura B e na figura D observamos a presença de linfócitos, portanto um filtrado inflamatório misto.

Destaca-se que o tecido conjuntivo é frouxo e exibe edema intersticial o que é demonstrado por espaços vazios entre as células, essa alteração estrutural

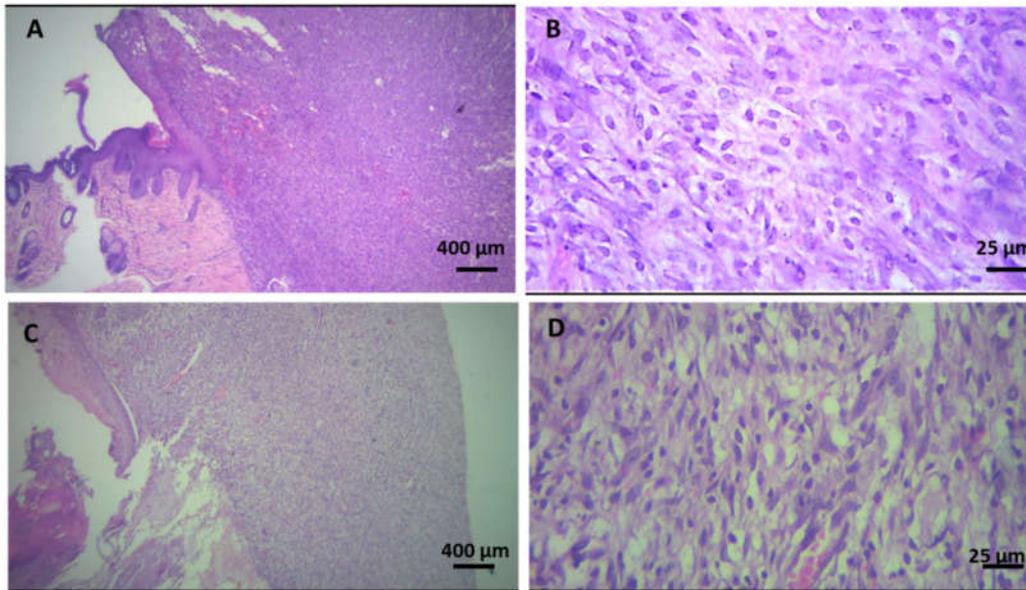
corresponde macroscopicamente ao aumento de volume caracterizando o edema.

Figuras 5 - Efeito do extrato de *H. pectinata* na análise histológica de lâminas coradas com hematoxilina-eosina. A e B representam o grupo CTL-3 e as figuras C e D representam o grupo HP5-3, ambos tratados por 3 dias. Presença de infiltrado inflamatório misto em região perimuscular, além de vasos congestionados e edema



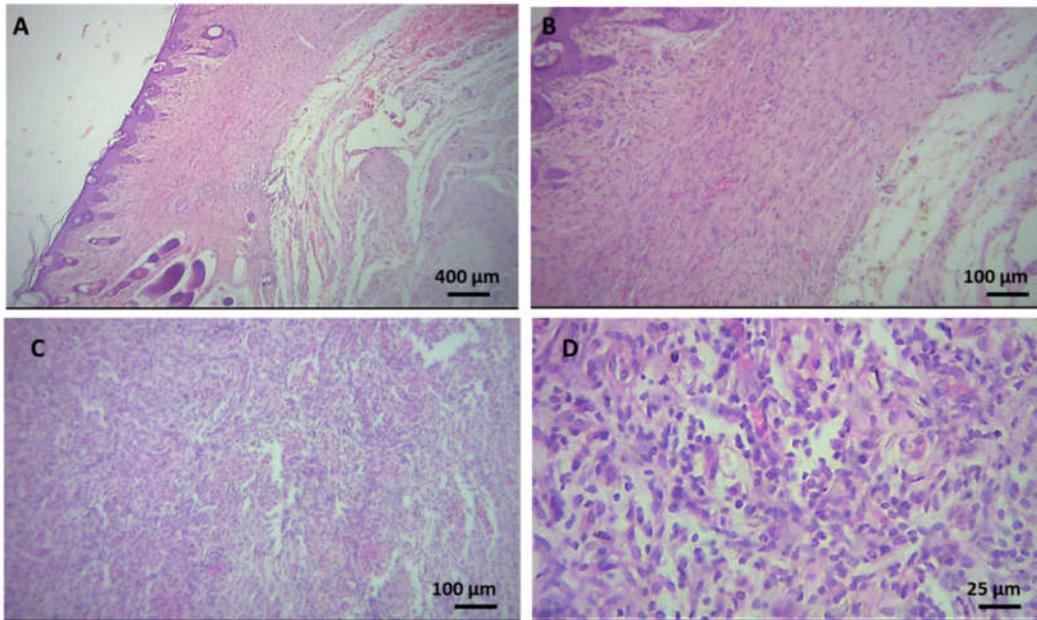
Nas lâminas de 7 dias podemos observar um tecido de granulação com alta celularidade, rico em vasos sanguíneos, células inflamatórias crônicas e os fibroblastos pobremente basofílicos. As células majoritárias são do filtrado inflamatório as quais são mononucleares com núcleo esférico e basofílico. Não há distinção entre os grupos em 7 dias no aspecto morfológico.

Figura 6 – As figuras A e B são representativas do grupo CTL-7; As figuras C e D representam o grupo HP5-7.



A avaliação dos tecidos após 14 dias A imagem A e B mostra um tecido conjuntivo totalmente reparado, tecido altamente celularizado com fibroblastos. As figuras C e D ainda exibem um filtrado inflamatório crônico ainda remanescente, as células estão afastadas, por conta de uma matriz de colágeno extracelular.

Figura 7 - As figuras A e B representam o grupo CLT – 14, as figuras C e D representam o grupo HP5-14.



Para os scores morfológicos quando avaliamos os tratamentos de 3, 7 e 14 dias observamos que não houve diferença significativa entre esses grupos, o que não corrobora com os achados da literatura por Barreto e colaboradores (2016).

Durante o processo de cicatrização da ferida, a resposta inflamatória deve ocorrer rapidamente para permitir o desenvolvimento de fases subsequentes. Portanto, apesar da resposta inflamatória ser absolutamente necessária para o processo de reparo cicatricial, sua persistência a longo prazo foi considerada uma das razões mais importantes para o atraso do processo de cicatrização; uma vez que quanto menor a inflamação menor a cicatriz formada (MONACO; LAWRENCE, 2003; WANG et al., 2017).

Quando avaliamos as lâminas dos tecidos tratados por 3 dias (figura XX) destacamos a presença do filtrado inflamatório, de edema e observamos uma quimiotaxia positiva no local demonstrada pela presença de neutrófilos e linfócitos o que demonstra uma inflamação mista: aguda e crônica tanto no grupo CTL, quanto no grupo HP5, portanto não há diferenças significativas entre os dois grupos (CHHABRA et al., 2017; WANG et al., 2017).

Para as lâminas dos tecidos retirados depois de 7 dias, observam-se nas figuras a predominância do tecido de granulação, de fibroblastos e filtrado inflamatório o que denota a sobreposição das fases proliferativa e inflamatória. Não foi observada diferença entre os grupos quanto aos aspectos morfológicos (YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

Já nas lâminas avaliadas depois de 14 dias da realização da ferida podemos observar a distinção entre os grupos. O grupo CTL-14 apresenta o tecido conjuntivo reparado, observamos, ainda, o tecido altamente celularizado e com fibroblastos, o que não encontramos no grupo HP5-14, o qual exhibe infiltrado inflamatório crônico e matriz de colágeno em um período de cicatrização menos avançado que o CTL-14 (PARK et al., 2017; REINKE; SORG, 2012).

Portanto, diante dos achados deste trabalho, podemos concluir que o extrato de *H. pectinata* levou a uma redução da área da lesão apesar de não ter mostrado diferença no aspecto morfológico, portanto se faz necessário mais estudos como uma investigação histológica mais minuciosa e imunológica para avaliar melhor a atividade cicatrizante.

## 5. CONCLUSAO GERAL

Portanto, podemos verificar a propriedade dos fitoterápicos nos diversos processos de cicatrização tanto agudo quanto crônico.

Os ensaios clínicos com fitoterápicos mostram a sua eficácia na cicatrização de úlceras crônicas, de forma segura e acelerando o processo cicatricial de feridas, devolvendo qualidade de vida e tornando-os aptos ao mercado de trabalho.

A *H. pectinata* mostrou-se eficaz no processo de reparo cicatricial, além de se mostrar segura por sua larga utilização por mais de 30 anos pela população, assim outros estudos como ensaios clínicos se mostram necessários para se confirmar a atividade cicatrizante desta planta.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBADE, L. P. F. et al. A sociodemographic, clinical study of patients with venous ulcer. **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 12, p. 989–992, 2005.
- AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105–121, mar. 2015.
- ALVES DO NASCIMENTO, M. W. et al. Medicinal plants indications from herbal healers for wound treatment. **Revista Eletronica de Enfermagem**, v. 18, 2016.
- ARRIGONI-BLANK, M. F. et al. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit.(Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine**, v. 15, n. 5, p. 334–339, 2008.
- ASEKUN, O. T.; EKUNDAYO, O.; ADENIYI, B. A. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 4, p. 440–442, 1999.
- BABIOR, B. M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. **New England Journal of Medicine**, v. 298, n. 12, p. 659–668, 1978.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.
- BARUD, H. DA S. Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana. 2006.
- BASÍLIO, I. J. L. D. et al. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 518–525, 2006.
- BISPO, M. D. et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 81–86, 2001.
- BOALINO, D. M. et al. ??-Pyrones and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 1303–1307, 2003.
- BOROJEVIC, R.; SERRICELLA, P. Próteses vivas de pele humana. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 7, p. 16–18, 1999.
- BRASIL. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2017.
- BUENO, A. X. et al. Effects of the aqueous extract from *Hyptis pectinata* leaves on rodent central nervous system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 317–323, 2006.
- BUENO, N. R. et al. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 39–44, 2005.
- CAROLINA DE LOURDES, J. V. HISTOFISIOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DAS QUEIMADURAS: CONSEQUENCIAS LOCAIS E SISTÊMICAS DAS

PERDAS TECIDUAIS EM PACIENTES QUEIMADOS. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 3, 2009.

CARVALHO, M. G. et al. Development and Validation of a Simultaneous RP-HPLC/UV/DAD Method for Determination of Polyphenols in Gels Containing *S. terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 50, p. 309–315, 18 abr. 2017.

CHEN, Y. E.; TSAO, H. The skin microbiome: Current perspectives and future challenges. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 1, p. 143–155, 2013.

CHHABRA, S. et al. Wound Healing Concepts in Clinical Practice of OMFS. **Journal of maxillofacial and oral surgery**, v. 16, n. 4, p. 403–423, dez. 2017.

COUCH, K. S. et al. The International Consolidated Venous Ulcer Guideline Update 2015: Process Improvement, Evidence Analysis, and Future Goals. **Ostomy/wound management**, v. 63, n. 5, p. 42–46, maio 2017.

DANTAS, S.; JORGE, S. A. Feridas e estomas. **Campinas, Edição do autor**, 2005.

DIAS, V. C. B. Fator de crescimento de queratinócito (KGF) na expressão gênica da cicatrização em queratinócitos de pacientes com queimadura. 2015.

DORNELAS, C. B. et al. Avaliação de derivados poliméricos intercalados em montmorilonita organofílica na preparação de novos materiais de uso farmacêutico. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 18, n. 3, p. 222–229, 2008.

DOS SANTOS, E. A. et al. Bioactivity Evaluation of Plant Extracts Used in Indigenous Medicine against the Snail, *Biomphalaria glabrata*, and the Larvae of *Aedes aegypti*. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2012, p. 846583, 2012.

DOURADO, L. F. N. **Preparação e caracterização de sistemas de liberação controlada de sinvastatina a partir de poli (3-hidroxibutirato)**UFVJM, , 2016.

FALCAO, R. A. et al. Antileishmanial phenylpropanoids from the leaves of *hyptis pectinata* (L.) poit. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

FAQUETI, L. G. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of standardized extract of polymethoxyflavones from *Ageratum conyzoides*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 194, p. 369–377, dez. 2016.

FORTES, T. M. L.; SUFFREDINI, I. B. Avaliação de pele em idoso: revisão da literatura. **J Health Sci Inst.[Internet]**, v. 32, n. 1, 2014.

FRAGOSO-SERRANO, M.; GIBBONS, S.; PEREDA-MIRANDA, R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. **Planta medica**, v. 71, n. 3, p. 278–280, 2005.

GERGER, A. et al. In vivo confocal laser scanning microscopy in the

diagnosis of melanocytic skin tumours. **British Journal of Dermatology**, v. 160, n. 3, p. 475–481, 2009.

HARRIS, M. I. N. D. E. C. **Pele-estrutura, propriedades e envelhecimento**. [s.l.] Senac, 2009.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, Supple, p. 18–23, dez. 2012.

JESUS, N. Z. T. et al. Hyptis suaveolens (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 982–988, 2013.

KAMEL, R. A. et al. Tissue Engineering of Skin. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 217, n. 3, p. 533–555, 16 maio 2016.

KOEHLER, J.; BRANDL, F. P.; GOEPFERICH, A. M. Hydrogel Wound Dressings for Bioactive Treatment of Acute and Chronic Wounds. **European Polymer Journal**, 2018.

LAMMOGLIA-ORDIALES, L. et al. A randomised comparative trial on the use of a hydrogel with tepescohuite extract (Mimosa tenuiflora cortex extract-2G) in the treatment of venous leg ulcers. **International Wound Journal**, v. 9, n. 4, p. 412–418, 2012.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9–18, 2007.

LI, R. et al. Cellulose whiskers extracted from mulberry: A novel biomass production. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 1, p. 94–99, 2009.

LIRA, A. A. M. et al. Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação in vitro. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 1, p. 35–41, 2004.

LIRA, A. A. M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele** Universidade de São Paulo, , 2007.

LISBOA, A. C. C. D. et al. Antinociceptive effect of Hyptis pectinata leaves extracts. **Fitoterapia**, v. 77, n. 6, p. 439–442, 2006.

MA, G. et al. Hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte complexes nanofibers prepared by electrospinning. **Materials Letters**, v. 74, p. 78–80, 2012.

MACHADO, A. C. H. R. **Desenvolvimento e avaliação da incorporação e liberação de óleo de açaí em hidrogéis de poli (N-vinil-2-pirrolidona)** Universidade de São Paulo, , 2010.

MCLAFFERTY, E.; HENDRY, C.; FARLEY, A. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. **Nursing Standard**, v. 27, n. 3, p. 35–42, 2012.

MELO, G. B. et al. Effects of the aqueous extract of Hyptis pectinata on liver regeneration after 70% partial hepatectomy. Preliminary results. **Acta Cir Bras**, v. 16, n. Suppl 1, p. 13–15, 2001.

MELO, G. B. et al. Effect of the aqueous extract of Hyptis pectinata on liver mitochondrial respiration. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 359–362, 2005.

- MELO, G. B. et al. Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats 1 Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* na regeneração hepática após hepatectomia parcial em ratos. **Acta Cir Bras**, v. 21, n. Suplemento 1, p. 33–36, 2006.
- MICHAELA PIETSCHMANN, OTTO VOSTROWSKY, HANS JÜRGEN BESTMANN, ANIL K. PANT, C. S. M. Volatile Constituents of *Hyptis pectinata* Poit. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. Vol. 10, n. 5, 1998.
- MONACO, J. L.; LAWRENCE, W. T. Acute wound healing an overview. **Clinics in plastic surgery**, v. 30, n. 1, p. 1–12, jan. 2003.
- MORIMOTO, N. et al. Exploratory clinical trial of combination wound therapy with a gelatin sheet and platelet-rich plasma in patients with chronic skin ulcers: study protocol. **BMJ open**, v. 5, n. 5, p. e007733, 2015.
- NASCIMENTO, P. et al. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. **Oral Diseases**, v. 14, n. 6, p. 485–489, 2008a.
- NASCIMENTO, P. F. C. et al. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. **Oral diseases**, v. 14, n. 6, p. 485–489, 2008b.
- NEVES, E. M. DOS S. F. **Macrófago**[sn], , 2015.
- OLIVEIRA, D. M. et al. Antibacterial mode of action of the hydroethanolic extract of *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. involves bacterial membrane perturbations. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 356–363, 2015.
- PAIXÃO, M. S. et al. *Hyptis pectinata*: redox protection and orofacial antinociception. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 9, p. 1328–1333, 2013.
- PAIXÃO, M. S. et al. *Hyptis pectinata* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 35–41, 2015.
- PARK, Y. G. et al. Hydrogel and Platelet-Rich Plasma Combined Treatment to Accelerate Wound Healing in a Nude Mouse Model. **Archives of plastic surgery**, v. 44, n. 3, p. 194–201, maio 2017.
- PARKES, J. A clinical in-market evaluation of an alginate fibre dressing. **British Journal of Nursing**, v. 24, p. S28-35, 14 ago. 2015.
- PEREDA-MIRANDA, R. et al. Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro-alpha-pyrones from *Hyptis pectinata*. **Journal of natural products**, v. 56, n. 4, p. 583–593, 1993.
- PEREIRA, R. F.; BARTOLO, P. J. Traditional therapies for skin wound healing. **Advances in Wound Care**, 2014.
- RAJA, R. R. LamiaceaeOverview.pdf. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 3, n. 1819–3455, p. 203–213, 2012.
- RAYMUNDO, L. J. R. P. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil.

- Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 725–732, 12 abr. 2011.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.
- REZENDE DE CARVALHO, M.; DE OLIVEIRA, B.; RENAUD, B. G. Terapia compressiva para el tratamiento de úlceras venosas: una revisión sistemática de la literatura. **Enfermería Global**, v. 16, n. 45, p. 574–633, 2017.
- ROJAS, A. et al. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 35, n. 3, p. 275–283, 1992.
- ROMERO-CERECERO, O. et al. Pharmacological and chemical study to identify wound-healing active compounds in *Ageratina pichinchensis*. **Planta Medica**, v. 79, n. 8, p. 622–627, 2013.
- SAMPAIO, S. A. P. Rivitti E. Pele normal: anatomia e fisiologia. **Sampaio SAP, Rivitti E. Dermatologia. 3ª edição. São Paulo Artes Médicas**, p. 3–35, 2001.
- SANNINO, A.; DEMITRI, C.; MADAGHIELE, M. Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications. **Materials**, v. 2, n. 2, p. 353–373, 2009.
- SANTOS, P. O. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1648–1652, 2008.
- SARHEED, O. et al. An investigation and characterization on alginate hydrogel dressing loaded with metronidazole prepared by combined inotropic gelation and freeze-thawing cycles for controlled release. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 3, p. 601–609, jun. 2015.
- SELLMER, D. et al. Sistema especialista para apoiar a decisão na terapia tópica de úlceras venosas. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 34, n. 2, p. 154–162, 2013.
- SENNA, A. M.; NOVACK, K. M.; BOTARO, V. R. Synthesis and characterization of hydrogels from cellulose acetate by esterification crosslinking with EDTA dianhydride. **Carbohydrate polymers**, v. 114, p. 260–268, 2014.
- SERAFINI, M. R. et al. Determination of chemical and physical properties of *Hyptis pectinata* essential oil and their redox active profile. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 3, n. March, p. 1–9, 2012.
- SILVA, W. J. et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 3251–3255, 2008.
- SILVA, J. A. DA. Desenvolvimento, caracterização e estudo de permeação cutânea de diclofenaco de dietilamônio em sistemas tópicos nanoemulsionados. 2008.
- SILVA, M. H. DA et al. Manejo clínico de úlceras venosas na atenção primária à saúde. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 25, n. 3, p. 329–333,

2012.

SILVA, R. C. L. DA et al. Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem. **São Caetano do Sul: Yendis**, 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. [s.l.] Artmed Editora, 2016.

SMIGIEL, K. S.; PARKS, W. C. Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: Recent Insights. **Current rheumatology reports**, v. 20, n. 4, p. 17, mar. 2018.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of separation science**, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.

STORPIRTIS, S. et al. Ciências farmacêuticas: biofarmacotécnica, Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 2009.

SÜNTAR, I. et al. Wound healing and antioxidant properties: do they coexist in plants? **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 2, p. 1–7, 2012.

TCHOUMBOUGNANG, F. et al. Aromatic plants of tropical Central Africa. XLVIII. Comparative study of the essential oils of four Hyptis species from Cameroon: *H. lanceolata* Poit., *H. pectinata* (L.) Poit., *H. spicigera* Lam. and *H. suaveolens* Poit. **Flavour and fragrance journal**, v. 20, n. 3, p. 340–343, 2005.

THAKUR, V. K.; THAKUR, M. K. Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 834–847, jan. 2015.

TOLAZZI, A. R. D. Efeito do inibidor de Leucotrieno Montelukaste na cicatrização cutânea em ratos: avaliação tensiométrica, da contração cicatricial e da deposição de colágeno. 2007.

TOSATO, M. G. **Análise dos constituintes da pele humana sob efeitos de cosmecêuticos por espectroscopia Raman**. 105 fDissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica)–Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, , 2010.

TOSATO, M. G. et al. Análise da composição bioquímica da pele por espectroscopia Raman. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 28, n. 3, 2012.

TROVATTI, E. et al. Biopolímeros: aplicações farmacêutica e biomédica. **Eclética Química Journal**, v. 41, n. 1, p. 1–31, 2017.

WANG, P.-H. et al. Wound healing. **Journal of the Chinese Medical Association**, 2017.

WANG, W.; WANG, A. Synthesis and swelling properties of pH-sensitive semi-IPN superabsorbent hydrogels based on sodium alginate-g-poly (sodium acrylate) and polyvinylpyrrolidone. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 4, p. 1028–1036, 2010.

WELLER, C.; EVANS, S. Venous leg ulcer management in general practice-practice nurses and evidence based guidelines. **Australian family physician**, v. 41, n. 5, p. 331–337, maio 2012.

YOUNG, A.; MCNAUGHT, C.-E. The physiology of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 29, n. 10, p. 475–479, 2011.



## 7. ANEXO

### 7.1. Artigo publicado na International Wound Journal

International Wound Journal ISSN 1742-4801

ORIGINAL ARTICLE

## The use of medicinal plants in venous ulcers: a systematic review with meta-analysis

Anderson L Freitas<sup>1</sup>, Carla A Santos<sup>1</sup>, Carlos AS Souza<sup>1</sup>, Marco AP Nunes<sup>2</sup>, Ângelo R Antonioli<sup>1</sup>, Wellington B da Silva<sup>1</sup> & Francilene A da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Brazil

<sup>2</sup> Department of Medicine, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Brazil

#### Key words

Healing; Medicinal plants; Meta-analysis; Varicose ulcers

#### Correspondence to

Anderson Freitas, MS  
Department of Pharmacy  
Federal University of Sergipe  
São Cristóvão, Brazil  
E-mail: andersonlfd@hotmail.com

Freitas AL, Santos CA, Souza CAS, Nunes MAP, Antonioli ÂR, da Silva WB, da Silva FA. The use of medicinal plants in venous ulcers: a systematic review with meta-analysis. *Int Wound J* 2017; doi: 10.1111/iwj.12751

#### Abstract

The aim of this study was to systematically review the use of medicinal plants for the treatment of varicose ulcers. The databases used in the search were: Medline/Pubmed, Scopus, Cinhal, Lilacs and Web of Science. The selection process was divided into two phases: the reading of titles and abstracts and the full reading of selected articles. The item description was compared with the checklist of the Consolidated Standards of Reporting Trials. The initial search produced 3505 articles and seven were selected for inclusion in the systematic review. Of the included studies, 7 (100%) evaluated the reduction of the ulcer area, 4 (57.14%) evaluated reepithelisation, 2 (28.57%) evaluated bacterial flora and 1 (14.28%) evaluated the oxygen pressure and percutaneous carbon dioxide. The level of evidence rating indicated that five studies (71.42%) were rated at level 2 and two (28.57%) were rated at level 3. The quality assessment was performed using the Jadad scale, which is prevalent in the literature. The quality score of the Jadad questionnaire ranges from 0 to 5; here, the studies analysed had an average of 2.5. A meta-analysis was performed on two studies that analysed the effects of *Mimosa tenuiflora* hydrogel in the treatment of venous ulcer and included 42 patients with a mean age of 60.5 years and a mean duration of treatment of 10.5 weeks. Heterogeneity was assessed using I<sup>2</sup>; we obtained a high value of 84%. We concluded that, despite the efficacy of the incorporation of *Ageratina pichinchensis* into the gel, the hydrogel that incorporated *M. tenuiflora* appeared to be a promising candidate for the management of venous ulcers.

#### Introduction

In humans, problems related to blood circulation, such as chronic venous ulcers, are common. This disease is associated with the complication of chronic venous insufficiency, which is the leading cause of lower limb ulcers. Venous ulcers are caused by the malfunction of the venous valves, which affects the oxygen and nutrient supply to tissues and is conducive to the appearance of cutaneous lesions (1). Most often, individuals between 60 and 80 years old are affected; however, the majority of injuries start before 60 years (2). A comparison of the data from a number of Western countries indicated the epidemiological prevalence varied from 0.7% to 2.7% (2,3)

The treatment cost of the disease is generally high and results in significant social and economic impact owing to the lengthy

process of the treatment and cicatrisation (2–4). The main treatments reported for venous leg ulcers are compression

#### Key Messages

- this systematic review demonstrates that medicinal plants are effective in cicatrisation venous ulcers.
- this review aims to synthesise the medicinal plants used in clinical trials in the treatment of venous ulcers
- clinical trials with medicinal plants demonstrate high efficacy in the treatment of venous ulcers with 100% cicatrisation
- *Ageratina pichinchensis* and *Mimosa tenuiflora* have been shown to be promising for the development of a pharmaceutical product because they are more effective

## 7.2. Submissão do artigo a revista Skin Pharmacology and Physiology

### Skin Pharmacology and Physiology Submission Received

spp@karger.com

qua 31/01/2018 00:59

Para: andersonfd@hotmail.com <andersonfd@hotmail.com>;

Dear Mr. Anderson Freitas:

Thank you for submitting your manuscript entitled "AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS POR HIDROGEL CONTENDO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *Hyptis pectinata* (L.), EM RATOS." to "Skin Pharmacology and Physiology"; the submission number is: 3422. Your submission will now be checked by the editorial office. Once this has been done, you will receive a confirmation mail from the editorial office.

If you have any queries please send an email to: spp@karger.com.

With kind regards,

Editorial Office

## Regras de Smissão da Revista: Skin Pharmacology and Physiology

### Submission

Should you have any problems with your submission, please contact the Editorial Office:

Esther Bettiol  
Editorial Office 'Skin Pharmacology and Physiology'  
S. Karger AG  
P.O. Box  
CH-4009 Basel (Switzerland)  
Tel. +41 61 306 1361  
Fax +41 61 306 1434  
spp@karger.com

### Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that they are not under simultaneous consideration by any other publication. Submission of an article for publication implies transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the permanent property of 'Skin Pharmacology and Physiology' and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher. It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc. from other publications.

For legal reasons, we must receive your 'Submission Statement' with your original (hand-written) signature. Please download, print, sign and either fax or scan it to make it legally binding.

### Sections

The journal consists of the following sections:

Editorials  
Reviews  
Original Papers  
Short Communications  
GD Communications  
Consensus Guidelines

### Short Communications

Authors may apply to have their paper treated as a short communication. Condition for this is a brief definite report of important results. Final decision whether a paper will be published as a short communication will be made by the Editors. A publication time of two months after acceptance is intended.

#### Conflicts of Interest

Authors are required to disclose any sponsorship or funding arrangements relating to their research and all authors should disclose any possible conflicts of interest. Conflict of interest statements will be published at the end of the article.

#### Ethics

Published research must comply with the guidelines for human studies and animal welfare regulations. Authors should state that subjects have given their informed consent and that the study protocol has been approved by the institute's committee on human research. Further, they should also state that animal experiments conform to institutional standards.

#### Plagiarism Policy

Whether intentional or not, plagiarism is a serious violation. We define plagiarism as a case in which a paper reproduces another work with at least 25% similarity and without citation.

If evidence of plagiarism is found before/after acceptance or after publication of the paper, the author will be offered a chance for rebuttal. If the arguments are not found to be satisfactory, the manuscript will be retracted and the author sanctioned from publishing papers for a period to be determined by the responsible Editor(s).

#### Arrangement

**Title page:** The first page of each paper should indicate the title, the authors' names, the institute where the work was conducted, and a short title for use as running head.

**Full address:** The exact postal address of the corresponding author complete with postal code must be given at the bottom of the title page. Please also supply phone and fax numbers, as well as e-mail address.

**Key words:** Please supply 3–10 key words in English that reflect the content of the paper.

**Abstract:** Each paper needs an abstract in English of not more than 200 words. The abstract is of utmost importance. It should consist of four paragraphs, labeled

Background/Aims, Methods, Results and Conclusion, describing briefly the problem addressed by the study, how the study was performed, the salient results, and what the authors conclude from the results.

Footnotes: Avoid footnotes.

Tables and illustrations: Tables and illustrations (both numbered in Arabic numerals) should be sent in separate files. Tables require a heading and figures a legend, also in a separate file. Due to technical reasons, figures with a screen background should not be submitted. When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm). Black and white half-tone and color illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800–1,200 dpi.

### Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 960.00 per page.

### References

In the text, identify references by Arabic numerals [in square brackets]. Material submitted for publication but not yet accepted should be noted as 'unpublished data' and not be included in the reference list. The list of references should include only those publications which are cited in the text. Do not alphabetize; number references in the order in which they are first mentioned in the text. The surnames of the authors followed by initials should be given. There should be no punctuation other than a comma to separate the authors. Preferably, please cite all authors. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system. Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

### Examples

(a) Papers published in periodicals:

Chatel J-M, Bernard H, Orson FM: Isolation and characterization of two complete Ara h 2 isoforms cDNA. *Int Arch Allergy Immunol* 2003;131: 14–18.

(b) Papers published only with DOI numbers:

Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) Monographs: Matthews DE, Farewell VT:  
Using and Understanding Medical Statistics, ed 3, revised. Basel, Karger, 1996.

(d) Edited books: Parren PWHI, Burton DR:  
DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, Dubois RN (eds): COX-2. Prog Exp Tum Res. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124–137.

Reference Management Software: Use of EndNote is recommended for easy management and formatting of citations and reference lists.

#### Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at [www.doi.org](http://www.doi.org)

#### Supplementary Material

Multimedia files and other supplementary files, directly relevant but not essential to the conclusions of a paper, enhance the online version of a publication and increase its visibility on the web. These files will undergo editorial review. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Multimedia and supplementary material should meet production quality standards for publication without the need for any modification or editing. Files should not exceed 10 MB in size. Figures and tables need to have titles and legends, and all files should be supplied separately and labeled clearly. All supplementary material should be referred to in the main text. A DOI number will be assigned to supplementary material and it will be hosted online at <https://karger.figshare.com> under a CC BY license. Authors will be charged a processing fee of CHF 250.00 for supplementary material.

#### Self-Archiving/Green Open Access

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-peer review) or post-prints (i.e. accepted manuscript after peer review but before production) on their personal or their institution's internal website. In addition, authors may post their accepted manuscripts in public Open Access repositories and scientific networks (e.g. ResearchGate or Mendeley) no earlier than 12 months following publication of the final version of their article. For all self-archiving, the posted manuscripts must:

Be used for noncommercial purposes only

Be linked to the final version on [www.karger.com](http://www.karger.com)

Include the following statement:

'This is the peer-reviewed but unedited manuscript version of the following article:  
[insert full citation, e.g. Cytogenet Genome Res 2014;142:227–238 (DOI:

10.1159/000361001)]. The final, published version is available at [http://www.karger.com/?doi=\[insert DOI number\]](http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number]).'

It is the author's responsibility to fulfill these requirements.

For papers published online first with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its final version. This is important to ensure that citations can be credited to the article.

Manuscripts to be archived in PubMed Central due to funding requirements will be submitted by Karger on the author's behalf [see Funding Organizations (NIH etc.)].

For self-archiving Author's Choice™ (Gold Open Access) articles, see Author's Choice™.

#### Author's Choice™

Karger's Author's Choice™ service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at [www.karger.com](http://www.karger.com). The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at [www.karger.com/authors\\_choice](http://www.karger.com/authors_choice).

The final, published version of the article may be posted at any time and in any repository or on other websites, in accordance with the relevant Creative Commons license. Reposted Open Access articles must:

Follow the terms of the relevant Creative Commons license

Be linked to the final version on [www.karger.com](http://www.karger.com)

Include the following statement:

'The final, published version of this article is available at [http://www.karger.com/?doi=\[insert DOI number\]](http://www.karger.com/?doi=[insert DOI number]).'

It is the author's responsibility to fulfill these requirements.

For papers published online first with a DOI number only, full citation details must be added as soon as the paper is published in its final version. This is important to ensure that citations can be credited to the article.

#### Funding Organizations (NIH etc.)

The U.S. National Institutes of Health (NIH) Public Access Policy mandates that accepted, peer-reviewed manuscripts are archived in its digital database, PubMed Central (PMC), within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits NIH-funded articles to PMC on behalf of the authors immediately upon publication. The NIH assigns a PMCID within approximately 1 month and the manuscript will appear in PMC after a 12-month embargo. For authors making their paper Open Access through Author's Choice™, the embargo will be overridden, thereby accelerating the accessibility

of the article. Karger also complies with other funders' requirements (including Wellcome Trust and RCUK) for submission to PMC.

Authors should include information on their grant in the Acknowledgements section of their papers.

### Page Charges

There are no page charges for papers of 5 or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). Each additional complete or partial page is charged to the author at CHF 325.00. The allotted size of a paper is equivalent to approximately 15 double-spaced manuscript pages (including abstract, tables, illustrations and references).

### Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the corresponding author and should be returned with the least possible delay. Alterations other than the correction of printer's errors are charged to the author.

### Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after the issue is printed are subject to considerably higher prices.

### 7.3. Autorização do Comitê de ética animal para a realização do projeto de pesquisa



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

#### DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "MELHORA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS POR DUODERME, ESPONJA OU HIDROGEL CONTENDO HYPTIS PECTINATA (L), CONTENDO FLAVONÓIDES, EM RATOS" Sob Coordenação da Profª. Drª. FRANCILENE AMARAL (protocolo CEPA 19/2015) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 24/11/2015.

São Cristóvão, 24 de novembro de 2015.

Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA  
Coordenador do CEPA/UFS

---

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"  
Jardim Rosa Elze - São Cristóvão - SE  
49100-000  
Fones: 3212 6661/6606