

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

PAULA RODRIGUES FONTES DE SOUSA MORAES

Obtenção, caracterização e análise comparativa de hidrogéis a base de celulose bacteriana com *Calendula officinalis* e *Jacaranda caroba* em dorso de ratos

São Carlos

2018

PAULA RODRIGUES FONTES DE SOUSA MORAES

Obtenção, caracterização e análise comparativa de hidrogéis a base de celulose bacteriana com *Calendula officinalis* e *Jacaranda caroba* em dorso de ratos

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia da Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues
Fontes da EESC/USP

M827o Moraes, Paula Rodrigues Fontes de Sousa
Obtenção, caracterização e análise comparativa de hidrogéis a base de celulose bacteriana com *Calendula officinalis* e *Jacaranda caroba* em dorso de ratos / Paula Rodrigues Fontes de Sousa Moraes ; orientadora Ana Maria Minarelli Gaspar. -- São Carlos, 2018.

Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Cicatrização. 2. Pele. 3. Celulose bacteriana. 4. Hidrogel. 5. *Calendula officinalis*. 6. *Jacaranda caroba*. 7. Dorso de ratos. I. Título.



FOLHA DE APROVAÇÃO

PAULA RODRIGUES FONTES DE SOUSA MORAES

Título da Tese:


"OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE COMPARATIVA DE HIDROGÉIS A BASE DE CELULOSE BACTERIANA COM *CALENDULA OFFICINALIS* E *JACARANDA CAROBA* EM DORSO DE RATOS".


TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.


Data da defesa: 26/06/2018

Profa. Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar (Orientadora)	FOAr/UNESP
Assinatura: 	Resultado: APROVADA

Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan	EESC/USP
Assinatura: 	Resultado: APROVADA

Prof. Dr. João Manuel Domingos de A. Rollo	EESC/USP
Assinatura: 	Resultado: APROVADA

Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento	FCFAR/UNESP
Assinatura: 	Resultado: APROVADA

Profa. Dra. Márcia Diana U. Zanoti	ASSUPERO/UNIP
Assinatura: 	Resultado: APROVADA

Homologado em: 30 / 06 / 2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família que é e sempre será a minha base, o meu orgulho, a minha inspiração para tudo.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** primeiramente, por me dar saúde, paciência e sabedoria para fazer todas as atividades da melhor forma com responsabilidade.

À querida orientadora **Profa. Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar**, que me deu a oportunidade de me tornar uma profissional cada vez mais completa, Mestre e agora Doutora.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À **Profa. Dra. Maria das Graças Lins Brandão**, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelas orientações sobre as plantas medicinais e pelos extratos concedidos para esse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti** pelo apoio e cessão do seu Laboratório de Bioquímica, da Faculdade de Farmácia da Unesp de Araraquara, para a realização da parte experimental *in vivo*.

Às Faculdades de Odontologia e de Farmácia de Araraquara/Unesp pelo espaço concedido para o teste *in vivo*, para a análise histológica e pelos materiais concedidos.

À Universidade de São Paulo, pelos auxílios financeiros em congressos e para a compra dos anticorpos da análise imuno-histoquímica, além da oportunidade de me tornar uma Doutora em uma Universidade maravilhosa conhecida mundialmente.

Ao **Prof. Dr. Sidney Ribeiro** pelo espaço do Laboratório de Materiais Fotônicos cedido e pelas mantas de Celulose Bacteriana fornecidas.

Ao bioterista **Nelson Ferreira da Silva Jr.** Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC da USP, pela ajuda na parte experimental com os animais, pelas orientações e pela amizade.

Ao técnico **Rafael Romano Domenegueti**, do Laboratório de Materiais Fotônicos do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, pelo auxílio no Laboratório.

Aos técnicos **Luiz Antonio** e **Pedro**, do Departamento de Morfologia, que me ajudaram no processamento dos cortes histológicos.

Ao físico **Aldimar Tadeu Jesuino Constante**, do Instituto de Química de São Carlos/USP, pela Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier feita com os hidrogéis.

Ao químico **Dr. Márcio de Paula**, do Instituto de Química de São Carlos/USP, pela Microscopia Eletrônica de Varredura feita com os hidrogéis.

Ao **Prof. Dr. Antônio José Felix de Carvalho**, do Departamento de Engenharia de Materiais da EESC/USP, pela análise Termogravimétrica feita com os hidrogéis.

Ao **Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade**, do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/Unesp, pelas orientações da análise Imuno-histoquímica.

Aos funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC da USP pela recepção e colaboração nesse trabalho.

À **Biogen**, pela ajuda com o tratamento das lâminas para a análise imuno-histoquímica.

À colega e “irmã” doutoranda **Caroline Faria Bellani**, pela grande ajuda com a análises estatística e de citotoxicidade, e pelos momentos de risadas e desabafos.

Aos alunos de Iniciação Científica **Camila Juliane** e **Angelo Camilli** da Universidade Estadual Paulista, pela ajuda no teste *in vivo*, pela companhia e troca de ensinamentos.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando, me alegrando, sendo pacientes e transmitindo muito amor e carinho. Eu amo vocês!

Ao meu ex-marido **Michael**, pela ajuda com o tratamento das tabelas e das imagens.

Aos meus amigos, que sempre me dão muita força nas minhas escolhas, além de me proporcionarem momentos sempre maravilhosos.

Meus sinceros agradecimentos a todas essas e outras pessoas não citadas aqui, mas que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho/sonho se concretizasse.

EPÍGRAFE

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir.”

Augusto Cury

RESUMO

MORAES, P. R. F. S. **Obtenção, caracterização e análise comparativa de hidrogéis a base de celulose bacteriana com *Calendula officinalis* e *Jacaranda caroba* em dorso de ratos.** 2018. 149 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A cura de feridas é um processo complexo que envolve eventos celulares e bioquímicos. Vários medicamentos têm sido usados para reduzir o tempo de cicatrização de lesões e evitar danos estéticos. Portanto, uma avaliação objetiva, não invasiva e *in vivo* é necessária para ajudar na determinação da profundidade e do grau de cicatrização de feridas. Biomateriais podem ser utilizados para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente tecidos ou órgãos. A celulose bacteriana é um material altamente hidrofílico, com possibilidade de ser moldada em estruturas tridimensionais, sendo suas fibras nanométricas, com excelente resistência mecânica à tração. Essa estrutura nanofibrilar pode vir a ser uma matriz viável para auxiliar a cura de lesões dérmicas e vem sendo utilizada em diversas aplicações médicas. As plantas medicinais *Calendula officinalis* e *Jacaranda caroba* podem contribuir para a cicatrização de feridas face suas atividades antiviral, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antiulcerogênica, entre outras. Neste trabalho, foram desenvolvidos hidrogéis de celulose bacteriana (pura e com extrato de *Calendula officinalis* e também de *Jacaranda caroba*), com os quais realizaram-se experimentos de caracterização (microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier). Após estas etapas, foi realizado o estudo *in vivo*, em dorso de ratos, no qual foram feitas as análises macroscópica e histológica dos hidrogéis, comparando com os grupos controles, positivo (hidrogel de celulose bacteriana pura) e negativo (coágulo). Após 3, 7, 15 e 30 dias, os animais foram sacrificados e os dorsos processados segundo rotina histológica. A caracterização química realizada neste trabalho confirmou a incorporação das tinturas das plantas às matrizes da celulose bacteriana sem alterar a sua estrutura química. A análise da microscopia eletrônica de varredura demonstrou que mesmo após a adição das tinturas das plantas à celulose bacteriana, a estrutura continuou com poros interconectados em todo o material. A análise termogravimétrica indicou que os hidrogéis com as tinturas das plantas apresentam propriedades térmicas melhores que o controle positivo. Os resultados demonstraram que os hidrogéis são biocompatíveis, de fácil fixação, mantêm o local úmido e não danificam o tecido de granulação. O hidrogel de celulose bacteriana com a *Calêndula* promoveu uma

diferença estatística significativa para a reparação tecidual nos períodos de três e setes dias (períodos críticos) comparado com os grupos controles, negativo e positivo. Os resultados da avaliação histológica demonstraram diferença estatística significativa para reação inflamatória tecidual entre os tratamentos no período de três dias. Na avaliação da qualidade, quantidade e orientação das fibras colágenas, foi verificada diferença estatística significativa entre os tratamentos no período de sete dias. A análise imuno-histoquímica demonstrou diferença estatística significativa entre os grupos nos períodos de 3, 7 e 15 dias. Os hidrogéis mostraram resultados satisfatórios, principalmente o de celulose bacteriana com *Calendula officinalis*. Com isso, pode-se concluir que eles contribuem positivamente na reparação tecidual de feridas de pele de ratos.

Palavras-chave: Celulose bacteriana. Calendula officinalis. Jacaranda caroba. Hidrogel. Cicatrização de feridas. Reparação tecidual.

ABSTRACT

MORAES, P. R. F. S. **Obtaining, characterization and comparative analysis of hydrogels based on bacterial cellulose with *Calendula officinalis* and *Jacaranda caroba* on the back of rats.** 2018. 149 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Wound healing is a complex process involving cellular and biochemical events. Several drugs have been used to reduce the healing time of lesions and to avoid cosmetic damage. Therefore, an objective, noninvasive and *in vivo* evaluation is needed to assist in determining the depth and degree of wound healing. Biomaterials can be used to enhance, enhance or replace partially or entirely tissues or organs. Bacterial cellulose is a highly hydrophilic material, with the possibility of being molded in three-dimensional structures, with its nanometric fibers, with excellent mechanical tensile strength. This nanofibrillar structure can be a viable matrix to assist the healing of dermal lesions and has been used in several medical applications. Medicinal plants *Calendula officinalis* and *Jacaranda caroba* can contribute to the healing of wounds due to its antiviral, anti-inflammatory, antimycobacterial, antioxidant, antiulcerogenic and other activities. In this work, hydrogels of bacterial cellulose (pure and with extract of *Calendula officinalis* and also of *Jacaranda caroba*) were developed, with which characterization experiments were carried out (scanning electron microscopy, thermogravimetric analysis and infrared spectroscopy with Fourier transform). After these steps, the *in vivo* study was carried out on the dorsum of rats, in which the macroscopic and histological analyzes of the hydrogels were performed, comparing with the positive (pure bacterial cellulose hydrogel) and negative (clot) control groups. After 3, 7, 15 and 30 days, the animals were sacrificed and the backs processed according to histological routine. The chemical characterization carried out in this work confirmed the incorporation of plant dyes into the bacterial cellulose matrices without altering their chemical structure. Scanning electron microscopy analysis showed that even after the addition of plant dyes to bacterial cellulose, the structure continued with interconnected pores throughout the material. The thermogravimetric analysis indicated that the hydrogels with the plant tinctures present better thermal properties than the positive control. The results demonstrated that the hydrogels are biocompatible, easy to attach, keep the site moist and do not damage the granulation tissue. The bacterial cellulose hydrogel with Marigold promoted a statistically significant difference for tissue repair in periods of three and seven days (critical periods) compared to

the control groups, negative and positive. The results of histological evaluation demonstrated a statistically significant difference for tissue inflammatory reaction between the treatments in the three-day period. In the evaluation of the quality, quantity and orientation of collagen fibers, a statistically significant difference was observed between the treatments in the seven-day period. The immunohistochemical analysis showed a statistically significant difference between the groups in the periods of 3, 7 and 15 days. Hydrogels showed satisfactory results, especially bacterial cellulose with *Calendula officinalis*. With this, it can be concluded that they contribute positively in the tissue repair of rat skin wounds.

Keywords: Bacterial cellulose. *Calendula officinalis*. *Jacaranda caroba*. Hydrogel. Wound dressing. Tissue repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Aspectos macroscópicos de <i>Calendula officinalis</i>	60
Figura 2 - Aspectos macroscópicos de <i>Jacaranda caroba</i>	68
Figura 3 - Fluxograma representando resumidamente o trabalho desenvolvido	75
Figura 4 - Identificação das regiões das lesões criadas no dorso dos ratos	85
Figura 5 - Três pontos definidos para a medida da membrana fibrosa purulenta. (a) – Ponto 1: início; (b) – Ponto 2: metade da região do meio; (c) – Ponto 3: região do meio	89
Figura 6 - Regiões definidas para a identificação dos núcleos Ki-67 positivos para quantificação automática	91
Figura 7 - Perfil cromatográfico da tintura de <i>Calendula officinalis</i> (60% v/v) por CLAE com as atribuições dos compostos detectados. 254 nm	94
Figura 8 - Perfil cromatográfico da tintura de <i>Jacaranda caroba</i> (60% v/v) por CLAE com as atribuições dos compostos detectados. 254nm	95
Figura 9 - Proliferação celular de fibroblastos L929 em contato com extratos dos hidrogéis a 10 m/v%. Quanto maior a fluorescência relativa (%), maior o número de células viáveis. As barras em cores representam as médias e as barras em preto representam o Erro Padrão das Médias. * $n < 0,05$, em comparação com as células não-tratadas (controle). ** $n < 0,0001$, em comparação com os diferentes hidrogéis	97
Figura 10 - Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura para os hidrogéis liofilizados. (a) hidrogel de CB-P; (b) hidrogel de CB-JC; (c) hidrogel de CB-CO. (A, B e C) são cortes transversais das amostras	99
Figura 11 - Curvas TG de: (a) Hidrogel de CB-P; (b) Hidrogel de CB-JC; (c) Hidrogel de CB-CO. I – perda de água, II – perda por decomposição e III – carbonização	101
Figura 12 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho. (a) Hidrogel de CB-P; (b) Hidrogel de CB-JC; (c) Hidrogel de CB-CO	102
Figura 13 - Aspecto das feridas dos grupos I e II no primeiro dia após a cirurgia. (a) – hidrogel de CB-JC; (b) – coágulo	106
Figura 14 - Terceiro dia: Grupo I – (a) hidrogel de CB-JC; Grupo II – (b) controle	

negativo com coágulo; Grupo III – (c) hidrogel de CB-CO; e Grupo IV – (d) hidrogel de CB-P	108
Figura 15 - Comparação do tamanho das feridas antes e após a aplicação dos hidrógeis e do coágulo (controle) para cada período avaliado (3, 7, 15 e 30 dias), expresso em porcentagem de regeneração da ferida. As barras em cores representam as médias e as barras em preto representam o Erro Padrão das Médias. *p<0,05 em comparação com o coágulo. #p<0,05 em comparação com hidrogel de celulose bacteriana puro (CB-P)	109
Figura 16 - Sétimo dia: Grupo I – (a) hidrogel de CB-JC; Grupo II – (b) controle negativo com coágulo; Grupo III – (c) hidrogel de CB-CO; e Grupo IV – (d) hidrogel de CB-P	110
Figura 17 - Décimo quinto dia: Grupo I – (a) hidrogel de CB-JC; Grupo II – (b) controle negativo com coágulo; Grupo III – (c) hidrogel de CB-CO; e Grupo IV – (d) hidrogel de CB-P	111
Figura 18 - Trigésimo dia: Grupo I – (a) hidrogel de CB-JC; Grupo II – (b) controle negativo com coágulo; Grupo III – (c) hidrogel de CB-CO; e Grupo IV – (d) hidrogel de CB-P	112
Figura 19 - Período de 3 dias; (a) – GI mostra neovascularização em formação e completa, crosta, tecido de granulação organizado, reação inflamatória moderada e epitélio em processo de cicatrização; (b) – GII mostra início da neovascularização, crosta, tecido de granulação desorganizado, reação inflamatória moderada e sem epitélio; (c) – GIII mostra neovascularização em formação e completa, tecido de granulação em organização, reação inflamatória média e epitélio em processo de cicatrização; (d) – GIV mostra neovascularização em formação e completa, crosta, tecido de granulação em organização, reação inflamatória média e epitélio em processo de cicatrização. Epitélio (A), crosta (B), neovascularização (C), infiltrado inflamatório (D), tecido de granulação (E) e camada de queratina (F). HE	115
Figura 20 - Período de 7 dias; (a) – GI mostra neovascularização em formação e completa, crosta, tecido de granulação organizado, reação inflamatória moderada, epitélio completo e camada de queratina; (b) – GII mostra	

neovascularização em formação e completa, tecido de granulação organizado, reação inflamatória moderada e sem epitélio; (c) – GIII e GIV mostram neovascularização em formação e completa, crosta, tecido de granulação organizado, reação inflamatória moderada e epitélio em processo de cicatrização. Epitélio (A), crosta (B), neovascularização (C), infiltrado inflamatório (D), tecido de granulação (E) e camada de queratina (F). HE 116

Figura 21 - Período de 15 dias; (a) – GI mostra neovascularização em formação e completa, crosta, tecido de granulação organizado, reação inflamatória média, epitélio completo, camada de queratina, derme reparada, presença de glândulas e folículo piloso; (b) – GII mostra neovascularização em formação e completa, tecido de granulação organizado, crosta, reação inflamatória moderada e epitélio completo; (c) – GIII mostra neovascularização em formação e completa, tecido de granulação organizado, reação inflamatória moderada, epitélio completo, camada de queratina, presença de glândulas e folículo piloso; (d) – GIV mostra neovascularização em formação e completa, tecido de granulação organizado, reação inflamatória média, epitélio completo, camada de queratina e presença de folículo piloso. Epitélio (A), crosta (B), neovascularização (C), infiltrado inflamatório (D), tecido de granulação (E) camada de queratina (F), glândulas (G) e folículo piloso (H). HE 117

Figura 22 - Período de 30 dias; (a) – GI mostra neovascularização em formação e completa, crosta, tecido de granulação organizado, reação inflamatória leve, epitélio completo, camada de queratina, presença de glândulas e folículo piloso; (b) e (d) – GII e GIV mostram neovascularização em formação e completa, tecido de granulação organizado, reação inflamatória média, epitélio completo e camada de queratina; (c) – GIII mostra neovascularização em formação e completa, tecido de granulação organizado, reação inflamatória leve e epitélio completo. Epitélio (A), crosta (B), neovascularização (C), infiltrado inflamatório (D), tecido de granulação (E) camada de queratina (F), glândulas (G) e folículo piloso (H). HE 118

Figura 23 - Média do número de miofibroblastos presentes na borda das feridas dos grupos Controle, CB-P, CB-JC e CB-CO para cada período avaliado (3, 7, 15 e 30 dias). As barras em cores representam as médias e as barras em preto representam o Erro Padrão das Médias 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração (%) das matérias-primas usadas na formulação do hidrogel CB-P	78
Tabela 2 - Concentração (%) das matérias-primas usadas na formulação do hidrogel CB-CO	78
Tabela 3 - Concentração (%) das matérias-primas usadas na formulação do hidrogel CB-JC	79
Tabela 4 - Distribuição dos grupos em relação ao material utilizado	86
Tabela 5 - Classificação para intensidade de reação inflamatória presente nos espécimes	87
Tabela 6 - Classificação para o padrão de reparação tecidual em relação à qualidade, quantidade e orientação das fibras colágenas presentes nos espécimes	88
Tabela 7 - Classificação para o padrão de reparação tecidual em relação à reconstituição do epitélio presentes nos espécimes	88
Tabela 8 - Tabela de picos do cromatograma da tintura de <i>Calendula officinalis</i>	94
Tabela 9 - Tabela de picos do cromatograma da tintura de <i>Jacaranda caroba</i>	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
ASTM	American Society for Testing and Materials (Sociedade Americana para Testes e Materiais)
CB	Celulose bacteriana
CB-P	Celulose bacteriana pura
CB-JC	Celulose bacteriana com <i>Jacaranda caroba</i>
CB-CO	Celulose bacteriana com <i>Calendula officinalis</i>
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
HE	Hematoxilina-Eosina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
TG	Análise Termogravimétrica
TGF-b	Fator de crescimento transformador básico
3-D	3 dimensões

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	39
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	43
2.1 A pele	43
2.2 Feridas	44
2.3 Tratamento	47
2.3.1 Hidrogéis	53
2.4 Celulose bacteriana (CB)	54
2.5 Plantas medicinais	56
2.5.1 <i>Calendula officinalis</i> L.	58
2.5.2 <i>Jacaranda caroba</i> (Vell.) A. DC.	66
3 OBJETIVO	73
3.1 Objetivos específicos	73
4 MATERIAIS E MÉTODOS	75
4.1 Obtenção do material botânico e das tinturas	75
4.2 Avaliação da qualidade das tinturas	76
4.3 Preparo dos hidrogéis	77
4.3.1 Hidrogel de celulose bacteriana pura (CB-P)	77
4.3.2 Hidrogel de celulose bacteriana com <i>Calendula officinalis</i> (CB-CO) 10%	78
4.3.3 Hidrogel de celulose bacteriana com <i>Jacaranda caroba</i> (CB-JC) 10%	78
4.4 Citotoxicidade e viabilidade celular	79
4.4.1 Cultura celular	79
4.4.2 Preparação dos extratos dos hidrogéis	79
4.4.3 Proliferação e viabilidade celular	80
4.5 Caracterização dos hidrogéis	81
4.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	81
4.5.2 Análise térmica por termogravimetria (TG)	82
4.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	83
4.6 Experimentação animal	84
4.7 Avaliação macroscópica	86
4.8 Análise histológica	87
4.8.1 Espessura da membrana fibrosa purulenta	88

4.9 Análise da proliferação celular utilizando imuno-histoquímica	89
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	93
5.1.1 <i>Calendula officinalis</i>	93
5.1.2 <i>Jacaranda caroba</i>	94
5.2 Citotoxicidade e viabilidade celular	96
5.3 Caracterização das micropartículas dos hidrogéis	98
5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	98
5.3.2 Análise térmica por termogravimetria (TG)	100
5.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	102
5.4 Avaliação macroscópica	103
5.5 Análise histológica	113
5.5.1 Espessura da membrana fibrosa purulenta	118
5.6 Imuno-histoquímica.....	119
6 CONCLUSÃO	123
REFERÊNCIAS	125
ANEXO	149

1. INTRODUÇÃO

Feridas complexas impactam a vida de cerca de 34,5 milhões de pessoas em todo o mundo, e esse número está crescendo a um ritmo alarmante (DRISCOLL, 2009).

No contexto da saúde pública, essas feridas são uma problemática que tem se mostrado frequente (MACIEL, 2008). No Brasil, atualmente, o tratamento de feridas recebe atenção especial dos profissionais da área de saúde, tendo como destaque a atuação dos enfermeiros, que muito têm contribuído para o avanço e o sucesso do tratamento de pessoas com lesões crônicas. Busca-se uma assistência global, visando à cura ou cicatrização, a melhora da condição clínica e social dos clientes, a racionalização e uma maior eficiência dos procedimentos direcionados ao tratamento de lesões cutâneas, com a consequente otimização do atendimento (CUNHA, 2006). As úlceras crônicas, atualmente chamadas de feridas complexas, são consideradas um problema de saúde pública. Elas contribuem para o aumento do número de aposentadorias precoces, fazendo com que haja perda de mão-de-obra ativa (DEALEY, 2008).

Estima-se que as feridas crônicas afetem mais de 6 milhões de pessoas nos Estados Unidos e sua incidência deve aumentar à medida que a população envelhece e segundo o aumento do número de portadores de diabetes *mellitus* (GREER et al., 2012). Úlceras especialmente atribuídas à diabetes *mellitus*, doenças vasculares, venosa e arterial, por pressão e por traumas correspondem a uma proporção substancial de úlceras crônicas (SOUZA et al., 2013).

A existência de uma variedade de tipos de feridas, com suas fases e modos variados de cicatrização, levou à evolução de diferentes tipos de coberturas. Estas, antes de 1960, eram consideradas apenas como produtos passivos que tinham um mínimo papel no processo de cura das lesões, porém, a pesquisa pioneira de Winter (1962), iniciou o conceito da importância de um ambiente ideal para a cicatrização das feridas e do ativo envolvimento das coberturas para estabilizar e manter tal ambiente. Esta consciência resultou, partindo dos materiais passivos tradicionalmente conhecidos, no desenvolvimento de coberturas funcionalmente ativas, que através da interação com as feridas que recobrem, criam e mantêm a umidade no campo de cicatrização.

Dentre as preparações semi-sólidas, os sistemas emulsionados são amplamente utilizados em formulações destinadas à aplicação tópica, pois são muitas as vantagens em

relação às emulsões sob o ponto de vista farmacêutico (LACHMAN; IEBERMAN; ANING, 2001). Cremes aquosos e loções tendem a serem mais aceitos pelo paciente em relação à facilidade na aplicação e espalhamento na pele, e por possuírem efeito refrescante (SMITH; MAIBACH; SURBER, 2000). Feridas de diferentes formas e tamanhos podem ser preenchidas quando são utilizadas coberturas no estado líquido e gel (GOERTZ et al., 2010).

Os hidrogéis podem ser usados para facilitar o processo de cicatrização pós-operatória. Eles atuam controlando o sangramento, permitindo que o tecido permaneça na orientação adequada, impedindo a formação de aderências (LIM; HUDSON, 2004). Na área médica, eles são muito utilizados também como cobertura em lesões de pele. Suas indicações são: feridas secas ou com pouco exsudato; feridas com necrose, pois auxilia na remoção de crostas; feridas limpas; feridas superficiais, como lacerações, cortes e abrasões; áreas doadoras e receptoras de enxerto; úlceras diabéticas e lesões de pressão; úlceras de membros inferiores; queimaduras de primeiro e segundo grau. Sua ação está relacionada com a quimiotaxia de leucócitos, favorecimento em relação à angiogênese, promoção do desbridamento autolítico e manutenção do meio úmido ideal. Os benefícios estão relacionados com a possibilidade de uso nas várias fases da cicatrização; não danifica o tecido de granulação; além de promover alívio e conforto (MANDELBAUM; DI-SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Apesar da grande disponibilidade de recursos, novos métodos que sejam mais eficazes na cicatrização de feridas têm sido buscados. Os métodos estudados atualmente incluem tanto o uso de terapias alopáticas quanto de terapias complementares, sendo parte destas a utilização de plantas medicinais que há séculos são aplicadas empiricamente. O uso de plantas medicinais pela população mundial nos últimos tempos tem sido significativo; dados da OMS indicam que cerca de 80% dessa população fizeram uso de algum tipo de planta na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, cerca de 30% foram por indicação médica (MARTINS et al., 2002). Além da OMS, o Ministério da Saúde tem incentivado o uso de terapias complementares, tendo implementado em 2006 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), inserindo as plantas medicinais através da fitoterapia, dentre outras terapias (BRASIL, 2006).

A celulose é o biopolímero natural mais abundante na Terra, dotado de propriedades únicas, sendo um ponto de partida ideal para transformá-la em biomateriais úteis.

As plantas *Calendula officinalis* e *Jacaranda caroba* também apresentam várias propriedades, como cicatrizante, analgésica, antisséptico, tonificante de pele, tranquilizante, antifúngica, antibacteriana, etc (ARAÚJO et al., 2009; BALDUCCI-ROSLINDO;

SILVÉRIO; MALAGOLI, 1999; CHAKRABORTHY; ARORA; MAJEE, 2011; MULEY; KHADABADI; BANARASE, 2009; NITZ et al., 2006; PAIM et al., 2010; PARENTE et al., 2002; RAO et al., 1991; SAMOCHOWIEC, 1983; VALDES; GARCIA, 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Desta forma, torna-se interessante a combinação dos hidrogéis de celulose bacteriana com os extratos dessas plantas por promoverem, em um mesmo material, biocompatibilidade, efeito anestésico, terapêutico, antisséptico, antibacteriana, e antigúngica, para a reparação de feridas complexas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A pele

A pele, o maior órgão do corpo humano, tem como principais funções a garantia da proteção mecânica, a prevenção contra contaminação (GROEBER et al., 2011; RAVICHANDRAN et al., 2012), proteção contra a perda de água por evaporação, contra o atrito e os microrganismos agressores. Desta forma, ela é parcialmente permeável às substâncias químicas e permite a passagem de medicamentos em certas condições, podendo ser considerada uma interface terapêutica; apesar desse tecido representar uma barreira física à penetração de substâncias, há várias formulações, de uso tópico, que sofrem absorção, inclusive as de uso interno (LIRA, 2003).

A pele, apesar de ser um órgão de proteção e eliminação, é também um órgão sensorial, que recebe e conduz estímulos (CHARLET, 1996). Atua na manutenção da temperatura corporal, pois através das suas terminações nervosas, está em comunicação constante com o ambiente através dos seus vasos, glândulas e tecido adiposo. Possui a capacidade de regular a pressão sanguínea e proteger contra raios ultravioletas (SAMPAIO; RIVITTI; EVANDRO, 2001). Suas glândulas sudoríparas participam da termorregulação e da excreção de várias substâncias (IRION, 2005).

Se a pele estiver intacta, a principal via de penetração dos fármacos são as camadas epidérmicas e não os folículos pilosos ou ductos das glândulas, pois sua área superficial é bastante pequena em comparação com a da pele que não contém nenhum desses elementos anatômicos. Portanto, a absorção percutânea dos medicamentos resulta da penetração direta do fármaco através do estrato córneo, passando os tecidos epidérmicos mais profundos e atingindo a derme que é vascularizada e onde o fármaco torna-se disponível para absorção (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

Anatomicamente, a pele humana pode ser descrita como um órgão estratificado com duas camadas principais de tecido, a epiderme e a derme e uma terceira camada variável, a subcutânea ou hipoderme (STEVENS; LOWE, 2001).

A epiderme é a camada mais externa da pele, que abrange as células epiteliais escamosas estratificadas (GENNARO, 2004; STEVENS; LOWE, 2001), sendo elas o estrato

córneo, basal, camada espinhosa e a camada granulosa (IRION, 2005). O estrato córneo, por ser o mais superficial, é o mais importante para a cosmética (GENNARO, 2004). Essa camada é a mais efetiva barreira contra infecção e contra o perigo da sepse, a qual é ainda mais frequente causa de morte após extensas lesões do tecido cutâneo (KANGESU, 1993).

A derme apresenta função protetora e de sustentação, sendo o local onde se formam as glândulas sebáceas e os folículos pilosos. Apresenta ainda fibras colágenas, elásticas e reticulíneas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A derme tem a importante função de nutrir a epiderme, pois esta exige uma constante reposição de nutrientes necessários para manter a atividade mitótica (IRION, 2005). Descrevem-se na derme duas camadas de limites pouco distintos que são: papilar, superficial e a reticular, mais profunda (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A hipoderme, que também é chamada de camada subcutânea, possui a função de amortecedor para a derme e a epiderme. Nesta camada, encontram-se fibras colágenas provenientes da derme que se cruzam entre as células gordurosas acumuladas, fornecendo uma conexão entre as camadas superficiais da pele e da camada subcutânea (GENNARO, 2004; SAMPAIO et al., 2001; STEVENS; LOWE, 2001).

2.2 Feridas

Uma ferida é representada pela interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico ou desencadeado por uma afecção clínica que aciona de imediato as frentes da defesa orgânica para o reparo (ARNOLD; ODOM; JAMES, 1994; BLANES, 2004). O objetivo imediato desse reparo é alcançar a integridade do tecido e a homeostase (SINGER; CLARK, 1999).

As feridas podem ser classificadas quanto ao agente causador em incisiva ou cortante; contusa; lacerada; perfurante; penetrante; escoriação; térmica ou queimadura; patológica; iatrogênica; e amputação. Quanto à etiologia, elas são classificadas em ferida aguda ou crônica (IRION, 2005).

O rompimento dos vasos sanguíneos também leva à formação do coágulo sanguíneo, composto de fibrina e de proteínas da matriz extracelular (MARTIN, 1997; SZPADERSKA et al., 2003). Além de fornecer uma barreira contra microrganismos invasores, o coágulo sanguíneo também atua como uma matriz para células invasoras e como um reservatório de

fatores de crescimento necessários durante os estágios posteriores do processo de cura. Após algumas horas, as células inflamatórias invadem o tecido da ferida; os neutrófilos são as primeiras células identificadas seguidas por monócitos e linfócitos. Eles produzem uma ampla variedade de proteinases como defesa contra microrganismos contaminantes e estão envolvidas na fagocitose de detritos celulares. Além dessas funções de defesa, as células inflamatórias também são uma fonte importante de fatores de crescimento e citocinas, que iniciam a fase proliferativa do reparo da ferida (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007). A infiltração de neutrófilos cessa após alguns dias e os próprios neutrófilos são fagocitados pelos macrófagos, em torno de 48 horas após a lesão (COTRAN; MAYADAS-NORTON, 1998). Em seguida, inicia-se a migração e proliferação de queratinócitos na margem da ferida e é seguida pela proliferação de fibroblastos dérmicos na vizinhança da ferida. Estas células migram subsequentemente para a matriz provisória e depositam grandes quantidades de matriz extracelular. Além disso, os fibroblastos da ferida adquirem um fenótipo contrátil e se transformam em mio fibroblastos, um tipo celular que desempenha um papel importante na contração da ferida. A angiogênese leva à formação de novos vasos sanguíneos. O tecido conjuntivo da ferida resultante é conhecido como tecido de granulação devido à aparência granular dos numerosos capilares. Finalmente, ocorre uma transição do tecido de granulação para a cicatriz madura, caracterizada pela contínua síntese de colágeno (MARTIN, 1997).

Quando a granulação é excessiva, ocorre um retardamento da cicatrização. A prevenção pode ser obtida pelo favorecimento de uma cicatrização subcrosta, sendo que a formação da crosta em feridas não exsudativas favorece o processo de cicatrização. Quando numa ferida persiste o exsudato, ocorre desagregação da crosta e desta forma, favorece o desenvolvimento de germes entre ela e o tecido de granulação (OLIVEIRA, 1992).

Quando o estímulo inflamatório não pode ser eliminado ou removido, desencadeia-se uma resposta complexa, envolvendo todo o organismo e levando a um processo inflamatório crônico, o qual muitas vezes poderá se tornar deletério (CONTRERA et al., 1985).

As feridas crônicas evoluem rapidamente, são refratárias a diversos tipos de tratamentos e decorrem de condições predisponentes que impossibilitam a normal cicatrização (CANDIDO, 2001).

É importante ressaltar que a incidência e a prevalência de lesões vêm crescendo em decorrência da mudança do perfil da população brasileira, com o aumento da longevidade, acompanhado de hábitos de vida inadequados, que geram altos índices de doenças crônicas, como diabetes *mellitus*, doenças vasculares, dentre outras (SILVA JR., 2006). Viver com a

condição de ter uma úlcera traz uma série de mudanças na vida das pessoas e, por consequência, na de seus familiares. Muitas vezes, surgem dificuldades com as quais o portador, a família e a equipe de saúde não estão preparados para lidar e nem compreender todos os aspectos que envolvem o problema (LUCAS; MARTINS; ROBAZZI, 2008).

Mandelbaum, Di-Santis e Mandelbam (2003) descrevem que 3% da população brasileira é portadora de algum tipo de lesão crônica. Cerca de 2,7% da população tem úlceras crônicas nos pés e pernas, porcentagem que chega a 10% nos diabéticos e que representa a segunda causa de afastamento do trabalho no Brasil. A respeito dos resultados de pesquisas isoladas e em função dos escassos registros existentes, é provável que os dados estatísticos não retratem de forma fidedigna o sério problema de saúde pública que as feridas crônicas representam (MORAIS; OLIVEIRA; SOARES, 2008).

A incidência da lesão por pressão varia de 13,3%, em hospitais, a 39,4%, em indivíduos que residem em instituições de longa permanência para idosos. A lesão por pressão produz dor incessante e restrição das atividades de vida diária, exigindo uma aprendizagem para conviver e lidar com tal afecção. Há evidências de que pacientes com úlcera, quando comparados aqueles sem lesão sentem impacto significativo da doença nos âmbitos físico, social e psicológico, além de terem que conviver com sintomas da afecção e problemas de saúde geral, como intervenções do cuidado, alta taxa de depressão, ansiedade e baixa qualidade de vida (GALHARDO et al., 2010; SOUZA; SANTOS, 2010). Salomé, Blanes e Ferreira (2011) avaliaram os sintomas de depressão em pacientes diabéticos com úlceras no pé, encontraram diferentes graus desses sintomas relacionados as úlceras.

A lesão crônica de membros inferiores é uma condição com alta prevalência e que pode gerar altos custos para a saúde pública, com tratamentos prolongados e pouco eficientes quando praticados por sistemas de saúde não integrados, sem uma padronização de cuidados. A insuficiência venosa crônica é responsável por 75% das úlceras de perna que acarretam graves repercussões sócio-econômicas com perda de dias de trabalho, aposentadoria precoce e longos períodos de tratamento. No Brasil, é a 14^a causa de afastamento do trabalho (OKAMOTO, 2012). As estimativas de custo para áreas de tratamento de feridas crônicas chegam a US\$ 50 bilhões por ano somente nos EUA (RICE et al., 2014).

Nos Estados Unidos (USA), cerca de 6 milhões de pessoas apresentam feridas crônicas em membros inferiores, sendo que na população idosa, a prevalência é em torno de 15%. Projetando-se esses dados para o futuro, estima-se que em 2050 cerca de 25% da população idosa vai apresentar essa lesão. No Brasil, não existem muitos estudos epidemiológicos que nos permitam estabelecer esse percentual, mas estima-se que haverá

cerca de 570 mil brasileiros com feridas crônicas a cada ano. Na população acima de 80 anos, essa prevalência pode chegar a 20 para cada 1000 indivíduos (OKAMOTO, 2012).

O processo de cura de feridas pode ser classificado em três tipos: cura por primeira intenção, cura por segunda intenção e cura por terceira intenção, dependendo da natureza das margens das feridas curadas. Em feridas cicatrizadas por primeira intenção, as margens são bem fechadas e sem cicatriz. Por outro lado, a cicatrização de feridas por segunda intenção envolve a formação de tecido de granulação, que preenche os espaços entre as margens da ferida e está associada a uma perda significativa de tecido, deixando pequenas cicatrizes. Feridas curadas por terceira intenção são geralmente as que estão abertas durante três a cinco dias, geralmente resultando na formação de uma cicatriz extensa (THAKARE, 2011). Na cicatrização por segunda intenção, o tecido de granulação, formado pela proliferação de fibroblastos e capilares, constitui uma barreira contra infecção, superfície para a migração do epitélio e tem papel na contração da ferida (SWAIM; HENDERSON; FOWLER, 1998).

A formação de cicatriz é um resultado fisiológico e inevitável do reparo de feridas em mamíferos e há evidências substanciais de que a inflamação é um pré-requisito essencial para a cicatrização. Embora o tecido cicatricial normal forneça uma restauração estável da barreira cutânea, o novo tecido é inferior em relação a aspectos estruturais, estéticos e funcionais importantes. Há considerável variação quantitativa e qualitativa no potencial de cicatrização entre as espécies e até mesmo entre vários locais e órgãos do corpo (HARTY et al., 2003; MARTIN; LEIBOVICH, 2005).

2.3 Tratamento

A evolução cicatricial das feridas é composta de uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos, e representa o esforço do corpo para restaurar a função e a estrutura natural de um tecido injuriado (SANTOS, 2000). Os fatores de ordem geral que podem afetar esta cicatrização são a idade, raça, tipo da pele, o estado nutricional, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, aterosclerose, disfunção renal, diabetes, quadros infecciosos e o uso de drogas sistêmicas. Já os fatores de ordem local que podem influenciar a cicatrização são a formação de hematomas, localização anatômica, infecção, reação de corpo

estranho, uso de drogas tópicas e ressecamento durante a cicatrização (MANDELBAUM; DI-SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na cicatrização de feridas é muito importante para a compreensão dos possíveis efeitos de métodos terapêuticos que podem auxiliar o processo de cura. A cura de feridas da pele requer a participação de várias linhagens celulares, e cada uma dessas células pode se comportar de forma diferente com base na terapia utilizada (PINHEIRO et al., 2006).

Os principais fatores que podem favorecer a cicatrização são: programas de controle de infecções; combate ao estresse, por esse fator se relacionar ao equilíbrio hormonal; uso de substâncias farmacológicas que comprovadamente apresentem favorecimento do processo cicatricial (MARTINS et al., 2006).

Borges (2012) afirma que o termo curativo é o ato de limpar, desbridar e cobrir lesões. Os materiais desenvolvidos para o curativo das feridas são denominados coberturas. A cobertura estimula a angiogênese por hipóxia no leito da ferida, absorve exsudato, mantém a umidade e a temperatura em torno de 37 °C, favorecendo o desbridamento autolítico e alívio da dor (OKAMOTO, 2012).

Na literatura descreve que na pré-história, vários agentes como extratos de plantas, água do mar, neve, gelo, frutas e barro eram aplicados sobre as feridas. Na Mesopotâmia, as feridas eram lavadas com água ou leite, e a cobertura era realizada com mel ou resina, sendo que a lã de carneiro, as folhas e cascas de árvores eram utilizadas para a cobertura das lesões. Os homens da pré-história utilizavam plantas e seus extratos como cataplasmas (emplasto de substâncias preparadas com linhaça, massa de argila, farinha de mandioca ou fubá colocadas entre dois panos), para estancar hemorragias e umidificar as feridas abertas (WIEMAN, 1998).

Por volta de 2.700 a.C., os egípcios utilizavam produtos que, hoje, denominamos “Fármacos da sujeira”. Esses produtos eram derivados de produtos aparentemente absurdos, como urina humana e outros, associados a orações e sacrifícios. Os médicos egípcios acreditavam que quanto mais a ferida supurava, mais rápida era a cicatrização. No período medieval, Galeno (século II d.C.), que era médico do grande imperador Marco Aurélio, instaurou a teoria da secreção purulenta. Nessa teoria, acreditava-se que a formação da secreção era fundamental para a cicatrização. Exemplos de tentativas de cicatrização foram relatados na Índia, China e nos países árabes, onde as coberturas eram cuidadosamente prescritas como o transplante de partes do corpo como a pele (PORTAL DA EDUCAÇÃO, 2012).

O desbridamento do tecido necrótico é essencial para que ocorra a cicatrização. Faz-se necessária à excisão total do tecido necrótico, infectado ou pouco vascularizado (OKAMOTO, 2012). É aceito que as lesões de membros inferiores devem ser desbridadas para permitir um bom tecido de granulação e uma adequada epitelização. Existem diversas formas de desbridar uma ferida, existindo métodos químicos, autolíticos e mecânicos que são utilizados associados ao curativo compressivo. Dentre os métodos de desbridamento autolíticos pode-se citar o hidrogel, alginatos, películas transparentes e os hidrocoloides. O desbridamento químico é baseado em enzimas desbridantes que ao serem colocadas na ferida, promovem a remoção de tecidos necróticos e aceleram a formação do tecido de granulação. Os principais agentes comercializados para esse tipo de desbridamento são a colagenase e a papaína. Quanto ao desbridamento mecânico, há diversos métodos de realizá-lo sendo o principal o desbridamento cirúrgico. A desvantagem desse método consiste no fato de haver remoção de tecidos viáveis em conjunto com o material necrótico (VALENCIA et al., 2001).

Exsudatos presentes nas feridas crônicas contêm altos níveis de enzimas proteolíticas, citocinas inflamatórias e pequenas quantidades de fatores de crescimento, o que impede a sua reparação, tornando-a crônica e predispondo a invasão bacteriana. Desta forma é conveniente a limpeza mecânica, mantendo-se o meio úmido. Em meio ambulatorial, a limpeza mecânica pode ser realizada através de irrigação com pressão controlada de soro fisiológico a 0,9% a 37 °C e a domicílio, em água corrente. O uso de antissépticos locais deve ser criterioso, pois a maioria dos produtos disponíveis apresenta citotoxicidade e dificulta a cicatrização (OKAMOTO, 2012).

A classificação mais usada para as coberturas é a que se baseia na composição do material e podem ser classificadas como sintéticas (derivadas de produtos manufaturados ou desenvolvidos em laboratório) e biológicas (derivadas de tecidos naturais) (PURNA; BABU, 2000). As coberturas biológicas podem ser derivadas de várias formulações e combinações com colágeno, celulose, elastina e lipídeos (BARTLETT, 1981), podem atuar como barreira de gases e prevenção na desidratação da ferida; diminuição da evaporação por perda de calor; menor perda de proteína e eletrólitos pelo exsudado do ferimento; prevenção da contaminação bacteriana protegendo a ferida e o paciente da sepse; permitem trocas menos dolorosas das coberturas; facilitam o desbridamento da ferida; promovem boa granulação no tecido que dará base para o auto enxerto em feridas profundas; podem ser usadas para testar o subseqüente auto enxerto; diminuem o tempo de cicatrização em regiões doadoras de pele para enxertos e em áreas que sofreram queimaduras com perda parcial de tecido; melhoram a qualidade da

cicatrização, inibem a presença excessiva de fibroblastos e diminuem a contração (WINTER, 1962). As coberturas sintéticas são as produzidas com tecido, como gaze. Elas proporcionam uma pequena ou nenhuma oclusão e permitem a evaporação da umidade, resultando numa ferida excessivamente ressecada. Foi observado que, mesmo 64 camadas de gaze não conseguem evitar a contaminação da ferida por bactérias exógenas (OWENS, 1943).

Em 2003, Yaguishita verificou a existência de 2.500 itens que se destinam ao tratamento de feridas agudas e crônicas no mercado internacional, desde a mais simples cobertura, soluções para higienização e antissepsia, até os mais complexos tipos de curativos, chamados "curativos inteligentes" ou "bioativos", que interferem de forma ativa nas diversas fases do processo cicatricial, dos vários tipos de feridas. Se por um lado tal diversidade de opções é um fator altamente positivo, por outro, pode tornar extremamente desafiadora a decisão.

Os filmes são coberturas homogêneas compostas por uma lâmina de polímero com adesivo em um dos lados. Eles são extremamente elásticos e transparentes. Os polímeros mais comumente usados incluem poliuretano, polietileno, policaprolactona, politetrafluoroetileno e dimetil aminoetil metacrilato. Coberturas de filmes são bastante apropriadas para feridas superficiais, mas devida sua falta de capacidade de absorção e por serem impermeáveis a vapores e gases, causam acúmulo de fluídos abaixo da cobertura, permitindo vazamento de exsudato e entrada de bactérias exógenas na superfície da ferida. Além do mais, não são convenientes para ferimentos grandes. Esses tipos de coberturas são encontrados no mercado como: Tegaderm[®], Dermafilm[®], Opsite[®], Opraflex[®] (STEPHEN, 1990). Existe também o CollatampFacie[®], membrana de colágeno tipo I, derivada de tendão de Aquiles de bovinos, associada a um equivalente epidérmico temporário (ROBSON; BURNS; SMITH, 1992; RUSZCZAK; SCHWARTZ, 2000). Há também o Dermagraft[®], uma tela dérmica, metabolicamente ativa, que contém proteínas da matriz (colágenos tipo I, III, V e VII, elastina, fibronectina e tenascina), fatores de crescimento presentes na derme humana e glicosaminoglicanos (RUSZCZAK; SCHWARTZ, 2000). O Biobrane[®], membrana de silicone com nylon ligado a peptídeos do colágeno dérmico, que é um substituto temporário de curto prazo, semipermeável, com boa aderência e flexibilidade (ROBSON; BURNS; SMITH, 1992). O Duoderm[®] é uma membrana impermeável com camada profunda de partículas hidroativas agregadas em polímero inerte, funcionando como uma cobertura hidroativa (HERMANS; HERMANS, 1986). A pele artificial Integra[™] é um material artificial composto por duas camadas. A primeira, externa, é composta por uma membrana de silicone. A camada interna é altamente porosa e composta por colágeno de origem bovina e

glicosaminoglicano (condroitina-6-sulfato) (KING et al., 1997; KREMER; LANG; BERGER, 2000; MOIEMEN et al., 2001).

As coberturas espumosas são lâminas de soluções espumosas de polímeros como polivinilalcool e poliuretano que são superiores às coberturas de filmes por proporcionarem isolamento térmico e auxiliarem na manutenção de um ambiente úmido na superfície da ferida. Além do mais, elas são permeáveis aos gases, não aderentes, leves e confortáveis. Têm a vantagem de se moldarem à superfície, facilitando o tratamento de feridas com cavidades irregulares. Coberturas em “spray” são mais confortáveis para a superfície da lesão e são totalmente portáteis. A maioria deles são copolímeros, por exemplo, Aeroplast[®]. Outros estudos resultaram no desenvolvimento de coberturas compostas da combinação de “spray” e espumas, por exemplo, uma espuma à base de gelatina usada sob a forma de “spray” (PURNA, 2000). Filmes em spray já existem desde 1950, mas foram relatados que produzem problemas de propagação de bactérias quando usado em feridas abertas de terceiro grau (KANE et al., 1996). “Hydron” é uma cobertura à base de poli (2-hidroxietil metacrilato) e polietileno glicol, que é formado *in situ* sobre a ferida, por pulverização, mas o seu alto custo limita o seu uso sobre coberturas simples (HUSAIN; AKHTAR; AKTHAR, 1983; NATHAN; MACMILLAN; HOLDER, 1975).

As coberturas compostas são laminados compostos de duas ou mais camadas. A mais externa é designada à durabilidade e elasticidade, e pode servir como controladora da taxa de evaporação de água, enquanto a mais interna é designada para máxima aderência e elasticidade. Essas coberturas podem ser classificadas em: Hidrocolóides – são formulações contendo um coquetel de adesivo elástico e de agentes colóides (Granuflex[®], Epigard[®], Biobrane[®], etc); Lâminas de hidrogel – são lâminas reticuladas em 3-D de polímeros hidrofílicos com ligações cruzadas, que interagem com soluções aquosas. Devido a uma habilidade refrescante, eles podem ser de grande benefício para o uso nos primeiros socorros em queimaduras; Hidrogel amorfo – estes são semelhantes ao anterior, mas não são ligados transversalmente para formar uma lâmina tridimensional. Contém pequenas quantidades de colágeno, alginato ou complexo de carboidratos, e são únicos na habilidade de doar umidade para escarras ressecadas e facilitar o desbridamento autolítico. Essas coberturas exibem taxas de fechamento e reepitelização mais rápidas quando comparadas com as coberturas hidrocolóides (GOKOO; BURHOP, 1993). Hidrogéis, devido ao seu teor de água significativo, possuem um grau de flexibilidade semelhante ao tecido natural (GULREZ; AL-ASSAF; PHILLIPS, 2011); Géis – HEMA[®] é um hidrogel biocompatível e atóxico baseado

em hidroxietil metacrilato; o PHEMA PEG[®] (Hydran) é um hidrogel que se forma diretamente sobre a superfície lesada; o Geliperm[®] que é formado pela polimerização da agarose e da acrilamida. As coberturas superabsorventes têm uma configuração em ilha consistindo de uma porção adesiva extrafina de hidrocolóide tendo na área central uma trama não absorvível cobrindo as partículas superabsorventes aderidas internamente (Combiderm[®]). Todas estas coberturas citadas anteriormente têm ação temporária e não auxiliam nas injúrias causadas por queimaduras extensas. Entretanto, problemas crônicos de perda de pele devem ser resolvidos pelo uso de materiais alternativos que promovam o fechamento da lesão. Este problema deu ensejo ao interesse em se desenvolver coberturas biológicas (PURNA, 2000).

Uma cobertura ideal seria aquela que prevenisse a cicatrização exagerada, não promovesse reação de corpo estranho, não tivesse a necessidade de realizar sua obtenção em outro sítio corpóreo nem efetuar a sua retirada posterior do local onde foi implantada (PANERARI et al., 2008).

É comum o uso empírico de antibióticos para feridas crônicas, porém, eles devem ser restritos aos casos com sinais clínicos evidentes de infecção, como edema, hiperemia, calor, empastamento, supuração e dor até que se conheça o resultado da cultura. Segundo O'Meara, Cullum e Majid (2000), não existem dados suficientes que justifiquem o uso de antibióticos sistêmicos de rotina. Os agentes mais encontrados nas úlceras crônicas entre os gram positivos são o *Staphylococcus aureus* e entre os gram-negativos a *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*.

Antibióticos tópicos são pouco eficazes no combate à infecção devido à proteção da capa fibrinosa na superfície da úlcera e a capacidade de algumas bactérias produzirem o biofilme protetor que dificulta a penetração do agente químico na membrana celular bacteriana. Os produtos à base de prata (sulfadiazina de Ag micronizada a 1% associada ou não a nitrato de cério hexahidratado a 0,4%) podem ser eficazes no tratamento da infecção e apresentam amplo espectro de ação tanto para gram-positivos quanto para gram-negativos, além de fungos, vírus e protozoários. Porém, não são indicados para feridas limpas com bom tecido de granulação e devem ser utilizados por período de tempo limitado, pois apresentam citotoxicidade, retardando a cicatrização, além de induzir a resistência bacteriana. Podem provocar efeito colateral como a leucopenia e seu uso indiscriminado pode levar à insuficiência hepática e renal transitórias, raros casos de hiposmolaridade e aumento de sensibilidade à luz solar (OKAMOTO, 2012).

É importante lembrar que uma série de agentes tópicos, tais como antissépticos, antibióticos e coberturas exercem algum efeito no local da ferida, sendo em alguns casos tão

adversos que prejudicam a cicatrização. Antissépticos e determinadas substâncias químicas destroem bactérias, mas também lesam as células corporais (MARTINS et al., 2006).

2.3.1 Hidrogéis

Os fármacos que são aplicados topicamente visam principalmente uma ação local; embora essa via também possa ser utilizada para a liberação sistêmica de fármacos. Os fármacos tópicos apresentam absorção percutânea escassa e errática com frequência, ainda que atualmente estejam disponíveis diversos adesivos (patches) transdérmicos, capazes de liberar o fármaco para distribuição sistêmica; nesta categoria se incluem os agentes antissépticos, antifúngicos e anti-inflamatórios, assim como emolientes da pele para fins de proteção (AUTON, 2005).

As preparações dermatológicas, seja medicamento ou cosmético, consistem na grande maioria em sistemas semi-sólidos. Estas formulações caracterizam-se por apresentarem sólidas em temperatura ambiente e fluídas, quando estressados mecanicamente durante sua aplicação na pele. Entre os sistemas semi-sólidos podemos destacar pomadas, pastas, géis, além de cremes e loções emulsionadas. Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que, quando dispersos em meio aquoso, dão viscosidade a preparação. A consistência dos géis decorre do forte entrelaçamento da fase dispersa que retém e segura o meio de dispersão em sua rede, existindo, portanto, uma estrutura interna possuidora de esqueleto, a qual é responsável por sua viscosidade estrutural (AUTON, 2005; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Os tipos de géis mais utilizados como formas farmacêuticas de uso tópico são os géis hidrofílicos (hidrossolúvel, hidrogel), obtidos pela incorporação de agentes geleificantes à água, ao glicerol ou ao propilenoglicol, tais como tragacanto, amido, celulose, derivados, polímeros de carboxivinil e silicatos de magnésio-alumínio, e os géis hidrofóbicos (oleogéis) constituídos usualmente de parafina líquida com polietileno ou óleos gordurosos com sílica coloidal ou sabões de alumínio ou zinco. Sem dúvida os géis hidrofílicos são mais utilizados ou mais comuns, sendo relativamente pequena a quantidade de preparações apresentadas como oleogéis (FERREIRA; LEITE, 2008; GENNARO, 2004; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990).

Os géis hidrofílicos têm sido usados extensivamente em produtos cosméticos e como base dermatológica, uma vez que apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossomas (CORRÊA et al., 2005). Partindo do pressuposto de que o fármaco não se liga ao polímero, tais géis liberam bem o fármaco. Os poros permitem a difusão relativamente livre de moléculas menores (AUTON, 2005). Desta forma, torna-se um sistema semi-sólido de grande importância para veiculação de princípios ativos empregados no tratamento das várias patologias acometidas pela pele.

Os termos géis e hidrogéis são usados diferentemente por alimentos e biomateriais para descrever estruturas de rede de ligação cruzada poliméricas (FERRY, 1980). O hidrogel apresenta estruturas de rede tridimensionais obtidas a partir de uma classe de polímeros sintéticos e/ou naturais que possam absorver e reter quantidade significativa de água (ROSIAK; YOSHII, 1999). A estrutura dessa cobertura é criada pelos grupos hidrofílicos ou domínios presentes numa rede polimérica após a hidratação num ambiente aquoso. Devido à presença de grupos funcionais hidrofílicos, como os grupos hidroxila, carboxílica, amida e sulfônica, juntamente com as cadeias poliméricas, os hidrogéis apresentam alta hidrofiliidade, biocompatibilidade e similaridade para os tecidos naturais (SAVAS; GUVEN, 2001). Como os hidrogéis, possuem um alto teor de água, o grau de flexibilidade é semelhante ao tecido natural (GULREZ; AL-ASSAF; PHILLIPS, 2011). Em 1960, Wichterle e Lim desenvolveram o primeiro hidrogel polímero sintético baseado em metacrilato de 2-hidroxietilo (2-HEMA).

Na forma de géis injetáveis, estes biomateriais são utilizados como suportes para a reconstrução de tecidos moles em defeitos de natureza traumática ou estética (KAPLAN, 1983), na correção da incontinência urinária (LEONARD, 1991), no aumento de volume de cordas vocais (FORD, 1984) e correção precoce de miopia pelo espessamento da parede escleral (KAPLAN, 1983). Outra característica importante desses géis é a sua biodegradabilidade, cujo controle garante o crescimento eficiente do novo tecido à medida que é biodegradado (FORD, 1984; KAPLAN, 1983; LEONARD, 1991).

2.4 Celulose bacteriana (CB)

Biopolímeros naturais, uma variedade de materiais e dispositivos biocompatíveis têm sido o foco principal de intensa pesquisa na área médica e áreas afins. Os biopolímeros

naturais, como colágeno, ácido hialurônico, quitosana e celulose estão sendo exploradas na medicina devido as propriedades similares às do tecido nativo (RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015; SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010).

A maioria das celuloses é produzida por plantas vasculares; além delas, grupos de algas, em várias espécies de bactérias e no reino animal (SAXENA; BROWN, 2005). O primeiro relato sobre a produção de celulose, a partir de fontes bacterianas, foi realizado por Brown em 1886 (BROWN, 1886). O autor investigou a biossíntese de celulose por *Acetobacter xylinum* - uma bactéria do ácido acético, que secreta um abundante 3-D rede de fibrilas de celulose sob condições aeróbicas, utilizando glicose como fonte de carbono.

Em termos de composição, a celulose bacteriana (CB) é um polímero estruturalmente similar à celulose vegetal, porém apresentando propriedades físico-químicas superiores (UL-ISLAM; KHAN; PARK, 2012). A celulose bacteriana, diferentemente da celulose das plantas, não contém fatores alergênicos como lignina e hemicelulose (BARUD et al., 2011; SANCHAVANAKIT et al., 2006). É um material altamente hidrofílico e tem a possibilidade de ser moldado em estruturas tridimensionais durante a síntese (HELENIUS et al., 2006). Ela possui cristalinidade superior à da celulose vegetal (BARUD; BARRIOS; MARQUES, 2007), sendo que suas fibras são nanométricas (“nanocelulose”), organizadas em um arranjo estrutural tridimensional, com excelente resistência mecânica (resistência a tração, dureza, permeabilidade a líquido e a gases). Essa rede de fios nanométricos lhe confere enorme área superficial, surpreendente capacidade de absorção e retenção de água e boa elasticidade (MACEDO, 2008).

A estrutura nanofibrilar pode vir a ser uma matriz viável para auxiliar a cura de lesões dérmicas (CZAJA; YOUNG; KAWECKI, 2007) e vem sendo desenvolvida e utilizada em diversas aplicações médicas como: substitutos temporários de pele no tratamento de lesões, queimaduras, úlceras crônicas, enxertos, como cobertura de ferimentos e auxiliar em abrasões dérmicas (COSTA; SOUZA, 2005; SANCHAVANAKIT et al., 2006). Também foi utilizada como substituta de meninge e como material de revestimento de *stents* intravasculares para evitar estenose circunferencial em artérias de grande calibre (CZAJA et al., 2006). Um substituto dérmico ideal, por exemplo, deve ser capaz de funcionar como um guia para as células na reparação de áreas teciduais e como um *scaffold* para fibroblastos para sintetizar componentes de matriz extracelular (CROCE et al., 2004).

Fontana et al. (1990) foram os pioneiros em descrever o uso da celulose bacteriana na substituição da pele. Desde então, a literatura tem mostrado um número crescente de trabalhos

relacionados às coberturas para as feridas. Os curativos de celulose são recomendados como cobertura temporária de pele, tratamento de feridas, incluindo lesões de pressão, lesões cutâneas, feridas diabéticas, queimaduras de segundo grau, enxertos de pele, abrasões traumáticas e lacerações (KOWALSKA-LUDWICKA et al., 2013).

Alguns curativos à base de CB estão disponíveis comercialmente como BioFill®, Bioprocess®, XCell® e Gengiflex® (para reconstrução de doenças periodontais (FARAH, 1990)). É importante ressaltar que a utilização da CB como curativo reduziu o tempo de cicatrização ou o fechamento da ferida em relação aos cuidados padrão quando aplicado em úlceras de extremidades inferiores que não cicatrizavam, como relatado por muitos pesquisadores (CZAJA et al., 2007; PORTAL; CLARK; LEVINSON, 2009).

O estudo sobre reparação, apesar de amplamente descrito na literatura e datado de longas décadas, ainda merece destaque. Vários estudos, na tentativa de adicionar fatores que influenciem positivamente tal resposta, devem ser estimulados, assim como o uso do hidrogel de celulose ou outros biomateriais. Algumas questões a respeito deste biomaterial necessitam de uma maior investigação. Desta forma, novos estudos se fazem necessários, pois poderão prover o entendimento de sua interação com os tecidos biológicos.

2.5 Plantas medicinais

Existe atualmente em todo o mundo, grande tendência para o aproveitamento de recursos naturais na terapêutica, por apresentarem vantagens econômicas, serem eficientes e apresentarem poucos efeitos nocivos à saúde (OLIVEIRA et al., 2000).

Planta medicinal, definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (DI STASI, 2007). Segundo a definição da Secretaria da Vigilância Sanitária, publicado pela portaria nº 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário (CALIXTO, 2000). Não se considera como medicamento fitoterápico aquele que inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004).

Na história há relatos que as plantas medicinais foram descobertas pelo homem na exploração do ambiente, e desde então, foram utilizadas empiricamente para o tratamento de patologias (VIEIRA et al., 2010). A utilização de plantas medicinais no Brasil teve origem, inicialmente, na cultura dos diversos povos indígenas, posteriormente com a colonização, onde foram introduzidas outras espécies trazidas pelos europeus e africanos, e também aquelas provenientes de outros países sul americanos (RESENER; SCHENKEL; SIMÕES, 2006).

A ideia primordial na indicação do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde, ofertando medicamentos equivalentes, com indicação terapêutica ou complementar às medicações existentes. Outro fator importante seria a valorização das tradições populares e o fornecimento de substrato para a indústria farmacêutica local (VOLPATO, 2005).

Alguns fatores poderiam explicar o aumento do uso desses medicamentos, como os avanços ocorridos na área científica que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes, como também uma forte tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (RIBEIRO; LEITE; DANTAS-BARROS, 2005).

O uso de plantas e produtos naturais como recursos terapêuticos pela medicina tradicional e popular é uma prática milenar, uma vez que, foi a partir da experimentação e aplicação das plantas na prevenção e no tratamento das diversas doenças, que foram descobertos os primeiros compostos químicos naturais dotados de propriedades biológicas. A partir de então, deu-se início a incessantes pesquisas científicas acerca do potencial químico das plantas na descoberta de compostos farmacologicamente ativos como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos (WAGNER; WIESENAUER, 2006). O resultado deste avanço científico foi um desenvolvimento de produtos de origem vegetal usados como terapêuticos, pois ao contrário das preparações tradicionais obtidas de plantas na medicina popular, a fundamentação científica e tecnológica proporcionou o desenvolvimento do medicamento fitoterápico (FERREIRA; LEITE, 2008).

Estudos químicos e farmacológicos envolvendo plantas medicinais têm aumentado muito nas últimas décadas, não apenas relacionados com o isolamento de princípios ativos, mas também para a caracterização de novos componentes com atividade terapêutica e

características nutracêuticas, importante para a utilização nas indústrias de alimentos cosméticos e fármacos (DANIELSKI et al., 2007).

Várias são as fontes testadas e usadas no processo de cicatrização de feridas cutâneas que se mostraram promissoras. Extratos de *Aloe vera* (babosa) foram eficazes no tratamento de feridas cutâneas produzidas em ratos diabéticos e normais (CONTRERA et al., 1985). O extrato alcóolico de flores de *Ixora coccinea* facilitou os fatores da cicatrização, como aumento do tecido de granulação, força de tensão e deposição de colágeno em feridas cutâneas em ratos (GOTTRUP, 1980). O uso tópico da solução de Papaína a 2% também apresentou bons resultados em feridas cutâneas em ratos (SANCHEZ NETO et al., 1993). Estes estudos aconteceram no final do século XX.

Considerando que o Brasil possui a flora mais rica do mundo em matéria prima para a produção de fitoterápicos (cerca de 1/3 do total) e que apenas 8% das espécies foram estudadas, é de suma importância que se busque nestas plantas uma fonte alternativa de terapia, visando no futuro à obtenção de novos fármacos mais eficazes e específicos (BRAZ-FILHO, 1994).

2.5.1 *Calendula officinalis* L.

Dentre as diversas plantas medicinais mais utilizadas na fitoterapia mundial, tem-se a *Calendula officinalis* L. Seu nome popular mais conhecido é Calêndula. Historicamente, os seus capítulos são utilizados, tanto popularmente quanto pela indústria alimentícia, para condimentar sopas e ensopados (para o combate de doenças), omeletes, queijos, carne assada e guisados, bem como para colorir manteiga, pudins e licores. As folhas e os caules também são utilizados como temperos (CARVALHO, 2004; KEMPER, 1999; OSAIDA; SILVA JUNIOR; OSAIDA, 2009; RAMOS et al., 1988; SIMÕES et al., 2001).

A Farmacopéia Brasileira, literatura oficial utilizada na consulta de dados analíticos para medicamentos, incluiu em sua 5ª edição (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010), a *C. officinalis*; o gênero *Calendula* tem seu nome derivado da palavra latina - *Calendae* - que significa "primeiro dia de cada mês", de onde se derivou também a palavra calendário, baseado no ciclo solar (CITADINI-ZANETTE; NEGRELLE; BORBA, 2012) e se deve ao fato das flores acompanharem o movimento do sol (KEMPER, 1999).

Originária do Egito e cultivada também por gregos, hindus e árabes, foi levada para a Europa no séc. XII e assim vem sendo usada medicinalmente (ACOSTA DE LA LUZ; FERRADÁ; GOVÍN, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Ela foi trazida para o Brasil no séc. XVIII, sendo cultivada como planta ornamental e medicinal (KEMPER, 1999).

Pertencente a antiga família Compositae (CORRÊA; MING; SCHEFFER, 1994), atualmente renomeada como Asteraceae, compreende cerca de 1.535 gêneros e 23.000 espécies (JUDD et al., 2009).

A Calêndula é uma herbácea anual, espécie descrita pelo botânico sueco Carl Von Linné, do qual recebeu o binômio *Calendula officinalis*. Seus nomes comuns ou populares são: Calêndula, Maravilha Calêndula do Campo, Calêndula do Jardim, Maravilhas do Campo, Calêndula de Panela e *Pot Marigold* (nos países do idioma inglês) (LORENZI; MATOS, 2008). A espécie foi aclimatada no Brasil e cresce naturalmente em localizações ensolaradas ao longo das Américas e da Europa. O florescimento acontece de maio até outubro, cresce mais ou menos 30 cm e possui caules múltiplos (CARVALHO, 2004; KEMPER, 1999).

Na descrição macroscópica (Figura 1), suas flores são dispostas em capítulos (inflorescência) de 3 cm a 7 cm, envolvidas por um involúcro de 2 séries de brácteas. As flores da periferia são liguladas, pistiladas, de 1,5 cm a 3,0 cm de comprimento e 0,5 cm a 0,7 cm de largura na porção mediana da lígula. Corolas amareladas ou alaranjadas, com o limbo tridentado, apresentando quatro ou cinco nervuras e tubo curto coberto de tricomas, ocasionalmente acompanhadas de um estilete filiforme e um estigma bifido. As flores do centro são escassas, tubulosas, pequenas, curtas, de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, hermafroditas, amarelas ou alaranjadas, raro quase avermelhadas, com corola quinqueentada, anteras sagitadas e estilete indiviso (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Figura 1 - Aspectos macroscópicos de *Calendula officinalis*.



Fonte – Plants for a future (1999)

- Fitoquímica

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo isolar e identificar constituintes químicos de espécies vegetais ou avaliar sua presença. A estrutura de uma molécula determina suas propriedades físicas, reatividade e atividade biológica. Os constituintes químicos importantes em uma planta são os metabólitos secundários, denominados também de produtos naturais (SOLOMONS, 2001).

O estudo da *C. officinalis* torna-se importante dentro dos aspectos científicos pela sua diversidade de ingredientes ativos, os quais podem apresentar potencial para utilização na agricultura. As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, produzidos pela planta em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos. O modo de ação sobre fungos inclui a granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da membrana plasmática e inibição de enzimas fúngicas, refletindo na inibição da germinação e alongamento do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento micelial. As fitoalexinas possuem grande diversidade, sendo que mais de 300 tipos já foram caracterizados

entre diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas, diterpenos, flavonóides e dioxiantocianidinas (CAVALCANTI et al., 2005).

A identificação de produtos naturais é realizada utilizando-se métodos espectroscópicos, espectrométricos e cromatográficos. Embora existam outros métodos para determinar a estrutura de uma molécula, as ferramentas espectrométricas são geralmente as mais práticas. Desde o início do século XXI, duas ou mais técnicas analíticas são empregadas com sucesso, como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE/EM) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à ressonância magnética nuclear (CLAE/RMN) (PINTO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2006; SOLOMONS, 2001).

Segundo as principais farmacopeias internacionais e publicações especializadas em farmacognosia, as flores de calêndula são padronizadas de acordo com a ocorrência de flavonóides (BARNES; ANDERSON; PHILLIPSON, 2007). Os trabalhos de Hamburguer et al. (2003); Parente et al. (2004); Re et al. (2009) e Ukiya et al. (2001, 2006) mostram que as flores da *C. officinalis* apresentam como componentes químicos principais: saponinas (aproximadamente 6%), triterpenos e ésteres de ácidos graxos, carotenóides, flavonoides (0,2-0,9%), cumarinas, óleos essenciais, hidrocarbonetos, ácidos graxos, terpenóides, ácidos fenólicos e carotenos. Para a *World Health Organization* (2002), os constituintes com presença majoritária na Calêndula são os triterpenos e saponinas (2-10%), baseado em ácido oleanólico (calendulosídeos) e flavonóides (3-O-glicosídeos e de isorhamnetina quercetina), incluindo hyperosídeos, isoquercetina e rutina.

Uma das classes de metabólitos secundários mais pesquisados na composição química de *C. officinalis* são os flavonóides, devido estudos relevantes acerca de sua atividade anti-inflamatória e cicatrizante (BEZÁKOVA et al., 1996; CARVALHO, 2004; KURKIN; SHAROVA, 2007; MENÉNDEZ et al., 2007). Entre as principais propriedades biológicas dos flavonoides destacam-se a atividade antioxidante, protegendo os organismos dos raios ultravioletas, poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos e estresses, dentre outros (VOLP et al., 2008).

Os flavonóides são compostos fenólicos de baixa massa molecular encontradas naturalmente nas plantas, onde são os responsáveis pelo aspecto colorido das folhas, flores e frutos (MOON et al., 2006). Foram descritos, aproximadamente, mais de 4.200 tipos deste grupo de substâncias (ZUANAZZI et al., 2004).

Todos flavonóides apresentam em comum a origem biossintética, isto é, o processo de biossíntese. Assim, sob o ponto de vista químico, são compostos formados por um núcleo comum fundamental benzopirano ou cromano unido a anel aromático caracterizado pelo esqueleto de carbono C6-C3-C6. São subdivididos, sucintamente, como segue: flavonol, flavona, catequina, flavana, flavanona, antocianidina e isoflavonóide (COSTA, 1987; GUARDIA et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2007).

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Para fins de controle de qualidade, os flavonóides são considerados quimitaxonômicos porque possuem uma grande diversidade estrutural e são quimicamente estáveis (SANTOS et al., 2015). Dentre todas as classes de flavonóides, a *Calendula officinalis* possui principalmente flavonóis, representados na grande maioria pelos compostos quercetina e rutina (RODRIGUES; GONÇALVES; SILVA, 2004). O emprego terapêutico de plantas contendo flavonóides é vasto e, em muitos casos, ainda empírico, embora alguns resultados tenham mostrado que os flavonóides possam apresentar efeito mutagênico, entretanto, são considerados como benéficos. Alguns medicamentos são elaborados a partir de flavonóides, em particular para o tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e agindo como cofator da vitamina C. Outras pesquisas sugerem que alguns flavonóides são responsáveis por ação antitumoral, podendo ainda agir como antivirais, antibacteriana, antihemorrágicos, hormonais, vasodilatadora, anti-inflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes (SIMÕES et al., 2004).

Triterpenóides, especialmente os ésteres palmitato de faradiol, miristato de faradiol e laurato de faradiol, são considerados como sendo os princípios ativos em preparações de Calêndula, utilizadas em aplicações tópicas contra inflamações da pele e mucosas e na cicatrização de feridas (ZITTERL-EGLESEER et al., 2001).

Todas as variedades de Calêndula são ricas em carotenóides, biologicamente ativos e com múltiplas aplicações em terapias. Ao lado da atividade da provitamina A, os carotenóides têm um efeito favorável sobre o processo de epitelização, influenciando a progressão do ciclo celular dos fibroblastos (STIVALA et al., 1996), atuando como agentes fotoprotetores (dependendo da dose), podendo reduzir o risco de queimaduras, fotossensibilidade e até mesmo alguns tipos de câncer de pele (FUCHS, 1998; GOMES, 2007; LEE et al. 2000).

- Ensaio farmacológicos

Em estudos farmacológicos realizados com extratos ou frações a partir de flores de *C. officinalis* foram detectadas as mesmas propriedades antibacterianas relatadas em medicamentos tradicionais que atuam em infecções de pele, psoríase e hanseníase (HARRISON, 2003; HORVATH; FERENC, 1992; ROOPASHREE et al., 2008; ZAHRA; MOHAMMED; MOHAMMED, 2000).

Tradicionalmente, a Calêndula era usada internamente para tratar febres, controlar menstruações e tratamento de icterícia, além de pequenas inflamações da pele. O mais interessante é que as flores passaram a ser utilizadas na forma de extratos, tinturas e pomadas e aplicadas diretamente sobre a pele para ajudar na cura de ferimentos, para acelerar a cicatrização de queimaduras, para aliviar a pele inflamada, danificada, com escoriações e cortes (BALDUCCI-ROSLINDO; SILVÉRIO; MALAGOLI, 1999; BROWN; DATTNER, 1998; CARVALHO, 2004; KEMPER, 1999; MARTIN; DEO, 2000; NADKARNI, 1982; NITZ et al., 2006; PARENTE et al., 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

C. officinalis contribui também para a cicatrização de feridas, hemostasia, antissepsia e contém atividades anestésicas leves para o efeito terapêutico do hidrogel (ZDORYK; KHOKHLOVA; GEORGIYANTS, 2014).

O efeito calmante do óleo de Calêndula é usado para curar úlceras de estômago e inflamação, na forma de formulações tópicas e o conteúdo de flavonóides, triterpenos e saponinas pode ser responsável por esta ação (PREETHI; KUTTAN; KUTTAN, 2009). O uso desse óleo traz muitos benefícios, além de atividade farmacológica específica que incluem aroma agradável, emoliência e melhoria na elasticidade da pele (MISHRA et al., 2012). Se aplicado na orelha, o óleo alivia a dor e o desconforto de uma dor de ouvido (FAY; SCHELLHASE; WUJEK, 2003).

A atividade antiviral de uma tintura das flores da Calêndula suprimiu a replicação de *Herpes simplex*, Influenza A2 e do vírus da gripe APR-8 *in vitro* (BOGDANOVA et al., 1970; KHALID et al., 2010). Os extratos das flores possuem propriedades anti-HIV de interesse terapêutico (KALVATCHEV; WALDER; GARZARO, 1997).

Compostos triterpenos e ésteres presentes nas flores da Calêndula apresentam atividades como anti-inflamatória (AKIHISA et al., 1996; DELLA LOGGIA et al., 1994;

SCHIPOCHLIEV, 1981; UKIYA, et al., 2001; YASUKAWA, et al., 1996), anti-edematosa (ZITTERL-EGLSEER et al., 1997) e anti-tumoral (YASUKAWA et al., 1996).

Gazim et al. (2008) observaram ação antifúngica do óleo essencial de *C. officinalis*, cultivada no Brasil, contra vários fungos como *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Cândida glabrata*, *krusei Candida*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Cândida krusei* e *Rhodotorella* spp.

A *C. officinalis* tem um efeito curativo sobre hemorragia externa, cortes e contusões, bem como os músculos tensos. Também é recomendado para feridas difíceis, varizes e ulcerações da parte inferior das pernas (BISSET, 1994).

Estudos realizados por Dumenil, Chemli e Balasard (1980) e Parente et al (2009) demonstraram que os extratos etanólicos de *C. officinalis* a 80% mostraram atividade antibacteriana principalmente contra *Staphylococcus aureus* e *S. fecalis*.

Iauk et al. (2003) avaliaram o extrato metanólico de Calêndulade quanto à sua atividade contra bactérias anaeróbicas e aeróbicas encontradas no periodonto. Os resultados mostraram inibição acentuada contra as bactérias *Porphyromonos gingivalis*, *Prevotella* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Veillonella parvula*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros* e *Actinomyces odontolyticus*.

Um estudo realizado em mulheres que receberam radioterapia para câncer de mama, com aplicação da pomada feita a partir de *C. officinalis* sobre a pele durante o tratamento, reduziu o número de dermatite grave (irritação da pele, vermelhidão e dor) (LARGATO et al., 2010).

Na Odontologia, o emprego de extratos de *C. officinalis* no controle de bactérias em biofilme dental e contra bactérias periodontopatogênicas (OLIVEIRA et al., 2007).

Naeini et al. (2012), observaram em ratos, o efeito cicatrizante de um gel a base de extrato etanólico das flores de *C. officinalis* (5, 7 ou 10%) verificando que os grupos tratados com o gel a 7 e 10% apresentaram respectivamente um conteúdo de colágeno e hidroxiprolina maior do que o grupo controle (sem tratamento).

O extrato hidroalcoólico das flores de *C. officinalis* incorporado em uma base gel (a 5 ou 10%) foi testado também em modelo de mucosite da cavidade oral em Hamsters induzida pelo tratamento com uma dose de 60 mg kg⁻¹ de 5-fluorouracil, administrado por via intraperitoneal. Os grupos tratados com o gel (5 e 10%) administrado diariamente após o 12º dia topicamente, foram capazes de reduzir os escores da mucosite comparados ao grupo controle (TANIDEH et al., 2012).

Pagnano et al. (2008) verificaram que a tintura de Calêndula a 5% obteve valores médios maiores de fibroblastos envolvidas no processo de cicatrização sobre feridas cutâneas em coelhos. Similarmente, Duran et al. (2005) reportam que o uso da Calêndula no tratamento de pacientes que apresentavam úlceras venosas promoveu aceleração na cicatrização das mesmas.

Um estudo realizado por Martins et al. (2003) sobre os efeitos de fitoterápicos derivados da *C. officinalis*, do *Symphytum officinale* e do *Stryphnodendron barbatiman* na cicatrização de pele por segunda intenção em equinos, observou-se que, na fase inflamatória do processo de cicatrização, as feridas tratadas com Calêndula apresentaram bordas menos edemaciadas e crostas serosas, lisas e delgadas, um resultado melhor comparado aos demais grupos de tratamento.

Nos estudos de PDR for Herbal Medicine (2000) e Schulz, Hansel e Tyler (2002), observou-se que o extrato de *C. officinalis* induziu a neovascularização, resultado importante no processo de granulação.

Um estudo avaliou o efeito combinado da terapia com ultrassom e aplicação tópica de um gel a base de *Calendula officinalis* em lesões musculares em ratos. Foi relatado um efeito benéfico na cicatrização e inflamação quando da aplicação combinada do gel e terapia com ultrassom quando comparado apenas ao ultrassom isoladamente (RICOLDY et al., 2010).

Menéndez et al. (2007) avaliaram o efeito cicatrizante e também o nível de irritabilidade de um creme contendo *C. officinalis* a 1% aplicado em feridas abertas na pele de ratos avaliando a cicatrização. O grau de irritabilidade da forma farmacêutica elaborada foi estudado (mensurado) em estudo com coelhos (aplicação nos olhos e na pele) onde análises histopatológicas e clínicas, comprovaram que o creme favoreceu o processo de cicatrização na pele de ratos e demonstrou não ser irritante na utilização dérmica e oftálmica em coelhos. Assim, concluiu-se que os resultados demonstram a possibilidade de uso do creme como agente fitoterápico tópico.

Segundo o Brasil (2014), extratos de *Calendula officinalis* também são capazes de aumentar a revascularização, um efeito que pode contribuir para a atividade cicatrizante atribuída à espécie.

Atualmente existem alguns medicamentos e fitocosméticos a base dessa planta no mercado nacional como a Pomada Homeopática de Calêndula D1 (do fabricante Almeida Prado), e Primoderme Emulsão Hidratante com Calêndula e Supriderme Óleo Hidratante com Calêndula (do fabricante LC Produtos Naturais). Cabe ressaltar que os medicamentos e/ou

fitocosméticos do fabricante LC Produtos Naturais estão registrados na ANVISA, já o produto da empresa Almeida Prado está isento de registro (FLOR, 2010).

O extrato de calêndula além de possuir uso popular consagrado, está na lista de registro simplificado de fitoterápicos, publicada pela ANVISA em 2004 (BRASIL. ANVISA. RE nº 89, 2004), nesta resolução foi estabelecido o uso da Calêndula como agente cicatrizante e anti-inflamatório de uso tópico.

A espécie *Calendula officinalis* também está na relação de plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. A finalidade é de fornecer medicamentos fitoterápicos na assistência farmacêutica básica em todo o país, para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença (SAÚDE E LAZER, 2009).

Por sua vez, de acordo com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) aprovada pelo Decreto nº 5.813/06 (ANVISA), é imprescindível garantir à população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, por meio da adoção de boas práticas de cultivo e manipulação de plantas medicinais, e produção de fitoterápicos. Portanto, em decorrência da importância da *C. officinalis* como planta medicinal utilizada extensivamente na medicina tradicional e oficial em todo o mundo, são necessários estudos para o controle de qualidade e para o estabelecimento de metodologias de desenvolvimento tecnológico de seus derivados fitoterápicos (BRASIL, 2006).

2.5.2 *Jacaranda caroba* (Vell.) A. DC.

É uma árvore conhecida popularmente como jacarandá, caroba e bolacheira, possuindo porte médio, com altura de 3-10 m, com aptidão também apícola, utilizada na arborização e ornamentação de ruas, principalmente devido à beleza das flores arroxeadas (POTT; POTT, 1994).

A importância da *J. caroba* (Vell.) A. DC. levou sua inclusão na primeira edição da Farmacopéia Brasileira em 1929 (BRANDÃO et al., 2006, 2008), e ao registro de um fitoterápico com registro na Anvisa (CARVALHO et al., 2008). As espécies deste gênero ainda se encontram sob adequação taxonômica, pois apresentam muitas sinonímias (LORENZI, 2000).

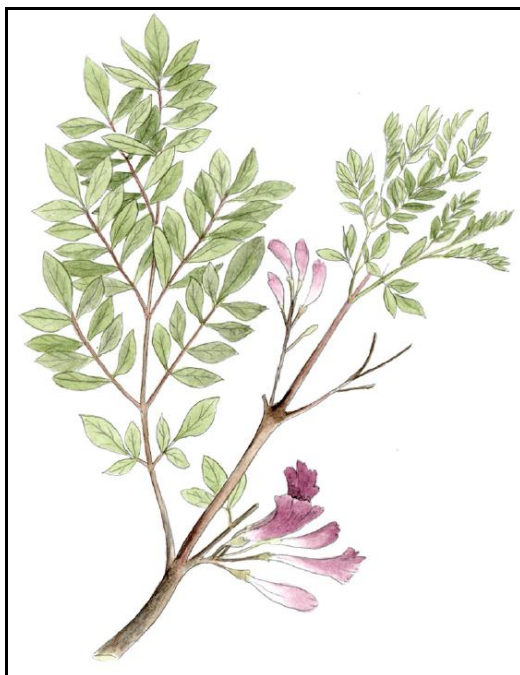
O Brasil possui áreas com vegetações distintas, dentre elas o Cerrado com uma grande diversidade de famílias e espécies de animais e vegetais, destacando-se no reino vegetal a família Bignoniaceae (PINTO et al., 2002).

A família Bignoniaceae contém 120 gêneros e cerca de 800 espécies, com distribuição pantropical, de ocorrência predominante nos neotrópicos. No Brasil, há 32 gêneros e cerca de 350 espécies, sendo considerado um centro de diversificação (CHAGAS JR.; CARVALHO; MANSANARES, 2010).

Esta família possui potencial de aplicação em diversas atividades econômicas: medicinal, alimentícia, cosmética, ornamental e agrícola (herbicida ou estimulante para o crescimento vegetal), dentre outras (CHAGAS JR.; CARVALHO; MANSANARES, 2010; SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010).

Destaca-se o gênero *Jacaranda*, que apresenta cerca de 49 espécies nativas nas Américas Central, do Sul e Caribe, sendo 39 espécies endêmicas do Brasil (GACHET; SCHÜHLY, 2009). A espécie *Jacaranda caroba* (Figura 2) é encontrada mais precisamente no Norte do Estado de São Paulo, Oeste de Minas Gerais e no sul de Goiás e Mato Grosso do Sul. Em várias regiões do país, como na região de Diamantina (MG), a *J. caroba* é conhecida popularmente como caroba, carobinha e caroba do campo. (FENNER et al., 2006; GACHET; SCHÜHLY, 2009).

A planta atinge de 2,5-10 m de altura, possui casca cinzenta e fina. A espécie *J. caroba* é uma espécie sub-arbustiva ou arbustiva, com flores arroxeadas característica com pico de floração no mês de julho (mas pode ser encontrada florida desde março até outubro ou até dezembro). Normalmente, é difícil encontrar o espécime com folhas e flores simultaneamente. Na maioria dos casos as folhas estão ausentes na floração. Os frutos elípticos, secos e deiscentes ocorrem de julho a outubro, normalmente. Produzem anualmente grande quantidade de sementes viáveis, amplamente dispersas pelo vento (LORENZI, 2000; SCUDELLER, 2004).

Figura 2 - Aspectos macroscópicos de *Jacaranda caroba*.

Fonte: Grandi (2014)

- Fitoquímica

Na literatura científica há poucos estudos fitoquímicos com a espécie *J. caroba*. Foi identificada a presença de terpenos em extratos etanólicos de partes aéreas da planta (BRAGA et al., 2003; VALADARES, 2009) e compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides e seus heterosídeos) em extratos aquoso e hidroalcoólico das folhas (FERRERES et al., 2013).

Segundo Gachet e Schüly (2009) dentre as espécies pertencentes ao gênero *Jacaranda* apenas seis foram estudadas sob o ponto de vista fitoquímico. São elas a *Jacaranda acutifolia*, *Jacaranda caucana*, *Jacaranda copaia*, *Jacaranda decurrens*, *Jacaranda mimosifolia* e *Jacaranda filicifolia* e as principais classes de substâncias isoladas foram terpenóides, quinonas, flavonóides, ácidos graxos, cetosídeos e um dímero feniletanóide.

Estudos fitoquímicos de algumas espécies da família Bignoniaceae demonstraram a presença de diversas classes de substâncias químicas como ácidos graxos, açúcares, antocianinas glicosiladas, terpenos, alcalóides taninos, flavonóides, lignanas, compostos fenólicos e iridóides, e lapachol, um tipo de naftoquinona (GACHET; SCHÜHLY, 2009).

Segundo Ferreres et al. (2013), o extrato hidrometanólico contém quantidades mais elevadas de compostos fenólicos, sendo mais rico em flavonóides, porém mais pobre em derivados do ácido cafeoil. Estudos de solubilidade mostram que os ácidos fenólicos são altamente solúveis em água (QUEIMADA et al., 2009). Portanto, em extratos aquosos espera-se obter mais riqueza em ácidos fenólicos, o que está de acordo com a literatura (MIMICA-DUKIC et al., 2008). Este fato favorece as formulações tópicas, como os hidrogéis, pois as tinturas hidroalcoólicas dos extratos são utilizadas para o preparo.

Normalmente, a presença de compostos fenólicos em extratos vegetais, está associada à atividade antioxidante desses extratos. Muitos antioxidantes de origem vegetal são metabólitos secundários fenólicos. Esses compostos fenólicos se enquadram em diversos grupos de metabólitos secundários, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (AMORIM, 2012; SOUSA et al., 2007).

O polifenol verbascosídeo é um composto geralmente derivado do ácido caféico. Vários trabalhos têm demonstrado que o verbascosídeo e derivados estão distribuídos em muitas espécies da família Bignoniaceae e exibem várias atividades biológicas, como cicatrizante (GARCEZ et al., 2007; SANTORO et al., 2008). A presença desta classe de metabólitos nos extratos metanólicos das cascas e folhas de espécies do gênero *Jacaranda* também sugere a provável hipótese que essa substância seja uma das responsáveis pela ação antimicrobiana desses extratos. Santos et al. (2010) encontraram vários tipos de aldeídos e polifenóis em *Jacaranda puberula*. O ácido caféico é encontrado frequentemente em combinação com o ácido clorogênico e é um intermediário na síntese de polímeros de células vegetais e está relacionado à resistência das plantas a doenças (VEIT et al., 1992). Este ácido possui quatro grupos hidroxila, que são responsáveis pela sua atividade antioxidante (SAMBANTHAMURTHI et al., 2011). O estudo de Carvalho, Gosmann e Schenkel (2002) apontou a atividade antibacteriana e antiviral do ácido caféico em diversas espécies de plantas.

As flavonas, pertencentes ao grupo dos flavonóides, são conhecidas por suas propriedades anti-inflamatórias, antialérgica, hepatoprotetora, antiespasmódica, hipocolesterolemiantes, diurética, antibacteriana e antivirais (BRUNETON, 2001). A luteolina é um exemplo de flavonóide isolado de *Jacaranda* spp. (GACHET; SCHÜHLY, 2009).

Os flavonóides têm despertado grande interesse em decorrência de seu potencial antioxidante e por inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de

reduzirem significativamente as tendências a doenças trombóticas (SANCHEZ-PEREZ et al., 2005). Atuam também como potentes depuradores de espécies ativas de oxigênio e queladores de metais e, portanto, aumentam a capacidade de reação hepática, contribuindo para a redução do dano oxidativo hepático e da formação de fibrose causada pela obstrução biliar (PERES et al., 2000). Estudos *in vitro* têm mostrado também que os flavonóides inibem fortemente a produção de óxido nítrico e do fator de necrose tumoral (KAWADA et al., 1998).

Como citado anteriormente, além dos compostos fenólicos, os terpenos também foram identificados nos poucos estudos fitoquímicos do Jacarandá.

Recentemente foi comprovado que os triterpenos apresentam atividade antioxidante não enzimática e que o ácido ursólico atua como inibidor da apoptose celular causada por hiperglicemia (YANG et al., 2007). De acordo com Copp (2003), os metabólitos secundários considerados como a principal classe promissora de atividade antimicobacteriana são os terpenóides.

Estudos fitoquímicos de *J. caucana* levaram ao isolamento dos ácidos ursólico, 2 α -hidroxiursólico, betulínico, jacarândico e jacumárico, sendo os dois últimos inéditos (LOURENÇO; FRANÇA; PEREIRA, 2002; OGURA; CORDELL; FARNSWORTH, 1976; OGURA; GEOFFREY; NORMAN, 1977; VARANDA et al., 1992). De *J. caucana* também foram isolados o derivado quinoídico jacaranona (OGURA; CORDELL; FARNSWORTH, 1976) e de *J. decurrens*, flavonóides como luteolina e quercetina-3-O-glicosídeo (BLATT; SANTOS; SALATINO, 1998).

Valadares (2009) observou os ácidos oleanólico (554,6 mg), ursólico (9,58 g) e uma mistura destes (27,63 g) que foram obtidos em quantidades significativas de *J. caroba*. Os ácidos ursólico e oleanólico juntos representam aproximadamente 4% da composição total do extrato bruto de partes aéreas de *J. caroba*.

Algumas espécies vegetais que contém os ácidos oleanólico e ursólico em sua composição como *Sambucus incanum*, *Calendula officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Ligustrum lucidum* e *Panax ginseng* são utilizadas popularmente como anti-inflamatórios, analgésicos, cardiotônicos, sedativos, hepatoprotetores e tônicos (DZUBAK et al., 2006; KOWALSKI, 2007; YIM et al., 2001). Os triterpenos isolados (ácido oleanólico e ácido ursólico) já foram avaliados em diversos modelos biológicos, sendo relatadas as atividades hepatoprotetora, anti-inflamatória, hipolipidêmica, antiaterosclerótica, tripanossomicida, imunomodulatória, anti-HIV e antitumoral, revistas por Liu (2005).

Os ácidos ursólico e oleanólico são empregados no Japão, sob a forma de preparações cosméticas, em terapias de câncer de pele (LIU, 1995).

Cunha et al. (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana dos ácidos ursólico e oleanólico, bem como de seus derivados sintéticos modificados frente a *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus* e *Enterococcus faecalis*, microrganismos relacionados na formação da cárie dental. Todos os triterpenos demonstraram atividade frente aos microrganismos, indicando sua potencialidade como agentes anti-placa e anti-cárie.

Os usos etnofarmacológicos relatados para *J. caroba* possuem relação com as atividades biológicas relatadas para os ácidos ursólico, oleanólico e β -sitosterol, isolados da espécie. Assim, pode-se supor que o uso da espécie como cicatrizante, no tratamento de infecções e úlceras estaria relacionado aos efeitos anti-inflamatório, antimicrobiano e antibacteriano relatados para os ácidos ursólico, oleanólico e β -sitosterol (FONTANAY et al., 2008; IKEDA; MURAKAMI; OHIGASHI, 2008; LIU, 1995; MALLAVADHANI et al., 2004; MÁÑEZ et al., 1997), bem como à ação antiulcerogênica relatada para esses ácidos (FARINA; PINZA; PIFFERI, 1998).

Tendo em vista as diversas atividades biológicas já relatadas para os ácidos ursólico e oleanólico, bem como para seus derivados sintéticos, além da baixa toxicidade dessas substâncias, é grande o interesse na síntese de derivados dos ácidos ursólico e oleanólico, visando obter substâncias bioativas que poderão viabilizar estudos futuros em relação à estrutura química-atividade biológica, constituindo o ponto de partida para o desenvolvimento de novos fármacos.

Os fitoquinóides encontrados nesse estudo foram também encontrados no trabalho de Martins, Castro e Cavalheiro (2008). Eles são quinonas responsáveis por processos de defesa à herbivoria e também a patógenos, polinização de flores e dispersão de sementes. As quinonas possuem atividade contra certos fungos patogênicos e alguns protozoários parasitas (BRUNETON, 2001). A jacaranona é uma quinona geralmente isolada de *Jacaranda* spp. (FARNSWORTH et al., 1977; MARTINS et al., 2008).

Poucas pesquisas químicas com *J. caroba* foram publicadas na literatura especializada, apesar de sua importância como planta medicinal. Dessa forma, estudos fitoquímicos e investigações de suas atividades biológicas podem contribuir para um maior conhecimento desta espécie.

- Ensaio farmacológico

Apesar do amplo emprego por séculos, poucos estudos farmacológicos foram realizados com a Caroba. O estudo de Bacchi, Rios e Dias (1999), demonstrou a ação cicatrizante da planta.

O combate a infecções é realizado através do banho preparado com folhas e a infusão das folhas, usado contra sífilis e como depurativo sanguíneo; o macerado das folhas em aguardente é aplicado como cicatrizante e também contra úlceras (AGRA et al., 2008; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; HIRUMA-LIMA; DI STASI, 2002) são descritas utilizações contra sarna, infecções bacterianas, como gonorreia; a madeira, a casca do tronco e as folhas no combate à febre (SCALON et al., 2006).

Bacchi, Rios e Dias (1999) relataram a atividade anti-ulcerogênica *in vivo* para as folhas de *J. caroba*. O extrato hidroalcoólico e a fração diclorometânica oriunda deste mostraram-se ativos na redução de úlceras induzidas por etanol e ácido clorídrico.

Jacaranda caroba é utilizada na medicina popular contra micoses, como adstringente e como diurético (FENNER et al., 2006; GACHET; SCHÜHLY, 2009).

As espécies nativas empregadas na composição de um fitoterápico composto (*Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum*) são utilizadas popularmente como tônico, amargo e outros usos. Segundo Saller, Iten e Reichling (2001), drogas vegetais com constituintes amargos apresentam importância secular na terapia de distúrbios digestivos. Alguns fitoterápicos estão disponíveis no mercado brasileiro para o tratamento de distúrbios digestivos. Este é o caso do produto Ierobina (Laboratório Belfar, Belo Horizonte), constituído pelos extratos fluídos das espécies nativas *Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum*, além da espécie exótica *Erythraea centaurium* (TAGLIATI et al., 2008).

A *J. caroba* foi utilizada na produção de fitoterápicos como a Ierobina® (comercializada com ação digestiva e hepatoprotetora), o Depuranorte® (utilizado como depurativo) e o Dissol® (que apresenta ação diurética e é empregado nas afecções hepáticas, obstruções do fígado e hemorragia) (CESAR et al., 2004). Devido a maior rigidez da atual legislação que regulamenta os fitoterápicos no Brasil (BRASIL, 2004), muitas empresas não estão obtendo renovação de registro de fitoterápicos cujas matérias-primas vegetais carecem ainda de estudos químicos e ensaios biológicos pré-clínicos e ensaios clínicos, como é o caso da Ierobina®.

3 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo desenvolver, caracterizar e analisar comparativamente coberturas de hidrogel a base de celulose bacteriana incorporadas a princípios ativos de extratos brutos de *Calendula officinalis* e *Jacaranda caroba*, após a aplicação sobre feridas confeccionadas em dorso de ratos.

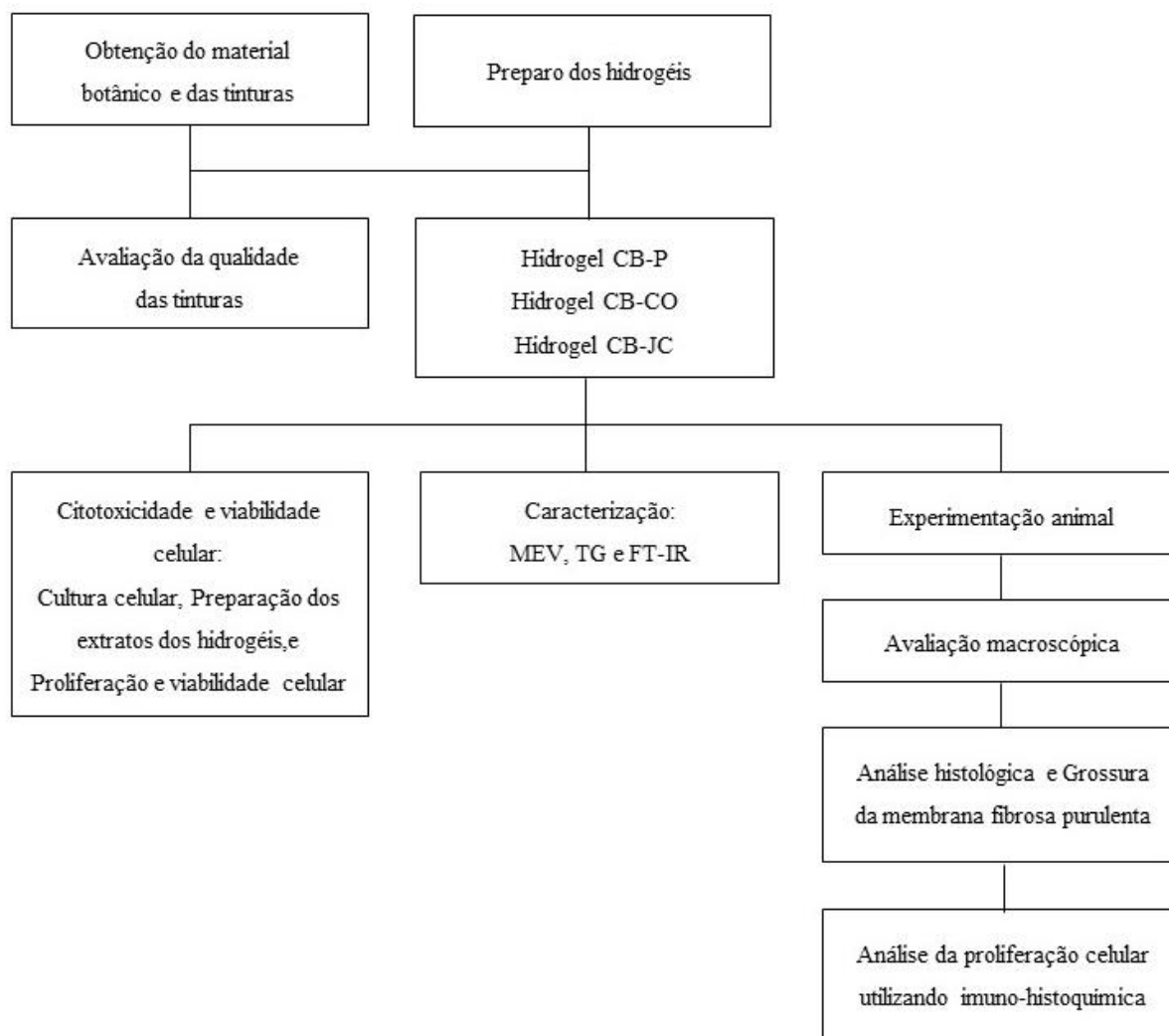
3.1 Objetivos específicos

- Obtenção de coberturas estruturalmente formadas por celulose bacteriana sintetizada por *Gluconacetobacter xylinus* com incorporação de extratos brutos de *Calendula officinalis* e *Jacaranda caroba*;
- Realizar caracterizações físico-químicas para verificar a incorporação dos fitoterápicos à celulose bacteriana;
- Avaliar a potencialidade destes biomateriais para a reparação tecidual;
- Análise do estudo *in vivo* para analisar a biocompatibilidade, a eficiência e o comportamento dos hidrogéis;
- Analisar a resposta imuno-histoquímica dos animais do estudo *in vivo*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A Figura 3 apresenta o fluxograma mostrando de forma resumida o desenvolvimento do trabalho.

Figura 3 - Fluxograma representando resumidamente o trabalho desenvolvido.



Fonte - Elaborada pela autora

4.1 Obtenção do material botânico e das tinturas

As folhas de *Jacaranda caroba* foram adquiridas em Curvelo - MG, em janeiro de 2014. O extrato seco foi preparado e fornecido pela Faculdade de Farmácia da Universidade

Federal de Minas Gerais, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria das Graças Lins Brandão. A licença para trabalhar com *Jacaranda caroba* em coleta e em pesquisa foi adquirida pela mesma Professora através da Plataforma Carlos Chagas.

A amostra foi identificada pela botânica Kadja Milena, e um comprovante foi depositado no DATAPLAMT, da UFMG (DAT – 066). As folhas secas e pulverizadas foram submetidas a percolação com etanol (80%) e a solução foi evaporada sob vácuo até *secura* resultando no extrato seco. A resuspensão de *Jacaranda caroba* (20% do extrato em pó em etanol 70%) foi preparada pelo Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

Nesse estudo procedeu-se incorporação de 7% de extrato bruto na fórmula dos hidrogéis, baseado em Nunes (2008) onde foi incorporada tintura de *C. officinalis* na concentração de 10%.

A tintura hidroalcoólica (20% da droga vegetal em etanol 70%) de *Calendula officinalis* foi comprada na Farmácia de Manipulação Calêndula de São Carlos - SP.

4.2 Avaliação da qualidade das tinturas

Na literatura foram encontrados vários métodos para quantificação de marcadores da Calêndula utilizando tanto CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e Espectrofotometria de Ultravioleta. As estruturas foram determinadas com base na comparação de seus índices de retenção com a literatura (ADAMS, 1995).

O estudo do perfil fitoquímico das tinturas de Caroba e de Calêndua foi realizado através da análise cromatográfica utilizando um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimadzu (LC-10AD) com detetor PDA. Software LC Real Time Analysis pertencente à Central de Análises Clínicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo; este foi usado para controle do instrumento, coleta, processamento e quantificação das substâncias apresentadas na área de cada pico dos cromatogramas. Foi utilizada uma coluna cromatográfica (Agilent) (15 cm, diâmetro interno 4,6 mm e 5 µm de tamanho de partícula). A fase móvel para *Jacaranda caroba* foi da combinação de metanol:H₂O (20:80) e para *Calendula officinalis* (25:85), com uma taxa de fluxo de 1 mL/min, durante 60 min. O volume de injeção para as amostras foi de 44x10⁻³ mL. As amostras foram diluídas a partir da tintura dos extratos em metanol.

4.3 Preparo dos hidrogéis

As mantas de celulose bacteriana hidratadas (99% água), obtidas sob cultivo, foram fornecidas pelo Instituto de Química da UNESP – Campus de Araraquara. Elas foram trituradas em um elemento dispersor de alta rotação do tipo Ultra Turrax, em água destilada. Assim, foi obtida uma suspensão formada de partículas de celulose bacteriana. Essa suspensão foi submetida a uma peneira, malha 37 mesh, para a retirada da água, restando apenas uma pasta formada pelas micropartículas da celulose bacteriana.

Os hidrogéis de celulose bacteriana pura (CB-P), de celulose bacteriana com a tintura de *Calendula officinalis* (CB-CO) e de celulose bacteriana com a tintura de *Jacaranda caroba* (CB-JC) foram obtidos em cooperação com o Laboratório de Materiais Fotônicos do Instituto de Química da UNESP – Campus de Araraquara, sob responsabilidade do Prof. Dr. Sidney José de Lima Ribeiro e colaboração do técnico Rafael Romano.

As amostras dos hidrogéis foram preparadas sob rigoroso protocolo asséptico, com a esterilização de todos os materiais utilizados.

A formulação foi preparada através da mistura dos reagentes (Tabelas 1, 2 e 3) por um agitador mecânico. Estas substâncias foram compradas na Farmácia de Manipulação Calêndula de São Carlos - SP. O Natrozol®250 (Hidroxietilcelulose), que dá a consistência de gel, e o solvente Propilenoglicol, foram produzidos pela Pharma Nostra. O conservante Nipagin® foi produzido pela Henri Farma.

4.3.1 Hidrogel de celulose bacteriana pura (CB-P)

Inicialmente solubilizou-se o Nipagin® em propilenoglicol, a quente e sob agitação manual. Assim, os mesmos foram vertidos no béquer que já continha a pasta de celulose e a água deionizada sob agitação mecânica. Em seguida, o Natrozol®250 foi adicionado aos poucos para dar a consistência de gel. As quantidades exatas das matérias-primas utilizadas para a produção de 100 g do Hidrogel CB-P estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração (%) de massa das matérias-primas usadas na formulação do hidrogel CB-P.

Reagentes	Hidrogel CB-P (%)
Nipagin	0,20
Propilenoglicol	5,00
Natrozol®250	3,00
Celulose Bacteriana	10,00
Água deionizada q.s.p.	81,80

Fonte - Elaborada pela autora

4.3.2 Hidrogel de celulose bacteriana com *Calendula officinalis* (CB-CO) 10%

Inicialmente solubilizou-se o Nipagin® em propilenoglicol, a quente e sob agitação manual. Assim, os mesmos foram vertidos no béquer que já continha a pasta de celulose e a água deionizada sob agitação mecânica. Em seguida, o Natrozol®250 foi adicionado aos poucos para dar a consistência de gel. Finalmente, a tintura do extrato de *Calendula officinalis* foi adicionada. As quantidades exatas das matérias-primas utilizadas para a produção de 100 g do Hidrogel CB-CO estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração (%) de massa das matérias-primas usadas na formulação do hidrogel CB-CO.

Reagentes	Hidrogel CB-CO (%)
Nipagin	0,20
Propilenoglicol	5,00
Natrozol®250	3,00
Tintura do extrato de <i>Calendula officinalis</i>	10,00
Celulose Bacteriana	10,00
Água deionizada q.s.p.	71,80

Fonte - Elaborada pela autora

4.3.3 Hidrogel de celulose bacteriana com *Jacaranda caroba* (CB-JC) 10%

Inicialmente solubilizou-se o Nipagin® em propilenoglicol, a quente e sob agitação manual. Assim, os mesmos foram vertidos no béquer que já continha a pasta de celulose e a água deionizada sob agitação mecânica. Em seguida, o Natrozol®250 foi adicionado aos poucos para dar a consistência de gel. Finalmente, a tintura do extrato de *Jacaranda caroba* foi adicionada. As quantidades exatas das matérias-primas utilizadas para a produção de 100 g do Hidrogel CB-JC estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração (%) de massa das matérias-primas usadas na formulação do hidrogel CB-JC.

Reagentes	Hidrogel CB-JC (%)
Nipagin	0,20
Propilenoglicol	5,00
Natrozol@250	3,00
Tintura do extrato de <i>Jacaranda caroba</i>	10,00
Celulose Bacteriana	10,00
Água deionizada q.s.p.	71,80

Fonte - Elaborada pela autora

4.4 Citotoxicidade e viabilidade celular

Este ensaio foi realizado Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Carlos sob supervisão da doutoranda Caroline Faria Bellani.

4.4.1 Cultura celular

Fibroblastos L929, derivados de camundongo, foram mantidos em meio DMEM (Life Technologies™) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell®), penicilina-streptomicina (1%) e anfotericina b (2 mg/L).

4.4.2 Preparação dos extratos dos hidrogéis

As amostras de hidrogéis foram dissolvidas em meio de cultura DMEM a 10% (v/v) durante 48 horas em agitação magnética. Os extratos foram mantidos sob-refrigeração a 8°C. Os extratos de hidrogéis foram aplicados aos respectivos grupos de células a serem estudados.

4.4.3 Proliferação e viabilidade celular

Para verificar a influência da presença dos hidrogéis no crescimento e viabilidade celular ao longo do tempo, fez-se o ensaio do alamarBlue® (Life Technologies™). O alamarBlue® é um reagente que apresenta um indicador de oxido-redução (REDOX) que tanto apresenta fluorescência como muda sua cor em resposta à redução química, a qual é resultado do crescimento celular em meio de cultura. O crescimento celular contínuo mantém um ambiente reduzido (fluorescente, vermelho). Já a inibição do crescimento celular mantém um ambiente oxidado (não-fluorescente, azul). O ensaio do alamarBlue® é utilizado para medir quantitativamente a proliferação, viabilidade ou citotoxicidade relativa de várias linhagens celulares humanas ou animais, de bactérias ou de fungos (CZEKANSKA, 2011).

Para os experimentos, os fibroblastos L929 foram contados e plaqueados a 1×10^4 por poços de microplacas de 24 poços. As células foram deixadas para aderir durante 24 horas a $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$, formando uma camada de células no fundo do poço. Após 24 horas, os extratos dos hidrogéis foram aplicados sobre as células. Utilizaram-se três amostras para cada um dos hidrogéis (celulose bacteriana pura, CB-P; celulose bacteriana + tintura de *Jacaranda caroba*, CB-JC; celulose bacteriana + tintura de *Calendula officinalis*, CB-CO). Trocou-se o extrato dos hidrogéis a cada dois dias.

Para o ensaio do alamarBlue®, em cada “time-point”, o meio de cultura foi aspirado e, em seguida, acrescentou-se 500 μL de solução de alamarBlue® a 10 v/v% dissolvido em meio de cultura DMEM (suplementado conforme anteriormente descrito) por poço. As placas foram mantidas a $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ por 4 horas. Após este período, 100 μL do sobrenadante de cada um dos poços foram transferidos para uma microplaca de 96 poços. Para calcular a porcentagem de redução relativa, também foi acrescentado, em quatro poços da microplaca nova, 100 μL de solução de alamarBlue® completamente reduzido, o qual foi obtido autoclavando esta solução por 15 minutos, seguindo as orientações do fabricante (CZEKANSKA, 2011). Fez-se a leitura da placa medindo os valores de fluorescência em um fluorímetro (SpectraMax Gemini XS – Molecular Devices), utilizando o espectro de 544nm de excitação e 590nm de emissão. A comparação dos valores de fluorescência obtidos de cada uma das amostras foi comparada com a média dos valores de fluorescência obtidos da solução de alamarBlue® completamente reduzida.

O ensaio foi realizado nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias após o início do cultivo das células. Os dados foram analisados através do programa GraphPad Prism (GraphPad

Software, La Jolla California USA) com nível de significância de 5%, utilizado ANOVA “two-way”, com pós teste de Tukey.

4.5 Caracterização dos hidrogéis

As caracterizações foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo – Campus I de São Carlos.

4.5.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pode ser utilizada para fornecer informações sobre tamanho, forma e arranjo das partículas da amostra e a relação entre elas numa escala nanométrica; informações cristalográficas (grau de cristalinidade das amostras); aplicações biológicas e seus efeitos; obtenção de imagens tridimensionais com alta profundidade. A ampliação de MEV pode ser controlada ao longo de um intervalo de até seis ordens de grandeza a partir de 10 a 500.000 vezes. Esta técnica amplamente utilizada para capturar estrutura de "rede" na característica de hidrogéis (EL FRAY et al., 2007).

As micrografias foram realizadas para verificar os níveis de alteração da estrutura microfibrilar nas amostras liofilizadas dos hidrogéis. As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas no microscópio eletrônico da Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. As amostras foram colocadas em um suporte, porta amostras metálicas de cobre, e foram recobertas com uma camada de carbono com espessura de 10 nm em um metalizador. As micrografias foram realizadas sob tensão de 15 kV.

4.5.2 Análise térmica por termogravimetria (TG)

A análise térmica é definida como grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura e/ou tempo, enquanto essa substância é submetida a um programa controlado de temperatura. Os resultados são fornecidos na forma de curvas, as quais contêm as informações a respeito da variação do parâmetro medido (GIRON, 2002; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001; SILVA; PAOLA; MATOS, 2007; WENDLANDT, 1986).

As potenciais aplicações da análise térmica na indústria farmacêutica são inúmeras em torno da investigação físico-química de produtos farmacêuticos. Por isso, tem sido extensivamente utilizada como ferramenta analítica confiável e essencial para o controle de qualidade e desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, bem como para o estudo da estabilidade, compatibilidade e das possíveis interações entre fármacos e excipientes e suas misturas, contribuindo dessa forma para estudos de pré formulação (SANTOS et al., 2008; WENDLANDT, 1986).

Na TG o parâmetro a ser medido é a massa, por meio da utilização de uma termobalança que permite medir o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra em função de uma variação controlada de temperatura. O transdutor ou sensor utilizado na termogravimetria é uma balança registradora (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001). As curvas obtidas fornecem informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado. Dada a natureza dinâmica da variação de temperatura da amostra para originar curvas TG, fatores instrumentais [razão de aquecimento, atmosfera (N_2 , ar ou outros), vazão de gás, composição do cadinho, geometria do porta amostra e tamanho e forma do forno] e relacionados às características da amostra (quantidade, granulometria, forma cristalina, empacotamento, condutividade térmica, solubilidade dos gases liberados da amostra e calor de reação envolvido) podem influenciar a natureza, a precisão e a exatidão dos resultados experimentais (SILVA; PAOLA; MATOS, 2007; WENDLANDT, 1986).

A TG pode ser utilizada, por ex., na compreensão dos mecanismos físico-químicos relativos a processos de decomposição térmica ou no estudo e desenvolvimento de novos compostos, entre outros (ANDRADE et al., 2007). A curva TG fornece informações importantes sobre a propriedade física das substâncias como estabilidade, compatibilidade,

cinética, decomposição térmica, fase de transição e polimorfismo (GIRON, 2002; RODRIGUES et al., 2005; SANTOS et al., 2008).

A pequena quantidade de amostra utilizada, a rapidez de resultados, a limpeza da técnica e a possibilidade de visualização do seu perfil termoanalítico, fazem dessas técnicas poderosas ferramentas no estudo de padronização das matérias-primas vegetais e ensaios de pré-formulação para o desenvolvimento tecnológico de medicamentos fitoterápicos (ALVES, 2008; ARAGÃO et al., 2002; ARAÚJO et al., 2006; SILVA JR., 2006).

Foram pesadas em média 3 mg de cada amostra, utilizando-se cadinho de alumina como referência. As amostras foram liofilizadas sob responsabilidade da doutoranda Livia Christovam do Instituto de Química da Unesp – Araraquara. As curvas de TG foram obtidas a partir de um equipamento TA-Instruments, usando uma célula SDT Q600, do Departamento de Engenharia de Materiais da Escola de Engenharia de São Carlos - USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Felix de Carvalho.

4.5.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) é uma espectroscopia de absorção na região do infravermelho do espectro eletromagnético. A espectroscopia no infravermelho baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais). Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento. A análise de um espectro no infravermelho de um composto fornece informações acerca dos grupos funcionais presentes neste (LOPES; FASCIO, 2004; MANSUR; OREFICE; MANSUR, 2004).

Quase todos os compostos contendo ligações covalentes absorvem várias frequências da radiação eletromagnética na região do infravermelho no espectro eletromagnético. A radiação infravermelha na faixa aproximada de 10.000 a 100 cm^{-1} quando absorvida, converte-se em energia de vibração molecular e, como resultado, as ligações químicas sofrem deformações (axiais e angulares). Este processo é quantizado, porém o espectro vibracional costuma aparecer como uma série de bandas ao invés de linhas. As linhas se sobrepõem

dando lugar às bandas observadas. São estas bandas de vibração rotação, particularmente as que ocorrem entre 4.000 e 400 cm^{-1} , a porção de maior interesse para a investigação das informações estruturais úteis de moléculas orgânicas (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Os espectros de FT-IR dos três hidrogéis liofilizados foram obtidos a partir do espectrofotômetro FT-IR IRAffinity-1 (Shimadzu), sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com um acúmulo de 64 varreduras, com resolução de 1cm^{-1} . Todo o procedimento foi feito no Instituto de Química de São Carlos – USP, sob a responsabilidade do físico Aldimar Tadeu Jesuino Constante.

4.6 Experimentação animal

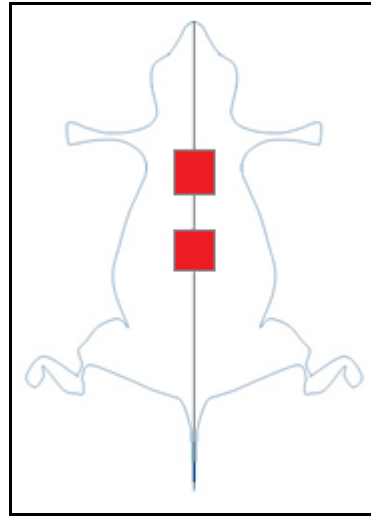
A regeneração tecidual *in vivo* utiliza o processo de cicatrização natural do organismo, proporcionando um resultado mais próximo ao real e clinicamente mais aceitável que a regeneração *in vitro* (TABATA, 2000).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus da Unesp de Araraquara (CEP/FCF/CAr n° 70/2015), no qual o relatório final de aprovação encontra-se em anexo. Todo o procedimento foi realizado no Biotério do Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP.

Todos os animais envolvidos no projeto foram recebidos setes dias antes do início dos experimentos para aclimação, mantidos em gaiolas coletivas até o dia do experimento.

O estudo constituiu de 32 ratos (*Rattus Norvegicus Holtzman*), machos, adultos, pesando em média 250 g. Os animais foram divididos em 4 grupos (períodos de 3, 7 15 e 30 dias). Cada período foi dividido em 2 grupos de 4 animais. Cada grupo recebeu dois testes (um na ferida superior e outro na ferida inferior). A localização das feridas criadas no dorso dos ratos pode ser verificada na Figura 4.

Figura 4 - Identificação das regiões das lesões criadas no dorso dos ratos.



Fonte – Adaptado pela autora

O procedimento de anestesia foi realizado com administração intramuscular de cloridrato de ketamina (25 mg/kg) e de cloridrato de xilazina (5 mg/kg). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob rigoroso protocolo asséptico.

Após tricotomia e assepsia da região dorsal foram realizadas, em cada animal, duas incisões com bisturi criando feridas de aproximadamente 10 mm², com uma distância de 2 cm entre elas (Figura 4). A distribuição dos grupos em relação ao material utilizado é mostrada na Tabela 4. O grupo I, a ferida superior (mais próxima à cabeça do rato) (Figura 4) recebeu a cobertura do Hidrogel de Celulose Bacteriana com *Jacaranda caroba* (CB-JC) e o grupo II, a ferida inferior foi preenchida naturalmente com coágulo (controle negativo). O grupo III, a ferida superior recebeu o Hidrogel de Celulose Bacteriana com *Calendula officinalis* (CB-CO) e o grupo IV, a ferida inferior recebeu a cobertura do Hidrogel de Celulose Bacteriana pura (CB-P, controle positivo).

Os grupos I, III e IV receberam as suas respectivas coberturas diariamente. Como os hidrogéis têm propriedades desbridantes, não foi necessária a limpeza antes do uso das coberturas. As lesões eram preenchidas com os hidrogéis utilizando uma espátula descartável. Não foi necessário anestésiar ou imobilizar o animal para a aplicação, que era feita na própria gaiola.

Tabela 4 - Distribuição dos grupos em relação ao material utilizado.

Grupos	Material utilizado
G I	Hidrogel CB-JC
G II	Coágulo
G III	Hidrogel CB-CO
G IV	Hidrogel de CB-P

Fonte - Elaborada pela autora

Posteriormente os animais foram devidamente transferidos para gaiolas isoladas e identificadas, e a recuperação foi acompanhada diariamente, com as devidas condições de alimentação, água e higiene. Os ratos foram mantidos num ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), a umidade (60-70%) e iluminação (12 horas de luz/escuridão ciclos), controladas. Foi administrado como analgésico o fármaco Tramadol, na dosagem única de 12,5 mg/kg, via intraperitoneal.

A eutanásia dos animais ocorreu nos períodos de 3, 7, 15 e 30 dias de pós-operatório, com quatro animais para cada período, correspondente às repetições de cada condição experimental. O procedimento foi realizado, primeiramente, por meio de anestesia geral, com a administração intramuscular de cloridrato de ketamina (25 mg/kg) e de cloridrato de xilazina (5 mg/Kg), e após remoção das lesões cicatrizadas, foi realizado o aprofundamento anestésico. As peças foram fixadas em solução de formol 10% e em seguida o material foi encaminhado para o processamento histológico de rotina para coloração em hematoxilina-eosina (HE).

4.7 Avaliação macroscópica

As feridas foram avaliadas macroscopicamente após os períodos de 3, 7, 15 e 30 dias. As lesões foram fotografadas utilizando câmera digital Sony, modelo Cyber-Shot de 16.2 megapixels, com a escala definida, de todos os animais em cada período, logo após o procedimento de anestesia pré-eutanásia. Foi utilizado o programa ImageJ para análise da área da lesão e estas medidas, tabuladas e analisadas estatisticamente através do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla California USA), onde verificou-se a análise do desvio padrão com nível de significância de 5%.

Na avaliação macroscópica, verificou-se também a presença de eritema (vermelhidão da pele) próxima à região da lesão, presença excessiva de exsudato e se a cobertura mantinha a lesão úmida.

4.8 Análise histológica

Após eutanásia, as regiões lesionadas do dorso foram removidas, fixadas em solução de Bouin por 48 horas e processadas segundo técnica rotineira para inclusão em parafina, onde foram realizados cortes semi-seriados de 6 µm, no sentido longitudinal da pele e posteriormente corados em Hematoxilina-Eosina (HE). Para cada um dos animais, foram feitas oito lâminas contendo seis cortes em cada uma delas e posteriormente feitas às respectivas análises.

Foi utilizado para a análise e fotografia das lâminas um microscópio com um aumento de 12.5x, acoplado à câmera digital, e o programa Leica Application Suite, pertencentes ao Departamento de Morfologia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

A resposta normal no processo cicatricial é um fenômeno dinâmico, no qual as células e seus produtos interagem para reparar o tecido danificado. Muitas células estão envolvidas nesse processo reparativo, incluindo macrófagos e leucócitos polimorfonucleares. A observação da distribuição dessas células pode ser usada para descrição da reação inflamatória (VINCE; HUNT; WILLIAMS, 1991). A análise para o grau de inflamação seguiu as normas da ASTM F981-04, que são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Classificação para intensidade de reação inflamatória presente nos espécimes.

Classificação	Escore
Sem reação	0
Grau leve	1
Grau médio	2
Grau moderado	3
Grau severo	4

Fonte - Elaborada pela autora

Os dados que se referem ao grau de inflamação (classificações e os seus respectivos scores) e ao padrão de reparação do tecido (em relação à qualidade, quantidade e orientações das fibras colágenas, e também em relação à reconstituição do epitélio), dos grupos tratados e

controles, nos diferentes períodos, foram apresentados em tabelas de contingência e sua associação estruturada foi analisada estatisticamente.

Para o grau do padrão de reparação tecidual, são apresentadas a seguir nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Classificação para o padrão de reparação tecidual em relação à qualidade, quantidade e orientação das fibras colágenas presentes nos espécimes.

Classificação	Escore
Ausência	0
Presença - fibras desorganizadas	1
Presença - pouco organizadas	2
Presença - organização média	3
Presença - bastante organizada	4

Fonte - Elaborada pela autora

Tabela 7 - Classificação para o padrão de reparação tecidual em relação à reconstituição do epitélio presentes nos espécimes.

Classificação	Escore
Não reparado	0
Em processo de cicatrização	1
Reparado	2

Fonte - Elaborada pela autora

A análise estatística foi feita utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla California USA) com nível de significância de 5%. O teste de Liliefors foi usado para analisar a normalidade dos resultados. Para a análise do grau de inflamação, foi usado o teste ANOVA e o teste t como pós-teste. Para a análise dos dados do grau do padrão de reparação tecidual (qualidade, quantidade e orientação das fibras colágenas) e para o grau do padrão de reparação tecidual (reconstituição do epitélio) foi usado o teste Kruskal-Wallis e o teste Dunn como pós-teste.

4.8.1 Espessura da membrana fibrosa purulenta

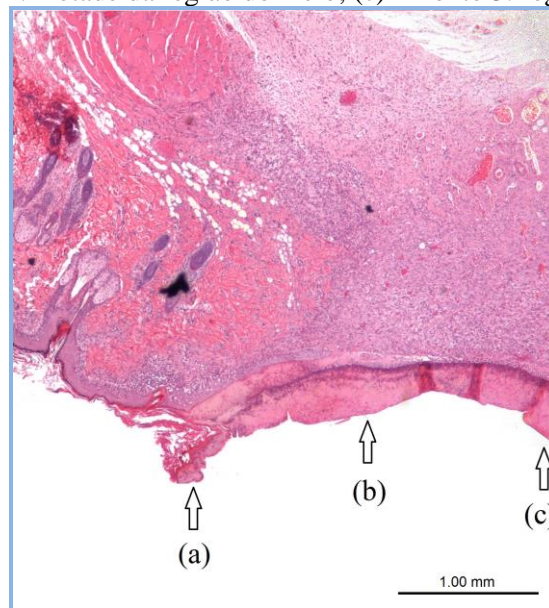
A análise da espessura da membrana fibrosa purulenta foi feita com os quatro grupos, nos períodos de três e sete dias.

Para a fotografia dos três pontos definidos (Figura 5) da membrana (Ponto 1 – início, Ponto 2 – metade da região do meio e Ponto 3 – região do meio), foram utilizados um microscópio com um aumento de 12.5x, acoplado à câmera digital, e o software Leica

Application Suite. Todo o processo foi feito no Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

A análise estatística foi feita utilizando o programa GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla California USA) com nível de significância de 5%. O teste de Liliefors foi usado para analisar a normalidade dos resultados. Posteriormente, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e o teste Dunn como pós-teste.

Figura 5 - Três pontos definidos para a medida da membrana fibrosa purulenta. (a) – Ponto 1: início; (b) – Ponto 2: metade da região do meio; (c) – Ponto 3: região do meio.



Fonte - Elaborada pela autora

4.9 Análise da proliferação celular utilizando imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi feita sob orientação do Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Para a análise da proliferação dos miofibroblastos no tecido em cada período (3, 7, 15 e 30 dias) do processo de reparo, foram obtidos 4 cortes de 4 μm em 8 lâminas silanizadas, as quais foram utilizadas para a realização da reação de imuno-histoquímica para Ki-67.

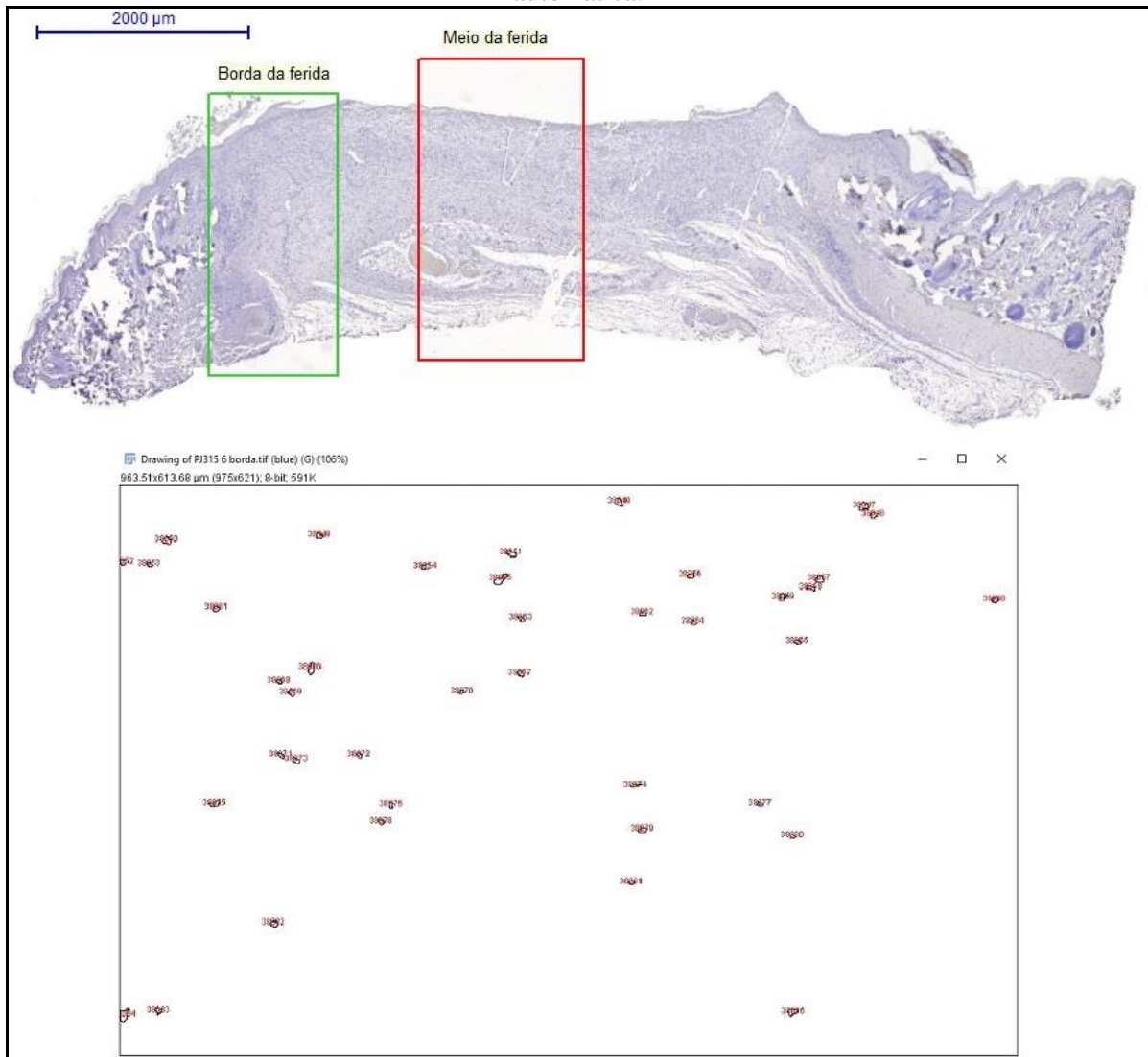
Os cortes em lâminas silanizadas foram submetidos à reconstituição de antígeno utilizando tampão citrato (pH 6,0) em dois tempos de 15 minutos em microondas 750W.

Aguardandou-se o resfriamento para iniciar a reação imuno-histoquímica. Para a realização deste experimento, foi utilizado o anticorpo primário contra Ki-67 (mouse anti-rat, Mib-5, Spring). A solução com o anticorpo primário Ki-67 (anti-Ki-67, Mib-5) foi diluída em diluente de anticorpo (Spring) na concentração preconizada pelo fabricante em exposição “over night”. Em seguida, foi realizado o sistema de visualização com os reagentes amarelo claro e vermelho. Finalmente, os procedimentos para a desidratação e montagem permanente das lâminas foram feitos seguindo a rotina laboratorial. A evidenciação da marcação promovida permitiu identificar as células positivas marcadas em marrom.

A contagem das células em proliferação foi realizada nas lâminas digitalizadas, nas regiões previamente marcadas pelo programa Panoramic Viewer 1.15.4: borda e meio das feridas (Figura 6). Após a identificação de todas as regiões de interesse, as imagens foram analisadas com o módulo contador de marcadores com a ajuda do programa ImageJ.

As medidas foram tabuladas e analisadas estatisticamente através do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla California USA) com nível de significância de 5%. O teste de Liliefors foi usado para analisar a normalidade dos resultados. Para a análise da quantidade de miofibroblastos, foi usado o teste ANOVA e o teste Tukey como pós-teste.

Figura 6 - Regiões definidas para a identificação dos núcleos Ki-67 positivos para quantificação automática.



Fonte - Elaborada pela autora

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

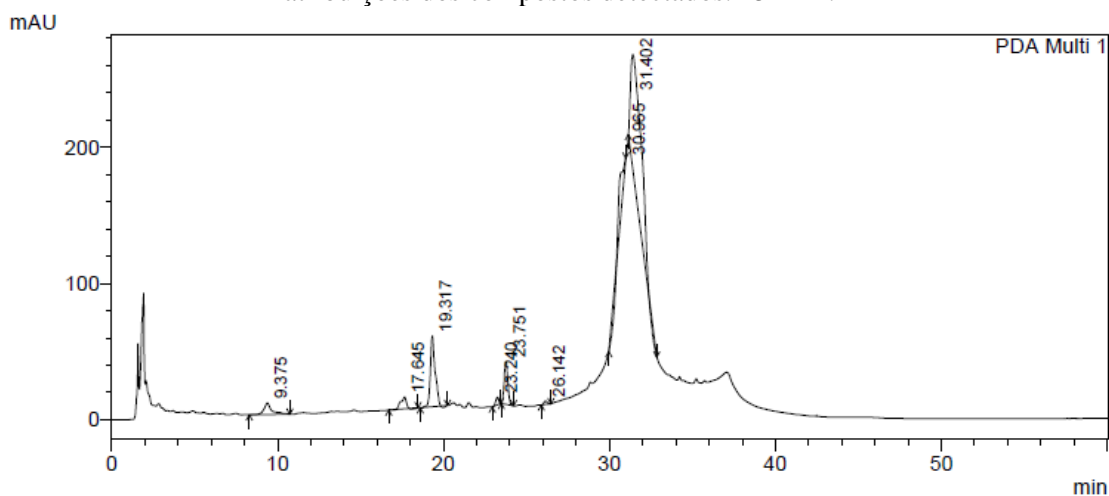
Os resultados do CLAE para os estudos fitoquímicos das tinturas de *C. officinalis* e *J. cabora* são apresentados a seguir.

5.1.1 *Calendula officinalis*

Observou-se no perfil cromatográfico (Figura 7) do extrato de *C. officinalis* (20%, v/v) a predominância de oito picos em intervalo de 9 a 32 minutos (Tabela 8). Todos os constituintes mostraram idêntica absorção no UV com máximos de absorção em torno de 254 nm, típico de flavonoides. Os constituintes químicos identificados foram: flavonóides quercetina-3-O-rutinosilramnosídeo (1º pico), isoquercitrina (2º pico), isoramnetina-3-O-glicosilglicosídeo (3º pico), isoramnetina-3-O-glicosídeo (4º pico) e quercetina (5º pico), carotenóides luteína (6º pico) e arnidiol-3-O-palmitate (7º pico), e terpenóide laurato de faradiol (8º pico).

Deve-se levar em consideração que tanto os fatores externos como temperatura, vento, solo, latitude e altitude, quanto os fatores técnicos como forma de plantio, adubação, época da colheita e estágio de crescimento, podem influenciar na composição química das plantas interferindo no teor do princípio ativo e na produção de biomassa (ARAÚJO et al., 2009; KASPRZYK; TUROWSKA; PYREK, 1968; VIDAL-OLLIVIER et al., 1991; VOLPATO, 2005). Estudos anteriores com a Calêndula mostraram que diferentes espécies da planta, bem como diferentes cultivos da mesma espécie, foram significativamente diferentes no conteúdo dos seus compostos fenólicos, flavonóides e atividades antioxidantes (ERCETIN et al., 2012).

Figura 7 - Perfil cromatográfico da tintura de *Calendula officinalis* (60% v/v) por CLAE com as atribuições dos compostos detectados. 254 nm.



Fonte - Elaborada pela autora

Tabela 8 - Tabela de picos do cromatograma da tintura de *Calendula officinalis*.

Picos#	Tempo de Retenção	Área	Peso	Área %	Peso %
1	9,375	282300	8547	4,421	4,443
2	17,645	180312	8578	2,824	4,459
3	19,317	1027656	51871	16,093	26,964
4	23,240	72770	5507	1,140	2,863
5	23,751	475628	31518	7,448	16,384
6	26,142	33343	2504	0,522	1,302
7	30,965	360494	743	5,654	0,386
8	31,402	3953373	83102	61,908	43,199
Total		6385876	192370	100,000	100,000

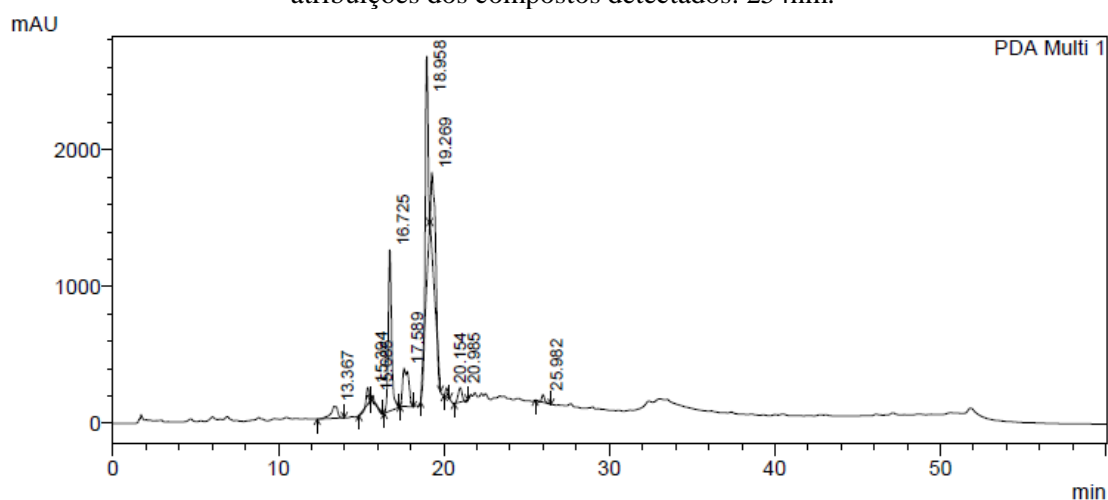
Fonte - Elaborada pela autora

5.1.2 *Jacaranda caroba*

Observou-se no perfil cromatográfico (Figura 8) do extrato de *J. Caroba* (20%, v/v) a predominância de dez picos em intervalo de 10 a 30 minutos (Tabela 9), mas não foram observados picos com intensidades significativas fora desse intervalo de tempo. O cromatograma obtido da tintura de *J. caroba* apresenta vários picos distintos entre si (Figura 8) entre 10 e 30 min. Os constituintes químicos identificados foram: fitoquinóides (2° e 3° picos) - substâncias desse grupo já foram obtidas de outras espécies do gênero *Jacaranda* (BORGES; BAUER, 1982), triterpenos (4° e 5° picos), fenóis (6°, 7° e 9° picos), flavonóides (8° e 10° picos). O 1° pico não foi identificado, como o relatado por Bento (2013).

A presença de alguns compostos nos extratos depende de vários fatores como vistos anteriormente. No estudo de Braga et al. (2003), iridóides, triterpenos e esteróides foram detectados em *J. caroba*, mas cumarinas, alcaloides e flavonoides estavam ausentes. As variações sazonais dos materiais vegetais utilizados na produção dos extratos podem ter influenciado. Segundo Pilatti (2012), existe também uma diferença na quantificação de compostos entre as plantas das diferentes formações florestais.

Figura 8 - Perfil cromatográfico da tintura de *Jacaranda caroba* (60% v/v) por CLAE com as atribuições dos compostos detectados. 254nm.



Fonte - Elaborada pela autora

Tabela 9 - Tabela de picos do cromatograma da tintura de *Jacaranda caroba*.

Picos#	Tempo de Retenção	Área	Peso	Área %	Peso %
1	13,367	2517526	87376	4,361	2,109
2	15,394	1160211	122336	2,010	2,952
3	15,685	203446	36778	0,352	0,888
4	16,725	16503242	1175630	28,585	28,372
5	17,589	6933636	276533	12,010	6,674
6	18,958	16584566	1664072	28,726	40,160
7	19,269	10979369	556258	19,017	13,425
8	20,154	673621	64525	1,167	1,557
9	20,985	1587177	104762	2,749	2,528
10	25,982	590880	55321	1,023	1,335
Total		57733673	4143591	100,000	100,000

Fonte - Elaborada pela autora

5.2 Citotoxicidade e viabilidade celular

As células L929 proliferaram com os extratos de hidrogéis de celulose bacteriana pura (CB-P), de celulose bacteriana com tintura de *Calendula officinalis* (CB-CO) e de celulose bacteriana com tintura de Jacaranda caroba (CB-JC) de maneira uniforme até 14 dias após o plaqueamento. Os resultados mostram que a concentração final do extrato de Calêndula, estimada em 0,7 m/v%, não é tóxica às células.

Tomados em conjunto, a toxicidade de doses repetidas de extratos das flores de *Calendula officinalis* pode ser considerada baixa, mas devemos ter cautela na administração oral por períodos prolongados, especialmente em indivíduos com problemas hepáticos, renais ou hematológicos (BRASIL, 2014).

A toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico da *Calendula officinalis* (extraído com etanol a 30%, e com uma razão droga vegetal: líquido extrator de 1:1) administrado por via subcutânea foi relatada como sendo de 45mg em camundongos (BRASIL, 2014).

Uma baixa toxicidade para o extrato hidroalcoólico das flores de *C. Officinalis* também foi observada em Silva et al. (2007), que avaliou a administração por via oral de extrato hidroalcoólico nas doses de 0,025; 0,25; 0,5; e 1,0g/Kg diariamente por 30 dias em ratos Wistar machos. No estudo, os parâmetros hematológicos e os parâmetros bioquímicos mantiveram-se dentro da normalidade.

Segundo Brasil (2014), um teste de oclusão da *Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association*, não publicado, envolvendo extrato aquoso de *C. officinalis* a 10%, realizado em nove coelhos, mostrou que o índice primário de irritação dérmica foi zero.

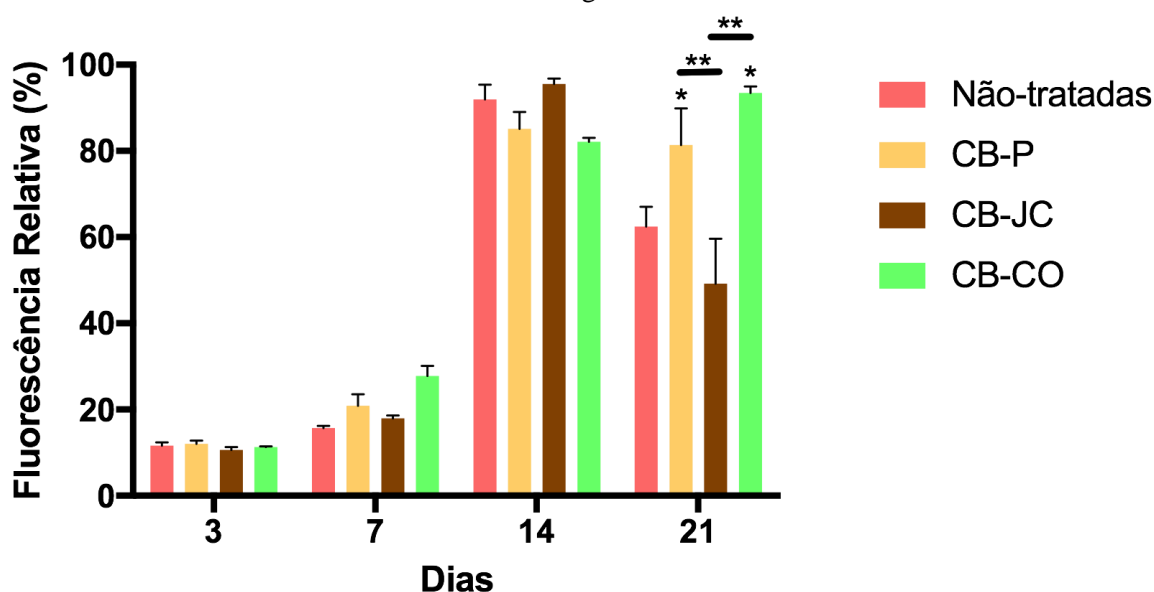
Fronza et al. (2009), demonstraram que o efeito em aumentar a proliferação de fibroblastos do extrato etanólico (10g material vegetal/ 150 mL solvente extrator) de *C. officinalis*, presentes em uma concentração de 10µg/mL nos poços, foi de 64,3 e 74,5% respectivamente em relação ao tratamento com controle (0,25% de DMSO).

Segundo Hernandez (2015), os resultados obtidos pelo teste de citotoxicidade quando comparados aos resultados de outros exemplares da família Bignoniaceae, o extrato de *J. Caroba* se mostrou mais citotóxico. No teste *in vivo*, o extrato não promoveu sinais de toxicidade, concordando com os resultados da análise macroscópica e histológica do atual estudo que demonstrou uma melhor taxa de regeneração tecidual (Figura 14) em relação ao controle (coágulo) para os períodos de 3 e 7 dias, e em relação ao hidrogel de CB-P para o período de 3 dias.

Aos 21 dias de ensaio, houve um decréscimo da quantidade de células viáveis cultivadas com o hidrogel de CB-JC (Figura 9), assim como para o controle (não tratadas), enquanto que, para os hidrogéis de CB-P e CB-CO, a fluorescência relativa manteve-se estável. Como o decréscimo também ocorreu para as células não-tratadas, a diminuição da fluorescência relativa para os poços com o hidrogel de CB-JC pode ser atribuída à dinâmica celular: em condições *in vitro*, as células proliferarão até preencher todo o espaço disponível quando, finalmente, a proliferação se estabilizará e diminuirá devido ao efeito da cascata de sinalização da apoptose; apoptose é o processo de morte celular o qual é fundamental para o desenvolvimento e função de organismos multicelulares (ALBERTS et al., 2013; STRASSER; O'CONNOR; DIXIT, 2000).

Contudo, como a quantidade relativa de células viáveis manteve-se estável para os outros hidrogéis (CB-P e CB-CO), aspectos como a densidade e polimerização destes hidrogéis devem ser investigados. Se estas variáveis forem superiores em relação às do hidrogel de CB-JC, haverá uma maior quantidade de celulose bacteriana em contato com as células, aumentando a superfície no qual as células podem se proliferar e, portanto, mantendo estável a cultura celular *in vitro* por um tempo superior em relação à superfície plana do poço controle (HESS et al., 2017; WAGNER et al., 2017).

Figura 9 - Proliferação celular de fibroblastos L929 em contato com extratos dos hidrogéis a 10 m/v%. Quanto maior a fluorescência relativa (%), maior o número de células viáveis. As barras em cores representam as médias e as barras em preto representam o Erro Padrão das Médias. * $n < 0,05$, em comparação com as células não-tratadas (controle). ** $n < 0,0001$, em comparação com os diferentes hidrogéis.



Fonte - Elaborada pela autora

5.3 Caracterização das micropartículas dos hidrogéis

Os resultados da caracterização dos hidrogéis de CB-P, CB-JC e CB-CO são apresentados a seguir.

5.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

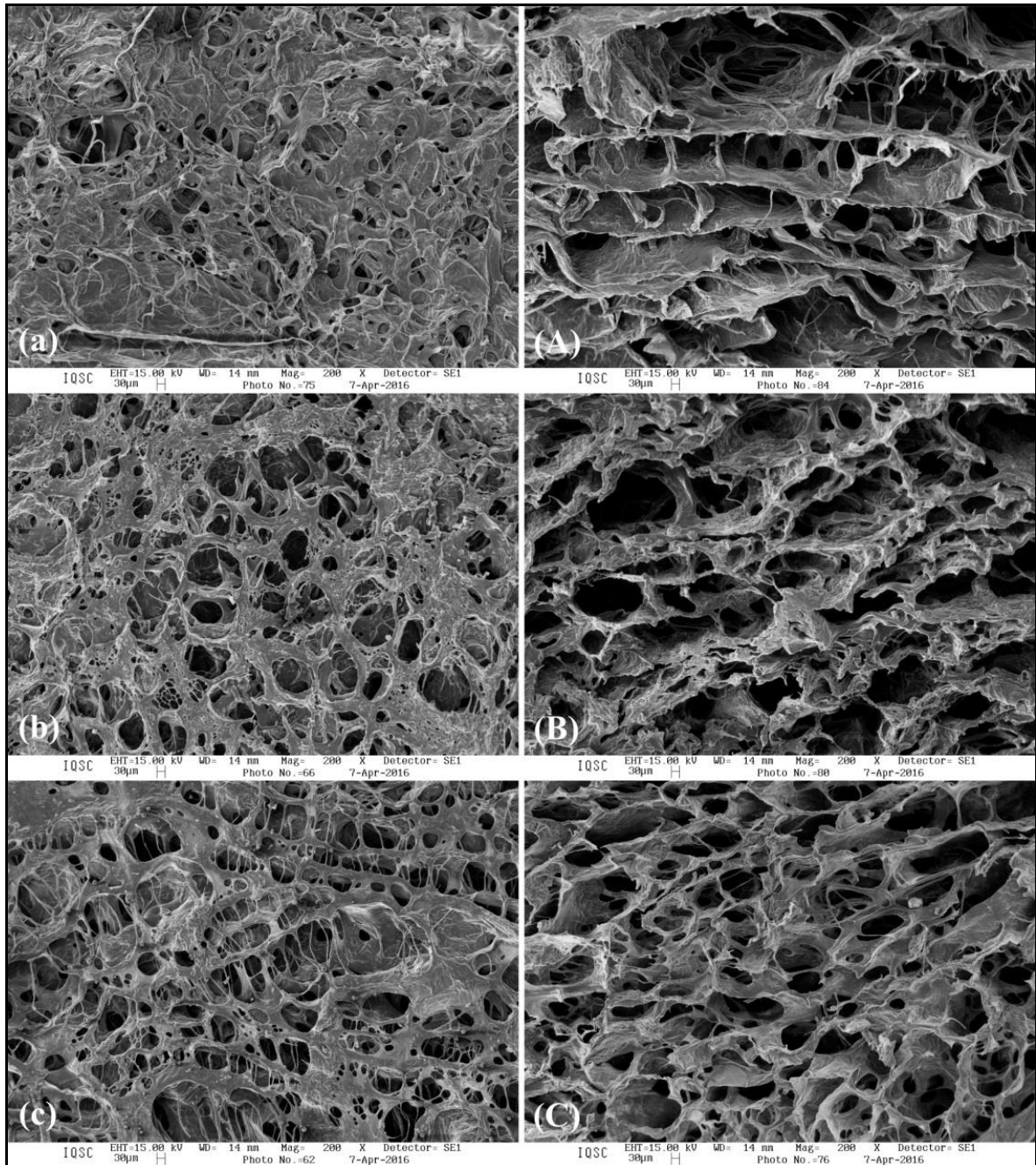
O MEV é uma ferramenta padrão para inspeção e análise em diversas áreas de pesquisa desde a área de materiais à área biológica. O poder de resolução da maioria dos microscópios eletrônicos é cerca de 100 vezes melhor do que a resolução do microscópio de luz (BENDO; CHRISTOFOLETTI, 2007).

A Figura 10 refere-se às micrografias dos hidrogéis liofilizados e estas se mostraram semelhantes. As imagens apresentam um material poroso característico de um hidrogel. As micrografias mostram uma estrutura constituída de arranjos de fibras aleatoriamente dispostas, mas compactas em alguns pontos. As fibras não têm uma morfologia regular e parecem “fundidas” entre si nos locais mais compactos.

A presença das tinturas de *Calendula officinalis* e de *Jacaranda caroba* na celulose bacteriana manteve a estrutura porosa e os poros continuaram interconectados em todo o material em três dimensões, o que é extremamente importante na engenharia de regeneração tecidual, como por exemplo, para o crescimento de fibroblastos (O'BRIEN et al., 2005).

Analisando a Figura 10, a superfície de (a) aparentemente apresenta fibras mais compactas que (b) e (c). Em (A), são mais visíveis fibras distribuídas e interconectadas em camadas. O corte transversal de (A) e (B) apresenta poros aparentemente maiores que em (C). Segundo Annabi et al. (2010), os hidrogéis com poros maiores permitem melhor penetração celular, bem como a formação de novos tecidos dentro da microestrutura do “scaffold”, quando comparados aos hidrogéis com menor porosidade.

Figura 10 - Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura para os hidrogéis liofilizados. (a) hidrogel de CB-P; (b) hidrogel de CB-JC; (c) hidrogel de CB-CO. (A, B e C) são cortes transversais das amostras.



Fonte - Elaborada pela autora

5.3.2 Análise térmica por termogravimetria (TG)

Na análise termogravimétrica, a variação da massa de uma amostra em atmosfera controlada é continuamente acompanhada em função do tempo ou temperatura. O gráfico de peso ou porcentagem em peso em função do tempo é chamado de curva termogravimétrica (WENDLAND, 1986).

A amostra é aquecida a uma temperatura constante até que haja uma variação da massa. Nesse momento, a temperatura para de aumentar até que haja a estabilização da massa. Com isso, a temperatura volta a aumentar até a próxima mudança da massa. A Figura 11 apresenta as curvas termogravimétricas obtidas na razão 10°C/min de aquecimento para o hidrogel de CB-CO (a), hidrogel de CB-JC (b) e hidrogel de CB-P (c).

Para as amostras foram observados três estágios atribuídos à:

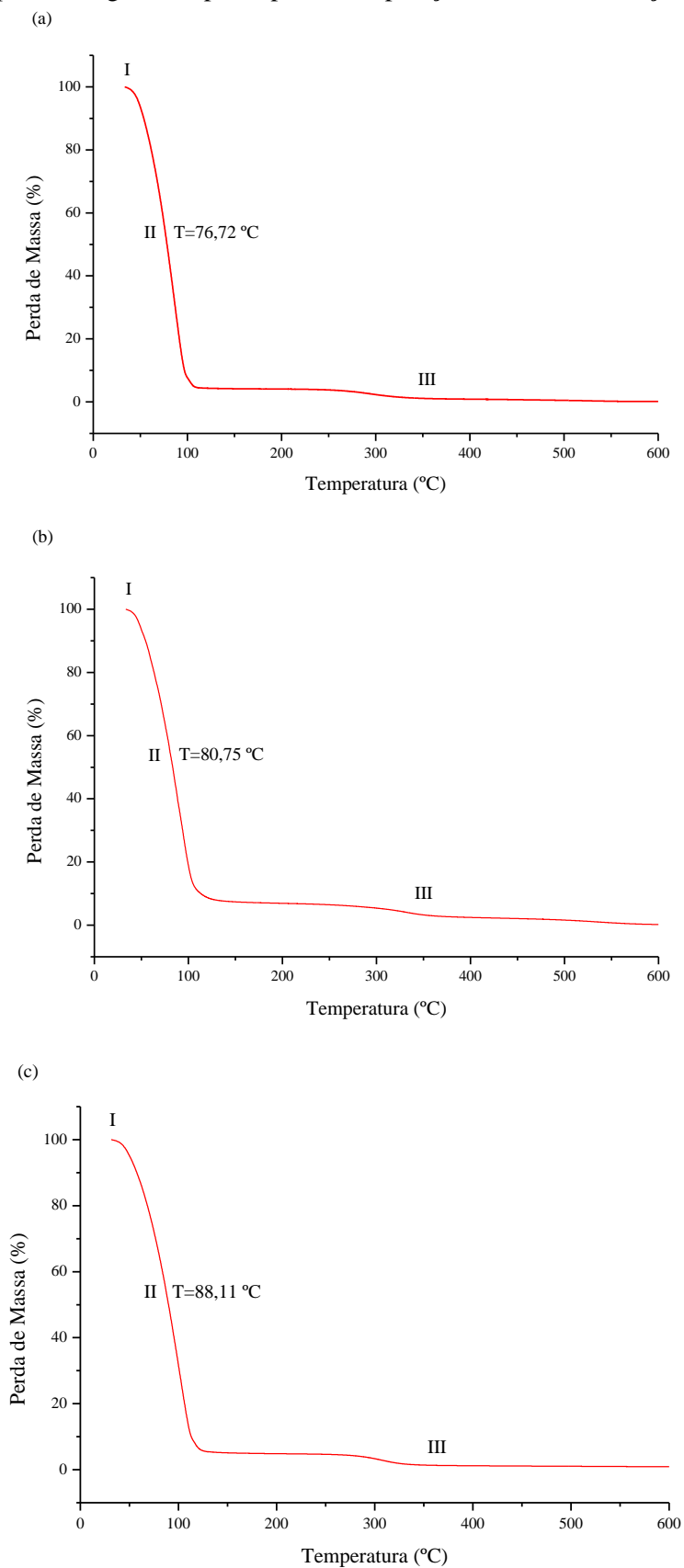
- I - Perda de água;
- II - Perda por decomposição;
- III - Carbonização.

As curvas termogravimétricas das amostras dos hidrogéis de CB-P, CB-JC e CB-CO mostraram que no estágio II, onde acontece a maior perda de massa, ocorreu nas temperaturas 76,72°C, 80,75°C e 88,11°C, respectivamente.

O hidrogel de CB-CO mostrou que um resultado melhor em relação aos hidrogéis de CB-P e CB-JC, pois ele suportou uma temperatura de 13% e 8,3% a mais, respectivamente, para a sua decomposição.

O hidrogel de CB-JC, mesmo que menor, apresentou um resultado melhor em relação ao hidrogel de CB-P (controle positivo), pois ele suportou uma temperatura de 5% a mais para a sua decomposição total.

Figura 11 - Curvas TG de: (a) Hidrogel de CB-P; (b) Hidrogel de CB-JC; (c) Hidrogel de CB-CO. I – perda de água, II – perda por decomposição e III - carbonização.



Fonte - Elaborada pela autora

5.3.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

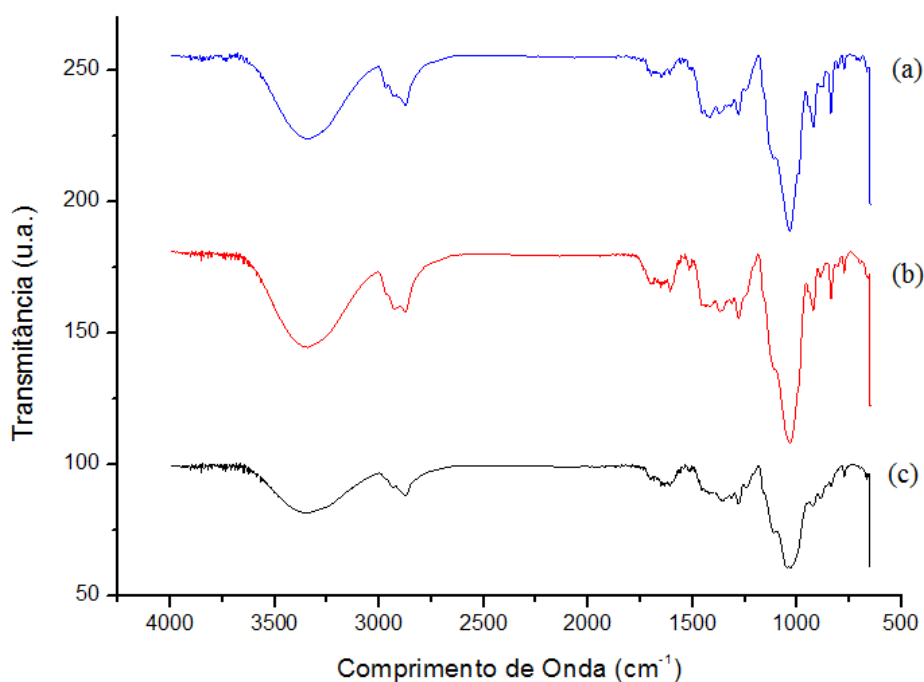
A radiação de infravermelho (IV) corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. O fato de cada grupo funcional absorver uma dada frequência característica, isso permite que por meio de um gráfico de intensidade de radiação versus frequência, o espectro de IV seja possível caracterizar os grupos funcionais de um padrão ou de um material desconhecido (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000). A técnica de FT-IR não é destrutiva, e permite espectros de amostras pouco solúveis, em filmes no estado sólido, como o caso dos hidrogéis liofilizados (GRANDE, 2009).

A Figura 12 demonstrou espectros de infravermelho semelhantes entre as amostras liofilizadas dos hidrogéis, mostrando que a composição química da CB não foi alterada, mantendo assim as suas propriedades, mesmo após a adição das tinturas.

As amostras apresentaram bandas típicas para proteínas em torno de 1656 e 1547 cm^{-1} , referentes ao estiramento C=O amida I e deformação N-H para amida II, respectivamente. Esta banda foi observada com pouca diferença de intensidade entre os espectros das amostras, porém a do hidrogel de CB-JC apresentou-se um pouco maior.

Para a banda em torno de 2922 cm^{-1} , é atribuída a ligação C-H de aromáticos.

Figura 12 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho. (a) Hidrogel de CB-P; (b) Hidrogel de CB-JC; (c) Hidrogel de CB-CO.



Fonte - Elaborada pela autora

Os espectros apresentaram bandas características de uma proteína, em torno de 1600-1700 cm^{-1} , que indicou o estiramento de uma carbonila; em 1450 cm^{-1} indicou a presença dos estiramentos do anel fenil (C=C). A banda de absorção em 1048 cm^{-1} é caracterizada pela ligação C-H do anel. Embora existam algumas pequenas variações em relação à intensidade dos modos vibracionais detectados, os valores obtidos estão de acordo com os relatados na literatura (NUNES, 2008; TONHI; PEPLIS, 2002).

O alargamento das bandas foi verificado nas três amostras, podendo estar relacionado à formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas da celulose bacteriana (CHEN et al., 2008).

5.4 Avaliação macroscópica

Uma propriedade fundamental da pele é a sua capacidade de responder ao tratamento. Em populações de ratos, estas respostas são claramente adaptativas, em que a primeira resposta, eritema, é um sinal de que o sistema imunitário está ativo e o processo de cura foi iniciado. Muitos animais podem ser utilizados como modelo para estudo da cicatrização, porém os mamíferos são os melhores para estes estudos por assemelharem-se ao homem na deposição de colágeno nas feridas. Os roedores, principalmente os ratos, são os mais usados por terem baixo custo, serem de fácil transporte e obtenção, e ocuparem pouco espaço (COHEN; MAST, 1990).

A pele de rato apresenta diferença importante em relação à humana que é a ausência de um limite definido entre derme papilar e derme reticular. Apesar dos achados histológicos diferentes da pele humana (a derme do rato é mais espessa e não apresenta tecido gorduroso subcutâneo nem tela muscular subcutânea), os vasos sanguíneos, responsáveis pela irrigação cutânea, são subdérmicos em ambos e apresentam as mesmas alterações de perfusão de macro e microvascularização (MCFARLANE; DEYOUNG; HENRY, 1965).

Os animais foram mantidos em gaiolas separadas, pois se os deixassem em gaiolas coletivas poderiam causar novos danos teciduais devido ao contato entre eles, comprometendo, portanto, a análise do processo cicatricial. Kashyap et al. (1995) realizaram um trabalho com iodo povidine em camundongos e citaram como problema em potencial a

interferência da lambida do animal na cicatrização da ferida, visto que a saliva de camundongo contém vários fatores de crescimento.

Os hidrogéis foram de fácil aplicação, aderiram e preencheram a lesão sem dificuldades. Mesmo com a incorporação da tintura do extrato, o hidrogel de CB-CO ficou semitransparente, pois ele foi preparado com as flores da Calêndula. Assim, foi possível acompanhar a cicatrização da ferida. O hidrogel de CB-JC não apresentou essa característica, pois ficou escuro devida tintura ser preparada a partir do extrato das folhas.

Um ponto positivo para as coberturas tópicas é não ter necessidade de realizar suturas, sendo uma aplicação rápida, sem invadir tecidos no entorno.

A grande quantidade de água presente nos hidrogéis mantém a lesão úmida, auxiliando na cicatrização. Winter (1962) descreve a importância da manutenção da umidade do leito da ferida, auxiliando enzimas como as colagenases e proteinases na capacitação de migração de células através da ferida para onde há fibrina. Quando uma ferida seca, ocorre a formação de uma crosta, fazendo com que as células epiteliais penetrem mais profundamente na ferida para encontrar a umidade necessária para a sua proliferação.

Vogt et al. (1995) observaram que a cicatrização em meios líquido e úmido foi significativamente mais rápida comparada com as feridas secas. No presente estudo, o fato dos hidrogéis serem aplicados diariamente e permanecerem por mais tempo nas feridas, mantiveram o meio úmido e proporcionaram uma cicatrização mais rápida, em contraste com o grupo controle.

A epitelização pode ser acelerada se a ferida for mantida úmida (WINTER, 1962). Uma explicação para isso é que os queratinócitos migram mais facilmente sobre a superfície da ferida úmida do que sobre uma crosta (WINTER; SCALES, 1963). Células epidérmicas podem migrar a uma velocidade de 0,5 mm/dia ao longo de uma superfície de ferida úmida, que é duas vezes mais rápida do que sob uma crosta em feridas secas (WINTER, 1972).

A avaliação macroscópica das lesões visou também observar a presença de hemorragias, crostas e secreções. Durante o estudo, não ocorreu nenhum episódio de hemorragia, apenas sangramentos inerentes aos procedimentos cirúrgicos, controlados somente por compressão de gazes e estancados com a aplicação dos hidrogéis.

No primeiro dia, após a cirurgia, todas as feridas não apresentaram exsudato purulento e estavam limpas. Algumas feridas dos grupos I (Figura 13) e III estavam bem menores que no dia da cirurgia. A contração da ferida em alguns ratos pode ser explicada pela retração natural da ferida que ocorre devido às forças elásticas e a tensão da pele que não sofrem influência do tratamento (MASOKO et al., 2010). Outra explicação para isso deve-se também

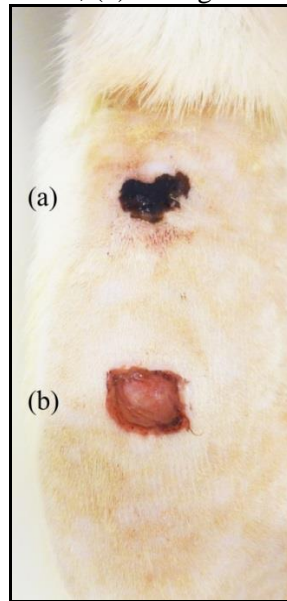
à presença do hidrogel que manteve a lesão úmida favorecendo a movimentação das células. As feridas dos grupos II (Figura 13) e IV estavam com o tamanho praticamente igual ao dia da cirurgia e róseas.

No presente estudo, todas as feridas que receberam o hidrogel de CB-JC apresentaram uma crosta que esteve presente desde o primeiro dia após a cirurgia até o período de sete dias (Figura 13). Esse resultado pode explicar o porquê de uma reparação bem menor em comparação com o hidrogel de CB-CO para os períodos de três e sete dias (Figura 15). Mesmo assim, esse hidrogel demonstrou um melhor resultado nesses períodos em relação ao hidrogel de CB-P e ao grupo controle.

Como foi dito anteriormente, durante o período do teste, algumas feridas apresentaram uma crosta rígida, escura e espessa. Isto provavelmente deve-se às proteínas e exsudatos de feridas interligados com os constituintes do extrato favorecendo a homeostase local, e protegendo o novo tecido, formando uma cobertura externa (MEZADRI et al., 2009). As crostas se soltaram espontaneamente a partir do sexto dia de pós-operatório, não ocorrendo sangramento após a retirada das crostas remanescentes no sétimo dia. Isso permitiu que o medicamento atuasse diretamente sobre as feridas, além de facilitar a avaliação macroscópica das feridas (aspectos morfológicos e morfométricos), corroborando com os ocorridos de Eurides et al. (1998).

As crostas foram observadas também nos outros grupos (CB-CO, CB-P e controle) a partir do 7º dia de avaliação (Figura 16). O mesmo foi observado por Bevilacqua (1984) e Simões et al (1986), segundo os quais a solução de continuidade causada pela remoção do fragmento de pele é inicialmente preenchida por coágulo, fibrina e exsudato inflamatório, que originam a crosta fibrinoleucocitária.

Figura 13 - Aspecto das feridas dos grupos I e II no primeiro dia após a cirurgia. (a) – hidrogel de CB-JC; (b) – coágulo.



Fonte - Elaborada pela autora

No terceiro dia (Figura 14), as feridas estavam limpas, desenvolvendo tecido de granulação (principalmente nas margens), sem inflamação ou contaminação aparente (presença de exsudato purulento, edema e eritema acentuado).

Nas feridas dos respectivos grupos, não foi constatada a formação de exsudato purulento, sugerindo que a membrana de fibrina purulenta se apresentou como protetora das coberturas. A formação exagerada de exsudato purulento é um sinal de reação inflamatória exacerbada, causada pela falha do material em oferecer biocompatibilidade, promovendo assim uma resposta inflamatória insatisfatória (SEVASTJANOVA et al., 1987). O fato de não ocorrer formação do exsudato purulento demonstra a boa resposta do organismo às coberturas que consequentemente possibilitou um processo cicatricial mais adequado. Esse resultado provavelmente se deve às ótimas propriedades da celulose bacteriana (BENZIMAN et al., 1980) somado as características antibacteriana, anti-inflamatória e antifúngica dos extratos das plantas medicinais presentes nos hidrogéis. Devemos salientar também o fato das coberturas apresentarem poros para que o tecido tenha uma adequada aeração (MATEOS, 2004), mas agem como barreira para contaminações externas.

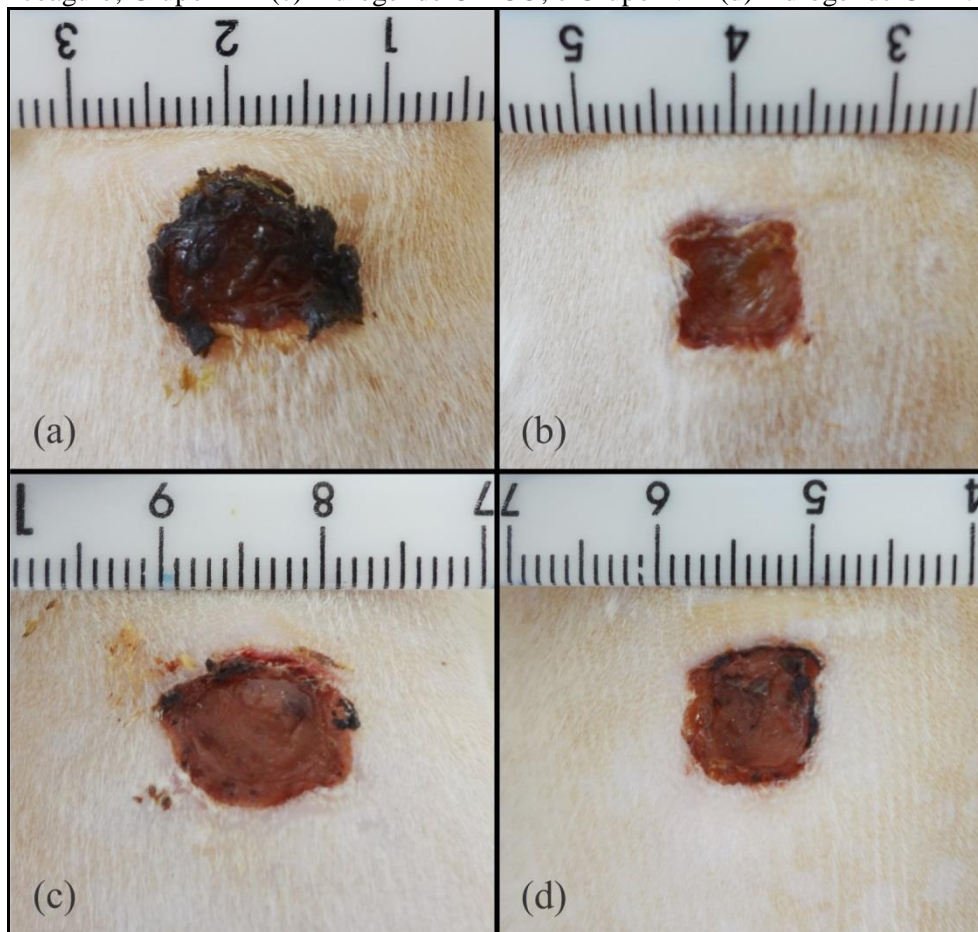
O grupo II (somente com coágulo) apresentou uma ferida com aumento no tamanho, já os outros grupos tiveram as suas feridas diminuindo normalmente. Segundo os estudos de Cross et al. (1995) e Teo e Naylor (1995), uma ferida pode aumentar de tamanho porque as

margens da lesão sofreram retração centrífuga devido à tensão elástica da pele circunjacente, perda de aderência à fáscia profunda e mobilidade da pele do rato.

Quando em uma ferida plana inicia o processo de cicatrização, sua área torna-se progressivamente menor, devido ao movimento centrípeto de suas margens, sobretudo em resposta à ação de miofibroblastos presentes no tecido de granulação (MACGRATH, 1983; ZACHARIAS, 1991). Este fenômeno ocorre com a contração da ferida e sua cura pode requerer meses (FALCÃO, 2001). Em curto prazo, o fechamento de uma ferida por processo de contração de suas margens é considerado insuficiente restando ainda uma área situada dentro do perímetro correspondente, denominada de área de epitelização e, no espaço de tempo referido, a cicatrização completa-se como resultado de uma combinação dos processos de contração e epitelização (MACGRATH, 1983).

Os resultados de Sanchez Neto (1993), com tratamento com solução de papaína a 2% para reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos, demonstraram que houve diminuição progressiva nos tamanhos das feridas de quase todos os animais em todos os dias de avaliação. A explicação para este fato pode ser o que se refere às feridas abertas submetidas a um processo de contração na tentativa de reparação da lesão.

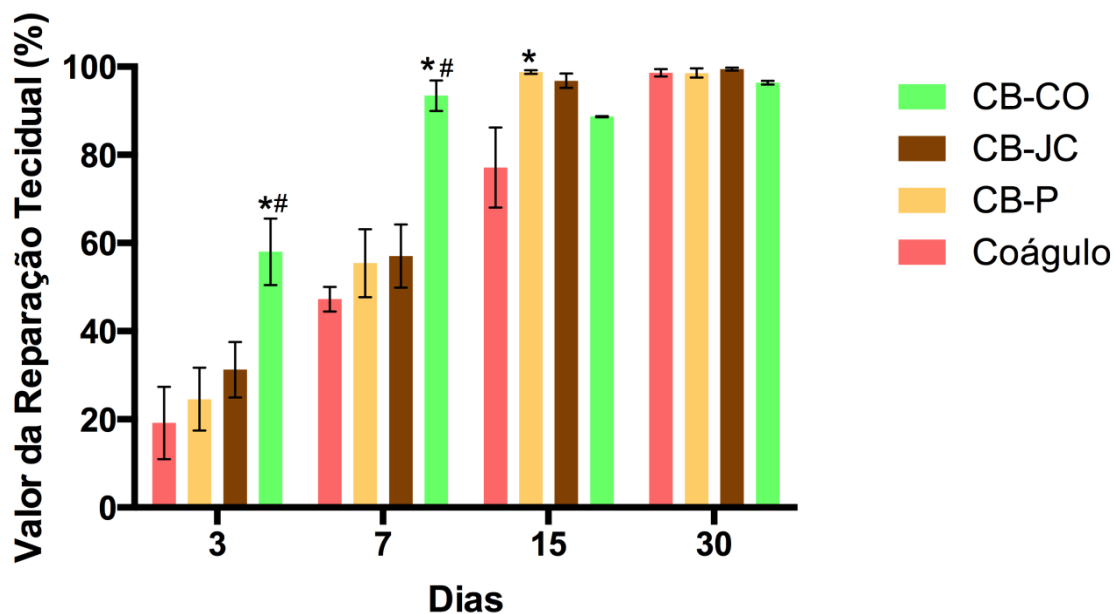
Figura 14 - Terceiro dia: Grupo I – (a) hidrogel de CB-JC; Grupo II – (b) controle negativo com coágulo; Grupo III – (c) hidrogel de CB-CO; e Grupo IV – (d) hidrogel de CB-P.



Fonte - Elaborada pela autora

Os valores das médias da redução do tamanho das lesões entre os grupos, \pm erro padrão, em relação aos períodos experimentais são apresentadas no gráfico a seguir (Figura 15). A apresentação desses valores, na forma de porcentagem, foi baseada no trabalho de Sanchez (2012).

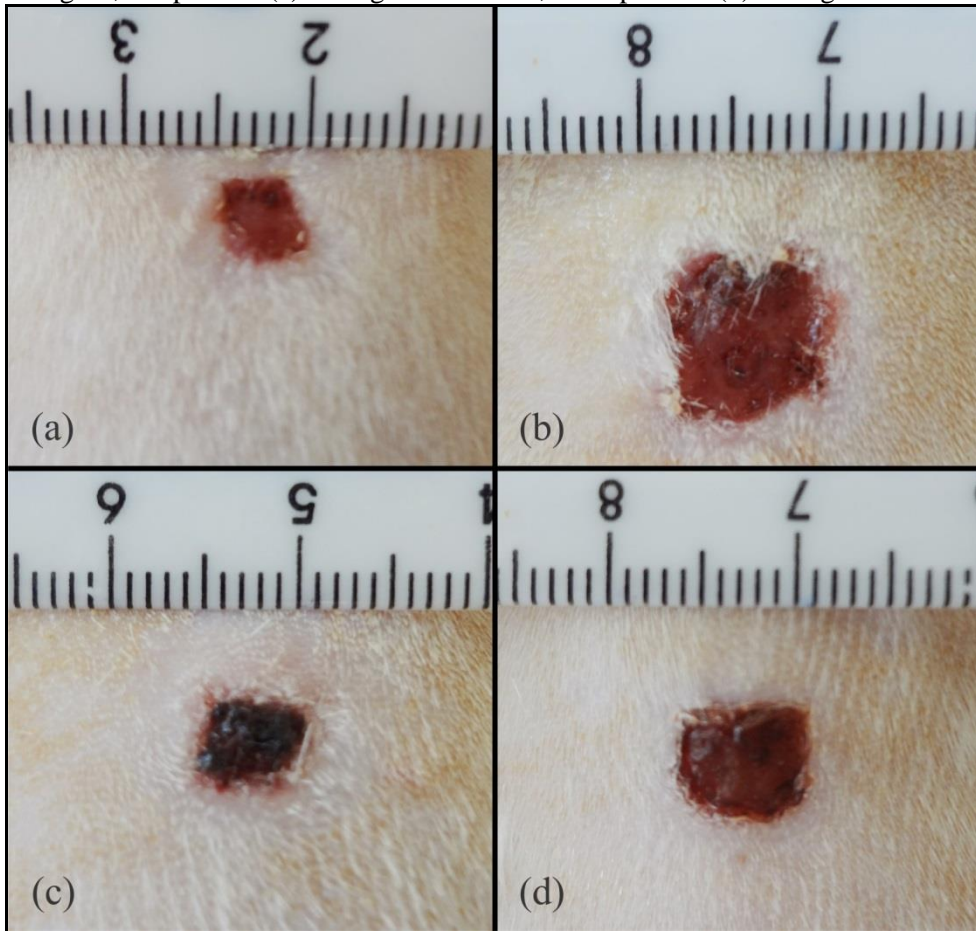
Figura 15 - Comparação do tamanho das feridas antes e após a aplicação dos hidrógeis e do coágulo (controle) para cada período avaliado (3, 7, 15 e 30 dias), expresso em porcentagem de regeneração da ferida. As barras em cores representam as médias e as barras em preto representam o Erro Padrão das Médias. * $p < 0,05$ em comparação com o coágulo. # $p < 0,05$ em comparação com hidrogel de celulose bacteriana puro (CB-P).



Fonte - Elaborada pela autora

No sétimo dia, o tecido de granulação já cobria toda a área das lesões e parecia mais abundante nas que receberam os hidrogéis. As feridas mantiveram-se secas, limpas e todas diminuíram de tamanho (Figura 16). Todas as crostas do grupo I se soltaram e as dos outros grupos começaram a se formar.

Figura 16 - Sétimo dia: Grupo I – (a) hidrogel de CB-JC; Grupo II – (b) controle negativo com coágulo; Grupo III – (c) hidrogel de CB-CO; e Grupo IV – (d) hidrogel de CB-P.

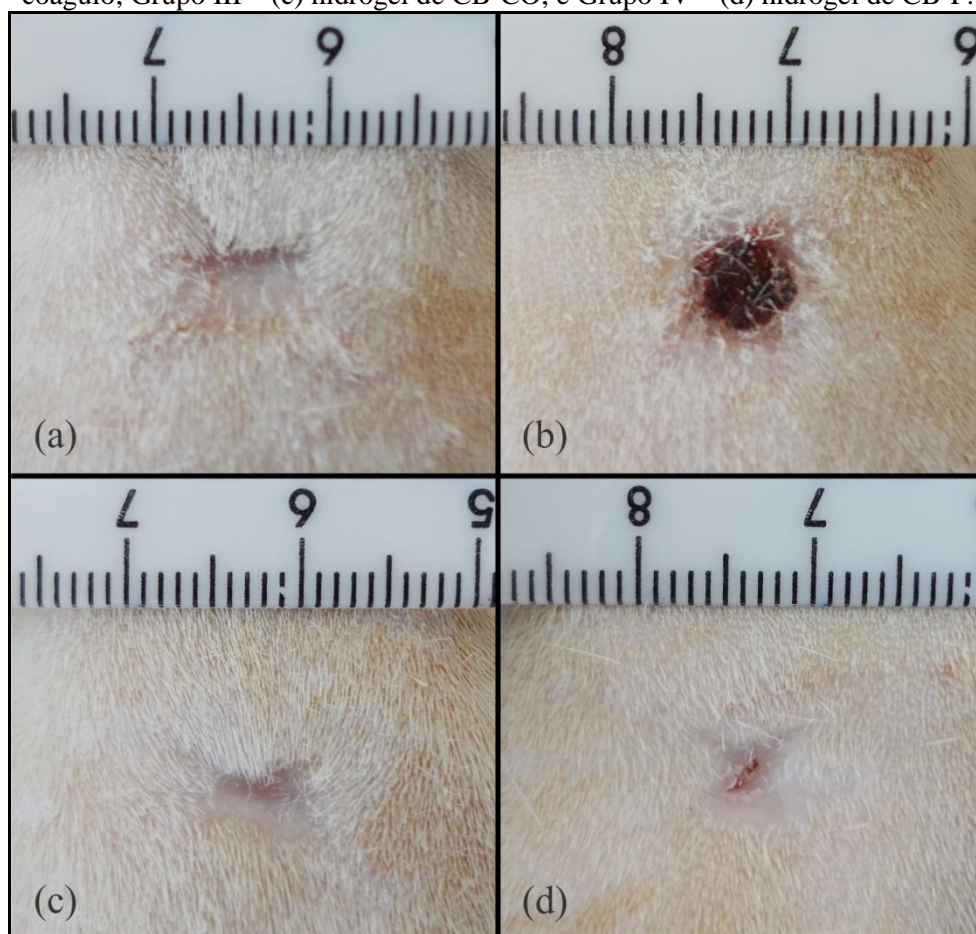


Fonte - Elaborada pela autora

A partir do décimo quinto dia de avaliação, ficou evidente que o processo cicatricial estava sendo finalizado para os grupos tratados, pois houve redução progressiva da área das lesões (Figura 17), mostrando a migração das margens das feridas no sentido centrípeto (reepitelização).

A epitelização é uma fase precoce do processo de cicatrização. Já nas primeiras 24 horas, após a lesão, começa a proliferação das células epiteliais nas margens da ferida, levando a um espessamento do epitélio marginal. Ao mesmo tempo, as células proliferadas migram sobre a derme, dirigidas pela rede de fibrina. Os anexos da pele perdem sua estrutura normal e contribuem para o progresso da epitelização, que se dá a partir das células epiteliais dos folículos pilosos, das glândulas sebáceas e de seus ductos. Vários fatores de crescimento epidérmico liberados dos macrófagos, como o TGF- β (fator β transformador do crescimento), EGF (fator de crescimento epidérmico), PDGF (fator de crescimento das plaquetas) e IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina 1), aceleram a epitelização (BEVILACQUA, 1981; SIMÕES, 1988).

Figura 17 - Décimo quinto dia: Grupo I – (a) hidrogel de CB-JC; Grupo II – (b) controle negativo com coágulo; Grupo III – (c) hidrogel de CB-CO; e Grupo IV – (d) hidrogel de CB-P.



Fonte - Elaborada pela autora

No trigésimo dia, as lesões tratadas estavam 100% cicatrizadas, com exceção do GII (Figura 18).

Devido aos resultados da reparação tecidual serem paramétricos, o teste Two-way ANOVA foi realizado mostrando uma diferença estatística entre os tratamentos ($p=0,0001$). O pós-teste Tukey foi utilizado para verificar qual tratamento foi melhor em cada período.

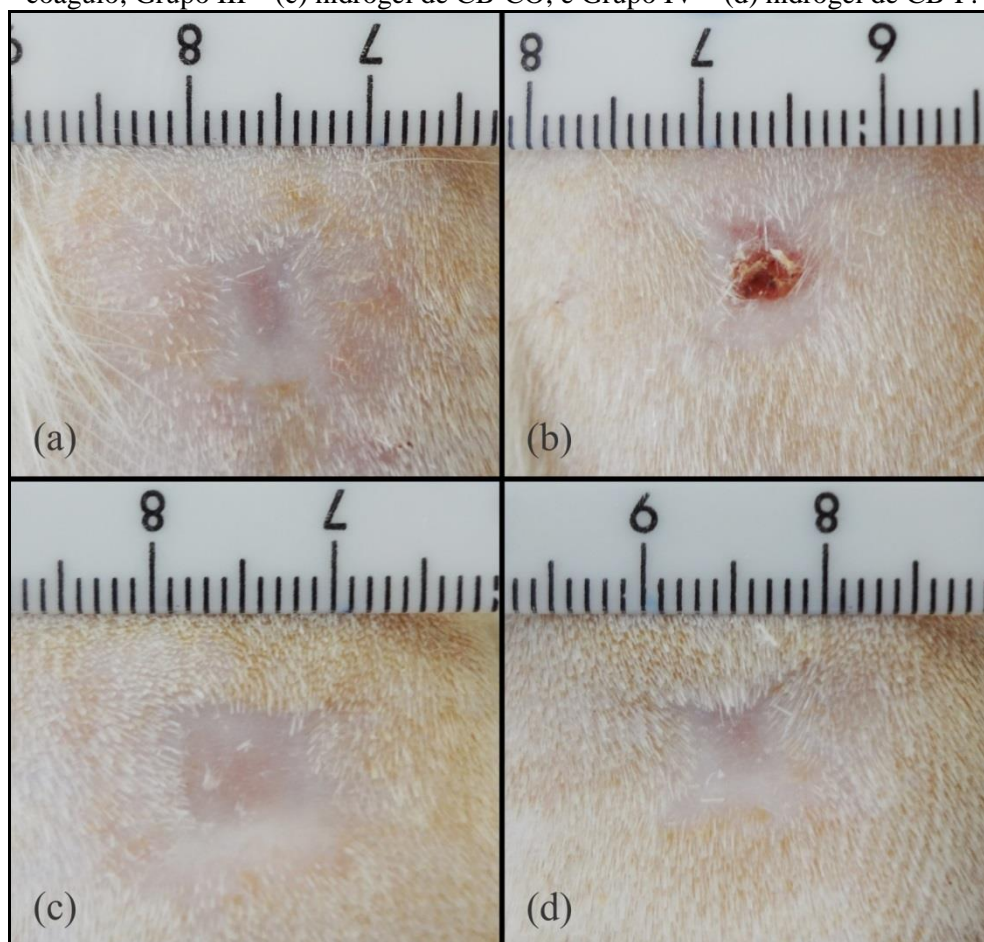
O tratamento com o Hidrogel de CB-CO promoveu uma diferença estatística para a reparação tecidual ($p<0,05$) nos períodos de três e setes dias (períodos críticos) comparado com as feridas preenchidas com coágulo (controle) e com o Hidrogel de CB-P.

Esses resultados sugerem que o Hidrogel de CB-CO foi uma boa cobertura para o reparo de feridas comparado ao dos outros grupos; Park et al. (2014) compararam curativos a base de CB com gaze de vaselina e Algisite® e observaram que as coberturas de CB proporcionaram a cicatrização das feridas mais rápida que os outros grupos comparados no período foi de 14 dias. No trabalho de Ahamed et al. (2014), um compósito de CB com

quitosana e nanopartículas de prata demonstrou o fechamento das feridas no período de 25 dias. Os efeitos tóxicos da prata na reepitelização e proliferação celular são preocupações importantes que devem ser levadas em consideração (BURD et al., 2007) e talvez isso justifique o fechamento tardio.

No período de 15 dias, com quase todas as lesões cicatrizadas, observou-se que o tratamento com o Hidrogel de CB-P apresentou uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação às feridas preenchidas com coágulo (grupo controle). Esse tratamento mostrou uma melhor reparação tecidual em relação aos outros tratamentos com as tinturas das plantas, porém não se obteve diferença estatística significativa.

Figura 18 - Trigesimo dia: Grupo I – (a) hidrogel de CB-JC; Grupo II – (b) controle negativo com coágulo; Grupo III – (c) hidrogel de CB-CO; e Grupo IV – (d) hidrogel de CB-P.



Fonte - Elaborada pela autora

Cada fase da cicatrização apresenta células ou substâncias características sem as quais o processo não evolui normalmente. Uma grande variedade de fatores pode influenciar em qualquer fase da cicatrização. Os principais fatores locais incluem sangramento, tensão de

oxigênio, bactérias, entre os fatores extrínsecos que são conhecidos como técnica cirúrgica, antissépticos tópicos e coberturas (WALDORF; FEWKES, 1995).

Os hidrogéis promovem condições fisiológicas adequadas para a cicatrização (KICKHÖFEN et al., 1986). Não são permeáveis às bactérias, deixando, entretanto, passar substâncias como água, proteínas e metabólitos. Os hidrogéis são atóxicos e não possuem propriedades irritantes, além de apresentarem propriedades mecânicas de retenção de água e difusão de proteínas. Têm sido indicados em feridas profundas, nas feridas contaminadas e com grande quantidade de exsudato purulento (ARAÚJO et al., 1994). A natureza delicada, flexível e emborrachada dos hidrogéis minimiza a irritação no tecido envolvente (ANDERSON; LANGONE, 1999).

5.5 Análise histológica

Os resultados da avaliação histológica dos quatro grupos e nos quatro períodos estão representados nas Figuras 19 a 22.

Para o grau de inflamação, o teste ANOVA foi realizado e mostrou diferença estatística ($p=0,037$) entre os tratamentos para o período de três dias (período crítico). O pós-teste t foi utilizado para verificar qual grupo apresentou melhor resultado e o tratamento com o hidrogel de celulose bacteriana com *Calendula officinalis* (CB-CO) apresentou um menor grau de inflamação ($p=0,030$) em relação ao tratamento com o hidrogel de Celulose Bacteriana Pura (CB-P).

Não houve sinal de resposta inflamatória aguda em nenhum dos grupos; o fato da cobertura de celulose não promover uma exacerbação e prolongamento do processo inflamatório deve-se às suas características físicas e de biocompatibilidade, como sua porosidade, textura da superfície, consistência e propriedade químicas, que promovem uma melhor reação tecidual não perpetuando o processo inflamatório (COHN et al., 2004; HART et al., 2002). Um dos aspectos importantes é a capacidade da cobertura em conter exsudato em seu interior, formando dessa maneira um hidrogel aderente que é efetivo para encapsular e imobilizar populações bacterianas potencialmente patogênicas, que promoveriam um processo infeccioso e consequente exacerbação e prolongamento da inflamação.

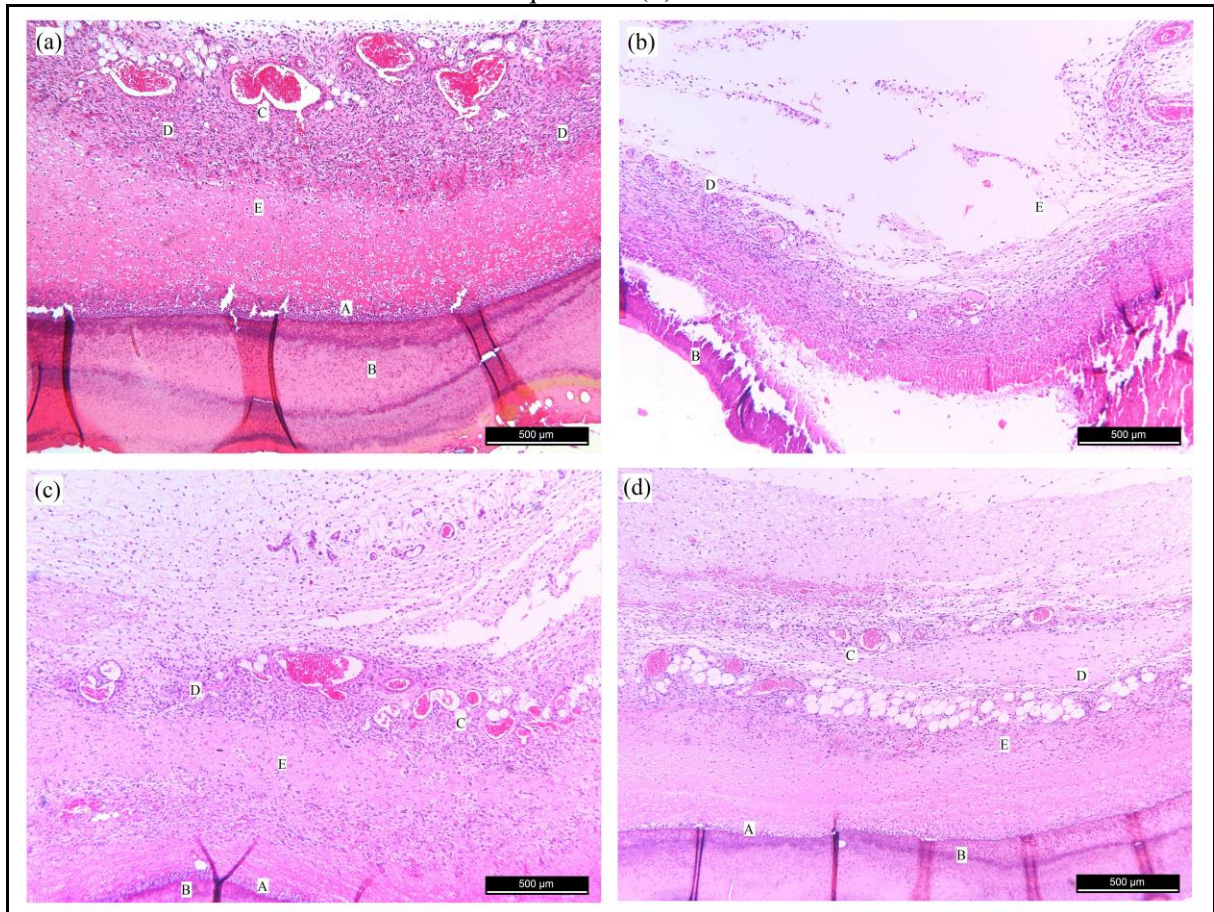
A fase inicial da cicatrização é chamada de inflamatória e é vital para o processo de reparação. O papel da fase inflamatória, incluindo a migração de neutrófilos para os tecidos, tem sido debatido na literatura, e a maioria dos pesquisadores é de opinião que neutrófilos têm um importante papel eliminando debris (fragmentos celulares), protegendo da infecção e liberando substâncias promotoras da cicatrização. O deslocamento de neutrófilos se inicia imediatamente após a lesão tecidual e têm vida curta, atingindo um pico de concentração em apenas 12 horas (CLARK, 1996; MASINI; CALAMO, 1986).

A reação inflamatória tem importância na cicatrização como demonstram diversos trabalhos, sendo nociva se for intensa, pois compromete a microcirculação e a proliferação de fibroblastos (TOGNINI et al., 2000). O grau de intensidade da resposta inflamatória pode ser de fundamental importância neste processo. Miller (1973) ressalta que certo grau de inflamação é necessário, contudo uma reação inflamatória intensa é prejudicial, pois pode prejudicar o adequado suprimento sanguíneo pelo comprometimento da microcirculação e ainda irá dificultar a proliferação celular (fibroblastos). A fase inflamatória é um pré-requisito necessário para a cura normal (KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993). Segundo Balakrishnan et al. (2005), isto pode ser iniciado por várias causas, uma das quais é a lesão.

Para o grau do padrão de reparação tecidual (qualidade, quantidade e orientação das fibras colágenas), o teste Kruskal-Wallis foi realizado e mostrou diferença estatística ($p=0,020$) entre os tratamentos para o período de sete dias. O pós-teste Dunn foi utilizado para verificar qual grupo foi melhor. O tratamento com o hidrogel de Celulose Bacteriana com *Calendula officinalis* (CB-CO) apresentou um melhor resultado em relação aos tratamentos com o hidrogel de Celulose Bacteriana Pura (CB-P) ($p=0,0090$) e com o hidrogel de Celulose Bacteriana com *Jacaranda caroba* (CB-JC) ($p=0,014$).

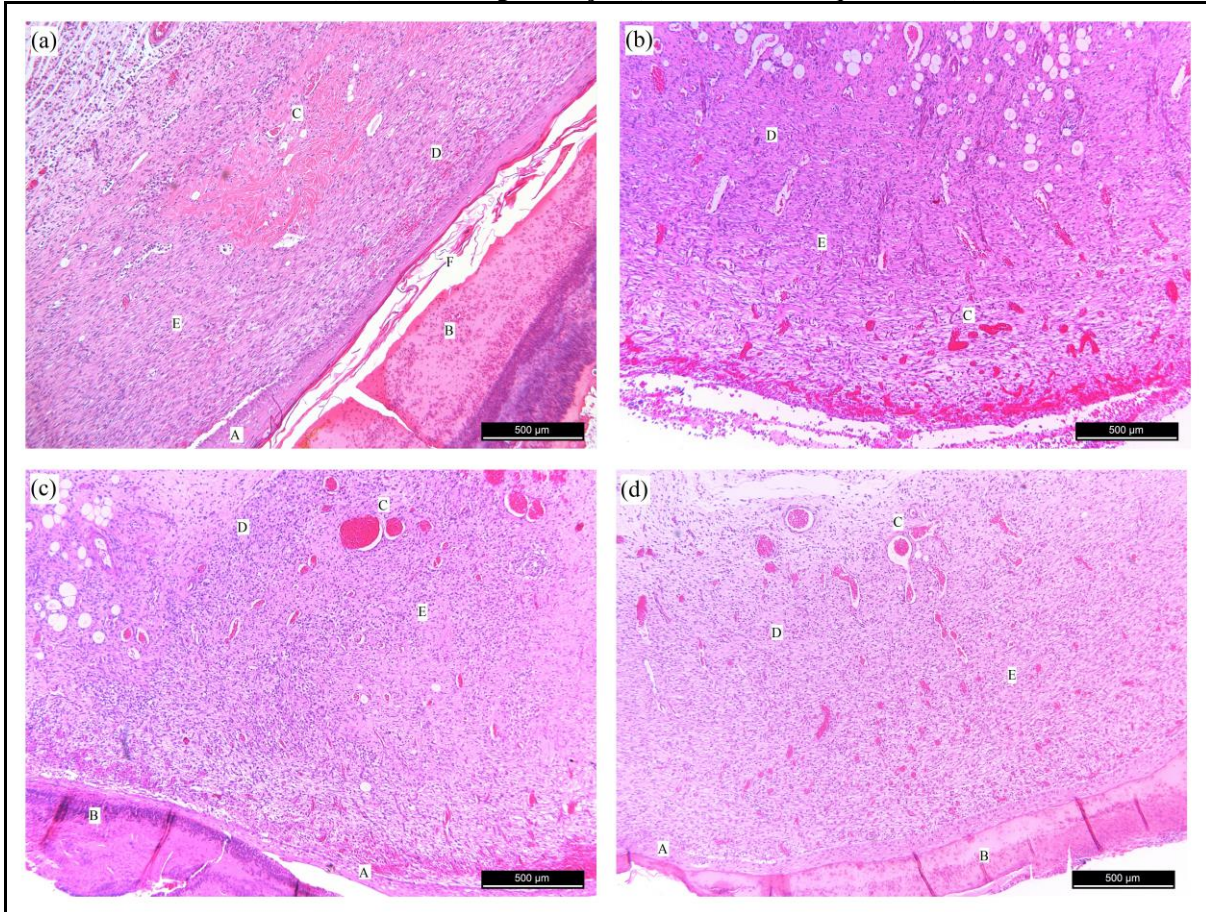
Para o grau do padrão de reparação tecidual (reconstituição do epitélio), o teste Kruskal-Wallis foi realizado e não mostrou diferença estatística significativa entre os tratamentos, em todos os períodos.

Figura 19 - Período de 3 dias; (a) – GI mostra neovascularização em formação e completa, crosta, tecido de granulação organizado, reação inflamatória moderada e epitélio em processo de cicatrização; (b) – GII mostra início da neovascularização, crosta, tecido de granulação desorganizado, reação inflamatória moderada e sem epitélio; (c) – GIII mostra neovascularização em formação e completa, tecido de granulação em organização, reação inflamatória média e epitélio em processo de cicatrização; (d) – GIV mostra neovascularização em formação e completa, crosta, tecido de granulação em organização, reação inflamatória média e epitélio em processo de cicatrização. Epitélio (A), crosta (B), neovascularização (C), infiltrado inflamatório (D), tecido de granulação (E) e camada de queratina (F). HE.



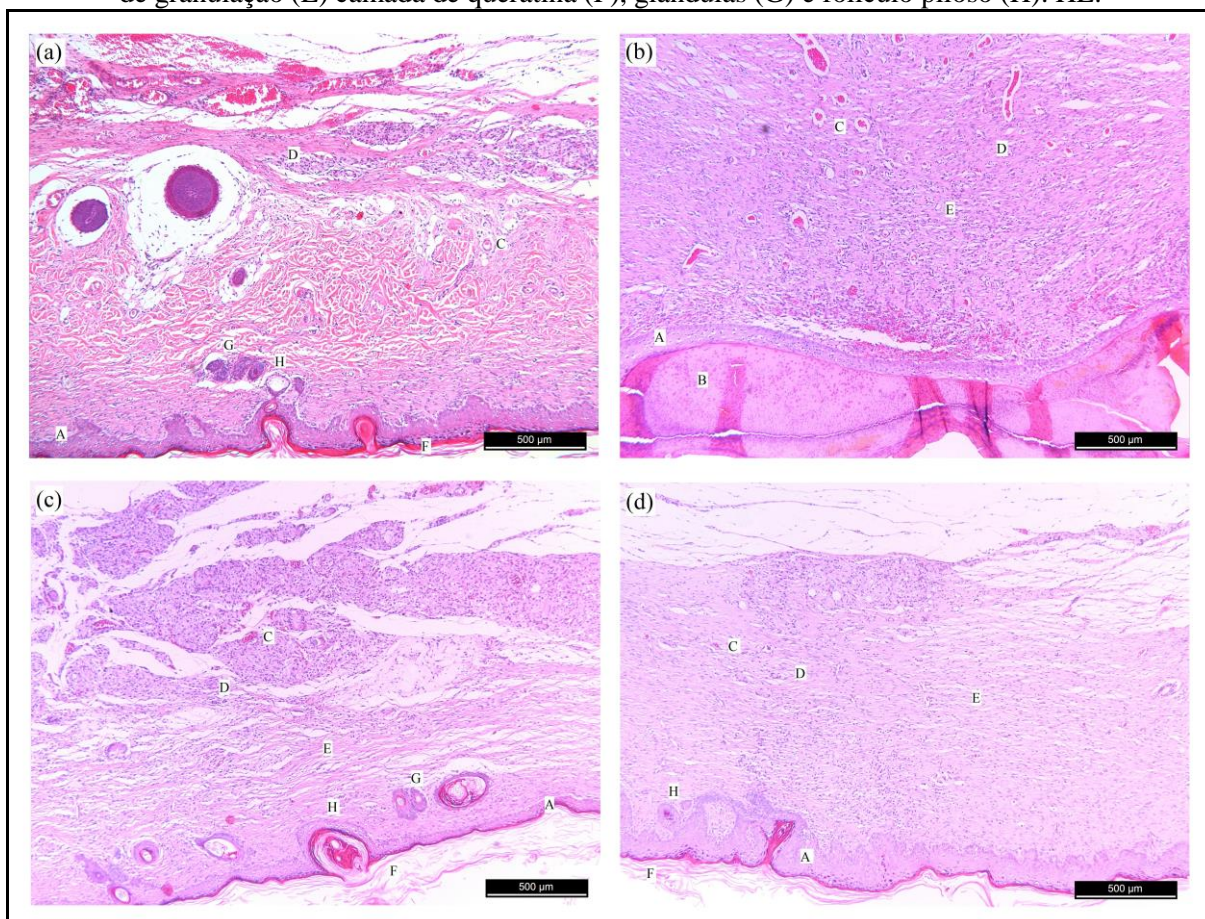
Fonte - Elaborada pela autora

Figura 20 - Período de 7 dias; (a) – GI mostra neovascularização em formação e completa, crosta, tecido de granulação organizado, reação inflamatória moderada, epitélio completo e camada de queratina; (b) – GII mostra neovascularização em formação e completa, tecido de granulação organizado, reação inflamatória moderada e sem epitélio; (c) – GIII e GIV mostram neovascularização em formação e completa, crosta, tecido de granulação organizado, reação inflamatória moderada e epitélio em processo de cicatrização. Epitélio (A), crosta (B), neovascularização (C), infiltrado inflamatório (D), tecido de granulação (E) e camada de queratina (F). HE.



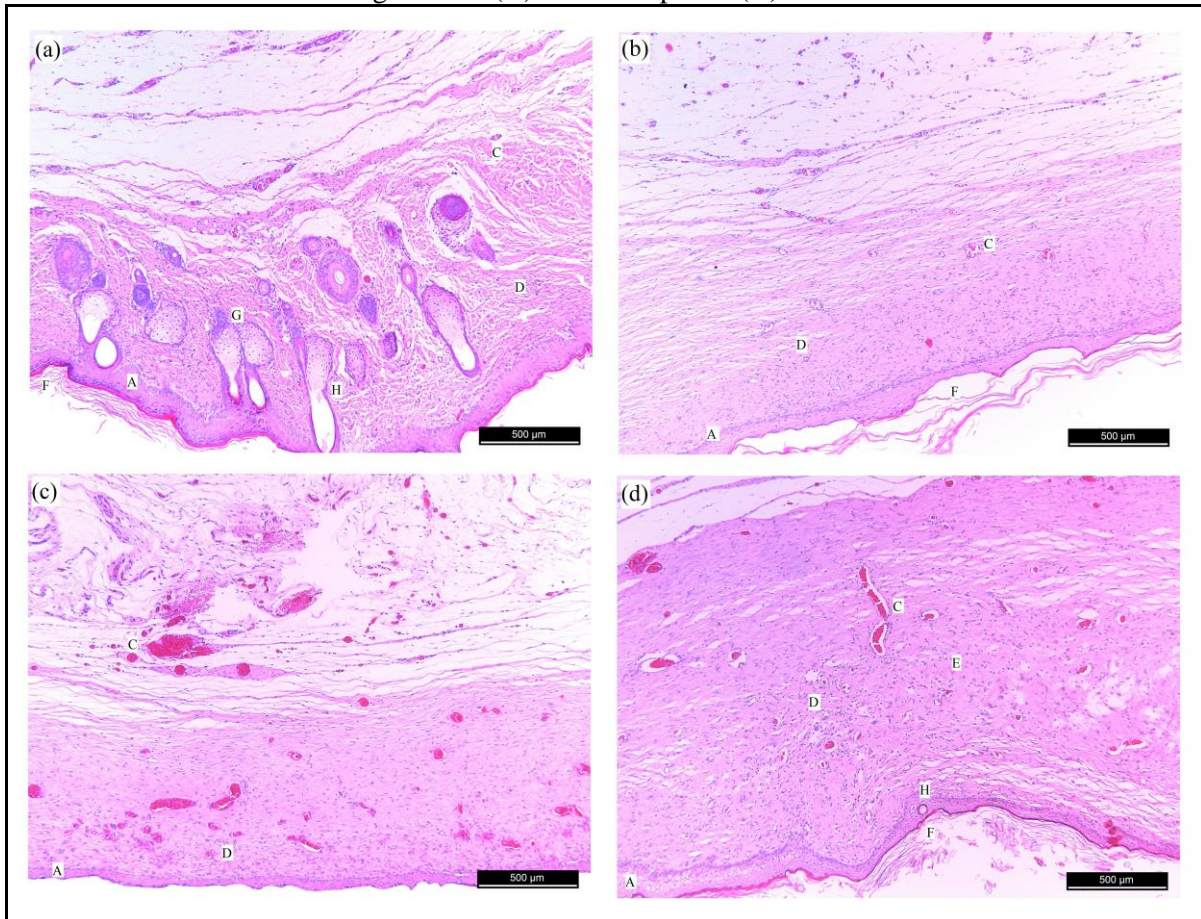
Fonte - Elaborada pela autora

Figura 21 - Período de 15 dias; (a) – GI mostra neovascularização em formação e completa, crosta, tecido de granulação organizado, reação inflamatória média, epitélio completo, camada de queratina, derme reparada, presença de glândulas e folículo piloso; (b) – GII mostra neovascularização em formação e completa, tecido de granulação organizado, crosta, reação inflamatória moderada e epitélio completo; (c) – GIII mostra neovascularização em formação e completa, tecido de granulação organizado, reação inflamatória moderada, epitélio completo, camada de queratina, presença de glândulas e folículo piloso; (d) – GIV mostra neovascularização em formação e completa, tecido de granulação organizado, reação inflamatória média, epitélio completo, camada de queratina e presença de folículo piloso. Epitélio (A), crosta (B), neovascularização (C), infiltrado inflamatório (D), tecido de granulação (E) camada de queratina (F), glândulas (G) e folículo piloso (H). HE.



Fonte - Elaborada pela autora

Figura 22 - Período de 30 dias; (a) – GI mostra neovascularização em formação e completa, crosta, tecido de granulação organizado, reação inflamatória leve, epitélio completo, camada de queratina, presença de glândulas e folículo piloso; (b) e (d) – GII e GIV mostram neovascularização em formação e completa, tecido de granulação organizado, reação inflamatória média, epitélio completo e camada de queratina; (c) – GIII mostra neovascularização em formação e completa, tecido de granulação organizado, reação inflamatória leve e epitélio completo. Epitélio (A), crosta (B), neovascularização (C), infiltrado inflamatório (D), tecido de granulação (E) camada de queratina (F), glândulas (G) e folículo piloso (H). HE.



Fonte - Elaborada pela autora

5.5.1 Espessura da membrana fibrosa purulenta

Para a análise da espessura da membrana fibrosa purulenta, o teste Kruskal-Wallis foi realizado e mostrou diferença estatística entre os grupos para os períodos de três ($p=0,037$) e sete dias ($p=0,041$) (períodos críticos). O pós-teste Dunn foi utilizado nos dois períodos para verificar quais grupos apresentaram menor espessura dessa membrana.

No período de três dias, o grupo controle apresentou uma menor espessura da membrana, no ponto do meio da ferida, em relação aos tratamentos com o hidrogel de CB-JC ($p=0,006$) e com o hidrogel de CB-P ($p=0,025$).

No período de sete dias, o tratamento com o hidrogel de CB-P apresentou uma menor espessura da membrana, no ponto do início da ferida, em relação ao grupo controle ($p=0,0093$).

Os resultados demonstraram que a membrana fibrosa purulenta serviu somente como proteção para os grupos.

5.6 Imuno-histoquímica

A proliferação celular no tecido epitelial foi identificada pela imuno-histoquímica para Ki-67. Este anticorpo se liga a uma proteína nuclear detectada apenas na fase ativa da divisão celular (GERDES et al., 1983).

No que diz respeito aos miofibroblastos, Grinnell (1994) através de análise de marcadores do citoesqueleto, e Darby, Skalli e Gabbiani (1990) com imunofluorescência marcada com anticorpos afirmaram que estas células são provenientes dos fibroblastos que migraram para ferida. Os miofibroblastos são ricos em actina e miosina, proteínas responsáveis pela contração muscular (CHILDS; MURTHY, 2017). A produção de actinmiosina nos miofibroblastos, que induzem o mecanismo de contração das feridas e também contribui para a progressão de células através da ferida em cicatrização (RAJA; GARCIA; ISSEROF, 2007).

Grinnell (1994) e Masur et al. (1996) referiram que o fator de crescimento, TGF- β age como promotor da diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos. O TGF- β além da ação sobre a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos atua sobre os queratinócitos, a deposição da matriz, a proliferação de fibroblastos e a angiogênese (AMADEU et al., 2003; MANDELBAUN; DI SANTIS; MANDELBAUN, 2003).

No atual estudo houve uma alta quantidade de miofibroblastos nas feridas dos animais dos grupos tratados nos períodos de 3, 7 e 15 dias, tanto para a CB quanto as tinturas dos extratos de CO e JC, que não apresentaram uma ação deletéria sobre o TGF- β . Este mesmo fator age sobre os queratinócitos responsáveis pela epitelização, e nesta pesquisa os hidrogéis apresentaram um efeito benéfico no que se refere à epitelização inicial avaliada desde o 3º

dia, sugerindo que estes tratamentos não interferem na ação deste fator de crescimento (TRINDADE et al., 2010).

Darby, Skalli e Gabbiani (1990) demonstraram que os miofibroblastos só apareceram no 6° dia de avaliação das feridas, e estavam positivamente presentes nas feridas do 12° ao 15° dia. Do 15° ao 20° dia houve declínio intenso da presença dos miofibroblastos, e no 30° dia já não havia nenhuma destas células nas feridas. Estes autores enfatizaram que a primeira fase de contração da ferida é independente dos miofibroblastos.

Berry et al. (1998) referiram que houve contração efetiva de grandes feridas na ausência de alta densidade de miofibroblastos. Sugeriram que a unidade contrátil possa estar relacionada com a organização que os fibroblastos realizam entre às fibras colágenas delgadas junto às fibras colágenas espessas, e a compactação do tecido conjuntivo dentro do tecido de granulação, retraindo a derme e o tecido adiposo ao redor da ferida.

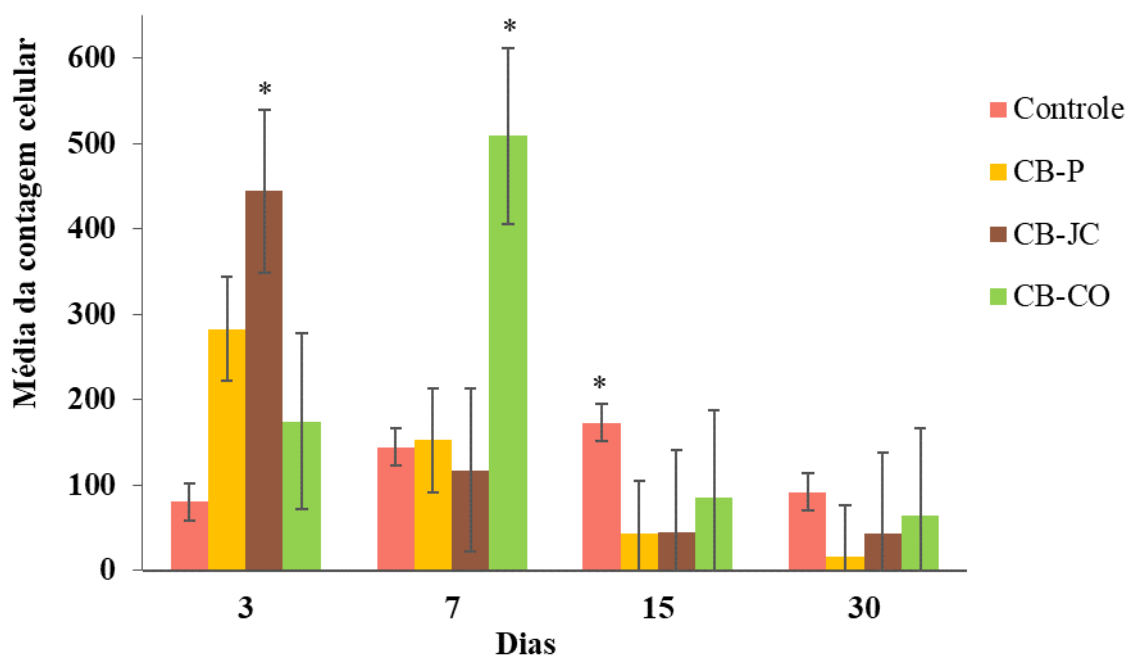
Autores referem que a tensão mecânica existente na matriz extracelular na ferida seria a responsável pela manutenção da presença dos miofibroblastos (HINS; GABBIANI, 2003; HINS et al., 2001).

Neste trabalho houve correlação entre a presença efetiva dos miofibroblastos na lesão e a contração macroscópica da ferida, pois houve diferença estatística significativa dos miofibroblastos ($p < 0,05$) somente na borda, nos períodos de 3, 7 e 15 dias a favor dos grupos tratados. O período de 30 dias não apresentou diferença estatística significativa.

Observou-se uma baixa presença de miofibroblastos nas feridas do grupo controle, principalmente nos períodos críticos (3° e 7° dias), compatível com os achados descritos por Darby, Skalli e Gabbiani (1990). Como é demonstrado na Figura 23, no período de 3 dias, o tratamento com o hidrogel de CB-JC demonstrou uma diferença estatística significativa para a presença dos miofibroblastos ($p = 0,004$) comparado com os grupos controle e do hidrogel de CB-CO. A grande quantidade de miofibroblastos que o grupo de CB-JC apresentou nesse período proporcionou uma re-epitelização mais rápida para o período de 7 dias, como é verificado nas Figuras 15 e 20. Para o período de 7 dias, o tratamento com o hidrogel de CB-CO demonstrou uma diferença estatística significativa para a presença dos miofibroblastos comparado com os outros grupos testados (controle – $p = 0,015$, hidrogel de CB-P – $p = 0,018$ e hidrogel de CB-JC – $p = 0,009$). Para o período de 30 dias, o grupo controle demonstrou uma diferença estatística significativa para a presença dos miofibroblastos comparado com os grupos do hidrogel de CB-P ($p = 0,012$) e do hidrogel de CB-JC ($p = 0,013$). Esse aumento da presença das células do grupo controle foi tardio comparado com os grupos tratados que já

estavam diminuindo a presença dessas células nesse período e apresentaram uma reparação tecidual mais rápida.

Figura 23 – Média do número de miofibroblastos presentes na borda das feridas dos grupos Controle, CB-P, CB-JC e CB-CO para cada período avaliado (3, 7, 15 e 30 dias). As barras em cores representam as médias e as barras em preto representam o Erro Padrão das Médias.



Fonte - Elaborada pela autora

Moulin et al. (2000) investigaram a influência dos miofibroblastos na diferenciação e crescimento dos queratinócitos usando um modelo de pele humana *in vitro*. Demonstraram que a presença dos miofibroblastos e/ou ausência de fibroblastos retardaram a re-epitelização, porém quando os fibroblastos estavam presentes a epitelização completa ocorreu no período de 7 a 10 dias, como também foi verificado neste trabalho.

Possivelmente a CB e as tinturas apresentaram ação direta sobre os fibroblastos, favorecendo a expressão inicial da α -SMA, estimulando o crescimento dos queratinócitos e favorecendo a re-epitelização completa, que ocorreu no grupo do hidrogel de CB-JC no 7º dia (Figuras 15 e 20). O grupo controle provavelmente retardou o fenômeno apoptótico dos fibroblastos que ocorre ao redor do 20º dia. Este fenômeno apoptótico foi observado por Darby, Skalli e Gabbiani (1990), no período entre o 20º e o 25º dia; esta hipótese justificaria os eventos ocorridos no 15º dia deste trabalho, quando as feridas dos grupos tratados apresentaram menor quantidade de miofibroblastos em relação aos do grupo controle.

Os hidrogéis de CB pura e de CB com as tinturas de CO e JC (7%), aplicados uma vez ao dia de forma tópica nas feridas de ratos, facilitou a epitelização periférica precoce, não interferiu na contração da ferida e não retardou o aparecimento dos miofibroblastos.

6. CONCLUSÃO

Os hidrogéis de celulose bacteriana pura (CB-P), de celulose bacteriana com *Calendula officinalis* (CB-CO) e de celulose bacteriana com *Jacaranda caroba* (CB-JC) foram desenvolvidos com uma técnica prática e rápida

A caracterização química confirmou a incorporação das tinturas às matrizes de CB por análises de espectroscopia (FT-IR), não alterando a sua estrutura.

A análise do MEV demonstrou a presença de poros interconectados nos hidrogéis, mesmo após a adição das tinturas à CB. Os hidrogéis de CB-P e CB-JC apresentaram poros aparentemente maiores, favorecendo a passagem de células para uma reepitelização mais rápida.

A análise TG indicou que os hidrogéis com as tinturas das plantas incorporadas apresentaram propriedades térmicas melhores do que o hidrogel de CB-P.

Os hidrogéis de CB com as tinturas (10%) não apresentaram toxicidade para a proliferação celular, confirmando que a concentração das tinturas utilizada foi favorável.

O hidrogel de CB-JC apresentou uma re-epitelização mais rápida (no período de 7 dias) comparado com os outros grupos tratados que mostraram essa característica no período mais tardio (15 dias).

Os hidrogéis apresentaram uma grande quantidade de miofibroblastos no período de 3 dias, principalmente o de CB-JC que proporcionou uma re-epitelização completa em algumas feridas no período de 7 dias.

Os hidrogéis são de fácil aplicação, fixação, mantêm o local úmido e não danificam o tecido de granulação.

O hidrogel de CB-CO manteve a característica semitransparente da CB após a adição da sua tintura.

Os biomateriais a base de CB com as tinturas de *C. officinalis* e *J. caroba* se apresentaram biocompatíveis.

Desta forma, pode-se concluir que os hidrogéis de CB com as tinturas de *C. officinalis* e *J. caroba* são biomateriais promissores para a regeneração tecidual de feridas complexas, principalmente nos períodos iniciais (período crônico) de cicatrização, devido aos seus resultados favoráveis em relação aos grupos controles (positivo e negativo).

REFERÊNCIAS

- ACOSTA DE LA LUZ, L.; RODRÍGUEZ FERRADÁ, C.; SÁNCHEZ GOVÍN, E. Instrutivo técnico de *Calendula officinalis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.6, n.1, p.23-27, ene./abr. 2001.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation. 467p., 1995.
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.114-140, Jan/Mar 2007.
- AGRA, M.F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.472-508, Jul/Set 2008.
- AHAMED, M.I. et al. Evaluation of biomaterial containing regenerated cellulose and chitosan incorporated with silver nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.72, p.680–686, Set 2015.
- AKIHISA, T. et al. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their antiinflammatory effects. **Phytochemistry**, v.43, n.6, p.1255–1260, Dez 1996.
- ALAMARBLUE® TECHNICAL DATASHEET. AbD Serotec. Endeavor House, Langford Lane, Kidlington, Oxford, UK. Corpright MorphoSys UK Ltd. 2009
- ALBERTS, B. et al. **Essential cell biology**. Garland Science: New York, 864p., 2013.
- ALLEN Jr., L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2007.
- ALVES, M.S.M. **Caracterização farmacognóstica, química, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica* (Humb. e Bonpl.) B. Verlt**. 2008. 116p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.
- AMADEU, T.P. et al. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. **International Journal of Lower Extremity Wounds**, v.2, n.2, p.60-8, 2003.
- AMORIM, M.L.L. **Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng.) R.M. King e H. Rob (ASTERACEAE)**. 2012. 101p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina – MG, 2012.
- ANNABI, N. et al. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v.16, p.371–383, 2010. Doi: 10.1089/ten.TEB.

- ANDERSON, J.M.; LANGONE, J.J. Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems. **Journal of Controlled Release**, v.57, n.2, p.107-113, 1999.
- ANDRADE, J. et al. Análise térmica aplicada ao estudo de materiais energéticos. **Química Nova**, v.30, n.4, p.952-956, 2007.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, V.G.; ALLEN Jr., L.V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6ª ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.
- ARAGÃO, C.F.S. et al. Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) Menispermaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, supl., p.60-61, 2002.
- ARAÚJO, C.F.R. et al. Efeitos do Agarol e do Trigliceril sobre a cicatrização de pele: estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**: São Paulo, v.13, n.4, 12 p., 1994.
- ARAÚJO, A.A.S. et al. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p.270-277, 2006.
- ARAÚJO, C.B.O. et al. Uso de adubação orgânica e cobertura morta na cultura da Calêndula. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.2, p.117-23, 2009.
- ARNOLD JR., H.L.; ODOM, R.B.; JAMES, W.D. A Pele: estrutura básica e função. In: _____. **Doenças básicas da pele de Andrews: dermatologia clínica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1994. p.1-14.
- AUTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ªed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.
- BACCHI, E.M.; RIOS, J.P.C.; DIAS, T.G. **Fraction responsible for *Jacaranda caroba* DC. Antiulcer action**. In: IUPAC International Conference on Biodiversity, 2, Anais: Belo Horizonte – MG, v.2, 173p., 1999.
- BALAKRISHNAN, B. et al. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. **Biomaterials**, v.26, n.32, p.6335–6342, Nov 2005.
- BALDUCCI-ROSLINDO, E.; SILVÉRIO, K.G.; MALAGOLI, D.M. Processo de reparo em feridas de extração dentária em camundongos tratados com o complexo *Symphitum officinale* e *Calendula officinalis*. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.13, n.2, p.181-187, 1999.
- BARNES, J.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. **Herbal Medicines**. 3rded. London, UK: Pharmaceutical Press. 720 p., 2007.
- BARTLETT, R.H. Skin substitutes. **Journal of Trauma**, Baltimore, v.21, 731 p., 1981.

BARUD, H.S.; BARRIOS, C.E.; MARQUES, R.F.C. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes, materials science e engineering. **Biomimetic Materials, Sensor and Systems**, v.1, p.1-2, 2007.

BARUD, H.S. et al. Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes. **Journal of Nanomaterials**, n.10, 2011.

BENDO, L; CHRISTOFOLETTI, G.B. Prática: microscopia óptica, microscopia eletrônica e EDX. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, 30 p., 2007.

BENTO, C.S.O. **Composição química atividades antioxidante e alelopática da caroba do campo (*Jacaranda caroba* (Vell.) A. DC. – Bignoniaceae)**. 2013. 126p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – Diamantina - MG, 2013.

BENZIMAN, M. et al. Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.77, n.11, p.6678-6682, 1980.

BERRY, D.P. et al. Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts, and myofibroblasts. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.102, n.1, p.124-31, 1998.

BEVILACQUA, R.G. Cicatrização. In: BEVILACQUA, G.S. **Bases da cirurgia**. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1981. p.99-118.

_____. **Cicatrização: manual do residente de cirurgia**. 2.ed. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1984.

BEZÁKOVA, L. et al. Inhibitory activity of isorhamnetin glycosides from *Calendula officinalis* L. on the activity of lipoxygenase. **Pharmazie**, v.51, n.2, p.126-7, 1996.

BISSET, N.G. **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basis Medpharm**. Scientific Publishers, Stuttgart and CRC Press, Boca Raton, USA, 1994.

BLANES, L. Tratamento de feridas. SILVA, J.C.C.B. (Ed.). **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://bapbaptista.com.br/feridasLeila.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

BLATT, C.T.T.; DOS SANTOS, M.D.; SALATINO, A. Flavonoids of bignoneaceae from the “cerrado” and their possible taxonomic significance. **Plant Systematics and Evolution**, v.210, p.289-292, 1998.

BOGDANOVA, N.S. et al. Study of antiviral properties of *Calendula officinalis*. **Farmakol Toksikol (Moscow)**, v.33, n.3, p.349, May/June 1970.

BORGES, P.A.L.; BAUER, L. Isolation of ethyl-1-hidroxy-4-oxo-2,5-cyclohexadiene-1-acetate from *Jacaranda puberula* Cham. **Tribuna Farmacêutica**, v.1/2, p.49-50, 1982.

BORGES, E.L. **Feridas: úlceras dos membros inferiores**. 1ªed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda. v.1, 203p., 2012.

BRAGA, F.C. et al. Estudo fitoquímico de *Erythraea centaurium*, *Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum* visando identificar marcadores químicos para o fitoterápico Ierobina®. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, supl.2, p.28-31, 2003.

BRANDÃO, M.G.L. et al. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.408-420, 2006.

_____. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.127-134, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada – RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

_____. Decreto n.º 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 jun. 2006.

_____. **Monografia da espécie *Calendula officinalis* L. (Calêndula)**. Brasília, 2014.

BRAZ FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. **Química Nova**, v.17, n.5, p.405-445, 1994.

BROWN, A.J. On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v.49, p.432-439, 1886.

BRUNETON, J. **Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales**. 2ªed. 1099 p. Editorial ACRIBIA, S. A. Zaragoza, Espanha, 2001.

BURD, A. et al. A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. **Wound Repair Regeneration**, v.15, n.1, p.94-104, 2007.

CALIXTO, J.B. Biopirataria. **Ciência Hoje**, v.31, n.28, p.36-43, 2000.

CANDIDO, L.C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo: SENAC; 2001.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: _____ **Farmacognosia da planta ao medicamento**/organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões. [et al.]. – 4 Ed. – Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC. Cap.20, p.443-459, 2002.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmedd, p.257-265, 2004.

CARVALHO, A.C.B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.314-319, 2008.

CAVALCANTI, L. S. et al. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S. et al. (eds.). **Indução de resistência em plantas à patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.81-124. 2005.

CESAR, A.T. et al. *Jacaranda caroba*, medicamento de mure. **Cultura homeopática**, v.6, p.6-7, 2004.

CHAGAS JR., J.M.; CARVALHO, D.A.; MANSANARES, M.E. A família de Bignoniaceae juss. (IPÊS) no município de Lavras, Minas Gerais. **Cerne**, v.16, n.4, p.517-529, 2010.

CHAKRABORTHY, G.S.; ARORA, R.; MAJEE, C. Antidiabetic and antihyperlipidaemic effects of hydroalcoholic extract of *Calendula officinalis*. **International research journal of pharmacy**, v.2, n.1, p.61–65, 2011.

CHARLET, E. **Cosmética para Farmacêuticos**. Royo, Editorial Acribia, 1996, p.5-12, 1996.

CHEN, J. et al. Preparation and photochromic behavior of crosslinked polymer thin films containing polyoxometalates. **Thin Solid Films**, v.516, p.2864-2868, 2008.

CHILDS, D.R.; MURTHY, A.S. Overview of Wound Healing and Management. **Surgical Clinics of North America**, v.97, n.1, p.189-207, 2017.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p.66, 2000.

CITADINI-ZANETTE, V.; NEGRELLE, R.R.B.; BORBA, E. Tschoseck. *Calendula officinalis* L. (ASTERACEAE): aspectos botânicos, ecológicos e usos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.13, n.1, p.6-23, 2012.

CLARK, R.A.F. **The molecular and cellular biology of wound repaired**. New York: Plenum Press, 611p. 1996.

COHEN, K.; MAST, B.A. Models of wound healing. **Journal of Trauma**, v.30, n.12, p.149-155, 1990.

COHN, S.M. et al. Open surgical wounds: how does Aquacel compare with wet-to-dry gauze? **Journal of Wound Care**, v.13, n.1, p.10-12, 2004.

CONTRERA, A. et al. Ação da tintura-mãe de *Lichnophora ericoides*, *Aristolochia esperanzae* e *Solidago microglossa*, em feridas cutâneas de ratos. **Revista da Escola de Farmácia de Odontologia**, v.11, p.157-60, 1985.

COPP, B.R. Antimycobacterial natural products. **Natural Products Report**, v.20, n.6, p.535-57, 2003.

CORRÊA, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994.

CORRÊA, N.M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.74-78, 2005.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 3^aed. v.2, p.194-225, 1987.

COSTA, H.O.; SOUZA, F.C. Avaliação da regeneração tecidual da pele de porco submetida a lesão térmica seguida de colocação de Biotissue®. **Acta ORL - Técnicas em Otorrinolaringologia**, v.23, n.3, p.23-27, 2005.

COTRAN, R.S.; MAYADAS-NORTON, T. Endothelial adhesion molecules in health and disease. **Pathologie-biologie**, v.46, p.164-70, 1998.

CROCE, M.A. et al. Adhesion and proliferation of human dermal fibroblasts on collagen matrix. **Journal of Biomaterials Applications**, v.18, n.3, p.209-222, 2004.

CROSS, S. E. et al. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. **British Journal of Plastic Surgery**, v.48, n.4, p.189-197, 1995.

CUNHA, N.A. **Sistematização da assistência de enfermagem no tratamento de feridas crônicas**. 2006. Monografia - Fundação de Ensino Superior de Olinda, Olinda – PE, 2006.

CUNHA, S.L.C. et al. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.62, n.9-10, p.668-972, 2007.

CZAJA, W. et al. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v.27, n.7, p.145-151, 2006.

CZAJA, W.K.; YOUNG, D.J.; KAWECKI, M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v.8, n.1, p.1-12, 2007.

CZEKANSKA, E.M. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. **Methods in molecular biology**, v.740, p.27-32, 2011.

DANIELSKI, L. et al. Marigold (*Calendula officinalis* L.) oleoresin: Solubility in SC-CO₂ and composition profile. **Chemical Engineering and Processing**, v.46, n.2, p.99-106, 2007.

DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. Alpha-Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Laboratory Investigation**, v.63, n.1, p.21-9, 1990.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras**. 3^aed. São Paulo: Atheneu; 2008.

DELLA LOGGIA, R. et al. The role of triperpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**, v.60, p.516-520, 1994.

DER MARDEROSIAN, A.; LIBERTI, L. **Natural Product Medicine: A Scientific Guide to Foods, Drugs, Cosmetics**. Philadelphia: George F. Stickley Co., 1988.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais verdades e mentiras: O que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber**. São Paulo: UNESP, 133p., 2007.

DRISCOLL, P. Incidence and prevalence of wounds by etiology. *MedMarket Diligence* S249, 2009.

DUMENIL, G.; CHEMLI, R.; BALAUSARD, G. Evaluation of antibacterial properties of *Calendula officinalis* flowers and mother homeopathic tinctures of *Calendula officinalis*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, v.38, p.493–499, 1980.

DURAN, V. et al. Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. *International Journal of Tissue Reactions*, v.27, n.3, p.101-6, 2005.

DZUBAK, P. et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Products Report*, v.23, p.394-411, 2006.

EL FRAY, M. et al. Morphology assessment of chemically modified cryostructured poly (vinyl alcohol) hydrogel. *European Polymer Journal*, v.43, p.2035-2040, 2007.

EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J.M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, v.127, n.3, p.514-525, 2007.

ERCETIN, T. et al. Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, v.36, p.203–208, 2012.

EURIDES, D. et al. Aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii*). *Veterinária Notícias*, v.4, n.1, p.77-82, 1998.

FALCÃO, S.C. et al. Processo modificado de reprodução e amplificação de imagem para mensuração de área por planimetria: aplicação em feridas planas produzidas em cães, tratadas por curativos oclusivos de pele de rã. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v.38, n.4, pp.165-169, 2001.

FARAH, L.F.X. Process for the preparation of cellulose film, cellulose film produced thereby artificial skin graft and its use. **BIO FILL PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS (BRASIL)**. US 4912049, 30 Sept. 1990, 10 June 1986.

FARINA, C.; PINZA, M.; PIFFERI, G. Synthesis and anti-ulcer activity of new derivatives of glycyrrhetic, oleanolic and ursolic acids. *Il Farmaco*, v.53, p.22-32, 1998.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. *Calendula officinalis* L. 5^aed. Volume 2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Fundação Oswaldo Cruz/Editora, 2010.

FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; OGURA, M. Phytoquinoid named jacaranon. *Ger Offen*, v.12, p.123, 1977.

FAY, D.L.; SCHELLHASE, K.G.; WUJEK, D. Naturopathic ear drops minimally effective for acute otitis media. *Journal of family practice*, v.52, n.9, p.673-676, 2003.

- FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.3, p.369-392, 2006.
- FERREIRA, L.A.; LEITE, J.P.V. Desenvolvimento de formulações fitoterápicas. In: LEITE, J.P.V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu, p.206-251, 2008.
- FERRERES, F. et al. Ellagic Acid and Derivatives from *Cochlospermum angolensis* Welw. Extracts: HPLC–DAD–ESI/MSⁿ Profiling, Quantification and *In Vitro* Anti-depressant, Anti-cholinesterase and Anti-oxidant Activities. **Phytochemical Analysis**, v.24, n.6, p.534–540, 2013.
- FERRY, J.D. **Viscoelastic properties of polymers**. New York, p.486-544, 1980.
- FLOR, J.B.S. **Levantamento bibliográfico de *Calendula officinalis* (Asteraceae): espécie de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS)**. 2010. 31p. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados – MS, 2010.
- FONTANA, J.D. et al. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.24-25, p.253-264, 1990.
- FONTANAY, S. et al. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: antibacterial spectra and selectivity indexes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, n.2, p.272-276, 2008.
- FORD, C.N. **Laryngoscope**, v.94, p.513-18, 1984.
- FRONZA, M. et al. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.126, n.3, p.463-7, 2009.
- FUCHS, J. Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR- α -tocopherol, L-scorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radical Biol Med**, v.25, p.848-873, 1998.
- GACHET, M.S.; SCHÜHLY, W. Jacaranda – A ethnopharmacological and phytochemical review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.121, p.14-27, 2009.
- GALHARDO, V. A. et al. Health related quality of life and depression in older patients with pressure ulcers. **Wounds**, v.22, n.1, p.20-6, 2010.
- GARCEZ, F.R. et al. Novos constituintes químicas das cascas do caule de *Tabebuia heptaphylla*. **Química Nova**, v.30, n.8, p.1887-91, 2007.
- GAZIM, Z.C. et al. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) growing in brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.61-63, 2008.
- GENNARO, A.R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20^aed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

GERDES, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer**, v.31, n.1, p.13-20, 1983.

GIRON, D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.68, p.335-357, 2002.

GOERTZ, O. et al. Evaluation of a novel polyhexanide-preserved wound covering gel on dermal wound healing. **European Surgical Research**, v.44, p.23-29, 2010.

GOKOO, C.; BURHOP, K.A. A Comparative study of wound dressings on full thickness wounds in micropigs. **Decubitus**, v.6, n.5, p.42-43/46, 1993.

GOMES, F.S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.20, n.5, p.537-548, 2007 .

GOTTRUP, F. Healing of incisional wounds in stomach and duodenum: A biomechanical study. **American Journal of Surgery**, v.140, n.2, p.296-301, 1980.

GRANDE, C.J. et al. Development of Self-assembled bacterial cellulose-starch nanocomposites. **Materials Science and Engineering**, v.29, n.4, p.1098-1104, 2009.

GRANDI, T.S.M. **Tratado das Plantas Mediciniais [recurso eletrônico]: mineiras, nativas e cultivadas**. 1^a. Ed. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 1204 p., 2014.

GREER, N. et al. **Advanced wound care therapies for non-healing diabetic, venous, and arterial ulcers: a systematic review**. Washington, DC: Department of Veterans Affairs, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK132238/>>. Acesso em: 12 jul. 2015.

GRINNELL, F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. **Journal of Cell Biology**, v.124, n.4, p.401-4, 1994.

GROEBER, F. et al. Skin tissue engineering – *in vivo* and *in vitro* applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.63, n.4-5, p.352-366, 2011.

GUARDIA, T. et al. Antiinflammatory properties of plant flavonoids: effects of rutin, quercetin and hesperedin on adjuvant arthritis in rat. **Fármaco**, v.56, p.683-687, 2001.

GULREZ, S.K.H.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G.O. Hydrogels: methods of preparation, characterization and applications. In: CARPI, A. **Progress in molecular and environmental bioengineering: from analysis and modeling technology applications**. New York: InTech, 2011. p.117-150.

HAMBURGUER, M. et al. Preparative purification of the major anti-inflammatory ester from Marigold (*Calendula officinalis*). **Fitoterapia**, v.74, p.328-338, 2003.

HARRISON, D. **Natural therapeutic composition for the treatment of wounds and sores**. CIPO Patent 2392544 Apr 17, 2003.

HART, J. et al. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in wound repair: effects *in vitro* on fibroblast biology and *in vivo* in a model of compromised healing. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.34, n.12, p.1557-1570, 2002.

HARTY, M. et al. Regeneration or scarring: an immunologic perspective. **Developmental Dynamics**, v.226, p.268–79, 2003.

HELENIUS, G. et al. *In vivo* biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.76, n.2, p.431-438, 2006.

HERMANS, M.H.; HERMANS, R.P. Duoderm, an alternative dressing for smaller burns. **Burns Including Thermal Injury**, v.2, p.214-219, 1986.

HERNANDES, L.S. **Farmacologia e fitoquímica de extratos e formulações de *Jacaranda decurrens* Chan., *Jacaranda caroba* (Vell.) DC. e *Piper umbellatum* L.** 2015. 110p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2015.

HESS, S.C. et al. Gene expression in human adipose-derived stem cells: comparison of 2D films, 3D electrospun meshes or co-cultured scaffolds with two-way paracrine effects. **European cells & materials**, v.34, p.232–248, 2017

HINZ, B. et al. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. **American Journal of Pathology**, v.159, n.3, p.1009-20, 2001.

HINZ, B.; GABBIANI, G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, n.5, p.538-46, 2003.

HIRUMA-LIMA, C.A.; DI STASI, L.C. **Scrophulariales medicinais. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** São Paulo: Editora Unesp, p.449-452, 2002.

HORVATH F. **Therapeutical compositions against psoriasis.** US Patent 5165932 Nov 24, 1992.

HUSAIN, M.T.; AKHTAR, M.; AKTHAR, N. Report on evaluation of hydron as burn wound dressing. **Burns**, v.9, p.330–334, 1983.

IAUK, L. et al. Antibacterial Activity of Medicinal Plant Extracts Against Periodontopathic Bacteria. **Phytotherapy Research**, v.17, p.599-604, 2003.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: an anti and pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.52, n.1, p.26-42, 2008.

IRION, G.L. **Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores.** Tradução João Clemente Dantas do Rego Barros. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 390p. 2005.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLONGG, E.A.; STEENS, P.F.; DONOGUE, M.J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético.** 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 612p. 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 427p. 2004.

- KALVATCHEV, Z.; WALDER, R.; GARZARO, D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.51, p.176–180, 1997.
- KANE, J.B. et al. Burn dressings. In: RATNER, B.D. et al. **An introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic, p.360–370, 1996.
- KANGESU, T. et al. Kerato-dermal grafts: the importance of dermis for the *in vivo* growth of cultured keratinocytes. **British Journal of Plastic Surgery**, Edinburgh, v.46, n.5, p.401-409, 1993.
- KAPLAN, E.N. **Annals of plastic surgery**, v.10, p.437-51, 1983.
- KASHYAP, A. et al. Effect of povidone Iodine dermatologic ointment on wound healing. **The American Surgeon**, v.61, n.6, p.486-491, 1995.
- KASPRZYK, Z.; TUROWSKA, G.; PYREK, J. The variations of free and bound sterols in *Calendula officinalis* during vegetation. **Acta Biochimica Polonica**, v.15, p.149-59, 1968.
- KAWADA, N. et al. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupfer cells. **Hepatology**, v.27, p.1265-1274, 1998.
- KEMPER, K.J. *Calendula (Calendula officinalis)*. **The Longwood herbal task force and the centre for holistic pediatric education and research**. 1999. Disponível em: <<http://www.longwoodherbal.org/dandelion/dandelion.pdf>>. Acesso em: 5 jul. 2015.
- KHALID, K.A.; SILVA, J.A.T. Yield, essential oil and pigment content of *Calendula officinalis* L. flower heads cultivated under salt stress conditions. **Scientia Horticulturae**, v.126, n.2, p.297–305, 2010.
- KICKHÖFEN, B. et al. Chemical and physical properties of a hydrogel wound dressing. **Biomaterials**, v.7, n.1, p.67- 62, 1986.
- KING, W.W. et al. Evaluation of artificial skin (Integra) in a rodent model. **Burns**, v.23, sup.1, p.30-32, 1997.
- KIRSNER, R.S.; EAGLSTEIN, W.H. The wound healing process. **Dermatologic Clinics**, v.11, n.4, p.629–40, 1993.
- KOWALSKA-LUDWICKA, K. et al. Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves. **Archives of Medical Science**, v.9, n.3, p.527-534, 2013.
- KOWALSKI, R. Studies of selected plant raw materials as alternative sources of triterpenes of oleanolic and ursolic acid types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.3, p.656-662, 2007.
- KREMER, M.; LANG, E.; BERGER, A.C. Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagenglycosaminoglycan matrix (Integra artificial skin). **British Journal of Plastic Surgery**, v.53, n.6, p.459-65, 2000.

- KURKIN, V.A.; SHAROVA, O.V. Flavonoids from *Calendula officinalis* flowers. **Chemistry of Natural Compounds**, v.43, n.2, p.179-180, 2007.
- LACHMAN, L.; IEBERMAN, H.A.; ANING, J.L. Semi-Sólidos. In: **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p.907-953, 2001.
- LARGATO, A. et al. Acute and subchronic oral toxicities of *Calendula officinalis* extract in Wistar rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.17, n.6208, 2010.
- LEE, J. et al. Carotenoid supplementation reduces erythema in human skin after simulated solar radiation exposure. **PSEMB**, v.2231, p.170-174, 2000.
- LEONARD, M.P. **Journal of Urology**, v.145, p.115-19, 1991.
- LIM, S.H.; HUDSON, S.M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. **Carbohydrate Research**, v.339, n.2, p.313-319, 2004.
- LIRA, A.A.M. et al. Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação *In Vitro*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.1, p.36-41, 2004.
- LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v.49, p.57-68, 1995.
- _____. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n. 1-2, p.92-94, 2005.
- LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v.27, n.4, p.670-673, 2004.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. 3ªed. Nova Odessa: Plantarum, 352p. 2000.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2ª ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 544p. 2008.
- LOURENÇO, M.V.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S. **Triterpenos em partes aéreas de *Jacaranda decurrens* Cham**. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 17, Cuiabá: Universidade Federal do Mato Grosso, 2002, Anais - CD.
- LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E.E.C. **Caracterização de Polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: Editora E-papers, 2001.
- LUCAS, L.S.; MARTINS, J.T.; ROBAZZI, M.L. Qualidade de vida dos portadores de ferida em membros inferiores - úlcera de perna. **Ciencia y Enfermería**, v.14, n.1, p.43-52, 2008.
- MACEDO, L.R. **Emprego de membrana de celulose microfibrilar na ceratoplastia lamelar em coelhos (*O. cuniculus*, LINNAEUS, 1758). Aspectos Clínicos, Morfológicos e Imunoistoquímicos**. 2008. 79p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, 2008.

MACGRATH, M.H.; SIMON, R.H. Wound geometry and the kinetics of wound contraction. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v.72, n.1, p.66-73, 1983.

MACIEL, E.A.F. **Prevalência de feridas em pacientes internados em um hospital filantrópico de grande porte de Belo Horizonte**. 2008. 92p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2008.

MALLAVADHANI, U.V. et al. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.10, p.1576-1579, 2004.

MANDELBAUM, S.H; DI SANTIS, É.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: Conceitos Atuais e Recursos Auxiliares - Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.78, n.5, p.525-542, 2003.

MÁÑEZ, S. et al. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v.3, n.1, p.103-105, 1997.

MANSUR, H.S.; OREFICE, R.L.; MANSUR, A.A.P. Characterization of poly (vinyl alcohol)/poly (ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. **Polymer**, v.45, n.21, p.7193-7202, 2004.

MARTIN, P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v.276, p.75–81, 1997.

MARTIN, R.J.; DEO, B. Effect of plant population on *Calendula* (*Calendula officinalis* L.) flower production. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v.28, p.37–44, 2000.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**, v.15, n.11, p.599–607, 2005.

MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**, Viçosa, UFV, 220p. 2002.

MARTINS, P.S. et al. Comparação de fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos. **Archives of Veterinary Science**, v.8, n.2, p.1-7, 2003.

MARTINS, N.L.P. et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu): estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, supl. 3, p.66-75, 2006.

MARTINS, M.B.G.; CASTRO, A.A.; CAVALHEIRO, A.J. Caracterização anatômica e química de folhas de *Jacaranda puberula* (Bignoniaceae) presente na Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.600-607, 2008.

MASINI, E.; CALAMO, M.A. Uma forma de tratamento de lesões cutâneas com papaína e sacarose. **Revista Brasileira de Clínica Terapêutica**, v.15, n.8, p.245-247, 1986.

MASOKO, P. et al. *In vivo* antifungal effect of combretum and terminalia species extracts on cutaneous wound healing in immunosuppressed rats. **Pharmaceutical Biology**, v.48, n.6, p.621–632, 2010.

MASUR, S.K. et al. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. **Journal of Cell Biology**, v.93, n.9, p.4219-23, 1996.

MATEOS, S.B. **Pele descartável. Indústria brasileira**, v.44, p.38-41, 2004.

MCFARLANE, R.M.; DEYOUNG, G.; HENRY, R.A. The desing of a pedide flap in the rat to study necrosis and its prevention. **Plastic, Reconstructive and Surgery**, v.35, p.177-182, 1965.

MENÉNDEZ, A.B. et al. Actividad cicatrizante y ensayos de irritación de la crema de *Calendula officinalis* al 1%. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.6, p.811-817, 2007.

MEZADRI, T. J. et al. Evaluation of the contraction of cutaneous wounds in Wistar rats treated with brazilian green propolis gel. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.28, n.5, p.762-767, 2009.

MILLER, J.M. Evaluation of a new surgical suture (prolene). **American Journal of Surgery**, v.39, n.1, p.31-39, 1973.

MIMICA-DUKIC, N. et al. Phenolic compounds in field horsetail (*Equisetum arvense* L.) as natural antioxidants. **Molecules**, v.13, n.7, p.1455–1464, 2008.

MISHRA, A.K. et al. Effects of Calendula Essential Oil-Based Cream on Biochemical Parameters of Skin of Albino Rats against Ultraviolet B Radiation. **Scientia Pharmaceutica**, v.80, n.3, p.669–683, 2012.

MOIEMEN, N.S. et al. Reconstructive surgery with a dermal regeneration template: clinical and histologic study. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.108, p.93-103, 2001.

MOON, Y.J. et al. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in Vitro**, v.20, n.2, p.187-210; 2006.

MORAIS, G.F.; OLIVEIRA, S.H.; SOARES, M.J. Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. **Texto e Contexto Enfermagem**, v.17, n.1, p.98-105, 2008.

MOULIN, V. et al. Role of wound healing myofibroblasts on re-epithelialization of human skin. **Burns**, v.26, n.1, p.3-12, 2000.

MULEY, B.P.; KHADABADI, S.S.; BANARASE, N.B. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.8, n.5, p.455–465, 2009.

NADKARNI, K.M. **The Indian Materia Medica**. 3rded., Popular parakashan, Bombay 238 p. 1982.

NAEINI, A.T. et al. Effects of topical application of *Calendula officinalis* gel on collagen and hydroxyproline content of skin in rats. **Comparative Clinical Pathology**, v.21, n.3, p.253-7, 2012.

NATHAN, P.; MACMILLAN, B.G.; HOLDER, I.A. *In situ* production of a synthetic barrier dressing for burn wounds in rats. **Infection and Immunity**, v.12, n.2, p.257-60, 1975.

NISHIKAWA, D.O. et al. Avaliação da estabilidade de máscaras faciais peel-off contendo rutina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.2, p.227-232, 2007.

NITZ, A.C. et al. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v.35, n.4, p.74-79, 2006.

NUNES, K.M. **Caracterização química e físico-química e estudos preliminares de planejamento da formulação fitoterápica semi-sólida contendo tintura de *Calendula officinalis* L.** 2008. 142p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, 2008.

O'BRIEN, F.J. et al. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. **Biomaterials**, v.26, n.4, p.433-441, 2005.

OGURA, M.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, R. Potential anticancer agents. III. Jacaranona, a novel phytoquinoid from *Jacaranda caucana*. **Lloydia**, v.39, p.255-257, 1976.

OGURA, M.; GEOFFREY, A.C.; NORMAN, R.F. Potential anticancer agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier (Bignoniaceae). **Lloydia**, v.40, p.157-168, 1977.

OKAMOTO, R. Feridas. In: **Caso Complexo 3: Ilha das Flores – Fundamentação teórica: feridas**. São Paulo: Especialização em Saúde da Família, 11p. 2012.

OLIVEIRA, H.P. Traumatismos nos animais domésticos. **Cadernos Técnicos da Escola de veterinária da UFMG**, v.1, n.7, p.1-57, 1992.

OLIVEIRA, S.T. et al. Formulações de confrei na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.7/8, n.1, p.6474, 2000.

OLIVEIRA, F.Q. et al. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.466-76, 2007.

O'MEARE, S.; CULLUM, N.; MAJID, M. Systematic reviews on wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds. **NHS Health Technology Assessment**, v.4, n.21, p.1-103, 2000.

OSAIDA, C.C.; SILVA JUNIOR, A.A.; OSAIDA, C. **Plantas Medicinais: resgate etnobotânico e científico**. Canelinha: Harmonia Natural, 2009. 1 CD-ROM.

OWENS, N. Use of pressure dressings in the treatment of burns and other wounds. **Surgical Clinics of North America**, v.23, p.1354-66, 1943.

PAGNANO, L.O. et al. Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com Calêndula. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.6, p.1662-1666, 2008.

PAIM, L.F.N.A. et al. Avaliação do desenvolvimento da planta, morfologia e teor de flavonoides em tratamentos de cultivo de *Calendula officinalis* L., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.6, p.974-80, 2010.

PANERARI, Â.C.D. et al. Avaliação da resposta inflamatória traqueal ao curativo de celulose bacteriana após escarificação cirúrgica em coelhos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v.74, n.4, p.512-22, 2008.

PARENTE, L.M.L. et al. *Calendula officinalis*: características, propriedades químicas e terapêuticas. **Arquivos de Ciências da Saúde**, UNIPAR, v.6, n.2, p.165-169, 2002.

PARENTE, L.M.L. et al. Análise farmacognóstica do pó e avaliação do efeito do extrato etanólico das flores da *Calendula officinalis* L. cultivadas no Brasil no sistema imunológico. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.1, n.1, p.9-16, 2004.

PARENTE, L.M.L. et al. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais de Botucatu**, v.11, n.4, p.383-91, 2009.

PARK, S.U. et al. The possibility of microbial cellulose for dressing and scaffold materials. **International Wound Journal**, v.11, n.1, p.35-43, 2014.

PDR FOR HERBAL MEDICINE. 2nd ed. New Jersey: Montvale, p.497-99, 2000.

PERES, W. et al. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **Journal of Hepatology**, v.33, p.742-750, 2000.

PLANTS FOR A FUTURE. *Calendula officinalis* L. 1999. Disponível em:<<http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Calendula+officinalis>>. Acesso em: 5 jul. 2015.

PILATTI, D.M. **Ecofisiologia química de espécies nativas de dois biomas do estado do Paraná**. 2012. 112p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel – PR, 2012.

PINHEIRO, A.L.B. et al. Biomodulative effects of polarized light on the healing of cutaneous wounds on nourished and undernourished wistar rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v.24, n.5, p.616–624, 2006.

PINTO, A.C. et al. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v.25, sup.1, p.45-61, 2002.

PORTAL, O.; CLARK, W.A.; LEVINSON, D.J. Microbial cellulose wound dressing in the treatment of nonhealing lower extremity ulcers. **Wounds**, v.21, p.1-3, 2009.

PORTAL DA EDUCAÇÃO. **A História dos curativos**. 2012. Disponível em:<<https://www.portaleducacao.com.br/enfermagem/artigos/14338/a-historia-dos-curativos>>. Acesso em: 10 out. 2016.

POTT, A.; POTT, V.J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, 320p., 1994.

PREETHI, K.C.; KUTTAN, G.; KUTTAN, R. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* Linn. and its possible mechanism of action. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.47, n.2, p.113-20, 2009.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M.R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa. 3^aed, v.2, p.183-207, 1990.

PURNA, S.K.; BABU, M. Collagen based dressing – a review. **Burns**, v.26, p.54-62, 2000.

QUEIMADA, A.J. et al. Solubilities of biologically active phenolic compounds: measurements and modeling. **Journal of Physical Chemistry B**, v.113, n.11, p.3469–3476, 2009.

RAJA, S.K.; GARCIA, M.S.; ISSEROFF, R.R. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. **Frontiers Bioscience**, v.12, p.2849–68, 2007.

RAJWADE, J.M.; PAKNIKAR, K.M.; KUMBHAR, J.V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, n.6, p.2491-2511, 2015.

RAMOS, A. et al. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.61, p.49-55, 1988.

RAO, S. et al. Calendula and hypericum: Two homeopathic drugs promoting wound healing in rats. **Fitoterapia**, v.62, n.6, p.508, 1991.

RAVICHANDRAN, R. et al., Composite poly-L-lactic acid/poly-(α,β)-DL-aspartic acid/collagen nanofibrous scaffolds for dermal tissue regeneration. **Materials Science and Engineering**, v.32, n.6, p.1443–1451, 2012.

RE, T.A. et al. Application of the threshold of toxicological concern approach for the safety evaluation of Calendula flower (*Calendula officinalis*) petals and extracts used in cosmetic and personal care products. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1246–1254, 2009.

RESENER, M.C.; SCHENKEL, E.P.; SIMÕES, C.M.O. Análise de propagandas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Santa Catarina. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.25, n.4, p.583-9, 2006.

RIBEIRO, A.Q.; LEITE, J.P.V.; DANTAS-BARROS, A.M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p.65-70, 2005.

- RICE, J.B. et al. Burden of diabetic foot ulcers for medicare and private insurers. **Diabetes Care**, v.37, n.3, p.651-8, 2014.
- RICOLDY, S.D. et al. Effect of ultrasound associated with Calendula gel on restorative activity in experimental muscular injuries. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v.32, n.2, p.135-40, 2010.
- ROBSON, M.C.; BURNS, B.F.; SMITH Jr., D.J. Acute management of the burned patient. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.89, n.6, p.1155-1168, 1992.
- RODRIGUES, P.O.; GONÇALVES, T.C.; SILVA, W.B. Influência de Diferentes Sistemas de Solventes no Processo de Extração de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.23, n.1, p.27-31, 2004.
- RODRIGUES, P.O. et al. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.24 n.3, p.383-387, 2005.
- RODRIGUES, M.V.N. et al. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **MultiCiência: construindo a história dos produtos naturais**. v.7, Out. 2006.
- ROOPASHREE, T.S. et al. Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v.1, n.3, p.20-28, 2008.
- ROSIK, J.M.; YOSHII, F. Hydrogels and their medical applications. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v.151, p.56-64, 1999.
- RUSZCZAK, Z.; SCHWARTZ, R.A. Modern aspects of wound healing: an update. **Dermatologic Surgery**, v.26, p.219-229, 2000.
- SALLER, R.; ITEN, F.; REICHLING, J. Dyspeptic pain and phytotherapy – a review of traditional and modern herbal drugs. **Forschende Komplementarmedizin and Klassische Naturheilkd**, v.8, n.5, p.263-273, 2001.
- SALOMÉ, M.G.; BLANES, L.; FERREIRA, L.M. Avaliação de sintomas depressivos em pessoas com diabetes *mellitus* e pé ulcerado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, v.38, n.5, p.327-33, 2011.
- SAMBANTHAMURTHI, R. et al. Oil palm vegetation liquor: a new source of phenolic bioactives. **British Journal of Nutrition**, Malaysia, v 106, p.1655-1663, 2011.
- SAMOCHOWIEC, L. Pharmacological study of saponosides from *Aralia manshurica* rupr. et maxim and *Calendula officinalis* L. **Herbal Polonica**, v.29, p.151-55, 1983.
- SAMPAIO, S.; RIVITTI, A.P; EVANDRO, A. **Dermatologia**. 2ªed. São Paulo: Artes Médicas, p.3-43, 2001.
- SANCHAVANAKIT, N. et al. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. **Biotechnology Progress**, v.22, n.4, p.1194-1199, 2006.

SANCHEZ NETO, R. et al. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2 por cento. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.8, n.1, p.18-23, 1993.

SANCHEZ-PEREZ, Y. et al. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v.217, p.25-32, 2005.

SANCHEZ, F. **Avaliação do processo de reparação tecidual em úlceras crônicas utilizando curativos de celulose bacteriana associados ou não à laserterapia**. 2012. 85p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

SANTORO, A. et al. Verminoside and verbascoside induced genotoxicity on human lymphocytes: Involvement of PARP-1 and p53 proteins. **Toxicology Letters**, v.178, n.2, p.71-6, 2008.

SANTOS, V.L.C.G. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: DUARTE, Y.A.O.; DIOGO, M.J.D. **Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico**. São Paulo: Atheneu, p.265-306, 2000.

SANTOS, A.F.O. et al. Application of thermal analysis of binary mixtures with metformin. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v.93, p.361–364, 2008.

SANTOS, P.M.L. et al. Antioxidant activity from the leaf extracts of *Jacaranda puberula* Cham., Bignoniaceae, a Brazilian medicinal plant used for blood Depuration. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p.147-153, 2010.

SANTOS, L.M.O. et al. Análise de amostras de flores de Calêndula (*Calendula officinalis* L., Asteraceae) comercializadas na grande Curitiba. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.36, v.2, p.251-258, 2015.

SAÚDE E LAZER. **MS elabora relação de plantas medicinais de interesse ao SUS**.

Disponível

em:<http://www.saudelazer.com/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=5830>.

Acesso em: 3 fev. 2016.

SAVAS, H.; GUVEN, O. Investigation of active substance release from poly(ethylene oxide) hydrogels. **International Journal of Pharmaceutics**, v.224, n.1-2, p.151-158, 2001.

SAXENA, I.M.; BROWN, R.M. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. **Annals of Botany**, v.96, n.1, p.9-21, 2005.

SCALON, S.P.Q. et al. Armazenamento e tratamentos pré germinativos em sementes de jacarandá (*Jacaranda cuspidifolia* Mart.). **Revista Árvore**, v.30, n.2, p.179-85, 2006.

SCHIPOCHLIEV, T. Extracts from a group of medicinal plants enhancing uterine tonus. **Veterinary Medical Nanki**, v.18, p.87-94, 1981.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia racional: um guia de Fitoterapia para as ciências da saúde**. São Paulo: Ed. Manole, p.316, 2002.

SCUDELLER, V.V. Bignoniaceae Juss. no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Iheringia**, série Botânica, v.59, p.59–7, 2004.

SEVASTJANOVA, N.A. et al. Biochemical characterization of connective tissue reaction to synthetic polymer implants. **Biomaterials**, v.8, n.4, p.242-247, 1987.

SILVA Jr., J.B. Vigilância das Dant no contexto da Vigilância em Saúde no Brasil. In: **Seminário Nacional de Vigilância em Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. p. 11-5.

SILVA, E.C.; PAOLA, M.V.R.V.; MATOS, J.R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.3, jul./set. 2007.

SILVA, E.J. et al. Toxicological studies on hydroalcohol extract of *Calendula officinalis* L. **Phytotherapy Research**, v.21, n.4, p.332-6, 2007.

SILVA, M.L.A. et al. Chitosan/polyester-based scaffolds for cartilage tissue engineering: assessment of extracellular matrix formation. **Acta Biomaterialia**, v.6, n.3, p.1149-1157, 2010.

SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A.; CONCEIÇÃO, G.M. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v.6, n.2, p.1-17, 2010.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ªed. Editora: LTC, p.86-87, 2006.

SIMÕES, M.J. et al. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. **Revista Paulista de Medicina**, v.104, p.132-135, 1986.

SIMÕES, M.L.P. Cicatrização. In: SILVA Jr., O.C.; ZUCOLOTO, S.; BEER Jr., A. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo: Robe Editorial, p.266-273, 1988.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFSC/ Editora UFRGS, 3ªed., 2001.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS /UFSC, p.579-604, 2004.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**, v.341, n.10, p.738–46, 1999.

SMITH, E.W.; MAIBACH, H.I.; SURBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**, New York: Marcel Dekker, p.259-269, 2000.

- SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, G. **Química Orgânica**, v.1 e 2, 7ªed., Rio de Janeiro, LTC, 2001.
- SOUSA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.
- SOUZA, D.M.; SANTOS, V.L.G. Incidence of pressure ulcer in the institutionalized elderly. **Journal of Wound Ostomy & Continence Nursing**, v.37, n.3, p.272-6, 2010.
- SOUZA, D.M.S.T. et al. Qualidade de vida e autoestima de pacientes com úlcera crônica. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.26, n.3, p.283-8, 2013.
- STEPHEN, T. **Semipermeable film dressings in wound management and dressings**. London: The Pharmaceutical Press, p.25-34, 1990.
- STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia humana**. 2ªed. São Paulo: Manole, 416p. 2001.
- STIVALA, L.A. et al. Effect of β -carotene on cell cycle progression of human fibroblasts. **Carcinogenesis**, v.17, n.2, p.2395-2401, 1996.
- STRASSER, A; O'CONNOR, L.; DIXIT, V.M. Apoptosis signaling. **Annual Review Biochemistry**, v.69, n.1, p.217-245, 2000.
- SWAIM, S.F.; HENDERSON, R.A.; FOWLER, D. Small animal wound management. **Veterinary Surgery**, v.27, n.2, 158p., 1998.
- SZPADERSKA, A. et al. The effect of thrombocytopenia on dermal wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v.120, n. 6, p.1130-7, 2003.
- TABATA, Y. The importance of drug delivery systems in tissue engineering. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v.3, n.3, p.80-89, 2000.
- TAGLIATI, C. Acute and chronic toxicological studies of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, sup., p.676-682, 2008.
- THAKARE, V.M. International standard serial number, promotion of cutaneous wound healing by herbal formulation containing *Azadirachta indica* and *Cynodon dactylon* extract in Wistar rats. **International Journal of Pharmaceutical Research & Development**, v.3, n.4, p.80-86, 2011.
- TANIDEH, N. et al. Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v.115, n.3, p.332-8, 2012.
- TEO, T.C.; NAYLOR, I.L. Modifications to the rate of wound contraction by allopurinol. **British Journal of Plastic Surgery**, v.48, n.4, p.198-202, 1995.
- TOGNINI, J.R.F. et al. Estudo biomecânico e morfológico da cicatrização da parede abdominal sob ação de meloxicam. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.15, p.146-155, 2000.

- TONHI, E.; PLEPIS, A.M.G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno quitosana. **Química Nova**, v.25, n.6, p.943-948, 2002.
- TRINDADE, L.C.T. et al. Avaliação do uso tópico do metronidazol no processo de cicatrização de feridas: um estudo experimental. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v.37, n.5, p.358-363, 2010.
- UKIYA, M. et al. Constituents of Compositae plants. 2. Triterpene diols, triols, and their 3-O-fatty acid esters from edible chrysanthemum flower extract and their anti-inflammatory effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.7, p.3187-3197, 2001.
- UKIYA, M. et al. Anti-Inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. **Journal of Natural Products**, v.69, n.12, p.1692-1696, 2006.
- UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. **Carbohydrate Polymers**, v.88, p.596-603, 2012.
- VARANDA, E.M. et al. Effect of ursolic acid from epicuticular waxes of *Jacaranda decurrens* on *Schizaphis graminum*. **Journal of Natural Products**, v.55, p.800-803, 1992.
- VALADARES, Y.M. *Remijia ferruginea* D.C., *Jacaranda caroba* D.C. e *Solanum paniculatum* L.: fitoquímica, atividades biológicas e síntese de derivados dos ácidos ursólico e oleanólico. 2009. 324p. Tese (Doutorado) - Belo Horizonte: UFMG, 2009.
- VALDES, H.L.; GARCIA, R.P. *Calendula officinalis*. **Revista Cubana de Farmácia**, v.33, n.3, p.188-194, 1999.
- VALENCIA, I.C. et al. Chronic venous insufficiency and venous leg ulceration. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.44, n.3, p.401-21, 2001.
- VEIT, M. et al. The distribution of caffeic acid conjugates in the equisetaceae and some ferns. **Phytochemistry**, Würzburg, v.31, n.10, p.3483-3485, 1992.
- VIDAL-OLLIVIER, E. et al. Dosage by HPLC of major flavonoids of *Calendula officinalis* L. as a function of the cultural variety and the date of harvesting. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v.66, p.318-320, 1991.
- VIEIRA, S.C.H. et al. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.1, p.28-34, 2010.
- VINCE, D.G.; HUNT, J.A.; WILLIAMS, D.F. Quantitative assessment of the tissue response to implanted biomaterials. **Biomaterials**, v.12, p.731-736, 1991.
- VOGT, P.M. et al. Dry, moist and wet skin wound repair. **Annals of Plastic Surgery**, v.34, n.5, p.493-500, 1995.
- VOLP, A.C.P. et al. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Revista Brasileira Nutrição Clínica**, v.23, n.2, p.141-149, 2008.

VOLPATO, A.M.M. **Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico.** 2005. 137p. Tese (Doutorado) - Curitiba: UFPR, 2005.

WAGNER, H.; WIESENAUER, M. **Fitoterapia: fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas.** 2ªed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

WAGNER, E.R. et al. Chondrocyte Attachment, Proliferation, and Differentiation on Three-Dimensional Polycaprolactone Fumarate Scaffolds. **Tissue Engineering Part A**, v.23, n.13–14, p.622–629, 2017.

WALDORF, H.; FEWKES, J. Wound healing. **Advances in Dermatology**, v.10, p.77-96, 1995.

WENDLANDT, W.W. **Thermal Analysis.** New York: John Wiley and Sons, 3ªed. 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Monographs on selected medicinal plants.** Geneva: Organização Mundial de Saúde. v.2, p.35-44, 2002.

WIEMAN, T.J. Introduction to care of chronic wounds. **American Journal of Surgery**, New York, v.176, n.2, sup.1, p.15-25, 1998.

WINTER, G.D. Formation of the scab and the rate of epithelialization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. **Nature**, v.193, p.293-294, 1962.

WINTER, G.D.; SCALES, J.T. The effect of air drying and dressings on the surface of a wound. **Nature**, v.197, p.91, 1963.

WINTER, G.D. Epidermal Regeneration studied in the domestic pig. In: MAIBACH, H.I.; ROVEE, D.T. **Epidermal wound healing.** Chicago: Year Book Medical, p. 71, 1972.

YAGUISHITA, N. Avaliação da cicatrização induzida pela membrana de celulose porosa depois da retirada total da pele em dorso de ratos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.6, n.2, p.193-194, 2007.

YANG, Z.G. et al. Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and their nitric oxide production-inhibitory and DPPH radical scavenging activities. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.55, p.15-18, 2007.

YASUKAWA, K. et al. Inhibitory effect of di- and tri-hydroxy triterpenes from the flowers of Compositae on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.19, p.1329–1331, 1996.

YIM, T.K. et al. Hepatoprotective action of an oleanolic acid-enriched of *Ligustrum lucidum* fruits is mediated through an enhancement on hepatic glutathione regeneration capacity in mice. **Phytotherapy Research**, v.15, p.589-592, 2001.

ZACHARIAS, D.P.M. et al. Efeito da nutrição protéica sobre a resposta cicatricial ao trauma: aspectos histológicos, histoquímicos e contração cicatricial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.33, n.6, p.97-102, 1991.

ZAHRA, A.; MOHAMMED, A.; MOHAMMED, H.K. Evaluation of immunomodulatory effects of five herbal plants. **Journal of Ethanopharmacology**, v.72, p.167-72, 2000.

ZDORYK, O.A.; KHOKHLOVA, K.O.; GEORGIYANTS, V. Investigation of Physical and Chemical Stability of an Ointment with Herbals. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v.18, n.3, p.248-252, 2014.

ZITTERL-EGLSEER, K. et al. Antioedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, n.2, p.139–144, 1997.

ZITTERL-EGLSEER, K. et al., Morphogenetic variability faradiol monoesters in marigold *Calendula officinalis* L. **Phytochem Analysis**, v.12, n.3, p.199-201, 2001.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4^aed. Porto Alegre: UFSC, p.489-517, 2004.

ANEXO – Relatório final de aprovação do comitê de ética



Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 70/2015

Interessado: Paula Rodrigues Fontes de Sousa Moraes

Título do projeto: "Obtenção, caracterização e análise comparativa de hidrogéis a base de celulose bacteriana com Calendula officinalis e Jacaranda caroba em dorso de ratos"

Parecer nº 11/2018 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 20 de junho de 2018, analisou o relatório final do protocolo para uso de animais na pesquisa: "Obtenção, caracterização e análise comparativa de hidrogéis a base de celulose bacteriana com Calendula officinalis e Jacaranda caroba em dorso de ratos" apresentado pela pesquisadora Paula Rodrigues Fontes de Sousa Moraes, e considerou o referido relatório estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua aprovação.

Araraquara, 20 de junho de 2018.

A handwritten signature in blue ink that reads "Carla Fontana".

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA
Coordenadora da CEUA

