

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GUILHERME ARCARO

MUCILAGEM DE *OCOTEA PUBERULA* (RICH.) NEES.: DESENVOLVIMENTO DE
UM FITOMEDICAMENTO E TESTES “*IN VIVO*” PARA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS

PONTA GROSSA

2018

GUILHERME ARCARO

MUCILAGEM DE *OCOTEA PUBERULA* (RICH.) NEES.: DESENVOLVIMENTO DE
UM FITOMEDICAMENTO E TESTES “*IN VIVO*” PARA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS.

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre na Universidade Estadual de
Ponta Grossa, Área de Ciências da Saúde.

Orientador: Prof.Dr. Luís Antonio Pinheiro;
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

PONTA GROSSA

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Arcaro, Guilherme
A668 Mucilagem de Ocotea Puberula (rich.)
nees.: desenvolvimento de um
fitomedicamento e testes "in vivo" para
cicatrização de feridas/ Guilherme Arcaro.
Ponta Grossa, 2018.
128f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da
Saúde - Área de Concentração: Atenção
Interdisciplinar em Saúde), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antonio
Pinheiro.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor
Farago.

1.Fitoterapia. 2.Ferimentos. 3.Lesões.
4.Cicatrização. 5.Mucilagem vegetal.
I.Pinheiro, Luís Antonio. II. Farago,
Paulo Vitor. III. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Mestrado em Ciências da
Saúde. IV. T.

CDD: 615.32

GUILHERME ARCARO

MUCILAGEM DE *OCOTEA PUBERULA*: DESENVOLVIMENTO DE
UM FITOMEDICAMENTO E TESTES *IN VIVO* PARA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

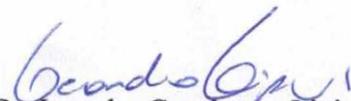
Ponta Grossa, 11 de junho de 2018.



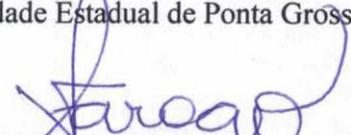
Prof. Dr. Luis Antonio Pinheiro – Orientador
Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto
Doutora em Ciências Biológicas
Universidade Federal do Alagoas



Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski
Doutor em Clínica Veterinária
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Paulo Vitor Farago – Coorientador
Doutor em Química
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Dedico este trabalho ao meu falecido pai Sérgio Arcaro, que mesmo longe fisicamente, em pensamento e energia, esteve ao meu lado em todos os momentos difíceis me guiando para o melhor caminho, e sempre lutou em vida para nossa graduação e sucesso profissional.

Dedico também à minha esposa e minha filha, pelo amor, compreensão e por sempre estar ao meu lado nos momentos alegres e tristes.

À minha mãe por todo apoio e incentivo.

Aos meus irmãos e amigos, pelo carinho em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por minha vida, família e amigos.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, e ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade de realizar o curso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Antonio Pinheiro, por me conceder a oportunidade de elaboração deste trabalho e por todo seu apoio.

Ao meuco-orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pela atenção, auxílio e paciência em todas as etapas deste trabalho.

À minha esposa pela paciência e compreensão em todos os momentos, nunca deixando de me incentivar e apoiar.

À minha mãe, irmãos e familiares pelo amor, incentivo e boas vibrações.

Meus agradecimentos aos amigos, companheiros de trabalhos que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida, em especial à Adriana e a Bruna que estiveram presentes me apoiando frente às várias dificuldades apresentadas no decorrer da pesquisa.

Ao C-LABMU por todo apoio no desenvolvimento das análises e caracterização do extrato botânico e preparações.

Ao Biotério pelo preparo e disponibilização dos animais e a estes pela possibilidade de realizar as análises de cicatrização de feridas

Ao Laboratório de Técnica Operatória, em especial à Adriana e a Bruna junto com o Prof. Leandro por todo apoio e orientação na realização dos testes *in vivo*

À Prof. Dra Andressa Novatski e a Mariana pelo auxílio e apoio na realização dos testes em FTIR e interpretação dos mesmos

À Ana Dalmolin e o Prof. Fábio André do Depto de Odontologia pelo apoio na realização das análises histológicas.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’” (Geroge Bernard Shaw)

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.
(Leonardo da Vinci)

ARCARO, G. **Mucilagem de *Ocotea puberula* (RICH.) NEES.: Desenvolvimento de um fitomedicamento e testes “in vivo” para cicatrização de feridas.** Ponta Grossa, 2018. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

RESUMO

Os objetivos dessa pesquisa foram desenvolver e avaliar fitomedicamentos para cicatrização de feridas contendo mucilagem de *Ocoteapuberula* (Rich) Nees. **Materiais e métodos:**a coleta e preparação das cascas foi realizada em espécies nativas da região dos Campos Gerais de Ponta Grossa PR, Brasil; sendo a mesma submetida a uma técnica hidroalcoólica para extração da mucilagem, através de técnicas distintas pela aplicação ou não de calor até 60°C. As amostras liofilizadas do extrato hidroalcoólico da *Ocoteapuberula* (EHOP) foram analisadas através de técnicas de DTG/TG, FTIR para análise dos extratos nas diferentes extrações, assim como quantificação de rendimento de extração do EHOP. Posteriormente foram formuladas membranas semipermeáveis de carboximetilcelulose (CMC) e acetato de polivinila (PVA) impregnadas com 10% de EHOP. Concomitante, foi realizada análise reológica e FTIR das membranas. As membranas de CMC e PVA puras e incorporadas com EHOP foram testadas em ratos através da aplicação em uma lesão no dorso do animal. Como controle positivo foi utilizado o curativo Megisorb^r e negativo a água destilada. As lesões foram avaliadas quanto ao índice de retração da lesão, análise histológica das feridas quanto a inflamação, angiogênese e colagênese e análise laboratorial de amostra sanguínea dos animais quanto a toxicidade hepática ou renal. **Resultados:**a extração através do aquecimento a 60°C proporcionou melhor rendimento associado a maior concentração de compostos alcalóides, com similaridade em FTIR da extração sem emprego de calor e a análise reológica demonstrou potencial em absorção de forças de stress sem sofrer deformação. Os espectros de FTIR das membranas de CMC e PVA sugeriram melhor estabilidade do EHOP em PVA. As análises histológicas permitiram visualizar potencial cicatrizante aos grupos CMC/EHOP e o EHOP, sem toxicidade hepática ou renal em ambos os grupos, sugerindo assim um potencial fitoterápico na aplicação de EHOP em feridas.

Palavras-chave: Fitoterapia, ferimentos, lesões, cicatrização, mucilagem vegetal, reologia, *Ocoteapuberula*.

ARCARO, G. **Mucilage of *Ocotea puberula* (RICH.) NEES .: Development of a phytomedication and "in vivo" tests for wound healing.** Ponta Grossa, 2018. 128 f. Dissertation (Master in Health Sciences). State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

ABSTRACT

The objectives of this research were to develop and evaluate one phytomedications for wound healing containing mucilage of *Ocoteapuberula* (Rich) Nees. **Materials and method:**The collection and preparation of the bark was carried out in native species of the "Campos Gerais" region of Ponta Grossa PR, Brazil, and it was submitted to a hydroalcoholic technique for extracting the mucilage, using different techniques for the application or not of heat up to 60 ° C. The lyophilized samples from the *Ocoteapuberula*hydroalcoholic extract (OPHE) were analyzed by DTG / TG, FTIR techniques for analysis of the extracts in the different extractions, as well as quantification of extraction yield of EHOP. Subsequently, semipermeable membranes of carboxymethylcellulose (CMC) and polyvinyl acetate (PVA) impregnated with 10% OPHE were formulated. At the same time, the rheological and FTIR analysis of the membranes was performed. Pure CMC and PVA membranes incorporated with OPHEwere tested in rats by application to a lesion on the animal's back. As a positive control the Megisorb dressing was used and negative the distilled water. The lesions were evaluated for lesion retraction index, histological analysis of wounds for inflammation, angiogenesis and collagenesis, and laboratory analysis of blood samples from animals for hepatic or renal toxicity. **Results:** Extraction through heating at 60 ° C provided a better yield associated with a higher concentration of alkaloid compounds, with FTIR similarity of the extraction without use of heat, and rheological analysis showed a potential for the absorption of stress forces without deformation. The FTIR spectra of CMC and PVA membranes suggested improved stability of EHOP in PVA. Histological analyzes allowed visualizing healing potential for the CMC / EHOP and EHOP groups, without hepatic or renal toxicity in both groups, thus suggesting a phytotherapeutic potential in the application of EHOP in wounds.

Key words: Phytotherapy, wounds, lesions, healing, vegetable mucilage, rheology, *Ocotea puberula*.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1	Desenho esquemático das camadas da pele.....	20
Figura 2	Desenho esquemático da epiderme.....	21
Figura 3	Principais alcalóides presentes na canela-guaicá.....	45
Figura 4	Desenho experimental da pesquisa.....	51
Figura 5	Fotos de uma espécime adulta de canela guaicá.....	52
Figura 6	Fotos das cascas da <i>Ocotea puberula</i> coletadas e fracionadas para secagem.....	54
Figura 7	Extração da mucilagem da <i>O. puberula</i> a quente.....	56
Figura 8	Extração hidroalcoólica da mucilagem da <i>O. puberula</i>	57
Figura 9	Fluxograma da Extração da mucilagem da <i>O. puberula</i> a quente.....	58
Figura 10	Pesagem da casca em pó hidratada da <i>Ocotea puberula</i> para centrifugação.....	59
Figura 11	Fluxograma da Extração da mucilagem da <i>O. puberula</i> a quente.....	60
Figura 12	Testes de viscosidade complexa em reômetro com EHOP....	63
Figura 13	Fluxograma de preparo de membrana de CMC 2%.....	67
Figura 14	Fluxograma de preparo de membrana de CMC 2% com EHOP 10%.....	68
Figura 15	Fluxograma de preparo de membrana de PVA 10%.....	70
Figura 16	Fluxograma de preparo de membrana de PVA 10% com EHOP 10%.....	71
Figura 17	Fluxograma ilustrativo dos grupos de pesquisa em ratos (7 grupos).....	73
Figura 18	Líquido denso obtido pela mistura de água e casca em pó na proporção 1:40 (p:v).....	80
Figura 19	Estrutura química da ocoteína (1) e da dehidroocoteína (2)...	83
Figura 20	Tubos de Ensaio com padrão de curva de glicose.....	84
Figura 21	DTG em extração a quente e a frio.....	86
Figura 22	TGA em extração a frio e a quente.....	87
Figura 23	FTIR em extração a quente e a frio.....	88

Figura 24	Modelos de Membrana de PVA e CMC.....	90
Figura 25	FTIR CMC Membrana pura e incorporada com EHOP.....	91
Figura 26	Estrutura dos alcalóidesaporfínicos stricto sensu e de folhas de espécimens adultos de <i>Ocotea puberula</i>	92
Figura 27	FTIR PVA Membrana pura e incorporada com EHOP.....	93
Figura 28	Módulo de Armazenagem (G') e Perda (G'') do EHOP.....	94
Figura 29	Viscosidade complexa do EHOP e do álcool etílico 95%.....	95
Figura 30	Manipulação Animal (rato <i>Wistar</i>) para o preparo da lesão incisional no dorso do animal.....	96
Figura 31	Fotos das lesões nos grupos experimentais.....	100
Figura 32	Fotomicrografia das lâminas das membranas após 7 dias de tratamento.....	103
Figura 33	Fotomicrografias das lâminas dos grupos não tratados com membrana (EHOP, Negativo e Positivo) após 7 dias de tratamento.....	104
Figura 34	Fotomicrografia das lâminas das membranas após 14 dias de tratamento.....	106
Figura 35	Fotomicrografias das lâminas dos grupos não tratados com membrana (EHOP, Negativo e Positivo) após 14 dias de tratamento.....	107
Figura 36	Fotomicrografia das lâminas das membranas após 21 dias de tratamento.....	109
Figura 37	Fotomicrografias das lâminas dos grupos não tratados com membrana (EHOP, Negativo e Positivo) após 21 dias de tratamento.....	110

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Exemplos de cobertura (curativos passivos) encontrados no mercado brasileiro.....	30
Quadro 2	Exemplos de curativos com princípio ativo encontrados no mercado brasileiro.....	30
Quadro 3	Exemplos de curativos com princípio ativo enzimático encontrados no mercado brasileiro.....	31
Quadro 4	Exemplos de curativos inteligentes encontrados no mercado brasileiro.....	31
Quadro 5	Exemplos de curativos biológicos encontrados no mercado brasileiro.....	31
Quadro 6	Exemplo de curativo utilizando pressão subatmosférica como forma de preparação do leito da ferida.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escores utilizados para avaliação histológica das lesões.....	77
Tabela 2	Rendimento da extração por técnicas quente e frio de extração de mucilagem da <i>Ocotea puberula</i>	81
Tabela 3	Composição centesimal da casca da <i>Ocotea puberula</i>	81
Tabela 4	Pesquisa no extrato hidroalcoólico das cascas de <i>O. puberula</i>	82
Tabela 5	Avaliação histológica das lesões após 7 dias.....	102
Tabela 6	Avaliação histológica das lesões após 14 dias.....	105
Tabela 7	Avaliação histológica das lesões após 21 dias.....	108
Tabela 8	Avaliação bioquímica dos grupos em Nefro e Hepatotoxicidade.....	111

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Cálculo de tamanho amostral para 7 grupos de pesquisa.....	72
Gráfico 2	Equação de Reta da curva padrão de glicose.....	84
Gráfico 3	Equação de Reta da curva padrão de ácido gálico.....	85
Gráfico 4	Índice de Cicatrização das lesões (ICL) dos grupos experimentais.....	97
Gráfico 5	Percentual de Retração das feridas entre 7 a 14 dias de tratamento.....	98
Gráfico 6	Percentual de Retração das feridas entre 14 a 21 dias de tratamento.....	99

LISTA DE SIGLAS

CMC – Carboximetilcelulose
PVA – Acetato De Polivinila
mm – Milímetros
DOPA – 3,4 Di-hidroxifenilalanina
°C – Grau Celsius
AC – Antes de Cristo
SF – Solução Fisiológica 0,9%
OMS – Organização Mundial de Saúde
PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
SUS – Sistema Único de Saúde
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
GNSO - Quitosana e S-Nitrosoglutationa
ECM - Matriz Extracelular
FTIR - Espectroscopia De Infravermelhos Com Transformadas De Fourier
QCSP - Quitosana G Polianilina Quaternizada
PEGS-FA - Etilenoglicol-Co-Poli (sebacato de glicerol)
PLGA - Co-Polímero De Polilactina E Poliglicolico Ácido
PLA – Polilactina
PGA – Poliglicolicoácido
PEG – Polietilenoglicol
PU – Poliuretano
PCL – policaprolactona
EHOP – Extrato Hidroalcoólico Da *Ocotea puberula*
DTG – Derivada da Termogravimetria
TG – Termogravimetria
UEPG – Universidade Estadual de Ponta Grossa
CAP – Circunferência da altura do peito
PA – Pureza Absoluta
CEUA/ UEPG – Comissão de Ética no Uso de Animais da UEPG
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

LTO – Laboratório para Técnica Operatória

DPO – dias de pós-operatório

ICF – Índice de Cicatrização das lesões

Ai – Área Inicial

Af – Área Final

TGO – Transaminase Glutâmico-Oxalacética

TGP – Transaminase Glutâmico-Pirúvica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 PELE	19
2.1.1 Anatomia e Fisiologia da Pele	20
2.1.2 Feridas	25
2.1.3 Cicatrização.....	27
2.1.4 Condições ideais para o processo de cicatrização.....	29
2.2 TRATAMENTO DE FERIDAS	29
2.2.1 Películas para aplicação em feridas	31
2.2.2 Outras terapias.....	33
2.3 FITOTERAPIA E O TRATAMENTO DE FERIDAS.....	35
2.3.1 Fitoterápicos e uso atual em feridas.....	35
2.3.2 Associação fitoterápicos e outros compostos.....	37
2.3.3 Películas semipermeáveis e fitoterápicos.....	39
2.4 CANELA GUAICÁ	43
2.4.1 Estudos sobre <i>Ocotea puberula</i>	47
3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	50
4 OBJETIVOS.....	51
4.1 OBJETIVO GERAL	51
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
5 DESENHO EXPERIMENTAL.....	52
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
6.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO	53
6.2 FORMULAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA <i>OCOTEA PUBERULA</i> (EHOP).....	55
6.2.1 Padronização da Droga Vegetal.....	55
6.2.2 Determinação da Composição Centesimal	55
6.2.3 Elaboração do extrato aquoso de <i>O. puberula</i> (Rich) Nees	56
6.2.3.1 Método de Extração à quente	56

6.2.3.2 Método de Extração à frio	59
6.2.3 Caracterização das Mucilagens	62
6.2.3.1 Análise de rendimento de extração da mucilagem	62
6.2.3.2 Análise da prospecção fitoquímica do EHOP	62
6.2.3.3 Análises reológicas.....	64
6.2.3.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR)	65
6.3 FORMULAÇÕES PARA USO TÓPICO.....	66
6.3.1 Filme de CMC puro (A1) e CMC com EHOP (A2).....	67
6.3.2 Filme de PVA puro (B1) e PVA com EHOP (B2).....	69
6.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE	72
6.4.1 Aspectos Éticos.....	72
6.4.2 Cálculo Amostral de animais para Pesquisa	73
6.4.3 Seleção de animais para pesquisa.....	73
6.4.4 Confecção da ferida e tratamento das lesões	75
6.4.5 Coleta de Material para estudo	75
6.4.6 Avaliação do Índice de cicatrização das lesões	76
6.4.7 Estudo Histológico (histomorfometria).....	76
6.4.8 Análise microscópica das feridas	77
6.4.9 Testes Estatísticos	78
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
7.1 EXTRAÇÃO DA CASCA DA <i>OCOTEA PUBERULA</i>	79
7.2 EXTRAÇÃO DA MUCILAGEM DA CASCA DA <i>OCOTEA PUBERULA</i>	80
7.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA CASCA DA <i>OCOTEA PUBERULA</i>	82
7.4. ANÁLISE DA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EHOP À QUENTE	83
7.5. DTG, TG E FTIR DO EHOP EM EXTRAÇÃO A QUENTE E A FRIO.....	87
7.6 ELABORAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CMC E PVA.....	91
7.7 FTIR DAS MEMBRANAS DE CMC E PVA PURAS E INCORPORADAS COM EHOP	91

7.8 ANÁLISES REOLÓGICAS DO EHOP	95
7.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i> PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	97
7.9.1 Avaliação do Índice de Cicatrização das Lesões (ICL)	98
7.9.2 Avaliação histológica após 7 dias de lesão	102
7.9.3 Avaliação histológica após 14 dias de lesão	105
7.9.4 Avaliação histológica após 21 dias de lesão	108
7.9.5 Análise bioquímica de nefro e hepatotoxicidade	111
8 CONCLUSÃO.....	114
9 PERSPECTIVAS.....	116
REFERÊNCIAS.....	117
ANEXOS.....	125
ANEXO I – Parecer Consubstanciado – CEUA.....	126
ANEXO II – Excicata <i>Ocotea puberula</i>	127
ANEXO III – Instrumento para realização das imagens das lesões	128

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as feridas crônicas constituem um sério problema de saúde pública, afetando grande parcela da população, em especial aos adultos e idosos, interferindo na capacidade funcional e ainda contribuindo para elevação de índices de morbidade e mortalidade por doenças crônicas (ABREU; RENAUD; OLIVEIRA, 2013). Esse elevado número representa um desafio para a adequada terapia, requerendo atenção e cuidado especial por parte dos profissionais de saúde, pois consiste em atividade de tratamento, que demanda tempo e custos, devido à longevidade da existência da ferida; a baixa resposta aos tratamentos e a não adesão a estas intervenções (SILVA, 2011).

Uma das justificativas de não adesão ao tratamento é a dificuldade de acesso da população brasileira aos medicamentos de alto custo (66%), aliado ao hábito de utilizar práticas integrativas e complementares nos cuidados em saúde (62,9%) (BRASIL, 2006). A utilização de plantas como uma dessas alternativa de tratamento, denota a importância de pesquisas que avaliem eficácia e segurança no uso de material vegetal permitindo uma alternativa ao uso de medicamentos alopáticos (OLIVEIRA; SOARES; ROCHA, 2010).

O tratamento de feridas retoma a Antiguidade, na busca pelo homem de terapias com melhores resultados cicatriciais em menores intervalos de tempo através do uso de diversos métodos e substâncias na terapêutica de lesões. Utilizava-se, muitas vezes, produtos empíricos, ineficazes e ao mesmo prejudiciais a processo cicatricial. Os avanços tecnológicos, os quais favoreceram e influenciaram a busca de estudos acerca do assunto, propiciando um grande avanço no conhecimento dos diferentes tipos de lesões, desde o processo de reparação do tecido lesado, bem como de todos os fatores nele envolvidos (MESQUITA, 2013).

Uma opção comumente explorada é a aplicação da fitoterapia, palavra de origem grega que resulta da combinação dos termos *Phito* = plantas e *Therapia* = tratamento e caracteriza pelo uso de plantas para tratamento de enfermidades. Historicamente, observa-se a busca por utilização da natureza e sua biodiversidade para aplicação à Saúde. Desde 1992, na Convenção sobre a Diversidade Biológica, 168 países assinaram acordos e termos na busca de preservação e exploração segura de suas

espécies nativas. Para as plantas (excluindo algas), há um catálogo global de registro de mais de um milhão de nomes e cerca de 350 mil espécies. No Brasil, conhece-se a ocorrência de aproximadamente 35 mil espécies, sendo destas quase 20 mil espécies endêmicas (SANTOS, 2016).

Dentre as plantas com propriedades medicinais, destaca-se na região dos Campos Gerais a espécie *Ocotea puberula* (Rich.) Nees. A *Ocotea puberula* é uma espécie arbórea nativa que ocorre por toda América tropical e subtropical, em quase todas as formações florestais (LORENZI, 1998). É conhecida popularmente como guaicá, canela-guaicá, canela-sebo, canela-parda, canela-de-corvo, canela-pimenta. Em trabalho etnobotânico efetuado em comunidades indígenas do Paraná e Santa Catarina por Marquesini (1995) foi obtida a informação do uso de *Ocotea puberula* no tratamento de tumores e afecções da pele. Ainda assim, em levantamento bibliográfico, existem poucas citações sobre dados fitoquímicos, principalmente relacionados com a identificação dos metabólitos secundários do presente táxon (FARAGO et al., 2004).

Nota-se também que há uma busca por associação de biofilmes a biomateriais crescente nas áreas de pesquisas correlatas ao tema “Cicatrização”, sendo fortemente associado a utilização de biomateriais de fácil acessibilidade, disponibilidade e baixo custo com a efetividade na sua função a ser pesquisada (antimicrobiano, antibiótico, cicatrizante, anti-inflamatório, entre outros).

Considerando a necessidade clínica de um tratamento eficaz na cicatrização de feridas associado à ampla oferta da canela guaicá na Região dos Campos Gerais, o presente estudo propõe a obtenção de um novo fitomedicamento baseado na extração de mucilagem da espécie *O. puberula*, associado com outros compostos, como Carboximetilcelulose (CMC) e o acetado de polivinila (PVA), para elaboração de uma película semipermeável impregnada com a mucilagem, para aplicação em feridas e avaliação de sua efetividade em testes *in vivo* em ratos, para posterior aplicação no tratamento de feridas crônicas no ambiente hospitalar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PELE

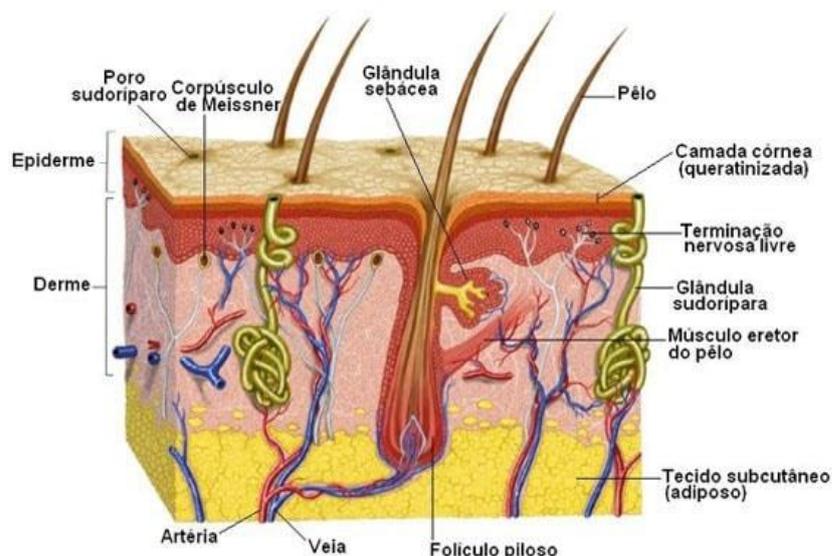
Comumente, cita-se na literatura coloquial e na descrição de diversos artigos não científicos, a classificação de tecido em referência à pele. Essa citação está equivocada, pois tecido se refere a qualquer agrupamento celular, tais como tecido epitelial, conjuntivo, muscular, ósseo, entre tantos outros. Nota-se portanto a necessidade de explanar a definição e caracterização da pele e suas características histológicas e fisiológicas (RABEH, 2013).

2.1.1 Anatomia e Fisiologia da Pele

O sistema tegumentar recobre o corpo, protegendo-o contra o atrito, a perda de água, a invasão de micro-organismos e a radiação ultravioleta. Tem papel na percepção sensorial (tato, calor, pressão e dor), na síntese de vitamina D, na termorregulação, na excreção de íons e na secreção de diversas substâncias. O tegumento é constituído pela pele e seus anexos: pelos, unhas, glândulas sebáceas, sudoríparas e mamárias(SILVA, 2011).

A pele é o maior órgão do corpo, sendo composta pela epiderme, derme e de tecido conjuntivo. Subjacente, unindo-a aos órgãos, há a hipoderme (ou fáscia subcutânea) de tecido conjuntivo frouxo e adiposo, conforme ilustrado na figura 1(RABEH, 2013).

Figura 1 - Desenho esquemático das camadas da pele

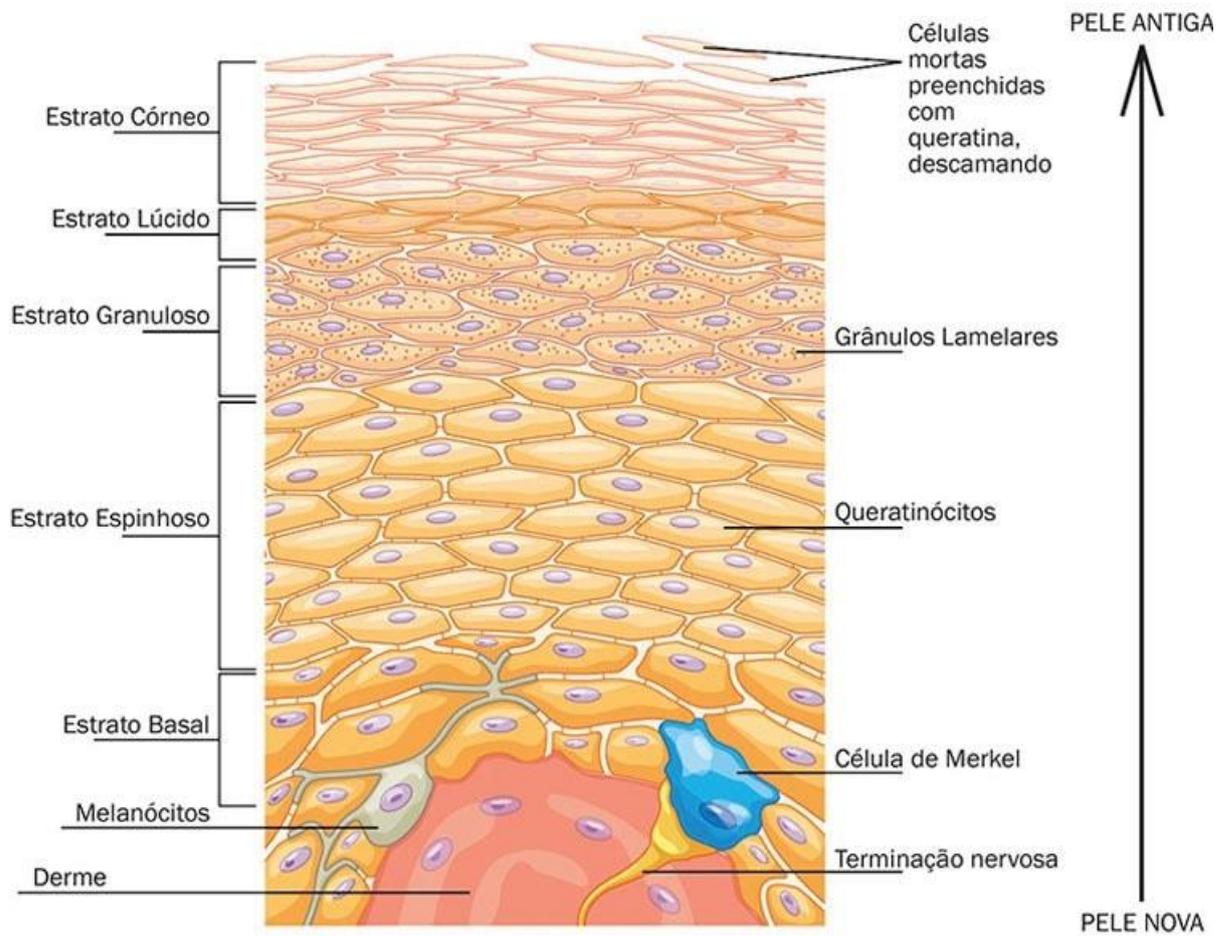


Fonte: Epiderme e Derme – camadas da pele (MORENO, 2017)

A pele apresenta diferenças segundo a sua localização. A palma das mãos e a planta dos pés, que sofrem um atrito maior, possuem uma epiderme constituída por várias camadas celulares e por uma camada superficial de queratina bastante espessa. Esse tipo de pele foi denominado pele grossa (ou espessa). Não possui pelos e glândulas sebáceas, mas as glândulas sudoríparas são abundantes. A pele do restante do corpo tem uma epiderme com poucas camadas celulares e uma camada de queratina delgada e foi designada pele fina (ou delgada). A epiderme da pele grossa mede 0,8 a 1,4 milímetros (mm), enquanto a da pele fina, 0,07 a 0,12mm (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A epiderme pode ser caracterizada em quatro camadas distintas: o estrato basal, o estrato espinhoso, o estrato granuloso e o estrato córneo; conforme ilustrado na Figura 2. Cada camada da epiderme tem funções e especificidades distintas (KÜHNEL, 2012).

Figura 2 - Desenho esquemático da epiderme



Fonte: Epiderme e Derme – camadas da pele (MORENO, 2017)

Nota-se também uma diversidade de células distintas, e estas com funções específicas e cruciais para o funcionamento adequado da pele em suas funções gerais. Os melanócitos são células arredondadas com longos prolongamentos, citoplasma claro e núcleo ovóide, possui vesículas membranosas, denominadas melanosomas, as quais oxidam a tirosina em 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA) e transformam a DOPA em melanina (do grego melas, negro), um pigmento pardo-amarelado a marrom-escuro. Pela fagocitose da extremidade dos prolongamentos, os grãos de melanina são introduzidos nas células do estrato basal e do estrato espinhoso. A melanina concentra-se sobre o núcleo, protegendo o material genético da radiação ultravioleta (MONTANARI, 2016).

Já as células de Merkel são semelhantes aos melanócitos, mas são mais escassas e, portanto, difíceis de serem observadas. Contêm um núcleo volumoso, filamentos de queratina e vesículas neuroendócrinas. Na base da célula, formam junções sinápticas com terminações nervosas sensitivas. Essas células são receptores táteis (mecanorreceptores) e são abundantes nas pontas dos dedos e na base dos folículos pilosos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As células de Langerhans são células apresentadoras de antígenos e originam-se de precursores da medula óssea. Elas fagocitam e processam os antígenos estranhos na pele, pois apresentam os antígenos capturados aos linfócitos T na própria epiderme ou nos linfonodos regionais, e os linfócitos iniciam a resposta imunológica. Nota-se portanto participação ativa na modulação de dermatites alérgicas por contato e da rejeição de transplantes cutâneos (GARTNER, 2017).

Penetrando a epiderme até o estrato granuloso, há terminações nervosas livres. Elas são ramificações de fibras amielínicas aferentes desprovidas de células de Schwann. Funcionam como receptores táteis de temperatura e de dor. (RABEH, 2013). Já no estrato córneo estão as células sem atividade proliferativa, as quais são pavimentosas, anucleadas e queratinizadas. Esse estrato confere proteção contra o atrito, a invasão de micro-organismos e a perda de água. Sua espessura varia, sendo maior na pele grossa, submetida a mais fricção do que a pele fina (RABEH, 2013).

Quando seguimos a descrição anatômica da pele por camadas, percebe-se que o limite entre a epiderme e a derme, principalmente na pele grossa, é bastante irregular, devido a projeções da derme para a epiderme (papilas dérmicas) e de

projeções da epiderme para a derme (cristas epidérmicas). Essas projeções aumentam a área de contato entre a derme e a epiderme, dando maior resistência à pele.

A derme é subdividida em: derme papilar, que corresponde às papilas dérmicas e é constituída por tecido conjuntivo frouxo e derme reticular, a maior parte da derme, de tecido conjuntivo denso não modelado. As fibras colágenas dispostas em diferentes sentidos conferem resistência ao estiramento. As camadas papilar e reticular contêm fibras elásticas, o que dá elasticidade à pele (SILVA, 2011).

Encontra-se também na derme alguns anexos cutâneos, como os vasos sanguíneos e linfáticos, os nervos e as terminações nervosas sensoriais livres ou encapsuladas. Uma vez que toda a superfície cutânea é provida de terminações nervosas capazes de captar mínimos estímulos térmicos, mecânicos ou dolorosos, como por exemplo ser possível discriminar um ponto em relevo com apenas 0,006 mm de altura e 0,04 mm de largura quando tateado com a ponta do dedo (KÜHNEL, 2012).

Essas terminações nervosas ou receptores cutâneos são especializados na recepção de estímulos específicos. Não obstante, alguns podem captar estímulos de natureza distinta. Cada receptor tem um axônio e, com exceção das terminações nervosas livres, todos eles estão associados a tecidos não-neurais. A derme pode conter ainda células musculares lisas, como, por exemplo, nas aréolas mamárias e no escroto (músculo dartos), ou fibras musculares esqueléticas, como na face (MENDONÇA; RODRIGUES, 2011).

Sobre os anexos cutâneos presentes na pele humana, estes também desenvolvem suas funções para garantia das atribuições fisiológicas da pele, os quais se destacam os pêlos, as glândulas sebáceas e sudoríparas e a glândula mamária.

Os pêlos desenvolvem-se dos folículos pilosos, invaginações da epiderme na derme e na hipoderme. Eles são abundantes na pele fina do couro cabeludo e ausentes nos lábios, na glândula, nos pequenos lábios, na face vestibular dos grandes lábios, nas faces laterais das mãos e dos pés e na pele grossa da palma das mãos e da planta dos pés. O folículo piloso é constituído por: bainhas radiculares interna e externa, derivadas da epiderme; membrana vítrea, que corresponde à membrana basal, e bainha dérmica, onde há condensação de fibras colágenas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Associados aos folículos pilosos, em virtude da sua origem, há as glândulas sebáceas. Elas são abundantes no couro cabeludo e ausentes na palma das mãos e na planta dos pés. Situam-se na derme. São glândulas exócrinas alveolares e possuem um ducto curto que desemboca no folículo piloso. Em algumas áreas do corpo, sem pêlos, as glândulas sebáceas abrem-se diretamente na superfície epidérmica. O sebo é uma secreção oleosa, com ácidos graxos, ésteres de cera e esqualeno, junto com os restos das células produtoras. Ele lubrifica a superfície da pele e do pelo, aumentando as características hidrofóbicas da queratina e protegendo o pelo (MONTANARI, 2016).

Já as glândulas sudoríparas estão distribuídas pela superfície corporal, excetuando-se os lábios, o clitóris, os pequenos lábios, a glândula e a superfície interna do prepúcio. Elas são abundantes nas regiões palmar e plantar. A porção secretora situa-se profundamente na derme ou na parte superior da hipoderme. São glândulas exócrinas tubulares simples, cuja função secretora é realizada pelas células escuras, produtoras de glicoproteínas, e pelas células claras, com características de células transportadoras de íons e responsáveis pela secreção aquosa do suor (GATNER, 2017).

O suor é uma solução aquosa, hipotônica, com pH neutro ou levemente ácido, contendo íons de sódio, potássio e cloro, uréia, ácido úrico e amônia. Além da função excretora, as glândulas sudoríparas regulam a temperatura corporal pelo resfriamento em consequência da evaporação do suor (RABEH, 2013).

Porém, na glândula mamária, que é uma área modificada da pele com glândulas sudoríparas especializadas na secreção de nutrientes sob a influência hormonal, ocorre a liberação do leite, importantíssimo para alimentação e crescimento dos recém nascidos, promovendo proteção, alimentação e desenvolvimento ao bebê (MENDONÇA; RODRIGUES, 2011).

2.1.2 Feridas

Feridas são descritas como lesões ou alterações de ordem celular, geralmente visíveis sobre a superfície da pele, as quais podem estar relacionadas a diversos fatores desencadeadores da lesão, tais como danos externos ao corpo, respostas imunológicas, tumores, entre outras diversas etiologias. Estas são usualmente classificadas em agudas ou crônicas: sendo as crônicas as que demandam mais tempo no processo de cicatrização (usualmente acima de 21 dias) e as lesões agudas,

as quais regeneram em tempo inferior. Associado a ferida, a população adulta é comumente assolada por doenças crônicas e sistêmicas, tais como diabetes, hipertensão arterial, desnutrição, imunodeficiência ou infecção. Estas são as principais causas sistêmicas de retardo no processo de reparação tecidual (SILVA, 2011).

As feridas podem ser também classificadas de acordo com suas características; quanto à causa, podem ser classificadas como cirúrgicas (por incisão, excisão ou punção), traumáticas (mecânico, físico ou químico) ou ulcerativas. Já quanto ao conteúdo microbiano, as feridas podem ser classificadas como limpas (em condições assépticas), limpas contaminadas (tempo inferior de 6 horas entre trauma e atendimento, sem contaminação significativa), contaminadas (tempo de atendimento superior a 6 horas, sem sinal de infecção) e infectadas (presença de agente infeccioso ou intensa reação inflamatória, podendo estar presente o pus) (MEIREIES, 2008; SANTOS, 2016).

Existe também três formas distintas das feridas poderem cicatrizar, as quais dependem da quantidade de tecido lesionado e da presença ou não de infecção. Cientificamente, estas maneiras distintas de cicatrização podem ser classificadas como: cicatrização por primeira intenção (não há perda de tecido e as bordas da ferida ficam justapostas), cicatrização por segunda intenção (perda de tecido e bordas não justapostas, cicatrizando mais lentamente) e cicatrização por terceira intenção (corrigidas cirurgicamente, normalmente crônicas sem resposta a tratamento usual). Podemos ainda definir feridas de acordo com sua apresentação como aberta (bordas da pele afastadas) ou fechadas (bordas justapostas) (BERGO, 2011; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Nota-se ainda uma tendência em classificação das feridas de acordo com o volume de exsudato (líquido com alto teor de proteínas séricas e leucócitos, produzido como reação a danos nos tecidos e vasos sanguíneos), sendo definidas como secas, pouco exsudativas, moderadamente exsudativas e altamente exsudativas (BERGO, 2011).

No caso de feridas infectadas, o tratamento continua sendo um tema de grande importância médica, particularmente na prática cirúrgica, numa época em que o uso indiscriminado de antimicrobianos tem dificultado o tratamento hospitalar dos

pacientes, com repercussão no aparecimento cada vez maior de microorganismos resistentes aos antimicrobianos. Diversas terapias alternativas têm sido testadas, dentre as quais o uso tópico de substâncias com elevada osmolaridade, sendo o açúcar e seus derivados citados como agentes antimicrobianos (ALVES et al., 2008).

2.1.3 Cicatrização

Logo após uma agressão à continuidade da pele, desde superficial até profunda, ocorre o início de processos específicos para cicatrização e reparo tecidual. Essa reestruturação da pele é desencadeada por mecanismos complexos, em que vários fatores extrínsecos (frio, calor, umidade) ou intrínsecos (doenças crônicas, imunidade comprometida, nutrição) contribuem ou retardam a regeneração da pele. Embora a reparação tecidual seja regulada sistemicamente, é necessário favorecer condições locais através de terapia tópica adequada para viabilizar o processo fisiológico. Para isto, no tratamento de feridas tem-se intensificado a pesquisa de produtos naturais para auxiliar a cicatrização (COELHO et al., 2010).

A cicatrização ocorre através de um processo dinâmico, interdependente, contínuo e complexo, com finalidade de restaurar os tecidos lesados, sendo composto por três principais fases, as quais são inflamatória, proliferativa e de maturação.

Na fase inflamatória que ocorre logo após a injúria tecidual, acontece homeostase e inflamação. É resumida em uma tentativa de limitar o dano tecidual, cessar o sangramento através do selamento da superfície da ferida e remoção de tecido necrótico, fragmentos estranhos ou bactérias presentes. Esta fase caracteriza-se por aumento da permeabilidade vascular, migração de células para a ferida por quimiotaxia, secreção de citocinas e fatores de crescimento na ferida e ativação de migração de células (MEDEIROS; DANTAS, 2016).

Este processo fisiológico ocorre porque, durante a injúria renal aguda, os vasos sanguíneos lesados expõem o colágeno subendotelial às plaquetas, o que acarreta em agregação plaquetária e ativação da via de coagulação. Ocorre vasoconstrição inicial das arteríolas e capilares, logo seguido por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Após o cessamento do sangramento, nota-se um acúmulo substancial de eritrócitos e plaquetas ao capilar danificado (MEDEIROS; DANTAS, 2016).

O aumento da permeabilidade vascular associados a fatores quimiotáticos promove também a diapedese dos macrófagos ao sítio da lesão. Estes liberam diversos componentes, enzimas e proteases, o que facilita sua migração. Nesta etapa, a lesão apresenta-se caracteristicamente com rubor, edema, calor e dor; estes relacionados à vasodilatação e migração de neutrófilos ao local de lesão (SILVA, 2011).

Podemos resumir a fase inflamatória, que ocorre normalmente em até seis dias; em etapas sequenciais, tais como a etapa trombocítica (ativação da cascata de coagulação), etapa granulócita (grande acúmulo de leucócitos com fagocitose das bactérias e limpeza local da ferida) e etapa macrofágica (macrófagos liberam enzimas, substâncias vasoativas e fatores de crescimento celular) (BERGO, 2011).

Já na fase proliferativa inicia-se o reparo da ferida através da angiogênese, fibroplasia e epitelização. Observa-se formação de tecido granuloso, que consiste de leito capilar, fibroblasto, macrófagos e rede de colágeno, além de outros compostos. A angiogênese é definida como formação de novos vasos, estes necessários para suportar o ambiente de cicatrização da ferida. Os fibroblastos presentes nesta etapa são células especializadas que chegam ao leito da ferida por diapedese, atraídos quimicamente ao sítio de inflamação, onde se dividem e produzem componentes da matriz extracelular (MEDEIROS; DANTAS, 2016).

Nesta fase nota-se um processo intenso de reepitelização, iniciado poucas horas após a lesão na formação de coágulos, posteriormente acontece a migração de células epiteliais. Queratinócitos localizados na camada basal da epiderme residual migram para a superfície da ferida, distribuída em uma sequência de etapas: desapego ao tecido basal, migração ao leito da ferida, proliferação local, diferenciação e estratificação. Nota-se ainda a formação contínua de colágeno no interior da lesão (BERGO, 2011).

Na fase de maturação, também chamada de fase reparadora ou de remodelação tecidual, é o momento em que já pode ser observado a contração inicial da ferida, de ordenação centrípeta tanto em profundidade como em extensão de toda a espessura da lesão devido redução da densa rede de capilares dos fibroblastos e reordenação das fibras de colágeno (PETZ, 2015).

Nota-se ainda diminuição da vascularização, hipopigmentação e diminuição da espessura da cicatriz, entretanto, o tecido cicatricial pode atingir até 80% da força original do tecido, portanto nunca será idêntico ao tecido original. O processo cicatricial segue um curso fisiológico do organismo, descrito acima; porém nem todas feridas cicatrizam de forma rápida e sem complicações, como é o caso de feridas crônicas. Estas são lesões que se desenvolvem por uma sequência anormal de reparação nas fases da cicatrização e em tempo prolongado, acarretando em déficit na recuperação anatômica e funcional do tecido, normalmente influenciado por fatores locais e sistêmicos que retardam este processo (PETZ, 2015).

2.1.4 Condições ideais para o processo de cicatrização

Compreendendo que a cicatrização é envolvida por etapas sequenciais e específicas para que haja a regeneração da pele agredida por uma lesão, há necessidade de promover condições que favoreçam a cicatrização de maneira ideal. Destaca-se a temperatura, pH, níveis bacterianos na ferida e umidade. A manutenção da temperatura e torno de 36,4 graus Celsius (°C) a 37,2°C favorece as reações químicas celulares (mitose, fagocitose, síntese de proteínas e metabolismo). Já o pH ácido que as secreções das glândulas sudoríparas e sebáceas promovem (pH4,2 a 5,6) impedem a penetração ou colonização de microrganismos (CAMPOS, 2008).

Portanto, o controle da colonização nas feridas favorece também a cicatrização, através de limpeza adequada, com técnica asséptica na troca do curativo e utilização de curativos que promovam barreira e que ajudem no controle microbiano. Ainda há de destacar que toda atividade celular ocorre em meio úmido, sendo crucial a utilização de um curativo que favoreça uma umidade ideal, protegendo as terminações nervosas, reduzindo a dor; acelerando o processo cicatricial, prevenindo a desidratação tecidual e a morte celular; promovendo necrólise e fibrinólise. O excesso de umidade ou falta do mesmo podem impossibilitar a atividade celular normal na área lesionada, lentificando a cicatrização, causando dessecação, hipergranulação ou maceração (SMANIOTTO et al., 2010).

2.2 TRATAMENTO DE FERIDAS

Para o tratamento de feridas crônicas são testadas diariamente diversas terapias alternativas, dentre as quais o uso tópico de substâncias com elevada osmolaridade tem demonstrado efeitos benéficos no tratamento das lesões, evidenciado potencial cicatrizante e antimicrobiano de grande interesse clínico (MESQUITA, 2013).

Nos dias atuais a terapia tópica empregada em feridas geram conflito de opiniões, em especial entre profissionais da área de saúde. Fato este justificado pela terapêutica implantada que deve atentar para a lesão e seu portador, com sensibilidade e planejamento holístico, de modo a contemplar o ser humano em sua plenitude. Estes múltiplos fatores de avaliação e definição de coberturas de maneira subjetiva corrobora a divergências de propostas de tratamentos às lesões de pele, em especial em feridas crônicas.

Os estudos, a comercialização e o uso de biomateriais, tais como os compostos para aplicação tópica, advém de longos tempos, remontando a sua aplicação na correção dos mais diversos tipos de problemas desde a antiguidade, como o uso de suturas de linho e ouro no Antigo Egito (2000 AC) e de intestino de gatos, na Europa, durante a Idade Média, até dentes artificiais feitos de conchas pelos maias (600 AC), de ferro pelos franceses (200 AC) e de ouro e madeira pelos romanos, chineses e astecas (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Já nos primórdios da existência humana, notava-se a busca por auxílio na tentativa natural de restaurar lesões e traumas. A utilização de cataplasmas e curativos de diversos compostos detém um avanço progressivo e acumulativo quanto ao conhecimento e cultura referente a aplicação de coberturas para a pele. Na literatura há relatos de utilização de vários agentes como extratos de plantas, água, neve, gelo, frutas e lama sobre as feridas (GIRARDI, 2005).

Nos dias atuais, percebe-se que o mercado relacionado à área de biomateriais é expressivo tanto do ponto de vista da quantidade de produtos comercializadas quanto do montante financeiro movimentado por empresas nas diversas áreas de atenção à saúde. Busca-se portanto, através das pesquisas, a formulação de um produto destinado ao tratamento das lesões de pele que apresentam algumas características como: facilidade de aplicação e remoção, conforto ao paciente, manutenção da umidade adequada no leito da ferida, custo-benefício atrativo, dentre outras qualidades (OKUMA, 2013).

2.2.1 Películas para aplicação em feridas

Atualmente há, no mercado mundial, diversas opções de materiais que podem ser utilizados nas diferentes etapas de tratamento das feridas com funções desde higienização do leito da ferida, debridamento para diminuição da população bacteriana, também para controle do exsudado ou ainda como estímulo à granulação (SMANIOTTO et al., 2010).

Observa-se também que os curativos podem ser classificados em curativos em passivos, com princípios ativos, curativos inteligentes e curativos biológicos, de acordo com os quadros descritos abaixo, exemplificando o princípio ativo e suas principais características. Nota-se também a ascensão por terapia por pressão negativa, idealizada por Argenta e Morikwasem 1997 e introduzida no Brasil em 2003, como uma opção a mais no tratamento das feridas (MEDEIROS; DANTAS, 2016).

Quadro 1 -Exemplos de cobertura (curativos passivos) encontrados no mercado brasileiro

Composição	Mecanismos de ação		Indicações	Contra indicações.
Curativo aderente (Rayon)	Tela de acetato de celulose com vaselina ou SF.	Livre fluxo de exsudato.	Queimaduras de profundidade parcial, áreas doadoras e receptoras de enxerto e lacerações.	Feridas infectadas e com grande volume de exsudato.
Filme transparente	Polímero de poliuretano, com adesivo de acrílico em uma das faces.	Cobertura permeável a gases e impermeável à água e microrganismos. Manutenção do leito úmido. Alívio da dor.	Feridas com fechamento por primeira intenção sem exsudato e Áreas doadoras de enxerto.	Feridas com exsudação.

Fonte: SMANIOTTO, P. H. S.; GALLI, R.; CARVALHO, V. F.; FERREIRA, M. C. Tratamento clínico das feridas: curativos. **Revista Médica**, v.89, n. 3/4, p. 137-141, 2010.

Quadro 2 -Exemplos de curativos com princípio ativo encontrados no mercado brasileiro

Composição	Mecanismos de ação	Indicações	Contra indicações.	Composição
Hidrocolóide	Poliuretano semipermeável (ext.) e celulose, gelatina e pectina (int.).	Absorção pouco exsudato. Mantém meio úmido. Alívio da dor Estimula tecido granulação.	Proteção de proeminência óssea (úlceras de pressão) e Lesão parcial de pele.	Feridas com grande exsudação e infectadas.
Hidrogel	Álcool de polivinil, poliacrilamidas e polivinil.	Ambiente hidrófilo Retem umidade. Liquefação de necrose.	Lesão parcial de pele e feridas com tecidos desvitalizados.	Feridas infectadas

Alginato de Cálcio	Fibras de algas marinhas impregnadas com cálcio.	O cálcio induz hemostasia. Absorção de exsudatos. Mantém o meio úmido (desbridamento autolítico).	Feridas abertas exsudativas, cavitárias e sangrantes.	Lesões superficiais com pouca exsudação e limpas.
---------------------------	--	---	---	---

Fonte: SMANIOTTO, P. H. S.; GALLI, R.; CARVALHO, V. F.; FERREIRA, M. C. Tratamento clínico das feridas: curativos. **Revista Médica**, v.89, n. 3/4, p. 137-141, 2010.

Quadro 3 -Exemplos de curativos com princípio ativo enzimático encontrados no mercado brasileiro

Composição	Mecanismos de ação	Indicações	Contra indicações	Composição
Papaína	Enzima proteolítica do látex do <i>Carica papaya</i> .	Ação de cisteína em dissolver seletivamente substratos necróticos (desbridante enzimático).	Tecido desvitalizado, necrose úmida ou seca.	Hipersensibilidade à formulação ou dor. Feridas limpas e secas
Colagenase	Enzima proteolítica <i>Clostridiopeptidase</i>	Degrada colágeno da ferida.	Tecido desvitalizado, necrose úmida ou seca.	Feridas limpas e secas

Fonte: SMANIOTTO, P. H. S.; GALLI, R.; CARVALHO, V. F.; FERREIRA, M. C. Tratamento clínico das feridas: curativos. **Revista Médica**, v.89, n. 3/4, p. 137-141, 2010.

Quadro 4 -Exemplos de curativos inteligentes encontrados no mercado brasileiro

Composição	Mecanismos de ação	Indicações	Contra indicações	Composição
Carvão ativado com prata	Fibras de carvão ativado impregnado com prata 0,15%.	Adsorção de exsudato Diminuição do odor. Prata é bacteriostática.	Feridas fétidas, exsudativas e infectadas.	Feridas limpas e secas.
Espuma com prata	Poliuretano ou silicone entremeadas por bolhas de ar impregnada com prata.	Alta absorção com isolamento térmico. Aderência do silicone ao leito. Prata é bacteriostática.	Feridas exsudativas, colonizadas, superficiais ou profundas.	Feridas limpas e secas.
Placa de Prata	Sais de prata.	Prata iônica causa precipitação de proteínas e age na membrana citoplasmática da bactéria (bacteriostática).	Feridas com infecção superficial.	Hipersensibilidade à prata.

Fonte: SMANIOTTO, P. H. S.; GALLI, R.; CARVALHO, V. F.; FERREIRA, M. C. Tratamento clínico das feridas: curativos. **Revista Médica**, v.89, n. 3/4, p. 137-141, 2010.

Quadro 5 -Exemplos de curativos biológicos encontrados no mercado brasileiro

Composição	Mecanismos de ação	Indicações	Contra indicações	Composição
------------	--------------------	------------	-------------------	------------

Matriz de colágeno	Colágeno bovino ou suíno decelularizado com celulose oxidada.	Agrega sinalizadores, que coordenam a ativação de fatores de crescimento endógenos.	Feridas crônicas e anérgicas (ex: diabéticos, úlceras venosas).	Experiência clínica ainda limitada.
Matriz de celulose	Membrana de celulose produzida por <i>Acinetobacter xylinum</i> desidratada, acrescida de poros artificialmente.	Manutenção da umidade da ferida e ativação de fatores de crescimento.	Área doadora de enxerto e feridas superficiais.	Feridas muito exsudativas e infectadas.
Pele alógena	Lâmina de pele humana de doador decelularizada.	Substituto temporário da pele humana.	Grande queimado, feridas complexas com perdas extensas.	Limitação de bancos de tecidos em nosso meio.

Fonte: SMANIOTTO, P. H. S.; GALLI, R.; CARVALHO, V. F.; FERREIRA, M. C. Tratamento clínico das feridas: curativos. **Revista Médica**, v.89, n. 3/4, p. 137-141, 2010.

Quadro 6 -Exemplo de curativo utilizando pressão subatmosférica como forma de preparação do leito da ferida

Composição	Mecanismos de ação	Indicações	Contra indicações	Composição
Terapia por pressão negativa	Esonja, tubos conectores, película adesiva, reservatório e bomba de vácuo.	Pressão subatmosférica, estímulo à vascularização, à granulação, controle do edema e da população bacteriana	Feridas extensas e de difícil resolução. Feridas complexas agudas e crônicas	Feridas com

Fonte: SMANIOTTO, P. H. S.; GALLI, R.; CARVALHO, V. F.; FERREIRA, M. C. Tratamento clínico das feridas: curativos. **Revista Médica**, v.89, n. 3/4, p. 137-141, 2010.

2.2.2 Outras terapias

A gama de terapias tópicas para o tratamento de lesões de pele é inúmera, denotando um conhecimento cada vez maior dos profissionais acerca de cobertura ideal e avaliação da ferida, a fim de promover uma regeneração ideal, livre de complicações como retração exacerbada, hipergranulação, maceração ou necrose da ferida.

Convencionalmente, há disponível largamente para a população em geral os curativos simples, como a utilização de gaze no leito da ferida e fixação das mesmas com micropore. Pelo custo reduzido associado ao efeito protetor e de controle de umidade, este curativo é empregado em diversas lesões agudas. Em situações de cronicidade das lesões há a busca por um curativo ideal que promova a progressão

das fases da lesão instalada, pois o tratamento convencional não realiza um suporte adequado para a evolução da cicatrização.

Girardi (2005), relata que a utilização de gases proporcionam pequena ou nenhuma oclusão e permitem a evaporação da umidade, resultando em uma ferida ressecada demasiadamente, além de não promover barreira física a patógenos externos (mesmo com 64 camadas de gases sobre a ferida). Nesta problemática, há uma busca contínua por aplicação de coberturas tópicas que promovam a resolução do meio úmido ideal, desde o uso de parafinas nos anos 80 até o incremento do silicone nas películas para utilização em feridas, estas atóxicas e de menor aderência ao leito da ferida, reduzindo lesões traumáticas em troca dos curativos.

As coberturas atualmente trabalham em várias grandes linhas de aplicação: filmes, espumas, sprays e géis. Os filmes, que são polímeros em forma de lâminas sobrepostas, são largamente aplicados em diversas lesões de pele, sendo que os compostos usualmente encontrados são polímeros de poliuretano, polietileno, policaprolactona, polietrafluoroetileno, dimetil aminoetil metacrilado, carboximetilcelulose, entre diversos outros compostos poliméricos (SOUZA, 2014).

Já as espumas promovem uma absorção de exsudato e proteção térmica superior aos filmes, favorecendo sua aplicação em feridas extensas e exsudativas. Elas se moldam facilmente ao leito da lesão, podendo ser utilizada inclusive em lesões com cavidades irregulares. Negativamente, sua adesão ao leito da ferida requer uma cobertura secundária para fixação, muitas vezes de difícil manuseio em algumas partes do corpo, especialmente articulares. Nestas lesões, o spray de copolímeros empregados em filmes e espumas podem colaborar na formação de uma barreira protetora moldada de acordo com a lesão e flexível para cumprir sua atividade curativa (GIRARDI, 2005).

Observando as qualidades referentes a cobertura, proteção e adesão dos filmes e a absorção, controle de umidade e moldagem das espumas, as indústrias vem aprimorando a formulação de curativos compostos, onde são associados diferentes compostos, como exemplo o gel hidrocolóide (associação de adesivo plástico com agente quelóide), o hidrogel (polímeros hidrofílicos reticulados em lâminas ou amorfo) entre outras associações (SMANIOTTO et al., 2010).

Observando as atualizações referentes a tratamentos tópicos, destaca-se também a busca por utilização de biopolímeros (agregação de proteína, ácido nucléico ou polissacarídeo de origem animal). Suas propriedades de renovabilidade, biodegradabilidade e atividade biológica detêm atenção e esforços para aplicação na Medicina em geral. Os polissacarídeos, por exemplo, possuem solubilidade ampla, associado a propriedades como gelificação, emulsificação e hidratação, cruciais para aplicação em coberturas de pele como filmes e géis. A quitosana e o alginato destacam-se entre os polissacarídeos de utilização atual na indústria da saúde (PIRES, 2015; YADAV, 2017).

Portanto, ao selecionar o tipo de tratamento a ser utilizado em uma ferida, é necessário reconhecer os benefícios, indicação, contra indicação, e o custo de cada produto, de forma a ponderar essas implicações e selecionar a cobertura mais adequada para aplicação, lembrando as especificidades de cada etapa do processo terapêutico da cicatrização (SILVA, 2014).

2.3 FITOTERAPIA E O TRATAMENTO DE FERIDAS

Conforme dados da Organização Mundial de Saúde – OMS, em países em desenvolvimento, o combate primário às doenças é realizado em cerca de 80% da população por práticas tradicionais e destas, 85% utilizam as plantas medicinais. Essa ampla utilização de plantas medicinais pela população no tratamento de saúde remonta a uma preocupação crescente na segurança terapêutica destas, sendo necessárias, portanto, pesquisas científicas que comprovem eficácia e segurança terapêutica da fitoterapia de uso popular em benefício dos mesmos (PÓVOAS, 2015).

2.3.1 Fitoterápicos e uso atual em feridas

O uso de plantas medicinais é incentivado pela OMS e reforçado na reunião de Alma-Ata, na declaração de Chiang Mai onde diz que “salvem plantas que salvem vidas”. Porém, há necessidade de seguir diretrizes e recomendações de uso seguro de plantas, lançadas em 2006 na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS – PNPIC. Paralelo a isto, o Brasil é um dos países com maior biodiversidade do mundo, onde 10% dos 1,4 milhões de organismos

catalogados no mundo encontram-se em território brasileiro, e os vegetais representam aproximadamente 55 mil espécies (GOMES, 2013; SANTOS, 2016).

Historicamente, há relatos de uso de fitoterapia na cultura populares, desde extratos vegetais para envenenar flechas na era Colonial pelos índios. Mais remoto ainda, na execução de presos na Grécia antiga, com exemplo clássico a morte de Sócrates após ingestão de chá à base de cicuta. O conhecimento etnobotânico era desprezado, desconhecido ou ainda ignorado pelos pesquisadores até a década de 70, onde ocorreu o avanço de métodos experimentais de pesquisa de menor custo e tempo, os permitiram ampliar a pesquisa na área de saúde. Em 2010, a ANVISA publicou uma resolução, a nº 14 de 31 de março de 2010, estabelecendo requisitos mínimos para registro e manipulação de fitoterápicos, definindo critérios para utilização de plantas como medicamento fitoterápico (GOMES, 2013).

A busca contínua por melhorias na manipulação e formulação de compostos pela indústria química, onde as moléculas ativas são extraídas das plantas e reproduzidas artificialmente, faz com que a maioria da população substitua progressivamente as plantas in natura pelas drogas, não por ineficiência das primeiras, mas, principalmente, pela maior oferta dos medicamentos sintéticos que, pela comodidade, foram mais aceitos pela população, principalmente dos grandes centros urbanos. Porém, observa-se em discordância com a efetividade do fármaco sintético, a exacerbação de efeitos colaterais, potencializados pelo isolamento do fármaco, efeito muitas vezes amenizado quando se utiliza o extrato botânico onde a miscelânea de compostos químicos favorece a compensação dos efeitos colaterais (CASTELO BRANCO NETO, 2006).

Estudos recentes buscam a investigação de plantas com potencial cicatrizial utilizando ratos como modelo animal, como a associação da romã (*Punica granatum*) com a pitanga (*Eugenia uniflora*), sendo observado resultados positivos quanto ao potencial antisséptico contra bactérias Gram-positivas em microbiota da pele. (BERNARDO et al., 2015). Também há estudo de cicatrização empregando o ipê-felpudo (*Zeyheria tuberculosa*), o qual apresentou potencial antimicrobiano e cicatrizante satisfatórios (SARMENTO et al., 2014) e a erva-de-jaboti (*Piper hayneanum*), com melhor desempenho cicatrizial das feridas infectadas em comparação com os grupos controles (BASTOS, 2011).

2.3.2 Associação fitoterápicos e outros compostos

Considerando que as feridas crônicas não possuem tratamento eficaz e de baixo custo atualmente na rede pública, a proposta de produção de biocurativos se faz de grande valia para atendimento à população em geral, podendo assistir a um maior número de pacientes com menor custo e maior efetividade do que os tratamentos hoje disponíveis no mercado. Buscou-se na literatura alguns artigos relevantes sobre a associação de extratos botânicos com potencial cicatrizante (ABRUCEZE et al., 2014).

Castelo Branco Neto et al. (2006), realizaram a aplicação do extrato hidroalcoólico da aroeira (*Shinus Terebinthifolius*) e concluíram que a aplicação do extrato em concentração de 100mg/ml em comparação com aplicação de solução salina 0,9% proporcionou retardo no processo cicatricial de lesões experimentais em ratos. Já Czepula (2006), realizaram um estudo com extrato de margaridão ou picão-da-praia (*Stryphnodendron adstringens*) buscando avaliar efeito anti-inflamatório em indução de edema de orelha em camundongos e avaliação de redução de edema após aplicação do extrato puro, preparações semi-sólidas em creme, pomada lipofílica, hidrofílica e gel sem o extrato e com a impregnação do extrato botânico e como controle positivo foi utilizado a pomada de dexametasona 0,1%. Observou-se que o extrato proporcionou eficácia anti-inflamatória similar à dexametasona em aplicação de preparações em pomada e superior em extrato puro, porém com baixa estabilidade do extrato para biodisponibilidade.

Em contrapartida, Coelho et al. (2010), realizou um estudo comparativo do efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae*) e de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) em feridas cutâneas de ratos com hipertensão venosa com grupo controle de aplicação de apenas solução salina 0,9%. Observou-se que ambos os tratamentos obtiveram resultados semelhantes no favorecimento do processo de cicatrização de feridas, comparados ao grupo controle. Também Atzingen et al. (2011), utilizaram gel de banana verde (*Musa sapientum*) realizou aplicação de gel a 4% do extrato botânico em feridas cirúrgicas no dorso de ratos, observando melhor cicatrização e retração da ferida, comparado a outras preparações em gel.

Okuma (2013), desenvolveu emulsões com gel à base de óleo de calêndula (*Calendula officinalis*) e avaliou a atividade cicatricial e úlceras cutâneas e ratos. As emulsões foram obtidas com fase gel lamelar, conferindo melhor estabilidade do fitomedicamento comparado ao grupo controle. O extrato puro da calêndula demonstrou baixa citotoxicidade *in vitro*. Já Santos et al. (2014), realizaram a avaliação do efeito cicatrizante do extrato aquoso de urucum (*Bixa orellana*) com 2,5% de norbixina (um carotenóide dicarboxílico hidrofílico presente no pericarpo das sementes do urucuzeiro) em feridas cutâneas em ratos. Não houve alteração significativa no processo cicatricial, porém notou-se relevante efeito pró-inflamatório e indutor de angiogênese na aplicação do extrato em feridas.

Batista et al. (2014), investigaram um creme base incrementado com óleo de pequi (*Caryiocar coriaceum*) a 10% também em feridas realizadas no dorso de ratos e um grupo controle com apenas o creme base. Neste estudo observou-se que o grupo que recebeu o óleo de pequi obteve aceleração na evolução do processo cicatricial, em especial a partir do 14º dia, com achados histológicos de reparação tecidual final (fibroblastos e fibras de colágeno em fase de reepitelização).

Póvoas(2015), realizou um estudo de atividade cicatrizante e antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de ipê-amarelo (*Tabebuia aurea*). Foi utilizado um creme de base inerte acrescido de 5% do extrato e como controle positivo o mesmo creme com dexpanthenol a 5% para avaliação cicatrizante. Observou-se menor rubor perilesional e inflamação no processo inicial da cicatrização em relação aos grupos controle, porém sem significância estatística no processo de cicatrização. Também não foi comprovado sua eficácia antimicrobiana e antifúngica no estudo realizado, mesmo com descrição em literatura de presença de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano.

Vasconcelos (2015), **avaliaram** a atividade antimicrobiana, antioxidante, citotóxica e cicatrizante do sambacaitá (*Hyptis pectinata*) através de extrato etanólico de caule e folhas da planta. O extrato não apresenta citotoxicidade *in vitro*, demonstrou atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro*, porém não apresentou capacidade cicatrizante significativa, quando comparado aos controles positivo e negativo.

Através desta breve revisão de literatura relacionada ao uso de fitoterápicos em cicatrização nota-se uma tendência em associação dos fitoterápicos a formulações

que garantam biodisponibilidade e reduzem efeitos citotóxicos à lesão, comparados a aplicação *in natura* do extrato botânico.

2.3.3 Películas semipermeáveis e fitoterápicos

A utilização de curativos biológicos ou sintéticos tem sido aplicado frequentemente no tratamento de feridas, devido ao fato destes curativos oclusivos possuírem ação antibacteriana, estimularem os processos de granulação, contração e epitelização; promover ao leito da ferida proteção contra o meio externo, assim como garantirem meio úmido ideal à lesão, propriedades estas benéficas à cicatrização. A gama de curativos oclusivos, em especial os filmes, são inúmeras, e conhecer suas propriedades e efeitos frente ao processo cicatricial são de suma importância para os profissionais de saúde (GIRARDI, 2005).

A utilização de filmes biológicos ou sintéticos impregnados com princípios ativos sintéticos ou extratos naturais são de suma importância, podendo associar os benefícios da aplicação de filmes em feridas com as propriedades farmacológicas dos compostos naturais ou sintéticos. A aplicação de biomoléculas em feridas, principalmente extraídas de plantas, apresenta-se como facilitadora dos mecanismos inatos de reparação, promovendo atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. Reduzem também a perda de água e proteínas do leito da ferida, podem inclusive favorecer debridamento autolítico de tecido necrótico e regular a granulação da lesão. Os curativos biológicos em utilização e pesquisas atualmente são substitutos de pele, membranas com fator de crescimento epitelial e tecidos (VYAS; VASCONEZ, 2014).

A associação de extratos naturais com formulações em filmes gelatinosos podem também favorecer a cicatrização de feridas. Inpanya et al. (2012), associaram *Aloe vera* com gel a base de proteína da fibra de seda (*Bombyx mori*) e avaliaram suas propriedades anti-inflamatórias, adesão celular, biocompatibilidade e cicatrização em feridas nos ratos com diabetes induzida por estreptozotocina. Obteve em sua aplicação uma redução do tempo de cicatrização e melhor retração da ferida além de maior proliferação precoce de fibroblastos, mostrando potencial cicatrizante para aplicação no tratamento de lesões.

Kim et al. (2015), avaliaram a influência da aplicação de óxido nítrico em lesões, através da associação de quitosana e s-nitrosoglutationa (GNSO), que seria a doadora de óxido nítrico à película. Em análise de sua atividade antimicrobiana, mostraram sua ação sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, comparado ao filme de quitosana puro. A avaliação *in vivo* de cicatrização em modelo de ferida em ratos mostrou através de estudos histopatológicos favorecimento de re-epitelização e reconstrução das lesões, proporcionando uma nova perspectiva de compostos para tratamento de lesões.

Ainda Kim et al. (2015), avaliaram a eficácia da utilização de filmes a base de quitosana em forma de gel contendo tirotricina em feridas induzidas em ratos. A adição de antimicrobianos em filmes em base de quitosana favorecem a liberação prolongada e controlada no leito das feridas, em especial infectadas, promovendo melhor tratamento de lesões, inclusive favorecidas pela aplicação de películas, as quais promovem diversos favorecimentos à lesão, já descritos anteriormente. Foi realizado experimentalmente lesões abrasivas, incisivas e infectadas em ratos e aplicado a membrana de quitosana com tirotricina. Os resultados demonstraram equidade estatística em aplicação de antimicrobiano em películas e utilização das mesmas sem aditivos; porém com resultados satisfatórios, quando comparado a utilização de coberturas usuais no leito da ferida, comparado ao filme em gel de quitosana.

Em outro estudo, Krausz et al. (2015), prepararam curcumina encapsulado em nanopartículas com poli-l-lisinae testaram seu potencial antimicrobiano *in vitro* e *in vivo* em modelo animal de ferida nos ratos. A curcumina *in natura* tem baixa estabilidade em meio aquoso, porém possui inata capacidade antimicrobiana e cicatrizante. Através de sua formulação em nanocápsulas conferiu melhor estabilidade. A aplicação *in vitro* em meio de cultura com *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou atividade antimicrobiana. Foi observado também favorecimento na proliferação de colágeno, neovascularização e redução do tempo de cicatrização. É importante salientar a necessidade de seu uso cauteloso em lesões oncológicas, pelo potencial proliferativo e de neovascularização no leito da ferida. Estudos anteriores, como o de Li et al. (2012), já haviam apresentado potencial cicatrizante da curcumina em associação com nanoformulação de quitosana.

Annabi et al. (2017), investigaram a formulação de um gel em spray e adesivo elástico a base de hidrogel, buscando propriedades antimicrobianas em feridas. Nota-se que o hidrogel puro tem baixa adesão ao leito da ferida, além de baixo espectro antimicrobiano. Para isto, o autor associou biopolímeros derivados de matriz extracelular (ECM), gelatina de metacrilóleo e tropoelastina humana recombinante substituída com metacrilóleo. Adicionalmente, um peptídeoantimicrobiano foi conjugado ao hidrogel, conferindo atividade antimicrobiana para bactérias gram positivo e negativo. Foi realizado diversas análises de propriedades físicas (porosidade, degradabilidade, evaporação, propriedade adesiva e protetora). Em testes *in vitro* e *in vivo* foi confirmado seu potencial antimicrobiano e facilitador da reparação tecidual das lesões.

Jridi et al. (2017), também buscaram utilizar gelatina de sépia / chocoenriquecido com extrato de hena (*Lawsonia inermis*), planta utilizada comumente como corante artificial laranja a vermelho extraído de suas folhas. Estudos fitobotânicos do extrato das folhas da hena evidenciaram potencial antidiabético, antifúngico, antiviral, antioxidante e anti-inflamatório, despertando interesse na indústria biomédica. A utilização de gelatina derivado da sépia provém um biomaterial de alto poder de incorporação de componentes vegetais ou sintéticos, além de potencial de formar filmes ou géis, conferindo melhor reparo tecidual às lesões do que tratamentos usuais. Em avaliação *in vitro* do extrato em gel e filme, demonstrou atividade antioxidante, transferindo ao leito da ferida melhor efeito cicatrizante. Notou-se também que o filme ou gel de gelatina de sépia, isoladamente, não possui atividade antioxidante e antimicrobiana eficaz, quando comparado à formulação com extrato botânico.

Yadav et al. (2017), avaliaram as propriedades físicas, potencial carreador de fármacos e atividade cicatrizante de filme de goma (carboximetil) de tamarindo em base de PVA (álcool polivinil). Estudos de microscopia evidenciaram formação de uma matriz composta, e a espectroscopia FTIR sugeriu a ocorrência de ligações de hidrogênio entre os componentes do filme. A viscoelasticidade dos compostos foi confirmada em estudos reológicos, visto que ambos já possuem potencial elástico naturalmente. Filmes carregados com ciprofloxacino demonstraram excelente propriedade antibiótica, demonstrando capacidade de carreamento de medicamentos

pela membrana. A avaliação cicatrizante foi realizada por estudo de proliferação de queratinócitos humanos como modelo aceito para pesquisa epidérmica biológica *in vitro*. Os resultados também foram satisfatórios, evidenciando potencial de associação de gomas e mucilagens a polímeros sintéticos para formação de filmes e aplicação em feridas.

Zhao et al. (2017), também realizaram uma pesquisa utilizando um composto em hidrogel de quitosana G polianilina quaternizada (QCSP) e um etilenoglicol-co-poli (sebacato de glicerol) (PEGS-FA) como composto eletroativo. A QCSP foi mantida em uma concentração constante de 3% v/v e a concentração de PEGS-FA foi variada de 0,5 a 3% v/v. Foram realizadas análises reológicas, caracterização físico-química, força de adesão, atividade hemolítica e anticoagulante, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana e análises de efeito cicatricial *in vivo* em feridas em ratos. Os resultados demonstraram excelente atividade antibacteriana, eletroatividade, capacidade de eliminação de radicais livres e propriedades anticoagulantes, corroborando com eficácia no reparo tecidual de lesões e também como agente anticoagulante e propiciando um biomaterial com potencial para utilização em lesões de pele, especialmente incisivas ou cirúrgicas.

Com base nos estudos acima descritos, observamos que um curativo ideal deve atuar como um modelo tridimensional que pode imitar a matriz extracelular, ser biologicamente estável e flexível, podendo remover o exsudado da ferida fornecendo um ambiente úmido para o local da ferida. Deve também formar uma camada protetora para cobrir a ferida de injúrias externas. As coberturas em maior gama de utilização envolvem polímeros naturais ou sintéticos, além de hidrocolóides (BASU; KUMAR; MANJUBALA, 2017).

Os principais polímeros naturais descritos em literatura são colágeno derivado de bovinos, gelatinas extraídas de moluscos marinhos, alginato extraído de algas, quitosana extraída de exoesqueleto de camarão, ácido hialurônico, celulose natural e bacteriana, sericina de seda, entre outros exemplos. Os hidrocolóides mais comum constituem uma composição de carboximetilcelulose com alginato e elastômeros ou adesivos. Como opção tem-se ainda os polímeros sintéticos, tais como o PLGA, um co-polímero de polilactina (PLA) e poliglicólico ácido (PGA) com grande potencial cicatrizante e modulador inflamatório, porém com limitação para controle de umidade

devido discreta hidrofobia, efeito este que impede a entrada e saída adequada de água ao leito da ferida, impedindo um meio úmido ideal para cicatrização.

Em contrapartida, o polietilenoglicol (PEG) já apresenta melhor hidrofília (atração à água / umidade), garantindo melhor controle de umidade, como uma opção para composições de co-polímeros. Descreve-se ainda a utilização de filmes de PVA, poliuretano (PU), policaprolactona (PCL), além da aplicação destas formulações em apresentação de gel, os chamados hidrogéis (BASU; KUMAR; MANJUBALA, 2017).

Em suma, percebe-se que ainda é um desafio a confecção de um curativo ideal, o qual execute funções diversas no processo de cicatrização, desde a ativação de células, homeostase, coordenação das fases de cicatrização e modulação de re-epitelização. Há atualmente uma grande variedade de materiais de curativo disponível para favorecer o processo de cicatrização de feridas, evidenciando que diversos curativos favorecem apenas algumas etapas específicas da cicatrização. Busca-se assim a confecção de um biofilme que seja amplamente disponível, de baixo custo, com potencial cicatrizante em todas as fases do reparo tecidual, justificando portanto os estudos frente a novos biofilmes para a aplicação em lesões cutâneas.

2.4 CANELA GUAICÁ

Explorando o potencial botânico das plantas, dentre as espécies existentes destaca-se a Família das Lauráceas, esta com distribuição tropical e subtropical, com concentração nas florestas úmidas da Ásia e América, incluindo aproximadamente 67 gêneros com mais de 2500 espécies. No Brasil há aproximadamente 25 gêneros e 400 espécies de Lauráceas, considerada uma das mais importantes famílias de composição dos ecossistemas florestais e com potencial econômico. Pode-se citar a *Ocotea porosa*, popularmente conhecida como Imbuia, a *Ocotea odorífera* ou sassafrás, ou ainda o óleo essencial extraído da *Aniba rosaeodora*, o linalol, um excelente fixador de perfume, que agrega um alto valor econômico (CUSTÓDIO; VEIGA JÚNIOR, 2014).

Na Floresta Ombrófila Densa do Paraná podemos encontrar um exemplar das Lauráceas com utilização para fornecimento de madeira própria para caixotaria e fabricação

de papel, como também para utilização em construção civil leve, construção interna, marcenaria, móveis, caixões de carroça e ainda em embalagens em geral. Esta planta dá-se o nome de *Ocotea puberula*, conhecida popularmente como guaicá, canela-guaicá, canela-goaicá, canela-sêbo, canela-parda, canela-de-corvo, canela-pimenta, canela-babosa, louro-abacate, amansa-besta ou ainda aiui-saiiu (BROTTO, 2010).

De acordo com o Sistema de classificação de Cronquist, a taxonomia de *Ocotea puberula* obedece à seguinte hierarquia: Divisão: *Magnoliophyta* (Angiospermae); Classe: *Magnoliopsida* (Dicotyledonae); Ordem: *Magnoliales*; Família: *Lauraceae*; Espécie: *Ocotea puberula* (Nees et Martius) Nees, Syst. Laurin. 472, 1836; Sinonímia botânica: *Strychnodaphne puberula* Nees et Martius (CARVALHO, 2002).

A *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Syst. Laur.: 472. 1836, também identificada como *Laurus puberula* Rich. Actes Soc. Hist. Nat. Paris 1: 108. 1792., é uma árvore de aproximadamente 15 metros de altura, ramos angulosos e glabros. Suas folhas são alternas; com pecíolo de 1–2,5 cm de comprimento, canaliculado e glabro; a lâmina foliar mede aproximadamente 7 a 15 cm de comprimento por 2 a 5 cm largura, ovalada ou estreito-elíptica, cartácea, com ápice acuminado e base cuneada ou obtusa. Nota-se também que sua margem é ondulada, revoluta e de face adaxial glabra. Apresenta ainda reticulação densa, com nervuras planas, face abaxial glabrescente, reticulação densa, nervura primária saliente, secundárias subsalientes, com 8 a 13 pares e ângulo de divergência 30°–65°. O padrão de nervação é broquidódromo e domácias ausentes. As inflorescências são axilares ou subterminais; com panícula de 3 a 11 cm de comprimento, multiflora, alvo-pubérula. As flores são unissexuadas; estaminadas, pedicelo de 3 mm comprimento; hipanto inconspícuo, internamente glabro. Suas tépalas com 2,8 mm comprimento, elípticas, iguais, face abaxial pubérula, face adaxial glabra; filetes com metade do comprimento da antera, glabros. As anteras são ovalado-quadrangulares, ápice obtuso, glabras, locelos introrsos. Nota-se ainda estaminódios ausentes. O fruto mede 1,4 cm de comprimento e 1,1 cm largura, elipsoide com cúpula de 1 cm comprimento por 0,6 cm largura. Apresenta-se infundibuliforme e margem simples (BROTTO, 2010).

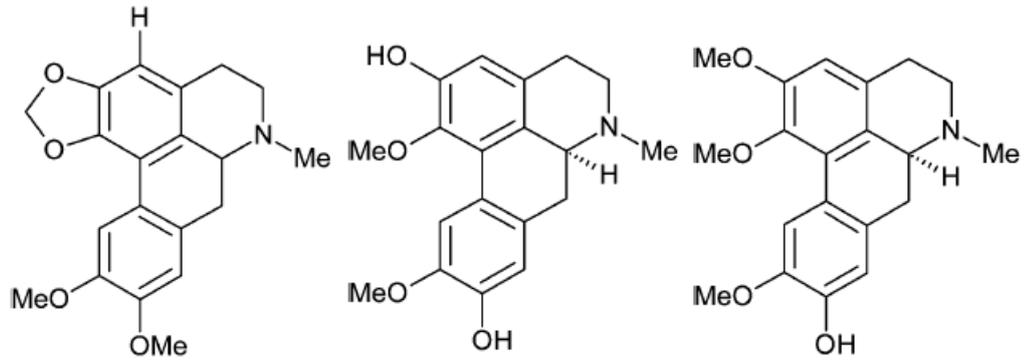
É importante salientar que o gênero *Ocotea* é constituído no mundo, por aproximadamente 300 espécies, das quais, pouco mais de 10% são conhecidas quimicamente, segundo o levantamento bibliográfico realizado. As espécies do gênero *Ocotea* são conhecidas por acumularem como metabólitos secundários, como alcalóides com esqueletos benzilisoquinolínico ou bisbenzilisoquinolínico, oxo-aporfínico, aporfínico e pró-aporfínico (ARAUJO, 2000).

Observa-se ainda que a canela-guaicá floresce de abril a julho e frutifica de agosto a novembro. Seu habitat ocorre desde a Guiana Francesa, Guiana, Peru, Colômbia, México e Brasil, nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. No Paraná, a espécie é amplamente distribuída e facilmente encontrada. Apresenta acentuada regeneração em florestas secundárias em estágio inicial de sucessão. Em material vivo, a coloração da flor varia de creme a esverdeada e o fruto maduro tem cúpula vermelha. A madeira apresenta odor suave. Entre as espécies com flores unissexuadas, é a única com folha de base fortemente revoluta.

Vernengo e Mitteilungen (1963), identificaram e analisaram a estrutura de um alcalóide presente na casca da canela-guaicá, a ocoteína. Diversos outros estudos foram realizados visando a caracterização destes alcalóides comumente encontrados no gênero *Ocotea*. Zanin e Lordello (2007), realizaram um estudo de identificação dos mesmos nas plantas do gênero. Demonstraram a presença de 39 alcalóides aporfínicos, sendo os mais comuns encontrados foram o predicentrina, o dicentrina, o isocoridina, o ocoteína, o ocopodina, dentre outros. Na *Ocotea puberula* foram encontrados os seguintes alcalóides: predicentrina, dicentrina, N-metillaurotetanina, Isodomeesticina, N-óxido dicentrina, ocoteína, leucoxina, talicminina, deidroocoteína, dideidroocoteína e 3-hidroxicentrina.

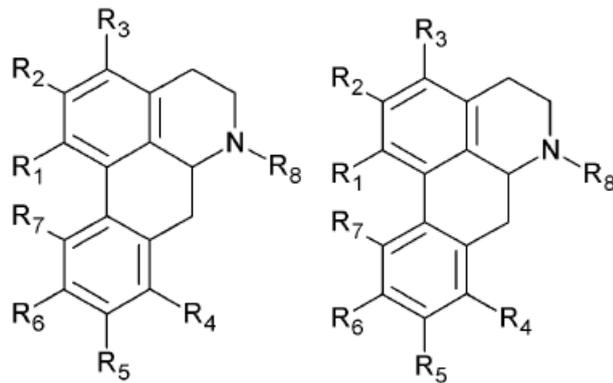
Em outro estudo mais recente, Custódio e Veiga Júnior (2014), enumeraram os principais alcalóides presentes na Família das Lauráceas. Dentre as espécies, foram descritos como metabólitos da *Ocotea puberula* a dicentrina, N-metillaurotetanina, predicentrina, leucoxina, ocoteína, talicminina, isodomeesticina, N-óxido-dicentrina, deidroocoteína, dideidroocoteína e 3-hidroxicentrina. Outros estudos com o extrato das folhas de indivíduos jovens de *Ocotea puberula* demonstram concentrações maiores de dicentrina, boldina, leucoxina e isodomeesticina, quando comparado às folhas de indivíduos adultos. Demonstra-se abaixo a composição química de alguns dos principais alcalóides presentes na canela-guaicá (CUSTÓDIO; VEIGA JÚNIOR, 2014).

Figura 3 -Principais alcalóides presentes na canela-guaicá



Dicentrina

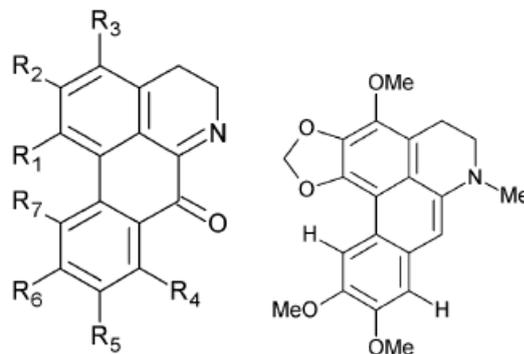
Boldina N-metillaurotetanina



$R_1=R_5=R_6=OCH_3$; $R_2=OH$; $R_3=R_4=R_7=H$; $R_8=CH_3$ $R_1+R_2=R_6=OCH_2O$; $R_3=R_5=R_6=OCH_3$; $R_4=R_7=H$; $R_8=CH_3$

Predicentrina

Ocoteina



$R_1+R_2=R_6=OCH_2O$; $R_3=R_5=R_6=OCH_3$; $R_4=R_7=H$

Talicminima Dehidroocoteína

Há ainda relatos de utilização da guaicá para alimentação animal, porém sem trabalhos robustos que comprovem seu potencial alimentar, além da presença de teores consideráveis de taninos (6 a 9%), conferindo provavelmente característica não palatável aos animais. Observa-se que da casca interna da canela-guaicá exsuda-se uma goma ou resina pegajosa. Fato importante foi a descrição através de um estudo etnobotânico com os índios de várias etnias do Paraná e de Santa Catarina, os quais relataram que utilizam a parte interna do caule da canela-guaicá (quanto mais velha melhor) e a casca do caule, no tratamento de furúnculo. A seiva da casca serviu ainda como um emplastro para auxiliar na remoção de espinhos ou estrepes da pele; e o chá das folhas também foi utilizado no combate às diarreias e disenterias (CARVALHO, 2002).

2.4.1 Estudos sobre *Ocotea puberula*

Vernengo e Mitteilungen (1963), elucidaram a caracterização e identificação da Ocoteína presente na casca da *Ocotea puberula*. Estudo similar foi realizado por Baralle et al. (1972), quando realizaram um extrato metanólico da casca da canela guaicá e através de técnicas de caracterização (espectroscopia e ressonância) identificaram outros dois compostos, a dehidroocoteína e a di-dehidroocoteína. Neste mesmo ano, Baralle e seus colaboradores, também publicaram a identificação da talimicminine, com técnicas similares de caracterização.

Avaliando o potencial botânico da planta, foram realizados estudos também de caracterização da espécie. Devido ao desmatamento crescente em diversas regiões do Paraná, a população da canela-babosa vem reduzindo drasticamente, porém nota-se uma capacidade alta de reflorestamento e utilização ampla na atividade econômica, já descrito anteriormente. Para isto, conhecer a morfoanatomia das flores se faz crucial para permitir um manejo de reflorestamento ideal, e ainda promover o conhecimento do sistema reprodutor deste gênero, notadamente raros no campo de pesquisa no Paraná. Um aspecto importante observado foi que esta espécie pode desenvolver frutos sem polinização, promovendo à planta versatilidade por conseguir se reproduzir de maneira assexuada (apomixia e vegetativa) e sexuada, sendo que a pressão seletiva do ambiente define o equilíbrio entre as alternativas de reprodução (SOUZA; MOSCHETA, 1999).

Em outro estudo, ao avaliar a composição fitoquímica das folhas da guaicá, observou-se como principal metabólito secundário os alcalóides. Ao realizar o extrato etanólico das folhas e analisar através diversos processos cromatográficos, foi isolado oito alcaloides aporfínicos, que foram ocoteína, dicentrina, predicenirina, N-metil-laurotetanina, isodomesticina, leucoxina, 3-hidroxi-dicentrina e N-óxido dicentrina. Ao avaliar a composição do óleo volátil das folhas e galhos, foi obtido por arraste de vapor três monoterpenos e dez sesquiterpenos, tais como o tujeno, pineno, mirceno, elemeno, isoledeno, entre outros. Percebe-se, portanto, sua variabilidade de compostos secundários, com possibilidade terapêutica em diversas aplicações, mas ainda sem estudos mais elaborados que comprovem sua eficácia fitoterápica (ARAUJO, 2000).

A morfoanatomia da casca da canela-sebo foi descrito por Farago et al. (2004), sendo evidenciado um súber relativamente espesso, formado por cerca de 25 camadas de células tabulares. Sequencialmente, foram visualizados o felogênio e a feloderme. No córtex da *Ocotea puberula* são evidenciadas células parenquimáticas de paredes delgadas, conteúdo amiloplastos. Apresenta também células pétreas com paredes de espessamento irregular. Formam-se ainda pequenos agrupamentos de fibras, e distribuição de células com conteúdo lipofílico, células mucilaginosas e células contendo compostos fenólicos na região cortical. Esta composição de células contendo óleo essencial e mucilagem são comuns na família das Lauráceas (FARAGO et al., 2004).

Estudos sobre estrutura populacional e disseminação em áreas de florestas ou de reflorestamento também foram realizados. Caldato, Vera e Donagh (2002), observaram a estrutura populacional da canela-guaicá em bosques do nordeste de Misiones em Argentina. A *Ocotea puberula* demonstrou-se como uma planta com número abundante de espécimes em fase de regeneração natural em bosques secundários e isoladamente em bosques primários, confirmando assim seu potencial de dispersão de exemplares e reflorestamento.

Em 2011, Zanin et al. (2011), avaliaram a quantificação de alcalóides aporfínicos em mudas de *Ocotea puberula* e sua concentração nas diferentes porções da árvore adulta. Observou-se um maior rendimento de extração de alcalóides em folhas, seguido decrescente dos galhos, caule e raízes. Notou-se também

semelhança nas mudas durante 12 meses e com as plantas adultas. Observa-se, portanto, o potencial de uso racional e sustentável da planta para extração de metabólitos secundários sem necessidade de extirpação da planta.

O potencial fitoterápico da canela-guaicá foi comprovado com a avaliação do efeito antinocepcivo (reduz a transmissão de estímulos que causem dor) da dicentrina extraídas através de clorofórmio dos frutos da *Ocotea puberula*. Ao injetar uma solução de 0,92% de formaldeído em musculatura abdominal dos ratos, estes produzem contração muscular relacionado a dor. Ao administrar dicentrina em fração clorofórmica, notou-se efeito antinocepcivo, com comparação similar a efeito analgésico de morfina ou aspirina (controles positivos). Neste mesmo estudo foi administrado a dicentrina na mesma concentração (30-300mg/kg) e após administração de naloxona para testar se o composto possui efeito opióide. Como resultados, concentrações de 300mg/kg de dicentrina promove efeito antinocepcivo similar a morfina por uma via ainda a ser estudada, não sendo nem via adenosinérgica ou por sistema opiáceo (MONTRUCCHIO et al., 2012).

Estes mesmos autores, em outra pesquisa “in vivo” com modelos de dor inflamatória aguda e crônica em ratos, observaram que ao administrar dicentrina em lesões plantares nas patas dos ratos, a S - (+) - Dicentrina um importante efeito antinocicepcivo em condições inflamatórias, reduzindo aa nocicepção espontânea e atenuando avhipersensibilidade mecânica e fria associada a estas condições. Este efeito parece ser devido a uma interação de S - (+) - dicentrina com canais TRPA1, embora o exato mecanismo desta interação ainda não é claro. Percebe-se portando que estes dados adicionam informações sobre propriedades antinocicepcivas de S - (+) - dicentrina e também indica que sua potencialidade no desenvolvimento de novos medicamentos clinicamente relevantes para a gestão da dor persistente, especialmente sob condições inflamatórias (MONTRUCCHIO, 2013).

Sendo assim, avaliando apenas um dos metabólitos secundários da *Ocotea puberula*, mostra potencial medicinal importante. Elucidar seus metabólitos e sua aplicação para os agravos em saúde em geral deve ser uma busca constante no meio científico. Observa-se também um potencial de reflorestamento e regeneração, capacidade de reprodução alternadamente sexuada ou assexuada e ampla oferta nas formações florestais secundárias, em especial na região dos Campos Gerais e na

Região Sul. Esta busca de ampliar capacidade fitoterápica e inovar no tratamento de um dos agravos mais comuns no meio hospitalar: as lesões de pele; foram um dos motivos da investigação do presente trabalho.

3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

A prevalência das feridas crônicas, como as úlceras de pressão, varia de 3% a 14% em ambientes hospitalares. O impacto econômico sobre os gastos públicos com a saúde é menor quando o tratamento é realizado em caráter preventivo e resolutivo, sem necessitar de reinternações. Observando a prevalência destas lesões, especialmente na Unidade de Terapia Intensiva, justifica-se a busca por alternativas terapêuticas que propiciem menor tempo de tratamento, redução de custos e, principalmente, qualidade de vida ao paciente hospitalizado (GOGIA, 2003). Para utilização de medicamentos fitoterápicos, são necessários estudos que comprovem a eficácia, sem causar danos à saúde do paciente (REZENDE; COCCO, 2002; ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005).

O uso de fitoterápicos tópicos, como o extrato hidroalcoólico da *Ocotea puberula* (EHOP) aplicados em feridas adquiridas no hospital requer uma pesquisa experimental “in vivo” prévia, avaliando sua eficácia. Sendo este fitoterápico inovador apto para uso em feridas, sua utilização favorecerá a melhoria do conforto e prevenção de complicações relacionadas à cronificação destas lesões, visto que o enfermo é submetido a outras diversas intervenções, e a ferida é adquirida como um ônus a mais no quesito dor, infecção e possíveis complicações.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

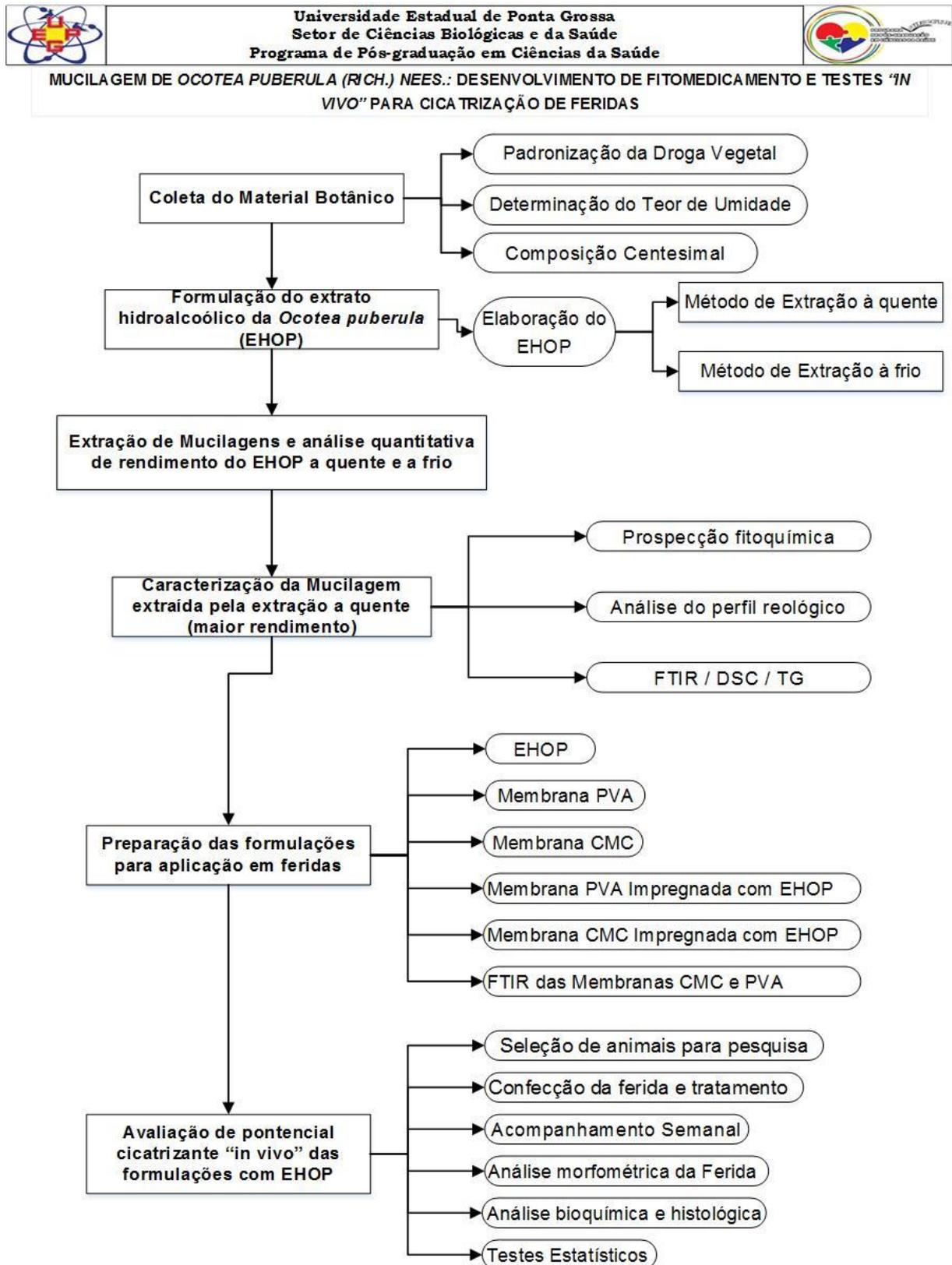
- Desenvolver um fitomedicamento para cicatrização de feridas contendo mucilagem de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar as cascas de *Ocotea puberula*;
- Promover a extração à quente e a frio das mucilagens de *Ocotea puberula*;
- Quantificar o teor de mucilagens no extrato hidroalcoólico obtido através da extração a quente e a frio;
- Avaliar o rendimento do extrato de mucilagem da *Ocotea puberula* nas diferentes técnicas de extração (quente e frio);
- Realizar a análise de prospecção fitoquímica do EHOP;
- Caracterizar por FTIR, DTG e TG do EHOP;
- Avaliar reologicamente o EHOP (viscosidade simples e complexa);
- Desenvolver uma formulação fitoterápica contendo o EHOP, em diferentes formulações farmacêuticas (membrana PVA e membrana CMC);
- Investigar a estrutura e interações das membranas e do EHOP por FTIR das membranas de CMC e PVA pura e impregnadas com EHOP;
- Avaliar o efeito cicatrizante *in vivo* do EHOP e das diferentes formulações (membrana PVA e membrana CMC) em modelo de ferida em ratos.

5 DESENHO EXPERIMENTAL

Figura 4 – Desenho experimental



Fonte: O autor, Jun. 2017

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

A coleta do material botânico foi realizada no Campus da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), localizado próximo às coordenadas 25°05'39'' de latitude S e 50°06'05'' de longitude W, no perímetro urbano do Município de Ponta Grossa, Estado do Paraná. As cascas foram coletadas na Primavera, em outubro de 2016 no período da manhã. A árvore ilustrada abaixo foi a amostra padrão da árvore e esta já caracterizada previamente em outros estudos, sendo tombado exsicata no Herbário da UEPG sob o número 19107 em 08/10/2012. Tomaram-se amostras da casca de cinco indivíduos adultos, com diâmetro entre 70 - 90cm, da circunferência da altura do peito (CAP). Foi extraída 1/3 do total do perímetro do caule de largura da casca e com altura de aproximadamente 3 vezes a largura da coleta de casca (FILIZOLA, 2015).

Figura 5 - Fotos de um espécime adulto de canela guaicá



Fonte: O autor, Out. 2016

Também foi realizado a coleta das cascas acima de 1,3m da altura do solo, menos exposta ao eventual contato com fogo das pastagens ao redor da planta e às infestações de pragas e doenças. Em seguida, realizou-se a retirada de epífitos (líquens) e o súber através de raspagem mecânica. A coleta foi realizada com acompanhamento de um especialista em identificação da planta *Ocotea puberula*, o Prof. Dr Paulo Vitor Farago da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), o qual as identificou no momento da coleta através de características botânicas peculiares à planta.

As cascas extraídas foram fracionadas em pequenas amostras de 2x2cm e acondicionadas em material absorvente e deixados para secar em temperatura ambiente, e local protegido de insetos e exposição ao sol. Previamente a secagem foi realizado a pesagem das cascas para comparação com peso final pós secagem. A cada 24 horas foi realizado a troca da superfície absorvente a fim de reduzir a umidade e o risco de formação de fungos. Ao final de duas semanas as amostras secas foram acondicionadas em recipientes plásticos protegidos de luz e livres de umidade (com agente absorvente de umidade sílica gel). Algumas amostras da casca fracionada foram acometidas por fungos, sendo as mesmas descartadas através de inspeção visual e retirada das mesmas das amostras botânicas (FILIZOLA, 2015).

Figura 6 Fotos das cascas da *Ocotea puberula* coletadas e fracionadas para secagem



Fonte: O autor, Out.2016

6.2 FORMULAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *OCOTEA PUBERULA* (EHOP)

6.2.1 Padronização da Droga Vegetal

As cascas secas foram submetidas ao processo de cominuição por meio de um moinho de facas tipo Willey com peneira em malha mesh 32 de crivo circular. Durante a trituração, foi utilizado no equipamento malha para tamisação com gramatura 50 (500 μm) para se obter uma granulometria correspondente à classificação de pó moderadamente grosso (BRASIL, 2010).

6.2.2 Determinação da Composição Centesimal

Observa-se que informações sobre a composição centesimal de fitoterápicos ainda são escassos e, muitas vezes, estes são utilizados pela população de modo empírico, sem nenhuma identificação dos constituintes que possam estar envolvidos na eficácia terapêutica (ROCHA, F. J.; PIMENTEL, R. R.; MACHADO, S. R, 2011).

Convencionou-se chamar “Composição Centesimal” a proporção em que aparecem alguns constituintes em 100g do produto, As análises realizadas foram as seguintes: Umidade, Cinzas, Proteínas, Fibra bruta, Gorduras totais, Carboidratos, Valor calórico. As técnicas de determinação dos dados acima foram seguidas pelas normativas vigentes no Laboratório do Departamento de Engenharia de Alimentos. Foi encaminhado aproximadamente 50g de pó bruto da casca da *Ocotea puberula* para as análises neste Departamento.

6.2.3 Elaboração do extrato aquoso de *O. puberula* (Rich) Nees

6.2.3.1 Método de Extração à quente

As cascas secas pulverizadas e tamisadas foram colocados em um béquer com água destilada, A proporção de massa por volume de água da casca da planta teve que ser ajustada até proporção de 1:40 (m/v), diferente da recomendação de proporção 1:1 (m/m) (NIEHUES et al., 2015). Tal ajuste fez-se necessário devido a formação de um colóide denso e espesso, impossibilitando a manipulação do extrato para seguimento experimental. Portanto 20g do pó foram adicionados a 800ml de água destilada. Procedeu-se agitação mecânica em agitador marca DIST, modelo DI-14MP, por 60 minutos a 300 rpm à temperatura aproximada de 60 °C, e mantida constante por chapa de aquecimento marca TECNAL, modelo TE-085.

Figura 7 - Extração da mucilagem da *O. puberula* a quente.



Fonte: O autor, Nov. 2016

Segundo a literatura, um aumento do tempo de extração pode induzir a mudanças na estrutura dos polissacarídeos e como consequência, diminuir o rendimento da extração. O uso de temperaturas mais elevadas, em torno de 80 a 90°C, pode diminuir o rendimento da extração pelo aumento da hidrólise dos polissacarídeos (CAO, 2013).

Após resfriamento até temperatura ambiente, o material sólido foi retido em peneira doméstica. A mistura líquida posteriormente foi centrifugada em centrífuga

SIGMA, modelo 2K15, por 15 minutos a 3600 rpm em temperatura ambiente. Duas frações foram obtidas: solúvel e insolúvel. A fração solúvel foi novamente centrifugada a 15000 rpm sob refrigeração a 8°C por 10 minutos em centrífuga SIGMA, modelo 2K15, para separação das partes sólidas ainda presentes. Todo resíduo sólido foi desprezado, sendo reservado a fração solúvel para precipitação da mucilagem por extração hidroalcoólica.

A formação da mucilagem foi realizada com etanol 95% P.A. na proporção de três volumes de etanol para cada volume de amostra (3:1 v/v). Após a adição de etanol, a solução ficou sob refrigeração por 24 horas. Após isto, formou-se um sobrenadante superficial branco e denso, o qual foi separado do resto da amostra e armazenado em frascos com tampa e sob refrigeração, obtendo um produto de coloração esbranquiçado. Este método de precipitação da fração solúvel com etanol para obtenção de mucilagem é recomentado por ser um método rápido, barato e atóxico quando comparado ao método de precipitação com acetona (ITURRIAGA , L.; SÁNCHEZ, S.; CORVALÁN, M, 2007).

Figura 8 - Extração hidroalcoólica da mucilagem da *O. puberula*

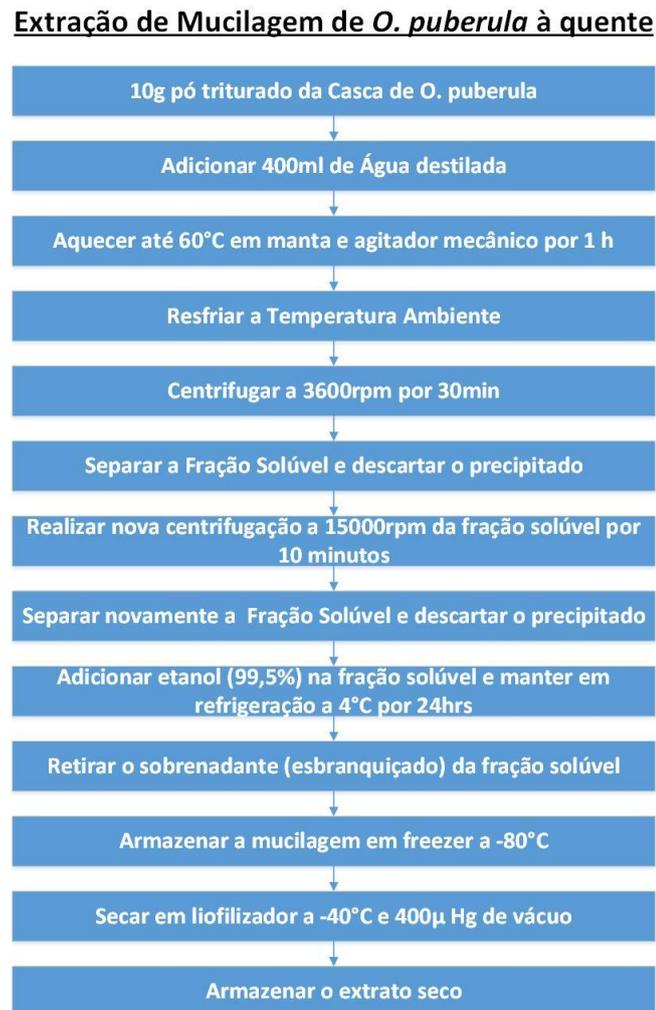


Fonte: o autor, Nov. 2016

O sobrenadante foi subsequentemente armazenado em um freezer a -80 °C, e depois secado durante 4 dias em um liofilizador a -40° C e 400 µHg de vácuo. Após essa etapa, a mucilagem foi macerada em almofariz de porcelana e armazenada em

embalagem de vidro a temperatura ambiente e em um dessecador para realização de análises posteriores. As demais frações da extração hidroalcoólicas foram desprezadas seguindo boas práticas em descarte de resíduos. Esta etapa também está descrita resumidamente no fluxograma abaixo.

Figura 9 - Fluxogramada Extração da mucilagem da *O. puberula* a quente.



Fonte: o autor, Nov. 2016

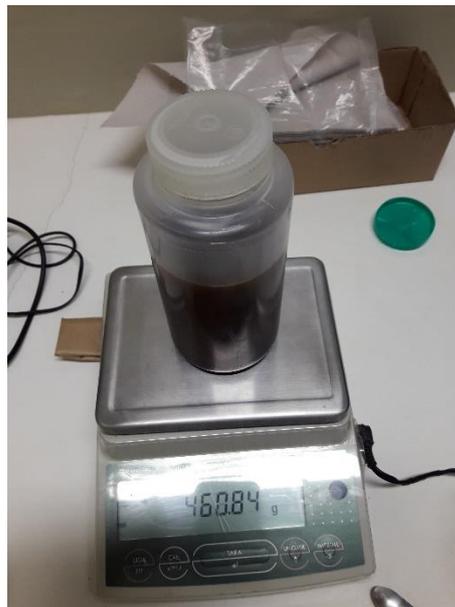
6.2.3.2 Método de Extração à frio

As cascas secas pulverizadas e tamisadas foram colocados em um béquer com água destilada, A proporção de massa por volume de água da casca da planta teve que ser ajustada até proporção de 1:40 (m/v), diferente da recomendação de proporção 1:1 (m/m) (NIEHUES et al., 2015). Tal ajuste fez-se necessário devido a

formação de um colóide denso e espesso sem possibilidade de manipulação do mesmo para seguimento experimental. Portanto 20g do pó foram adicionados a 800ml de água destilada. O material foi conduzido à maceração dinâmica em mesa agitadora orbital MA140/CF à temperatura ambiente (25°C), durante 7 dias. Transcorrido esse período, o material sólido foi retido em peneira doméstica.

Após esta etapa, a mistura líquida foi centrifugada em centrífuga SIGMA, modelo 2K15, por 15 minutos a 3600 rpm em temperatura ambiente. Duas frações foram obtidas: solúvel e insolúvel. A fração solúvel foi novamente centrifugada a 15000 rpm sob refrigeração a 8°C por 10 minutos em centrífuga HIMAC HITACHI, modelo CR21GI, para separação das partes sólidas ainda presentes. Todo resíduo sólido foi desprezado, sendo reservado a fração solúvel para posterior precipitação da mucilagem por extração hidroalcoólica. Abaixo demonstrado a pesagem das amostras para centrifugação.

Figura 10 - Pesagem da casca em pó hidratada da *O. puberula* para centrifugação.

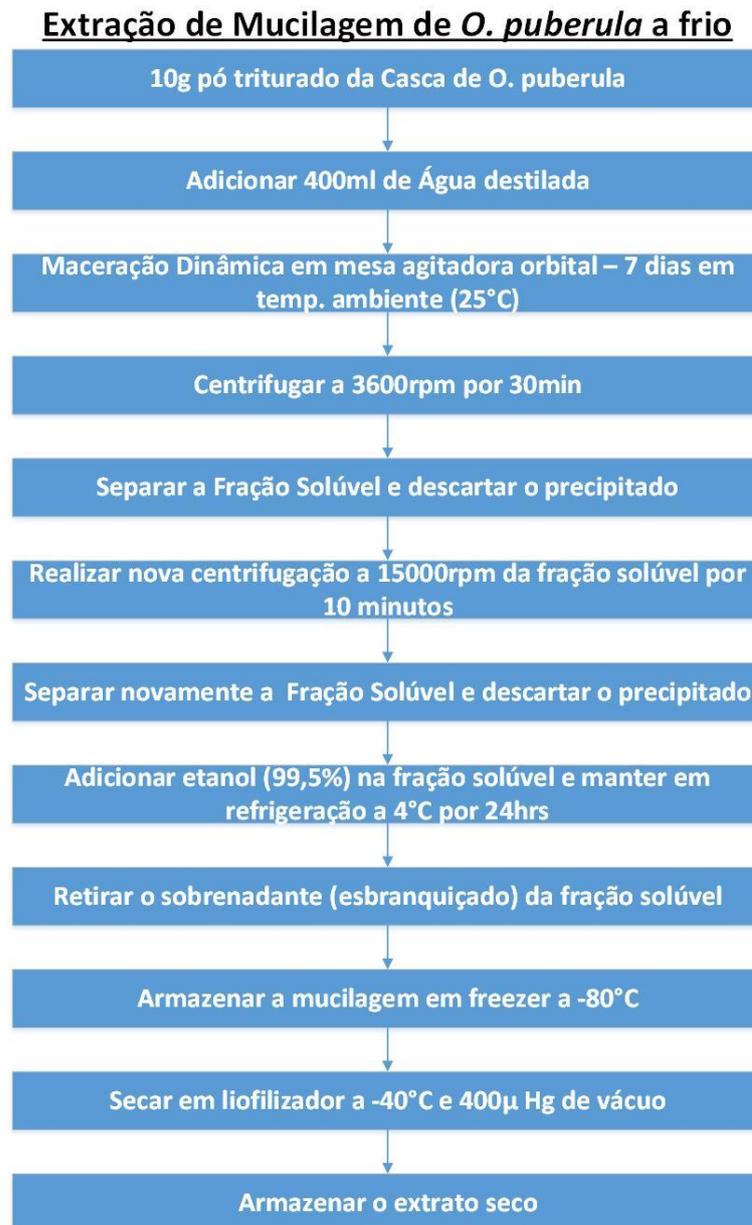


Fonte: O autor, Fev. 2017

A formação da mucilagem pela extração hidroalcoólica foi realizada da mesma maneira que se realizou a extração de mucilagem descrito anteriormente. O sobrenadante foi subseqüentemente armazenado também em um freezer a -80 °C, e depois secado durante 4 dias em um liofilizador a -40° C e 400 µHg de vácuo. Após

essa etapa, a mucilagem foi macerada em almofariz de porcelana e armazenada em embalagem de vidro a temperatura ambiente e em um dessecador para realização de análises posteriores. As demais frações da extração hidroalcoólicas foram desprezadas seguindo boas práticas em descarte de resíduos (ITURRIAGA, L.; SÁNCHEZ, S.; CORVALÁN, M, 2007). O método de extração a frio também está representado através de fluxograma abaixo.

Figura 11 - Fluxograma de extração da mucilagem da *O. puberula* a frio



Fonte: o autor, Nov. 2016

6.2.3 Caracterização das Mucilagens

6.2.3.1 Análise de rendimento de extração da mucilagem

Após obtenção das frações de mucilagem liofilizadas pelo método de extração a quente e a frio, as mesmas foram pesadas e o rendimento calculado. Os compostos foram avaliados em sua composição química isoladamente (composto A e B). Todas as análises foram efetuadas em triplicata.

A avaliação do extrato a quente e a frio e o rendimento da extração permitiu avaliar qual dos dois métodos é mais eficaz no quesito rendimento e pureza da extração, garantindo assim um metabólito fitoterápico de qualidade e com maior eficácia na sua extração da casca. Os métodos de avaliação foram DSC e FTIR para teor de pureza (descritos posteriormente) e o peso do extrato seco total para quantificar rendimento das extrações.

6.2.3.2 Análise da prospecção fitoquímica do EHOP

A prospecção fitoquímica é um método qualitativo utilizado para identificar os compostos bioativos nas espécies vegetais, sendo esta realizada segundo MOREIRA (1979), modificada por Nakashima (1993), onde foi preparado o extrato hidroalcoólico da casca da *Ocotea puberula* pela técnica de extração de mucilagem a quente, sendo investigado os seguintes grupos químicos: extrato hidroalcoólico: glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, glicosídeos antraquinônicos, cumarinas e aminogrupos;

As reações realizadas para a caracterização dos metabólitos secundários foram as seguintes:

1. Teste da cianidrina ou Shinoda e oxalo-bórica para a detecção de flavonóides;
2. Reação de Bornträeger para a pesquisa de antraquinonas;
3. Reação de Liebermann-Burchard para a detecção de esteróides e triterpenos;
4. Reações gerais, utilizando os reativos de Dragendorff (iodo-bismutato de potássio), Mayer (iodo-mercurato de potássio), Wagner (iodo-iodeto de potássio) e Bertrand (ácido sílico-túngstico), para a pesquisa de alcalóides;

5. reação de ninhidrina para detectar a presença de aminogrupos;
6. reação com papel micro-sódico para a pesquisa de glicosídeos cianogénicos;

A identificação de classes de constituintes químicos presentes no EHOP foi realizada segundo a metodologia de quantificação dos constituintes presentes na literatura. O extrato liofilizado a quente, que foi o composto de maior rendimento e pureza, foi conduzido a análise de quantificação de compostos químicos, entre eles açúcares totais e flavonóides. Todas as análises quantitativas foram realizadas através de curva de absorbância e medida em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu Multispec 1501.

Os açúcares totais foram determinados pelo método fenol-ácido sulfúrico, onde o ácido sulfúrico desidrata as pentoses e hexoses convertendo-os em furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, os quais reagem com o fenol formando um complexo de coloração alaranjada. O complexo formado com pentoses absorve maior intensidade na região de 480nm e com hexoses na região de 490nm. Neste estudo foi utilizando como padrão solução de D(+) glicose anidra MERCK (C₆H₁₂O₆) nas concentrações de 10-50 µg/mL. Nestas concentrações, foi adicionado 0,5ml de Fenol a 5%, seguido de repouso por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foi acrescido 2,5ml do H₂SO₄ concentrado. A leitura foi realizada em 490nm do espectrofotômetro e anotado a absorbância em cada concentração padrão de glicose.

A quantificação de açúcar total realizou-se com o auxílio de uma curva padrão de glicose com as concentrações já descritas acima. Através da curva padrão e a equação de reta apresentada, com R² acima de 0,95, foi efetuada a avaliação do extrato botânico com concentração do mesmo no qual sua leitura no espectrofotômetro esteja dentro dos limites da curva padrão. A concentração de açúcares totais foi fornecida através do cálculo pela equação da reta.

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão de referência. O reagente de Folin Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. A leitura foi realizada a 740 nm em espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV 1240V. (MINUSSI et al., 2003)

Uma alíquota de 0,5 mL de amostra diluída foi transferida para um tubo com tampa de rosca e lhe foram adicionados 2,5 mL do reagente Folin Ciocalteu (Sigma Aldrich Chemical Co.) diluídos em água destilada 1:10. Esses reagentes ficaram em repouso de 3 a 8 min e a eles foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio a 4%. Os tubos foram deixados em repouso por 2 h ao abrigo da luz e, na sequência, feita a leitura da absorbância a 740 nm. Um reagente branco foi conduzido nas mesmas condições. Foi construída uma curva analítica contendo 100, 80, 60, 40, 20, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido gálico e os resultados expressos em $\text{mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$ de mucilagem. GAE: equivalente em ácido gálico (KROYER; HEGEDUS, 2001; SINGLETON; JOSEPH; ROSSI, 1965).

6.2.3.3 Análises reológicas

O perfil reológico das amostras foi determinado em reômetro híbrido Discovery DR2 TA-Instrumentals, acoplado a um controlador de temperatura Peltier (TC81) utilizando os sensores placa-placa (PP 40 Ti). Previamente às análises reológicas, foi determinada a inércia (calibração do equipamento) para descontar os valores das forças centrífugas e centrípetas geradas durante os experimentos. O extrato hidroalcoólico da *Ocotea puberula* foi mantido refrigerado até o momento da análise. Os extratos foram realizados em tempo inferior a 15 dias previamente a análise de perfil reológico.

Figura 12 - Testes de viscosidade complexa em reômetro com EHOP



Fonte: o autor, Nov. 2017

As análises foram realizadas em triplicata. Foi utilizado um disco plano de 40mm e base em Peltier com temperatura constante de 36,5°C (similar a temperatura da pele humana). Foi aplicado aproximadamente 20mL do extrato hidroalcoólico da mucilagem da *Ocotea puberula* e realizado testes de viscosidade linear e viscosidade complexa (módulo de perda e de armazenamento). A tensão de cisalhamento e taxa de deformação permitem avaliar a característica e comportamento do fluido frente a forças externas, similares a aplicadas na aplicação em superfícies em geral, como a pele.

Para analisar este comportamento, foi ajustado o reômetro para temperatura constante de 36,5°C (similar a temperatura da pele humana), com tempo de imersão de 30 segundos, tensão de 0,5, varredura logarítmica com frequência angular de 0,1 a 100 rad/seg e 5 pontos por década. Os resultados foram representados graficamente através de módulo de armazenamento G' e módulo de perda G'' de acordo com a frequência angular. A avaliação de deformação e armazenamento de materiais é de grande valia para conhecer o comportamento do material frente a qualquer força de deformação (fricção, pressão, rotação, entre outros).

Ao realizar uma força de deformação, o material apresenta uma resposta frente a esta força de deformação. A resposta também é medida graficamente. A diferença gráfica entre a deformação e a resposta gera um ângulo de fase ou defasagem (δ). Este ângulo associado à representação gráfica do extrato permite definir se o material tem uma capacidade de absorver “stress” mecânico com maior ou menor resistência para deformação. No caso da formação de filmes para aplicação em películas, a busca por extratos botânicos com estas características contribui para a qualidade e durabilidade da cobertura para pele.

6.2.3.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy – FTIR)

As amostras liofilizadas de mucilagem de *Ocotea puberula* em extração a quente e frio foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de cada amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2%, m/m), no equipamento IR Prestige 21

(SHIMADZU, Quito, Japão), na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 32 scan.min⁻¹. Os espectros obtidos foram avaliados frente aos espectros do extrato puro e liofilizado (no método de extração a quente e a frio) e da formulação branco referente.

Posteriormente foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho as membranas de CMC e PVA puras e também as membranas de CMC e PVA com a mucilagem em EHOP, buscando comparar os espectros de cada membrana e investigando possíveis interações ou alterações estruturais nos componentes das membranas associadas ao EHOP.

6.2.3.5 Derivada da Termogravimetria (Derived from Thermogravimetry– DTG) e Termogravimetria (Thermogravimetry – TG)

As amostras liofilizadas de mucilagem de *Ocotea puberula* em extração a quente e frio foram pesadas igualmente e acondicionadas em cadinho de alumina. O instrumento STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos) foi calibrado usando índio (In; P.F.= 156,6°C; ΔH fusão = 28,54 J.g⁻¹) como padrão. As amostras (5 mg extrato puro e liofilizado da mucilagem pelo método de extração a quente e a frio) foram aquecidas a uma taxa constante de 10 °C.min⁻¹, de 20 a 400 °C, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) constante.

A análise termogravimétrica foi realizada no mesmo equipamento, STA 6000 (PERKIN ELMER, Waltham, MA, Estados Unidos), utilizando cadinho de alumina, onde as amostras (5 mg extrato puro e liofilizado da mucilagem pelo método de extração a quente e a frio) foram aquecidas a uma taxa constante de 10 °C.min⁻¹, de 20 a 600 °C, sob fluxo de nitrogênio (50 mL.min⁻¹) constante.

6.3 FORMULAÇÕES PARA USO TÓPICO

As formulações utilizadas neste experimento foram manipuladas no Laboratório de Farmacotécnica da UEPG. O EHOP puro foi acondicionado em embalagens livres de contato com meio externo e luz (aluminizada) e aplicadas em formas de discos padronizados com mesmo peso de composto (10g). Foi também preparado uma

membrana de CMC a 2% e CMC 2% com 10% EHOP, assim como PVA 10% e PVA 10% com 10% EHOP.

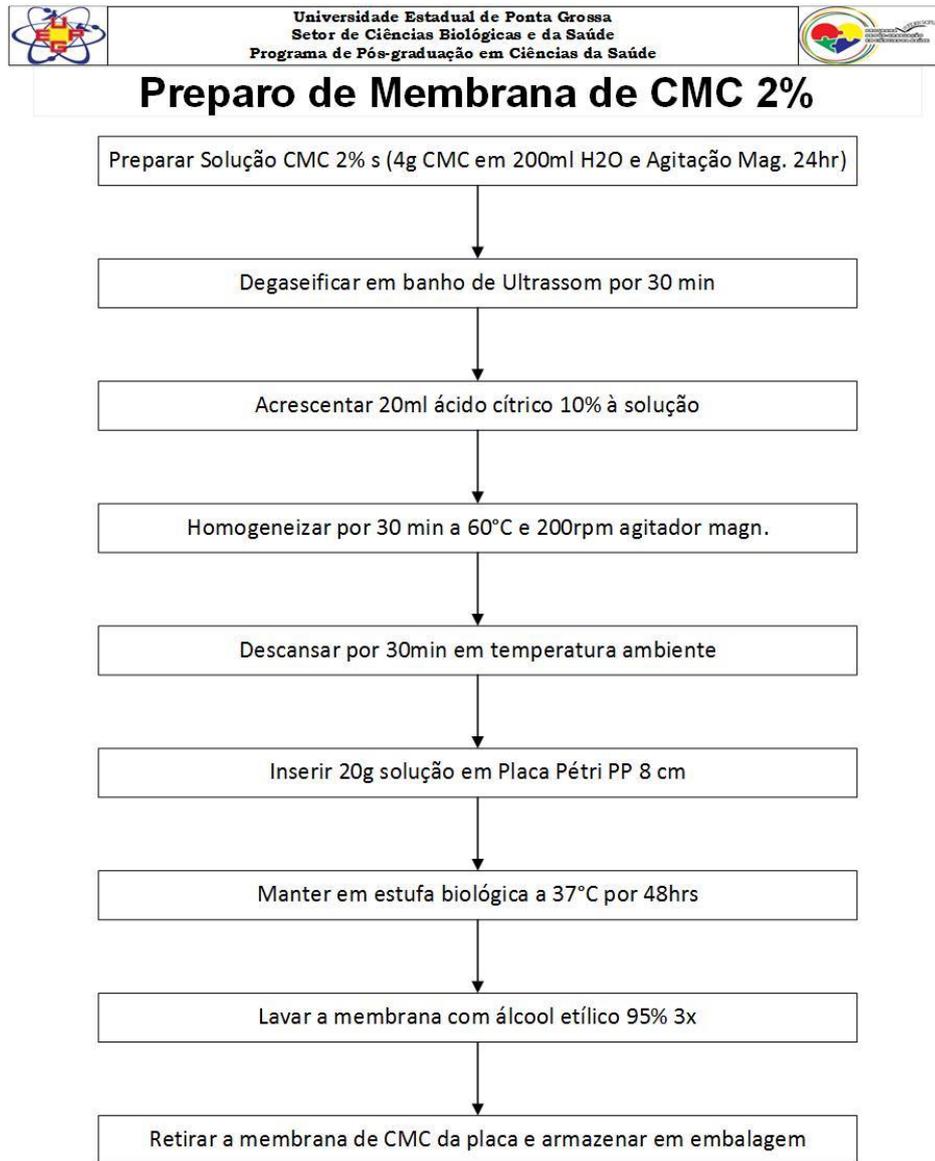
Como justificativa de uso do curativo “*MegisorbAg^R*” para grupo Controle Positivo, descreve-se que este é formado por uma espuma de alginato fibras celulósicas, as quais possuem capacidade de absorção em feridas com altos níveis de exsudação. Contém ainda prata iônica para fornecer liberação prolongada de prata por até 4 dias, promovendo um efeito antimicrobiano rápido e sustentado. Destina-se a feridas cirúrgicas e traumatológicas, bem como úlceras de perna, úlceras de pressão e úlceras diabéticas normalmente exsudativas (SARHEED et al., 2016).

6.3.1 Filme de CMC puro (A1) e CMC com EHOP (A2)

Em meio a tantos produtos obtidos pela modificação da celulose, a carboximetilcelulose (CMC) destaca-se pelo seu potencial emulsificante e na variedade de aplicações. É um sal de éter de celulose, hidrossolúvel e obtido através da reação de celulose com ácido monocloroacético na presença de hidróxido de sódio em etanol/água. Na formação de filmes de CMC, foi utilizado 4g de CMC em um béquer com 200ml água. Esta mistura permaneceu em agitação magnética por 24hrs. Após esta etapa, a mistura de CMC em água foi degaseificada em banho de ultrassom na cuba de Ultrassom Cristofoli 220V por 30 minutos.

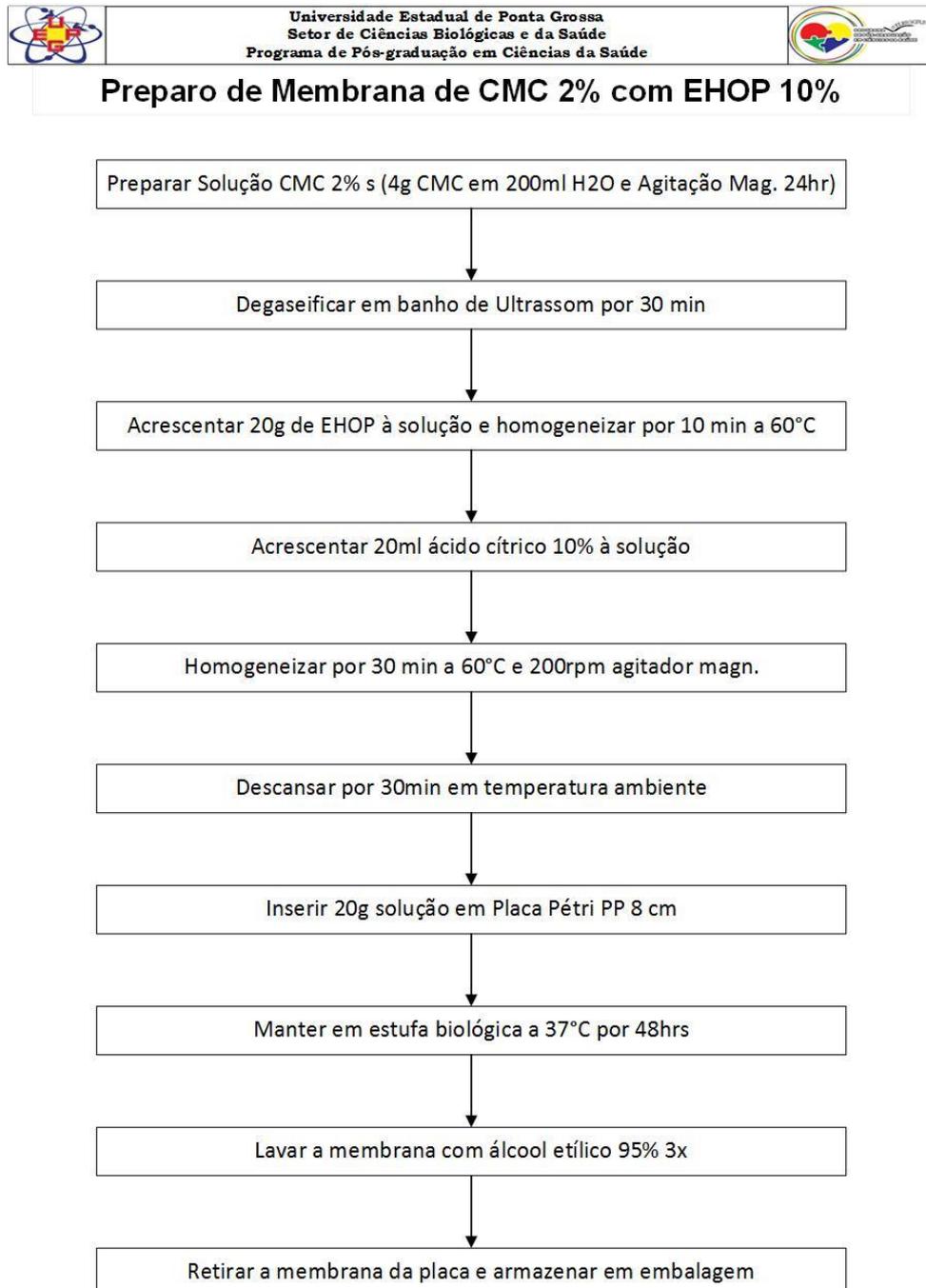
Posteriormente foi acrescido 20 ml de uma solução reticuladora, que foi o ácido cítrico a 10%. Após a adição, a solução foi novamente homogeneizada em agitação magnética a 60°C em 200rpm por 5 minutos. Em sequência, a mesma permaneceu descansando em temperatura ambiente por 30 minutos. Para formação de filmes de CMC foi adicionado 20g da solução em placas de pétri PP 8cm. Permaneceram em estufa biológica a 37°C por 48 horas. Após a secagem, a membrana foi lavada com álcool etílico a 95% 3 vezes, extraindo assim o reticulador residual da placa. Foi retirado as membranas da placa de pétri e as mesmas foram armazenadas em embalagem livre de contato com luz e ambiente externo.

Figura 13 - Fluxograma de preparo de membrana de CMC 2%



Fonte: O autor, Out. 2016

Para o preparo da membrana de CMC 2% com 10% de EHOP foi seguido os mesmos passos experimentais da membrana pura de CMC a 2%, acrescentando na etapa pré reticulação a mistura de 20g do EHOP na solução e agitação magnética a 60°C por 10 minutos, conforme fluxograma abaixo.

Figura 14 - Fluxograma de preparo de membrana de CMC 2% com EHOP 10%

Fonte: O autor, Out. 2016

6.3.2 Filme de PVA puro (B1) e PVA com EHOP (B2)

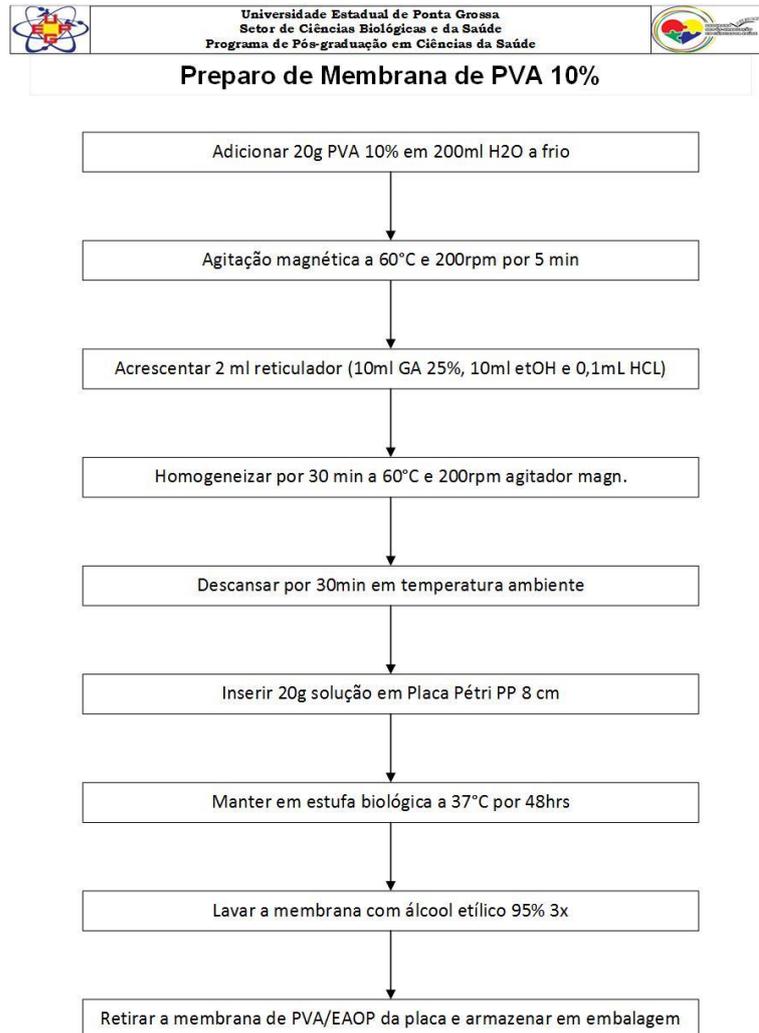
O Poli (álcool vinílico) ou PVA é um polímero transparente de fórmula química $(C_2H_4O)_n$, com densidade que pode variar de 1,19 a 1,31 g/cm³, ponto de fusão de aproximadamente 200°C e ebulição 228°C. Possui uma estrutura simples e seu

monômero é o álcool vinílico. O álcool vinílico possui uma hidroxila e não é estável em forma de monômero. O PVA não é tóxico e possui boa biodegradabilidade. O PVA é produzido por polimerização do acetato de vinila com poli (acetato de vinila) (PVAc) seguido da hidrólise de PVAc em PVA (ANDRADE; FERRARI, 2014).

O PVA pode ser aplicado em diversas funções, tais como adesivos, papéis filmes usados para textos, revestimentos de papéis plásticos, empacotamento, plásticos biodegradáveis para produtos de higiene, barreira para dióxido de carbono em garrafas PET, agente aderente de outros polímeros, película para fotografias, lágrimas artificiais na indústria de entretenimento, lubrificante de lentes de contato, reforço de concreto, estrutura de apoio em impressão 3D entre outros, mas em especial como membrana para aplicação em feridas (ANDRADE; FERRARI, 2014).

Na formação de filmes de PVA, foi utilizado 20g de PVA em um béquer com 200mL água. Esta mistura permaneceu em agitação magnética a 60°C por 10 minutos para homogeneização. Após esta etapa, a mistura de PVA em água foi degaseificada em banho de ultrassom na cuba de Ultrassom Cristofoli 220V por 30 minutos (YADAV et al., 2017).

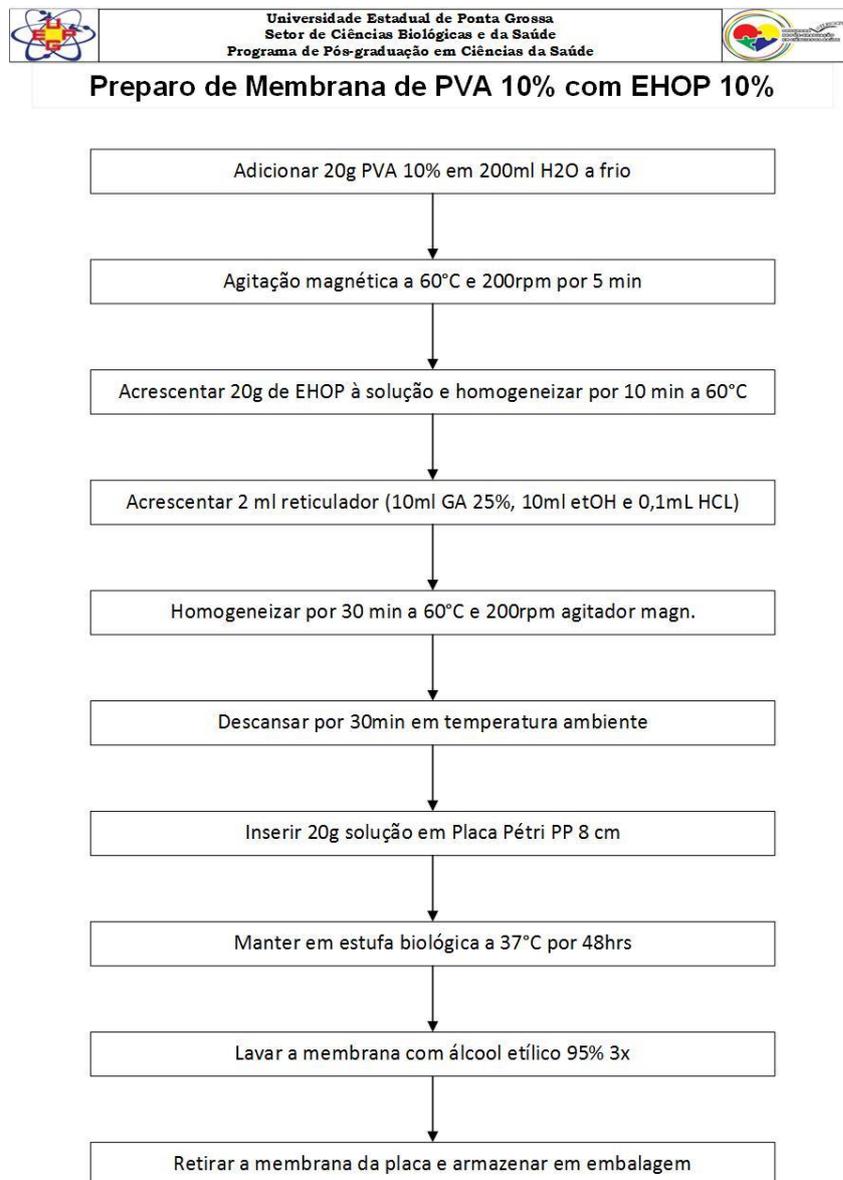
Posteriormente foi acrescido 2 ml de uma solução reticuladora, que foi a mistura de 10ml de Glutaraldeído a 25%, 10ml álcool etílico 95% e 0,1mL ácido clorídrico. Após a adição, a solução foi novamente homogeneizada em agitação magnética a 60°C em 200rpm por 5 minutos. Em sequência, a mesma permaneceu descansando em temperatura ambiente por 30 minutos. Para formação de filmes de PVA foi adicionado 20g da solução em placas de pétri PP 8cm. Permaneceram em estufa biológica a 37°C por 48 horas. Após a secagem, a membrana foi lavada com álcool etílico a 95% 3 vezes, extraindo assim o reticulador residual da placa. Foi retirado as membranas da placa de pétri e as mesmas foram armazenadas em embalagem livre de contato com luz e ambiente externo (YADAV et al., 2017). Segue abaixo desenho experimental da formação da membrana de PVA.

Figura 15 - Fluxograma de preparo de membrana de PVA 10%

Fonte: O autor, Out. 2016

Para o preparo da membrana de PVA 10% com 10% de EHOP foi seguido os mesmos passos experimentais da membrana pura de PVA a 10%, acrescentando na etapa pré reticulação a mistura de 20g do EHOP na solução e agitação magnética a 60°C por 10 minutos, conforme fluxograma abaixo.

Figura 16 - Fluxograma de preparo de membrana de PVA 10% com EHOP 10%



6.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE

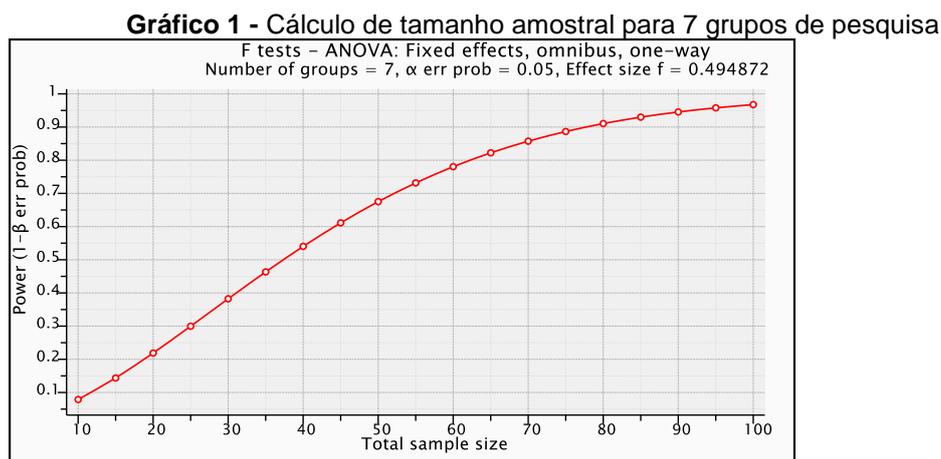
6.4.1 Aspectos Éticos

Para realização da experimentação “in vivo”, um projeto foi encaminhado para Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ponta Grossa (CEUA/UEPG) e aprovado sob o nº do processo 016/2016 (Anexo I). Os protocolos

foram conduzidos respeitando-se os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

6.4.2 Cálculo Amostral de animais para Pesquisa

O número da amostra foi calculado com base nos trabalhos de Castelo Branco Neto et al. (2006) e Caetano et al. (2012). Sendo adotado um nível de significância de $\alpha=0,05$, para 7 grupos de 12 animais cada. Os cálculos foram realizados com base na média e desvio padrão, estabelecendo um poder de teste em 95%, usando o programa GPower 3.1.9.2. Foram acrescentados 30% do total obtido garantindo a viabilidade dos grupos mesmo com perda de animais no desenvolvimento da pesquisa. Sendo assim, totalizou-se uma amostra de 105 ratos (15 ratos para cada grupo de pesquisa).



Fonte: O autor. Set. 2016

6.4.3 Seleção de animais para pesquisa

Foram utilizados 105 *Ratus norvegicus albinus* da linhagem Wistar, machos, com aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 290g a 380g, fornecidos pelo Biotério da UEPG e transferidos para o Laboratório para Técnica Operatória - LTO. Estes animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, com identificação numérica do animal e grupo a que pertencerá; forradas com maravalha, ruídos mínimos, ciclo

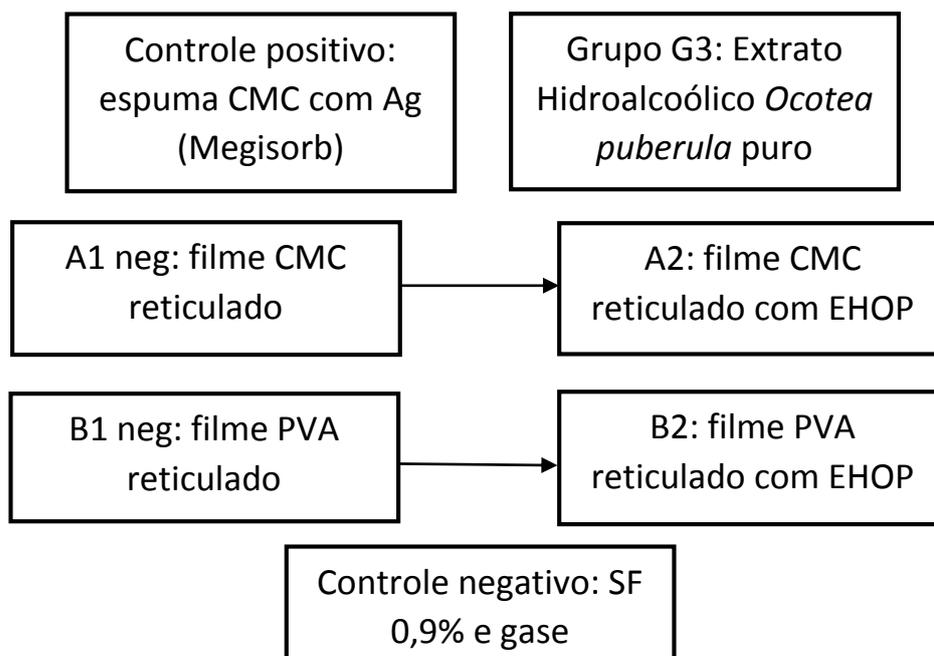
claro-escuro de 12 horas, temperatura de $21 \pm 2^\circ \text{C}$, sistemas de ventilação adequados, ração própria para a espécie e livre acesso à água.

Os animais foram separados de seu grupo de convivência, sendo acondicionado um animal por gaiola e mantidos em observação por 14 dias antes do bioensaio. O isolamento dos animais é necessário para que no decorrer da experimentação não haja a retirada dos curativos pelos outros animais do grupo. O período pré-experimentação de 14 dias terá intuito de permitir a ambientação (adaptação) dos animais à separação do grupo de convivência, além de verificar condições clínicas, realizar a avaliação do peso e temperatura e identificação de variáveis que possam influenciar no experimento.

Os ratos foram pesados e separados pelo método probabilístico de escolhas aleatórias em 7 grupos com 15 animais cada, identificados a partir da terapêutica: grupo 1 controle positivo (CP) – espuma de alginato com prata (Megisorb); grupo 2 controle negativo (CN) – SF,9%; grupo 3 EHOP puro, grupo 4 A1 película de CMC sem EHOP; grupo 5 A2 película de CMC com EHOP; grupo 6 B1 película de PVA sem EHOP e grupo 7 Película de PVA com EHOP.

Figura 17 - Fluxograma ilustrativo dos grupos de pesquisa em ratos (7 grupos)

Grupos de Pesquisa com ratos



Fonte: O autor, Set. 2016

6.4.4 Confeção da ferida e tratamento das lesões

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram previamente pesados e o peso utilizados para o cálculo da anestesia. A anestesia foi realizada por via intraperitoneal (i.p), em concentração 40 mg/kg de quetamina a 10% e 10 mg/kg de xilazina a 2%. Alcançada a profundidade anestésica necessária, realizou-se depilação dos pelos do dorso do animal, no local da confecção da lesão. Com tesoura e bisturi foi confeccionada uma lesão excisiva dorsal única (2cm x 2cm) até o nível do tecido aponeurótico e em seguida, as lesões foram limpas com soro fisiológico (SF) a 0,9%, aplicado o tratamento tópico (exceto no controle negativo) e cobertas com gaze e ataduras, com técnica asséptica (SARMENTO et al., 2014).

Durante o tratamento foi dispensado em cada ferida amostras da membrana de Megisorb, CMC e PVA no tamanho de 4x4cm de amostra, garantindo que a quantidade das formulações utilizadas seja igual para todos os animais. Todas as lesões foram protegidas com gases estéreis e realizado curativo com esparadrapo, mantendo-o por 7 dias para avaliação da interação tratamento x lesão nos primeiros 7 dias de lesão (fase exsudativa).

6.4.5 Coleta de Material para estudo

Nos dias D7, D14 e D21 de pós-operatório (DPO), seguiu-se a verificação do peso corporal dos grupos e realizado média simples para avaliação de peso médio dos ratos e percentual de perda ou ganho de peso pós lesão. Foi realizada retirada do curativo de todos os grupos após 7 dias de lesão e fotografia de todas as lesões para acompanhamento da evolução (estas fotos realizadas sem flash, sem zoom e com resolução padrão de 5 Mega pixels e Tamanho 4:3). Na realização das imagens, foi utilizado um aparato de metal onde a câmera foi fixada numa base de metal distante cm perpendicularmente à área das lesões e realizado fotos com régua milimétrica para calibração do aplicativo ImageJ na mensuração da área de ferida.

Foram eutanasiados cinco animais por grupo e tempo de seguimento. A mensuração da área de cada ferida foi realizada nos dias 7, 14 e 21 através de programas computacionais de avaliação de retração de ferida e a área de cada lesão

foi determinada através da digitalização das imagens obtidas com os desenhos e avaliadas utilizando o programa ImageJ 1.44.

Posteriormente foram coletadas amostras das lesões/ cicatrizes para estudos histológicos (n=5 amostras por tempo e por grupo) dos animais nos dias 7, 14 e 21 dias. A pele dorsal ao redor das úlceras foi extraída cirurgicamente por profissionais habilitados na manipulação animal e técnica operatória adequada. Estas amostras foram acondicionadas em cassetes histológicos e fixados em solução de formaldeído 10% por 24 horas, e posteriormente conservados em álcool 70%.

A coleta de amostra de sangue para avaliação bioquímica foi realizada através de punção cardíaca, sendo acondicionados em tubos falcon com gel separador, centrifugados e armazenados posteriormente em freezer a -4°C

6.4.6 Avaliação do Índice de cicatrização das lesões

As áreas das lesões foram calculadas a partir das fotografias de cada grupo e seus dias de seguimento de tratamento, utilizando o software ImageJ 1.44. A área inicial representou a superfície da lesão no dia do procedimento cirúrgico e a área final correspondeu à área da lesão no dia da eutanásia. Seguidamente, foi calculado o Índice de Cicatrização das Lesões (ICF) para analisar o percentual de reepitelização, sendo que este foi representado pelo quociente entre a diferença das Áreas Inicial (A_i) e Área Final (A_f) e a Área Inicial (A_i) [$ICF=(A_i-A_f)/A_i$] e expresso na fórmula abaixo:

$$ICF = \frac{A_i - A_f}{A_i} \cdot 100$$

Adotou-se que valores maiores que zero representam diminuição da área ulcerada e valores menores que zero representam aumento da área e valores iguais a 1 representam reepitelização completa.

6.4.7 Estudo Histológico (histomorfometria)

Nos dias D7, D14 e D22 ocorreram a eutanásia dos animais. A cada eutanásia sacrificou-se 5 animais por grupo para retirada da ferida e coleta de sangue. Os animais submeteram-se a anestesia com 4 vezes a dose utilizada para o procedimento cirúrgico de confecção das feridas (eutanásia). Alcançada a profundidade anestésica, foi retirado entre 2 a 5 mL de sangue por punção cardíaca. Sendo confirmada a parada cardiorrespiratória dos animais, a ferida foi retirada (obtendo-se um fragmento de formato elipsóide abrangendo também a área perilesional).

O sangue foi acondicionado em tubos de falcons com gel devidamente identificados, posteriormente centrifugados para a separação do plasma dos elementos figurados do sangue. O objetivo é realizar avaliação bioquímica para avaliar os seguintes testes séricos: Transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), uréia e creatinina.

O fragmento de tecido obtido (ferida), além de fragmento de fígado e de rim esquerdo de todos animais foram acondicionados em frascos com formol, e substituídos por álcool etílico após 24 horas de submersão ao formol. Posteriormente, foram enviados os fragmentos de ferida ao Laboratório de Patologia Médica, situado na cidade de Ponta Grossa - PR, sob supervisão técnica do Prof. Dr Mário Rodrigues Montemór Netto, para preparo das lâminas histológicas, sendo que todo o processo do preparo das lâminas foi realizado neste laboratório seguindo técnicas e padronizações habituais deste estabelecimento.

6.4.8 Análise microscópica das feridas

A análise das lâminas foi realizada no Laboratório de Histologia do Programa de Especialização de Odontologia por um profissional que desconhecia a metodologia do trabalho, e as lâminas foram identificadas por codificação que o examinador desconhecia a qual grupo de animais pertencia as lâminas.

Todos esses cuidados visaram evitar a possibilidade de viés ao estudo pelo examinador das lâminas. Foi utilizada a coloração com hematoxilina e eosina de Harris para avaliação da resposta inflamatória quanto à inflamação e angiogênese e para avaliação da colagênese (formação de fibras de colágeno) foi utilizada a coloração de Tricômio de Masson.

Para resposta inflamatória, angiogênese e colagênese foram atribuídos escores baseados na literatura, sendo estes: para ausência (0), para presença (1), intensamente infiltrado (2), severamente infiltrado (3), conforme ilustrado na tabela abaixo.

Tabela 1 - Escores utilizados para avaliação histológica das lesões

Variáveis	Ausente	Presente	Moderado	Intenso
Inflamação	0	+1	+2	+3
Angiogênese	0	+1	+2	+3
Colagênese	0	+1	+2	+3

Fonte: SARMENTO, et. al. Avaliação do extrato da *Zeyheria tuberculosa* na perspectiva de um produto para cicatrização de feridas. **Revista Latino-Americano em Enfermagem**, v. 22, n. 1, p. 165-172, jan./fev. 2014.

Dos escores obtidos através da análise histológica das fotomicrografias das lâminas, foi obtido uma média de escore e seu desvio padrão correspondente, para posterior avaliação dos tratamentos com coberturas para as lesões realizadas.

6.4.9 Testes Estatísticos

Todos os resultados estatísticos foram obtidos pelo programa GraphPad Prism 5® e as variáveis numéricas avaliadas pelo teste One-way ANOVA (análise de variância). Para os resultados do teste de cicatrização e provas bioquímicas foi utilizado o pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ($M \pm E.P.M$).

7 RESULTADOSE DISCUSSÃO

Neste capítulo foram apresentados e discutidos os resultados obtidos no decorrer deste trabalho referentes ao processo de formulação das membranas de CMC e PVA impregnadas com o EHOP desde a coleta botânica até a confecção da membrana, além de caracterização da mucilagem e das membranas impregnadas com o extrato botânico. Além disso, a atividade cicatrizante dos grupos experimentais em modelo de ferida em ratos foi analisada através de análises morfoanatômicas das

feridas, análise histológica da lesão e quantificação bioquímica de constituintes sanguíneos buscando avaliação de nefro e hepatotoxicidade.

7.1 EXTRAÇÃO DA CASCAS DA *OCOTEA PUBERULA*

A etapa inicial da extração das cascas da *Ocotea puberula* é crucial para o desenvolvimento de toda pesquisa. A identificação da planta foi realizada pelo Prof. Dr Paulo Vitor Farago como exsicata disponível já depositada previamente no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (ANEXO II).

Através da busca das plantas observou-se uma alta disponibilidade por toda região dos Campos Gerais, fato este que somente no local da pesquisa (Campus da Universidade Estadual de Ponta Grossa), foi possível identificar mais de 15 exemplares da espécie em fase adulta e outros exemplares em mudas ou formas jovens, sendo uma espécie amplamente distribuída no Paraná e facilmente encontrada em florestas secundárias. (BROTTO, 2010).

O peso bruto extraído de cascas coletadas foi de 8.300g e desta amostra inicial aproximadamente 900g foram descartadas por presença visual de fungos, representando 10% do total da amostra coletada. A presença de fungos em cascas *in natura* sem tratamento antifúngico prévio é esperado em espécies de crescimento rápido, como é o caso da *Ocotea puberula*, sendo também observada presença dos fungos no súber da canela-guaicá quando realizado a coleta da mesma (PAES, 2002).

Portanto, totalizou-se 7400g de amostra *in natura* e o peso final das cascas após secagem foi de 5700g de amostra seca. Dados estes demonstram a grande quantidade de umidade presente nas cascas e a capacidade da mesma de armazenar umidade. A fração de umidade presente na casca foi de 23% aproximadamente. É importante salientar que as amostras não foram avaliadas por teor de massa seca, apenas a diferença de peso entre a amostra *in natura* após coleta e a mesma amostra após duas semanas de secagem a temperatura ambiente. Comparando o teor de umidade no extrato em pó da casca de 11%, observamos uma alta capacidade de reter umidade, fato este justificado por ser realizado a coleta da camada superficial do caule da planta, responsável pelo fluxo de floema, e este potencial de armazenar em

suas micelas a água garante resistência da planta em condições de estiagem (FILIZOLA, 2015).

O processo de moagem e tamização foi realizado em um moinho de facas com limpeza e garantia de pureza do extrato em pó. Observado também a deposição de resina com alta capacidade de adesão ao equipamento durante o processo de moagem, fato este justificado pelo potencial de retenção de umidade, o qual formou um emplastro que aderiu aos compostos de inox do equipamento, sendo também observado fácil limpeza com água aquecida ou álcool 70%, fato esperado pela composição padrão de mucilagens de compostos polissacarídeos e baixo teor de proteínas (ROCHA; PIMENTEL; MACHADO, 2011).

7.2 EXTRAÇÃO DA MUCILAGEM DA CASCA DA *OCOTEA PUBERULA*

Com o pó da casca da *Ocotea puberula* disponível, foi realizada a etapa de extração da mucilagem, através da extração hidroalcoólica, conforme descrito por Niehues et al. (2015). Porém, na titulação padrão descrita no método deste autor a dissolução do pó da casca para formar um composto líquido não foi possível, devido formação de um gel denso e sem possibilidade de manipulação do mesmo. Observado esta característica, realizou-se uma rediluição visando formar um composto líquido que pudesse ser manipulado e transferido a outros recipientes.

As titulações de diluições subseqüentes realizadas foram em peso de pó da casca da *Ocotea puberula* e volume de água para diluição (p:v). Os testes foram realizados em ajuste progressivo de titulação 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 até 1:40. A titulação mínima de diluição da casca que permitiu formar um líquido denso foi uma fração de peso da casca em pó para 40 frações de volume de água destilada. Abaixo exemplificado a formação de líquido denso em diluição 1:40 p/v da casca da *Ocotea puberula*.

Figura 18 - Líquido denso obtido pela mistura de água e casca em pó na proporção 1:40 (p:v)



Fonte: O autor, Nov. 2016

Posteriormente optou-se por realizar a extração através de duas técnicas distintas: a primeira foi com o aquecimento do líquido por uma hora a 60°C com agitador mecânico e a segunda foi com a agitação dinâmica por 7 dias em temperatura ambiente (25°C). Obtendo as mucilagens, as mesmas foram trituradas e separadas após liofilização em frascos para posterior análises laboratoriais (DSC, TG e FTIR) e determinação do rendimento de extração de mucilagem.

Avaliando o rendimento de extração de mucilagem, o extrato a frio teve peso inicial de 80g de casca em pó da *Ocotea puberula*. Desta massa inicial, após a diluição, agitação, centrifugação, separação dos resíduos e extração hidroalcoólica, o EHOP foi liofilizado, obtendo um peso final em uma balança analítica de 4 casas decimais (Celtac FA2104N 220V) de aproximadamente 0,9048g de pó liofilizado da mucilagem.

Calculando o rendimento, o percentual de extrato seco em pó de mucilagem foi de 1,131%. Já na técnica de extração da mucilagem a quente, o peso inicial também foi de 80g de casca em pó da *Ocotea puberula*. Desta massa inicial, após a diluição, agitação, centrifugação, separação dos resíduos e extração hidroalcoólica, o EHOP foi liofilizado, obtendo um peso final de aproximadamente 1,0744g de pó liofilizado da

mucilagem. Calculando o rendimento, o percentual de extrato seco em pó de mucilagem foi de 1,343%. Os dados estão expressos na tabela abaixo.

TABELA 2 - Rendimento da extração por técnicas quente e frio de extração de mucilagem da *Ocotea puberula*

80g de pó da casca	Peso final (liofilizado)	Rendimento
Extração a Quente	1,0744g	1,343%
Extração a Frio	0,9048g	1,131%

Fonte: O autor. Dez. 2016

Estudos similares de rendimento de mucilagens em geral, como o de Tavares et al. (2011), avaliou o extrato de mucilagem do inhame *Dioscorea trifida* (um tubérculo), com rendimento final de 6,85% de mucilagem em comparação com o tubérculo bruto. Já Campos et al. (2015), realizou avaliação de extração de mucilagem de sementes de chia *Salvia hispânica* através de extrato aquoso, obteve rendimento de aproximadamente 4,95%. QUEIROZ et. al em 2013 avaliaram a composição química da palma forrageira (*Opuntia ficus indica*), e observou um baixo rendimento de extração de mucilagem, aproximadamente 1,68%, estes dados similares ao rendimento da *Ocotea puberula*.

7.3 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA CASCA DA OCOTEA PUBERULA

Em análise química de diversos vegetais, é de suma importância a determinação de sua composição centesimal, com a finalidade de fornecer informações sobre a composição química do extrato e seu potencial de utilização para a avaliação nutricional e controle da qualidade, além de desenvolvimento de novos produtos conforme os constituintes presentes nestes extratos (LIMA, 2008).

A Composição Centesimal do pó seco da casca da *Ocotea puberula* demonstra a proporção em que aparecem alguns constituintes em 100g do produto. Os resultados foram descritos na tabela abaixo.

Tabela 3 - Composição centesimal do pó bruto da casca da *Ocotea puberula*

Determinações	Valor
Umidade (%)	11,65
Cinzas (%)	4,05
Proteínas (%)	5,63
Fibra bruta (%)	17,65
Gorduras totais (%)	1,07
Carboidratos (%)	59,95
Valor calórico (Kcal)	271,95

Fonte: Setor de Ciências Agrárias e Tecnologia - Departamento de Engenharia de Alimento. Relatório de Análise 608/17 UEPG Ponta Grossa-PR Novembro 2017

Nesta análise, foi observado ainda um alto teor de umidade, confirmando o potencial de retenção de umidade. Apresenta um teor considerável de fibra bruta, alto teor de carboidratos, garantindo assim um valor calórico considerável 271,95kcal/100g da casca. O teor baixo de proteínas também exprime as características das esperadas das cascas de árvores da *Ocotea puberula*.

Segundo Farago et al. (2004), o córtex de *O. puberula* é formado por células parenquimáticas, apresentando também grupos de células pétreas associados a pequenos agrupamentos de fibras. Nota-se ainda células com conteúdo lipofílico, células mucilaginosas e células contendo compostos fenólicos distribuem-se na região cortical.

Sendo assim, a composição centesimal de um fragmento vegetal (como o caule) exprime de forma grosseira o valor nutritivo desta amostra da planta. Podemos, a partir da composição centesimal, verificar a riqueza do composto em alguns grupos homogêneos considerados, assim como verificar o valor calórico desse alimento. Os dados obtidos conduzem de melhor segurança as interpretações dos testes experimentais de caracterização da mucilagem da *Ocotea puberula*.

7.4. ANÁLISE DA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EHOP À QUENTE

As análises de prospecção fitoquímica são essenciais para complementar os dados obtidos da composição centesimal das cascas, podendo assim transpor para o extrato seco e liofilizado da mucilagem da *Ocotea puberula* a quantificação de alguns grupos funcionais

Os resultados obtidos através da marcha sistemática fitoquímica para as cascas de *O. puberula* estão expressos na Tabelas 03.

Tabela 4 –Pesquisa no extrato hidroalcoólico das cascas de *O. puberula*

Metabólito	Resultado
Flavonóides	Negativo
Antraquinonas	Negativo
Esteróides e/ou Triterpenos	Positivo (+)
Cumarinas	Negativo
Alcalóides	Positivo (+++)
Aminogrupos	Positivo (++)

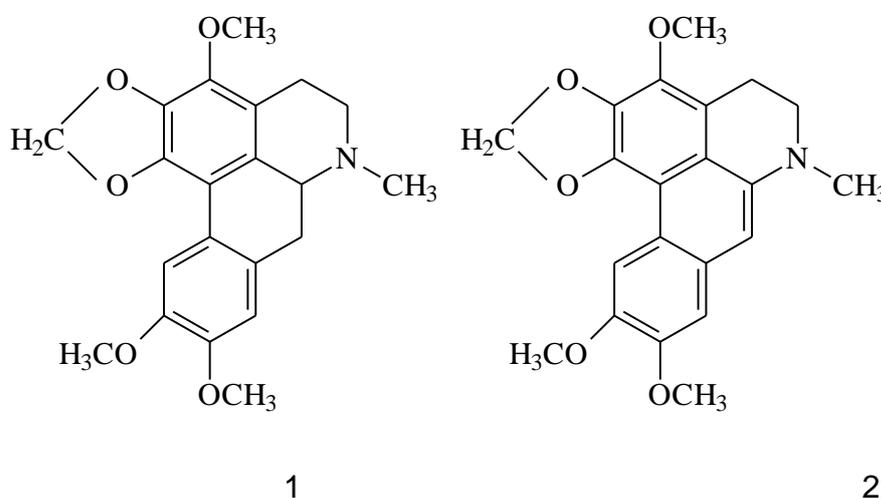
Legenda: + fracamente positivo; ++ positivo; +++ fortemente positivo

Fonte:O autor. Ponta Grossa-PR Novembro 2017

A análise fitoquímica preliminar indicou a presença de alcalóides, aminogrupos e esteróides e/ou triterpenos no extrato hidroalcoólico das cascas da *O. puberula*. As reações gerais para a verificação da presença de alcalóides, utilizando os reativos de Dragendorff, Mayer, Wagner e Bertrand, demonstraram resultados fortemente positivos.

Esses resultados estão de acordo com Jacobucci (1954), que isolou um alcalóide aporfínico a partir do extrato metanólico das cascas de *Ocotea puberula*, a ocoteína e com Baralle et al. (1972), que identificaram dois novos alcalóides aporfínicos nas cascas de *O. puberula*, a dehidroocoteína e a dideidroocoteína. As estruturas químicas da ocoteína e da dehidroocoteína estão representadas na Figura 16.

Figura 19 - Estrutura química da ocoteína (1) e da dehidroocoteína (2).

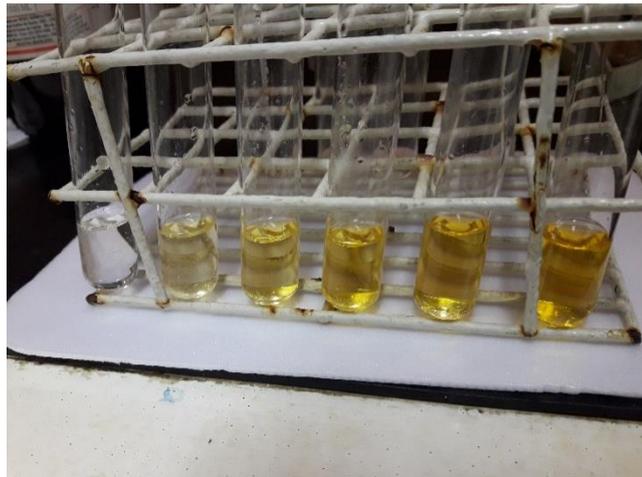


Fonte: JACOBUCCI, G. A. Ocoteina, un alcaloide aislado de la corteza de *Ocotea puberula* (Rich.) Ness. **Anales de la Asociación química Argentina**, v. 42, n. 1, p. 18-19, 1954.; BARALLE, F. et al. Dehydroocoteine and didehydroocoteine from *Ocotea puberula*. **Experientia**, v. 28, p. 875-876. 1972.

De acordo com Costa (1994), os alcalóides aporfínicos são alcalóides de núcleo isoquinolínico, caracterizados quimicamente pela presença do núcleo tricíclico de 9,10-dihidrofenantreno. Ainda, segundo o mesmo autor, o alcalóide que deu origem a esses compostos foi a aporfina, sendo que os diversos derivados se distinguem pelo número e posição dos substituintes mais usuais.

Ao avaliar a quantidade de alguns grupos funcionais do EHOP liofilizado foi observado também alguns dados que corroboram os testes qualitativos obtidos na prospecção fitoquímica acima descrita. Abaixo demonstrado realização de curva padrão de glicose para quantificação de açúcares totais (Figura 17).

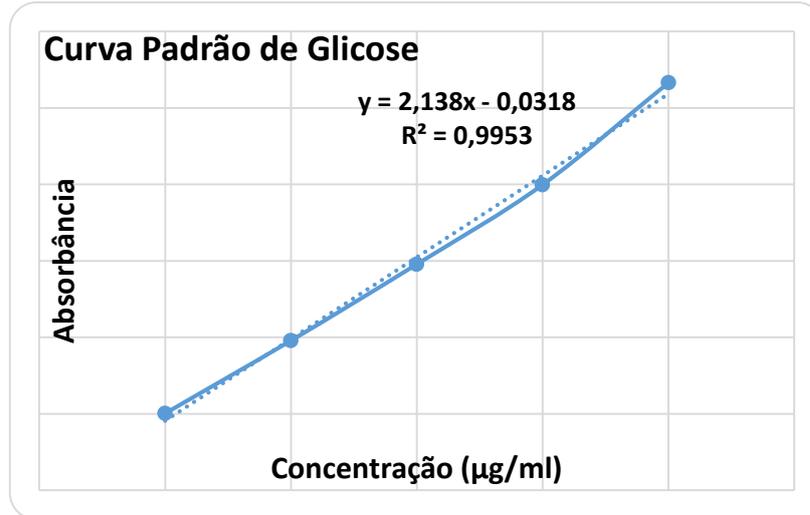
Figura 20 - Tubos de Ensaio com padrão de curva de glicose



Fonte: O autor. Out. 2017

O teor de açúcares totais obtido através do método de fenol-ácido sulfúrico demonstrou uma concentração importante de açúcares totais. Através da curva padrão de glicose foi possível obter um gráfico linear e extrair a equação da reta, conforme demonstrado no gráfico abaixo.

Gráfico 2 - Equação de Reta da curva padrão de glicose

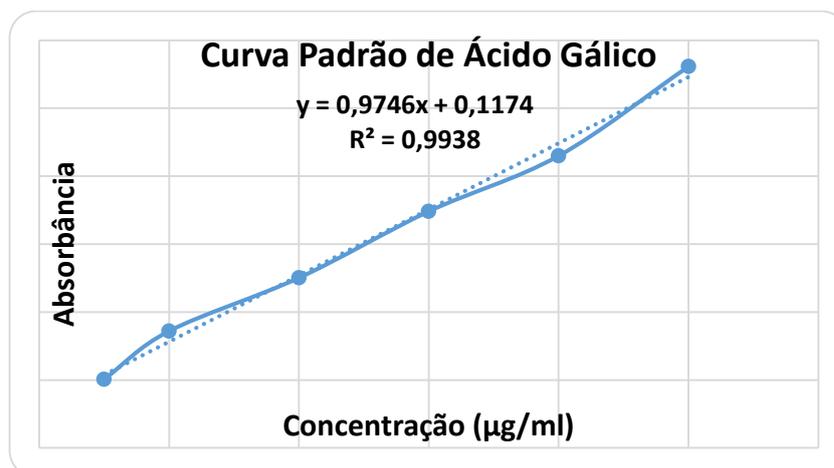


Fonte: O autor. Dez. 2017

Utilizando o método descrito acima, foi possível quantificar o teor de açúcares totais, que foi de 1,439 $\mu\text{g/ml}$ glicose por μg de EHOP.

O teor de compostos fenólicos foi obtido através do método de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão de referência. Através da curva padrão do ácido gálico foi possível obter um gráfico linear e extrair a equação da reta, conforme demonstrado no gráfico abaixo.

Gráfico 3 - Equação de Reta da curva padrão de ácido gálico



Fonte: O autor. Fev. 2018

Utilizando o método descrito acima, foi possível quantificar o teor ácido gálico, que foi de 0,0921 $\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico por mg de mucilagem de EHOP. Este dado

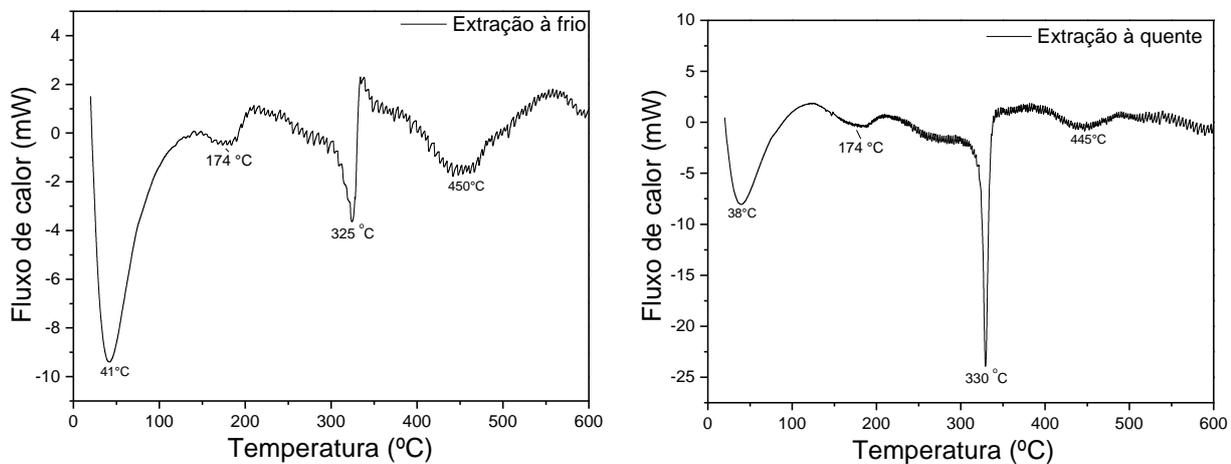
também é similar aos dados obtidos na marcha sistemática, o qual evidencia uma concentração mínima de compostos fenólicos em uma grande proporção de amostra analisada por este teste.

Sendo assim, podemos validar a marcha fitoquímica realizada como adequada para avaliação de grupos funcionais presentes na casca da *Ocotea puberula*.

7.5. DTG, TG E FTIR DO EHOP EM EXTRAÇÃO A QUENTE E A FRIO

Esta etapa foi essencial para avaliação da qualidade das amostras em comparativo da extração a quente e a frio da mucilagem da casca da *Ocotea puberula*. Observou-se previamente um maior rendimento da técnica de extração a quente, porém as análises laboratoriais foram necessárias para ilustrar qual método obteve um extrato de melhor qualidade, sem outros constituintes não esperados na extração.

Figura 21 - DTG em extração a quente e a frio



Fonte: O autor. Set. 2017

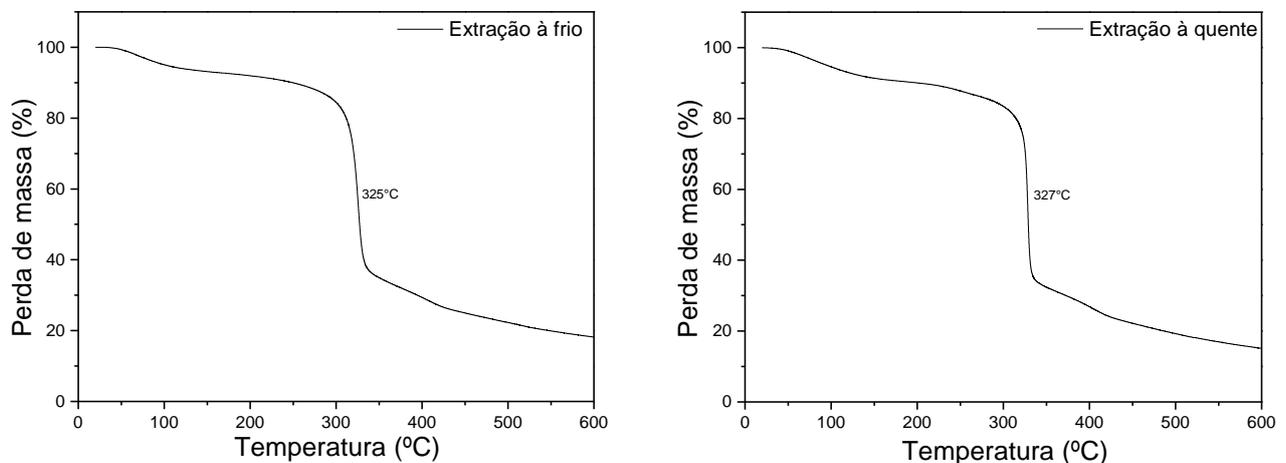
Observa-se através na análise de Termogravimetria derivada (DTG) que há em aproximados 174°C a primeira perda de massa discreta, relacionado à perda de água estrutural. Os dados obtidos através do DTG mostram uma degradação de massa uniforme no extrato a quente, sugerindo um comporta com maior quantidade de compostos isolados ou sem resíduos interferentes na pureza da mucilagem da *Ocotea puberula*. Avaliando as demais perdas de massa, nota-se uma segunda perda de

massa em aproximados 325°C, por provável degradação de compostos alcalóides presentes no extrato conforme descrito na marcha fitoquímica. Ilustra-se ainda uma terceira perda massa em 445 °C relacionado a degradação de aminogrupos. Obtém-se como massa final após aquecimento até 600°C um teor de carbono e sais inorgânicos de aproximadamente 20%, percentual maior do que o obtido em avaliação das cascas *in natura* da *Ocotea puberula*.

A utilização de um extrato com maior teor de pureza é essencial quando se busca um potencial fitoterápico na aplicação do extrato em feridas. Potencializar o extrato com maior teor de compostos uniformes é uma medida que pode garantir eficácia na aplicação do extrato nos ensaios biológicos *in vivo*.

Seguindo as análises laboratoriais, foram realizados TGA e FTIR dos dois extratos para comparação e análise dos gráficos obtidos. Os valores de TGA foram similares na análise dos extratos à frio e à quente, demonstrando a maior perda de massa na mesma variação de temperatura, que foi de 325 - 327°C.

Figura 22 - TGA em extração a frio e a quente



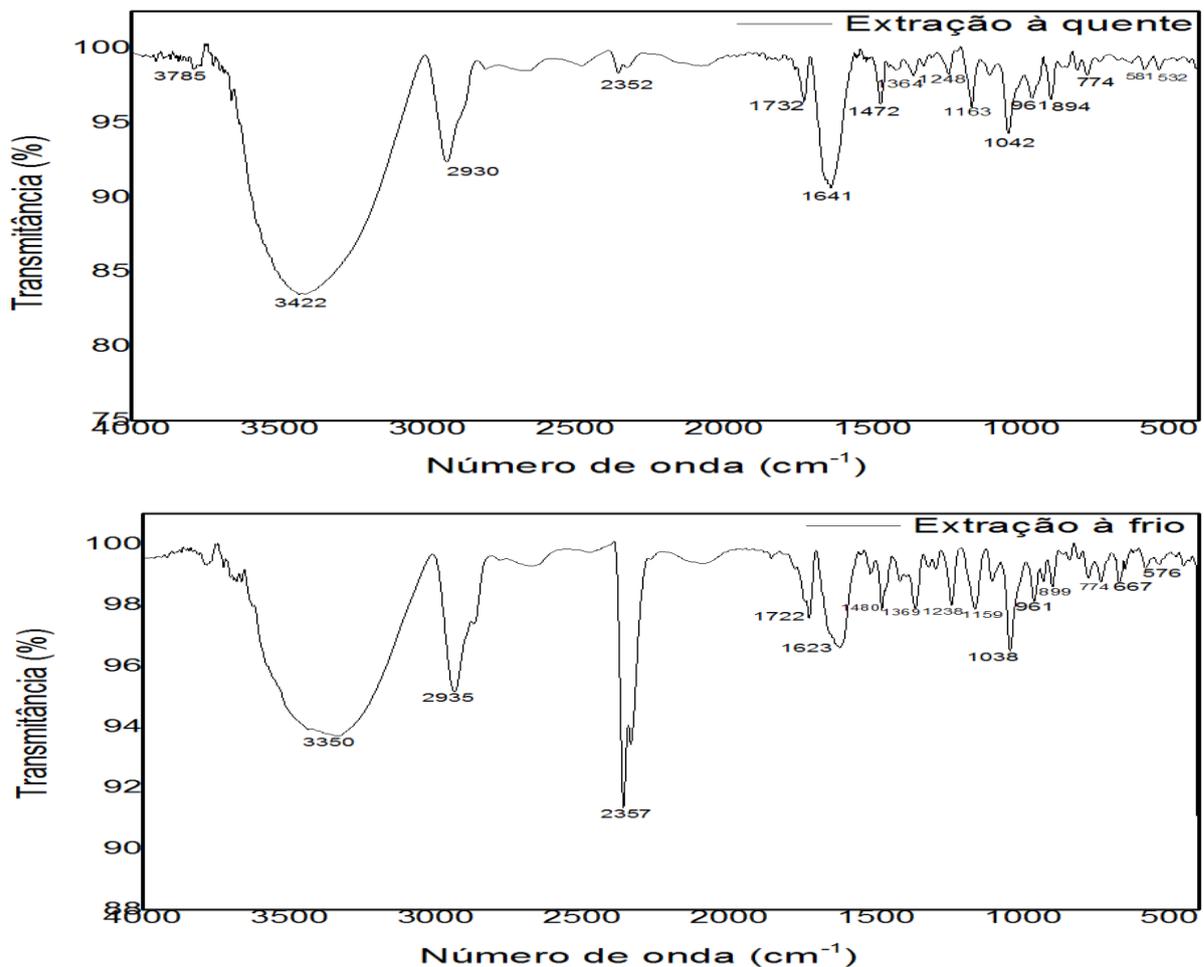
Fonte: O autor. Set. 2017

O valor demonstrado nas figuras acima mostram os valores de 325°C e 327°C os quais são os picos de máxima perda de massa. Os dados obtidos em curvas de TGA mostram similaridade entre os extratos obtidos a quente e a frio, sendo que esta análise não pode definir isoladamente qual a técnica de extração oferece um composto fitoterápico de melhor pureza. Podemos assim concluir através destas análises que a quantidade de compostos alcalóides em massa presente no extrato a

quente é superior ao extrato a frio, conforme demonstrado no DTG em 2ª perda de massa de 325 – 327°C, corroborando com o rendimento da extração a quente como método mais adequado para extração de mucilagem da *Ocotea puberula*.

Seguindo a avaliação química dos constituintes, foi avaliados os dados obtidos em FTIR, conforme ilustrado nos gráficos abaixo. É importante salientar que a espectroscopia na região do infravermelho (IV) é uma técnica valiosa na análise orgânica qualitativa, sendo utilizada por vários estudos nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas (LOPES, 2003). Na Figura 23 está ilustrado os espectros em FTIR dos extratos liofilizados por técnica de extração a quente e a frio, conforme já descritos previamente.

Figura 23 - FTIR em extração a quente e a frio



Fonte: O autor. Sete. 2017

Conforme descrito anteriormente, a análise fitoquímica preliminar indicou a presença de alcalóides aporfínicos os quais possuem modos vibracionais no IR em 3040 correspondente ao radical OH⁻, 1585 e 1467 devido ao anel aromático, 1039 e 935 cm⁻¹ devido ao dioximetileno (PABON, 2010). Quando o alcaloide possui radical formil (R1=COH), este apresenta absorções adicionais em 2830, 2700 e 1739 cm⁻¹ (pabon 2010). Ainda com a presença de ocoteol no extrato, podemos observar absorções em 3375, 2945, 1736, 1614, 1516, 1450, 813 e 681 cm⁻¹ (CANDIDO, 2016)

Na figura 23 temos os resultados de FTIR para os extratos obtidos pelos dois métodos (quente e frio). Dentre as principais diferenças podemos destacar que a forma da banda relacionada com o radical O-H possui maior intensidade para maiores números de onda para a extração a quente, esta banda pode ainda ser relacionada com vibrações do tipo N-H. Também o pico que está relacionado com grupos formil em 1728 cm⁻¹ para a extração a quente possui uma menor intensidade quando comparado com o modo vibracional em 1628-1636 cm⁻¹ sendo que a banda em 1628 e 1636 cm⁻¹ que pode ser atribuída a deformação axial de C=O em ácidos carboxílicos (por exemplo) possui menor largura para a extração a quente quando comparada com a extração a frio. As vibrações em 1042 cm⁻¹ correspondem ao estiramento de C-O (1000-1300 cm⁻¹), presente em estrutura química de diversos alcalóides aporfínicos da *Ocotea puberula* como a boldina, dicentrina, isomesticinina e leucoxina, ilustrados na figura 26 (ZANIN et al., 2011; LOPES, 2004; CAPANEMA, 2016).

Para a extração a quente as vibrações em menores números de onda são todas alargadas, demonstrando desordem estrutural e possível ocorrência de outros alcalóides de difícil indexação dos modos vibracionais. Entretanto, a partir destas análises podemos inferir que o método de extração influencia na composição final das mucilagens.

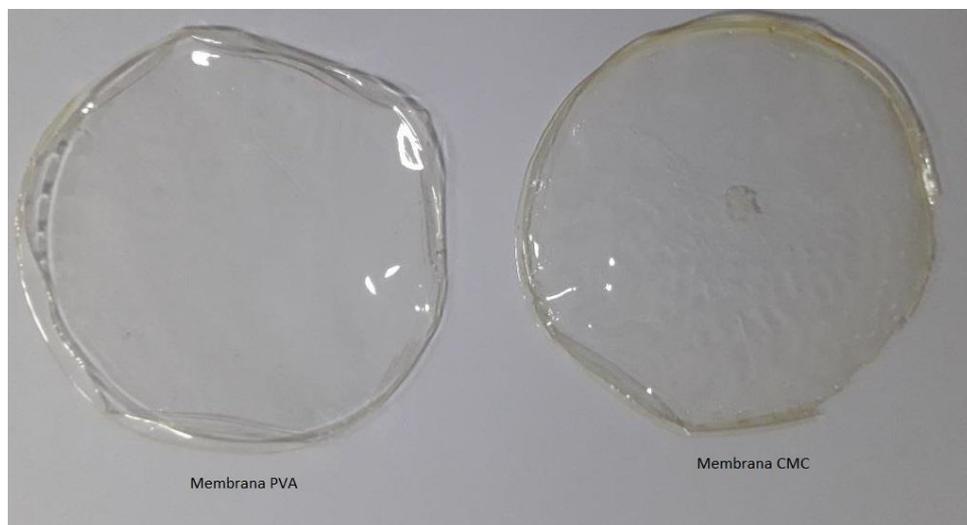
Neste sentido, optamos por seguir com a obtenção das mucilagens por extração à quente visto que a agitação em temperatura de 60°C por uma hora detém melhor rendimento, quando comparado às análises do extrato a frio. Outro fato que corrobora para a extração a quente é o tempo para extração, onde na técnica de extração a frio o tempo necessário para obtenção da mucilagem é de 7 dias, diferente da técnica de extração a quente que obtém o extrato em algumas horas.

7.6 ELABORAÇÃO DAS MEMBRANAS DE CMC E PVA

A escolha da elaboração das membranas contendo CMC e PVA foram baseadas em literaturas, que demonstram ampla utilização destas em membranas simples ou associadas a outros compostos para utilização em cobertura de feridas. A técnica mais comum para incorporação de compostos nas membranas de CMC e PVA é por adesividade, formando assim duas camadas distintas (uma com CMC ou PVA e outra com composto ativo).

No caso do EHOP, este demonstrou baixa adesividade em utilização por camadas, porém ao realizar o processo de reticulação incorporando o EHOP na membrana obteve um filme transparente, homogêneo e de fácil manipulação após a secagem, conforme ilustrado abaixo. A incorporação do composto ativo e posterior reticulação é uma opção para formação de membranas com fitoterápicos, comparado a outros métodos descritos em literatura.

Figura 24 - Modelos de Membrana de PVA e CMC



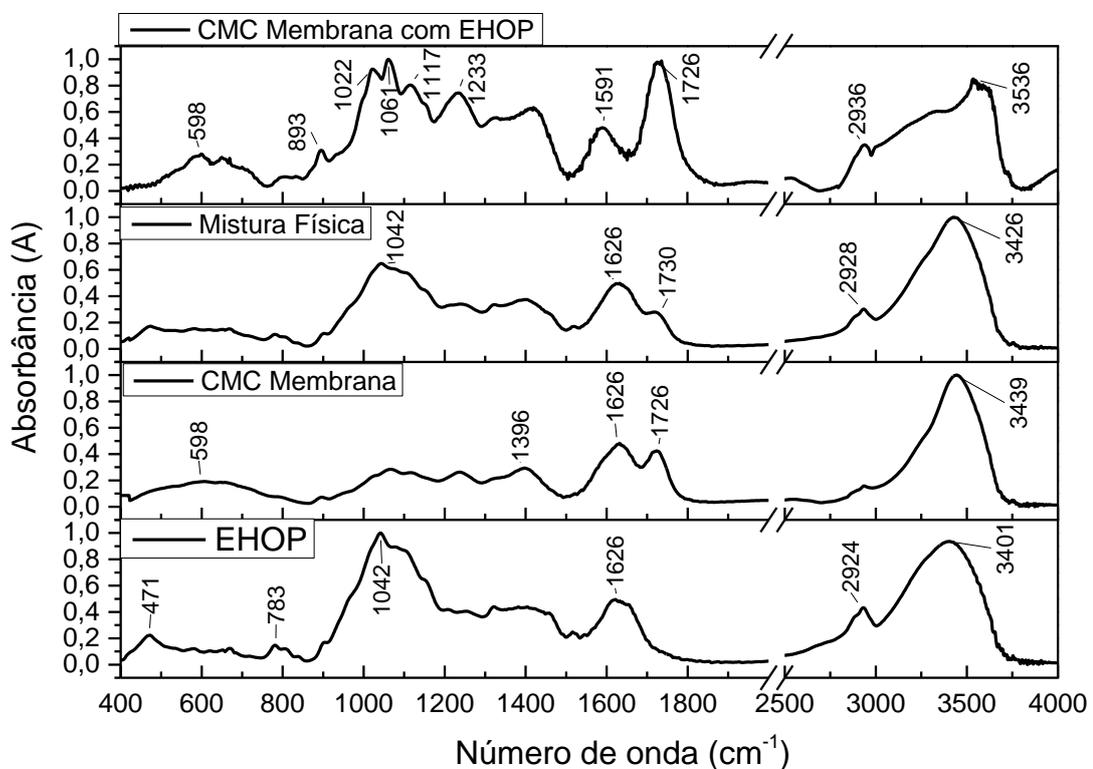
Fonte: O autor. Set. 2017

7.7 FTIR DAS MEMBRANAS DE CMC E PVA PURAS E INCORPORADAS COM EHOP

Neste tópico foram elucidadas as características dos espectros de FITR da CMC, do PVA e do EHOP liofilizados e isolados, também em forma de mistura física e após sua reticulação em forma de membranas. Foram demonstrados os espectros separadamente do constituinte CMC e posteriormente PVA.

A Figura 25 fornece espectros de FTIR do CMC puro em pó e membrana, do EHOP em pó e associado com a CMC em membrana e a mistura física dos dois constituintes.

Figura 25 - FTIR CMC Membrana pura e incorporada com EHOP

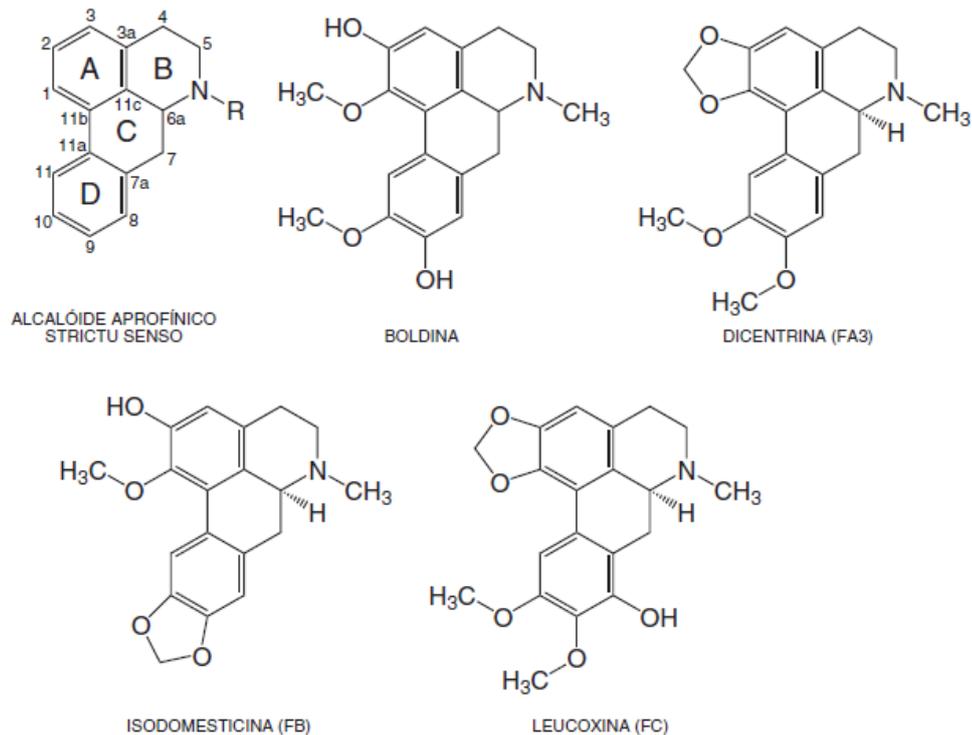


Fonte: O autor. Jan. 2018

Observa-se na CMC em membrana os picos de deformação axial de COOH em proximidades de 1735 cm^{-1} tanto na membrana pura como na incorporação do EHOP. Também está presente em proximidades de 1593 cm^{-1} a deformação simétrica de ânion carboxilato tanto na membrana pura como incorporada com o EHOP. Avaliando o EHOP isolado, nota-se presente componentes em comprimento de onda de 1042 cm^{-1} podendo ser justificado como estiramento forte de C-O ($1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$),

presente em estrutura química de diversos alcalóides aporfínicos da *Ocotea puberula* como a boldina, dicentrina, isomesticinina e leucoxina, ilustrados na figura 26. (ZANIN et al., 2011; LOPES, 2004; CAPANEMA, 2016).

Figura 26 - Estrutura dos alcalóides aporfínicos stricto sensu e de folhas de espécimens adultos de *Ocotea puberula*

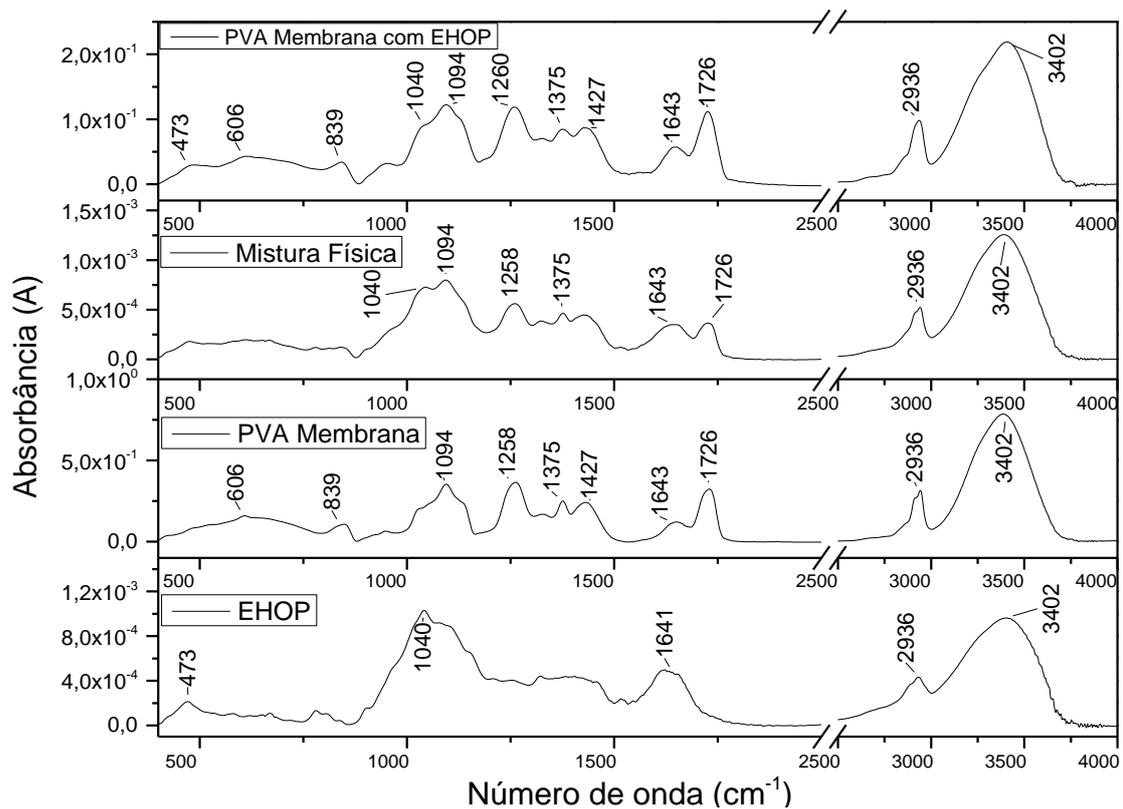


Fonte: ZANIN, S. M. W. et. al. Mudanças de *Ocotea puberula* (Lauraceae): Identificação e Monitoramento de Alcalóides Aporfínicos. **Revista Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 743, 2011.

Avaliando os deslocamentos das bandas e conformação das mesmas, é notória a percepção do alto potencial higroscópico da CMC, ocasionando incorporação de grande quantidade de água nos constituintes da membrana, alterando polaridade e interferindo na análise da membrana pelo substrato de CMC. Nota-se alargamento no espectro no comprimento de onda de 1715 cm^{-1} e distorção em comprimento de onda de 3500 cm^{-1} , quando comparado à mistura física sem formação de membrana. À via de regra, a incorporação de EHOP na membrana não demonstrou estabilidade química adequada, porém o fato de higroscopia pode ter interferido significativamente neste resultado.

Em sequência às análises das membranas, a Figura 27 fornece espectros de FTIR do PVA puro em membrana, do EHOP em pó e associado com o PVA em membrana e a mistura física dos dois constituintes.

Figura 27 - FTIR PVA Membrana pura e incorporada com EHOP



Fonte: O autor. Jan. 2018

Observa-se na membrana de PVA e também nos outros espectros comprimento de onda de 3550-3200 cm^{-1} os estiramentos largos de O-H (ácido carboxílico). Também está presente em proximidades de 2936 cm^{-1} o estiramento curto de C-H em grupos alquil para o EHOP e para C-H de aldeídos presentes na membrana de PVA reticulada com glutaraldeído. Avaliando o EHOP isolado, nota-se presente componentes em comprimento de onda de 1042 cm^{-1} podendo ser justificado como estiramento forte de C-O (1000-1300 cm^{-1}), presente em estrutura química de diversos alcalóides aporfinóides conforme ilustrados na figura 26 (ZANIN et al., 2011; LOPES, 2004; MANSUR et al., 2008).

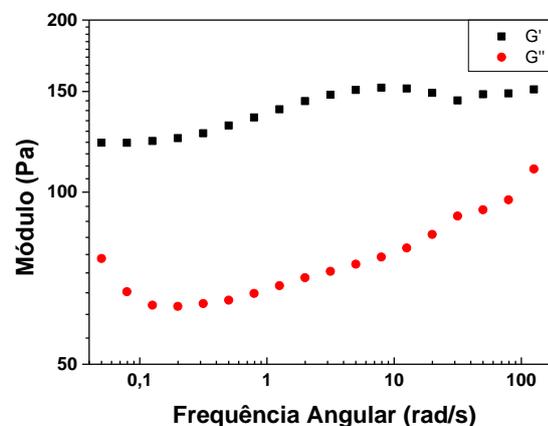
Avaliando as bandas e conformação das mesmas, observa-se grande similaridade nos espectros apresentados, identificando adição dos compostos em forma de membrana e reticulados com glutaraldeído e mantendo suas características químicas iniciais em análise por FTIR. Nota-se menor potencial higroscópico comparado à membrana de CMC. Percebe-se assim um potencial de incorporação de EHOP em PVA para formar membranas para serem aplicadas na assistência à saúde, com estabilidade química após incorporação dos constituintes em uma membrana única.

7.8 ANÁLISES REOLÓGICAS DO EHOP

Os perfis reológicos das amostras foram realizados os testes no reômetro em triplicata. Foi utilizada um disco plano de 40mm e base em Peltier com temperatura constante de 36,5°C (similar a temperatura da pele humana). Foi aplicado aproximadamente 20ml do extrato aquoso da mucilagem da *Ocotea puberula* e realizado testes de viscosidade linear e viscosidade complexa (módulo de perda e de armazenamento). A tensão de cisalhamento e taxa de deformação permitiram avaliar a característica e comportamento do fluido frente a forças externas, similares a aplicadas sobre o mesmo em superfícies em geral, como a pele.

Na Figura 28, estão apresentados os gráficos de módulo de armazenamento e módulo de perda (G' e G'') versus frequência angular (rad/s) para as amostras contendo EHOP puro.

Figura 28 - Módulo de Armazenagem (G') e Perda (G'') do EHOP

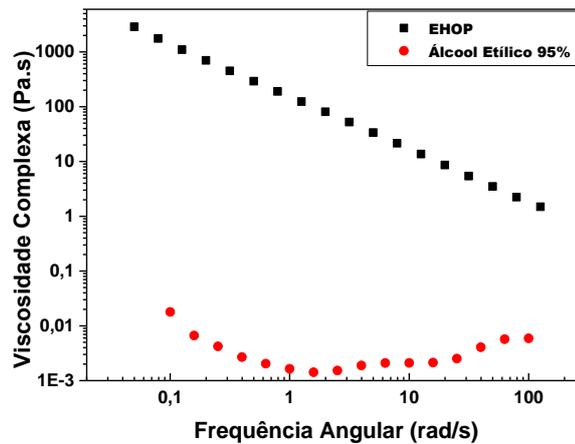


Fonte: O autor. Jan. 2018

Observou-se que o EHOP apresentou comportamento similar a pseudoplástico, por apresentar um módulo elástico (deformação) (G') maior que o módulo viscoso (perda) (G'') e pontos de cruzamento dos módulos em diferentes taxas de stress, confirmando o potencial de absorção de força sem sofrer deformação significativa. A avaliação de deformação e armazenamento de materiais é de grande valia para conhecer o comportamento do material frente a qualquer força de deformação (fricção, pressão, rotação, entre outros). Ao realizar uma força de deformação, o material apresenta uma resposta frente a esta força de deformação. Para formação de filmes utilizados na aplicação em superfícies, a busca por extratos botânicos com estas características contribui para a qualidade e durabilidade da cobertura na aplicação sob a pele.

Ao realizar análise de viscosidade complexa do EHOP e do o álcool etílico 95% ao qual o EHOP estava acondicionado, as características de viscosidade significativa do EHOP não foi representada no álcool etílico 95%, garantindo assim a confidencialidade da característica peculiar do EHOP de viscosidade complexa significativa, associado ao módulo de armazenagem maior que o módulo de perda sem ponto de cruzamento dos módulos, podemos perceber que o EHOP é apto para aplicação como cobertura tópica para pele, podendo este inclusive ter potencial reológico para ser transformado em uma membrana e o mesmo não sofrer alterações estruturais com forças de cisalhamento ou torção ao ser aplicada à pele. O gráfico de viscosidade complexa do EHOP e do álcool 95% está expressado na Figura 29 abaixo.

Figura 29 - Viscosidade complexa do EHOP e do álcool etílico 95%



Fonte: O autor. Jan. 2018

7.9 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VIVO* PARA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Os ensaios biológicos foram realizados nos sete grupos distintos descritos na metodologia. Foram respeitados critérios técnicos de manipulação animal, calibração dos profissionais envolvidos nos processos experimentais e padronização destes para a elaboração na lesão até a análise histológica das mesmas, conforme demonstrado nas ilustrações abaixo.

Figura 30 - Manipulação Animal (rato *Wistar*) para o preparo da lesão incisional no dorso do animal

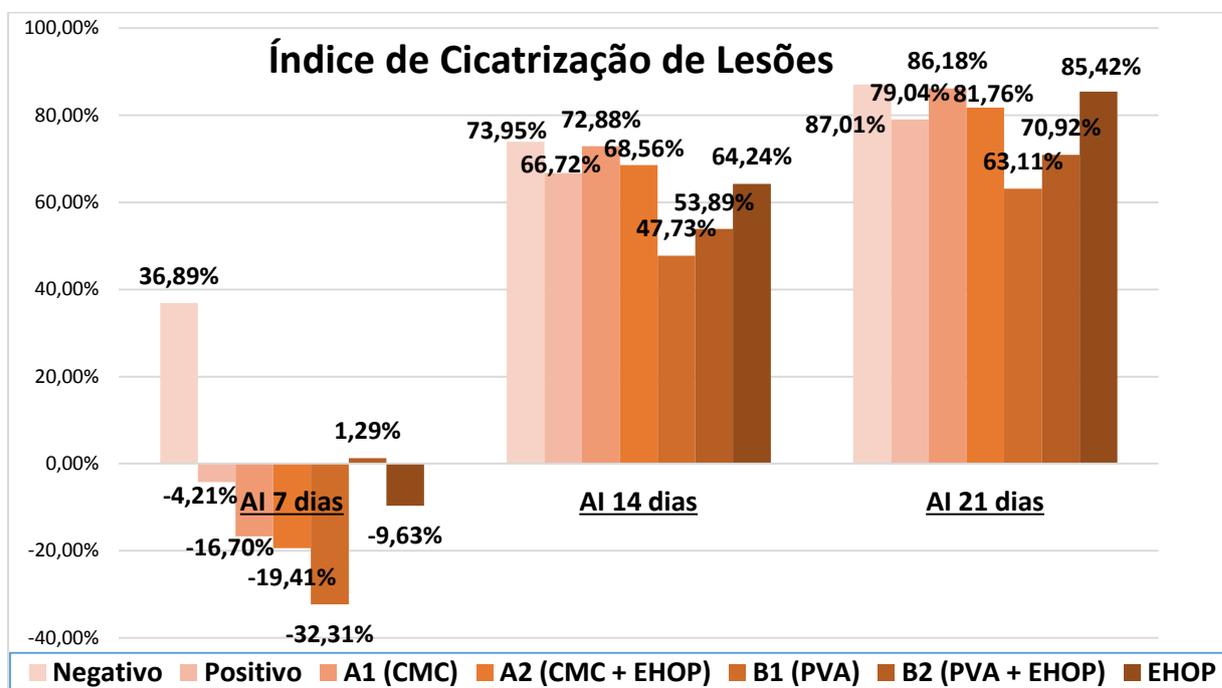


Fonte: O autor. Jan. 2018

7.9.1 Avaliação do Índice de Cicatrização das Lesões (ICL)

Para avaliar a reepitelização das lesões foi calculado o ICL considerando a área da úlcera (calculada pelo *software* ImageJ) no início e no último dia de acompanhamento. Os resultados obtidos foram expressos graficamente através das diferenças das médias iniciais e finais de cada grupo, obtendo um percentual de regressão das feridas conforme ilustrado abaixo. O instrumento padronizado para realização das fotos padronizadas em todos animais está demonstrado no ANEXO III.

Gráfico 4 - Índice de Cicatrização das lesões (ICL) dos grupos experimentais



Fonte: O autor. Fev. 2018

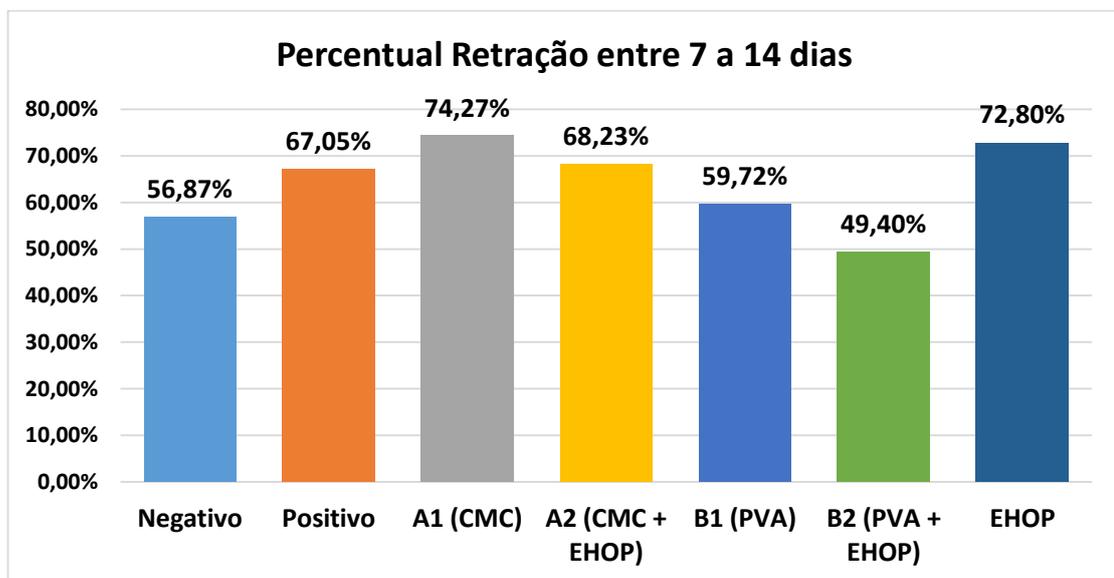
Comparando a reepitelização dos grupos, observa-se uma regressão significativa das lesões no grupo negativo (CN), quando comparado aos outros grupos. Outro grupo que teve regressão discreta após 7 dias foi o grupo PVA/EHOP (B2). O grupo com pior desempenho após 7 dias de tratamento foi o grupo PVA (B1). Pode-se sugerir assim que a aplicação do EHOP na membrana de PVA obteve desempenho superior à membrana sem o extrato botânico e o extrato isolado não obteve o mesmo desempenho inicial de regressão da lesão. Previamente foi

identificado em FTIR a melhor estabilidade da composição PVA/EHOP em comparação ao CMC/EHOP.

Nota-se assim que a aplicação de qualquer membrana na ferida incisional dos ratos ocasionou aumento da área lesional, podendo ser explicada pelo alto teor exsudativo das lesões e favorecimento da maceração das lesões quando utilizado coberturas que mantinham o leito da ferida úmido. Rocha (2014), relata que uma das estratégias principais para tratamento de lesões é o manejo adequado da umidade, fato este também já descrito na revisão de literatura desta pesquisa.

Após 14 dias a totalidade dos grupos obtiveram redução da área de lesão em mais de 50%, observando melhor desempenho mantido no grupo CN, porém notou-se uma regressão significativa dos grupos Controle Positivo (CP), CMC (A1), CMC/EHOP (A2) e EHOP (C), quando comparados aos grupos tratados com membrana de PVA e o controle negativo, conforme expresso abaixo.

Gráfico 5 - Percentual de Retração das feridas entre 7 a 14 dias de tratamento

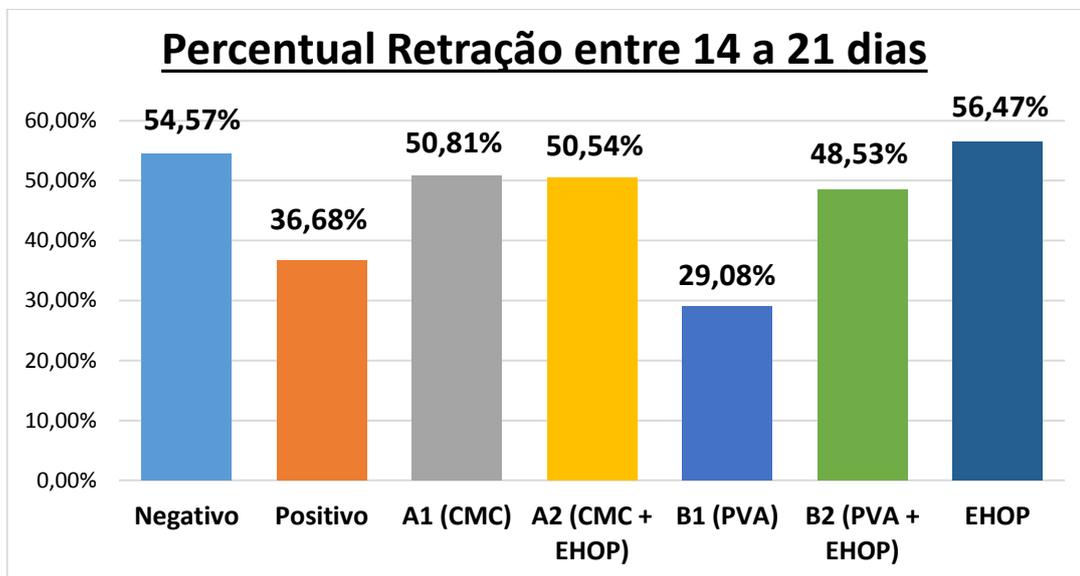


Fonte: O autor. Fev. 2018

Ao final de 21 dias o grupo negativo manteve melhor performance de retração das lesões, seguido do grupo CMC (A1) e do grupo EHOP (C). Observou-se ainda que o grupo tratado com PVA obteve pior desempenho final de regressão da área de lesão, e dentre os grupos a membrana de PVA com EHOP teve melhor desempenho, comparado ao grupo PVA puro. Observou-se ainda que o Grupo Positivo (CP) e o

Grupo PVA (B1) obtiveram o menor percentual de retração entre 14 a 21 dias, e os demais grupos obtiveram desempenhos similares em relação à regressão da lesão.

Gráfico 6 - Percentual de Retração das feridas entre 14 a 21 dias de tratamento



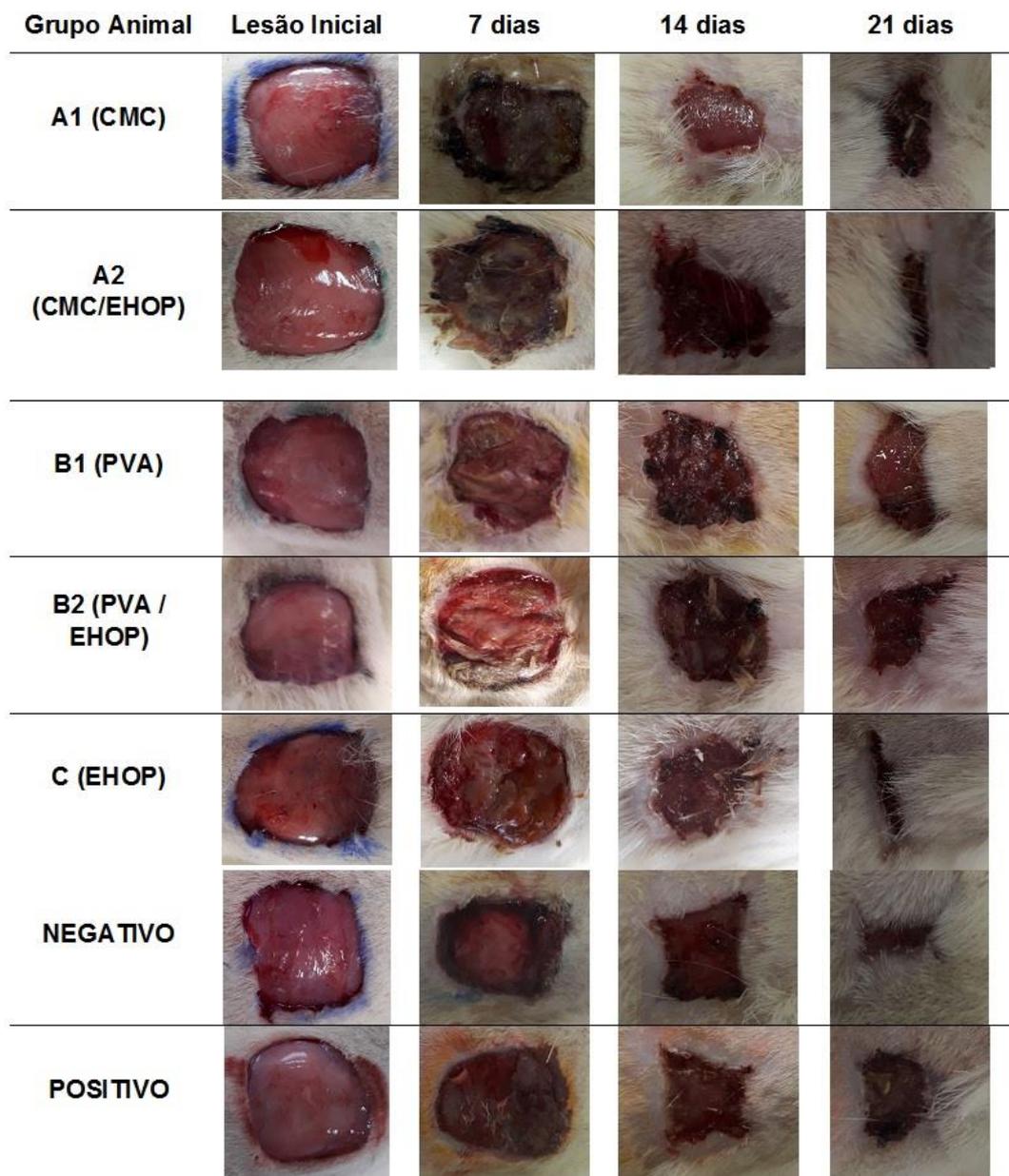
Fonte: O autor. Fev. 2018

O estudo macroscópico permitiu observar diferenças entre os grupos, quanto à cor da lesão e pode ser realizado uma avaliação visual das lesões, sendo possível observar alterações macroscópicas entre os grupos tratados com membranas e se apresentaram similaridade em alguma característica (SARMENTO et al., 2014).

Podemos demonstrar através da Figura 31 que as lesões iniciais de todos os grupos tiveram similaridade macroscópica, como observado na primeira coluna da ilustração. Porém, após 7 dias de lesões, os grupos A1, A2, C e Positivo apresentaram maior teor de umidade visível nas fotos, quando comparado ao Grupo B1, B2 e Negativo. Nota-se também grande acúmulo de secreção purulenta e enegrecida nas imagens do Grupo A1 e A2. Pode ser justificado essas apresentações devido o potencial higroscópico intenso presente nas membranas de CMC, quando comparados às membranas de PVA. O excesso de umidade, associado a lesões de pele, manutenção de cobertura por longo período e o calor são os meios ideais para proliferação bacteriana na pele (OLIVEIRA, 2010).

Após 14 dias também observam discretas diferenças visuais entre os grupos experimentais, em especial ao alto teor de crosta presente no grupo tratado com PVA (B1 e B2), quando comparado aos demais grupos.

Figura 31 - Fotos das lesões nos grupos experimentais



Fonte: O autor. Fev. 2018

Após 21 dias as lesões com tratamento através do PVA foram as que tiveram pior desempenho cicatricial, visível nas ilustrações a diferença da característica do

leito da ferida e presença de tecido cicatricial e reepitelização com proliferação de pelos perilesional. Em suma, o aspecto da lesão, em relação à cor, reflete clinicamente o desenvolvimento do processo de cicatrização, onde a coloração amarelada indica infecção. Esses dados atribuem que os grupos tratados com EHOP (C); Controle Negativo e Controle Positivo tiveram uma quantidade menor de animais com essa característica, mostrando a atividade antimicrobiana do EHOP e o Controle Positivo, e um melhor controle de umidade sem a presença da membrana sob a lesão (Controle Negativo).

É importante salientar que os escores obtidos no estudo histológico corroboraram esses dados, pois a avaliação inicial das características macroscópicas das lesões sugere diferenças entre os grupos no potencial cicatrizante, porém os estudos histológicos elucidam estas diferenças de fases de cicatrização das lesões (SARMENTO et al., 2014).

7.9.2 Avaliação histológica após 7 dias de lesão

Os dados histológicos foram coletados de acordo com as fases de cicatrização e organizados de acordo com os escores para quantificação. Na Tabela 5 é possível observar que as maiores médias nos escores de inflamação foram obtidas pelos grupos que receberam a membrana e o grupo com o extrato puro (A1, A2, B1, B2 e C). Observou-se que na avaliação inflamatória após 7 dias de tratamento o grupo A1, A2 e C foram significativamente diferentes do grupo Negativo e Positivo. Os demais grupos (B1 e B2, Negativo e Positivo) não tiveram diferença significativa quando comparados entre si.

Avaliando a Angiogênese dos grupos, podemos observar as maiores médias nos grupos A1 e A2 em relação aos outros grupos, com diferença significativa do grupo C em relação ao grupo A1. Nota-se que os demais grupos, com exceção do grupo A1 e C não tiveram diferença significativa, conforme análise estatística. Observando a colagênese após 7 dias podemos afirmar que não houve diferença estatística no desempenho em formação de colágeno entre os grupos, mesmo com média discretamente maior no grupo A2.

Tabela 5– Avaliação histológica das lesões após 7 dias

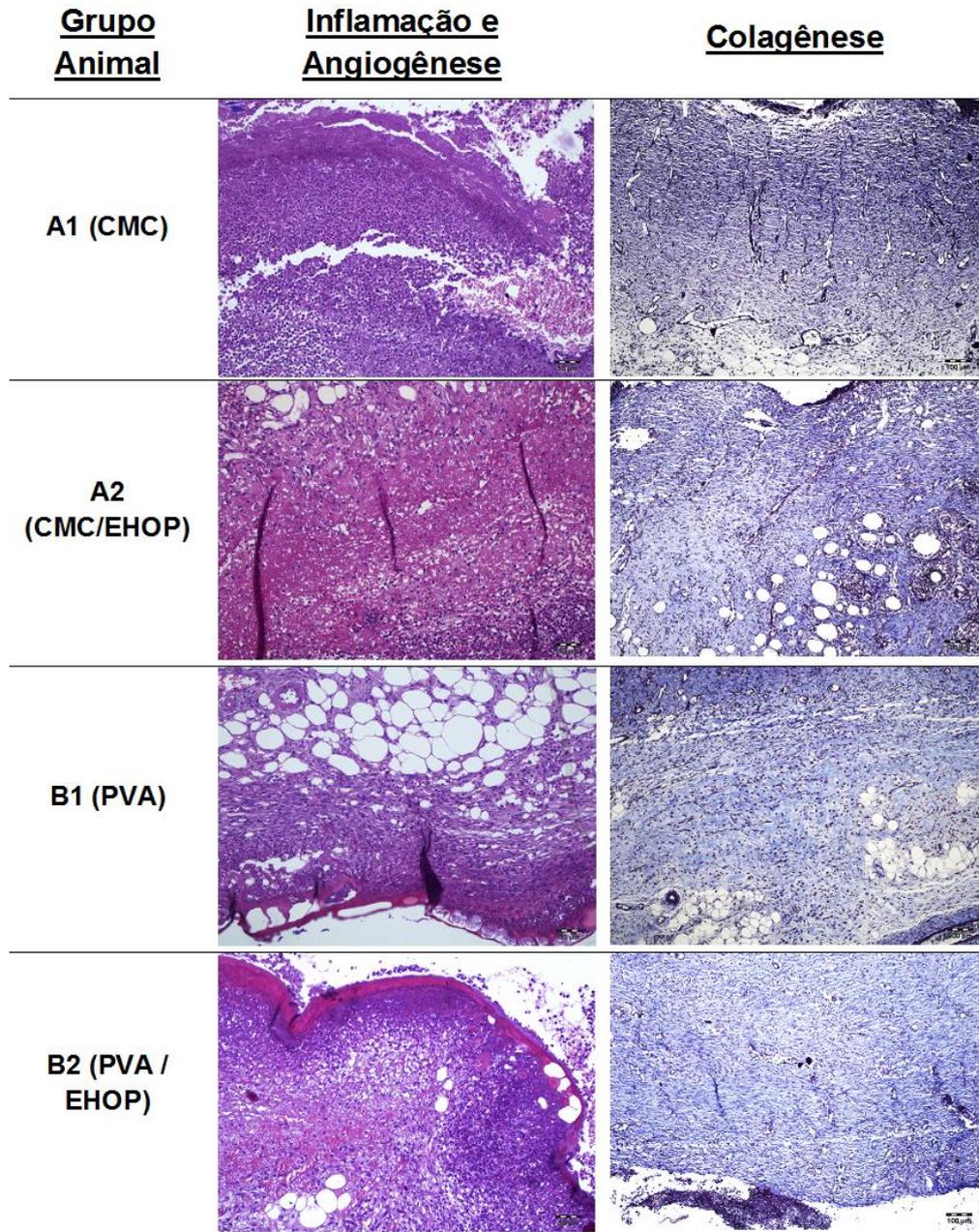
Grupo Animal	Inflamação	Angiogênese	Colagênese
	Média +- dP	Média +- dP	Média +- dP
A1 (CMC)	2,6000 +- (0,547) ^a	2,4000 +- (0,894) ^a	0,2000 +- (0,447) ^a
A2 (CMC/EHOP)	2,8000 +- (0,447) ^a	2,2000 +- (0,836) ^{ab}	0,4000 +- (0,547) ^a
B1 (PVA)	2,0000 +- (0,000) ^{ab}	1,4000 +- (0,894) ^{ab}	0,2000 +- (0,447) ^a
B2 (PVA/EHOP)	1,8000 +- (0,836) ^{ab}	1,8000 +- (0,447) ^{ab}	0,2000 +- (0,447) ^a
C (EHOP)	2,2000 +- (0,836) ^a	1,0000 +- (0,000) ^b	0,2000 +- (0,447) ^a
Negativo	1,0000 +- (0,000) ^b	1,6000 +- (0,547) ^{ab}	0,2000 +- (0,447) ^a
Positivo	1,0000 +- (0,000) ^b	1,2000 +- (0,447) ^{ab}	0,2000 +- (0,447) ^a

OBS: Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Fonte: O autor. Abr. 2018

Ilustra-se abaixo também as fotos micrográficas dos grupos estudados e suas diferenciações em avaliação das membranas e controles / extrato. É importante salientar que ao avaliar a resposta inflamatória dos grupos, podemos observar maior número de células de resposta inflamatória nos grupos tratados com CMC, quando comparado ao grupo tratado com PVA, com celularidade e infiltrado inflamatório presente nas lâminas deste grupo. Corrobora os dados estatísticos obtidos de maiores médias nos grupos A1 e A2 em relação aos outros grupos, com diferença significativa do grupo A1 em relação aos demais grupos. A resposta inflamatória exacerbada favoreceu a angiogênese nestes grupos, observando maior número de vasos presentes nas lâminas com processo inflamatório, justificado pela resposta do organismo na neovascularização estimulada por mediadores inflamatórios, em especial as citocinas (CASTRO, 2012).

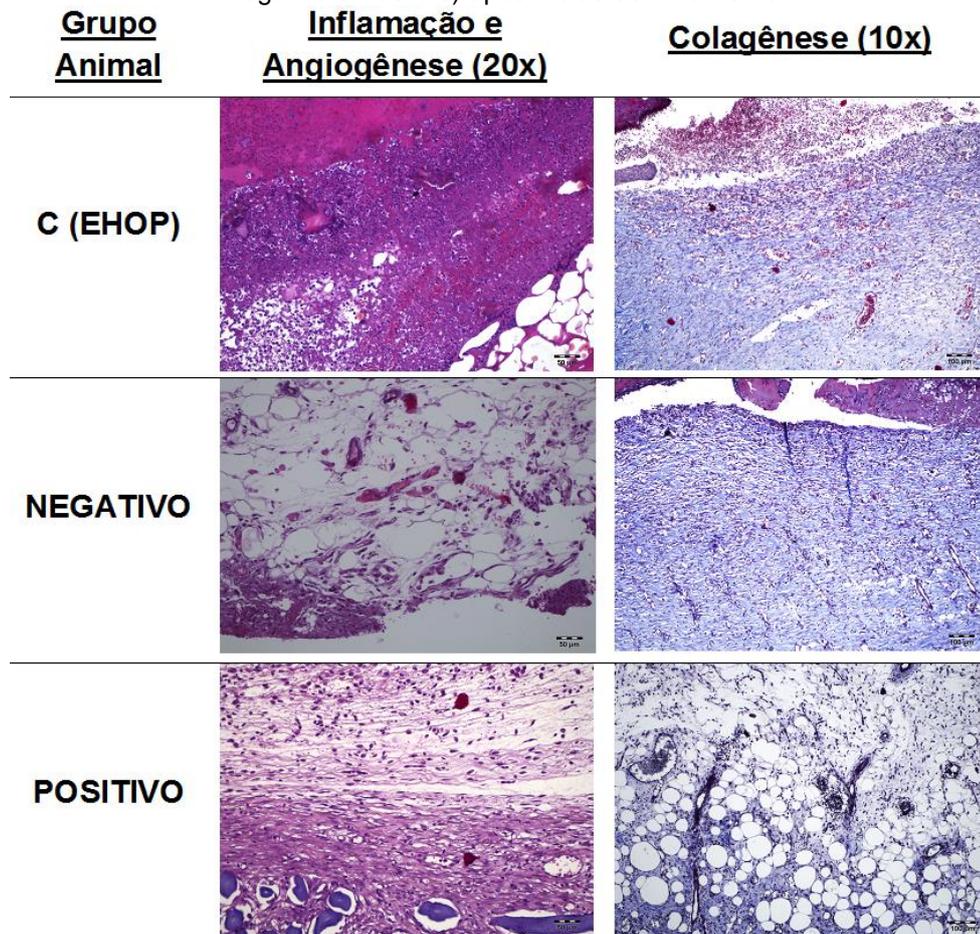
Figura 32 - Fotomicrografia das lâminas das membranas após 7 dias de tratamento



Fonte: O autor. Mai. 2018

Observando as fotomicrografias das lâminas dos grupos negativo, positivo e extrato, podemos observar também as diferenças visuais similares a apresentadas na Tabela 5, pois há uma presença mais intensa de células de resposta inflamatória e angiogênese no grupo tratado com extrato, comparado ao grupo negativo e positivo.

Figura 33 - Fotomicrografias das lâminas dos grupos não tratados com membrana (EHOP, Negativo e Positivo) após 7 dias de tratamento



Fonte: O autor. Mai. 2018

7.9.3 Avaliação histológica após 14 dias de lesão

Na Tabela 6 é possível observar que as maiores médias nos escores de inflamação foram obtidas pelos grupos que receberam a membrana de PVA (B1 e B2). Observou-se que na avaliação inflamatória após 14 dias de tratamento o grupo B2 (PVA com EHOP) foi significativamente diferente do grupo Negativo e Positivo. Os demais grupos (A1, A2, B2, C, Negativo e Positivo) não tiveram diferença significativa quando comparados entre si.

Avaliando a Angiogênese dos grupos, podemos observar as maiores médias nos grupos A2 e C em relação aos outros grupos, com diferença significativa do grupo B2 e Positivo. Nota-se ausência de diferença significativa com os demais grupos. Através destes dados, podemos observar que a resposta inflamatória foi mais intensa

em dois grupos distintos, porém a angiogênese associada à resposta inflamatória foi presente somente no grupo C (EHOP). Como hipótese para esta questão, podemos esperar que a atividade de modulação inflamatória dos alcalóides presentes no EHOP foram biologicamente ativos nos grupos A2 e C, porém não tiveram sua atividade moduladora no grupo B2, talvez pela forte interação entre estes compostos na membrana, impedindo sua liberação ao leito da ferida.

Tabela6 – Avaliação histológica das lesões após 14 dias

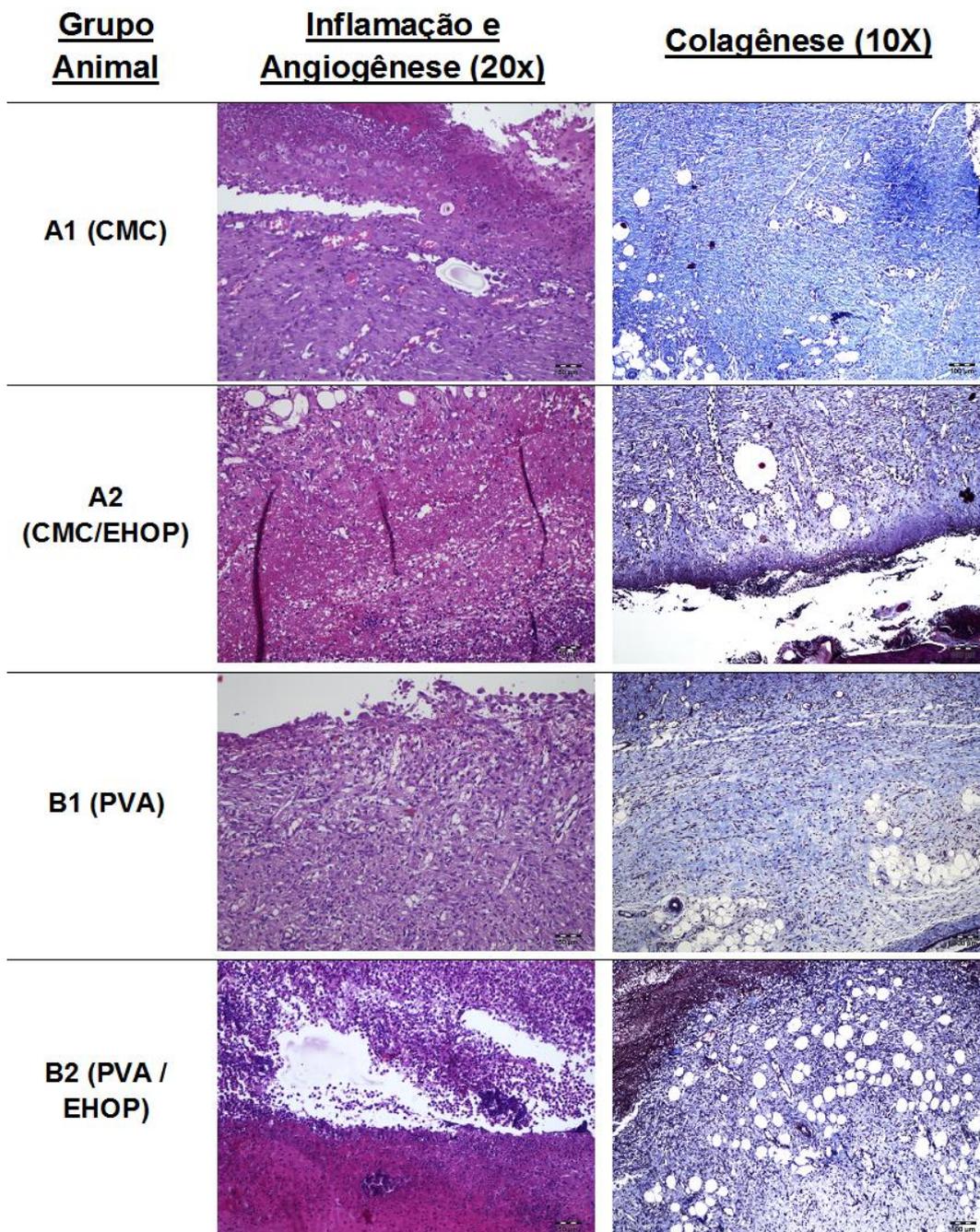
Grupo Animal	Inflamação	Angiogênese	Colagênese
	Média +- dP	Média +- dP	Média +- dP
A1 (CMC)	1,6000 +- 0,547 ^{ab}	1,4000 +- 0,547 ^{ab}	2,4000 +- 0,547 ^{acd}
A2 (CMC/EHOP)	1,4000 +- 0,547 ^{ab}	2,4000 +- 0,547 ^a	1,2000 +- 0,447 ^{bc}
B1 (PVA)	1,6000 +- 0,894 ^{ab}	1,8000 +- 0,836 ^{ab}	1,2000 +- 0,447 ^{bc}
B2 (PVA/EHOP)	2,4000 +- 0,547 ^a	1,2000 +- 0,447 ^b	1,6000 +- 0,547 ^{abcd}
C (EHOP)	2,0000 +- 0,707 ^{ab}	2,4000 +- 0,547 ^a	1,6000 +- 0,547 ^{abcd}
Negativo	1,2000 +- 0,447 ^b	1,6000 +- 0,547 ^{ab}	2,6000 +- 0,547 ^{ad}
Positivo	1,0000 +- 0,000 ^b	1,2000 +- 0,447 ^b	1,4000 +- 0,547 ^c

OBS: Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Fonte: O autor. Abr. 2018

Observando a colagênese após 14 dias podemos notar diferenças distintas entre o grupo A1 e Negativo aos demais, pela maior média relacionado à presença de fibras de colágeno, com diferença significativa aos grupos A2, B1 e o Controle Negativo também com o grupo C (EHOP). A colagênese destes grupos corrobora com dados obtidos na análise de retração de feridas, onde estes mesmos dois grupos foram os que obtiveram maior Índice de Cicatrização da Lesão (ICL) comparando aos demais grupos. Esta característica de intensificação de fibras de colágeno e redução da angiogênese é presente na fase de remodelagem da cicatrização, onde há contração da lesão no intuito de promover a maturação da cicatriz.

Figura 34 - Fotomicrografia das lâminas das membranas após 14 dias de tratamento

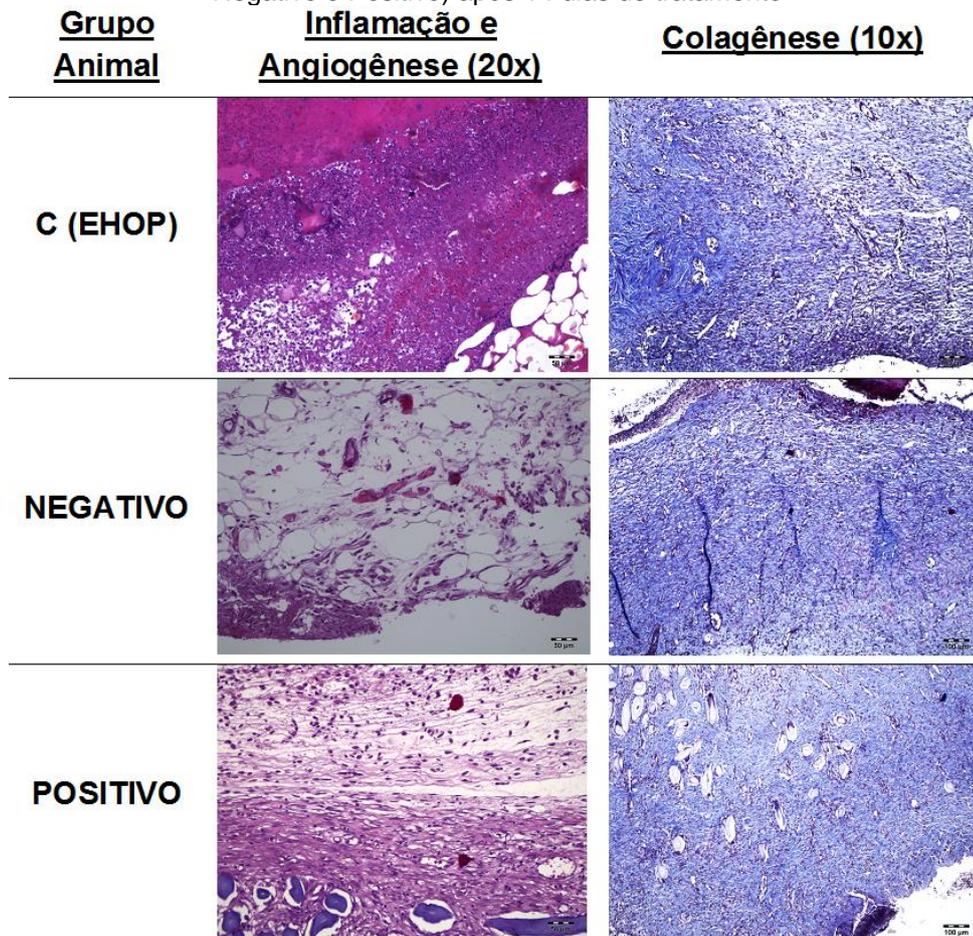


Fonte: O autor. Mai. 2018

Ilustra-se acima também as fotomicrografias dos grupos estudados e suas diferenciações em avaliação das membranas e controles / extrato. Observa-se diferenças distintas na presença de celularidade e infiltrado inflamatório entre os grupos, associado a alteração da angiogênese e aumento da deposição de fibras de colágeno (CAETANO, 2012).

Observando as fotomicrografias abaixo das lâminas dos grupos negativo, positivo e extrato, podemos observar também as diferenças visuais similares a apresentadas na Tabela 6, pois há uma presença mais intensa de células de resposta inflamatória e angiogênese no grupo tratado com extrato, comparado ao grupo negativo e positivo; e um maior apresentação de fibras de colágeno dispersas por toda área da lesão no grupo negativo.

Figura 35 - Fotomicrografias das lâminas dos grupos não tratados com membrana (EHOP, Negativo e Positivo) após 14 dias de tratamento



Fonte: O autor. Mai. 2018

7.9.4 Avaliação histológica após 21 dias de lesão

Os dados histológicos foram coletados de acordo com as fases de cicatrização e organizados de acordo com os escores para quantificação. Na Tabela 7 é possível observar que as maiores médias nos escores de inflamação foram obtidas pelos

grupos que receberam o extrato (A2, B2 e C). Observou-se que na avaliação inflamatória após 21 dias de tratamento o grupo A2 e B2 foram significativamente diferentes do grupo A1, Negativo e Positivo. Os demais grupos (A1, B1, C, Negativo e Positivo) não tiveram diferença significativa quando comparados entre si.

Tabela 7 – Avaliação histológica das lesões após 21 dias

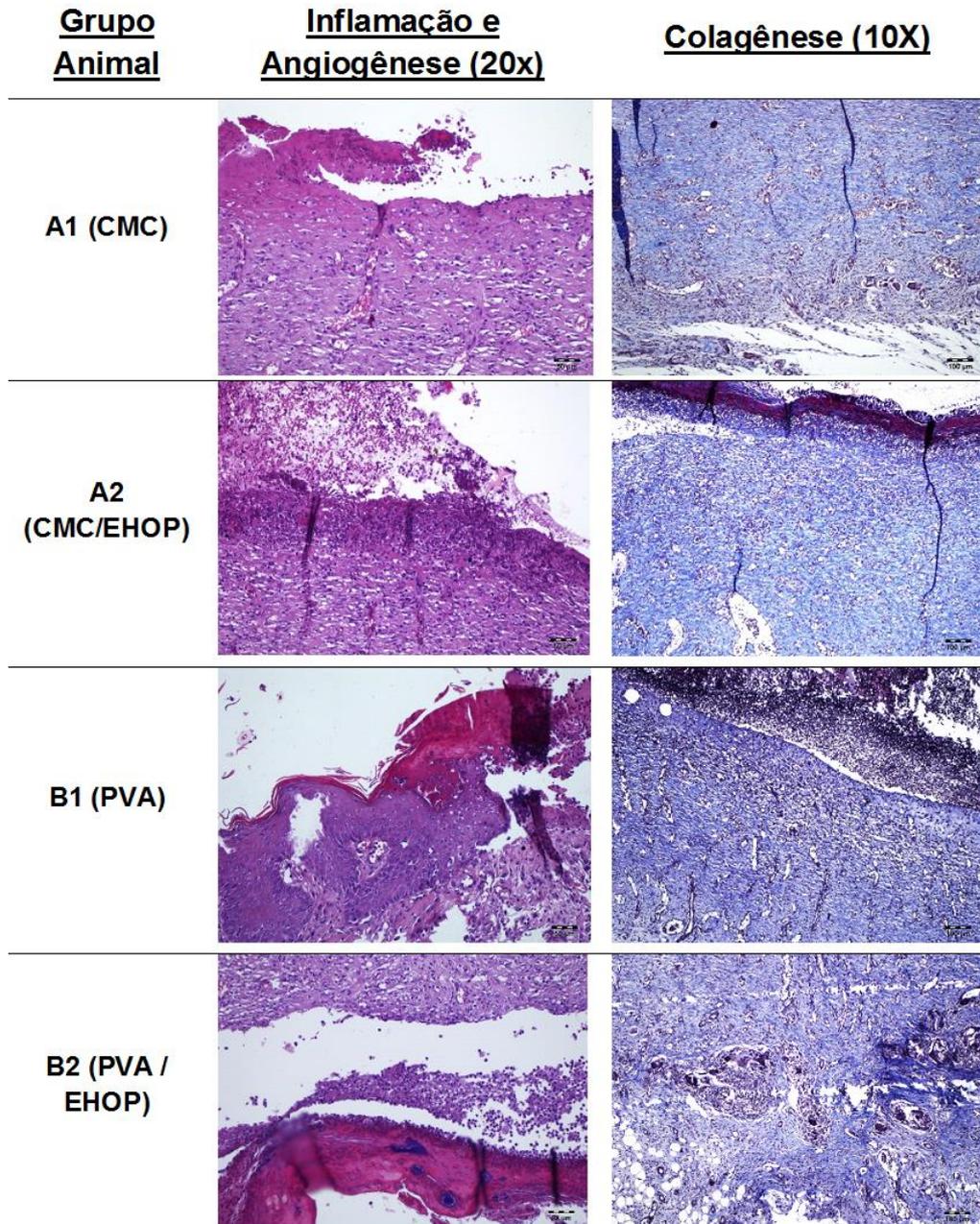
Grupo Animal	Inflamação	Angiogênese	Colagênese
	Média +- dP	Média +- dP	Média +- dP
A1 (CMC)	1,0000 +- (0,000) ^{ac}	2,6000 +- (0,547) ^a	1,6000 +- (0,894) ^{ab}
A2 (CMC/EHOP)	1,8000 +- (0,447) ^b	2,0000 +- (0,000) ^{ab}	2,6000 +- (0,547) ^a
B1 (PVA)	1,4000 +- (0,547) ^{abc}	1,2000 +- (0,447) ^b	2,4000 +- (0,547) ^{ab}
B2 (PVA/EHOP)	1,8000 +- (0,447) ^b	1,2000 +- (0,447) ^b	1,2000 +- (0,447) ^b
C (EHOP)	1,4000 +- (0,547) ^{abc}	1,6000 +- (0,547) ^b	2,0000 +- (0,707) ^{ab}
Negativo	1,0000 +- (0,000) ^{ac}	1,4000 +- (0,547) ^b	2,4000 +- (0,547) ^{ab}
Positivo	1,0000 +- (0,000) ^{ac}	1,2000 +- (0,447) ^b	2,6000 +- (0,547) ^a

OBS: Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Fonte: O autor. Abr. 2018

Ilustra-se abaixo também as fotomicrografias dos grupos estudados e suas diferenciações em avaliação das membranas e controles / extrato. É importante salientar que ao avaliar a angiogênese dos grupos, podemos observar as maiores médias nos grupos A1 e A2 em relação aos outros grupos, com diferença significativa do grupo A1 em relação aos demais grupos. Nota-se que os demais grupos, com exceção do grupo A1 não tiveram diferença significativa, conforme análise estatística. Observando a colagênese após 21 dias podemos afirmar que os grupos A2 e Positivo foram os grupos com melhor desempenho na análise de proliferação de fibras de colágeno, porém apresentou diferença significativa apenas com o grupo B2, que foi o tratamento com pior desempenho em formação de colágeno.

Figura 36 - Fotomicrografia das lâminas das membranas após 21 dias de tratamento

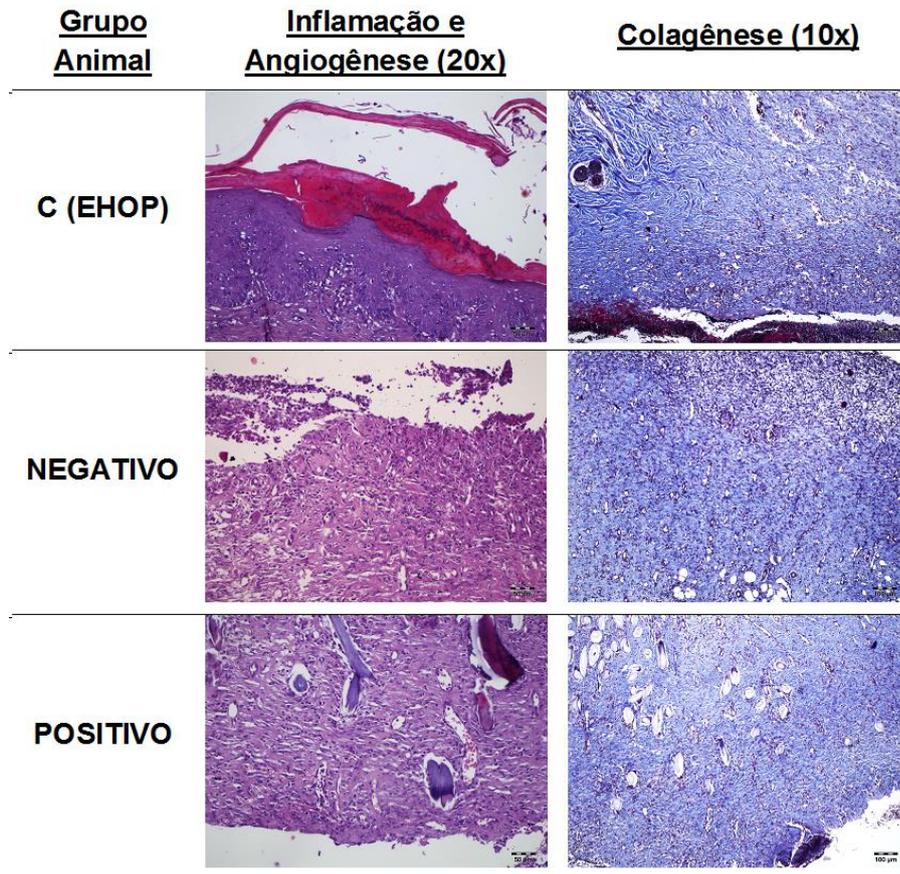


Fonte: O autor. Mar. 2018

Nota-se na ilustração acima um maior infiltrado inflamatório nos grupos A2 e B2 e uma angiogênese mais intensa nos grupos A1 e A2. Em relação à colagênese percebe-se uma pigmentação azulada mais intensa nos grupos A2 e B1, comparado aos outros grupos de membranas. Através destes dados, podemos definir que o grupo tratado com CMC associado a EHOP teve melhor resposta inflamatória, associado a

angiogênese presente e maior disseminação de fibras de colágeno no leito da ferida, quando comparado aos outros grupos de membranas avaliadas.

Figura 37 - Fotomicrografias das lâminas dos grupos não tratados com membrana (EHOP, Negativo e Positivo) após 21 dias de tratamento



Fonte: O autor. Mar. 2018

Nota-se na ilustração acima um maior infiltrado inflamatório no grupo C, assim como uma angiogênese mais intensa. Em relação à colagênese percebe-se uma pigmentação azulada intensa nos grupos ambos os grupos (C, Negativo e Positivo), discretamente aumentada no grupo Negativo. Através destes dados, podemos definir que o grupo tratado com EHOP puro teve melhor resposta inflamatória, associado a angiogênese presente e similar disseminação de fibras de colágeno no leito da ferida, quando comparado aos outros grupos negativo e positivo.

7.9.5 Análise bioquímica de nefro e hepatotoxicidade

A utilização de animais de laboratório é de suma importância nas pesquisas na busca do desenvolvimento da ciência e tecnologia, desde o aperfeiçoamento dos métodos de prevenção, diagnóstico até o tratamento de diversas doenças. Por essa razão, o conhecimento dos valores dos diferentes parâmetros fisiológicos, como função hepática e renal é significativo para a avaliação de modificações induzidas por testes experimentais e permite avaliar através dos resultados obtidos a confiabilidade na aplicação de um composto livre de potencial tóxico ao ser vivo. Os resultados estão demonstrados na tabela abaixo, sendo expressados os dados de Uréia e Creatinina em mg/dL; transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) em UI/L.

Tabela 8 – Avaliação bioquímica dos grupos em Nefro e Hepatotxicidade

Grupo Animal	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	TGO (UI/L)	TGP (UI/L)
	Média +- dP	Média +- dP	Média +- dP	Média +- dP
Negativo	40,37 +- (5,45) ^a	0,350 +- (0,061) ^{ab}	73,38 +- (15,67) ^{ab}	59,50 +- (11,49) ^{ab}
Positivo	37,00 +- (6,72) ^a	0,324 +- (0,054) ^{ab}	69,80 +- (20,16) ^a	49,87 +- (14,20) ^a
A1 (CMC)	43,87 +- (5,60) ^a	0,329 +- (0,042) ^{ab}	95,13 +- (23,78) ^b	67,20 +- (10,39) ^b
A2 (CMC/EHOP)	42,00 +- (8,29) ^a	0,302 +- (0,063) ^a	86,33 +- (25,47) ^{ab}	59,93 +- (16,75) ^{ab}
B1 (PVA)	44,13 +- (10,95) ^a	0,337 +- (0,091) ^{ab}	95,27 +- (28,85) ^b	62,93 +- (12,48) ^{ab}
B2 (PVA/EHOP)	37,43 +- (4,05) ^a	0,352 +- (0,050) ^{ab}	82,43 +- (10,07) ^{ab}	66,43 +- (14,06) ^b
C (EHOP)	41,40 +- (4,03) ^a	0,371 +- (0,048) ^b	86,60 +- (13,90) ^{ab}	65,13 +- (6,12) ^b

OBS: Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Fonte: O autor. Abr. 2018

As amostras sanguíneas foram coletadas por punção intra-cardíaca em todas as fases de cicatrização e realizado uma média entre os valores de todas as amostras (15 amostras de cada grupo). As análises foram obtidas através do Autoanalisador Winier Lab CT 300i, com testes de calibração e controles de qualidades prévias, estes realizados no Laboratório Escola da UEPG, sob a supervisão técnica da Prof. Me Márcia Viviane Marcon.

Ao analisar os valores de uréia, podemos observar uma maior média no grupo B1 e menor média no grupo Positivo, porém sem diferença significativa. Na análise de dosagem de creatinina, notamos maiores médias no grupo C e menor média no grupo A2, com diferença estatística entre estes, porém o grupo de maior valor não teve

diferença estatística com o grupo Negativo, este o qual não recebeu nenhum tratamento, sugerindo como controle para a avaliação dos demais grupos.

Em artigos científicos observa-se valores de uréia e creatinina acima do valor encontrado em outros biotérios, como descrito por Dantas (2006), com valor de uréia de 48mg/dL +- 7,6 e creatinina de 0,5 mg/dL +-0,07. Melo et al. (2012), também observou em seu estudo com ratos Wistar valor médio de uréia de 35,9mg/dL +- 3,58 e creatinina de 0,5 mg/dL +- 0,05. Podemos assim sugerir que as análises bioquímicas não evidenciaram potencial nefrotóxico ao aplicar sob as lesões dos ratos testados nesta pesquisa.

Complementando a análise de toxicidade, foi realizado quantificação de valores de TGO e TGP dos grupos testados quando ao potencial de cicatrização. Em avaliação dos valores de TGO, podemos observar a menor média apresentada pelo grupo Positivo e as maiores média pelo grupo A1 (CMC) e B1 (PVA), com diferença estatística entre estes grupos. Os demais grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre os extremos de médias, como é o caso do Grupo Negativo que não foi diferente significativamente dos grupos A1 e B1.

Ao realizar análise similar aos valores de TGP, podemos observar a menor média no grupo Positivo e as maiores médias nos grupos B2 (PVA/EHOP) e C (EHOP) com diferença significativa. Entretanto, o grupo Negativo não foi diferente de nenhum dos grupos testados. Buscando dados em literatura, observa-se valores de TGO e TGP similares aos grupos pesquisados, sugerindo, portanto, ausência de potencial hepatotóxico na aplicação de membranas com EHOP em modelos de feridas em ratos (DANTAS, 2006; MELO et al., 2012).

8 CONCLUSÃO

Através deste trabalho concluímos que a canela guaicá (*Ocotea puberula*) é uma planta de ampla distribuição na região dos Campos Gerais, onde sua extração do caule, secagem e trituração em pó obtém um rendimento adequado. A obtenção da mucilagem pela técnica de extração hidroalcoólica é uma opção de baixo custo para disponibilização do fitomedicamento, onde as possibilidades de extração com emprego de calor ou por maceração dinâmica a temperatura ambiente tem respostas similares e o rendimento através do emprego do calor até 60°C mantém as propriedades químicas similares à extração em temperatura ambiente. Observa-se uma maior proporção de compostos alcalóides na extração a quente, conforme ilustrado na DTG dos extratos. Portanto, a utilização da extração com emprego de calor é uma opção adequada para disponibilização da mucilagem da *Ocotea puberula*.

A análise reológica do EHOP obteve importantes dados referentes a comportamento sob tensão, mantendo sua estrutura e absorvendo forças de tração sem deformar-se, podendo observar o seu caráter mais elástico do que viscoso, denotando a sua resistência e potencial aplicação nas lesões e formação de membranas. As formulações tópicas para aplicação em feridas foram obtidas através da incorporação do EHOP com concentração de 10% em membranas de CMC e PVA. Através de análises em FTIR podemos notar estabilidade química na reticulação da associação de PVA/EHOP, porém não foi duplicado estas características na reticulação da associação de CMC/EHOP.

A aplicação em modelo de lesão animal em ratos Wistar foi adequada, podendo ser observado a evolução da cicatrização das lesões e as diferenciações entre os grupos. Pelas características do animal de formar lesões altamente exsudativas, a ausência de membranas com potencial de retenção de umidade foi transmitida em melhor potencial de regressão das lesões. Observou-se, porém, que as membranas de CMC obtiveram melhor performance tanto pelo ICL quanto pelas análises histológicas. O grupo tratado com EHOP puro também obteve importantes resultados em potencial cicatricial, quando comparado ao controle positivo de Megisorb, um curativo com potencial cicatrizante e antimicrobiano conhecido largamente entre os

profissionais de saúde. As análises bioquímicas denotaram ausência de atividade nefrotóxica ou hepatotóxica.

Podemos assim concluir que a aplicação de membranas de CMC/EHOP e o EHOP isolado em lesões experimentais em ratos provém atividade cicatrizante, com modulação inflamatória e estímulo na angiogênese das lesões, assim como regressão significativa das lesões após 21 dias de tratamento. Nota-se também que a aplicação da mucilagem das cascas da *Ocotea puberula* são seguras, livre de ação tóxica aos rins e fígado, podendo assim expor cientificamente a eficácia do conhecimento etnobotânico dos índios sobre esta planta.

9 PERSPECTIVAS

Espera-se estudos posteriores sobre a *Ocotea puberula* explorando seu potencial fitoterápico devido a presença de alcalóides aporfinóides, com possibilidade de ação anti-inflamatória e analgésica, conforme pesquisas preliminares citadas nesta dissertação.

Observa-se através das características macroscópicas das feridas após a utilização das membranas um teor de exsudato purulento intenso, denotando possível inatividade antibacteriana, podendo ser realizado estudos posteriores acerca do assunto e associar antimicrobianos nas membranas para promoção de melhor controle bacteriano do leito da ferida. Outro fato a ser considerado é a utilização de adjuvantes nas membranas que propiciem melhor controle de umidade dos curativos tópicos ao ser aplicado em lesões exsudativas

Busca-se, portanto a associação do EHOP com as membranas semipermeáveis e testes de cicatrização com diferentes concentrações de fitomedicamento, não apenas 10% como apresentado neste estudo. Outra opção a ser estudada é a formação de membrana com o EHOP puro através da identificação de um reticulador que propicie a formação de um curativo semipermeável com maior fração botânica na sua formação, visto o potencial reológico do EHOP.

Os estudos futuros com a presente espécie, assim como os realizados neste trabalho visam principalmente a utilização da planta em feridas agudas e crônicas na população em geral, fornecendo um tratamento eficaz com custos reduzidos promovendo a valorização da planta como espécie medicinal, atualmente um adjetivo ausente para a Canela Guaicá comumente presente nos Campos Gerais de Ponta Grossa-PR, Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. M.; RENAUD, B. G.; OLIVEIRA, B. Atendimento a pacientes com feridas crônicas nas salas de curativos das policlínicas de saúde. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 152, p. 42-49, jun. 2013.
- ABRUCEZE, L. H. B. et al. Avaliação da eficácia dos biocurativos em ratos *Wistar* com lesões de pele causadas por queimaduras. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 68, p. 12-17, 2014.
- ALVES, D. F. et al. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 188-193, mai./jun. 2008.
- ANDRADE, F. G.; FERRARI, O. **Atlas Digital de Histologia Básica**. 1. ed. Londrina: UEL [livro eletrônico], 2014. 124 p.
- ANNABI, N. et al. Engineering a sprayable and elastic hydrogel adhesive with antimicrobial properties for wound healing. **Biomaterials**, v. 139, p. 229-243, 2017.
- ARAUJO, A. J. **Estudo fitoquímico das folhas de *Ocotea puberula* (Reich.) Nees (LAURACEAE)**. 2000, 110 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Pós-Graduação em Química, Universidades Federal do Paraná, Curitiba, 2000.
- ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina, v. 6, n. 2, p. 1-6, jun. 2005.
- ATZINGEN, D. A. N. C. V. et al. Gel da casca de *Musa sapientum* verde no reparo de lesões operatórias em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n. 5, p. 379-382, 2011.
- BARALLE, F. et al. Dehydroocoteine and didehydroocoteine from *Ocotea puberula*. **Experientia**, v. 28, p. 875-876. 1972.
- BASTOS, M. L. A. et al. Antimicrobial and wound healing activities of *Piper hayneanum*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 213-222, 2011.
- BASU, P.; KUMAR, U. N.; MANJUBALA, I. Wound healing materials: a perspective for skin tissue engineering. **Current Science**, v. 112, n. 12, p. 2392-2404, 2017.
- BATISTA, J. S. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum Wittm*) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 77, n. 3, p. 441-447, jul./set. 2010.
- BERGO, A. M. A. et al. **Protocolo de prevenção e tratamento de feridas**. Prefeitura de São Paulo: Comissão de prevenção e tratamento de feridas COGESP. 1. ed. São

Paulo, 2011. Disponível em: <
http://www.ee.usp.br/departamento/ens/sel/protocol_feridas.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2018.

BERNARDO, T. H. L. et al. Antimicrobial Analysis of an Antiseptic Made from Ethanol Crude Extracts of *P. granatum* and *E. uniflora* in *Wistar* Rats against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de ciência, tecnologia e insumos estratégicos. Departamento de assistência farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília. 2006b. 60 p.

BROTTO, M. L. **Estudo taxonômico do gênero *ocotea* aubl. (lauraceae) na floresta ombrófila densa no estado do Paraná, Brasil**. 2010, 92 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Pós-Graduação em Botânica do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

CALDATO, S. L.; VERA, N.; DONAGH, P. M. Estructura poblacional de *Ocotea puberula* em um bosque secundário y primário de la selva mixta misionera. **Ciência Florestal**, v. 13, n. 1, p. 25-32, 2002.

CAETANO, G. F. **Biomembrana de quitosana-alginato na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia ESP / Instituto Butantan /IPT para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. 89 pag. Universidade de São Paulo USP, São Paulo, 2012

CAMPOS, A. A. G. **Protocolo de cuidados de feridas**. Secretaria Municipal de Saúde. Florianópolis/ SC 2007. Disponível em: <
http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/26_10_2009_10.46.46.f3edcb3b301c541c121c7786c676685d.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2018.

CAMPOS, B. et al. Extração da mucilagem da chia e uso em sorvete como emulsificante. In: Simpósio nacional de bioprocessos e simpósio de hidrólise enzimática de biomassa. 20., 2015. **Anais...** Fortaleza: UEM, 2015. Disponível em: <
<https://proceedings.science/sinaferm/sinaferm-2015/trabalhos/extracao-da-mucilagem-da-chia-e-uso-em-sorvete-como-emulsificante>>. Acesso em: 10 ago. 2018.

CAO, X., et. Al. **New nanocomposite materials reinforced with cellulose nanocrystals in nitrile rubber**. *Polymer Testing* Vol 32, pag 819–826, 2013.

CARVALHO, P. E. R. **Canela Guaicá**: ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. 2002. Disponível em: <
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/307285/1/CT0062.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2018.

CASTELO BRANCO NETO, M. L. et. al. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. Sup.2, p. 17-22, 2006.

COELHO, J. M. et al. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, p. 45-51, 2010.

COELHO, M. C. O; REZENDE, M. F.; TENÓRIO, A. P. M. **Contração de Feridas após Cobertura com substitutos temporários de pele**. Revista Ciência Rural, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 297-303, 1999.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.
CUSTÓDIO, D. L.; VEIGA JÚNIOR, V. F. Lauraceae alkaloids. **RSC Advances**, v. 4, p. 21864-21890, 2014.

CZEPULA, A. I. S. **Desenvolvimento de preparações semi-sólidas contendo extrato de *Sphagneticola trilobata* (L.) pruski (*acmela brasiliensis*, *wedelia paludosa*) (asteraceae) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica *in vivo***. 2006, 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Uiversidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

DANTAS, J. A. et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do biotério central da universidade estadual de Maringá, estado do Paraná. **Acta scientiarum. Health sciences**. Maringá, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

FARAGO, P. V. et al. **Análise farmacognóstica das cascas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae**. Revista Brasileira de Farmácia, v. 85, n. 1, p. 23-26, 2004.

FILIZOLA, B. C. S., BONESSO, M. **Boas Práticas de Manejo para o Extrativismo Sustentável de Cascas**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza. 2015. 108 p.

GATNER, L. P. et al. **Tratado de Histologia em Cores**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

GIRARDI, R. C. G. **Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato**. 2005, 101 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Programa de Pós Graduação em Bioengenharia, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

GOGIA, P. P. **Feridas: tratamento e cicatrização**. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

GOMES, A. L. P. **Fitoterápicos da RENAME 2012, possibilidades de inclusão na padronização de medicamentos da Fundação Hospital Maternidade Santa Theresinha-RJ**. 2013, 36 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em

Gestor da Inovação em Fitomedicamentos) – Programa de Pós-Graduação em Gestor da Inovação em Fitomedicamentos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

INPANYA, P. et al. Effects of the blended fibroin/aloe gel film on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedical Materials**, v. 7, n. 3, p. 035008, 2012.

ITURRIAGA, L.; SÁNCHEZ, S.; CORVALÁN, M. **Solubility solubility of dispersions of *Opuntia ficus-indica***. VI International Congress on Cactus Pear and Cochineal, João Pessoa, Paraíba, Brasil, 2007

JACOBUCCI, G. A. Ocoteina, un alcaloide aislado de la corteza de *Ocotea puberula* (Rich.) Ness. **Anales de la Asociación química Argentina**, v. 42, n. 1, p. 18-19, 1954.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2013. 322 p.

JRIDI, M. et al. Wound healing activity of cuttlefish gelatin gels and films enriched byhenna (*Lawsonia inermis*) extract. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 512, n. 1, p. 71-79, 2017.

KIMA, J. O. et al. Nitric oxide-releasing chitosan film for enhanced antibacterial and in vivo wound-healing efficacy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, n. 1, p. 217-225, 2015.

KIM, J. Y. et al. Wound healing efficacy of a chitosan-based film-forming gel containing tyrothricin in various rat wound models. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 1, p. 229-238, 2015.

KRAUSZ, A. E. Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, p. 195-206, 2015.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Kidlington Oxford, v. 2, n. 3, p. 171-174, 2001.

KÜHNEL, W. et al. **Histologia: texto e atlas**. 12. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012. 544 p.

LI, X. et al. In vivo evaluation of curcumin nanoformulation loaded methoxy poly(ethyleneglycol)-graft-chitosan composite film for wound healing application. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 84-90, 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, vol. 2. 1998.

MANSUR, H. et al. FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 539-548, 2008.

MEDEIROS. A. C.; DANTAS FILHO, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of Surgical Research**, v. 7, n. 2, p. 87-102, 2016.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem wistar) provenientes do biotériocentral da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 9, p. 1-6, 2012.

MENDONÇA, R. S. C.; RODRIGUES, G. B. O. As principais alterações dermatológicas em pacientes obesos. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 68-73, 2011.

MEIRELES, I. B.; SILVA, R. C. L. Fundamentos biológicos para o atendimento ao portador de lesão de pele. 2. ed. In: SILVA, R. C. L.; FIGUEIREDO, N. M. A.; MEIRELES, I. B. (Org.). **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem**. São Caetano do Sul: Yendis, 2008.

MESQUITA, R. M. G. R. **Caracterização do tratamento de feridas complexas em um Hospital Geral**. 2013, 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2013.

MINUSSI, R. C. et al. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry, Oxon**, v. 82, n. 3, p. 409-416, 2003.

MONTANARI, T. **Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. 3. ed. Porto Alegre: Editora da autora , 2016.

MONTRUCCHIO, D. P. et. al. Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 78, p. 1543-1548, 2012.

MONTRUCCHIO, D. P.; CÓRDOVA, M. M.; SANTOS, A. R. S. Plant derived aporphinic alkaloid s-(+)-dicentrine induces antinociceptive effect in both acute and chronic inflammatory pain models: evidence for a role of trpa1 channels. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1-9, 2013.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v.47, n.1, p. 1-19, 1979.

NAKASHIMA, T. **Étude phytochimique, évaluation des activités antifongiques et antivirales de trois Verbenaceae: *Lippia alba* N.E.Brown, *Lippia multiflora* Mold. e *Citharexylum myrianthum* Cham.**. Thèse (Docteur), Institute National Polytechnique de Toulouse. Toulouse, France. 1993.

NIEHUES, E. et al. Caracterização reológica da mucilagem de *Cereus hildmaniannus*. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 1-7, 2014. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1034-21461-143465.pdf>>. Acesso em: 10 de ago. 2018.

OKUMA, C. H. **Desenvolvimento de emulsões com fase gel lamelar à base de óleo de calêndula (*Calendula officinalis*) e avaliação da atividade cicatricial em úlceras cutâneas de ratos**. 2013, 90 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2013.

OLIVEIRA, S. H. S.; SOARES, M. J. G. O; ROCHA, P. S. Uso de cobertura com colágeno e *Aloe vera* no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso. **Revista escola enfermagem – USP**, v. 44, n. 2, p. 346-351, 2010.

PETZ, F. F. C. **Terapia a laser na cicatrização da úlcera por pressão em adultos e idosos: revisão sistemática**. 2015, 140 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

PÓVOAS, F. T. X. **Estudo da atividade antimicrobiana e cicatrizante de feridas em ratos do extrato etanólico de folhas de *Tabebuia aurea***. 2015, 100 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

QUEIROZ, I. S.; SILVA, C. M. R.; TESHIMA, E. **Avaliação da composição química da palma forrageira (*Opuntia ficus indica*)**. A. Ciências Exatas e da Terra - 4. Química - 4. Química de Produtos Naturais. Recife, PE. 2015

RABEH, S. H. N.; GONÇALVES, M. B. B. **Avaliação de feridas crônicas na assistência de enfermagem**. Caderno de histologia, 1ª Edição 2015 USP São Paulo. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2124718/mod_folder/content/0/U4.pdf?force_download=1. Acesso em: 10 de novembro de 2017

REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola Enfermagem USP**, v. 36, n. 3, p. 282-8, 2002.

ROCHA, F. J.; PIMENTEL, R. R.; MACHADO, S. R. Estruturas secretoras de mucilagem em *Hibiscus pernambucensis arruda* (malvaceae): distribuição, caracterização morfoanatômica e histoquímica. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 4, p. 751-763, 2011.

SANTOS, J.A.A.; SOUSA, M.F.A.M.; SILVA, E.L.V.; AGUIAR JÚNIOR, F.C.A **Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina)**

no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.16, n.3, supl. I, p.637-643, 2014

SANTOS, F. V. et al. **Manual de Curativos:** Prefeitura Municipal de Campinas, 2016, Campinas. Disponível em: <http://www.saude.campinas.sp.gov.br/enfermagem/2016/Manual_de_Curativos_2016.pdf>. Acesso em: 10 de ago. 2018.

SARHEED, O. et al. Antimicrobial Dressings for Improving Wound Healing. **InTEch Open Science**, v. 17, p. 373-398, 2016.

SARMENTO, P. A. et al. Avaliação do extrato da *Zeyheria tuberculosa* na perspectiva de um produto para cicatrização de feridas. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 22, n. 1, p. 165-72, 2014.

SILVA, E. S. **Feridas crônicas: conhecimento e importância do tratamento sob a ótica do paciente.** 2011, 63 f. Monografia (Especialização em Saúde Pública) – Programa de Pós-Graduação em Saúde, Faculdade Adventista da Bahia, Cachoeira, 2011.

SILVA, P. N.; ALMEIDA, O. A. E.; ROCHA, I. C. Terapia tópica no tratamento de feridas crônicas. **Enfermería Global**, n. 33, Enero, p. 46-58, 2014.

SMANIOTTO, P. H. S. et al. Tratamento clínico das feridas: curativos. **Revista Médica**, v. 89, n. ¾, p. 137-141, 2010.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic - phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture, Davis**, v. 16, p. 144-149, 1965.

SOUZA, R. F. B. **Membranas de quitosana complexada com alginato e xantana: comportamento na presença de diferentes proporções de água e incorporação de eritromicina.** 2014, 118 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S. Morfo-anatomia da flor de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees (Lauraceae). **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 2, p. 343-348, 1999.

TAVARES, S. A. et al. Caracterização físico-química da mucilagem de inhame liofilizada. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 973 -979, set./out., 2011.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da Ferida e Cicatrização. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 3, n. 41, p. 259-264, 2008.

VASCONCELOS, T. L. C. 2015. **Avaliação do potencial antimicrobiano, antioxidante e cicatrizante do extrato etanólico de *Hyptis pectinata* L. Poit. (Sambacaitá).** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em

Enfermagem da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas – UFAL. Maceió, AL. 2015.

VERNENGO, M. J.; MITTEILUNGEN, K. The Structure of Ocoteine (Thalicmine). **Experientia**, v. 19, n. 6, p. 294-295, 1963.

VYAS, K.; VASCONEZ, H. C. Wound healing: biologics, skin substitutes, biomembranes and scaffolds. **Healthcare**, v. 2, n. 3, p. 356-400, 2014.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcalóides aporfinóides do gênero ocotea (lauraceae). **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 92-98, 2007

ZANIN, S. M. W. et al. Mudanças de *ocotea puberula* (lauraceae): identificação e monitoramento de alcalóides aporfinóides. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 743-747, 2011.

ZHAO, X. et al. Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as selfhealing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. **Biomaterials**, v. 122, p. 34-47, 2017.

YADAV, I. et al. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol- carboxymethyl tamarind gum based composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 165. P. 159-168, 2017.

ANEXOS

ANEXO I – Parecer Consubstanciado – CEUA

UEPGPRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 014/2016**

Protocolo UEPG – 6378/2016

Título - "Mucilagem de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees.: Caracterização química, análise reológica, desenvolvimento de fitomedicamento inovador e testes *in vivo* para cicatrização de feridas"

Interessado: Professor Dr. Luis Antonio Pinheiro

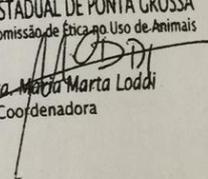
Data de Entrada – 11/05/2016**Resultado:** Aprovado**Data/Prazo** – 11/05/2016 a 11/05/2018**Considerações**

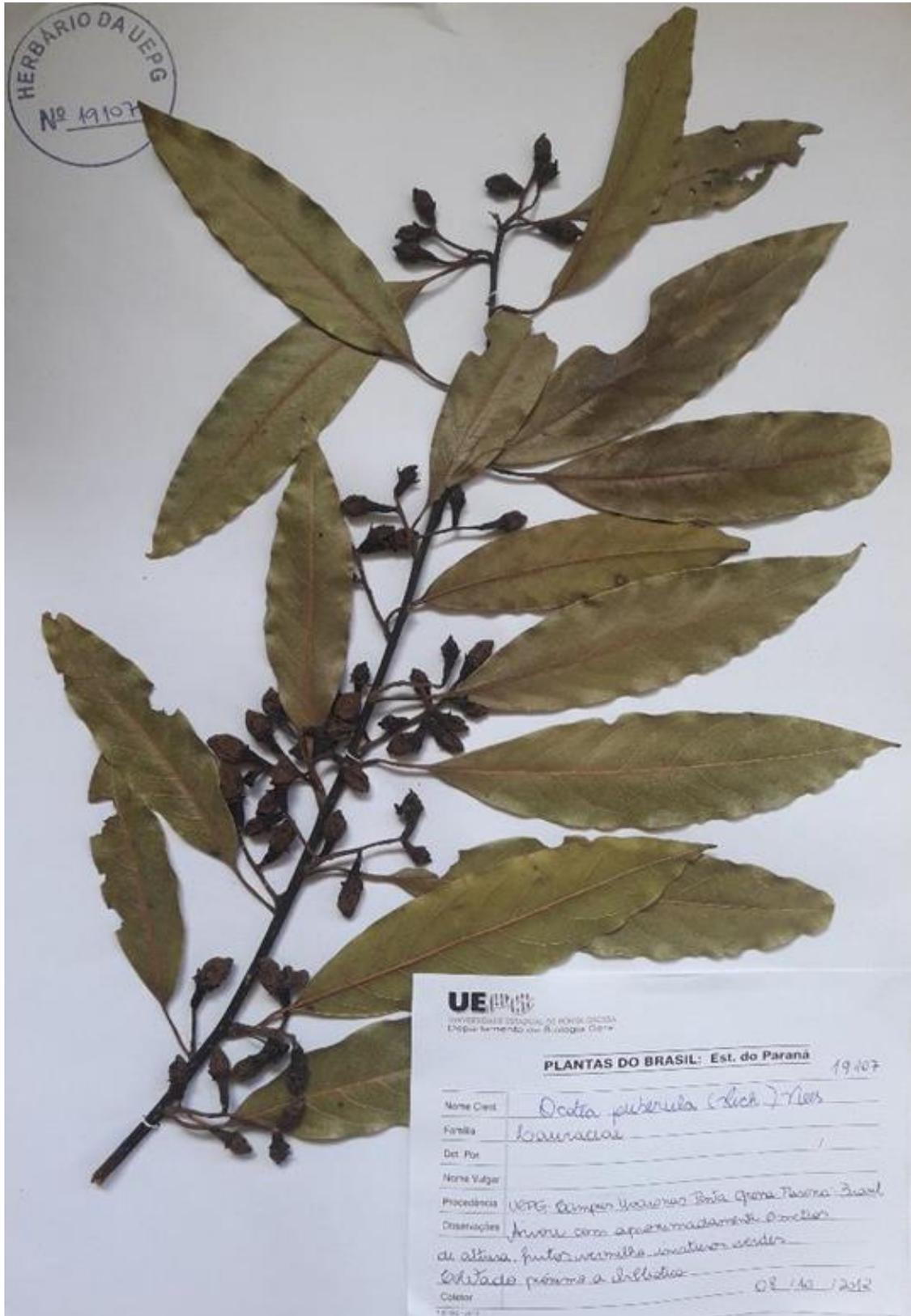
Prezado Professor Dr. Luis Antonio Pinheiro e Guilherme Arcaro

Em relação á utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização cento e quarenta ratos Wistar, machos.

Ponta Grossa, 11 de maio de 2016.

Atenciosamente

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROPESP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Prof.ª Dra. Maria Marta Loddi
CoordenadoraAv. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84 030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264

ANEXO II – Excicata *Ocotea puberula*

ANEXO III – Instrumento para realização das imagens das lesões

