

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LAIS CAROLINE DE ASSUNÇÃO MORAIS

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DE EXTRATO SECO DE *Leonurus sibiricus* (L.) NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

PONTA GROSSA

2022

LAIS CAROLINE DE ASSUNÇÃO MORAIS

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VIVO DE EXTRATO SECO DE *Leonurus sibiricus* (L.) NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em ciências farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dra. Priscileila C. Ferrari
Coorientador: Prof. Dr. Flavio Luís Beltrame.

PONTA GROSSA

2022

M827 Morais, Laís Caroline de A.
 Caracterização e avaliação *in vivo* de extrato seco de *Leonurus sibiricus*
(L.) no processo de cicatrização, Ponta Grossa, 2022 / Laís Caroline de A. Moraes.
Ponta Grossa, 2022.
 57 f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

 Orientadora: Profa. Dra. Priscileila Colerato Ferrari.

 1. Pesquisa. 2. Metodologia Científica. 3. Cicatrização. I. Ferrari, Priscileila
Colerato. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e
Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 615

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VIVO DE EXTRATO SECO DE *Leonurus sibiricus* (L.) NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

Dissertação de mestrado apresentada para a obtenção do grau de mestre em ciências farmacêuticas, na Universidade Estadual de Ponta Grossa, setor de ciências biológicas e da saúde, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ponta Grossa, 27/10/2022

Professora Dra. Priscileila Colerato Ferrari – Orientadora
Doutora em Ciência Farmacêuticas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas na UNESP - Araraquara



Professora Dra. Patrícia Mazureki
Campos Doutor em Ciência
Farmacêuticas Universidade de São
Paulo- Ribeirão Preto



Professora Dra. Thais Latansio de Oliveira
Doutor em Ciência Farmacêuticas
Universidade Federal do Paraná



AGRADECIMENTOS

Agradecer primeiramente a Deus por seu amor incondicional, onipresença em minha vida, me concedendo saúde, sabedoria, serenidade e discernimento para enfrentar os desafios que encontrei durante minha caminhada e me permitir viver este momento.

À minha família, meus pais, irmãos e à minha avó que me ensinaram honestidade, determinação e perseverança para buscar sempre novas conquistas e fazer sempre o melhor possível.

À minha orientadora Professora Priscileila por sua sabedoria, conhecimento a mim transmitido, paciência e estímulo diante das minhas limitações.

Ao meu noivo Fabio, por sempre ser presente, me apoiar e incentivar.

Aos professores Flavio Beltrame, Rosi Zanoni, Leandro Lipinski, Adriana Koga, e Airton Kirst e Márcia Paes pelo auxílio e dedicação que empenharam na realização deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório por sua empatia e pelo auxílio durante esta jornada, e demais professores da Universidade por todos os momentos memoráveis, e pelos ensinamentos ao longo dos anos, sem os quais este estudo não seria possível.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização de mais este sonho, meu muito obrigado!

RESUMO

As feridas cutâneas são caracterizadas essencialmente por uma lesão que leva a descontinuidade da estrutura da pele em diferentes graus de extensão. O processo de cicatrização é complexo e envolve diferentes etapas como hemostasia, inflamação, fase proliferativa e remodelação tecidual. Muitos fatores podem interferir nas alterações celulares e moleculares durante o processo de cicatrização, e a modulação da fase inflamatória pode acelerar este processo com menores efeitos maléficos, como a dor, edema, e presença de exsudatos. *Leonurus sibiricus* é uma planta de origem asiática que é utilizada popularmente como anti-inflamatória, contudo não há relatos científicos da sua aplicação para auxílio na cicatrização da pele. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi caracterizar os extratos aquoso e metanólico de *L. sibiricus* e avaliar a cicatrização em modelo animal tratado com gel contendo os extratos. A caracterização dos extratos foi realizada por espectroscopia de massas e os flavonóides totais foram quantificados. A cicatrização das feridas foi avaliada pela retração da lesão e regeneração tecidual em estudo histológico corado com hematoxilina-eosina e picrossirius. Diversos compostos químicos foram encontrados nos espectros dos extratos, mostrando diferente composição entre eles, principalmente no intervalo de massas de 350 a 550 m/z. Contudo, alguns compostos como ácido siringico, apigenina, luteolin-7-metil-éter, ácido clorogênico e luteolina possivelmente estão presentes nos dois extratos. Os animais tratados com os extratos apresentaram maior retração das lesões no décimo quarto dia após início do estudo em relação ao grupo controle. O estudo histológico mostrou melhor regeneração tecidual nos animais tratados com os extratos do que o grupo controle, e os animais do grupo metanólico apresentaram regeneração tecidual mais organizada com maior presença de colágeno tipo I a partir do décimo quarto dia. Assim, os extratos apresentam-se promissores para uso como cicatrizante, sendo necessários estudos mais aprofundados dos mecanismos de atuação dos compostos químicos encontrados.

Palavras-chave: Feridas, extrato vegetal, pele, espectroscopia de massas, histologia, picrossirius.

ABSTRACT

Skin wounds are essentially characterized by an injury that leads to discontinuity of the skin structure to varying the extent degrees. The healing process is complex and involves different steps such as hemostasis, inflammation, proliferative phase, and tissue remodeling. Many factors can interfere with cellular and molecular changes during the healing process, and modulation of the inflammatory phase can accelerate this process with fewer ill effects, such as pain, edema, and the presence of exudates. *Leonurus sibiricus* is a plant of Asian origin that is popularly used as an anti-inflammatory; however, there are no scientific reports of its application to help skin healing. Thus, the aim of this study was to characterize the aqueous and methanolic extracts of *L. sibiricus* and to evaluate healing in an animal model treated with gel containing the extracts. The characterization of the extracts was performed by mass spectroscopy and total flavonoids were quantified. Wound healing was evaluated by lesion retraction and tissue regeneration in histological study stained with hematoxylin- eosin and picrossirius. Several chemical compounds were found in the spectra of the extracts, showing different composition among them, mainly in the mass range of 350 to 550 m/z. However, some compounds such as siringic acid, apigenin, luteolin-7- methyl-ether, chlorogenic acid and luteolin are possibly present in both extracts. The animals treated with the extracts showed greater retraction of the lesions on the fourteenth day after the beginning of the study compared to the control group. The histological study showed better tissue regeneration in the animals treated with the extracts than in the control group, and the animals in the methanolic group showed more organized tissue regeneration with a greater presence of type I collagen from the fourteenth day on. Thus, the extracts present themselves as promising for use as cicatrizing agents, being necessary further studies on the mechanisms of action of the chemical compounds found.

Keywords: Wounds, plant extract, skin, mass spectroscopy, histology, picrossirius.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	<i>Leonurus sibiricus</i> L.	20
FIGURA 2-	Estrutura química de flavonóides isolados de folhas de <i>L. sibiricus</i>	24
FIGURA 3-	Característica do extrato líquido e seco.....	30
FIGURA 4-	Curva de calibração para flavonoides totais	31
FIGURA 5-	Espectro de massas do extrato aquoso de <i>L. sibiricus</i> , scan negativo. A. 100 a 350 m/z, B. 350 a 550 m/z, C. 550 a 1000 m/z	33
FIGURA 6-	Espectro de massas do extrato metanólico de <i>L. sibiricus</i> , scan negativo. A. 100 a 350 m/z, B. 350 a 550 m/z, C. 550 a 1000 m/z	34
FIGURA 7-	Média de massas por m/z comparativo dos extratos aquosos e metanólicos de <i>L. sibiricus</i> obtida por quimiometria	38
FIGURA 8-	Média de massas no intervalo de 350 a 550 m/z comparativo dos extratos aquosos e metanólicos de <i>L. sibiricus</i> obtida por quimiometria	38
FIGURA 9-	Formulações em gel. a. Gel base, b. Gel extrato aquoso, c. Gel extrato metanólico	40
FIGURA 10-	Imagens das lesões dos animais. GB: tempo zero, 7 dias, 14 dias e 21 dias após a lesão.....	41
FIGURA 11-	Imagens das lesões dos animais. GEA: tempo zero, 7 dias, 14 dias e 21 dias após a lesão	41
FIGURA 12-	Imagens das lesões dos animais. GEM: tempo zero, 7 dias, 14 dias e 21 dias após a lesão	42
FIGURA 13-	Áreas das lesões dos animais mensuradas nos dias zero, 7, 14 e 21	43
FIGURA 14-	Fotomicrografia da pele de ratos eutanasiados no 7º dia corados em HE. A. Grupo, controle (200x), B. Grupo gel extrato aquoso (100x), C. Grupo gel extrato metanólico (100x)	45
FIGURA 15-	Fotomicrografia da pele de ratos eutanasiados no 14º dia corados em H. A. Grupo controle (100x), B. Grupo gel extrato aquoso (100x), C. Grupo gel extrato metanólico (100x)	46

FIGURA 16-	Fotomicrografia da pele de ratos eutanasiados no 21° dia corados em HE. A. Grupo, controle (100x),B. Grupo gel extrato aquoso (100x),C. Grupo gel extrato metanólico (100x)	46
FIGURA 17-	Macrófagos em fotomicrografia no 21°. A) Grupo GB, B) Grupo GEA, C) Grupo GEM	47
FIGURA 18-	Fotomicrografia da pele de ratos eutanasiados do Grupo GB, GEA E GEM corado com picrossirius. A. 7° dia, B. 14° dia, C.....	48
FIGURA 19-	Análise estatística comparativa de colágeno tipo III e I no 14° dia. Grupo GB, GEA e GEM	50
FIGURA 20-	Análise estatística comparativa de colágeno III e I no 21° dia. Grupo GB, GEA e GEM	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Parâmetros espectrométricos utilizados para a análise.....	26
TABELA 2	Quantificação de flavonoides, em triplicata, dos extratos aquosos e metanólicos	31
TABELA 3	Compostos do rubim relatados na literatura que podem estar presentes nos extratos preparados e os picos observados nos espectros no scan negativo	35

LISTA DE SIGLAS

TNF-alfa	—	Fator de necrose tumoral
IL-6 e IL 8	—	Interleucina 6 e interleucina 8
NF-Kb	—	Nuclear fator kappa B
UEPG	—	Universidade Estadual de Ponta Grossa
Rpm	—	Rotação por minuto
P/P	—	Peso/peso
C1	—	Concentração inicial
V1	—	Volume inicial
C2	—	Concentração final
V2	—	Volume final
GEA	—	Gel com Extrato Aquoso
GEM	—	Gel com Extrato Metanólico
GB	—	Gel base
HE	—	Hematoxilina- eosina
R ²	—	R quadrado
D7	—	Dia 7 após o início do tratamento
D14	—	Dia 14 após o início do tratamento
D21	—	Dia 21 após o início do tratamento
C	—	Controle

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA PELE.....	16
3.1.1 Hemostasia.....	16
3.1.2 Fase Inflamatória.....	17
3.1.3 Formação do Tecido de Granulação	18
3.1.4 Remodelação.....	19
3.2 <i>Leonurus sibiricus</i> (L.)	20
3.3 FLAVONOIDES.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 COLETA DO MATERIAL	24
4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>L. SIBIRICUS</i>	24
4.3 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES E FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS	25
4.4 ANÁLISE DOS EXTRATOS SECOS EM LC/MS	26
4.5 PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO TÓPICA PARA INCORPORAÇÃO DOS EXTRATOS.....	27
4.6 AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA ATIVIDADE DE CICATRIZAÇÃO DO GEL CONTENDO OS EXTRATOS.....	27
4.6.1 Estudo da Cicatrização.....	27
4.6.2 Análise Histológica	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 PREPARO DOS EXTRATOS DE <i>L. SIBIRICUS</i>	30
5.2 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS	30
5.3 ANÁLISE DOS EXTRATOS EM ESPECTROSCOPIA DE MASSAS	32
5.4 INCORPORAÇÃO DOS EXTRATOS NA FORMULAÇÃO DE GEL	39
5.5 AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DA ATIVIDADE DE CICATRIZAÇÃO DO GEL CONTENDO OS EXTRATOS	40

5.5.1 Estudo da Cicatrização.....	40
5.5.2 Análise Histológica	44
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Desde o início dos tempos, as plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de diversas enfermidades e ajudam na recuperação após ferimentos, seja na forma de emplastro, cataplasma, ou chás com o objetivo de amenizar ou cessar hemorragias, aliviar dores e favorecer a regeneração de tecidos (LIMA *et al.*, 2014; VARGAS *et al.*, 2014). Para tanto, o conhecimento popular sobre estas plantas é uma importante fonte de informações que pode atuar na descoberta de novas alternativas no tratamento de diversas doenças (DUTRA *et al.*, 2016). Cerca de 65% a 80% da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, tira algum proveito do uso de plantas medicinais, especialmente na atenção primária à saúde, isso equivale a aproximadamente 3,5 a 4,0 bilhões de pessoas que usam de alguma forma, plantas para o tratamento de doenças (WONG *et al.*, 2011).

Grande maioria das plantas existentes não possui estudos científicos comprovados, isso leva à utilização de forma errônea, ou finalidade inadequada, isso devido ao fato de que a maioria da população não possui conhecimentos científicos sobre elas, resultando às vezes em efeitos adversos (RUDMAN *et al.*, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2015).

Uma ferida é caracterizada essencialmente por uma lesão que leva a descontinuidade de um tecido corpóreo, seja em menor ou maior grau de extensão, de origem por trauma físico, mecânico ou químico (ARAÚJO *et al.*, 2015). A partir do momento que se determina o tipo de ferida, é possível escolher de forma adequada o tratamento que deve ser tomado para que a recuperação do local ocorra de forma harmônica. Mesmo hoje havendo uma grande quantidade de recursos em saúde, as plantas medicinais ganham cada vez mais espaço no mercado, devido ao fato de possuírem um baixo custo e serem facilmente encontradas, sendo uma boa opção terapêutica (WANG *et al.*, 2013).

De um modo simples, as plantas medicinais são utilizadas para tratamentos de ferimentos cutâneos devido ao fato de serem atribuídas a elas propriedades terapêuticas. Algumas destas plantas possuem a capacidade de promover o

processo de coagulação, evitar o surgimento de infecções e acelerar ou interferir nas vias do processo de cicatrização favorecendo o fechamento de lesão, ou modulando a inflamação, e assim alcançando a cicatrização satisfatória (SOUZA, 2016).

A cicatrização da pele se inicia logo após ocorrer a lesão, e ocorre de forma lenta e gradativa. Clark (1993) dividiu este processo de reparo do tecido lesado em três fases, com limites quase eu sobrepostos no tempo: inflamação, formação do tecido de granulação, onde ocorre a deposição da matriz extracelular (colágeno, elastina e fibras reticulares) e a remodelação. Após ocorrer a lesão, mediadores inflamatórios levam à infiltração de neutrófilos e monócitos, angiogênese e migração de células responsáveis pela deposição de matriz extracelular, em sequência se inicia o processo de fibroplastia, e reepitelização, com exteriorização das proteínas de adesão de leucócitos que possuem grande importância com funções imunes de degradação tecidual e da produção de fatores de crescimento (BALBINO *et al.*, 2005).

Estudos farmacológicos de *Leonurus sibiricus* L., mostraram que seus componentes possuem efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, analgésicos, cardioprotetores e antibacterianos (SITAREK, 2017). O uso popular de *L. sibiricus*, conhecido popularmente como rubim é bastante amplo, porém, o mecanismo de sua atividade anti-inflamatória ainda não está bem definido.

Shin e colaboradores (2009) investigaram este efeito e observaram a inibição da secreção de TNF-alfa (fator de necrose tumoral) e interleucinas IL-6; IL 8; provavelmente por inibir a liberação de NF-kB (fator nuclear kappa B). Este fator de transcrição relacionado à capacidade imunológica, na defesa contra parasitas e regulação da expressão de genes (FRANCO, 2010). *L. sibiricus* possui ácido ursólico e iridoides que atuam inibindo as ciclo-oxigenases (ALMEIDA, 2006; GRANDO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

Diante da complexidade e variedade de compostos com atividade terapêutica presentes nas plantas, o estudo da sua composição e incorporação em novas formulações é fundamental para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que atue nos processos inflamatórios associados à cicatrização, visto

que atualmente há um grande foco nos cuidados com a pele de forma geral, especialmente em relação a marcas e sinais na pele em geral, assim as cicatrizes tornaram-se foco de preocupação, sejam elas vindas de acidentes ou cirurgias em geral. Dessa forma, o objetivo do presente projeto foi preparar extratos de *L. sibiricus*, caracterizá-los e avaliar sua atividade cicatrizante *in vivo* incorporados em uma formulação de gel para administração tópica, tendo como base o seu uso popular, na forma de emplastro, unguento e chás por grande parte da população.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade cicatrizante de formulações em gel contendo extratos de *L. sibiricus* para tratamento e aceleração do processo de cicatrização da pele.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar os extratos aquoso e metanólico da planta;
- Quantificar os flavonóides totais dos extratos;
- Preparar uma formulação de gel para incorporação dos extratos;
- Analisar os extratos em espectrofotômetro de massas e proceder à análise quimiométrica dos dados obtidos;
- Avaliar o processo de cicatrização em modelo animal, pela retração da ferida e regeneração tecidual por histologia.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA PELE

A pele é a primeira barreira protetiva do organismo, desta forma, está sujeita a ataques constantes de agentes externos, tornando assim sua capacidade de reparação muito necessária à sobrevivência (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Após ocorrer uma lesão, ocorre quase que imediatamente uma série de eventos bioquímicos, na tentativa de reparar o dano causado, assim iniciando um processo que engloba uma sequência de eventos moleculares, objetivando a restauração do tecido lesado (PAGANELA *et al.*, 2009; MENDONÇA *et al.*, 2009).

Um dano tecidual pode ocorrer por fatores extrínsecos, como um procedimento cirúrgico e lesões acidentais como um corte ou trauma, ou também devido a fatores intrínsecos, como por infecções e úlceras crônicas, alterações vasculares ou neoplasias (EBERHARDT *et al.*, 2015). O processo de cicatrização da pele se inicia logo após a lesão, tendo segmento de forma lenta e gradativa, um processo através do qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, independentemente de qual tenha sido a causa desta lesão (PANOBIANCO *et al.*, 2012). Desta forma, o processo de cicatrização tem como finalidade, restabelecer a homeostasia tecidual (CAVALCANTE *et al.*, 2012).

Após ocorrer a lesão, mediadores inflamatórios promovem à infiltração de monócitos e neutrófilos, migração de células depositoras de matriz extracelular e angiogênese, seguida de fibroplastia, e reepitelização com exteriorização das proteínas de adesão de leucócitos que possuem grande importância com funções imunes de degradação tecidual e da produção de fatores de crescimento (BALBINO *et al.*, 2005).

3.1.1 Hemostasia

Esta fase é dependente da cascata de coagulação. Após ocorrer um dano tecidual, os eventos subsequentes, como ruptura de vasos sanguíneos, com extravasamento dos seus constituintes, alterações nas células endoteliais estimulam compostos vasoativos a promoverem uma vasoconstrição imediata,

visando diminuir a perda sanguínea (KUMAR *et al.*, 2005). Ocorre então, a formação de uma cobertura primária formada por fibrina que atua realizando a captação das bordas da ferida, protegendo contra ação de organismos e restabelecendo a hemostase, fornecendo um ambiente propício para que as plaquetas atuem secretando fatores de crescimento e elementos na matriz extracelular. Mediadores do processo inflamatório recrutam células como macrófagos e neutrófilos, que secretam diversos fatores específicos, que regem as próximas fases do processo de reparação tecidual (DÁRIO, 2008; IRION, 2005; SANTORO e GINALDI, 2005).

3.1.2 Fase inflamatória

A inflamação pode se iniciar cerca de, geralmente, 24 a 48 horas após o dano tecidual, podendo se prolongar por até duas semanas. Depende, além de diversos mediadores químicos, das células inflamatórias, como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos, sendo os neutrófilos e monócitos recrutados para o local da lesão por meio de quimiocinas, que são liberadas pelos mastócitos durante a fase de homeostase, embora os monócitos tenham seu recrutamento prolongado devido à ação de quimiocinas específicas (quimiocina dos monócitos e proteína inflamatória dos macrófagos) (MANDELBAUM *et al.*, 2003, LAUREANO, 2011).

Os principais componentes celulares presentes em uma ferida são os leucócitos polimorfonucleares e os macrófagos derivados de monócitos, que aparecem no tecido lesado de forma proporcional à sua quantidade presente na circulação. Inicialmente, o tipo de célula predominante, os leucócitos polimorfonucleares têm uma vida breve e atuam principalmente com função fagocítica (NETO, 2003).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da lesão, estes são atraídos por meio de substâncias quimiotáticas liberadas por plaquetas, estas células se aderem à parede do endotélio por meio de ligação com a selectinas, que são receptores de membrana, os neutrófilos são produtores espécies reativas que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos. (WU *et al.*, 2014).

São também responsáveis pela liberação de proteases como a colagenase e elastase, permitindo assim sua passagem por membranas; os receptores de integrina que são encontrados na superfície destas células permitem a sua comunicação com matriz extracelular (MEC). Os macrófagos atuam na lise e fagocitose, tendo atividade na indução de angiogênese e formação de tecido de granulação, durante o processo de cicatrização favorecendo sua progressão para a fase proliferativa, devido esta atividade são as células consideradas como as mais importantes reguladoras da fase inflamatória. São responsáveis por liberar diversos fatores de crescimento, como fator de crescimento de endotélio vascular, de fibroblastos, TGF alfa e beta (LAUREANO, 2011).

3.1.3 Formação do tecido de granulação com deposição de matriz extracelular

Nesta fase ocorre a reparação do tecido conjuntivo e do epitélio, por meio da formação de tecido de granulação, ocorrendo a proliferação endotelial, e de fibroblastos (SARANDY, 2007).

Os fibroblastos, células mais ativas durante esta fase, iniciam a síntese e a secreção de componentes da matriz extracelular, como glicosaminoglicanos, e fibras colágenas tipo I e tipo III principalmente, associadas à proliferação e ao crescimento interno dos capilares (angiogênese) (KUMAR *et al.*, 2005). Como consequência da angiogênese promovida nesta fase, é formado o tecido conjuntivo, que é denominado tecido de granulação por possuir aparência granular devido à presença dos inúmeros capilares (WERNER, 2003).

Uma vez que o fluxo sanguíneo e a oxigenação do tecido foram restabelecidos, o fator principal responsável por desencadear a angiogênese sofre uma redução e os vasos recém-formados começam a diminuir (NETO, 2003). A partir desta redução destes vasos, se inicia a fase de contração das paredes das margens da lesão, ação realizada por fibroblastos ativados, os quais sofrem diferenciação em miofibroblastos (PAGANELA *et al.*, 2009). Estes por sua vez, aproximam as margens da lesão forçando as fibras de colágeno a se sobreporem e se entrelaçarem (PAGANELA *et al.*, 2009). Esta sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento das feridas após as lesões (RAMALHO *et al.*, 2003).

Finalizada esta fase, ocorre a epitelização, que levará ao fechamento da superfície da lesão, este processo se inicia pela migração de células epiteliais denominadas queratinócitos, a partir das margens da ferida (CARVALHO, 2002). Esta epitelização ocorre por conta do aumento da divisão, de tamanho e de migração das células da camada basal da epiderme para sobre a área de reparação. Diversos fatores de crescimento são responsáveis pela elevação de mitoses e consequente hiperplasia do epitélio (MANDELBAUM *et al.*, 2003).

3.1.4 Remodelação

A remodelação é a última fase do processo de cicatrização, ocorrendo tanto no colágeno quanto na matriz. Esta fase pode durar meses ou anos dependendo da área da lesão, e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz. É nesta fase que os elementos reparativos da cicatrização são transformados em tecido maduro com características bem diferenciadas (NETO, 2003). Durante este período de remodelagem ocorre a diminuição da atividade celular e uma queda no número de vasos sanguíneos, além também da perda do núcleo dos fibroblastos, o que leva à maturação da cicatriz (VIEIRA *et al.*, 2002).

Na fase de formação do tecido de granulação citada anteriormente, o tecido é rico em colágeno tipo III, uma fibra mais fina e delicada, que se apresenta de forma desorganizada, possuindo assim a característica de se romper com maior facilidade, e vasos sanguíneos. Já nesta fase de remodelação, o número de células na região diminui, porém eleva-se a produção de colágeno do tipo I, a fim de tornar o tecido mais resistente, fibras estas que formam feixes de várias unidades, enquanto as fibras de colágeno tipo III iniciais, que estavam orientadas de forma aleatória são digeridas pela colagenase. Gradativamente estes feixes de fibras colágenas tornam-se mais espessos pois este tipo de colágeno é o responsável por fornecer resistência e força de tração, assim a lesão torna-se mais resistente após esta maturação do colágeno. A troca entre os tipos de colágeno III e I ocorre de forma lenta, simultânea e gradativa, um equilíbrio que é resultante da atividade combinada de metaloproteinases e inibidores teciduais (OLIVEIRA, 2008).

Com o decorrer do processo de remodelação, ocorre uma elevação na deposição de colágeno e a maioria das células desaparece, podendo ser observada a apoptose de fibroblastos e células endoteliais, e finalmente formando o tecido cicatricial (BALBINO *et al.*, 2005).

3.2 *Leonurus sibiricus* (RUBIM-LAMIACEAE)

Os produtos derivados de plantas medicinais ocupam cada vez mais espaço na terapêutica dos indivíduos, eles se sobressaem pela sua eficácia e, principalmente, pelo menor número de contra-indicações e de efeitos colaterais que apresentam, quando comparados aos medicamentos sintéticos (BANDEIRA *et al.*, 2011).

A espécie *L. sibiricus* L. (Figura 1) do gênero *Leonurus* pertencente à família Lamiaceae, é um arbusto ereto, ramificado com hastes quadranguladas, folhas simples bem divididas, e flores labiadas de cor variando de azulada a roxo, dependendo da idade da planta, com sépalas rígidas que são reunidas em inflorescências axilares fasciculadas. É uma planta nativa da China, Sibéria e Japão que se expandiu em todo território brasileiro pelo seu crescimento espontâneo (FERRÃO *et al.*, 2012).

Figura 1– *Leonurus sibiricus*



(Fonte: o autor)

Morais (2019) realizou o estudo morfo-anatômico nas folhas e caule de *L. sibiricus* evidenciado que a folha apresenta consistência membranácea, com certa tumescência na superfície abaxial do limbo, e caule quadrangular com heterofilia das folhas. Na análise histológica estruturas de tricomas glandulares foram encontradas tanto nas folhas quanto no caule (DUARTE *et al.* 2005).

Esta planta é popularmente conhecida com rubim é utilizada como anti-inflamatório, principalmente para tratar pequenas contusões, como torções e pancadas, sendo aplicada diretamente na pele a planta macerada sobre o local afetado geralmente como emplastro (SILVA, 2014).

No interior de São Paulo, é utilizada como anti-inflamatória, principalmente pela população japonesa. Popularmente é utilizada em diversas regiões do Brasil contra problemas gastrintestinais, tratamentos de bronquites, coqueluche e como anti-reumática (WADT, 2008).

Estudos já realizados comprovaram seus efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, além de também ter a capacidade de induzir a expressão de óxido nítrico, que está envolvido na função muscular em geral, e relacionado à arteriosclerose. Também se encontram na literatura, além destas atividades, alguns dados a respeito da potente ação antioxidante de seus extratos, além da sua capacidade de aumentar a secreção de insulina, uma vez que, no Rio Grande do Sul a planta é utilizada para o tratamento de diabetes (ZACHOW, 2016).

Um estudo realizado por Wadt e colaboradores (1996) confirmou a atividade antimicrobiana desta espécie, através do uso do extrato hidroalcoólico a 70% (extrato bruto) contra o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, pela determinação da concentração inibitória mínima, através do método de diluição em tubo.

Estudos farmacológicos de *L. sibiricus* realizados por Sitarek (2017), mostram que seus componentes possuem efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes, analgésicos e antibacterianos. O mecanismo de sua atividade anti-inflamatória ainda não foi bem definido, contudo, Shin e colaboradores (2009) investigaram este efeito e observaram a inibição da secreção de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa)

e interleucinas IL-6; IL 8; provavelmente por inibir a liberação de NF- κ B (fator nuclearkappa B). Este é um fator de transcrição, relacionado à capacidade imunológica, na defesa contra parasitas e regulação da expressão de genes (FRANCO, 2010). *L. sibiricus* possui ácido ursólico e iridóides que atuam inibindo as ciclo-oxigenases (ALMEIDA, 2006; GRANDO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

O extrato feito a partir das folhas apresenta atividade antibacteriana, além de ajudar na prevenção de dermatites e outros problemas dermatológicos, efeitos que corroboram a sua utilização popular. Na medicina Chinesa, as sementes são consideradas afrodisíacas e a planta seca é também tonificante, podendo ser utilizada em disfunções menstruais (MAY *et al.*, 2012).

As flores e folhas são excelentes no combate de diarreias e vômitos, além de serem eficientes no tratamento de resfriados, bronquites e reumatismos. Outra atividade comprovada diz respeito ao extrato metanólico das folhas, pois pode combater células neoplásicas de glândulas mamárias, além de demonstrar atividade anti-inflamatória (MAY *et al.*, 2012).

Estudo realizado por Kim (2019) realizado através de modelo *in vitro* e em modelo animal em camundongos CD-1, com osteoporose estabelecida por injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS), investigou a hipótese de que *L. sibiricus* pode exercer atividade no metabolismo ósseo, na diferenciação osteoblástica e na osteoclastogênese. Foi observado que aos 17 e 21 dias, o *L. sibiricus* elevou a diferenciação dos osteoblastos *in vitro*, indicado pelo aumento na formação de nódulos mineralizados, e também promoveu a expressão de genes osteogênicos como RUNX2, ALP (*Alpl*), OPN (*Sparc*), OSN (*Spp1*) e COL1 (*Col1a1*). O estudo *in vivo* revelou que a administração de LPS levou a redução da densidade mineral óssea, enquanto o uso de *L. sibiricus* inibiu significativamente a redução induzida por LPS.

Sitarek (2017) ressaltou a atividade anti-inflamatória, delineada pela queda de IL-6, IL-1 β , TNF- α , e produção de interferon- γ em mastócitos estimulados por lipopolissacarídeos do óleo essencial das raízes de *L. sibiricus*.

3.3 FLAVONOIDES

Os flavonoides são metabolitos secundários de plantas produzidos por via acetato e chiquimato, sendo definidos como substâncias compostas por um núcleo formado por 3 anéis fenólicos, constituindo um grupo de polifenóis (BEEHER, 2003; TAPAS *et al.* 2008).

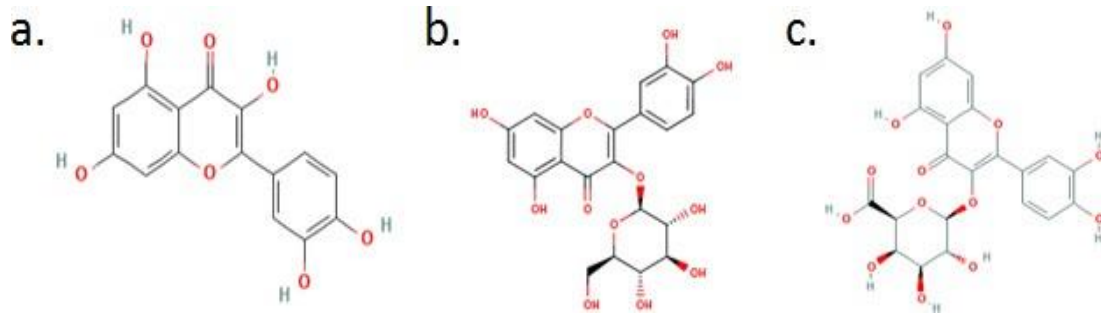
Os flavonoides são um dos grupos fenólicos de maior relevância e diversidade entre os produtos naturais, sendo amplamente distribuída no reino vegetal (SIMÕES *et al.* 2004).

Sua diversidade estrutural pode ser atribuída às variações no seu esqueleto carbônico básico, ocasionadas por reações de glicosilação, alquilação ou oligomerização (TAHARA *et al.* 2007).

Alguns flavonoides são capazes de diminuir a produção de NO que possui a capacidade de elevar a permeabilidade vascular através de mudanças no fluxo sanguíneo no local, e do aumento na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (SALVEMINI *et al.* 1996) e também a expressão da enzima iNOS, dentre estes podemos citar as flavonas apigenina, luteolina, crisina, o flavonol, entre outros (CAZAROLLI *et al.* 2008; SANTANGELO *et al.* 2007). Outros flavonoides, quercetina, luteolina, apigenina e a rutina são capazes de interferir na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-1 (LÓPES-POSADA *et al.* 2008; KIM *et al.* 2004; CAZAROLLI *et al.* 2008). A quercetina e a luteolina também demonstraram possuir atividade para o processo de ativação do sistema complemento, reduzindo a migração das células inflamatórias ao endotélio, reduzindo consequentemente a resposta inflamatória (SANDHAR *et al.* 2011).

A caracterização dos grupos químicos do extrato aquoso e metanólico de *L. sibiricus* foi realizada por Morais (2019) sendo encontrados resultados positivos para taninos totais, saponinas e flavonoides. Também já foi relatado que o rubim apresenta em sua composição, além das substâncias terpênicas, alguns compostos fenólicos como as flavonas metoxiladas e alguns flavonoides como a quercetina e seus isômeros (ALMEIDA, 2006). A Figura 2 apresenta alguns flavonóides isolados de extratos foliares de *L. sibiricus*.

Figura 2 - Estrutura química de flavonóides isolados de folhas de *L. sibiricus* L.



a) quercetina, b) quercetin 3-O- β -D-glucopyranoside, c) Quercetin 3-O- β -D-galacturonopyranoside (In: ALMEIDA, 2006, p.40)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL

A coleta da planta foi realizada no período antes da época de floração até o início da floração (final de outubro a início de dezembro). A planta foi coletada na área rural do município de Ortigueira, distrito de Lageado Bonito, Paraná, nas coordenadas “24°16’0,67” de latitude Sul e “50°78’0,33” de longitude Oeste. A planta colhida foi então levada ao laboratório, onde foi realizado o processo de seleção das folhas e pedaços do caule apical, descartando o caule central devido ao fato do mesmo possuir característica se porosidade, com baixa quantidade de sumo, e também pelo método de extração selecionado, em seguida foi realizado processo de higienização, e então, levada ao processo de secagem de metade do volume de planta colhida, onde as partes selecionadas foram submetidas à secagem em estufa em temperatura não superior a 40°C por 24 horas, e cortes para estudos morfo-anatômico. A outra metade da coleta foi utilizada para o preparo do extrato fresco.

A planta se encontra registrada no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) sob o registro 22154 e 22155.

4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE *L. sibiricus*

Dois extratos foram produzidos, a partir da planta fresca e outro da planta seca.

Para o preparo do extrato da planta fresca foi realizada a extração dos compostos químicos pelo processo de turbo extração com o uso de um liquidificador, por 5 minutos a 2500 rpm. Este método de extração foi escolhido devido sua rapidez no processo, e por ser comumente utilizado, e por realizar a extração de forma bruta, isto é, não realizar a extração de compostos seletivos. O solvente utilizado foi a água destilada na proporção de 1:5 (p/p) de planta fresca:solvente, utilizando-se 460g de planta, obtendo-se o extrato aquoso (EA).

Para o preparo do extrato da planta seca foi realizada a extração dos compostos químicos pelo processo de turbo extração com o uso de um liquidificador, por 5 minutos a 2500 rpm, o solvente utilizado foi uma mistura de metanol e água na proporção 3:1 (metanol:água) estando este em uma proporção 1:10 (p/p) planta seca:solvente, utilizando-se 156,53g de planta, obtendo-se o extrato metanólico (EM).

A seleção dos parâmetros quando a escolha das proporções de peso planta:solvente e rotação utilizada foi realizada através do uso de extratos testes, pois o volume de planta utilizado dificultava o processo de trituração. Observou-se nestas condições um processo mais homogêneo, sem maiores dificuldades na extração.

Foram produzidos 1,8 litros para o extrato metanólico, e 2,3 litros para o extrato aquoso. Os extratos foram filtrados em algodão e em seguida novamente filtrados em papel de filtro. A secagem dos extratos foi realizada por Spray Dryer, tendo temperatura de saída de 75°C para o extrato aquoso e de 65 °C para o extrato metanólico.

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS DOS EXTRATOS

A quantificação de flavonoides totais foi realizada pela construção de uma curva de calibração de quercetina nas concentrações 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0, 5,0 µg/mL, analisadas em espectrofotômetro de ultravioleta com comprimento de onda de 425 nm.

Para o preparo da curva foi realizada uma solução mãe de quercetina, visto que a mesma é o composto mais utilizado para a realização de curvas de calibração,

sendo realizada na concentração de 500 µg/mL, pesando-se 50 mg de quercetina e solubilizando-a em 100 mL de metanol em balão volumétrico calibrado. Em seguida foi realizada uma diluição da mesma para a concentração de 10 µg/mL, ao colocar 1 mL da solução mãe em um balão volumétrico calibrado de 50 mL e completar o volume com metanol, sendo esta chamada de solução mãe 2. Os cálculos para os pontos da curva foram realizados por meio da fórmula de $C1.V1=C2.V2$, sendo C1 a concentração inicial, V1 o volume inicial (que se deseja saber), C2 a concentração final que se deseja obter e V2 o volume final que se deseja obter, neste caso, 10 mL. Após a obtenção dos volumes a serem aliqüotados para chegar à concentração dos pontos da curva e realizado o seu preparo, cada um foi chamado de solução filha seguido da concentração de cada ponto. O preparo destes pontos foi realizado em duplicata para a leitura em espectrofotômetro, seguindo o método descrito na Farmacopéia Brasileira 5ª Edição para quantificação de flavonoides: em um balão volumétrico de 10 mL adicionou-se 4 mL de solução filha de cada ponto, 0,4 mL de cloreto de alumínio e completado o volume para 10 mL com uma solução de ácido acético metanólico (5 mL de ácido acético e 95 mL de metanol), deixado em repouso e lido exatamente 30 minutos após o preparo em 425 nm.

4.4 ANÁLISE DOS EXTRATOS SECOS EM ESPECTROSCOPIA DE MASSAS

Os compostos foram analisados por espectroscopia de massas (Xevo TQD, Waters). Foram realizadas infusões diretas de soluções dos extratos aquoso e metanólico. As condições para a aquisição dos espectros de massas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros espectrométricos utilizados para a análise.

	Extrato aquoso	Extrato metanólico
Modo de ionização	Negativo	Negativo
Capilar (kV)	2,5	3,0
Potencial cone (V)	50	40
Temperatura de dessolvatação (°C)	550	500
Fluxo de gás de dessolvatação (L/h)	650	650

Para o preparo das amostras foi realizada a pesagem de 0,002 g dos extratos secos e diluídos em 10 mL de metanol grau HPLC, em balão volumétrico, dando origem às soluções mãe, na concentração de 200 µg/mL de cada extrato. A partir da solução mãe de cada extrato (200 µg/mL), foi realizado o preparo da solução de leitura a 30 µg/mL do extrato metanólico (EM) e da solução a 50 µg/mL do extrato aquoso (EA).

Todas as soluções foram submetidas à filtração em membrana de nylon 0,22 µm e injetadas diretamente no espectrômetro de massas, com posterior análise dos dados através da importação dos dados, diretamente para o programa MatLab, onde os dados foram selecionados para plotagem dos dados de massa, na forma de gráficos.

4.5 PREPARAÇÃO DA FORMULAÇÃO TÓPICA PARA INCORPORAÇÃO DOS EXTRATOS

A forma farmacêutica para a incorporação dos extratos foi um gel de Carbopol a 4% (p/v), com nipagin 0,05% (p/v) como conservante. Os extratos secos EA e AM foram incorporados no gel na concentração de 3% (p/v) esta proporção foi escolhida por mim, com base na quantidade de extrato obtida e na concentração usualmente utilizada para incorporação de extratos, que varia de 1 a 10%.

4.6 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ATIVIDADE DE CICATRIZAÇÃO DO GEL CONTENDO OS EXTRATOS

4.6.1 Estudo de cicatrização

Para avaliar a cicatrização foram utilizados 45 ratos machos da espécie Wistar, os quais foram divididos em 3 grupos, sendo estes, o grupo tratado com gel com EA, gel com EM e gel base como controle (C), contendo 15 indivíduos em cada grupo. Cada grupo teve seus 15 indivíduos separados em subgrupos de 5 indivíduos, sendo estes o grupo X vermelho, grupo R vermelho e grupo R azul; isso porque a cada 7 dias eram eutanasiados 1 subgrupo de cada grupo, totalizando 3 eutanásias em 21 dias. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (processo CEUA n. 02/2019).

Para realizar a lesão nos animais eles foram sedados com o uso de quetamina, e em seguida foi removido um pedaço de pele (2,0 x 2,0 cm) na região dorsal dos animais, região onde não é possível o animal lambê-lo. A área da lesão foi fotografada logo após ser realizada a lesão, para então ser feita a medição da área de lesão no dia zero e no dia da eutanásia de cada subgrupo (7, 14 e 21 dias após a lesão) com o uso do software ImageJ Launcher.

Os dados foram colocados em planilhas do Excel para análise estatística. Foi realizada análise das áreas das lesões dos animais de cada grupo, em cada dia de eutanásia, esta análise foi realizada pelo teste t. A análise da retração da ferida do dia zero até o dia da eutanásia foi realizada pelo teste de Tukey de múltiplas comparações, que consiste em comparar todos os pares de média possíveis, se baseando em uma diferença mínima significativa estabelecida.

Os ratos foram colocados em gaiolas individuais e tratados por sete dias, sendo o primeiro dia, o mesmo em que foram causadas as lesões, seguindo um padrão de horário para aplicação da formulação, sendo aplicado de 1 mL (30mg/mL) de cada formulação em cada respectivo grupo de animais com o uso de uma seringa dosadora, não havendo perda da formulação por bordas aparentes. Após uma semana de tratamento foi realizada a eutanásia dos primeiros 15 animais, sendo um subgrupo de cada grupo; o primeiro subgrupo foi o X vermelho.

Para a realização da eutanásia os animais foram colocados em uma câmara contendo isofurano, seguindo procedimento ético para que os mesmos não sofressem; em seguida foi realizada a coleta de amostra de tecido do local da lesão previamente tratada, e a mesma foi colocada em formol a 10%, onde permaneceu por 24 horas, e então foi colocada em álcool a 70% para armazenamento.

4.6.2 Análise histológica

Foi realizada a análise histológica da avaliação da modulação do processo inflamatório, com produção de colágeno e remodelação tecidual, por meio de duas técnicas, sendo a coloração em HE e a coloração com picrossirius.

O preparo das lâminas histológicas para análise microscópica foi realizado por meio de desidratação em soluções alcoólicas de concentrações crescentes (80%,

90% e 100%) seguido da diafanização em xilol, embebição e inclusão em parafina. Na sequência foi realizado cortes com 5 µm de espessura em micrótomo (Leica RM 2025).

Após a obtenção das lâminas coradas em HE, foi realizada a visualização no microscópio óptico binocular Nikon Eclipse (E-200) no aumento de 1000x. Após a seleção do material, o mesmo foi fotografado em câmera digital em tempo real no fotomicroscópio (OLYMPUS BX41) para análise da regeneração tecidual.

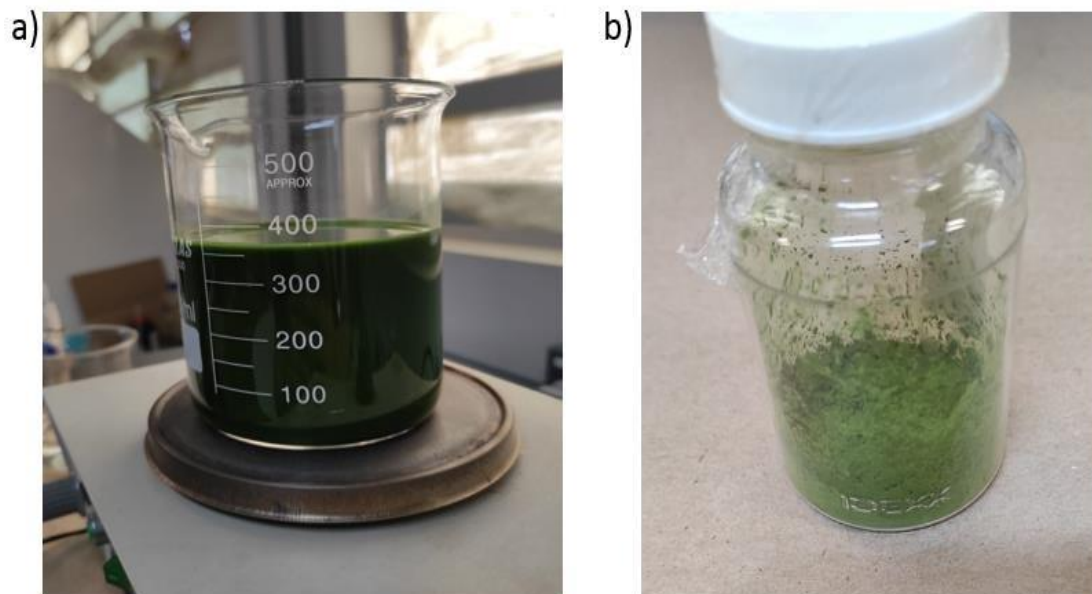
Foi também realizada a avaliação da formação de colágeno, que foi realizada através da análise de lâminas histológicas do tecido dos animais, com coloração de picrossirius, com avaliação microscópica sendo obtidas imagens seguidas da avaliação estatística de formação de colágeno no programa ImageJ.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARO DOS EXTRATOS DE *L. sibiricus*

Os extratos aquosos e metanólico obtidos apresentaram colorações esverdeadas (Figura 5a), sem a presença de turvações causadas por partículas sólidas de partes da planta não removidas no processo de filtração. Após a secagem os mesmos apresentaram tenuidade fina, mantendo a coloração esverdeada, porém em tom mais pálido (Figura 5b). Também apresentaram característica de higroscopicidade em amostra teste inicial, ficando, portanto, as amostras armazenadas em dessecadores.

Figura 3- Característica do extrato líquido e seco

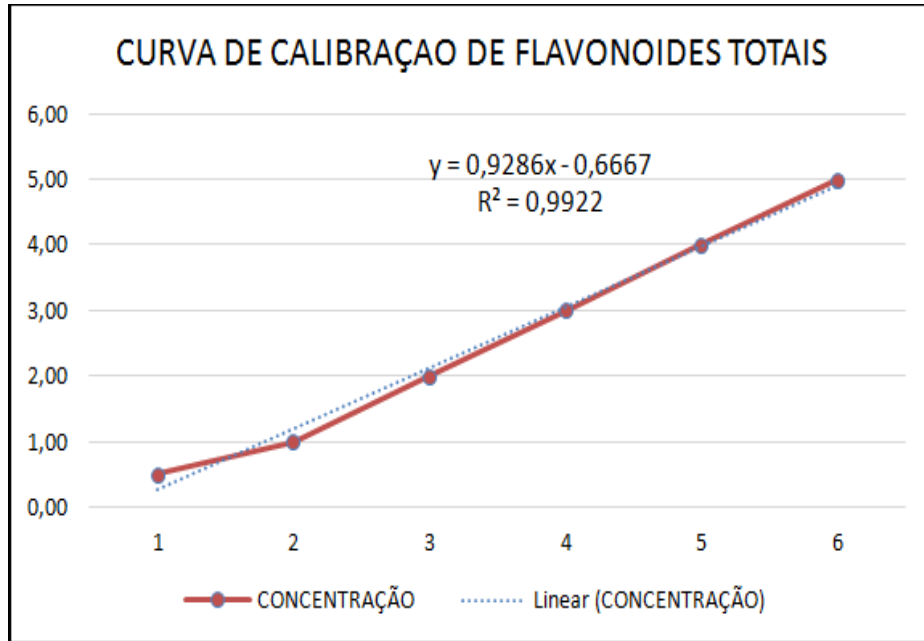


a) Extrato líquido, b) Extrato seco (Fonte: o autor)

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

A curva de calibração para flavonóides totais (Figura 4) apresentou um R^2 de 0,9922, indicando que a equação obtida se encontra adequada para calcular a quantidade de flavonóides presentes na amostra a partir da absorbância obtida na leitura da amostra em triplicata de extrato metanólico e aquoso.

Figura 4- Curva de calibração para flavonóides totais



(Fonte: o autor)

Os resultados obtidos das amostras de extrato metanólico e aquoso para a análise de flavonóides estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Quantificação de flavonóides, em triplicata, dos extratos aquosos (EA) e metanólicos (EM).

	Flavonóides totais (µg/mL)	
	Extrato metanólico	Extrato aquoso
n 1	2,3635	1,7593
n 2	2,3656	1,7604
n 3	2,3602	1,7615
Média	2,3631	1,7604
Desvio padrão	0,00272	0,0011

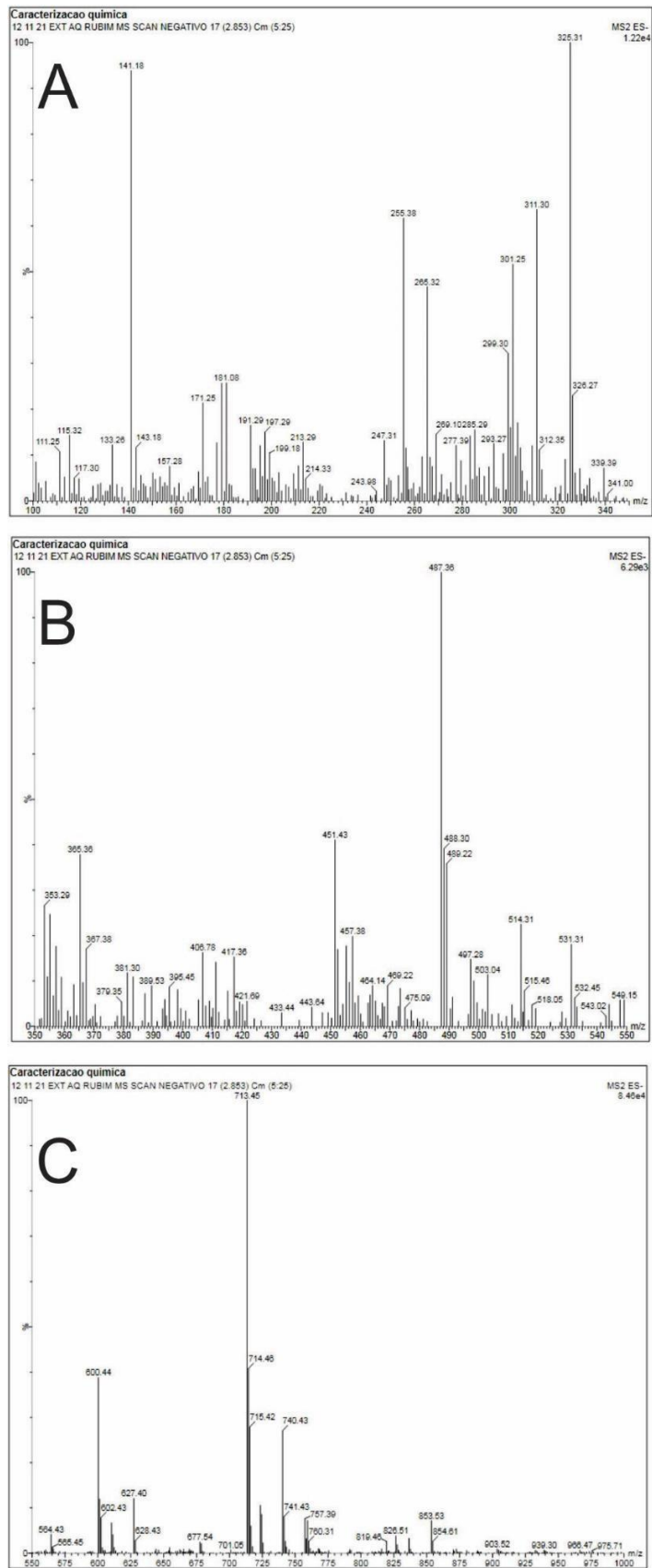
(Fonte: o autor)

Foi possível observar que o extrato metanólico apresentou maior quantidade de flavonóides, isso pode ter ocorrido devido à polaridade dos compostos presentes na planta e sua afinidade com o solvente. Os flavonóides possuem polaridade diferenciada entre si, devido à presença de anéis aromáticos e diversas hidroxilas, o que explica até então não haver um método de extração universal para tais compostos.

5.3 ANÁLISE DOS EXTRATOS EM ESPECTROSCOPIA DE MASSAS

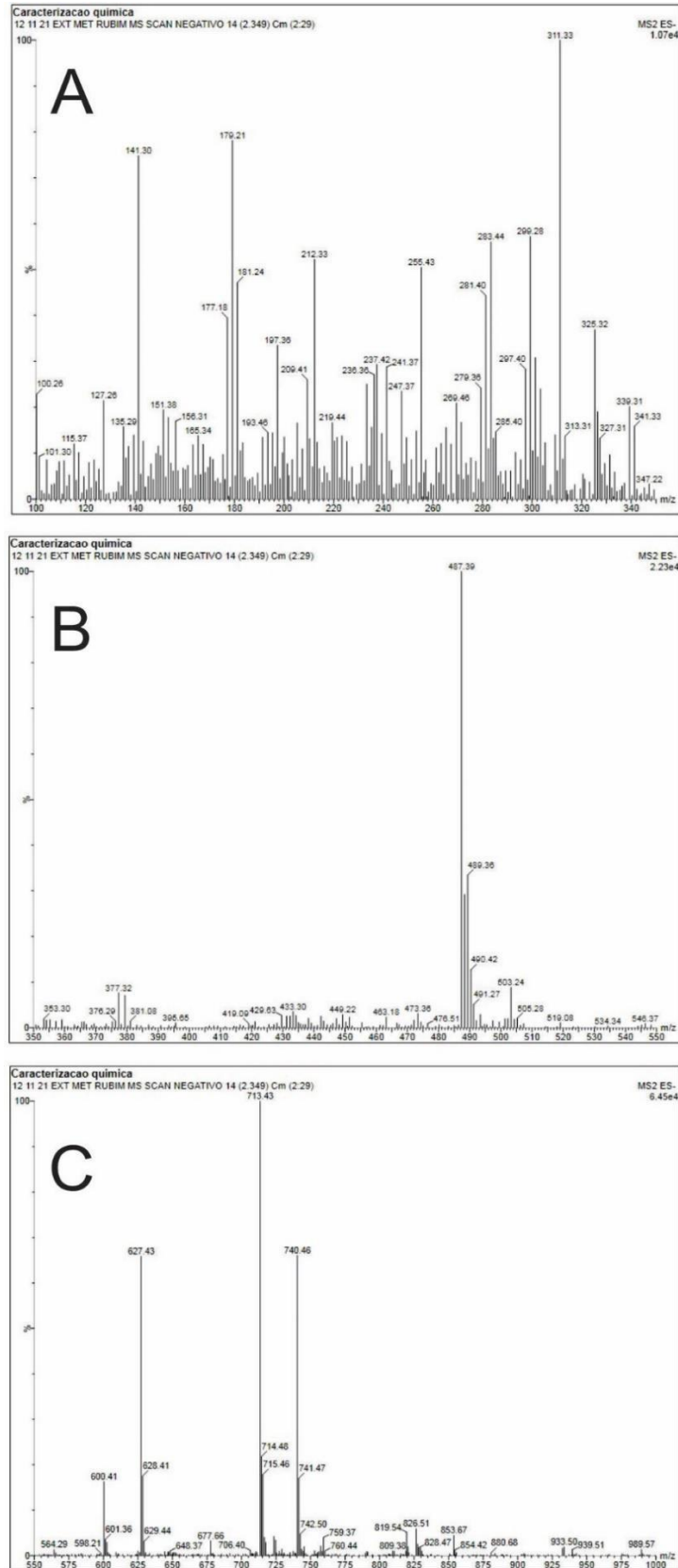
Os espectros de massas dos extratos aquoso e metanólico de *L. sibiricus* foram obtidos (Figuras 5e 6) e foi possível observar que houve presença de diversos compostos.

Figura 5 - Espectro de massas do extrato aquoso de *L. sibiricus*, scan negativo.



A. 100 a 350 m/z, B. 350 a 550 m/z, C. 550 a 1000 m/z. (Fonte: o autor)

Figura 6 - Espectro de massas do extrato metanólico de *L. sibiricus*, scan negativo.



A. 100 a 350 m/z, B. 350 a 550 m/z, C. 550 a 1000 m/z. (Fonte: o autor)

A Tabela 3 apresenta os compostos presentes no rubim que já foram relatados na literatura por meio de estudos cromatográficos, e a massa m/z experimental dos picos observados nos espectros dos extratos aquoso e metanólico (Figuras 5 e 6). Analisando os espectros de massas obtidos, é possível verificar diversos picos com massa semelhante ao relatado, o que pode sugerir a presença destes compostos. Contudo um estudo mais detalhado para a identificação dos compostos deve ser realizado.

Tabela 3. Compostos do rubim relatados na literatura que podem estar presentes nos extratos preparados e os picos observados nos espectros no scan negativo. EA: extrato aquoso; EM: extrato metanólico

(Continua)

Compostos de <i>L. sibiricus</i>	Massa molecular	m/z experimental	
		EA	EM
Leosibiria (C ₂₄ H ₃₈)	450,53 g/mol	-	449,22
Isoleosibiria (C ₂₄ H ₃₄)	450,53 g/mol	-	449,22
Ácido afeico (C ₉ H ₈ O ₄)	180,16 g/mol	-	179,36
Leonotin (C ₂₀ H ₂₅)	348,44 g/mol	-	347,22
Sibiricinon A (C ₂₀ H ₃₀)	366,45 g/mol	365,36	-
Sibiricinon B (C ₂₀ H ₂₈)	348,44 g/mol	-	347,22
Sibiricinon C (C ₂₁ H ₃₂)	380,48 g/mol	379,35	-
Sibiricinona D e 15- <i>epi</i> - sibiricinona D (C ₂₁ H ₃₄ O ₅)	366,50 g/mol	365,36	-
Sibiricinona E e 15- <i>ep</i> - <i>sibiricinona</i> E (C ₂₁ H ₃₄ O ₅)	366,50 g/mol	365,36	-
Ácido Siringico (C ₉ H ₁₀ O ₅)	198,17 g/mol	197,29	197,36
Apigenina (C ₁₅ H ₁₀ O ₅)	198,17 g/mol	197,29	197,36

Tabela 3. Compostos do rubim relatados na literatura que podem estar presentes nos extratos preparados e os picos observados nos espectros no scan negativo. EA: extrato aquoso; EM: extrato metanólico

(Conclusão)

Luteolin-7-metil éter (C ₁₆ H ₁₂ O ₆)	300,27 g/mol	299,30	299,28
Genkwanin (C ₁₆ H ₁₂ O ₅)	284,27 g/mol	-	283,44
Isoquercitrina (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂)	464,38 g/mol	-	463,18
Hiperina (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂)	464,38 g/mol	-	463,18
Quercetina (C ₁₅ H ₁₀ O ₇)	302,24 g/mol	301,25	-
3 α -Acetoxileoheteronona E (C ₂₄ H ₃₆ O ₈)	452,54 g/mol	451,43	-
3 α -Acetoxi-15-epileoheteronona E (C ₂₄ H ₃₆ O ₈)	452,54 g/mol	451,43	-
Ácido clorogênico (C ₁₆ H ₁₈ O ₉)	354,31 g/mol	353,29	353,30
Ácido elágico (C ₁₄ H ₆ O ₈)	302,19 g/mol	301,25	-
Ácido ferrúlico (C ₁₀ H ₁₀ O ₄)	194,19 g/mol	-	193,46
Luteolina (C ₁₅ H ₁₀ O ₆)	286,24 g/mol	285,29	285,40
Triciclono (C ₁₀ H ₁₆)	136,23g/mol	-	135,29
Estricnobilavona (C ₃₂ H ₂₂ O ₁₄)	630,5g/mol	-	629,44
óxido de cariofileno (C ₁₅ H ₂₄ O)	220,35g/mol	-	219,44

(Abu et al. 2016)

Diversos compostos químicos foram encontrados nos extratos tanto nas análises em modo positivo quanto negativo. Analisando o scan negativo, os compostos ácido siríngico, apigenina, luteolin-7-metil-éter, ácido clorogênico e luteolina possivelmente estão presentes nos dois extratos obtidos, enquanto outros compostos aparecem em um dos extratos somente, como por exemplo leosibirina,

isoquercitrina, sibiricinona B e leonotina podem estar presentes no extrato metanólico, e a quercetina, sibiricinona A e ácido elágico podem estar presentes no extrato aquoso.

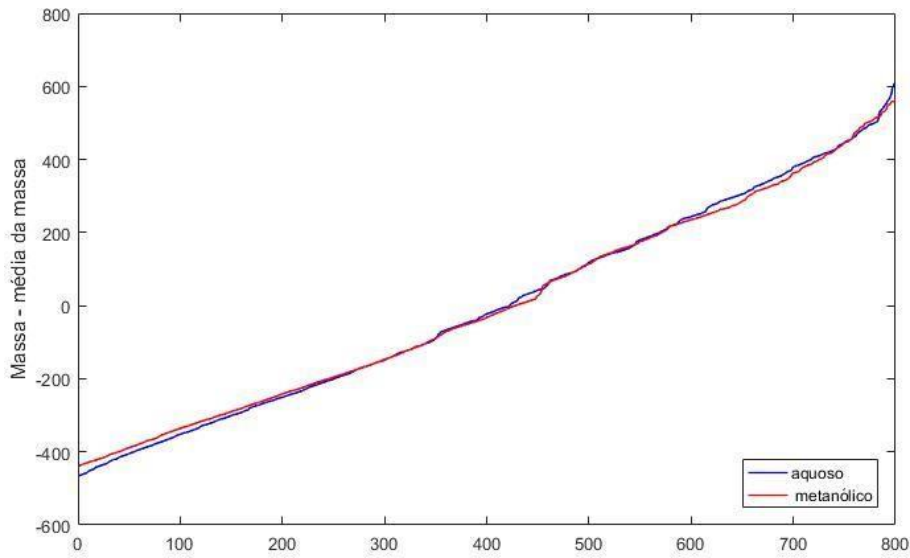
Os compostos sugeridos nos extratos de *L. sibiricus*, estão envolvidos em diversas atividades, sendo compostos químicos farmacologicamente importantes, sendo em sua maioria compostos fenólicos envolvidos não apenas no processo anti-inflamatório, mas também agindo como antioxidante, antifúngico e bactericida.

Também foi possível observar nos gráficos, a presença de outros picos na região de 202 a 204 m/z, onde não foi possível identificar com precisão sua m/z, devido ao fato dos extratos apresentarem muitos picos, sendo apenas sugerido que tais picos possam ser dos compostos germacreno D, α -copaeno, e γ -muuruleno que são compostos já identificados como presentes nos extratos desta planta.

Ao analisarmos os gráficos de massas de ambos os extratos por quimiometria, podemos observar que ocorre uma diferença em relação aos picos obtidos em alguns intervalos de m/z, sendo esta diferença mais evidente no gráfico com intervalo de 350 a 550 m/z. Alguns flavonoides já observados em literatura possuem massa que se enquadra dentro deste intervalo.

Ao realizarmos análise quimiométrica dos dados obtidos, com a elaboração de um gráfico de linearidade, é possível identificar que ambos os extratos apresentam uma distribuição linear quanto a sua composição, sofrendo uma leve variância em alguns pontos da reta, quando observado quanto à média das massas como mostrado na Figura 7.

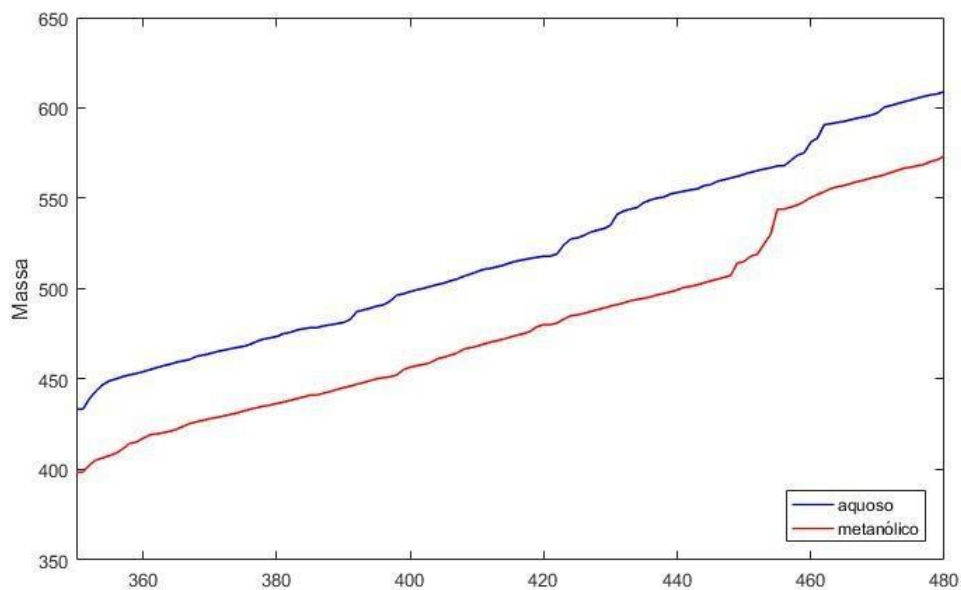
Figura 7 - Média de massas por m/z comparativo dos extratos aquoso e metanólico de *L. sibiricus* obtida por quimiometria.



(Fonte: o autor)

Se observarmos de forma mais centralizada, focando em um intervalo de massas específica, utilizando como base o intervalo de 350 a 550 m/z , onde houve a diferença observada no gráfico de massas, podemos identificar que ocorre uma distinção quanto à composição dos extratos, como mostrado na Figura 8.

Figura 8 - Média de massas no intervalo de 350 a 550 m/z comparativo dos extratos aquoso e metanólico de *L. sibiricus* obtida por quimiometria.



(Fonte: o autor)

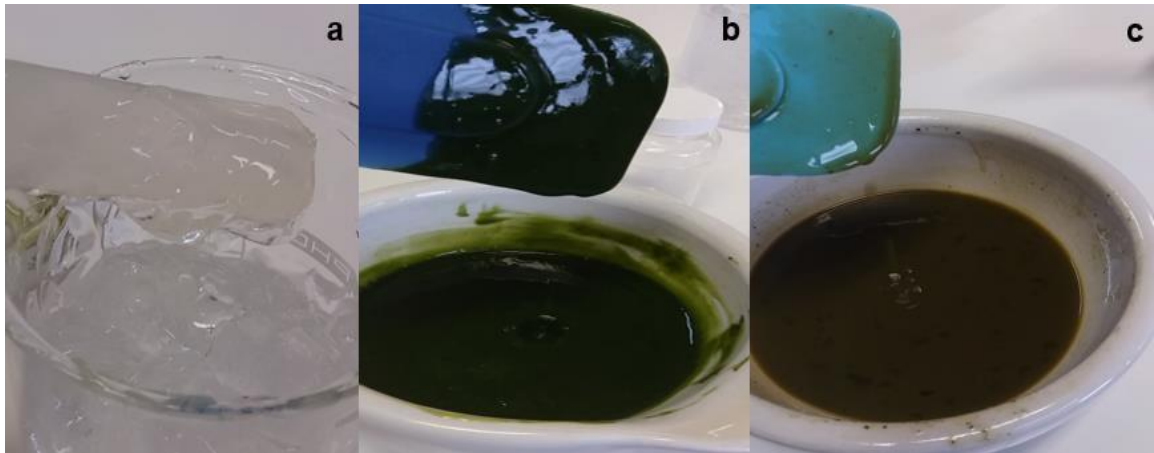
Ao analisarmos as Figuras obtidas pela quimiometria é possível observar que o extrato metanólico apresenta alguns picos distintos do extrato aquoso. Este fato nos leva a sugerir que esta diferença, em relação às massas observadas, é devido à composição dos extratos, que varia de acordo com o solvente utilizado para extração. Essa variação na composição dos extratos pode influenciar no processo de cicatrização das feridas, principalmente em relação à modulação do processo inflamatório, conforme será apresentado na sequência.

Neste intervalo de 350 a 550 m/z, encontram-se algumas massas característica de alguns flavonoides (m/z 376,29; 379,1; 476,51; 429,63), conhecidos por sua atividade anti-inflamatória, antioxidante, entre outras, devido sua capacidade de eliminar ou diminuir a formação de radicais livres de oxigênio (ROS), levar à supressão da expressão de citocinas inflamatórias, suprimir da angiogênese, possuir capacidade de inibir enzimas que catalisam oxidação, e atuar como quelante de íons de metais. Dentre estes compostos, podemos suspeitar da presença de apigenina, cianidina, pelargonidina, galocatequina, e luteolina, sendo este último um composto já isolado anteriormente nesta espécie vegetal.

5.4 INCORPORAÇÃO DOS EXTRATOS NA FORMULAÇÃO DE GEL

Na formulação de gel, os extratos secos metanólicos e aquosos foram incorporados na concentração de 3% no gel base inicial (Figura 9a). Ao se adicionar os extratos aquoso (Figura 9b) e metanólico (Figura 9c) no gel base, ocorreu diminuição sua viscosidade, porém essa redução da viscosidade não prejudicou a administração do gel nos animais durante o tratamento. Esta alteração de viscosidade pode ter ocorrido devido a característica aniônica do carbopol, em reação a composição dos extratos.

Figura 9 - Formulações em gel. a. Gel base, b. Gel extrato aquoso, c. Gel extrato metanólico



(Fonte: o autor)

5.5 AVALIAÇÃO *IN VIVO* DA ATIVIDADE DE CICATRIZAÇÃO DO GEL CONTENDO OS EXTRATOS

5.5.1 Estudo de cicatrização

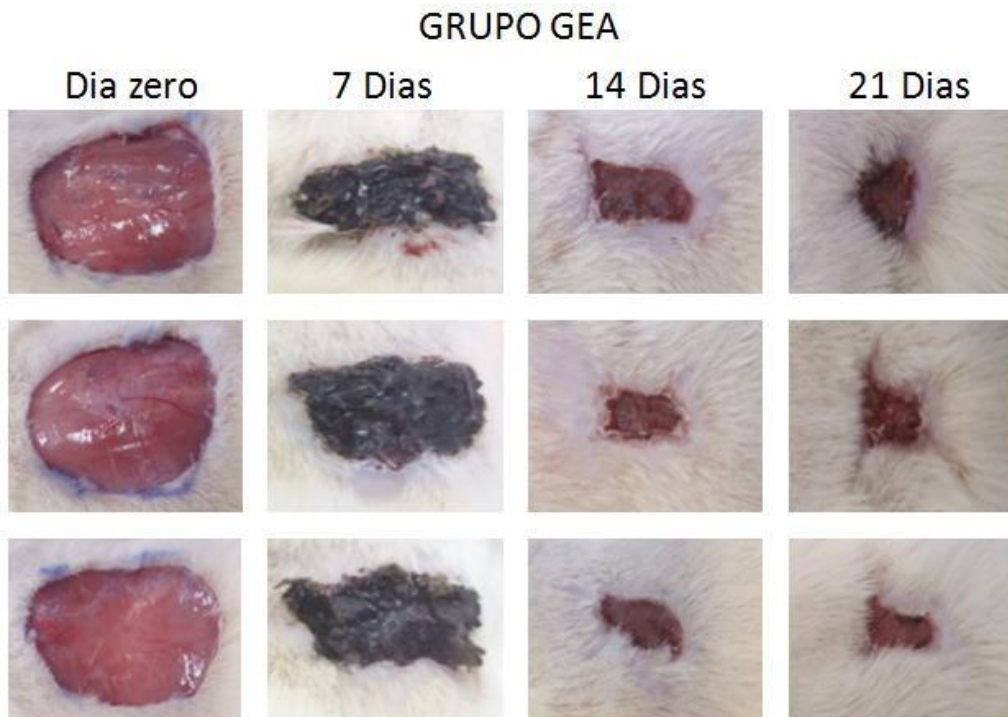
No estudo da avaliação da cicatrização os animais foram tratados com o gel contendo os extratos por um período de 7 dias. As Figuras de 10 a 12 mostram as lesões nos grupos analisados durante o período do estudo.

Figura 10 - Imagens das lesões dos animais.



GB: gel base (controle): tempo zero 7 dias, 14 dias e 21 dias após a lesão. (Fonte: o autor)

Figura 11 - Imagens das lesões dos animais.



GEA: grupo extrato aquoso: tempo zero 7 dias, 14 dias e 21 dias após a lesão. (Fonte: o autor)

Figura 12 - Imagens das lesões dos animais.

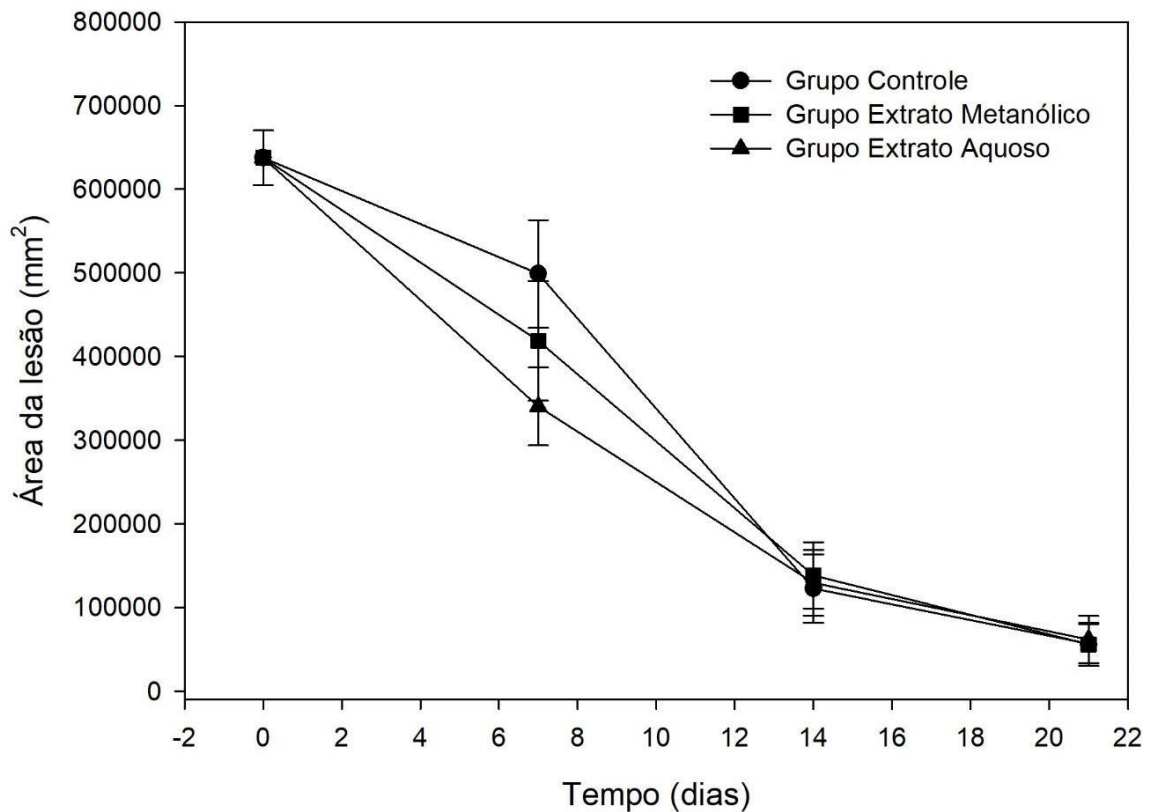


GEM: grupo extrato metanólico: tempo zero, 7 dias, 14 dias e 21 dias após a lesão. (Fonte: o autor)

Os resultados evidenciam que houve retração da lesão em todos os grupos. Porém é possível observar que nos grupos tratados, a lesão apresenta um aspecto menos avermelhado e possui menor quantidade de crostas sobre a área avaliada e lesão com menor diâmetro.

A Figura 13 apresenta as médias das áreas das lesões durante todo o período avaliado, avaliando o diâmetro da lesão, mostrando que houve diminuição da área com o passar do tempo, relacionado ao processo de cicatrização. Observa-se diferença no tamanho médio das áreas entre os grupos controle e os tratados com gel contendo extrato aquoso ($p < 0,05$) somente no sétimo dia após a realização das lesões. Nos demais dias analisados não houve diferença estatística do tamanho das áreas entre os grupos estudados.

Figura 13 — Área das lesões dos animais mensuradas nos dias zero, 7, 14 e 21 após a produção da lesão e o tratamento.



Valores expressos em média e desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos de estudo para cada dia ($p < 0,05$, teste t). (Fonte: o autor)

Foi também realizada análise da retração (regressão) da lesão, análise estatística de múltipla comparação (teste Tukey), foi realizada a partir da diferença de tamanho da área da lesão no dia zero (dia da cirurgia) e no dia de eutanásia, ou seja, após 7, 14 ou 21 dias. Foram considerados significantes, os resultados de análise comparativa que apresentaram $p < 0,05$.

Após 7 dias da realização das lesões e tratamento houve redução significativa da área entre o grupo controle e o grupo que recebeu gel com extrato aquoso ($p = 0,0375$). Já após 14 dias da lesão houve diferença estatística significativa de redução da área da lesão entre o grupo tratado controle e o grupo gel com extrato aquoso ($p = 0,0186$) e entre os grupos de gel com extrato aquoso e gel com extrato metanólico ($p = 0,0301$). Após 21 dias não houve diferença estatística da retração da ferida entre os grupos.

Esta diferença estatística entre os grupos tratados com os extratos pode ter ocorrido devido à individualidade de cada animal, ou pode-se supor que inicialmente o processo inflamatório inicial da cicatrização é mais estimulado pelo gel contendo extrato seco aquoso, porém após um período maior, no dia 14, é possível verificar que há diferença não apenas entre o grupo controle e os grupos tratados com os extratos, mas também entre os dois extratos utilizados, tornando-se mais clara a atividade do gel com extrato metanólico em relação ao aquoso. Este resultado é mais evidente ao analisarmos as lâminas histológicas.

5.5.2 Análise histológica

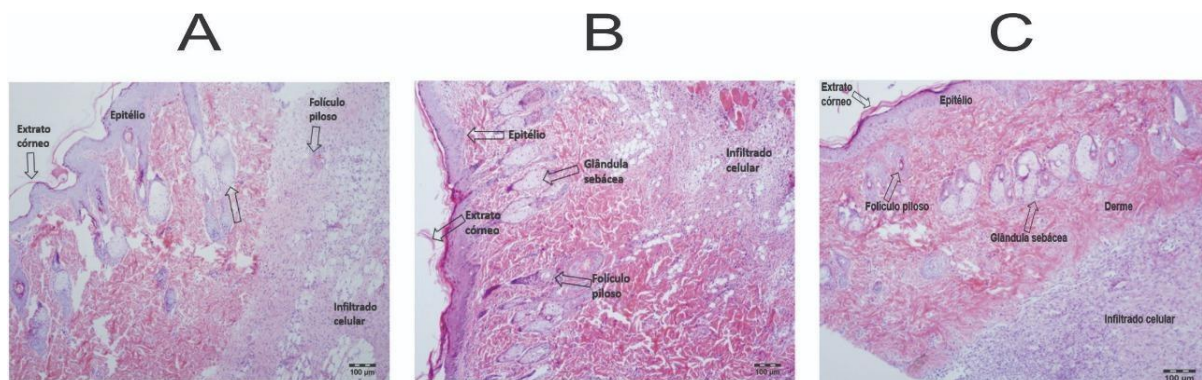
As Figuras de 14 a 16 apresentam as fotomicrografias da pele dos animais eutanasiados. A análise histológica de regeneração tecidual da lesão apresentou resultados semelhantes entre os grupos tratados com as formulações contendo extratos, porém, foi possível verificar que os animais tratados com extrato metanólico apresentaram melhor distribuição das fases de regeneração, mostrando uma regeneração mais organizada quando comparada ao grupo tratado com o extrato aquoso.

O grupo tratado com gel base também apresentou regeneração, porém, quando comparado aos grupos tratados com as formulações contendo os extratos, a organização do tecido de regeneração mostrou-se irregular, apresentando regiões com ausência de estruturas fundamentais como colágeno e folículos pilosos. Neste grupo também se pode observar uma mistura das fases da regeneração, com infiltrados celulares espalhados em pequenos grupos por grande parte do tecido, contrastando com os grupos tratados com as formulações contendo os extratos, onde se pode observar a regeneração uniforme por toda a borda da lesão.

As lâminas histológicas selecionadas foram de indivíduos diferentes, e os resultados destes, foram separados por dias de eutanásia. Foram selecionadas 3 lâminas, sendo um indivíduo de cada grupo, conforme segue: lâminas dos indivíduos eutanasiados no 7º dia (primeira eutanásia) sendo o grupo controle (Figura 14a), grupo gel extrato aquoso (Figura 14b) e grupo gel extrato metanólico (Figura 14c), onde é possível observar que ao passar a semana de tratamento, os

grupos apresentaram fases de regeneração e organização semelhantes, porém, com a diferença de que nos grupos tratados com a formulação em gel contendo os extratos secos de *L. sibiricus* observa-se a presença de certa quantidade de infiltrado celular, que não foi visualizado no grupo tratado apenas com o gel base, como mostrado a seguir.

Figura 14 - Fotomicrografia da pele de ratos eutanasiados no 7º dia corados em HE.

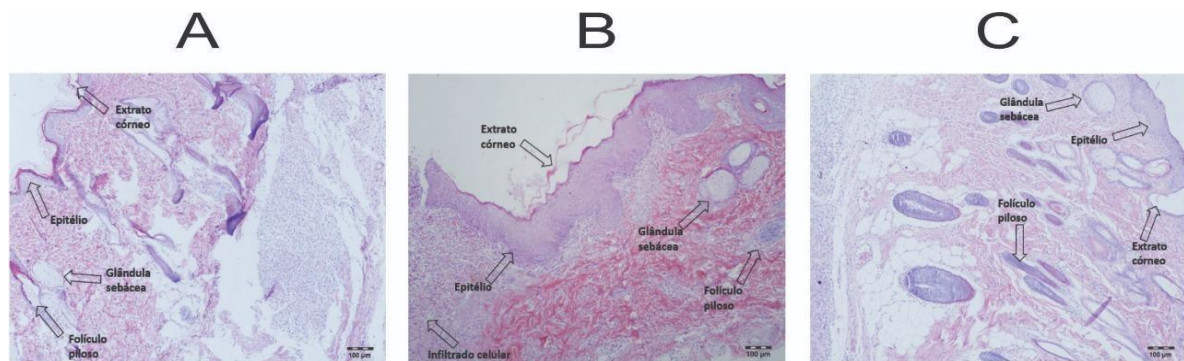


A. Grupo controle (200x), B. Grupo gel extrato aquoso (100x), C. Grupo gel extrato metanólico (100x). (Fonte: o autor)

As lâminas dos indivíduos eutanasiados no 14º dia (segunda eutanásia) (Figura 15), mostraram que no final do tratamento que durou 7 dias, há diferença na regeneração entre os grupos tratados com as formulações com extratos (entre eles) e também entre o grupo controle.

Foi possível observar que o grupo tratado com extrato metanólico apresentou uma maior quantidade de fibras colágenas do tipo I, o que garante maior resistência ao tecido, quando comparado aos demais grupos; foi possível observar também que o mesmo apresenta uma proeminência na raiz dos folículos pilosos, indicando que o tecido já apresentava crescimento de pêlos, o que não foi observado no grupo controle, e em menor quantidade no grupo tratado com o extrato aquoso.

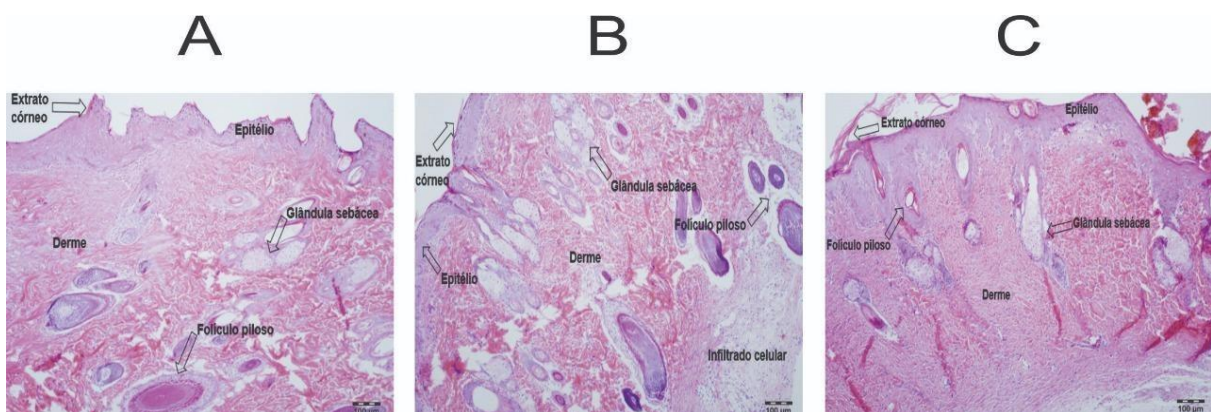
Figura 15. Fotomicrografia da pele de ratos eutanasiados no 14° dia corados em HE.



A. Grupo controle (100x), B. Grupo gel extrato aquoso (100x), C. Grupo gel extrato metanólico (100x). (Fonte: o autor)

Nas lâminas histológicas do 21° dia (terceira eutanásia) (Figura 16), foi possível observar que há uma grande diferença entre as fases da regeneração e organização do tecido cicatricial, sendo que a lâmina do grupo tratado com extrato metanólico apresentou melhor resultado, pois apresentou maior quantidade de colágeno, estando este colágeno distribuído de forma homogênea por todo o tecido, mais organizado e uniforme, sendo possível visualiza-lo ao obervarmos a imagem, corado em rosa mais claro, apresentando-se em uma forma delicada, além de ser possível observar folículos pilosos com pêlos proeminentes, características estas que não foram observadas nos outros grupos que foram eutanasiados no mesmo dia.

Figura 16. Fotomicrografia da pele de ratos eutanasiados no 21° dia corados em HE.



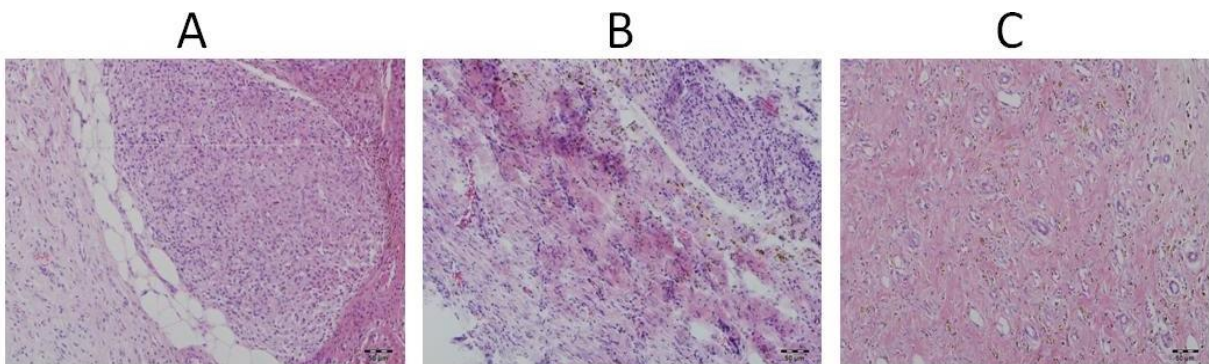
A. Grupo controle (100x), B. Grupo gel extrato aquoso (100x), C. Grupo gel extrato metanólico (100x). (Fonte: o autor)

Ao analisarmos as lâminas histológicas, é possível observar que há diferença na regeneração celular entre os grupos tratados com o gel contendo os extratos, e o grupo controle; também há entre os mesmos grupos tratados com os extratos em dias diferentes de eutanásia.

Em relação ao grupo tratado com o gel contendo extrato metanólico é possível observar que há diferença entre o dia 14 e 21, isso pode ser explicado pelo tamanho de tecido coletado, pois no dia 14 a área aberta era maior do que no dia 21, sendo que neste dia foi colhida uma amostra de tecido mais central, não sendo retirado tecido da borda da lesão devido à grande quantidade de pelos.

A Figura 17 mostra a presença de macrófagos nas fotomicrografias de pele dos animais eutanasiados, no 21º dia.

Figura 17 – Macrófagos em fotomicrografia no 21º.



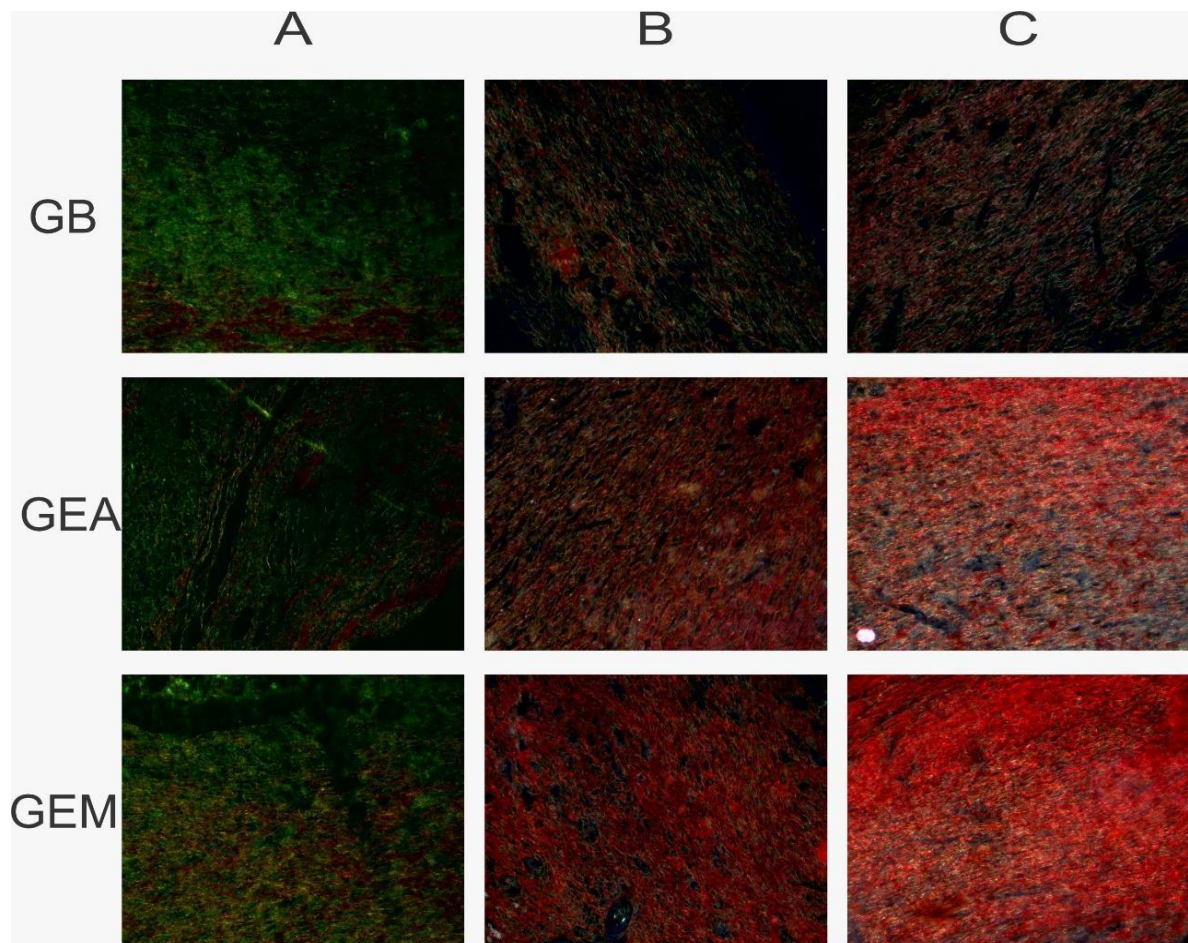
A. Grupo controle, B. Grupo extrato aquoso, C. Grupo extrato metanólico. (Fonte: o autor)

Foi realizada a contagem de macrófagos das lâminas histológicas com uso do software ImageJ Launcher. Ao realizar a análise estatística dos dados obtidos, foi possível observar diferença estatística apenas entre o grupo extrato metanólico e o controle ($p < 0,5$) no 21º. Isso é de grande relevância, pois os macrófagos são responsáveis por participar ativamente do processo de regeneração celular, por atuar na fagocitose de restos celulares, e especialmente por serem capazes de promover o recrutamento e a ativação de outras células, atuar na síntese de matriz extracelular e angiogênese, que são extremamente necessários ao processo de cicatrização, além de atuar na remodelação do tecido.

As fibras colágenas são produzidas em fases diferentes da regeneração do tecido durante o processo de cicatrização. As fibras de colágeno tipo III são produzidas primeiro, e ao decorrer do processo vão diminuindo sua quantidade, simultaneamente ocorre a produção das fibras de colágeno tipo I com maior capacidade de resistência. As fibras de colágeno do tipo III coram-se em amarelo claro e aparecem esverdeadas quando vistas em microscopia polarizada. Já as fibras de colágeno do tipo I coram-se em vermelho intenso.

A Figura 18 apresenta as imagens das lâminas histológicas coradas com picrossirius, coloração utilizada para avaliação do processo de cicatrização de feridas por tornar possível estabelecer uma relação entre a qualidade e a quantidade de colágeno formada, com o resultado final da cicatrização da lesão.

Figura 18- Fotomicrografia da pele de ratos eutanasiados



Grupo GB (gel base, controle), GEA (extrato aquoso) e GEM (extrato metanólico) corado com picrossirius. A. 7° dia, B. 14° dia, C. 21° dia. (Fonte: o autor)

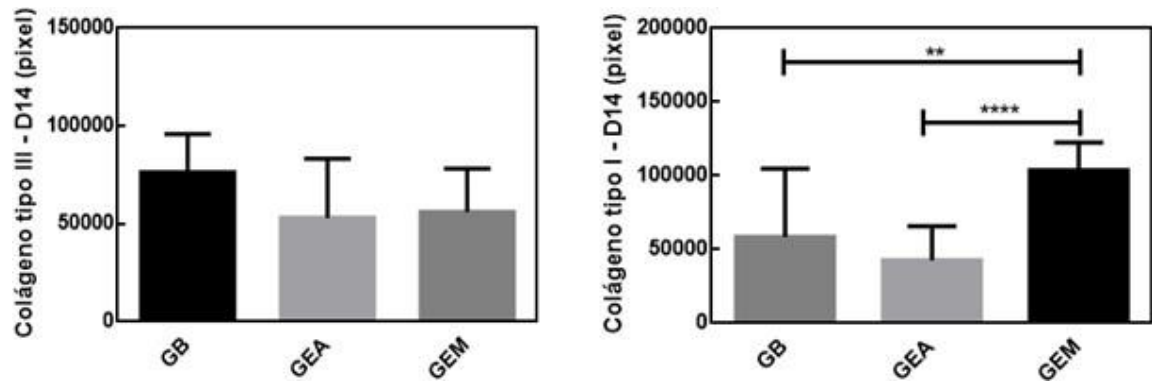
A imagem mostra o grupo controle apresentando maior predominância de colágeno tipo III no sétimo dia após o tratamento, em relação aos grupos tratados, também se observa que o colágeno tipo I aparece em menor quantidade e de forma menos homogênea no grupo, quando comparado aos grupos tratados, sendo mais evidente no grupo extrato metanólico a presença de forma mais distribuída e em maior quantidade de colágeno tipo I. A presença de colágeno tipo I já na primeira semana nos grupos tratados pode ser considerada um indicativo de que o processo de cicatrização foi acelerado, mostrando que os extratos modularam a fase inflamatória da cicatrização, com início mais rápido das fases de reparação e remodelação do tecido em comparação com o grupo controle.

Em relação ao 14^o podemos observar que houve um aumento considerável de colágeno tipo I, em ambos os grupos, porém fica evidente que o grupo controle apresenta menor quantidade de colágeno tipo I quando comparado aos outros dois grupos. Mesmo entre os grupos tratados, é possível observar a diferença em relação à quantidade de colágeno presente, e também a sua uniformidade em toda a área, sendo o grupo extrato metanólico com maior quantidade de colágeno indicando que o processo de reparação tecidual e remodelação foi mais rápido neste grupo, apresentando melhor resultado.

A análise estatística em relação ao colágeno tipo III não apresentou diferença significativa ($p > 0,5$) entre o grupo controle e os grupos tratados com os extratos, e entre os grupos tratados. Em relação à análise de colágeno tipo I nos 14^o dia da lesão foi possível identificar diferença significativa entre o grupo tratado com o gel com extrato metanólico e os grupos controle e grupo extrato aquoso ($p < 0,5$), com maior presença de colágeno tipo I neste grupo conforme visualizado nas Figuras 19 e 20. Já no 21^o dia não houve diferença estatística entre os grupos.

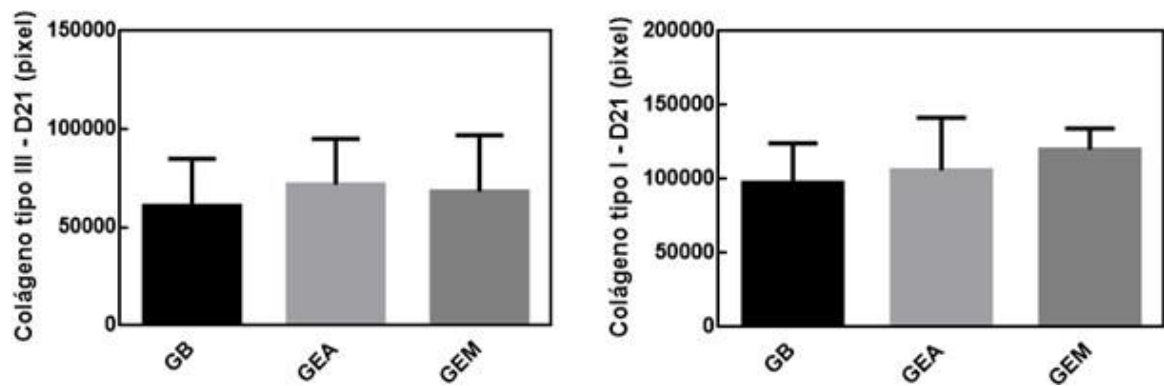
Isso pode ser explicado pelo fato de que os extratos agiram como moduladores da fase inflamatória, menor concentração de infiltrado celular, e aumentando a migração de macrófagos para a área lesionada, células que atuam ativamente no processo de regeneração do tecido, e com a fase inflamatória ocorrendo de maneira mais amena, favoreceram a atividade de células que aumentaram a produção de colágeno, levando ao aparecimento do colágeno tipo I em menor tempo e em maior quantidade quando comparado ao grupo controle.

Figura 19 - Análise estatística comparativa de colágeno tipo III e I no 14° dia.



Grupo GB (gel base, controle), GEA (extrato aquoso) e GEM (extrato metanólico). (Fonte: o autor)

Figura 20 - Análise estatística comparativa de colágeno tipo III e I no 21° dia.



Grupo GB (gel base, controle), GEA (extrato aquoso) e GEM (extrato metanólico).

6 CONCLUSÃO

Os extratos aquosos e metanólicos de *L. sibiricus* foram obtidos, secos e apresentam em sua composição diversos compostos químicos, entre eles foi possível identificar picos característicos de alguns flavonoides, sendo assim sugerida a presença de quercetina, ácido cafeico, sibirinona C, apigenina, cianidina, pelargonidina, galocatequina, e luteolina, ácido elágico, luteolin-7-meil éter, genkwanin, luteonina, γ -muuroleno, ácido ferrúlico, entre outros, que são compostos com atividade anti-inflamatória e antioxidante por sua capacidade de impedir ou reduzir a formação de radicais livres, e que já foram citados como compostos presentes espécie vegetal.

O estudo de cicatrização *in vivo*, em modelo animal mostrou que o tratamento das lesões na pele com os extratos levou a melhoria no processo de cicatrização, tanto pela redução da área lesionada quanto pela maior rapidez na regeneração tecidual e aspecto da lesão quando comparados com o grupo controle.

Segundo os resultados obtidos, quando comparamos todos os parâmetros em um panorama interligado, podemos concluir que os extratos metanólicos e aquosos dos caules e folhas de *Leonurus sibiricus* se apresentaram promissores quanto a sua utilização em processos de cicatrização de feridas. Porém, em relação ao tipo do extrato, a diferença estatística obtida na retração da lesão entre os grupos foi mais bem evidenciada no décimo quarto dia, assim como as observações teciduais, indicando maior potencial do extrato metanólico, podendo se supor que o mesmo apresentou melhor extração dos compostos com atividade farmacológica da planta.

Contudo, é necessário um estudo mais aprofundado dos mecanismos de atuação dos compostos extraídos, para se saber em qual etapa do processo de cicatrização, e quais marcadores ou citocinas estes compostos estimulam ou inibem diretamente, levando à sua atividade farmacológica propriamente dita.

REFERÊNCIAS

- Abu, S, *et al.* *Leonurus sibiricus* L. (honeyweed): A review of its phytochemistry and pharmacology. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. Volume 6, Pages 1076-1080, Issue 12, December 2016
- ALMEIDA, L. F. R. **Composição química e atividade alelopática de extratos foliares de *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae)**. Tese (Botânica) – Instituto de biociências, UNESP — Universidade estadual paulista, Botucatu, 2006.
- ARAÚJO, M, A, *et al.* Uso de plantas medicinais para o tratamento de feridas. **Revista Interdisciplinar**, v. 8, n. 2, p. 60-67, abr./maio/jun. 2015.
- BALBINO, C, A, *et al.* Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005
- BANDEIRA, J, M, *et al.* Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 157-164, 2011
- BEECHER G, R. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. **The Journal of Nutrition**, Volume 133, pp. 3248S — 3254S, Issue 10, October 2003.
- CARVALHO, P, T, C. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos**. Dissertação (Mestrado em bioengenharia), Intituto de química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- CAVALCANTE L, C, *et al.* Efeito da pedra umes no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos. **Braz J Periodontol**. 22(1), p. 69-73, 2012.
- CAZAROLLI, L, H, *et al.* **Mini-Rev. Med.** Chem. 2008, 8, 1429. [CrossRef] [PubMed]
- CLARK, R, A, F. Biology of dermalwound repair dermatological clinics. **Investigation Dermatology**, v.11, p. 647-661, 1993
- DÁRIO G, M. **Avaliação da atividade cicatrizante de formulação contendo**

argila medicinal sobre feridas cutâneas em ratos. Dissertação (mestrado em ciências da saúde), Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2008.

DUARTE, M, R, *et al.* Morfoanatomia Foliar e Caulinar de *Leonurus sibiricus* L., Lamiaceae. **Acta Farm. Bonaerense** 24 (1):p. 68 -74, 2005.

DUTRA, R, C, *et al.* Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**. Volume 112, Pages 4-29, October 2016.

EBERHARDT, T, D, *et al.* Cicatrização de Feridas: Análise das Tendências em Teses e Dissertações. **RevEnferm UFSM**, v. 5, n. 2, p. 387-395, 2015.

FERRÃO, B, H, *et al.* Prospecção fitoquímica, potencial anti-helmíntico e análise toxicológica de Macaé (*L. sibiricus* L.). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 3, p. 353-358, 2012.

FRANCO, D, G. Fator de transcrição nuclear kappa B no sistema nervoso central: do fisiológico ao patológico. **Rev Biol**. 2010; 4:35-9

GINALDI L, *et al.* **Osteoporose, inflamação e envelhecimento. Imuno Envelhecimento**. 2:14, 2005. Ver artigo: Google Scholar: PubMed/NCBI

GRANDO, R. *et al.* **Avaliação da atividade antinociceptiva de frações etanólicas e diclorometano da espécie *Leonurus sibiricus***. 4^a Mostra Acadêmica – UNIMEP, 2012.

IRION, G. **Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores/Glenn L. Irion**; Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.390, 2005.

KIM, *et al.* ***Leonurus sibiricus* L. ethanol extract promotes osteoblast differentiation and inhibits osteoclast formation.** Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4269>. Acesso em: 03, julho 2023

KIM, H. P, *et al.* **Pharmacol. Sci.** 2004, 96, 229. [CrossRef] [PubMed]

KUMAR, N, *et al.* **Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview.** **Talanta**, 123, p. 186–199, 2014

KUMAR, V, *et al.* **Patologia:** bases patológicas das doenças. 7a ed. Elsevier, Rio de Janeiro., 2005

LAUREANO, A, *et al.*, Cicatrização de feridas. **Revista da SPDV** 69(3), p. 355, 2011

LIMA, P, *et al.* Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 628-636, 2014.

LÓPEZ-POSADAS, R, *et al.* **Biochem. Pharmacol.** 2008, 76, 495. [CrossRef] [PubMed]

MANDELBAUM, S. H. *et al.* Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares — Parte 1. **AnBras de Dermatol.** Rio de Janeiro, RJ. 78(4):393-410, Jul./ago., 2003.

MAY, J, *et al.* Levantamento etnofarmacológico das plantas medicinais utilizadas nos municípios de Terra Nova do Norte e Nova Canaã do Norte—MT. **FACIDER-Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2012.

MENDONÇA, R, J, *et al.* Aspectos celulares da cicatrização. **AnBrasDermatol.** 84(3), p.257-262, 2009.

MORAIS, L, C, A. **Avaliação da atividade de gel contendo extrato seco de *Leonurus sibiricus* (L.) no processo de cicatrização.** Trabalho de conclusão de curso (Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, 2019.

NETO, J, C, L. **Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em equinos em 2003.** Online. Disponível na internet em <http://br.merial.com/pdf/arquivo8.pdf>. Acesso em: 03, julho 2023.

NOGUEIRA, R, M, B, *et al.* Estudo clínico da reparação tecidual de feridas cutâneas de cães tratados com papaína e colagenase. **Revista nosso clínico.** 8(43):25-28, 2005.

OLIVEIRA, A, F. **Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* (tul.) Martius (Jucá) em lesões cutâneas de caprinos.** Dissertação (Mestrado em ciencias animais), Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, Rio grande do Norte, 65p, 2008.

PAGANELA, J, C, *et al.* Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias.** 104 (569-572):13-18,2009.

PANOBIANCO, M, S, *et al.* Comparação da cicatrização pós-mastectomia entre mulheres portadoras e não-portadoras de diabetes mellitus. **Rev. Rene.** 11:15-22, 2012.

RAMALHO, L, N, Z, *et al.* Efeito de agentes anti-hipertensivos sobre as células estreladas durante a regeneração hepática em ratos. **Arquivos de Gastroenterologia.** 40(1), 2003.

RUDMAN, M, D, *et al.* Bromodomain and extraterminal domain-containing protein inhibition attenuates acute inflammation after spinal cord injury. **ExpNeurol**, v. 4886, n. 18, p.30355-8, 2018.

SALVEMINI D, *et.al.* Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br J Pharmacol**; 118:829-38, 1996.

SANDHAR, H, K, *et al.* A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. **InternationalePharmaceuticaSciencia**, 1(1), pp. 25-41, 2011.

SANTANGELO, C, *et al.* **Ann Ist Super Sanità.** 2007, 43, 394.

[PubMed]

SANTORO, M. M. *et al.* Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental CellResearch.** 304, pp.274-286, 2005.

SARANDY, M. M. **Avaliação do efeito cicatrizante do extrato de repolho (Brassicaoleracea var. capitata) em ratos wistar.** Dissertação (Biologia celular e estrutural), Departamento de Análises quantitativas e moleculares do Genoma; Biologia das células e dos tecidos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 49p, 2007.

SIMÕES, C, M, O, *et al.* Farmacognosia: da Planta ao Medicamento, 5ª ed., Santa Catarina: Editora da UFSC, 2004.

SHIN, H, Y, *et al.* Anti-inflammatory activity of Motherwort (*Leonurus sibiricus* L.). **ImmunopharmacolImmunotoxicol.** 31 (2), p. 209-13, 2009.

- SILVA, J, C. **Extração do óleo essencial do Rubim (*Leonurus sibiricus* L.) e aplicação em creme.** Trabalho de conclusão de curso (Graduação), Fundação Educacional do Município de Assis- FEMA, 2014. 52p.
- SILVA, R, F, R, *et al.* Avaliação da atividade anti-inflamatória de frações etanólicas e diclorometano da espécie *Leonurus sibiricus*. In 4ª MOSTRA ACADÊMICA – UNIMEP, 2012.
- SITAREK, P, *et al.* Propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e anti-proliferativas de óleos essenciais de raízes pilosas e normais de *Leonurussibiricus* L. e sua composição química. **Oxid Med Cell Longev.** P.12, V. 2017.
- SOUZA, D, *et al.* Plantas medicinais: indicação de raizeiros para o tratamento de feridas. **Revista Brasileira de Promoção à Saúde**, v. 29, n. 2, p. 197- 203, 2016.
- TAHARA, S. **Biosci., Biotechnol., Bichem.** 2007, 71, 1387. [CrossRef] [PubMed]
- TAPAS, A, R, *et al.* Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 7 (3), pp. 1089 — 1099, 2008.
- VARGAS, N, R, C, *et al.* Plantas medicinais utilizadas na cicatrização de feridas por agricultores da região sul do RS. **Journal of Research: Fundamental Care Online**, v. 6, n. 2, abr./jun. 2014
- VIEIRA, C, S, C, A, *et al.* **Manual de condutas para úlceras.** 2002.
- WADT, N, S, Y. A imigração japonesa e sua contribuição à saúde. **Saúde Coletiva**, v. 5, n. 23, p. 134, 2008.
- WADT, N, S, Y, *et al.* Atividade antimicrobiana de *Leonurussibiricus* L. **Rev. Bras. De Farmacognosia**, vol.5, n.2, p.167- 174, 1996.
- WANG, R, *et al.* Wound-healing plants from TCM: in vitro investigations on selected TCM plants and their influence on human dermal fibroblasts and keratinocytes. **Fitoterapia**, v.84, p.308-317, 2013
- WERNER, S, *et al.* Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews.** 83, 2003
- WONG, A, *et al.* Herbal medicines and anaesthesia. **ContinEducAnaesthCrit Care**

Pain; 11(1):14-7, . 2011.

WU, Y, *et al.*, Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. **CancerLett**, v.10, n. 2, p. 164-73, 2014.

ZACHOW, L, L. **Extração, composição química e avaliação das atividades de inibição enzimática e antimicrobiana de *Leonurus sibiricus* L.** 2016. 123 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2016