



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL  
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA – ESENFAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM – MESTRADO



**CAMILA MOREIRA VASCONCELOS**

**Avaliação da migração celular, atividade antiinflamatória e antimicrobiana da *Hyptis pectinata* L. Poit.: estudos *in vitro* e *in vivo* com vistas ao tratamento de feridas**

**MACEIÓ  
2018**

**CAMILA MOREIRA VASCONCELOS**

**Avaliação da migração celular, atividade antiinflamatória e antimicrobiana da *Hyptis pectinata* L. Poit.: estudos *in vitro* e *in vivo* com vistas ao tratamento de feridas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas, na área de concentração Enfermagem no Cuidado em Saúde e na Promoção da Vida e linha de pesquisa Enfermagem, ciência, tecnologia e inovação para o cuidado, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Lysete de Assis Bastos

**MACEIÓ  
2018**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária**  
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

V331a Vasconcelos, Camila Moreira.  
Avaliação da migração celular, atividade antiinflamatória e antimicrobiana da  
*Hyptis pectinata* L. Poit. : estudos *in vitro* e *in vivo* com vistas ao tratamento de feridas  
/ Camila Moreira Vasconcelos. – 2019.  
84 f. : il. color.

Orientadora: Maria Lysete de Assis Bastos.  
Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas.  
Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 72-84.

1. Plantas medicinais. 2. *Hyptis pectinata*. 3. Anti-Inflamatórios. 4. Cicatrização. I.  
Título.

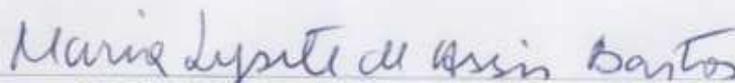
CDU: 633.88

## Folha de Aprovação

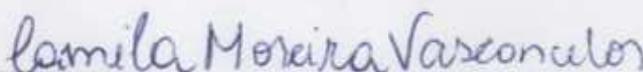
AUTOR: CAMILA MOREIRA VASCONCELOS

Avaliação da migração celular, atividade antiinflamatória e antimicrobiana da *Hyptis pectinata* L. Poit.: estudos *in vitro* e *in vivo* com vistas ao tratamento de feridas

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 24 de Julho de 2018.

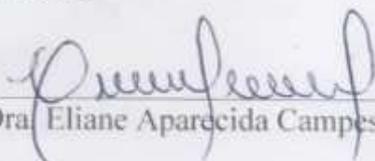


Dr.<sup>a</sup> Maria Lysete de Assis Bastos (Orientadora)

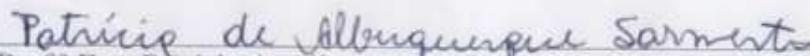


Camila Moreira Vasconcelos

### Banca Examinadora:



Prof.<sup>a</sup> Dra. Eliane Aparecida Campesatto, ICBS/UFAL (Membro Titular)



Prof.<sup>a</sup> Dra. Patricia de Albuquerque Sarmiento, ESENFAR/UFAL (Membro Titular)

*Primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente nos momentos mais difíceis. À minha família, principalmente meus pais, José Eugênio e Alda Maria, e meu irmão Ítalo, por serem sempre presentes e atuantes em minha vida. Ao meu noivo, Rodrigo, por todo amor e companheirismo. E à professora Lysete, essencial em minha carreira acadêmica.*

## AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus, o único e verdadeiro mestre no real sentido da palavra, pela luz que guia meus passos e pela graça recebida de encerrar mais uma etapa na minha vida, renovando os meus caminhos para um novo amanhecer;

Aos meus pais, Eugênio e Alda, por todo seu amor, momentos de compreensão e suporte, e por sempre lutarem, incentivarem, investirem e acreditarem em minha educação;

Ao meu irmão Ítalo, que mesmo à distância, tornou-se meu maior orgulho, além de ter me oferecido com o presente mais lindo da minha vida, a minha afilhada Maria Emanuele, que, embora ainda muito pequena para compreender, é responsável por despertar um amor tão puro e profundo, o qual renova minhas energias com alegria e esperança e dá sentido especial à minha existência;

Ao meu noivo Rodrigo, minha fortaleza e meu conselheiro, por todo amor, carinho, cuidado, paciência e apoio, por escutar minhas angústias e me incentivar com palavras de encorajamento, e por sempre acreditar em minha capacidade, nunca me deixando desistir nos momentos de dificuldade;

À minha orientadora, professora Dra. Maria Lysete, pela sua dedicação em mais uma orientação direcionada a mim e por sempre estar presente em minha vida acadêmica, pela confiança em mim depositada, pela amizade, paciência e pelos ensinamentos tão valiosos que nunca serão esquecidos;

Às docentes do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem (PPGENF/UFAL) por todo aprendizado transmitido durante as disciplinas cursadas;

Aos funcionários da Secretaria do Mestrado, em especial à Monique, por todo suporte e esclarecimentos de dúvidas pertinentes ao decorrer do curso;

À professora Dra. Janylle Souza Ferro, pela disponibilidade e por ter acompanhado com muita paciência os testes de citotoxicidade e cicatrização *in vitro* e ao seu aluno, Julianderson Oliveira, que também foi fundamental para realização destes testes;

À professora Dra. Círia Vieira Barbosa, por todo auxílio, suporte e disponibilização do laboratório bem como ao seu aluno Jefferson, também essencial em várias etapas desta pesquisa;

Ao Ednaldo, técnico do Laboratório de Química Medicinal, ao doutorando Edeílto e o mestrando Paulo, por ter acompanhado e auxiliado no teste de triagem fitoquímica e na partição dos extratos brutos;

À professora Dra. Eliane Aparecida Campesatto e ao mestrando Geraldo Neto do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) - ICBS/UFAL, pela disponibilidade, paciência e por ter contribuído no teste, *in vivo*, de peritonite aguda induzida por carragenina;

Aos integrantes dos Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas (LpTF) por todo auxílio na realização das atividades práticas rotineiras, em especial às alunas Ingrid, Larissa, Roberta, Nathália, Hallana e Mariana. Pela imprescindível colaboração durante o ensaio *in vivo*, agradeço, em especial, aos alunos Igor, Ancila, Brenda e Elizabeth; aos mestrandos Joice, Wanderlei, Jefferson e Lucianna; à doutoranda Maria Gabriella; e às professoras Dra. Regina Sales, Dra. Patrícia Sarmiento, Dra. Fabiana Soares e Dra. Adriana Todaro. À técnica Juscenir dos Santos, por toda tranquilidade, disponibilidade, suporte, empenho, competência e profissionalismo para manter o laboratório organizado e ativo;

À minha turma de mestrado, pelos momentos de alegrias e descontração compartilhados e apoio nos momentos difíceis durante essa caminhada;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho;

E às dificuldades que surgiram, pois ao serem superadas, tornam essa conquista mais valiosa e gratificante.

Muito obrigada!

Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que-fazer-se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade.

Paulo Freire

## RESUMO

A espécie vegetal *Hyptis pectinata*, popularmente conhecida como sambacaitá ou canudinho, têm recebido destaque por suas propriedades biológicas, principalmente relacionadas às atividades cicatrizantes e anti-inflamatórias, e pelo amplo uso popular para tratar diversas afecções. Desta forma, objetivou-se avaliar a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e de migração celular de extratos de *H. pectinata* L. Poit. O material vegetal das folhas e galhos foi coletado, macerado e filtrado para a obtenção dos extratos brutos. Em seguida, foi realizada a partição dos extratos, obtendo-se as frações acetato de etila, clorofórmica, metanólica e hexânica. Para determinar a atividade antimicrobiana das amostras, foi realizado o teste da Concentração Inibitória Mínima e para avaliar a viabilidade celular foi realizado o ensaio do MTT, investigando a presença de citotoxicidade. A ação antiedematogênica foi avaliada por meio do teste de peritonite por carragenina. A atividade da MPO foi realizada por meio de teste *in vivo*, a partir do exsudato extraído de Ratos Wistar. A avaliação da migração celular *in vitro* foi realizada pelo método do Scratch Assay, com fibroblastos 3T3. Como resultado, na análise fitoquímica foi evidenciada a presença de seis grupos, os quais: Flavonas, flavonóis e xantonas; Catequinas; Esteroides livres; Triterpenos; Saponinas; Antraquinonas e Taninos condensados. Com relação à Concentração Inibitória Mínima, os extratos brutos das folhas e dos galhos da *Hyptis pectinata* inibiram as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na concentração de 1000 µg/mL, evidenciando fraca atividade inibitória e ausência da atividade antimicrobiana para bactérias gram-negativas. O extrato bruto das folhas apresentou viabilidade celular nas concentrações de 62,5 e 125 µg/mL, sendo levemente citotóxico em 250 µg/mL. Já o extrato bruto dos galhos demonstrou ser severamente citotóxico nas concentrações 125 e 250 µg/mL e moderadamente citotóxico em 62,5 µg/mL. No ensaio de peritonite, o grupo tratado com extrato bruto de galhos reduziu o número de células para  $5,73 \pm 0,5 \times 10^6$  e tratado com o extrato de folhas para  $6,03 \pm 0,7 \times 10^6$ , evidenciando-se uma redução da proliferação celular inflamatória em 67,61%, 65,91%, respectivamente. O tratamento tópico dos ratos com 100 mg/g de creme Lanette® do extrato bruto das folhas, 2 vezes ao dia, diminuiu a atividade de MPO, porém, não houve significância estatística. A avaliação cicatrizante *in vitro*, evidenciou que o extrato bruto das folhas não alterou a migração celular quando comparada ao controle positivo, e que o extrato bruto dos galhos diminuiu a migração celular.

**Palavras-chaves:** Plantas medicinais. *Hyptis pectinata*. Agentes anti-Inflamatórios. Cicatrização.

## ABSTRACT

Skin care is not a recent concern, since for centuries it has been investigated which can aid in the preservation and recovery of the largest organ in the human body. It is from this perspective that experimental studies based on medicinal plants that act in the healing and inflammation process are being developed, and among them, the plant species *Hyptis pectinata* have been highlighted by their biological properties and the wide popular use to treat several diseases. The objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory, antimicrobial activity and cellular migration of extracts of *H. pectinata* L. Poit .. The plant material of the leaves and branches was collected, macerated and filtered to obtain the crude extracts. Then, the extracts were partitioned, obtaining ethyl acetate, chloroform, methanolic and hexane fractions. In order to determine the antimicrobial activity of the samples, the Minimum Inhibitory Concentration test was performed and the MTT assay was investigated to evaluate cell viability, investigating the presence of cytotoxicity. The antidematogenic action was evaluated through the carrageenan peritonitis test. Surgical wounds were performed on the back of 36 Wistar rats and disks of polyvinyl alcohol sponges were inserted. The animals were given specific treatment for each group (n = 9) and, after 48 hours of the experiment, euthanized and exudate discs were removed, used as a source to measure MPO activity. The evaluation of in vitro cell migration was performed by the Scratch Assay method, with 3T3 fibroblasts. As a result, the presence of six groups was evidenced: Flavones, flavonols and xanthenes; Catechins; Free steroids; Triterpenes; Saponins; Anthraquinones and condensed tannins. The crude extracts of leaves and branches of *H. pectinata* inhibited the gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* at a concentration of 1000 µg / mL, evidencing weak inhibitory activity and absence of antimicrobial activity for gram-negative bacteria. The crude extract of the leaves presented cell viability at concentrations of 62.5 and 125 µg / mL, being slightly cytotoxic at 250 µg / mL. On the other hand, the crude extract of the branches was shown to be severely cytotoxic at concentrations of 125 and 250 µg / mL and moderately cytotoxic at 62.5 µg / mL. In the peritonitis assay, the treated group with crude extract of branches reduced the number of cells to  $5.73 \pm 0.5 \times 10^6$  and treated with the leaf extract to  $6.03 \pm 0.7 \times 10^6$ , evidencing a reduction in inflammatory cell proliferation in 67.61%, 65.91%, respectively. Topical treatment of mice with 100 mg / g Lanette® cream of the leaf extract twice daily reduced MPO activity, but there was no statistical significance. The in vitro cicatrization evaluation showed that the crude extract of the leaves did not alter the cell migration when compared to the positive control, and that the crude extract of the branches decreased the cell migration.

**Key-words:** Medicinal plants. *Hyptis pectinata*. Anti-inflammatory agents. Healing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Ilustração da pele, com destaque o estrato córneo da epiderme, a derme e a hipoderme.	21
Figura 2-	Evolução do número relativo de células sanguíneas e fibroblastos nas fases sequenciais do processo de cicatrização.	26
Figura 3-	Alterações celulares e vasculares responsáveis pela sintomatologia do processo inflamatório.	29
Figura 4-	<i>Hyptis pectinata</i> L. Poit.	34
Figura 5-	Processo de preparação dos extratos etanólicos de <i>Hyptis pectinata</i> .	40
Figura 6-	Processo de fracionamento dos extratos etanólicos de <i>H. pectinata</i> .	41
Figura 7-	Esquema geral da partição e separação dos prováveis e principais metabólitos secundários presentes nos extratos da planta.	46
Figura 8-	Esquema do ensaio de Peritonite induzida por Carragenina.	50
Figura 9-	Placa de 12 poços com cultura de fibroblastos.	52
Figura 10-	Esquema da técnica Ensaio da raspagem ( <i>Scratch assay</i> ): VEDULA et al., 2013.	53
Figura 11-	Prospecção fitoquímica para taninos – formação de precipitado dos extratos brutos de galhos e folhas.	54
Figura 12-	Manejo da triagem fitoquímica das frações da <i>H. pectinata</i> .	55
Figura 13-	Viabilidade celular dos extratos brutos das folhas e galhos de <i>H. pectinata</i> .	57
Figura 14-	Número de células por mililitro de lavado intraperitoneal contabilizados no ensaio de peritonite induzida por carragenina pós - tratamentos.	59
Figura 15-	Efeito de HPEF e HPEG na migração de fibroblastos 3T3. (A) Fotomicrografias representativas das células feridas no intervalo de 0 e 24 h após o arranhão. (B) A análise da taxa de migração foi avaliada pelo <i>software</i> Imagem.	60
Figura 16-	O efeito do extrato etanólico da <i>H. pectinata</i> (HPEF) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) após 48 h de indução da ferida.	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Rendimento dos extratos e frações de <i>H. pectinata</i> .	55
Tabela 2-	Efeito das frações dos extratos das folhas e do caule da <i>H. pectinata</i> na viabilidade celular dos fibroblastos 3T3.	58
Tabela 3-	Número de leucócitos contabilizados no ensaio de peritonite induzida por carragenina pós - tratamentos.	59

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Colorações indicativas para a presença de antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis.	44
Quadro 2-	Prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas e dos galhos da <i>Hyptis pectinata</i> .	54
Quadro 3A-	Identificação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos brutos da <i>H. pectinata</i> .	56
Quadro 3B-	Identificação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> das frações da <i>H. pectinata</i> .	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>AINEs</b>	Antiinflamatórios não esteroidais
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>AP</b>	Proteína ativadora
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion
<b>CC</b>	Controle de crescimento
<b>CE</b>	Controle de esterilidade
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CHCL<sub>3</sub></b>	Clorofórmio
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CL</b>	Concentração letal necessária para matar 50% de uma população
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CN</b>	Controle negativo
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>CP</b>	Controle positivo
<b>DEMEM</b>	Meio Dulbecco Modificado por Eagle
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>ESENFAR</b>	Escola de enfermagem e farmácia
<b>g</b>	Grama
<b>h</b>	Hora
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido Sulfúrico
<b>HCL</b>	Ácido clorídrico
<b>HPEF</b>	Extrato bruto das folhas de <i>H. pectinata</i>

<b>HPEG</b>	Extrato bruto dos galhos de <i>H. pectinata</i>
<b>HTAB –</b>	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
<b>IMA</b>	Instituto do Meio Ambiente
<b>KOH</b>	Hidróxido de potássio
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>MTT</b>	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sódio
<b>NF –</b>	Fator nuclear
<b>NO –</b>	Óxido nítrico
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Proteína C reativa
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PNPIC</b>	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
<b>PVA</b>	Acetato de Polivinila
<b>RENISUS</b>	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>s</b>	Segundos
<b>SBF</b>	Soro bovino fetal
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TGF</b>	TGF – Transforming growth factor
<b>TNF</b>	TNF – Fator de Necrose Tumoral
<b>TTC</b>	Cloreto de Trifenil Tetrazólio

<b>U</b>	Unidade
<b>UFAL</b>	Universidade Federal de Alagoas
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>UTI</b>	Unidade de tratamento intensivo
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>20</b>
2.1	O manto de revestimento do corpo	20
2.2	O processo de cicatrização	22
2.2.1	Fase inflamatória	24
2.2.1.1	Mecanismos vasculares	24
2.2.1.2	Mecanismos celulares	25
2.2.2	Fase proliferativa	26
2.2.3	Fase de maturação	27
2.3	Processo Inflamatório	28
2.4	As plantas no tratamento de lesões e a atuação da enfermagem	31
2.5	Considerações sobre a espécie <i>Hyptis pectinata</i> L. Poit	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
3.1	Objetivo Geral	38
3.2	Objetivos Específicos	38
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>39</b>
4.1	Tipo de Estudo e locais dos experimentos	39
4.2	Aspectos éticos	39
4.3	Coleta do material vegetal e preparação do extrato	39
4.4	Fracionamento do extrato etanólico bruto da <i>Hyptis pectinata</i>	40
4.5	Análise Fitoquímica	41
4.5.1	Teste para saponinas	43
4.5.2	Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavanoídes	43
4.5.3	Teste para fenóis e taninos	44
4.5.4	Teste para Antraquinonas, antronas e cumarinas	45
4.5.5	Teste para Leucocianidinas, Catequinas, Flavanonas	45

4.5.6	Teste para alcaloides	46
4.5.7	Teste para esteroides e triterpenos ( <i>Lieberman-Burchard</i> )	46
4.6	Ensaio de viabilidade celular pelo teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)	47
4.7	Microdiluição em Caldo	48
4.8	Ensaio de peritonite induzida por carragenina	49
4.9	Medida da atividade de mieloperoxidase (MPO)	50
4.9.1	Análise Estatística	52
4.10	Ensaio de migração celular <i>in vitro</i> utilizando Scratch assay	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>54</b>
5.1	Análise Fitoquímica	54
5.2	Rendimento dos extratos etanólicos e suas frações	55
5.3	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	56
5.4	Ensaio de viabilidade celular (teste colorimétrico do Metiltetrazolium/MTT)	57
5.5	Ensaio Peritonite	58
5.6	Medida da atividade de mieloperoxidase (MPO)	60
5.7	Ensaio de migração celular <i>in vitro</i> utilizando <i>Scratch assay</i>	61
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PESPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O cuidado com a pele não é uma preocupação recente, pois há séculos se investiga o que prejudica e o que pode auxiliar na preservação do maior órgão do corpo humano. Embora o interesse pelas feridas tenha origem remota, ainda há muito para se descobrir e discutir, desde as melhores práticas no cuidado até a etiologia de distúrbios que impactam não apenas os indivíduos, mas também seus familiares e o sistema de saúde (GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

De fato, a pele apresenta inúmeros mecanismos de regeneração e reparação. A migração celular, por exemplo, desempenha um papel importante em uma ampla variedade de fenômenos biológicos. A migração de uma célula ou grupo de células, de uma área para outra, geralmente em resposta a um sinal químico, é fundamental para diversas funções fisiológicas do organismo e, diante do contexto, destaca-se o processo de cicatrização das feridas (MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2016).

Nos seres humanos, o processo de cicatrização de feridas é universal, ocorrendo, imediatamente após o ferimento, uma sequência de reações físicas, químicas e biológicas cuja finalidade é reconstituir a integridade tecidual. Este evento dinâmico e complexo torna o manejo de feridas dérmicas uma problemática à saúde, uma vez que o tratamento destes agravos pode gerar altos custos financeiros, resistência a antibióticos, altos índices de septicemia, incapacidade de restauração total da pele, impacto ao bem-estar geral do paciente, podendo até causar a morte (MALAGUTTI, 2015).

Conseqüentemente, há uma grande prevalência de lesões em indivíduos tratados nas instituições hospitalares e, no Brasil, estima-se que as lesões de pele representam uma incidência de até 62,5% em unidade de terapia intensiva (UTI), de 42,6% em clínica médica e de 39,5% em unidades cirúrgicas (PASSARETTI et al, 2016). Mesmo com os avanços referentes à compreensão dos processos e fenômenos que envolvem as lesões e o desenvolvimento de recursos e tecnologia para a reparação tissular, a incidência e a prevalência das lesões ainda são altas.

Diversos fatores podem afetar o processo de cicatrização de feridas, como por exemplo a idade, a imobilidade, o estado nutricional, as doenças associadas, o uso de medicamentos contínuos, principalmente as drogas imunossupressoras, a localização anatômica da ferida, a presença de tecido desvitalizado e de infecção e a presença de reação inflamatória persistente.

Em geral, a resposta inflamatória, quando controlada, é benéfica e culmina com a eliminação do agente agressor e reparo do dano tecidual. Entretanto, se essa reação for desregulada e persistente pode ocasionar graves danos aos tecidos do hospedeiro, levando ao desenvolvimento de processos inflamatórias intensos (CALDER, 2013).

Desta forma, os profissionais da área de saúde se deparam constantemente com desafios no tratamento de feridas com dificuldade de cicatrização, fazendo uso de recursos alopáticos, homeopáticos ou ainda, da medicina popular, no intuito de acelerar esse processo fisiológico com relação ao melhor resultado de formação de cicatriz e minimizar os danos causados por estas afecções (FERREIRA et al, 2013).

Além disso, os elevados índices de efeitos colaterais advindos dos medicamentos para tratar patologias relacionadas à deficiência cicatricial/inflamação aumentam ainda mais a importância de estudos por novas opções terapêuticas que agreguem o mínimo de reações colaterais possíveis. Destaca-se que alguns efeitos adversos dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), medicamentos mais amplamente utilizados dentre os agentes terapêuticos, incluem sonolência, cefaleia, tontura, icterícia, diarreia, vômito, úlcera e hemorragia no trato gastrointestinal, oligúria e hematuria (OLSON, 2013).

Nesse sentido, grandes avanços no conhecimento do processo de reparação do tecido lesado, bem como de todos os fatores nele envolvidos, e da comprovação das propriedades biológicas de inúmeros produtos naturais, propiciou o desenvolvimento de mais de 2000 produtos utilizados, evidenciando, assim, cada vez mais o surgimento de inovações tecnológicas para tratamento e cura das feridas (ARAÚJO, 2016; KORELO; FERNANDES, 2016; PASSARETTI et al, 2016).

É nessa perspectiva que estudos experimentais à base de plantas que atuam no processo de cicatrização e inflamação estão sendo desenvolvidos. Com isso, os extratos vegetais têm recebido destaque pelas propriedades biológicas de suas substâncias e por serem reconhecidos empiricamente, há séculos, como recurso terapêutico para o tratamento de feridas e de diversas doenças (BARRETO et al, 2013).

Entretanto, apesar da biodiversidade brasileira ser muito vasta, o potencial de seu uso como fonte de novos medicamentos é pouco explorado. No mundo, entre as 250 e 500 mil espécies de plantas estimadas, apenas uma pequena percentagem foi investigada fotoquimicamente. No Brasil, com cerca de 55 mil espécies de plantas, apenas 0,4% da flora foi explorada (BRASIL, 2012).

De fato, a utilização de plantas como recurso terapêutico é uma prática generalizada na medicina popular e tem aumentado acentuadamente nas últimas décadas. Dentre as diversas espécies que possuem comprovação científica sobre suas propriedades medicinais, destacam-se as pesquisas com espécies do gênero *Hyptis*, as quais se destacam pela sua importância econômica e etnofarmacológica, cujos conhecimentos são transmitidos de geração a geração até os dias de hoje.

A espécie vegetal *Hyptis pectinata* L. Poit., popularmente conhecida como "sambacaitá" ou "canudinho" tem sido relatada como possuidora de ação cicatrizante, antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante. Devido a isto, são amplamente utilizadas na medicina popular (BISPO et al, 2001; RAYMUNDO et al, 2001; NASCIMENTO et al, 2008; SANTOS et al, 2008; MARMITT et al, 2015; COSTA, 2016).

Sendo o cuidado com as feridas uma das atribuições inerente à assistência prestada pela enfermagem, os inúmeros estudos publicados com esta temática demonstram a importante responsabilidade do(a) enfermeiro(a) nesse processo e na busca de novas maneiras de cuidar, estando atento às inovações de cuidado nesta área que visem à melhoria da qualidade da assistência, minimizando os desconfortos do paciente, facilitando a prestação dos cuidados de enfermagem e da equipe multiprofissional e diminuindo o tempo de internação e os custos hospitalares (OLIVEIRA et al., 2016). Portanto, o (a) enfermeiro (a) possui papel relevante no tratamento, orientação, acompanhamento da evolução do processo cicatricial, bem como na avaliação de novos produtos que surgem no mercado (CARNEIRO; SOUZA; GAMA, 2010). E para, além disso, seu importante papel nas pesquisas que privilegiam o uso popular das plantas medicinais para tratamento de feridas.

Diante do apresentado, fica evidente a necessidade de investir em pesquisas básicas do tipo experimental que utilizem tecnologias inovadoras, em uma perspectiva multidisciplinar, com vistas a tratamentos alternativos que agreguem eficácia e ausência de efeitos colaterais. Portanto, é proposta desta pesquisa responder a seguinte questão norteadora do estudo: Extratos vegetais de *Hyptis pectinata* L. Poit possuem ação anti-inflamatória e contribuem para o processo de cicatrização de feridas?

Uma vez que a literatura científica disponível evidencia que as substâncias presentes em extratos e óleos essenciais oriundos de plantas do gênero *Hyptis* aceleram a cicatrização de feridas e possuem propriedades anti-inflamatórias, sendo amplamente utilizadas na medicina tradicional, torna-se relevante investir em estudos que atuam na busca por novas

opções terapêuticas; justificando-se, assim, a necessidade de pesquisar tais propriedades biológicas da espécie *Hyptis pectinata* frente ao processo de cicatrização.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 O manto de revestimento do corpo**

O sistema tegumentar recobre o corpo, protegendo-o contra o atrito, a perda de água, a invasão de micro-organismos e a radiação ultravioleta. Apresenta função de percepção sensorial (tato, calor, pressão e dor), síntese de vitamina D, termorregulação, excreção de íons e secreção de lipídios protetores e de leite. É constituído pela pele e seus anexos: pelos, unhas, glândulas sebáceas, sudoríparas e mamária (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A pele é considerada o maior órgão do corpo, em peso e área de superfície. Esta área pode variar aproximadamente de 1,7m<sup>2</sup> a 2,0m<sup>2</sup> (em indivíduos adultos), correspondendo em torno de 5,5% da massa corporal. Diante desta extensão, existe grande variação de estrutura de um local para outro do corpo. Além desta variação estrutural, observa-se uma oscilação do pH entre 5,5 a 7,0 diante de toda a extensão da pele. Enquanto a pele recobre o corpo, funcionando como invólucro de revestimento, sendo a maior interface entre o meio ambiente e o corpo humano, exposta intensamente a variações como: temperatura, umidade, luz solar, xenobióticos ambientais e ocupacionais (ALVES, 2015).

Uma das principais funções da pele é a proteção do organismo, por apresentar-se como uma barreira funcional, limitando a penetração de substâncias exógenas presentes no ambiente, como a invasão bacteriana e fúngica. Inclui também a proteção contra estímulos danosos, como a luz ultravioleta e estímulos físicos. O estrato córneo é responsável pela proteção contra atrito e perda de água e a melanina como proteção dos raios ultravioletas e, o filme hidrolipídico, responsável pela defesa, manutenção do pH e hidratação do estrato córneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

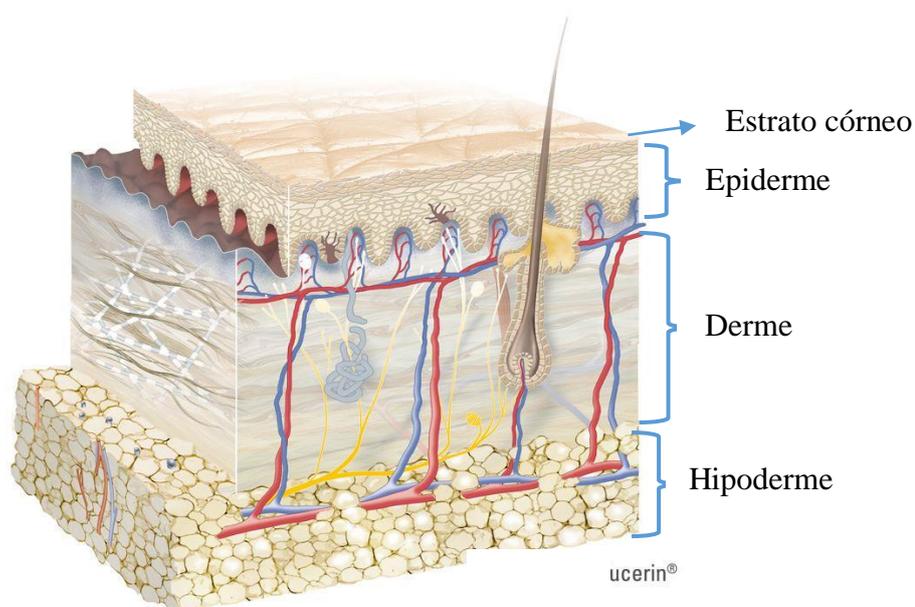
Outra função importante é o fato da pele ser um órgão sensitivo, isto é decorrente de diferentes receptores para tato, pressão, dor e temperatura, definindo a pele como um dos cinco órgãos do sentido. A termorregulação ocorre pela presença de termorreceptores nervosos na pele, estes reagem estimulando as fibras nervosas a levarem informações até o centro de regulação térmica no hipotálamo. A regulação da temperatura ocorre em caso de perda de calor, aumentando o fluxo sanguíneo, conseqüentemente elevando a secreção de suor e em caso de conservação de calor possui ação mínima devido à escassez de pelos (ALVES, 2015).

A atividade metabólica da pele ocorre de forma constante, observada pelos processos de secreção que são realizados através de suas glândulas sebáceas com a eliminação do sebo e

sudoríparas com o suor. Além disso, a pele está relacionada à síntese de vitamina D3, que é produzida por influência dos raios ultravioletas. Esta atua no metabolismo do cálcio e formação do tecido ósseo, funcionando como antirraquítica (CARVALHO, 2010).

A pele consiste em uma complexa estrutura, onde está presente três camadas a epiderme (camada de superfície), a derme (camada intermediária) e a hipoderme ou subcutânea (camada profunda) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), conforme ilustrado na figura 1.

**Figura 1:** Ilustração da pele, com destaque o estrato córneo da epiderme, a derme e a hipoderme.



**Fonte:** <https://www.eucerin.com.br/sobre-pele/conhecimentos-basicos-sobre-a-ele/estrutura-e-funcoes-da-pele>

A epiderme, camada mais externa da pele, é constituída por células epiteliais (queratinócitos) com disposição semelhante a uma “parede de tijolos”. Estas células são produzidas na camada mais inferior da epiderme (camada basal ou germinativa). Em sua evolução em direção à superfície sofrem processo de queratinização ou corneificação, que dá origem à camada córnea, composta basicamente de queratina, uma proteína responsável pela impermeabilização da pele (CARVALHO, 2010).

A renovação celular constante da epiderme faz com que as células da camada córnea sejam gradativamente eliminadas e substituídas por outras, processo que acontece de forma contínua. O estrato córneo é a principal barreira aos fármacos quando estes são aplicados topicamente, além de ser ainda barreira para substâncias exógenas (ALVES, 2015).

Além dos queratinócitos, encontram-se também na epiderme: os melanócitos, que produzem o pigmento que dá cor à pele (melanina) e células de defesa imunológica (células de Langerhans).

A derme, camada localizada entre a epiderme e a hipoderme, é responsável pela resistência e elasticidade da pele. É constituída por tecido conjuntivo (fibras colágenas e elásticas envoltas por substância fundamental), vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e terminações nervosas. Os folículos pilossebáceos e glândulas sudoríparas, originadas na epiderme, também se localizam na derme (CARVALHO, 2010).

A faixa na qual a epiderme e a derme se unem é chamada de junção dermo-epidérmica. Nesta área, a epiderme se projeta em forma de dedos na direção da derme, formando as cristas epidérmicas. Estas aumentam a superfície de contato entre as duas camadas, facilitando a nutrição das células epidérmicas pelos vasos sanguíneos da derme (MEDEIROS; DANTAS-FILHO, 2016).

A hipoderme, também chamada de tecido celular subcutâneo, é a porção mais profunda da pele. É composta por feixes de tecido conjuntivo que envolvem células gordurosas (adipócitos) e formam lobos de gordura. Sua estrutura fornece proteção contra traumas físicos, além de ser um depósito de calorías (ALVES, 2015).

## **2.2 O processo de cicatrização**

A pele consiste em uma barreira eficaz, entretanto, por se apresentar como um órgão de interface do organismo com o meio ambiente, está exposta às agressões exógenas e, dentre elas, destacam-se as feridas, que podem apresentar alterações na estrutura, função e aspecto da mesma (MALAGUTTI, 2015).

Ferida é compreendida, do ponto de vista biológico, como uma agressão sofrida pelo tegumento, uma imperfeição na qual há a quebra de sua integridade, afetando camadas superficiais ou mais profundas podendo atingir até os órgãos. O processo cicatricial surge a partir dessa injúria com o objetivo principal de restaurar/cicatrizar esse rompimento da continuidade, sendo este um processo dinâmico, complexo, no qual a sua resposta está diretamente ligada às condições gerais do indivíduo (BLANCK; GIANNINI, 2014).

A capacidade auto-regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos. Nos organismos multicelulares, está relacionada à presença de enzimas responsáveis pela recuperação de elementos estruturais (como os constituintes do citoesqueleto, membranas e paredes celulares), de moléculas de alta complexidade (como proteínas de elevada

complexidade estrutural, RNAs e o DNA) e, além destes, também ocorre o reparo de tecidos que pode se dar de duas formas: (1) pela regeneração com a recomposição da atividade funcional do tecido ou (2) pela cicatrização com restabelecimento da homeostasia do tecido com perda da sua atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica (GURTNER; NELIGAN, 2015).

Desta forma, a cicatrização de feridas é um processo complexo que consiste em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que ocorra a reconstituição tecidual (MANDELBAUM; DI SANTIS, 2013). A regeneração é a restauração perfeita da arquitetura do tecido pré-existente, na ausência de formação de cicatriz, e embora seja o tipo ideal no universo de cicatrização de feridas, ela só é observada no desenvolvimento embrionário, organismos inferiores ou em determinados tecidos como ossos e fígado (BLANCK; GIANNINI, 2014).

A grande complexidade que geralmente está associada ao processo de reparação tecidual envolve alguns fatores que podem afetar a cicatrização, chamados de sistêmicos e locais. Entre os fatores sistêmicos destacam-se: a idade, a imobilidade, o estado nutricional, doenças associadas e o uso de medicamentos contínuos, principalmente as drogas imunossupressoras. Dentre os fatores locais, destacam-se a localização anatômica da ferida, presença de tecido desvitalizado e, principalmente, a presença de infecção (SILVA et al., 2017).

Os mecanismos da cicatrização em sequência ordenada de eventos foram descritos por Carrel (1910), e divididos, em seguida, em cinco elementos principais: inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelamento da ferida. Posteriormente, esse processo foi reclassificado em três fases, divididas, didaticamente, em: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelamento ou de maturação (CLARK, 2005).

Estas não são mutuamente excludentes, mas sobrepostas no tempo. O reparo completo de tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas que têm os leucócitos como um de seus mais importantes protagonistas. Na divisão do processo de reparo em três fases, são considerados, prioritariamente, os aspectos macroscópicos e histológicos predominantes em cada uma delas (GURTNER; NELIGAN, 2015).

### 2.2.1 Fase inflamatória

A primeira fase do processo de cicatrização inicia com uma etapa precoce caracterizada por fenômenos vasculares, hemostase e coagulação, e outra por mecanismos majoritariamente celulares. A lesão inicial dos tecidos provoca dano vascular com hemorragia local. A resposta inflamatória hiperaguda, revelada clinicamente pelos sinais cardinais de inflamação, pode durar geralmente 24 a 72 horas, podendo persistir até duas semanas (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

Esta lesão induz a exposição do colágeno da matriz extracelular (MEC), permitindo a ativação das plaquetas, a sua adesão, agregação e secreção de diversos mediadores facilitadores da coagulação, possibilitando a hemostase. Da mesma forma, as plaquetas também são responsáveis pela secreção de quimiocinas e de fatores de crescimento que proporcionam a infiltração celular de leucócitos no sítio da lesão, incluindo neutrófilos e macrófagos. Consequentemente, destacam-se duas subetapas caracterizadas por mecanismos distintos, vasculares e celulares, cada um deles com células efetoras predominantes e participação de numerosos mediadores químicos (GURTNER; NELIGAN, 2015).

#### 2.2.1.1 Mecanismos vasculares

A hemostase inclui a formação de um coágulo de fibrina e a coagulação. Tal como referido, as plaquetas são a primeira célula envolvida no processo de cicatrização. Após exposição à MEC, são ativadas pelos componentes desta, presentes na parede vascular, o colágeno fibrilar e a fibronectina. Após ativação, segue-se a adesão, agregação, libertação de mediadores vasoativos (serotonina, ADP, tromboxano A<sub>2</sub>) ou de proteínas de adesão (fibrinogênio, fibronectina, trombospondina e fator de Von Willebrand) e ativação de enzimas (fator de Hageman). Estes mediadores perpetuam a ativação e secreção plaquetárias, assim como a transformação, por parte da trombina produzida localmente, do fibrinogênio em fibrina (GURTNER; NELIGAN, 2015).

Um segundo componente da hemostase é a cascata da coagulação, pelas vias intrínseca e extrínseca. A primeira inicia-se pela ativação do fator XII e, a última, pela libertação do fator tecidual pelos tecidos lesados. As plaquetas também contribuem para os mecanismos celulares da fase inflamatória e para as etapas da fase proliferativa, porque o coágulo de fibrina constitui uma matriz provisória para a migração de várias células (leucócitos, queratinócitos, células endoteliais, fibroblastos) e é reservatório de fatores de crescimento. As células plaquetárias também secretam vários fatores de crescimento (fator de

crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), fator de crescimento de transformação- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento epidérmico (EGF)) igualmente importantes na progressão normal da cicatrização (MANDELBAUM; DI SANTIS; 2013).

#### 2.2.1.2 Mecanismos celulares

Esta etapa é dominada pelo influxo local de leucócitos, numa fase precoce com predomínio de neutrófilos e monócitos e, posteriormente, com declínio no número de neutrófilos e predomínio de macrófagos. Para além do contributo celular, estes mecanismos são igualmente dependentes de mediadores químicos (GURTNER; NELIGAN, 2015).

Os neutrófilos e os monócitos são recrutados ao local da ferida por quimiocinas libertadas durante a fase de hemostase e por mastócitos. Os neutrófilos desempenham funções de lise e de fagocitose de bactérias e proteínas presentes no leito da ferida. A infiltração por neutrófilos pode durar normalmente alguns dias, podendo prolongar-se nas situações de contaminação da ferida. Estas células são também responsáveis pela libertação de proteases (colagenase e elastase) que permitem a sua passagem pela membrana dos vasos (MANDELBAUM; DI SANTIS; 2013).

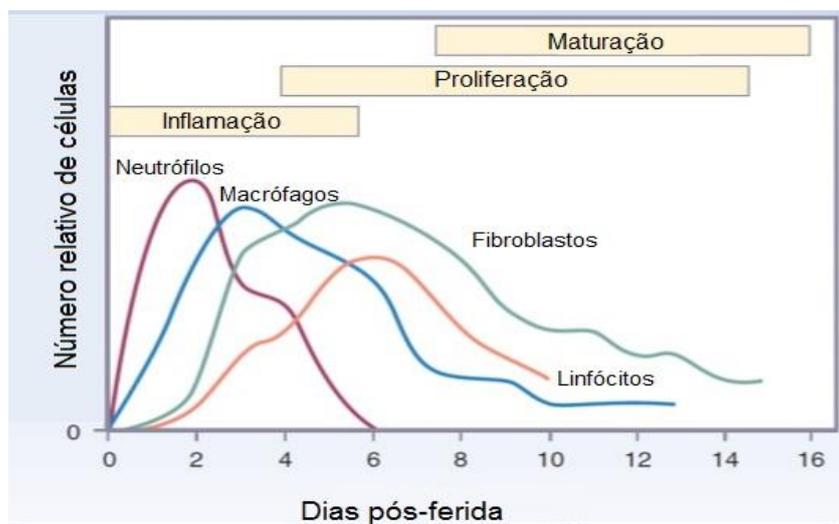
Os receptores de integrina presentes na superfície destas células vão permitir a sua comunicação com a MEC. Os monócitos são inicialmente recrutados pelas mesmas quimiocinas que os neutrófilos. No entanto, o seu recrutamento é prolongado pela ação de quimiocinas específicas dos monócitos, incluindo a quimiocina dos monócitos e a proteína inflamatória dos macrófagos (ALVES, 2015).

Os produtos de degradação da MEC, como o colágeno, a fibronectina e a trombina, são também específicos para os monócitos. Os macrófagos são considerados como a célula reguladora mais importante da fase inflamatória. Permitem a lise e a fagocitose, contribuindo para a progressão da cicatrização para a fase proliferativa, através da indução da angiogénese e da formação de tecido de granulação (BLANCK; GIANNINI, 2014).

Os macrófagos são responsáveis, ainda, pela libertação de vários fatores de crescimento (PDGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , fator de crescimento dos fibroblastos e fator de crescimento do endotélio vascular). Também ativam os elementos celulares das fases subsequentes da cicatrização, tais como fibroblastos e células endoteliais (figura 2) (GATNAU et al, 2012).

Tal como na etapa anterior, destaca-se a importância dos mediadores químicos na progressão e regulação dos vários fenómenos envolvidos. Estes mediadores podem ser agrupados em aminas vasoativas (histamina e serotonina), proteases plasmáticas (cininas e sistema complemento), proteínas da coagulação, derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), radicais livres, citocinas e fatores de crescimento (SILVA et al., 2017).

**Figura 2:** Evolução do número relativo de células sanguíneas e fibroblastos nas fases sequenciais do processo de cicatrização.



**Fonte:** adaptado de WITTE; BARBUL, 1997.

### 2.2.2 Fase proliferativa

A fase proliferativa é responsável pelo “fechamento” da lesão propriamente dita, sendo constituída por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Esta fase tem início ao redor do 4º dia após a lesão e se estende aproximadamente até o término da segunda semana. A epitelização ocorre precocemente. Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. Se a membrana basal for lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora (BLANCK; GIANNINI, 2014).

A angiogênese, essencial à formação do tecido de granulação, com aspecto granuloso, avermelhado e pouco consistente, é estimulada para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização por meio do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e é caracterizada pela

migração de células endoteliais e formação de capilares, necessária para a cicatrização adequada (KIM et al, 2012).

A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência. O fator de crescimento mais importante na proliferação e ativação dos fibroblastos é o PDGF<sup>12</sup>. Em seguida é liberado o TGF- $\beta$ , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (MANDELBAUM; DI SANTIS; 2013).

### 2.2.3 Fase de maturação

A característica mais importante da terceira e última fase, a fase de maturação ou remodelamento, é a deposição de colágeno de maneira organizada, por isso é a mais importante clinicamente. O colágeno produzido inicialmente é mais fino do que o colágeno presente na pele normal, e tem orientação paralela à pele. Com o tempo, o colágeno inicial (colágeno tipo III) é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. Estas mudanças se refletem em aumento da força tênsil da ferida (MANDELBAUM; DI SANTIS; 2013).

Ocorre, nesta fase, a contração cicatricial, um movimento centrípeto das bordas da ferida que produz uma diminuição da área lesada e, juntamente com a reepitelização, participa ativamente para o fechamento da ferida. A delgada epiderme, formada inicialmente, é frágil em decorrência da ausência das interdigitações entre o epitélio e o conjuntivo subjacente (BLANCK; GIANNINI, 2014).

A reorganização da nova matriz é um processo importante da cicatrização. Fibroblastos e leucócitos secretam collagenases que promovem a lise da matriz antiga. Mesmo após um ano a ferida apresentará um colágeno menos organizado do que o da pele sã. O objetivo final destes fenômenos complexos e coordenados será a formação de um tecido de estrutura e função semelhantes às da pele íntegra (KIM et al, 2012).

É consenso, atualmente, que a resolução completa de uma ferida somente pode ser considerada depois de concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular. Este processo ocorre lentamente levando muitos meses ou às vezes anos e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal,

sendo que a função pré-cicatrização nunca é totalmente recuperada (GURTNER; NELIGAN, 2015).

### **2.3 Processo Inflamatório**

Descrições das características clínicas da inflamação foram encontradas em papíros egípcios, datados de aproximadamente 3000 a.C., mas o primeiro autor a listar os quatro sinais cardinais da inflamação foi Celsius, um escritor romano do século I d.C., que relatou o aumento no fluxo sanguíneo e a dilatação dos pequenos vasos (rubor), a permeabilidade vascular aumentada (tumor) que levaria a um aumento na temperatura local (calor), à passagem de células do sangue circulante e dor local (VAZ et al, 2014).

No século XIX, Virchow acrescentou ainda um quinto sinal que seria a perda de função. Essas modificações são realizadas por mediadores inflamatórios gerados durante a resposta imune. Duas principais classes de mediadores são as prostaglandinas e os leucotrienos (RUH et al, 2013).

A pele como qualquer órgão do corpo está sujeita às injúrias do meio ambiente. Numa lesão cutânea, por exemplo, o processo inflamatório representa uma fase crítica do reparo tecidual, desencadeada em resposta a um determinado agente agressor. Sendo um mecanismo de defesa, é orquestrado por um amplo contingente de mediadores químicos capazes de agir no local da agressão ou sistemicamente (VAZ et al, 2014).

Desta forma, a imunidade natural consiste na primeira linha de defesa do organismo, ocorrendo o recrutamento de leucócitos que impede, controla ou elimina a invasão por patógenos e/ou danos teciduais no hospedeiro. A reação da imunidade natural, ou inflamação, é uma resposta do organismo a estímulos nocivos, tais como trauma, invasão de partículas estranhas, infecção de microrganismos, neoplasia maligna e reações autoimunes (VAZ et al, 2014).

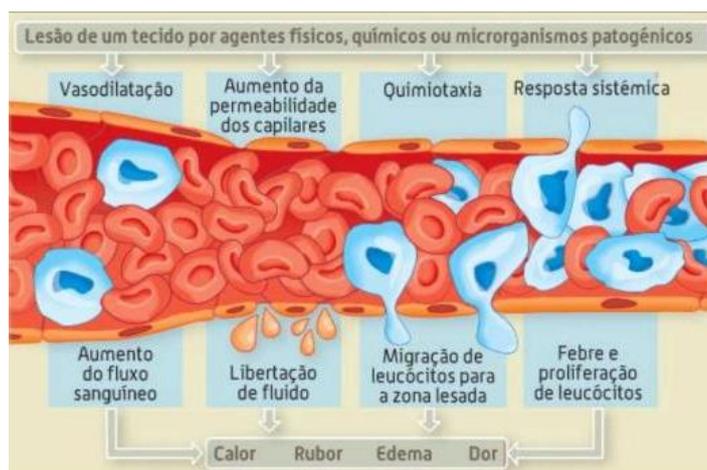
Assim, o processo inflamatório sob um determinado ponto de vista, pode ser encarado como um mecanismo de defesa do organismo e, como tal, atua destruindo (fagocitose e anticorpos), diluindo (plasma extravasado) e isolando ou sequestrando (malha de fibrina) o agente agressor, além de abrir caminho para os processos reparativos (cicatrização e regeneração) do tecido afetado. Entretanto, a inflamação pode ser potencialmente danosa, uma vez que em sua manifestação pode lesar o próprio organismo, às vezes de forma mais deletéria que o próprio agente injuriante, como ocorre por exemplo na artrite reumatóide do homem e em alguns tipos de pneumonia. Mas, a tendência da maioria dos estudiosos ao se

referir a este processo concentra-se em exaltar suas ações benéficas e minimizar as indesejáveis (RUH et al, 2013).

Pode-se dividir a inflamação em dois grandes tipos, aguda e crônica. A inflamação aguda, como o próprio nome refere, é caracterizada por ser a resposta inicial a um agente agressor e o aparecimento dos sinais flogísticos. É limitada, durando poucos dias, podendo resultar na cicatrização tecidual ou cronificação da inflamação. Também há diferenciação dos tipos celulares e mediadores químicos envolvidos, em relação a inflamação crônica (VAZ et al, 2014).

Algumas células participam ativamente da resposta inflamatória contra agentes agressores (figura 3). A maioria delas chega ao local da injúria via corrente sanguínea, como acontece com os polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos), os monócitos e os linfócitos. Algumas dessas células cumprem a função de defesa elaborando substâncias específicas (anticorpos e linfocinas) que neutralizam ou destroem o agente agressor - são os linfócitos e plasmócitos da defesa imunológica (SILVA et al., 2017).

**Figura 3:** Alterações celulares e vasculares responsáveis pela sintomatologia do processo inflamatório.



**Fonte:** <https://belezanoar.net/2016/04/21/fisiopatologia-processo-inflamatorio->

O outro tipo celular desempenha sua função fagocitando e digerindo, no seu interior, o agente agressor. É o caso dos macrófagos e leucócitos polimorfonucleares granulócitos (neutrófilos e eosinófilos). Ainda se tem células endoteliais que quando ativadas produzem substâncias que irão atuar sobre a coagulação e adesão leucocitária (ROBBINS, 2013).

A inflamação crônica representa o processo pelo qual o agente agressor se perpetua ou a resposta orgânica não cessa levando a um estado permanente inflamatório, que pode ser

local ou sistêmico. Há destruição e reparo tecidual ocorrendo concomitante, frequentemente sua sintomatologia, diferente da aguda que é bem marca pela flogose, é pouco intensa e de início insidioso, até uma fase mais tardia, onde já há intenso dano (VAZ et al, 2014).

Na inflamação crônica, tem-se um repertório celular e químico diferente da inflamação aguda, que leva a cronicidade da lesão, devido a continuidade do estímulo ou a não modulação inflamatória pelo organismo. Essa resposta acaba, em longo prazo, sendo deletéria ao organismo gerando dano tissular e posteriormente doenças relacionadas a perda da função destes tecidos lesados. Em contraste com a inflamação aguda, onde predomina fenômenos vasculares e exsudativos, tem-se um componente proliferativo com formação de fibrose. O principal componente infiltrativo celular são as células mononucleadas (macrófagos, linfócitos, plasmócitos). A destruição tissular é produzida pela permanência do agente agressor ou pela ação das células inflamatórias, gerando o posterior reparo por fibrose (ROBBINS, 2013).

Por conseguinte, uma inflamação extensa, prolongada ou não regulada, é altamente prejudicial ao organismo e esta desregulação dos mecanismos biológicos e moleculares que envolvem a resposta inflamatória pode causar sérios danos ao organismo, como por exemplo septemia, doenças infecciosas, traumas, asma, alergia, doenças autoimunes, rejeição de transplantes, câncer, doenças neurodegenerativas, entre outros (RUH et al, 2013).

Os processos inflamatórios estão fortemente associados a diversas doenças crônicas, tais como a síndrome metabólica, obesidade, diabetes mellitus, doenças coronárias e autoimunes, pois os sistemas metabólico e imune estão intimamente ligados e agem de modo interdependente. Muitos hormônios, citocinas, proteínas sinalizadoras, fatores de transcrição e lipídios bioativos podem acionar ambos os sistemas de modo que o tecido adiposo passe a ter uma função secretória de substâncias pró-inflamatória que antes eram associadas apenas ao sistema imune, como as interleucinas-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e proteína C-reativa (PCR) (ROBBINS, 2013).

Os impactos causados decorrentes dos inúmeros exames laboratoriais e internações podem fazer com que o portador de doenças crônicas inflamatórias tenha alguns prejuízos por causa do absenteísmo ao trabalho ou até mesmo perda do vínculo empregatício com repercussões sociais e econômicas, além de manter elevados custos do tratamento (VAZ et al, 2014).

A abordagem terapêutica mais comum para reduzir a inflamação envolve o uso de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), entretanto tem sido limitada devido aos

seus efeitos colaterais, que incluem lesões gastrointestinais, renais e hepáticas. Por esse motivo, a busca por substâncias e coberturas que possam atuar na modulação da resposta inflamatória com efeitos colaterais mínimos é intensa e estudos experimentais têm sido conduzidos a fim de fornecer alternativas terapêuticas com tais finalidades (GOMEZ; ROCHA; GOMBERG, 2016).

#### **2.4 As plantas no tratamento de lesões e a atuação da enfermagem**

O uso do poder curativo das plantas tem acompanhado a espécie humana, sendo que as primeiras civilizações perceberam que determinadas espécies continham princípios biologicamente ativos, os quais ao serem usados no combate às doenças, revelaram empiricamente seu potencial terapêutico (MACHADO et al, 2017).

Ao longo dos séculos, produtos de origem vegetal constituíram as bases para tratamento de diversas doenças, quer de forma tradicional, devido ao conhecimento das propriedades de determinada planta, que é passado de geração a geração, quer pela utilização de espécies vegetais, como fonte de moléculas ativas (PIRIZ et al., 2014).

Os primeiros registros do uso plantas no tratamento de doenças datam 3.000 anos a.C. na China com a catalogação de 365 ervas medicinais, que foi reconhecida como primeiro herbário do mundo. No Brasil, essa prática está enraizada nas culturas indígenas com os seus curandeiros e pajés, sendo também muito influenciada pelos povos africanos e portugueses (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006). Uma das principais utilizações de plantas era no tratamento das feridas, com a utilização de extratos e macerados das folhas para estancar as hemorragias e favorecer o processo cicatricial (PIRIZ et al., 2014).

Além da ação cicatricial, anti-inflamatória e antimicrobiana que várias espécies possuem, há certas vantagens ao se utilizar plantas para fins de tratamento e cura, quando comparadas a drogas sintéticas, como, por exemplo, ausência de efeitos colaterais e reações adversas intensas e abundância destas espécies no território brasileiro, permitindo, assim, maior facilidade de acesso e valorização do emprego de preparações à base de plantas para fins terapêuticos, nas duas últimas décadas (MACHADO et al, 2017).

Atualmente, as plantas medicinais são um dos maiores recursos naturais utilizados na síntese de novos agentes terapêuticos. A diversidade de compostos biologicamente ativos presentes nestas plantas representa uma alternativa promissora para a descoberta e o desenvolvimento de potenciais agentes anti-inflamatórios, possivelmente com menores efeitos adversos e com novas estratégias de controle da inflamação (SÉFORA-SOUSA; ANGELIS-

PEREIRA, 2013). Outros fatores têm colaborado para a utilização destas, tais como, as baixas condições socioeconômicas da população, altos custos dos fármacos industrializados e difícil acesso da população a assistência à saúde (MACHADO et al, 2017).

Considerando que as medicações não podem ser utilizadas continuamente devido principalmente aos seus efeitos adversos, torna-se importante o conhecimento sobre a utilização de plantas na prevenção e/ou no tratamento de afecções, conferindo uma segurança no seu uso em longo prazo, adiando, portanto, as medicações alopáticas e conseqüentemente seus efeitos colaterais (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

Dentro dessa prática, foi pactuada na Comissão Intergestores Tripartite, aprovada pelo Conselho Nacional de Saúde no ano de 2005 e publicada por meio de Portaria GM nº 971, de 03 de maio de 2006, a Política Nacional de Práticas Complementares e Integrativas do SUS (PNPIC) que propôs a inclusão das Plantas Medicinais e dos Fitoterápicos como opções terapêuticas no Sistema Público de Saúde (BRASIL, 2012).

Essa política traz dentre suas diretrizes a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e de Fitoterápicos de interesse ao SUS (RENISUS) em 2009, que apresentou uma lista com 71 diferentes espécies vegetais de interesse ao SUS visando o acesso seguro e o uso racional pela população, de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2016). Desta forma, é importante conceituar as diferenças entre os termos plantas medicinais, fitoterápicos e fitoterapia.

De acordo com a definição proposta pela ANVISA, as plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade. Para usá-las, é preciso conhecer a planta e saber onde colhê-la e como prepará-la. Quando a planta medicinal é industrializada para se obter um medicamento, tem-se como resultado o fitoterápico. Já o termo fitoterapia foi dado à terapêutica que utiliza os medicamentos cujos constituintes ativos são plantas ou derivados vegetais, e que tem a sua origem no conhecimento e no uso popular (BRASIL, 2012).

Acredita-se que o cuidado realizado com o uso de plantas medicinais seja favorável à saúde humana, desde que o usuário tenha conhecimento prévio de sua finalidade, além dos riscos e benefícios. Ademais, o profissional de saúde deve considerar tal recurso de origem popular na sua prática de cuidar, viabilizando um cuidado singular, centrado nas crenças, valores e estilo de vida das pessoas cuidadas (NUNES; MACIEL, 2013).

O profissional enfermeiro deve atentar tanto para as questões culturais da comunidade quanto para a multidimensionalidade do ser humano. Desse modo, é necessário levar em

consideração o compromisso com o cuidar, o que pode favorecer não apenas diagnósticos, resultados e intervenções de enfermagem, mas todo o planejamento da prática, tornando o convívio das pessoas com processos inflamatórios, menos sofrível (SILVA et al, 2014).

O saber popular deve ser compreendido e acrescido de conhecimentos e atitudes respaldados pelo saber científico, ampliando as pesquisas sobre a utilização de plantas medicinais na perspectiva de garantir uma assistência integral e acolhedora por parte dos profissionais do SUS (PIRIZ et al, 2014).

O importante é que o conhecimento sobre plantas medicinais possa contribuir, efetivamente, na área da saúde, suprimindo as necessidades básicas de cada população, aqui especial, no que tange ao tratamento de inflamações, prática tão familiar à enfermagem. Neste contexto, a enfermagem tem expandido sua visão em saúde no campo da pesquisa básica e valorizado a cultura e a tradição popular pelo uso de plantas medicinais. Esta temática, associada às condições econômicas do país e baseada na realização de pesquisas experimentais, promove à incorporação de novos conhecimentos relacionados às práticas e saberes da enfermagem (SILVA et al, 2014).

Sendo a assistência do enfermeiro, fundamental, na atenção primária, exige que este profissional detenha conhecimentos técnico-científicos, além de discernimento para o exercício de juízo profissional, não se restringindo apenas à execução de técnicas curativas, para debelar a inflamação e prevenir infecções, que se caracteriza somente como uma tarefa mecânica a ser executada em complacência com a prescrição médica (NUNES; MACIEL, 2013).

Desta forma, comprovar cientificamente e contribuir para o tratamento de lesões, por meio da avaliação de novas coberturas associadas à ação de espécies vegetais, reafirma a autonomia e o papel fundamental do enfermeiro na integralidade de suas ações (SILVA et al, 2014).

## **2.5 Considerações sobre a espécie *Hyptis pectinata* L. Poit**

A espécie vegetal *H. pectinata*, conhecida popularmente em Alagoas como sambacaitá ou canudinho (figura 4), pertence à família Lamiaceae e é constituída por 250 gêneros, correspondendo a um dos principais gêneros da subfamília Nepetoideae que possui 280 espécies. Está presente em todo território nacional, nos domínios fitogeográficos amazônia, caatinga, cerrado e mata atlântica, podendo desenvolver-se de forma selvagem ou cultivada

em volta de residências, principalmente nos Estados de Alagoas e Sergipe. Tem sido produto frequente em barracas de raizeiros locais (CARVALHO et al, 2015).

Esta planta mede de um a dois metros de altura, com hábito herbáceo a arbustivo, folhas opostas em pares cruzados, curto-pecioladas, de limbo ovalado-lanceolado, com base levemente cordada e ápice agudo, com margem crenado denteada, coloração verde, densa pilosidade branca em ambas as faces e glândulas produtoras de compostos voláteis aromáticos. O caule apresenta formato quadrangular, ereto, estriados longitudinalmente, ramificados na parte superior com ramos ascendentes, terminados em inflorescências de aspecto aglomerado compostas por flores pequenas, bilabiais, hermafroditas, pentâmeras, zigomorfas, com os estames presos ao lábio inferior da corola (KISSMAN; GROTH, 1995).

De acordo com vários autores, a morfologia da corola de *Hyptis* é característica das espécies com mecanismo de polinização explosiva realizada na presença de insetos, sendo considerada uma planta hermafrodita, anual reproduzida por sementes, com ciclo de 120 dias (OLIVEIRA et al., 2011).

**Figura 4.** *Hyptis pectinata* L. Poit.



**Fonte:** <http://tropical.theferns.info/image.php?id=Hyptis+pectinata>

Apresenta uma distribuição pantropical, ocorrendo na América, desde os EUA, nos estados do Hawaii e Califórnia, até a região sul do Brasil (EUA, 2005; KISSMAN; GROTH, 1995); bem como na África, tanto em países ao oeste do continente, como Costa do Marfim, quanto em países mais ao centro do continente como Camarões e Tanzânia. Na Ásia está presente sobretudo na Índia. Na Oceania está presente no norte da Austrália, Nova Zelândia e

em várias outras ilhas banhadas pelo Pacífico, como as Ilhas Fiji (MALAN et al., 1988; TCHOUMBOUGNANG et al., 2005; PIETSCHMANN et al., 1998).

Na grande maioria dos lugares onde ocorrem, suas folhas são tidas como um poderoso e tradicional recurso terapêutico. No México, por exemplo, seu uso remete às civilizações précolombianas e ainda hoje é usada pela população, sobretudo do meio rural, contra doenças dos tratos respiratório e gastrointestinal, febres, infecções, dores musculares e reumatismo (PEREDA-MIRANDA, 1993); na Guiana Francesa é usada contra a malária (VIGNERON et al., 2005).

Independente da distância geográfica, as indicações populares de uso da *H. pectinata* tendem a se repetir, ainda que a forma de utilização mude. No México, as folhas da planta são utilizadas sob a forma de inalação contra rinfaringite e outros males respiratórios como na Costa do Marfim, onde além desta modalidade também é utilizado o sumo, obtido das folhas prensadas, levemente aquecido; como gotas nasais, para o mesmo fim (MALAN et al., 1988).

No Brasil, a *Hyptis pectinata* é muito valorizada por suas propriedades anti-inflamatória e anti-séptica; sua principal forma de utilização popular é a ingestão de chás (infusões e decocções), para as mais diversas indicações- problemas gástricos ou respiratórios, câncer, infecções, febre- mas também é muito usada sob a forma de bochechos, contra afecções da cavidade oral, e curativo, contra doenças de pele (MARMITT et al., 2015).

Muitas espécies dessa família são ricas em óleos essenciais, que são produtos voláteis, proveniente do metabolismo secundário das plantas, conferindo as principais características organolépticas do vegetal. Devido a essa particularidade, apresentam importância econômica, sendo utilizadas na culinária, perfumarias e para fins terapêuticos (OLIVEIRA et al., 2011).

Com base nas diversas atividades medicinais atribuídas a *Hyptis pectinata* pela cultura popular em vários países, pesquisadores em diferentes partes do mundo começaram a estudar suas propriedades terapêuticas bem como sua composição química. Os primeiros estudos a esse respeito foram realizados por MALAN e colaboradores (1988), que avaliaram as propriedades antibacteriana e antimicótica do seu óleo essencial, de espécimes coletados na Costa do Marfim (MALAN et al., 1988) e depois investigaram os seus constituintes químicos, identificando 33 compostos, dentre os quais os principais foram: pimenene (33.7%), timol (26.0%), gama-terpineno (8.9%), alfa-thujeno (6.5%) e mycrene (5.0%). Isto permitiu justificar pela presença do timol as propriedades antisépticas apresentadas pelo óleo essencial.

Além destes compostos, outros estudos já realizados identificaram também a presença de sesquiterpenoides com altos teores de calamusenone,  $\beta$ -cariofileno, cis- $\beta$ -guainene, óxido

de cariofileno. Outra pesquisa realizada com experimento *in vivo* comprovou que estes compostos são responsáveis pela atividade antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória desta espécie (SERAFINI, 2012).

Por conseguinte, estudos com o extrato metanólico da *H. pectinata*, permitiram a identificação e avaliação farmacológica de novos compostos orgânicos identificados como pironas, o primeiro deles foi o hyptolide, que apresentou modesta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e nenhuma atividade contra as amostras de bactérias gram-negativas ou *Candida albicans* (ROJAS et al,1992). Do extrato clorofórmico foi isolada uma pirona, a qual não apresentou atividade citotóxica, mas teve significativa atividade antimicrobiana contra duas linhagens de *Staphylococcus aureus* multi-resistentes a vários antibióticos (FRAGOSO-SERRANO; PEREDA, 2005).

A análise química do óleo essencial da *H. pectinata* mostrou, que variações genéticas e o ambiente de armazenamento podem alterar a concentração entre os mesmos tipos de princípios ativos, como os monoterpenos e sesquiterpenos – que são metabólitos secundários de origem vegetal, com propriedades terapêuticas. Fatores atribuídos ao solo, clima, sazonalidade, tempo e tipo de cultura também conseguem alterar a similitude das qualidades físico-químicas do vegetal (MENEZES, 2015; JESUS et al, 2016).

A partir do conhecimento popular várias outras atividades farmacológicas da *H. pectinata* foram pesquisadas e comprovadas. No sistema digestivo de ratos wistar, o extrato aquoso reduziu significativamente as lesões gástricas induzidas por indometacina ou etanol, além de também reduzir o esvaziamento gástrico, efeito esse relacionado com o sistema opióide (FREIRE et al, 2000); o extrato apresentou ainda redução da motilidade gastrintestinal, justificando o uso popular contra diarreia.

O óleo essencial da *H. pectinata* também apresentou significativa atividade gastroprotetora, no modelo de úlcera induzida por etanol a 70 % em camundongos swiss (SOUZA; BATISTA, 2005). Sobre o tecido hepático de ratos wistar, o extrato aquoso de sambacaitá apresentou funções hepatoprotetora - observada pela redução dos índices de fosfatase alcalina e do aspartato aminotransferase de animais submetidos à operação simulada e hepatectomia parcial respectivamente – e hepatoregeneradora, demonstrada por marcador imunohistoquímico sensível à proliferação celular (MELO et al, 2001; SILVA et al, 2002).

O extrato aquoso e óleo essencial da *H. pectinata* apresentou efeito antinociceptivo demonstrado pelos modelos de nocicepção em camundongos: contorção abdominal induzida por ácido acético a 0,6%; placa quente e, apenas para o extrato, formalina, nos quais foi

sugerido que esse efeito se deu por ação central e periférica do extrato. Nestes mesmos trabalhos também foi avaliado o efeito antiedematogênico de ambos, em modelos de edema de pata, em ratos, induzidos por carragenina e, apenas para o extrato aquoso, ácido araquidônico, através dos quais foi sugerido um efeito inibitório das vias da ciclooxigenase e lipoxigenase, para o extrato aquoso e, efeito inibitório da via da ciclooxigenase para o óleo essencial (BISPO et al, 2001).

Pesquisas sobre o efeito curativo do vegetal propõem que esta planta tem ação antileishmanial, investigação esta que é estimulada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), visto que o tratamento para leishmaniose é altamente tóxico, sendo necessário monitoramento hospitalar devido ao risco de morte (FALCÃO; MENEZES, 2003).

Quanto a sua ação anti-inflamatória, Raymundo et al (2011) investigaram esta atividade em óleos essenciais de *H. pectinata*, evidenciando resultados promissores para o tratamento da inflamação. Outros estudos avaliaram o potencial anti-inflamatório de *H. capitata*, *H. verticillata* (FALCÃO; MENEZES, 2003) e *H. crenata* (BRAVIM, 2008) espécies do mesmo gênero da *H. pectinata*, demonstrando ser eficazes na modulação do processo inflamatório.

Em relação à sua ação cicatrizante, apesar de vários estudos mencionarem a utilização empírica da espécie *H. pectinata* para este fim (SANTOS; PADRÃO, 2016; NASCIMENTO et al, 2016; GOMEZ; ROCHA; GOMBERG, 2016; FALCÃO, 2013; SILVA et al, 2002; MALAN et al, 1988), são extremamente escassas, na literatura científica, pesquisas experimentais que comprovem tal atividade biológica.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

Avaliar a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e de migração celular com vistas à cicatrização de feridas de extratos de *Hyptis pectinata* L. Poit.

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

- Identificar a viabilidade celular de macrófagos peritoneais por meio do Método Colorimétrico do Metiltetrazólio (MTT);
- Avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana extratos brutos e fracionados de folhas e galhos da *H. pectinata*;
- Determinar a atividade anti-inflamatória por meio do ensaio, *in vivo*, de peritonite induzida por carragenina;
- Aferir a capacidade de migração celular com vistas à cicatrização de feridas.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo de Estudo e locais dos experimentos**

Trata-se de uma pesquisa básica experimental, que visa produzir conhecimentos novos, dentro do desenho. Os testes *in vitro* e *in vivo* foram realizados nos seguintes laboratórios pertencentes à Universidade Federal de Alagoas/UFAL: Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas da Escola de Enfermagem e Farmácia – LpTF/ESENFAR, coordenado pela Profa. Dra. M<sup>a</sup> Lysete de Assis Bastos; Laboratório de Química Medicinal, coordenado pelo Prof. João Xavier de Araújo Júnior, Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais, coordenado pela Profa. Dra. Lúcia Maria Conserva do Instituto de Química e Biotecnologia – LPqPN – Fitoquímica/IQB; Laboratório de Farmacologia e Imunidade do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – LaFI/ICBS, coordenado pelas Profas. Dras. Eliane Aparecida Campesatto e Magna Suzana Alexandre Moreira.

### **4.2 Aspectos éticos**

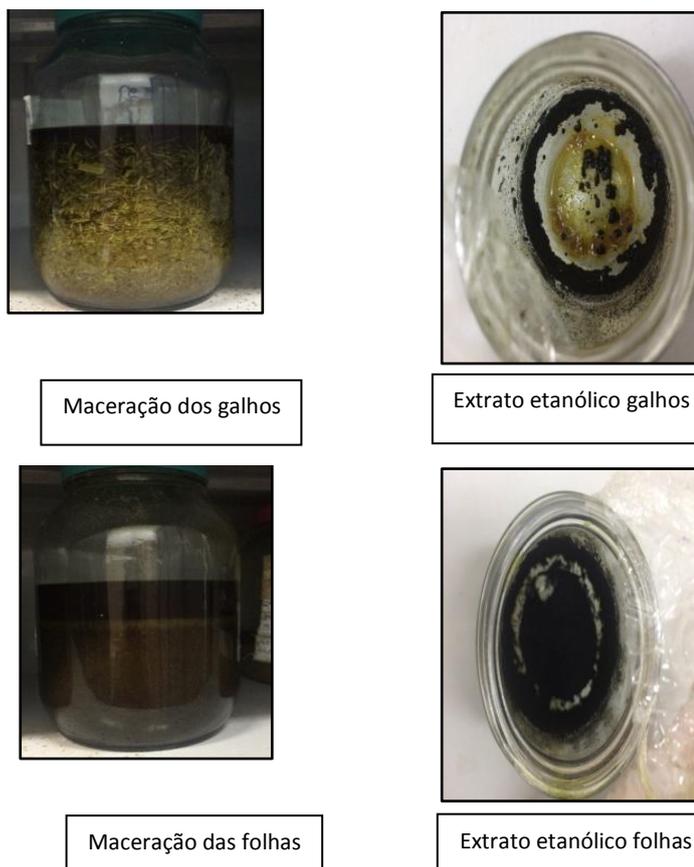
O presente projeto de pesquisa encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), com nº41/2016, por se tratar de um trabalho que envolve experimentos *in vivo*. Os protocolos foram conduzidos respeitando-se os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

### **4.3 Coleta do material vegetal e preparação do extrato**

Galhos e folhas da *H. pectinata* foram coletados em janeiro de 2017 em uma propriedade privada (9° 32'29.0" S, 35° 45'43.9" W) no bairro Cidade Universitária, município de Maceió - AL, os quais foram identificados e catalogados por técnicos do Instituto de Meio Ambiente do Estado de Alagoas – IMA, com MAC nº 23601.

A secagem do material botânico foi realizada à sombra, com ar circulante durante 60 dias. Depois de dessecadas, as amostras vegetais foram trituradas, pesadas (galhos: 212g; Folhas: 293,4g) e submetidas a um processo de maceração a frio com álcool etílico a 97% (Figura 5). A filtração foi realizada a cada 72 h, até o esgotamento do processo de extração. A cada filtração, a solução com extrato foi concentrada em evaporador rotativo a 40 °C e mantida em estufa banho-maria, na mesma temperatura, para evaporação do solvente residual e obtenção do extrato bruto etanólico, que resultou em 4,4g dos galhos e 4,6 g das folhas.

**Figura 5.** Processo de preparação dos extratos etanólicos de *Hyptis pectinata*



**Fonte:** Autora, 2018.

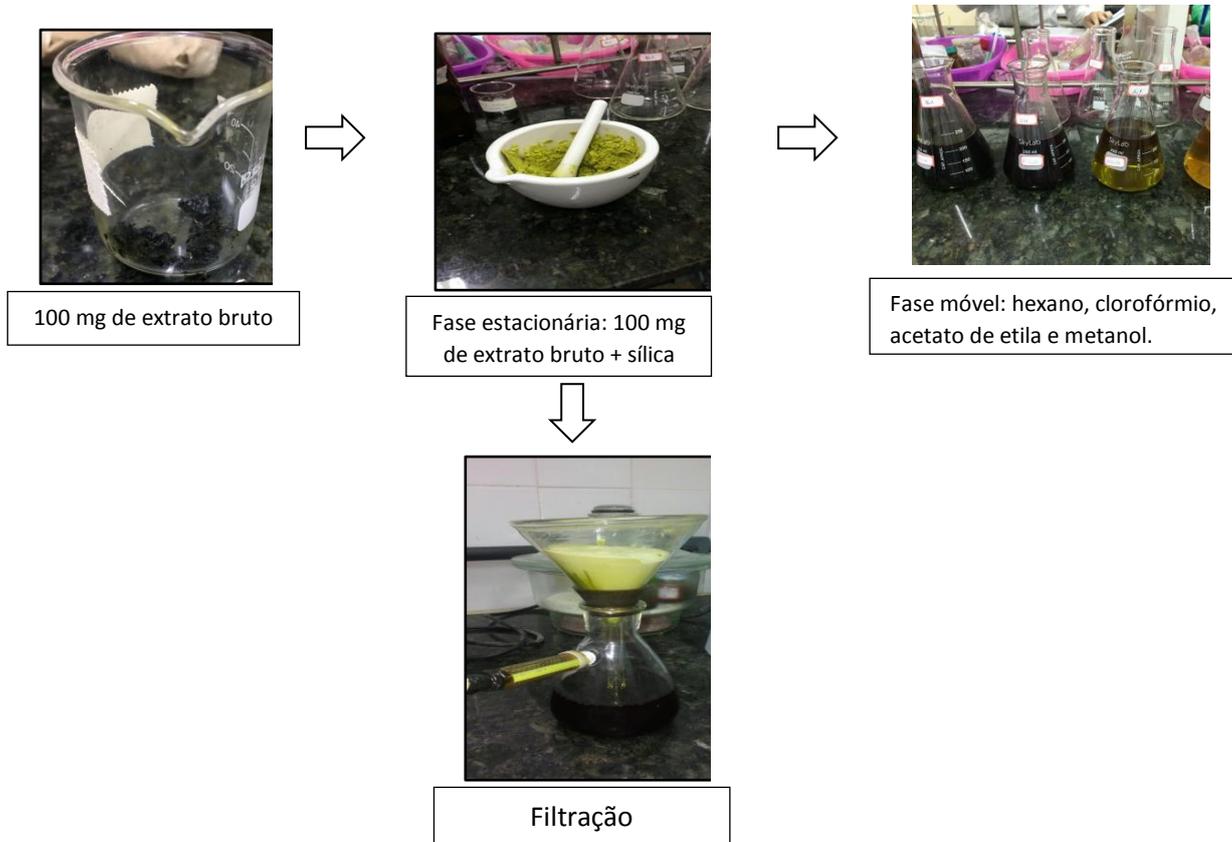
O solvente etanol ( $C_2H_5OH$ ) apresenta uma baixa toxicidade, constituindo um fator determinante no processo de extração de compostos ativos com a finalidade de fabricação de fitomedicamentos. Também, possui um menor impacto ambiental e financeiro, frente aos demais (SILVA; CAMPOS, 2013). Por isso, foi o eleito para a extração do material vegetal.

#### **4.4 Fracionamento do extrato etanólico bruto da *Hyptis pectinata***

Depois de finalizada a etapa de extração, o passo sequencial foi a realização da partição dos extratos brutos, em que se utilizou a ordem crescente de polaridade (MATOS, 2009), visando uma semi-purificação dos extratos brutos. Uma alíquota de 100 mg do extrato etanólico bruto das folhas e galhos foi particionada em coluna filtrante sob vácuo, utilizando como fase estacionária, sílica gel e como fase móvel, hexano ( $C_6H_{14}$ ), clorofórmio ( $CHCl_3$ ), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), de acordo com a figura 6. A filtração foi realizada utilizando-se os solventes puros, até que toda a coloração desaparecesse em todas as soluções e da coluna, respectivamente.

As soluções obtidas foram concentradas em evaporador rotativo. Posteriormente, os materiais úmidos foram colocados em frascos adequados e secos em temperatura ambiente. Ao final, foram obtidas quatro frações de galhos: (6,4 mg) hexânica, (2,7 mg) clorofórmica, (3,9 mg) acetato de etila e (10,3 mg) metanólica; e quatro frações de folhas: (8,0 mg) hexânica, (11,1 mg) clorofórmica, (3,8 mg) acetato de etila e (6,9 mg) metanólica.

**Figura 6.** Processo de fracionamento dos extratos etanólicos de *H. pectinata*.



**Fonte:** Autora, 2017.

#### 4.5 Análise Fitoquímica

A prospecção fitoquímica é um estudo dos princípios ativos vegetais que objetiva descobrir os principais componentes existentes nas plantas, podendo identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes úteis enquanto marcadores químicos, sendo importante, principalmente, quando ainda não são dispostos todos os estudos químicos com espécies de interesse popular, possibilitando, assim, uma possível comparação com os dados presentes na literatura (BESSA et al, 2013). Para este estudo, a prospecção fitoquímica foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Matos (2009).

No geral, as plantas produzem compostos que são caracterizados em metabólitos primários e secundários. Os primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, estando relacionados a um conjunto de processos que desempenham funções essenciais na planta, tais como fotossíntese, respiração, síntese de aminoácidos e transporte de solutos. São encontrados em todas as células vegetais e, são macromoléculas como açúcares, carboidratos, aminoácidos, lipídeos, proteínas, clorofila e ácidos nucleicos (BRAZ FILHO, 2010).

Em contrapartida, a presença dos metabólitos secundários está associada com várias funções ecológicas, possuindo um papel fundamental nos seus sistemas de defesa contra os ataques de herbívoros, de patógenos, na competição entre as plantas, na atração de organismos benéficos (simbiose, polinizadores), proteção contra estresse biótico (mudanças de temperaturas, radiação solar, níveis de água e luz, deficiência de nutrientes minerais) (BRAZ FILHO, 2010).

Embora não sejam essenciais para a vida das plantas, os metabólitos secundários desempenham função importante na interação delas com o meio ambiente, contribui com aromas, cores e a resistência a doenças e ou pragas (MOURA, 2015), o que, provavelmente, têm alguma relação com o potencial efeito medicinal para os seres humanos, (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Destaca-se a importância desses metabólitos de espécies vegetais para a área da saúde e biotecnologia em decorrência dos benefícios para a espécie humana, relacionados às propriedades biológicas que se caracterizam por diferentes usos como medicamentos, herbicidas, perfumes, corantes, etc (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Os metabólitos secundários podem ser divididos em quatro classes, quais sejam terpenos, compostos fenólicos, glicosídeos e alcaloides (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Os testes qualitativos e semi-quantitativos realizados abrangem ensaios para fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequina, flavanonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, xantonas, esteroides, triterpenos, saponinas, alcaloides, antraquinonas, antranas e cumarinas. Para a realização dos testes foram retirados 30 mg de cada amostra, que foram solubilizadas em 30 mL de etanol, sendo colocadas em tubos de ensaio numerados.

#### 4.5.1 Teste para saponinas

A palavra saponina ou saponosídeo provém do fato de liberarem espuma quando misturadas com água à semelhança do sabão. Constituem um grupo particular de heterosídeos, tendo uma parte lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra hidrofílica (carboidratos), que determina a propriedade de redução da tensão superficial da água, característica de sua ação emulsificante. Esse composto irrita a mucosa, provoca um relaxamento intestinal, aumenta as secreções mucosas dos brônquios, também usada como diurético e desinfetante das vias urinárias e anti-inflamatório (SANTOS et al, 2013).

O resíduo insolúvel em clorofórmio do teste anterior foi dissolvido em 10 mL de água destilada e filtrado para um tubo de ensaio. Após agitação de aproximadamente dois minutos foi observado se ocorreu a formação de espuma. O aparecimento de espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas.

#### 4.5.2 Teste para Antocianinas, Antocianidinas e Flavanoides

Os flavonoides constituem a maior classe de compostos fenólicos de plantas, classificados em quatro grupos: Antocianinas, flavonas, flavonóis e isoflavonas. São pigmentos naturais presentes nos vegetais que desempenham um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, como por exemplo, os raios ultravioletas, a poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, entre outros. Atuam também, como agentes terapêuticos graças à atividade como antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral; além de possuir ação antimicrobiana, por quebrar formação de complexos com as proteínas das membranas plasmáticas das bactérias (OLIVEIRA et al., 2010; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Para avaliar a presença desses componentes foram preparados três tubos de ensaios, que correspondeu à cada classe química. O pH do tubo 1 foi aferido para 3, a partir de uma solução de ácido clorídrico (HCL) 3 mol/L. Nos tubos 2 e 3 o pH foi alcalinizado com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L obtendo-se, um pH de 8,5 e 11 respectivamente. As mudanças de coloração foram interpretadas da seguinte maneira, conforme apresentado no quadro 1.

**Quadro 1** - Colorações indicativas para a presença de antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas, chalconas, auronas e flavanonóis.

Constituintes	Coloração observada		
	Ácido pH = 3	Alcalino pH = 8,5	Alcalino pH = 11
<b>Antocianinas e antocianidinas</b>	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
<b>Flavonas, flavonóis e xantonas</b>	-	-	Amarela
<b>Chalconas e auronas</b>	Vermelha	-	Vermelho púrpuro
<b>Flavanonóis</b>	-	-	Vermelho laranja

Fonte: Matos, 2009.

#### 4.5.3 Teste para fenóis e taninos

Os Taninos são compostos fenólicos hidrossolúveis com peso elevado. Estão associados aos mecanismos de defesa das plantas contra insetos e são responsáveis pela adstringência das plantas, ao precipitarem alcaloides, gelatina e outras proteínas formando um complexo insolúvel em água com estes compostos. As ações farmacológicas relacionadas referem-se a antissépticos, antioxidantes, antídotos em intoxicação por metais pesados, cicatrizantes, protetores, reepitelizantes e antidiarreicos (PEREIRA; CARDOSO, 2012) e muitas atividades fisiológicas humanas, como a estimulação das células fagocíticas e ação antitumoral, além das atividades anti-infecciosas (MONTEIRO et al., 2005).

A palavra *tanino* é largamente usada, particularmente em literatura botânica, originalmente derivada do termo "tanante", implicando que o material vegetal produza couro a partir de peles. Ajudam no processo de cura das feridas, queimaduras e inflamações através de uma camada protetora sobre a pele e ou mucosa danificada (MONTEIRO, 2005).

Para identificar a presença de tanino, foram adicionadas três gotas de uma solução alcoólica de cloreto de ferro ( $\text{FeCl}_3$ ) em um tubo de ensaio contendo 3 mL da solução solubilizada. Em seguida, o mesmo foi agitado e a variação da coloração ou a formação de precipitado é observada, onde a coloração entre azul e vermelho indica a presença de fenóis. Por outro lado, a formação de um precipitado azul escuro, é indicativo de taninos hidrolisáveis e a formação de precipitado verde, a presença de taninos condensados.

#### 4.5.4 Teste para Antraquinonas, antronas e cumarinas

Antraquinonas são compostos orgânicos derivados do antraceno, formados a partir da oxidação de fenóis. Algumas antraquinonas são utilizadas industrialmente como pigmentos ou indicadores de pH e terapeuticamente como laxativos e catárticos, por agirem irritando o intestino grosso e aumentando a motilidade intestinal (SOUZA et al., 2003).

As cumarinas são compostos que possuem em comum um anel aromático fundido em um anel de lactonas condensado, com um princípio ativo natural existente em diversas plantas como o guaco, o agrião, a ipeca, o cumaru, a canela, a chicória, entre outras, e em frutas como o morango, a cereja, a framboesa e o damasco (SOUZA, 2005). São utilizadas como fixador de perfumes, aromatizantes de alimentos, além de possuírem propriedades antibióticas, broncodilatadora, anti-inflamatória, analgésica e também serem utilizadas em tratamentos contra o câncer. Sua propriedade anticoagulante é exercida de forma indireta, através da inibição da síntese dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K (PINTO et al., 2015).

Amostras foram solubilizadas em metanol, aplicadas na placa de cromatografia delgada e eluídas com mistura de  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (9:1). Após eluição, foi borrifado hidróxido de potássio (KOH) a 10% e, após esperar secar, foi observada a presença das cores indicativas em luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm. O surgimento de coloração azul é indicativo de cumarina; vermelho de antraquinona; e amarelo de antrona.

#### 4.5.5 Teste para Leucocianidinas, Catequinas, Flavanonas

As flavanonas são moléculas glicosiladas que são degradadas pelas enterobactérias presentes no intestino delgado e absorvidas como compostos aglicona (hesperitina e naringenina) e têm sido associadas a atividades hipolipidêmicas, anti-inflamatórias e anticancerígenas (MANTHEY; BENDELE, 2008).

Catequinas são compostos incolores, hidrossolúveis, que contribuem para o amargor e a adstringência do vegetal. Dentre seus benefícios à saúde humana destacam-se a redução na incidência de certos tipos de câncer, redução do colesterol sérico e estimulação do sistema imunológico (COZZOLINO, 2009).

Dois tubos de ensaios foram enumerados, no qual o primeiro ajustou-se o pH para 2 pela adição de HCL 1 mol/L e o segundo foi alcalinizado com NaOH 1 mol/L para pH 11. Posteriormente, os tubos foram aquecidos por 3 minutos. As mudanças de coloração observadas foram interpretadas da seguinte forma: se o tubo de pH 2 estiver com coloração

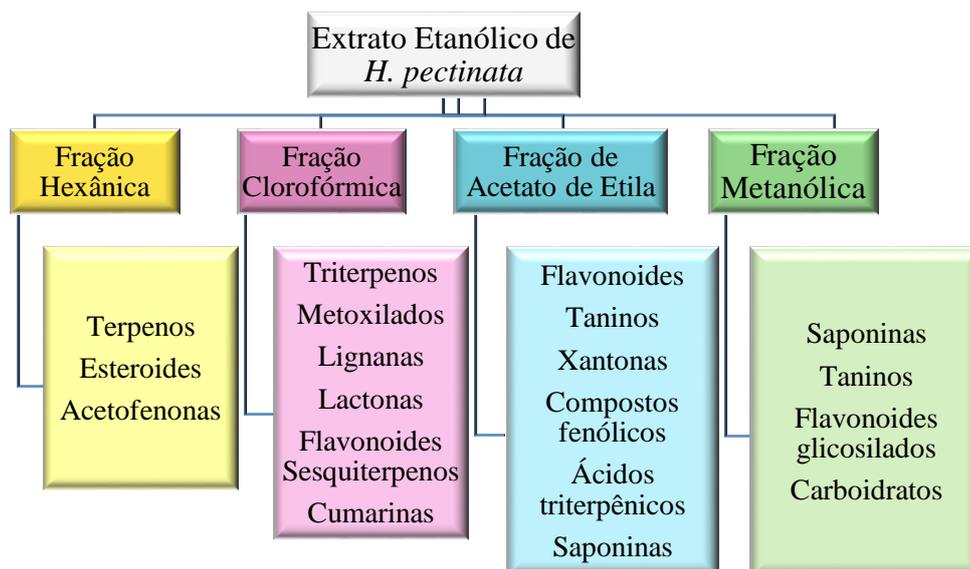
vermelha foi sugestivo de leucoantocianidinas; caso esteja com coloração pardo-amarelada foi sugestivo de catequinas; já no tubo de pH 11, caso esteja com a coloração vermelho laranja foi sugestivo de flavanonas.

#### 4.5.6 Teste para alcaloides

A avaliação da presença de alcaloides foi realizada por meio da técnica de cromatografia em camada delgada, utilizando a mistura de  $\text{CHCl}_3$ : MeOH (9:1) como eluente. Após eluição, o cromatograma foi revelado com reagente de *Dragendorff*. O surgimento de manchas de cor alaranjada sugere a presença de alcaloides.

Na figura 7, estão descritos os metabólitos secundários que são obtidos de acordo com a polaridade dos solventes utilizados para o fracionamento. Pode-se encontrar nas frações oriundas dos extratos etanólicos, as prováveis classes de metabólitos secundários (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

**Figura 7.** Esquema geral da partição e separação dos prováveis e principais metabólitos secundários presentes nos extratos da planta.



**Fonte:** Adaptado de Cechinel Filho; Yunes, 1998.

#### 4.5.7 Teste para esteroides e triterpenos (*Lieberman-Burchard*)

Esteroides e triterpenos constituem os óleos essenciais ou voláteis. Seu interesse terapêutico dá-se pela importância dos glicosídeos cardiotônicos, que fazem parte desse grupo. Destacando-se pela capacidade de inibir a absorção do colesterol da dieta, reduzindo

assim os níveis de colesterol circulante diminuindo com isso o risco de doença cardiovasculares (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Uma alíquota da amostra foi diluída em 2 mL de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e após, foi realizada a filtração da solução em um funil coberto com sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anidro para a retirada da água residual. A solução resultante foi colocada em um tubo de ensaio onde foi acrescido 1 mL de anidrido acético e, após agitação branda, foi adicionado ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Posteriormente, foi realizada uma nova agitação e foi possível a observação de mudança da coloração. A coloração azul evanescente seguida de verde permanente indicará a presença de esteroides livres, já a coloração de parda até vermelha indicará triterpenos pentacíclicos livres.

#### **4.6 Ensaio de viabilidade celular pelo teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT)**

O teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT) é baseado na atividade das mitocôndrias celulares pela redução do MTT, por meio das enzimas desidrogenases presente nas mitocôndrias ativas, responsável pela clivagem do sal de tetrazólio (de coloração amarelada) que resulta na formação de cristais de formazan (de coloração azul escura), sendo utilizado para a avaliação da citotoxicidade *in vitro*. A densidade óptica da reação resultante é determinada pelo espectrofotômetro. Quanto mais escura a coloração ao fim da reação, maior a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Foram avaliadas somente as amostras que apresentarem as menores CIM nos experimentos *in vitro*. Inicialmente, fibroblastos da linhagem 3T3 foram colocados em placas de 96 poços com a densidade de  $2 \times 10^5$ . Cada poço foi cultivado com o meio Dulbecco Mem (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, preenchido com 200  $\mu\text{L}$  do meio das células e e ficarão “over night” para melhor aderência das células à placa.

No dia seguinte, a amostra foi utilizada para tratar as células nas concentrações de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , 500  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  por 48 horas e após, foram levadas a estufa à 5% de  $\text{CO}_2$ . Como controle positivo foram utilizados poços com células lisadas e, para o controle negativo, células cultivadas e adicionadas a dimetilsulfóxido (DMSO).

Após incubação total de 48 horas, o sobrenadante foi descartado e em cada cavidade foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de MTT (500  $\mu\text{g/mL}$ ), sendo reincubado por mais 1 hora em estufa a  $37^\circ\text{C}$  à 5% de  $\text{CO}_2$ . Passado o período, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspensionado com 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. Uma hora antes de adicionar o MTT, em três poços, as células foram lisadas com 2  $\mu\text{L}$  de Triton 100x para comparação da morte celular.

Para a leitura das placas e quantificação do sal tetrazólio reduzido a formazan foi necessário o auxílio de um leitor de microplacas no comprimento de onda de 550 nm. Para obtenção dos resultados foi realizada uma análise por meio da média das absorbâncias, mais o erro padrão da média (SEM) e diferenças estatísticas entre os grupos tratados e os de controle que foram avaliados pelo teste Dunnett e ANOVA, no qual foi identificado por um asterisco ( $p < 0,05$ ) os níveis de significância em comparação com os grupos controle. O percentual de viabilidade celular foi calculado por meio da fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{\text{Absorbância do Tratamento}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

#### 4.7 Microdiluição em Caldo

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos e frações vegetais foi realizada por meio da técnica da microdiluição em caldo baseado no protocolo do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). As cepas avaliadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 31488), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), devido à maior predominância destas bactérias em lesões de pele (SANTOS et al., 2016).

Foram utilizadas microplacas de poliestireno estéreis, contendo cada uma delas 96 poços, com 12 colunas (1 a 12), sendo que as 3 últimas (10<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> colunas) correspondem, respectivamente, ao controle negativo (CN), controle de crescimento (CC) e controle de esterilidade da placa (CE).

As 8 linhas da placa são codificadas pelas letras de A a H e inicialmente, todos os poços foram preenchidos com 100  $\mu$ L de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). Um volume de 100  $\mu$ L da solução estoque, na concentração de 1000  $\mu$ g/mL das amostras de extratos brutos das folhas, galhos e suas frações foram inoculadas, em triplicata, nas colunas de 1 a 9 da linha A. Em seguida, uma alíquota de 100  $\mu$ L do conteúdo de cada orifício da linha A foi transferido para os orifícios da linha B, e após homogeneização o mesmo volume foi transferido para a linha C, reproduzindo este procedimento até a linha H, desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição, obtendo-se concentrações decrescentes do extrato, metade da concentração para cada linha a partir da linha B, em  $\mu$ g/mL (1000  $\mu$ g/mL - linha A;

500 µg/mL - linha B; 250 µg/mL - linha D, continuamente, até a concentração 7,8 µg/mL na linha H) (CLSI, 2012).

Posteriormente, em cada orifício foram adicionados 5 µL de inóculo microbiano. Os inóculos foram preparados em solução salina estéril e a suspensão bacteriana foi determinada pela turvação do tubo 0,5 da escala de Mc Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), diluída numa proporção de 1:10 para se conseguir uma diluição  $10^7$  UFC/mL, sendo a concentração final de bactérias entre  $5 \times 10^5$  UFC/mL e  $5 \times 10^4$  UFC/poço, ao inocular 5 µL dessa suspensão no caldo (CLSI, 2012; FREITAS et al., 2013).

Os poços das colunas 10, 11 e 12 foram destinados para os testes de controle do experimento. O orifício 10 foi utilizado para controle negativo (CN), avaliado por meio da atividade inibitória do diluente DMSO a 2%, o orifício 11 utilizado para o controle de crescimento (CC) usado avaliar viabilidade microbiana, foi plaqueado com caldo de cultivo e 5 µL do inóculo microbiano. No orifício 12 destinado para o controle de esterilidade (CE), utilizou-se apenas o caldo de cultivo BHI.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 18 horas e após este período foram adicionados 20 µL de cloreto 2,3,5 *trifenil tetrazolium* (TTC) a 5% em cada poço. O TTC é um corante incolor na forma oxidada e torna-se vermelho quando reduzido por ação enzimática dos microrganismos vivos, originando o *trifenil formazam*, que torna as células vermelhas. Deste modo, a mudança de incolor para vermelho indica a presença de microrganismo vivo, o que revela ausência de atividade das amostras testadas. No entanto, ausência de coloração, significa resultado positivo para inibição das amostras sobre as bactérias avaliadas (CLSI, 2012; FREITAS, 2013).

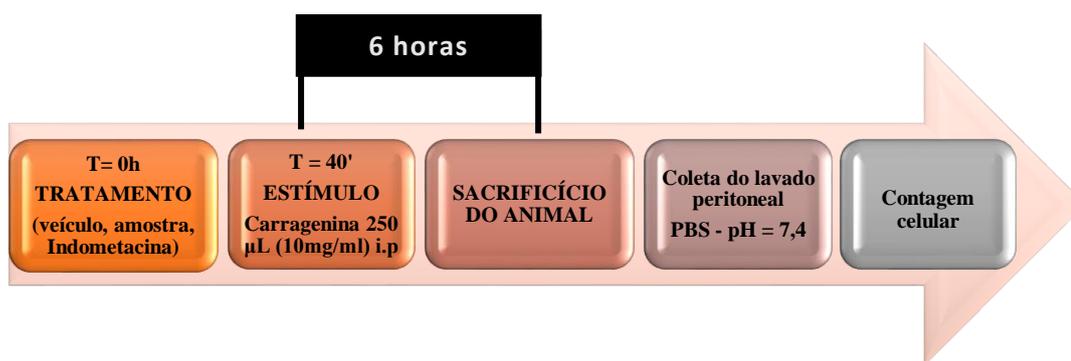
#### **4.8 Ensaio de peritonite induzida por carragenina (FERRÁNDIZ & ALCARAZ, 1991)**

Neste ensaio foi avaliada a atividade anti-inflamatória dos extratos e frações de *H. pectinata*. 36 Camundongos da linhagem Swiss, adultos, de ambos os sexos, pesando entre 20 e 30g, foram distribuídos em seis grupos (n = 6), onde: grupo 1 – controle negativo (solução salina, 10 mL/Kg, v.o.), grupo 2 – controle positivo (indometacina, 30 µmol/Kg, v.o.), grupo 3 – HPFB (extrato bruto das folhas, 100 mg/Kg, v.o), grupo 4 HPFG (extrato bruto dos galhos, 100 mg/Kg, v.o.), grupos 5 – HPFAC (fração acetato de etila das folhas, 100 mg/Kg, v.o.), grupo 6 – HPFCL (fração clorofórmica das folhas, 100 mg/Kg, v.o). O ensaio consistiu na administração das amostras e dos padrões negativos e positivos, e após 30 minutos foi

administrado 250 µL (10mg/mL) de solução estéril de carragenina na cavidade peritoneal dos animais.

Decorrido 4 horas da administração da carragenina, foi coletado o lavado peritoneal após injeção na cavidade de 3 mL de tampão fosfato salina pH = 7,4 (PBS). A partir do lavado peritoneal foi realizada a contagem dos leucócitos totais presentes no exsudato. Para isso, a amostra foi diluída em azul de Tripán (1:20), e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico em objetiva de 10x. A figura 8 esquematiza, de forma objetiva, os passos metodológicos percorridos para realização do ensaio de peritonite.

**Figura 8.** Esquema do ensaio de Peritonite induzida por Carragenina.



Fonte: SILVA, N.K.G, 2017.

#### 4.9 Medida da atividade de mieloperoxidase (MPO)

O modelo empregado foi descrito previamente por Muscará et al. (2000), com adaptações. Foram utilizados 36 ratos machos Wistar (300-350 g) mantidos em gaiolas com cama de xilana à temperatura de  $22 \pm 2$  °C, com troca em dias alternados, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h, recebendo água *ad libitum* e dieta padrão. Os cremes foram preparados a partir do creme Lanette® que é um creme hidratante constituído de base aniônica para incorporar ativos. O creme do extrato etanólico das folhas de *H. pectinata* (HPEF, 100 mg/g) foi preparado em graal de porcelana até se obter preparações homogêneas para serem aplicados topicamente nos animais.

Discos de esponja de álcool polivinílico (PVA) foram confeccionados com diâmetro de 6 mm por 2,75 mm de espessura e esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121 °C. Em seguida, em capela de fluxo laminar, foram colocados em placas estéreis de 96 poços. Posteriormente, adicionou-se 25 µL de solução fisiológica a 0,9% em cada disco para que fiquem umedecidos. A confecção das feridas foi realizada sob anestesia geral, com injeção

intramuscular de 0,1 mL/100 g de peso de uma solução composta por 1 mL de quetamina (50 mg) e 1 mL de xilazina (20 mg).

Realizou-se epilação do terço superior do dorso dos animais e a antisepsia efetuada com clorexidina. Foram realizadas feridas cirúrgicas incisivas de 4 cm de comprimento. A seguir, serão inseridos subcutaneamente discos de esponja de PVA embebidos em solução salina, os quais foram alinhados longitudinalmente em ambos os lados da ferida, perfazendo um total de 4 discos.

Em seguida, as feridas foram suturadas com três pontos cirúrgicos e os animais (n=9) submetidos aos diferentes tratamentos (G1 = sem tratamento; G2= pomada com HPEF; G3 = Controle positivo (pomada comercial Novaderm® - acetato de clostebol e sulfato de neomicina, ambos 5 mg/g), G4= Controle Negativo (Creme Lanette®), com aplicação tópica, uma vez ao dia, na dose de 0,4 mL.

Após 72h da indução da ferida, os animais foram novamente anestesiados com xilazina e quetamina, eutanasiados e a pele dorsal removida cuidadosamente, bem como as esponjas para coleta do exsudato.

Adicionou-se 70 µL de PBS às esponjas que foram retiradas dos animais e, posteriormente, estas foram espremidas com pinças para obtenção do exsudato (o qual foi utilizado na avaliação da atividade de MPO). Em 20 µL de exsudato foi adicionado igual volume de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; Sigma Chem. Co., EUA). A seguir, as amostras foram aquecidas durante 2h a 60 °C em estufa (para inativação de catalase endógena) e centrifugados 10.000xg durante 5 min.

Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados e usados como fonte para medida da atividade de MPO. Dez microlitros desta solução foram adicionados a 200 µL de tampão fosfato de potássio, pH 6,0, contendo 0,164 mg/mL de di-hidroclorato de o-dianisidina (Sigma Chemical Co., EUA) e 0,01% de água oxigenada.

No ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio for degradado ocorrerá a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidina em composto de cor marrom. A mudança de absorbância (DO) da mistura das amostras com a solução de o-dianisidina em função do tempo de reação foi medida por espectrofotômetro à 450nm, durante 5 min a intervalos de 10s. Os resultados foram expressos como unidades (U) de MPO por mL de exsudato. Uma unidade de MPO deve ser definida como aquela capaz de degradar 1 mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por min a 25°C (BRADLEY et al., 1982).

#### 4.9.1 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo teste de variância (ANOVA) com extensão *post-hoc* de Dunnet. Utilizou-se o nível de significância de 5%, de modo que as diferenças observadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Os gráficos foram gerados usando o *software* GraphPad Prism.

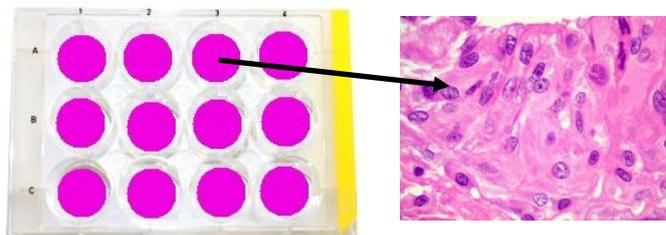
#### 4.10 Ensaio de migração celular *in vitro* utilizando *Scratch assay*

A migração dos fibroblastos é um passo chave para a cicatrização adequada das feridas, por desempenharem um papel importante na produção e deposição de componentes da matriz extracelular, tais como o colágeno (CHEN, et al., 2014; ZHANG, et al., 2016). Assim, para avaliação do potencial cicatrizante *in vitro* foi utilizada a análise de migração celular por meio do método *Scratch assay*, no qual se baseia na criação de uma área de descontinuidade de uma monocamada celular por raspagem (um risco), ou seja, uma ferida e o acompanhamento do seu fechamento, observando crescimento e migração de células em direção ao centro, sendo monitorada por mensuração utilizando-se microscópio invertido de fase (LIANG; PARK; GUAN, 2007; CORY, 2011).

Para este ensaio, utilizaram-se fibroblastos da linhagem 3T3 de tecido de embrião de camundongo. A designação “3T3” corresponde ao crescimento desta linhagem celular, originalmente em uma concentração de  $3 \times 10^5$  células por  $\text{cm}^2$ , com um intervalo de transferência (“T”) de 3 dias (ABREU, 2008).

Garrafas de cultivo estéreis (poliestireno) contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soros fetal bovino (SBF) foram acrescidas com fibroblastos e colocadas em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas, para alcançarem alta confluência. Após a constatação da confluência da monocamada, realizou-se as subculturas utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprender as células aderidas. Posteriormente, os fibroblastos foram semeados em placas de 12 poços (Figura 9) e mantidos em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , até atingirem confluência máxima.

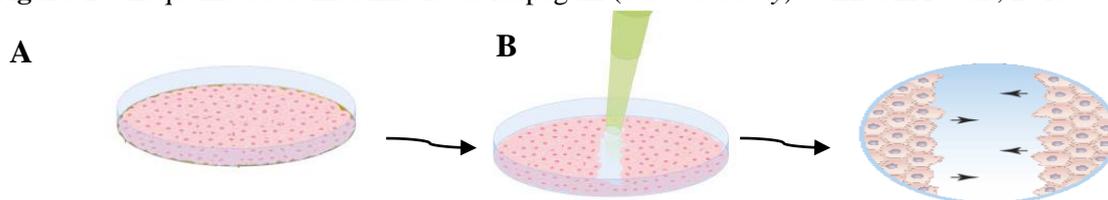
**Figura 9.** Placa de 12 poços com cultura de fibroblastos.



Fonte: PAGNANO et al, 2008.

Constatado a confluência, o meio de cultura foi descartado e, em seguida, foi realizado o ensaio de *Scratch* confeccionando a ferida, ou seja, com a ponta da pipeta de 200 µL fez-se um risco em linha reta na região mediana da placa. Este procedimento proporciona uma ruptura entre as células, causando uma lesão mecânica (Figura 10). Para a remoção dos debrídis resultantes da lesão, os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

**Figura 10.** Esquema da técnica Ensaio da raspagem (*Scratch assay*): VEDULA et al., 2013.



% Convergência da ferida =  $\frac{(A-B) \times 100\%}{A}$

A

**Fonte:** Adaptado de VEDULA et al., 2013.

Logo após, foram adicionados os extratos brutos das folhas e galhos de *H. pectinata* às placas na concentração de 31,3 µg/mL, utilizando os tempos de migração em horas que foram de 0 e 24 horas (OLIVEIRA, 2009).

A migração dos fibroblastos foi avaliada por meio de fotografias, utilizando-se o programa Adobe photoshop CS5, no qual se mensurou a área lesional nos momentos referidos. As imagens foram captadas com câmera digital acoplada ao microscópio invertido de fase, utilizando *software* NIS Elements F 3.2 e foram obtidas do mesmo campo de visão da ferida, criando pontos de referência na parte externa da placa e na platina do microscópio com marcadores de ponta fina.

Os dados foram expressos como média ± DP. A análise estatística determinada por meio da análise de variância unidirecional (ANOVA), seguido por teste de Newman-Keuls. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ . Os gráficos foram gerados usando o *software* GraphPad Prism.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise Fitoquímica

Dos 16 grupos de metabolitos secundários testados, foi evidenciada a presença de seis grupos, os quais: Flavonas, flavonóis e xantonas; Catequinas; Esteroides livres; Triterpenos; Saponinas; Antraquinonas e Taninos condensados, conforme o resultado apresentado no quadro 2 e figuras 11 e 12. Percebe-se que Flavonas, Flavonois, Xantonas, Catequinas e Taninos condensados estiveram presentes tanto nos extratos das folhas quanto dos galhos.

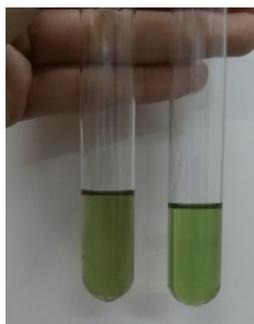
**Quadro 2-** Prospecção fitoquímica do extrato etanólico das folhas e dos galhos da *Hyptis pectinata*.

Grupo químico	Avaliação Qualitativa	
	Extrato bruto etanólico das folhas (HPEF)	Extrato bruto etanólico dos galhos (HPEG)
Flavonas, Flavonois e Xantonas	+	+
Catequinas	+	+
Esteroides livres	+	-
Triterpenos	+	+
Saponinas	-	+
Antraquinonas	+	-
Taninos condensados	+	+

Legenda: (+) = presente; (-) = ausente.

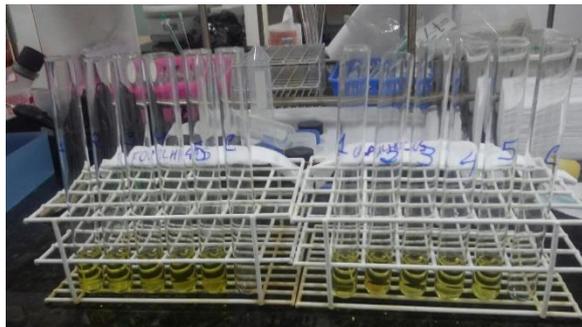
**Fonte:** Autora, 2017.

**Figura 11.** Prospecção fitoquímica para taninos – formação de precipitado dos extratos brutos de galhos e folhas.



**Fonte:** Autora, 2018.

**Figura 12.** Manejo da triagem fitoquímica das frações da *H. pectinata*.



**Fonte:** Autora, 2018.

### 5.2 Rendimento dos extratos etanólicos e suas frações

O rendimento de um extrato ou de um fracionamento é calculado a partir da relação percentual entre a massa de material vegetal utilizada no processo e a massa do material que foi extraído seco (SILVA, 2017). Dessa forma, partindo-se de 293,4 g de folhas secas e 212 g de galhos secos da espécie vegetal, foram obtidos 7,6 g de extrato bruto etanólico das folhas (HPEF) e 6,4 g de extrato bruto etanólico dos galhos (HPEG), apresentando rendimento de 2,59 % e 3,02 %, respectivamente.

Ao partir de 3 g de extrato bruto de folhas e 2 g de extrato bruto de galhos para a realização da partição, pôde-se calcular a proporção do rendimento das frações em relação à massa total de material vegetal colhido.

O rendimento de cada extrato bruto etanólico e suas frações encontra-se descrito na tabela 1, na qual observa-se que o HPEG e suas frações apresentam maiores rendimentos quando comparado ao HPEF e suas frações. A fração do HPEG que apresentou maior rendimento foi a clorofórmica (0,15%) e do HPEF foi a metanólica (0,09%). A tabela 1 relaciona os rendimentos em grama e porcentagem dos extratos e suas frações.

**Tabela 1.** Rendimento dos extratos e frações de *H. pectinata*.

Amostras	Rendimentos	
	(mg)	(%)
<b>HPEF</b>	7600	2,59
Fração hexânica	80	0,07
Fração clorofórmica	69	0,06
Fração acetato de etila	38	0,03
Fração metanólica	111	0,09

<b>HPEG</b>	6400	3,02
Fração hexânica	64	0,1
Fração clorofórmica	103	0,15
Fração acetato de etila	39	0,06
Fração metanólica	27	0,04

Fonte: Autora, 2018.

### 5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e fracionados estão organizados nos quadros 3A e 3B.

**Quadro 3A.** Identificação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos brutos da *H. pectinata*.

Concentração inibitória mínima dos extratos brutos ( $\mu\text{g/ mL}$ )		
Microrganismo	HPEF	HPEG
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000	1000
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1000	1000
<i>Escherichia coli</i>	NI	NI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NI	NI

Legenda NI = Não Inibiu.

Fonte: Autora, 2018.

**Quadro 3B.** Identificação da atividade antimicrobiana *in vitro* das frações da *H. pectinata*

Concentração inibitória mínima das frações ( $\mu\text{g/ mL}$ )								
Microrganismo	F1	F2	F3	F4	G1	G2	G3	G4
<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	1000	1000	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NI	1000	1000	NI	NI	NI	1000	NI
<i>Escherichia coli</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

Legenda: F=Folhas; G=Galhos; 1= Hexano; 2= Clorofórmio; 3=Acetato e 4=Metanol; NI=Não Inibiu.

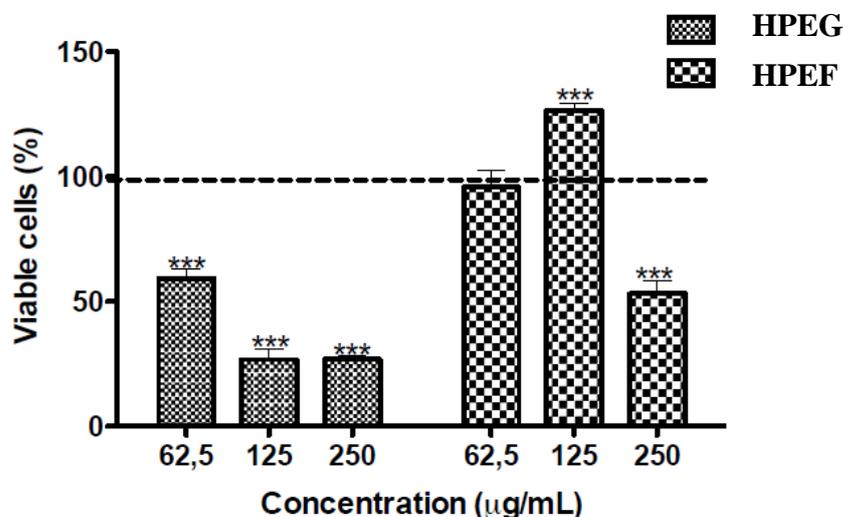
Fonte: Autora, 2017.

Dessa forma, ao analisar o quadro 3A, observa-se que os extratos brutos das folhas e dos galhos da *H. pectinata* inibiram as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na concentração de 1000 µg/ mL, evidenciando fraca atividade inibitória. Não houve inibição da atividade antimicrobiana para bactérias gram-negativas, evidenciando ausência desta atividade para tais bactérias. Já nos extratos fracionados das folhas e galhos, de acordo com o quadro 3B, evidencia-se que as frações clorofórmica e em acetato de etila das folhas inibiram as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na concentração de 1000 µg/ mL e a fração acetato de etila dos galhos inibiu a bactéria *Staphylococcus epidermidis* na concentração de 1000 µg/mL, demonstrando fraca atividade inibitória para ambas. As demais apresentaram ausência de inibição do crescimento bacteriano.

#### 5.4 Ensaio de viabilidade celular (teste colorimétrico do Metiltetrazolium/MTT)

Conforme apresentado na figura 13, o tratamento com o extrato bruto dos galhos (HPEG), em todos os testes de concentração, diminuiu a viabilidade dos fibroblastos. Observou-se que o aumento da concentração da EEG induziu um declínio no número de células viáveis, levando a uma redução de 41% (62,5 µg / mL), 73,3% (125 µg / mL) e 73,1% (250 µg / mL) com P <0,001.

**Figura 13.** Viabilidade celular dos extratos brutos das folhas e galhos de *H. pectinata*.



Fonte: Autora, 2017.

Por outro lado, a incubação com o extrato bruto das folhas HPEF a 62,5 e 125 µg/mL não teve efeito sobre a viabilidade celular dos fibroblastos. No entanto, o tratamento com

HPEF a 250 µg / mL induziu uma diminuição de 46,9% (P <0,001) na porcentagem de células viáveis quando comparado com o grupo controle. A tabela 2 apresenta resultados descritos obtidos por meio desse teste.

**Tabela 2.** Efeito das frações dos extratos das folhas e do caule da *H. pectinata* na viabilidade celular dos fibroblastos 3T3.

Extratos	Concetração (µg/mL)	Viabilidade celular ± DP (%)
<b>EEG</b>	62.5	59.27 ± 3.78
	125	26.75 ± 4.22
	250	26.91 ± 1.47
<b>EEF</b>	62.5	95.82 ± 7.04
	125	126.37 ± 3.12
	250	53.17 ± 5.39

**Fonte:** Autora, 2018.

### 5.5 Ensaio Peritonite

No ensaio de peritonite, foram testadas as amostras (HPEF, HPEG, fração clorofórmica e acetato de etila das folhas) que apresentaram atividade antimicrobiana frente a, pelo menos, duas espécies bacterianas, de acordo com os resultados obtidos pela CIM. Desta forma, todas as doses dos extratos brutos e frações reduziram a migração celular em relação ao número de leucócitos totais por mL (\*\*p < 0,001), conforme demonstram figura 14. A tabela 3 apresenta a relação do número de leucócitos contabilizados pós-tratamento.

O tratamento com solução salina 10 mL/Kg (grupo controle negativo) induziu uma migração leucocitária para a cavidade peritoneal de  $17,7 \pm 0,6 \times 10^6$ . Do contrario, no grupo controle positivo tratado com indometacina (anti-inflamatório não esteroide padrão: 30 µmol/Kg), evidenciou-se redução da migração de leucócitos para  $7,67 \pm 0,5 \times 10^6$ , significando uma equivalente a 43,31%. No grupo tratado com HPEG, houve uma redução do número de células para  $5,73 \pm 0,5 \times 10^6$ , enquanto que o tratado com HPEF reduziu o número de células para  $6,03 \pm 0,7 \times 10^6$ . Já o grupo que foi administrada a fração acetato de etila das folhas, houve redução do número de células para  $5,63 \pm 0,8 \times 10^6$  e, por fim, no grupo tratado com a fração de clorofórmio das folhas para  $5,60 \pm 0,9 \times 10^6$ ; desta forma, foi evidenciado uma redução da proliferação celular inflamatória em 67,61%, 65,91%, 68,17%, 68,36%, respectivamente.

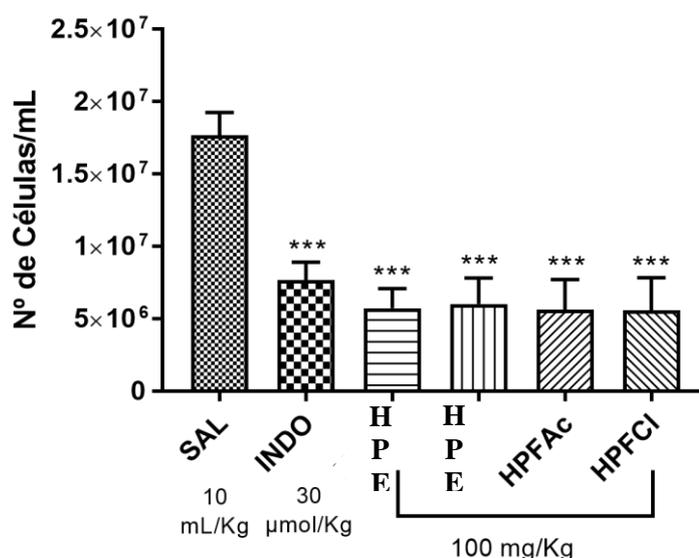
**Tabela 3.** Número de leucócitos contabilizados no ensaio de peritonite induzida por carragenina pós - tratamentos.

Tratamentos	Nº de Leucócitos Totais/mL	% inibição
Solução Salina (10 mL/Kg)	$1,77 \pm 0,6 \times 10^7$	-
Indometacina (30 $\mu$ mol /Kg)	$7,67 \pm 0,5 \times 10^6$ ***	56,69%
HPEG (100 mg/Kg)	$5,73 \pm 0,5 \times 10^6$ ***	67,61%
HPEF (100 mg/Kg)	$6,03 \pm 0,7 \times 10^6$ ***	65,91%
Fração acetato de etila das folhas (100 mg/Kg)	$5,63 \pm 0,8 \times 10^6$ ***	68,17%
Fração clorofórmica das folhas (100 mg/Kg)	$5,60 \pm 0,9 \times 10^6$ ***	68,36%

**Fonte:** Autora, 2017.

Nota: Os dados representam a média  $\pm$  e.p.m. dos grupos tratados comparados ao controle (SAL) por meio da One-way ANOVA, seguidos do Teste de Dunnet, com \*\*\* $p < 0,001$ .

**Figura 14.** Número de células por mililitro de lavado intraperitoneal contabilizados no ensaio de peritonite induzida por carragenina pós - tratamentos.



**Fonte:** Autora, 2017.

Legenda: HPEG – extrato bruto dos galhos; HPEF – extrato bruto das folhas; HPFAC – fração acetato de etila das folhas; HPFCI – fração clorofórmica das folhas.

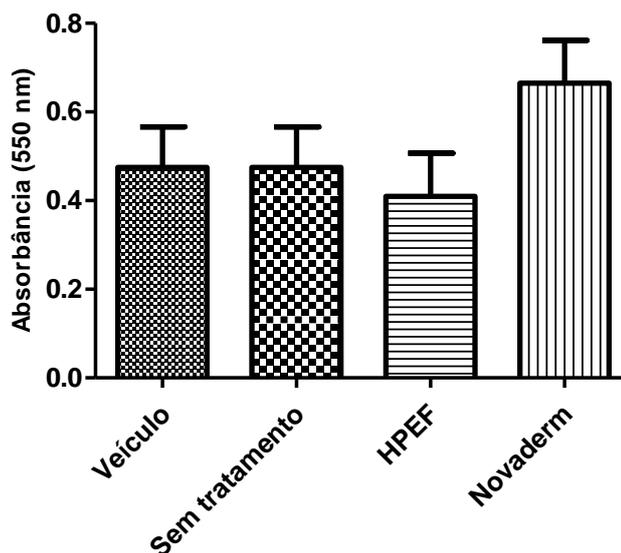
Nota: Os dados representam a média  $\pm$  e.p.m. dos grupos tratados comparados ao controle (SAL) por meio da One-way ANOVA, seguidos do Teste de Dunnet, com  $***p < 0,001$ .

### 5.6 – Medida da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

O resultado da atividade da mieloperoxidase evidenciada nos grupos tratados durante o ensaio encontra-se descrito na figura 15. O tratamento tópico dos ratos com 100 mg/g de creme Lanette® do HPEF, 2 vezes ao dia, diminuiu a atividade de MPO, um indicador de neutrófilos, após 48 h da indução da ferida em ratos (Figura 2), porém, não foi estatisticamente significativa ( $p=0,26$ ). O grupo que não recebeu tratamento também diminuiu a atividade de MPO, mas não houve significância ( $p=0,32$ ).

A preparação comercial Novaderm® não foi capaz de diminuir a atividade de MPO, quando comparado ao grupo de animais controle (veículo), entretanto, não apresentando significância ( $p=0,51$ ).

**Figura 15.** O efeito do extrato etanólico da *H. pectinata* (HPEF) sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) após 48 h de indução da ferida.



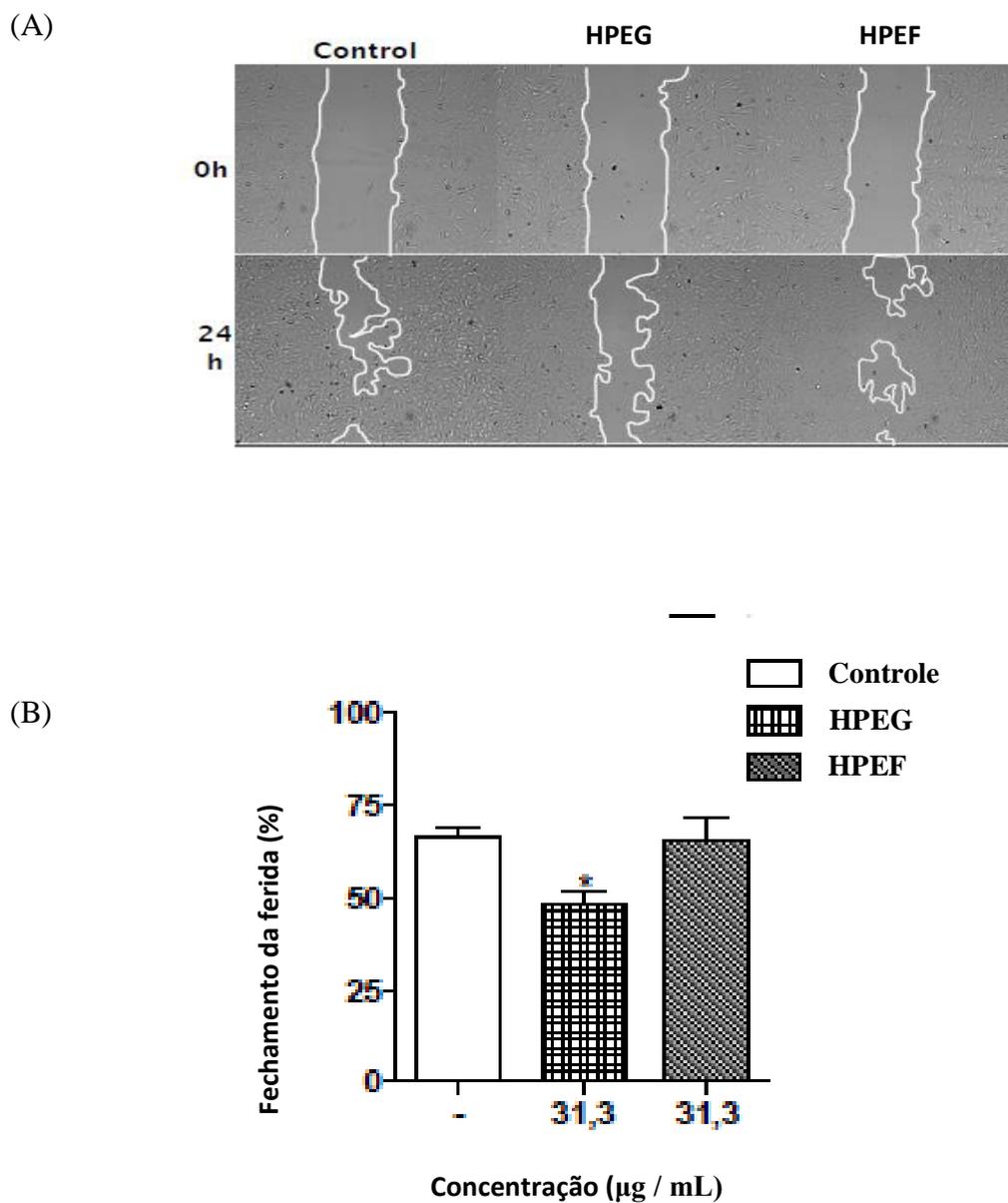
**Nota:** Os ratos foram tratados, 2 vezes ao dia, com veículo (0,4 mL de creme Lanette®), HPEF (100mg/g) ou preparação comercial Novaderm®. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM da atividade de MPO em unidades (U) mL<sup>-1</sup> de exsudato.

**Fonte:** Autora, 2017.

### 5.7 – Ensaio de migração celular *in vitro* utilizando *Scratch assay*

Conforme apresentado na figura 16, o tratamento com HPEF diminui a migração de fibroblastos em 27% ( $p < 0,05$ ) quando comparada com a grupo de controle. O tratamento com EEG, por sua vez, não alterou o migração de fibroblastos.

**Figura 16.** Efeito de HPEF e HPEG na migração de fibroblastos 3T3. (A) Fotomicrografias representativas das células feridas no intervalo de 0 e 24 h após o arranhão. (B) A análise da taxa de migração foi avaliada pelo *software* ImageJ.



Fonte: Autora, 2018.

## 6. DISCUSSÃO

Identificou-se, no presente estudo, que a *H. pectinata* apresenta os metabólitos secundários flavonas, flavonóis e xantonas; catequinas; esteroides livres; triterpenos; saponinas; antraquinonas e taninos condensados. Entretanto, os fenóis, alcaloides e cumarinas estavam ausentes. Estes achados corroboram, parcialmente, com o estudo de Costa (2016), pois o autor evidenciou ausência de alguns fenóis, bem como de triterpenos, na referida espécie. No entanto, a composição química de extratos e óleos essenciais de *H. pectinata* é variável (SANTOS et al, 2008), e alguns autores relataram resultados diferentes. Barbosa (2009) e Pereira (2014) identificaram a presença de esteroides livres, saponinas e sesquiterpênicos na *H. pectinata*, enquanto que Santos et al (2008) identificaram majoritariamente compostos sesquiterpênicos, com altos índices de calamusenona (24,64%),  $\beta$ - cialofileno (18,34%) e óxido de cariofileno (18%). Lira (2006), detectou a presença de alcaloides, taninos e flavonoides e ausência de esteroides e saponinas nos extratos aquosos das folhas de *H. pectinata*.

Considerando que substâncias como os compostos fenólicos podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos e exercem atividade antioxidante (OLIVEIRA et al., 2004; SILVA, 2008), os resultados obtidos estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante de substâncias isoladas da espécie estudada neste trabalho

Os metabólitos secundários são estruturas complexas de baixo peso molecular que possuem atividades biológicas marcantes e baixas concentrações (BERG; LUBERT, 2008). Eles são essenciais para a sobrevivência e continuidade das espécies vegetais, pois têm como funções a proteção contra os ataques de herbívoros e patógenos, bem como auxilia na competição com outros vegetais e favorece a atração de polinizadores, dentre outras funções. É provável que essa importância ecológica tenha alguma relação com o efeito medicinal para humanos (PEREIRA, 2012).

Devido à presença de taninos e vários outros fenóis, as espécies de *Hyptis* são comumente utilizadas no tratamento de infecções gastrointestinais, dor e contra fungos (OLIVEIRA et al., 2004; SILVA, 2008). Pesquisa avaliou a atividade biológica do extrato aquoso das folhas *Hyptis suaveolens* (mesmo gênero da *H. pectinata*), identificando efeitos analgésicos e antiedematogênico (SANTOS et al., 2007),

Produtos que contenham em seus constituintes flavonoides e flavonas apresentam atividades antioxidantes, anti-inflamatória e antibacteriana têm um grande potencial de

exploração na área cosmética (PERRUCHON, 2002). Sendo assim, a presença de flavonoides na *Hyptis pectinata* pode indicar atividade antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana. Compostos fenólicos como flavonas, flavonoides e xantonas isoladas de folhas e galhos de plantas da espécie *Hyptis* evidenciaram efeito anticoagulante e protetor cardiovascular, além disso, atua na inibição da proteína tirosina fosfatase prevenindo a hiperglicemia (OH et al, 2005).

Essas classes de metabólitos apresentam, ainda, importantes atividades terapêuticas anticarcinogênicas e antivirais (ARAÚJO, 2008). Outra atividade relacionada aos flavonoides é sua ação antioxidante devido à presença de hidroxilas aromáticas. Alguns flavonoides como rutina e quercetina têm mostrado melhor atividade antioxidante do que o ácido ascórbico que é considerado um potente redutor. Os flavonoides possuem ainda propriedade antibiótica provavelmente relacionada à capacidade de formar complexos com proteínas solúveis e com a parede de células bacterianas (FLAMBÓ, 2013).

A espécie *Hyptis canun*, outra espécie do gênero *Hyptis*, apresenta como propriedade medicinal a ação antifúngica, antiulcerativa, analgésica, anticancerígena, antimicrobiana, propriedades medicinais estas que correspondem à presença de substâncias químicas que têm como principais grupos de metabólitos secundários os alcalóides e flavonóides (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). Assim, como os alcalóides também estão presentes na *Hyptis pectinata*, atribui-se a possibilidade desta espécie apresentar as mesmas atividades medicinais da *H. canun*.

A composição dos metabólitos secundários nas plantas é resultado do balanço entre sua formação e transformação, que ocorrem durante o crescimento. Diversos metabólitos secundários são normalmente sintetizados e acumulados constitutivamente nas plantas, enquanto outros têm sua biossíntese induzida apenas após a ativação por fatores do ambiente (BRANQUINHO, 2015).

De fato, os metabólitos secundários representam a interface química entre as plantas e o ambiente. Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, podem-se ressaltar as interações planta/microrganismos, planta/insetos e planta/planta; idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de coleta, bem como técnicas de colheita e pós – colheita (ADAMS, 2007; MENEZES et al; BRANQUINHO, 2015; JESUS, 2016). É válido ressaltar que estes fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando

isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário (MORAIS, 2009).

Estudo realizado por Arrigoni-Blank et al (2010) que avaliou a influência dos horários de colheita e secagem das folhas sobre o teor e rendimento do óleo essencial da *H. pectinata*, identificou que não houve diferenças significativas da secagem e dos horários de colheita.

Por outro lado, pesquisas recentes comprovaram que, após análise da composição química do óleo essencial de *H. pectinata*, as variações genéticas e o ambiente de armazenamento podem alterar a concentração entre as mesmas espécies de princípios ativos, como os monoterpenos e sesquiterpenos; além disso, fatores atribuídos ao solo, clima, sazonalidade, tempo e tipo de cultura também conseguem alterar a similitude das qualidades físico-químicas do vegetal (MENEZES, 2015; JESUS, 2016).

A prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos e das frações da *H. pectinata* realizada no presente estudo evidenciou a presença de metabólitos secundários de grande importância biológica. Entretanto, os resultados de diferentes prospecções podem sofrer variações e discrepâncias devido às técnicas de separação empregadas, os solventes utilizados e à sua polaridade. Por isso, diferentes resultados podem ocorrer em comparações qualitativas e até mesmo quantitativas destes metabólitos de uma mesma espécie, pois cada genótipo responde de forma diferente às condições ambientais.

Desta forma, devido a existência de poucos relatos sobre variações de constituintes químicos e rendimento em óleo essencial e de extratos de *H. pectinata*, ressalta-se a necessidade de estudos que envolvam técnicas agrônomicas mais peculiares para cada espécie, uma vez que o comportamento é muito variado de espécie para espécie.

A massa total de folhas coletadas foi de 293,4 gramas, obtendo-se 7,6g de extrato; apresentando, desta forma, rendimento de 2,59%. Para os galhos, o rendimento dos extratos obtidos foi de 3,02%. Sales et al. (2007), estudando o óleo essencial das folhas *Hyptis marruboides*, outra espécie do gênero *Hyptis*, identificaram 26 compostos que representaram 96- 99% dos constituintes voláteis. Estes dados sugerem uma ampla quantidade de compostos voláteis presentes nas espécies do gênero *Hyptis*, o que pode justificar o baixo rendimento dos extratos vegetais obtidos neste estudo, pois o próprio processo de obtenção do extrato pode ter influenciado no seu rendimento.

A atividade citotóxica apresentada pelos tipos de extratos de *H. pectinata* encontra-se descrita em poucas pesquisas na literatura. Neste estudo, os extratos brutos foram testados frente aos fibroblastos 3T3, os quais apresentaram citotoxicidade severa para àqueles

procedentes dos galhos nas concentrações 125 e 250 µg/mL, com mais de 50% de inviabilidade celular, e na concentração de 62,5 µg/mL revelou-se moderadamente citotóxico. Já os oriundos das folhas, nas concentrações 62,5 e 125 µg/mL demonstram-se atóxicos, sendo que na concentração de 250 µg/mL induziu a um declínio no número de células viáveis, levando a uma redução de 46,83 ( $p < 0,001$ ) da viabilidade celular.

Corroborando com estas informações, a administração do extrato aquoso de folhas da *H. pectinata* em ratos revelou baixa toxicidade (BISPO et al., 2001; ARRIGONIBLANK et al., 2008). Da mesma forma, Barbosa (2009), utilizando testes de toxicidade frente a larvas de *Artemia salina*, evidenciou que as folhas desta espécie apresentaram  $CL_{50} > 1000$  µg/mL. Em continuidade a este mesmo estudo, a *H. pectinata* (sambacaitá) demonstrou, ainda, certa especificidade para as células de linhagem tumoral de cólon humano (HCT-8).

A citotoxicidade corresponde a uma das atividades apresentadas pelas espécies da família Lamiaceae (FALCÃO; MENEZES, 2003). Estudos realizados com *H. pectinata* comprovaram atividades moluscicida contra *Biomphalaria pfeifferi* e *Bulinus glabiosus*. Plantas do gênero *Hyptis martiusii* apresentaram atividade antitumoral (COSTA-LOTUFO et al., 2004) citotóxica (ARAÚJO et al., 2006), inseticida (ARAÚJO et al., 2003) e contra as larvas de *Culex quinquefasciatus* (COSTA et al., 2005).

Estudos experimentais que investigaram a atividade antimicrobiana apresentada pelas plantas da espécie *H. pectinata* encontram-se relatados em poucos trabalhos na literatura. Com relação à CIM, as frações em clorofórmio e acetato de etila das folhas e dos galhos e os extratos brutos de *H. pectinata* demonstraram fraca atividade antimicrobiana (1000 µg/mL) frente às bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. As demais amostras não foram capazes de promover a inibição dos microrganismos testados.

Santos et al (2008), ao avaliarem a atividade antimicrobiana do óleo essencial da sambacaitá frente a bactérias gram-positivas e negativas, evidenciaram atividade antimicrobiana com CIM que variou de 12,5 a 50 µg/mL para gram-positivas e entre 200 a 300 µg/mL para gram-negativas. Os referidos autores identificaram três sesquiterpenos (calamusenona, cariofileno e óxido de cariofileno) como componentes majoritários desta espécie vegetal, correlacionando estes componentes, como responsáveis pela ação antimicrobiana acima descrita. Também estudando o óleo essencial da mesma espécie, Nascimento et al. (2008) demonstraram a ação antimicrobiana contra cepas de *Streptococcus mutans* através do método de difusão em disco.

Devido à importância do papel dos leucócitos nos processos inflamatórios agudos e crônicos, muita atenção tem sido atribuída a modelos animais de inflamação aguda que permitam a quantificação estimativa da migração desses leucócitos. Os modelos animais envolvendo cavidades como a pleural, a peritoneal e o modelo de inflamação na bolsa de ar permitem que a migração celular, mediadores inflamatórios e extravasamento plasmático sejam quantitativamente mensurados após um processo inflamatório agudo, induzido por diferentes agentes irritantes aplicados no interior da cavidade (SEDGWICK; LEES, 1986).

Vale ressaltar que a inflamação aguda é caracterizada por dilatação dos vasos, exsudação de plasma e migração celular para o local da lesão (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004), desta forma, seguindo o aumento na permeabilidade vascular, há o infiltrado celular, principalmente de neutrófilos, que contribuem para a o processo inflamatório através da produção, dentre outros mediadores, de radicais livres derivados do oxigênio, como o ânion superóxido e radicais hidroxilas (POSADAS et al., 2004). Um modelo clássico que vem sendo utilizado há muito tempo para avaliar a atividade anti-inflamatória de novos compostos é o ensaio de peritonite induzida por carragenina.

Este teste é caracterizado pela indução de resposta inflamatória persistente após a administração de carragenina na cavidade peritoneal (PASSOS et al., 2007; MARIOTTO et al., 2008). A literatura descreve que a carragenina é um agente flogístico indireto que no peritônio de ratos induz a migração de neutrófilos dependentes da ativação de macrófagos residentes (SOUZA et al., 1988). Estudos mostram que a injeção de carragenina no peritônio de ratos induz a expressão da NO sintase e COX-2, levando assim a liberação de grande quantidade de NO e PGs (HATANAKA et al., 1999).

A administração intraperitoneal da carragenina provoca migração celular, ou seja, um infiltrado de neutrófilos e leucócito, que são oriundos da vênula mesentérica para cavidade peritoneal. Esse evento ocorre em consequência da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular e da liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e prostaglandina E2 (PAULINO et al., 2008).

A inibição da migração dos leucócitos para a cavidade peritoneal ocorre por dois mecanismos: a inibição da produção de substâncias quimiotáticas e/ou a inibição da expressão de moléculas de adesão, haja vista que os leucócitos necessitam de substâncias quimiotáticas que facilitem sua migração para o local onde está ocorrendo à injúria, inflamação, para então desencadearem seus efeitos na tentativa de destruir o agente agressor (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004).

Alguns estudos mostram que os AINES reduzem a ativação de fatores de transcrição como a Proteína Ativadora – 1 (AP-1) e o fator nuclear NF- $\kappa$ B, fatores relacionados com a ativação de genes de citocinas primárias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , substâncias potentes em muitas ações envolvidas na migração leucocitária. A redução do influxo leucocitário também está associada à inibição da mieloperoxidase (PEREIRA et al., 2006), enzima importante nos processos inflamatórios.

No ensaio de peritonite para verificação do potencial anti-inflamatório da *H. pectinata*, foi observado que o pré-tratamento com os extratos brutos e as frações clorofórmica e acetato de etila das folhas e galhos da sambacaitá reduziu estatisticamente a migração leucocitária, sendo semelhante à indometacina, usada como fármaco de referência.

Entretanto, existem algumas vantagens no uso de plantas medicinais em relação aos fármacos sintéticos, tais como a diminuição dos efeitos colaterais e reações adversas e, conseqüentemente, menores contraindicações, fácil acesso e diversidade da flora brasileira. No caso da sambacaita, particularmente, a ausência de toxicidade dos extratos brutos das folhas nas concentrações testadas, em associação as vantagens mencionadas, apontam perspectivas favoráveis para o seu uso com a finalidade terapêutica como anti-inflamatório natural.

Corroborando com esses resultados, Raymundo et al (2011), ao avaliarem a ação anti-inflamatória do óleo essencial de *H. pectinata*, constata que houve inibição do processo inflamatório induzido por tratamento subcutâneo com carragenina no ensaio de bolsa de ar, reduzindo a migração celular, o volume de exsudato, a concentração de proteína e de mediadores inflamatórios (óxido nítrico, prostaglandina E2, IL-6 e TNF- $\alpha$ ).

Entretanto, estudos experimentais que avaliam a atividade anti-inflamatória relacionada à espécie *H. pectinata* e ao gênero *Hyptis* são extremamente escassos na literatura. O ensaio de peritonite induzida por carragenina foi avaliado em estudo realizado com o óleo essencial de *Hyptis crenata*, outra espécie do gênero *Hyptis*, constatando diminuição significativa do número total de leucócitos em 47,55% em comparação ao grupo controle positivo (BRAVIM, 2008). Destaca-se que os polimorfonucleares são as principais células a migrarem para a cavidade peritoneal, nesta fase inicial da resposta inflamatória, no modelo experimental usado (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999).

Nos neutrófilos, a mieloperoxidase (MPO) é a principal enzima, sendo liberada a partir dos grânulos azurófilos primários e desempenha importante papel microbicida na resposta a infecção bacteriana (LAU; BALDUS 2006; GUILPAIN et al., 2008; LORIA et al., 2008;

ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Esta enzima apresenta atividade oxidativa e inflamatória (LORIA et al., 2008). No fagossoma de neutrófilos, a MPO converte o peróxido de hidrogênio e íons cloro em ácido hipocloroso (HClO) e água (LAU; BALDUS 2006; GUILPAIN et al., 2008; LORIA et al., 2008; ARNHOLD; FLEMMIG, 2010).

A MPO é conhecida por ser um marcador de neutrófilos ativados (LAU & BALDUS 2006; GUILPAIN et al., 2008; LORIA et al., 2008). A migração de neutrófilos para o tecido inflamado é avaliada pela determinação da atividade da MPO, pois durante esta ativação, uma quantidade considerável desta enzima é liberada para o meio extracelular (ARNHOLD & FLEMMIG, 2010). Os neutrófilos em apoptose liberam MPO e são removidos pelos macrófagos, o que é importante para a resolução da inflamação (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010).

Por conseguinte, a MPO está envolvida em várias doenças, especialmente aquelas relacionadas à inflamação mediada por neutrófilos como: doença arterial coronária, artrite reumatóide, doença inflamatória do intestino, asma, câncer (GUILPAIN et al., 2008) aterosclerose, esclerose múltipla e glomerulonefrite (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010). Nestas doenças se observa o aumento significativo da atividade desta enzima (ARNHOLD; FLEMMIG, 2010).

Neste estudo, sugere-se que a inflamação induzida pela inserção subcutânea dos discos de espojas de PVA nos animais provocou aumento da atividade da MPO. Observou-se que o grupo tratado com o HPEF (100mg/g) teve o acúmulo de neutrófilos reduzidos quando comparados com o grupo tratado com o veículo. Entretanto, os resultados oriundos deste ensaio *in vivo* não foram estatisticamente significantes, sendo necessária a repetição do mesmo para melhor elucidação deste teste.

A medicina no final do último milênio e começo do século XXI vem observando crescente emprego de drogas no tratamento de feridas. A propósito, as investigações não têm se limitado ao desenvolvimento de fármacos sintéticos, e sim na tentativa cada vez mais frequente de isolar princípios ativos oriundos de extratos vegetais.

O emprego de plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas é mencionado em vários estudos experimentais (BASTOS, 2008; REZENDE NETO, 2011; BARRETO et al, 2013; VASCONCELOS, 2016; POVOAS, 2016), sendo utilizados a partir de extratos vegetais, óleos essenciais, substâncias isoladas, dentre outros, que são empregados na forma de pomadas, géis, membranas etc.

Apesar de vários estudos mencionarem a utilização empírica da planta *H. pectinata* para cicatrização de feridas (SANTOS; PADRÃO, 2016; NASCIMENTO et al, 2016; GOMEZ; ROCHA; GOMBERG, 2016; FALCÃO, 2013; SILVA et al, 2002; MALAN et al, 1988), são escassas, na literatura, pesquisas experimentais que comprovem tal atividade biológica.

VASCONCELOS et al (2016) realizaram estudo que objetivou avaliar a ação terapêutica do extrato etanólico de folhas de *Hyptis pectinata* em feridas limpas induzidas em ratos. Foi evidenciado que o extrato não apresentou melhores resultados na redução do diâmetro da ferida, em lesões excisivas induzidas em ratos, quando comparado ao grupo de controle positivo.

Por outro lado, pesquisa experimental *in vivo* que avaliou a cicatrização de feridas em ratos Wistar revelou que a espécie *Hyptis suaveolens*, pertencente ao mesmo gênero e família da *H. pectinata*, promoveu uma maior reepitelização das lesões após o tratamento de 10 dias (SHIRWAIKAR, 2003).

Corroborando com estes resultados, Antonio (2005) comprovou que o creme de *Hyptis suaveolens* promoveu uma maior reepitelização das feridas cutâneas realizadas cirurgicamente na região dorsal do tórax de camundongos (*Mus musculus*), contribuindo, assim, para uma melhor cicatrização.

Shenoy, et al., (2009), testando os extratos aquosos, alcoólicos e de éter de petróleo de *Hyptis suaveolens* em modelos de cicatrização de feridas em ratos, evidenciou que o extrato de éter de petróleo demonstrou melhor atividade cicatrizante em comparação com os outros extratos, na dose de 500 mg/kg (v.o), após o tratamento de 10 dias, sendo maior o período de epitelização e a força de granulação. O estudo histopatológico deste extrato também revelou mais colágeno e macrófagos em comparação com os outros extratos.

Neste estudo, a avaliação de uma possível atividade cicatrizante foi realizada utilizando-se de um bioensaio *in vitro* com o emprego do *Scratch assay*, o qual avaliou a migração celular dos extratos brutos de *H. pectinata* nos intervalos de tempos de 0 e 24 horas.

Para o extrato bruto dos galhos, foi observada uma diminuição da migração dessas células após 24h da “lesão”. Em relação ao extrato bruto das folhas, não foi observada migração significativa quando comparada ao seu controle, sugerindo que a ação cicatrizante da *H. pectinata* pode não envolver a migração dos fibroblastos 3T3, mas sim, diferentes mecanismos celulares com a participação outros tipos de células, além de eventos moleculares e bioquímicos.

Em contrapartida, estudos histológicos obtidos provenientes de lesões em ratos Wistar, nas quais foram tratadas com *H. suaveolens*, demonstraram aumento do número de fibroblastos (SHENOY, 2009).

Sabe-se que as fases inflamatória, proliferativa e de maturação do processo cicatricial são dependes do tipo e da extensão do dano, do estado de saúde do indivíduo e do potencial do tecido em reparar (SWAMYA et al., 2007). A intervenção em qualquer uma destas fases, inclusive na fase inflamatória, poderia, eventualmente, levar a uma promoção no processo de cura (MUKHERJEE et al, 2000). Portanto, é importante considerar o potencial anti-inflamatório demonstrado pelos extratos de *H. pectinata* demonstrados neste estudo como um fator benéfico para o processo de cicatrização de feridas.

Entretanto, constando-se que dados conclusivos sobre a atividade cicatrizante em feridas da *H. pectinata* oriundos de pesquisas experimentais são extremamente escassos na literatura, estudos mais conclusivos que abordem testes complexos com ensaios *in vivo*, são necessários para a confirmação desta atividade biológica.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A prospecção fitoquímica identificou a presença dos seguintes metabólitos secundários Flavonas, flavonóis e xantonas; Catequinas; Esteroides livres; Triterpenos; Saponinas; Antraquinonas e Taninos condensados.

Os resultados do MTT indicaram que o extrato das folhas apresentou viabilidade celular nas concentrações de 62,5 e 125 µg/mL, sendo levemente citotóxico em 250 µg/mL. Já o extrato bruto dos galhos demonstrou ser severamente citotóxico nas concentrações 125 e 250 µg/mL e moderadamente citotóxico em 62,5 µg/mL.

A CIM do extrato das folhas e galhos e das frações clorofórmica e acetato de etila das folhas e a fração acetato de etila dos galhos foi de 1000 µg/mL apenas para as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, evidenciando fraca atividade antimicrobiana. Frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* os extratos brutos das folhas e galhos e as suas frações metanolicas, clorofórmica, hexânica e acetato de etila não apresentaram atividade inibitória.

O ensaio de peritonite evidenciou forte inibição da migração celular dos extratos brutos das folhas galhos e das frações clorofórmica e acetato de etila das folhas, quando comparados ao controle positivo, sugerindo elevada atividade anti-inflamatória.

A avaliação de migração celular pelo método do *Scratch assay* evidenciou que o extrato bruto das folhas não alterou a migração celular quando comparada ao grupo controle negativo, e que o extrato bruto dos galhos diminuiu a migração celular.

Assim, os resultados deste estudo sugerem que a *H. pectinata* possa atuar de forma benéfica ao processo de reparo tecidual, ao inibir a resposta inflamatória exacerbada por meio da diminuição da migração leucocitária ao local da lesão.

Desta forma, este estudo de caráter preliminar sobre as atividades biológicas da sambacaitá pode constituir uma base de trabalho para investigações futuras. Considera-se a importância da continuidade de estudos com esta espécie vegetal, principalmente para isolamento do princípio ativo da planta melhor investigação da atividade cicatrizante.

Além disso, futuras investigações poderão centrar-se no desenvolvimento de coberturas contendo o princípio ativo da *H. pectinata* com o objetivo de auxiliar no processo de reparo tecidual de modo a restaurar, manter e melhorar a função do tecido lesionado.

Neste intuito, o laboratório de Química de Produtos Naturais pertencente a Universidade Federal de Alagoas atua, dentre outras práticas, no desenvolvimento e na caracterização de membranas de colágeno, realizando parcerias com outros laboratórios,

inclusive com o Laboratório de Pesquisa no Tratamento de Feridas, o qual a pesquisadora deste trabalho é vinculada, com o objetivo de investir em pesquisas básicas do tipo experimental que utilizem tecnologias inovadoras, em uma perspectiva multidisciplinar, com vistas a tratamentos alternativos que agreguem eficácia e ausência de efeitos colaterais.

Portanto, para a continuação desta pesquisa, tem-se como perspectivas futuras o desenvolvimento e a caracterização de membranas de colágeno contendo o princípio ativo da espécie vegetal *Hyptis pectinata* L. Poit., bem como a avaliação destas membranas a cerca das atividades anti-inflamatória e cicatrizante *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, C. L. C. **Avaliação de citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/9270/1/105.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2018.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois USA, Allured Publishing Corporation, 2007, 804 p.
- ALVES, N. C. Penetração de ativos na pele: revisão bibliográfica. *Revista Amazônia Science & Health*, v. 3, n. 4, p. 36-43, 2015. Disponível em: <file:///C:/Users/Rodrigo/Downloads/852-3916-2-PB.pdf> Acesso em: 07 jun. 2017.
- ANTONIO, F. I. **Aspectos macroscópicos e microscópicos da reparação de feridas cutâneas de camundongos (swiss-vallée) tratadas com o creme de *Hyptis suaveolens* e *Croton urucurana* Baill.** 2005. 50 f. . Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/13134/1/FIAntonioDISS1PRT.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2017.
- ARAÚJO, E. C. C. A cicatrização de feridas com uso de produtos naturais. **Rev enferm UFPE.**, v.10, n.5, 2016. Disponível em: <https://periodicos.ufpe.br/revistas/revistaenfermagem/article/view/11150/12662>. Acesso em: 07 jun. 2017.
- ARAÚJO, E.C.C.; LIMA, M.A.; MONTENEGRO, R.C.; NOGUEIRA, M.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R. Cytotoxic abietane diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. **Z Naturforsch**, v.61, p. 177-183, 2006. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/b246/8b86b123549f17b154baa7f8a7c9135ccfdb.pdf>. Acesso em:13 out 2016.
- ARAÚJO, E.C.C.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S.; ANDRADE-NETO, M.; ANDRADE, I.L.; LIMA, M.AA. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. **J Agr Food Chem** 51: 3760-3762, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12797740>. Acesso em:13 out 2016.
- ARAÚJO, T. A. S. **Taninos e flavonoides em plantas medicinais da Caatinga: um estudo de etnobotânica quantitativa**. 2008. 71 f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008. Disponível: [https://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/3231/arquivo2107\\_1.pdf?sequence=1](https://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/3231/arquivo2107_1.pdf?sequence=1) Acesso em:13 out 2016.
- ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 92-106, 2010.
- ARRIGONI-BLANK, M. F.; et al. Influência do horário de colheita e de secagem no óleo essencial de *Hyptis pectinata* L. Poit (Lamiaceae). **Scientia Plena** v. 6, n. 10, p. P. 3101,

2010. Disponível em: <https://www.scienciaplena.org.br/sp/article/view/110>. Acesso em: 07 jun. 2017.

BARBOSA, C. V. **Avaliação do potencial antineoplásico de plantas medicinais utilizadas como coadjuvantes no tratamento do câncer pelos pacientes do CACON/UFAL**. 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009). Disponível em: [http://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/914/1/Dissertacao\\_CiriaVieiraBarbosa\\_2009\\_Completa.pdf](http://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/914/1/Dissertacao_CiriaVieiraBarbosa_2009_Completa.pdf). Acesso em: 13 out 2016.

BARRETO, A.L.S.; BASTOS, T.S.; PIRES, J.A.; Albuquerque-Júnior, R.L.C.; CARDOSO, J.C. Análise quantitativa de mastócitos na cicatrização de feridas tratadas com membranas de colágeno contendo própolis vermelha. **Interfaces Científicas -Saúde e Ambiente**, v.1, n.2, p. 79-90, 2013. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/index.php/saude/article/view/527/220>. Acesso em: 07 jun. 2017.

BASTOS, M.L.A **Avaliação da atividade antimicrobiana, “in vitro e in vivo” e estudo químico biomonitorado de Piper hayneamum C.D.C (Piperaceae) e Zeyheria tuberculosa (Vell) Bur (Bignoniaceae)**. 2008. 195 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p., 2008.

BESSA, N.G.F.de, et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento Vale Verde – Tocantins. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.4, supl.I, p.692-707, 2013. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722013000500010&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-05722013000500010&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 02 maio. 2016.

BISPO, M. D.; et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p.81-86, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11378286>. Acesso em: 02 abril. 2016.

BLANCK, M.; GIANNINI, T. **Úlceras e feridas: as feridas tem alma**. Rio de Janeiro: Di Livros Ed, 2014, 864p.

BRADLEY, P. P.; et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.78, n.3, p.206-9, 1982.

BRANQUINHO, N. A. A. **Avaliação de teor e composição química dos óleos essenciais de três espécies de Hyptis, submetidas a diferentes velocidades e temperaturas de secagem**. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2015. Disponível em: [https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sgcursos/uploads/anexos\\_12/2017-04-03-03-46-43AVALIA%20C3%87%20DE%20TEOR%20DISSERTA%20C3%87%20N%20ABIA%20ANG%20A9lica%20de%20C3%81vila%20Branquinho.pdf](https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sgcursos/uploads/anexos_12/2017-04-03-03-46-43AVALIA%20C3%87%20DE%20TEOR%20DISSERTA%20C3%87%20N%20ABIA%20ANG%20A9lica%20de%20C3%81vila%20Branquinho.pdf). Acesso em: 2 maio. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. RENISUS - **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Portal da saúde. Brasília. 2009. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>. Acesso em: 02 maio. 2016.

BRAVIM, L. S. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Antiinflamatória do Óleo Essencial de *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth.** 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2008. Disponível em: <http://www.ufpa.br/ppgcf/arquivos/dissertacoes/dissertacaoAno2008-LucianaSilvaBravim.pdf>. Acesso em: 08 maio. 2017.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quim Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000100040](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000100040). Acesso em: 18 Jan. 2017.

CALDER, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p. 645-662, 2013.

CARVALHO, D. **Pele – abordagem cosmetológica**. *Cosmet toiletries*, v. 22, n. 30, 2010.

CARVALHO, J. S. B.; et al. Influência de diferentes tipos de estacas e substratos na propagação vegetativa de *Hyptis pectinata*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.14, n.1, p.89-91, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cagro/v31n3/a15v31n3.pdf>. Acesso em: 18 Jan. 2017.

CHEN, J.C.; et al. NGF accelerates cutaneous wound healing by promoting the migration of dermal fibroblasts via the PI3K/Akt-Rac1-JNK and ERK pathways. **BioMed research international**, v. 2014, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25006578>. Acesso em: 28 ago. 2017.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=564ceedf5e9d97daf08b45a2&assetKey=AS%3A297254750572544%401447882463055>. Acesso em: 27 mar. 2017.

COSTA, J.G.M.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; SILVA, M.R.; MOTA, M.L.; SANTOS, N.K.A.; CARDOSO, A.L.H.; LEMOS, T.L.G. Chemical-biological study of the essential oils of *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* and *Syzygium aromaticum* against larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Rev Bras Farmacogn** 15: 304-309, 2005.

Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2005000400008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2005000400008). Acesso em: 15 ago 2016.

COSTA-LOTUFO, L.V.; ARAÚJO, E.C.; LIMA, M.A.; MORAES, M.E.; PESSOA, C.; SILVIERA, E.R.; MORAES, M.O. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). **Pharmazie**, v. 59, n. 78-79, 2004. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/8693222\\_Antiproliferative\\_effects\\_of\\_abietane\\_diterpenoids\\_isolated\\_from\\_Hyptis\\_martiusii\\_Benth\\_Labiatae](https://www.researchgate.net/publication/8693222_Antiproliferative_effects_of_abietane_diterpenoids_isolated_from_Hyptis_martiusii_Benth_Labiatae). Acesso em: 15 ago 2016.

COSTA, M. M. **Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante da espécie *Hyptis pectinata***. 2016. 100 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016. Disponível em: [https://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/18635/DISSERTAC%20A%20O\\_MO\\_NYK%20MELO%20COSTA\\_CD\\_final%20\(1\).pdf?sequence=1](https://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/18635/DISSERTAC%20A%20O_MO_NYK%20MELO%20COSTA_CD_final%20(1).pdf?sequence=1). Acesso em: 15 dez 2017.

CORY, G. Scratch-wound assay. **Cell Migration: Developmental Methods and Protocols**, v. 769, p. 25-30, 2011. Disponível em: [http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-207-6\\_2](http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-207-6_2). Acesso em: 2 jan. 2018.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3. Ed. São Paulo: Manole, 2009. 878 p.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002. 604p.

EUA. United States Department of Agriculture (USDA). **Natural resources conservation service**. Disponível em: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=HYPE3>. Acesso em: 11 nov 2017.

FALCÃO, D.Q.; MENEZES, F.S., Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 83, p. 69-74, 2003. Disponível em: [http://www.rbfarma.org.br/files/pag\\_69a74\\_vjml00dk.pdf](http://www.rbfarma.org.br/files/pag_69a74_vjml00dk.pdf). Acesso em: 2 jan. 2018.

FALCÃO, R. E. A. **Avaliação do potencial antioxidante, leishmanicida e antinociceptiva das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) poit.** 2013. 144 f. Tese (Doutorado em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013. Disponível em: <https://bdigital.ufpe.br/bitstream/10284/3979/1/Projeto%20final.pdf>. Acesso em: 17 jun 2017.

FERRÁNDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents actions**, v. 32, p. 283-288, 1991. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1650522>. Acesso em: 17 jun 2017.

FERREIRA, A.M; CANDIDO, M.C.F.S, CANDIDO, M.A. O cuidado de pacientes com feridas e a construção da autonomia do enfermeiro. **Rev. enferm. UERJ**. v. 18, n.4, p.656-60, 2013. Disponível em: <http://www.facenf.uerj.br/v18n4/v18n4a26.pdf>. Acesso em: 05 abr 2016.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. **Atividades biológicas dos flavonoides: atividade antimicrobiana**. 2013. 43 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando

Pessoa, Porto, 2013. Disponível em:  
<https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3979/1/Projeto%20final.pdf>. Acesso em: 17 jun 2017.

FRAGOSO-SERRANO M, G.S, PEREDA, M.R. Anti-staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. **Planta Medica**; v. 71, n. 3, p.278-80. 2005. Acesso em: 05 abr 2016.

FREIRE, T. N. ; COELHO, R. M. ; ANTONIOLLI, A. R. ; BATISTA, J. S. ; SILVA, O. C. Atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas de *Hyptis pectinata* (Lamiaceae). In: **XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2000.

FREITAS, M. A. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do carvacrol através dos métodos de contato direto e gasoso. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, 2013. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/17128>. Acesso em: 28 set. 2017.

GAMBA, Monica Antar; PETRI, Valéria; COSTA, Mariana Takahashi Ferreira. **Feridas: prevenção, causas e tratamento**. Rio de Janeiro: Santos Ed., 2016. 352p.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P.U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología)**, v. 2, n. 3, 2009. Disponível em:  
[http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo\\_secundario\\_de\\_plantas.pdf](http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf). Acesso em: 28 set. 2017.

GATNAU, J. R. G.; GONZALO, A. C.; FERNANDEZ, M. A.; SANZ, L. P. Cierre por segunda intencion de defectos cutâneos posquirurgicos second intention healing of postsurgical skin wounds. **Piel (barc)**. v. 27, n. 7, p. 408–415, 2012.

GOMEZ, Marcella; ROCHA, Emerson Antônio; GOMBERG, Estélio. Análise das publicações etnobotânicas sobre plantas medicinais da Mata Atlântica na Região Sul do Estado da Bahia, Brasil. **Revista Fitos**, v. 10, n.2, p. 95-219, 2016. Disponível em:  
<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19248>. Acesso em: 28 set. 2017.

GUILPAIN, P.; SERVETTAZ, A.; BATTEUX, F.; GUILLEVIN, L. ; MOUTHON, L. Natural and disease associated antimyeloperoxidase (MPO) autoantibodies. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, p. 421-425, 2008.

HATANAKA, K.; KAWAMURA, M.; OGINO, K.; MATSUO, S.; HARADA, Y. Expression and function of cyclooxygenase-2 in mesothelial cells during late phase of rat carrageenan – induced pleurisy. **Life Sci**, v. 65, p. 161-66, 1999.

JESUS, A. S.; et al. Influence of storage time and temperature on the chemical composition of the essential oil of *Hyptis pectinata* L. **Poit. Rev. Bras. Pl. Med.**, v.18, n.1, s. I, p.336-340, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v18n1s1/1516-0572-rbpm-18-1-s1-0336.pdf>. Acesso em: 18 nov 2017.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 354.

KIM, H. N.; HONG, Y.; KIM, M. S.; KIM, S. M.; SUH, K-Y. Effect of orientation and density of nanopography in dermal wound healing. **Biomaterials**. v. 33, n. 34, p. 8782-8792, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22959181>. Acesso em: 09 mar 2017.

KISSMAN, K; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. Tomo III. Ed. BASF, São Bernardo do Campo, SP. 1995.

KORELO, R. I. G; FERNANDES, L. C. Ultrassom terapêutico para cicatrização de feridas: revisão sistemática. **ConScientiae Saúde**, v. 15, n.3, p. 518-529, 2016. Disponível em: <http://www4.uninove.br/ojs/index.php/saude/article/view/6421/3360>. Acesso em: 18 nov 2017.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammation vascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p. 16-26, 2006.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. Cicatrização de feridas. **Revista da SPDV**, v. 69, n.3, p. 355-367, 2011.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, vol. 2, n. 2, p. 329-33. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406593>. Acesso em: 10 Fev. 2017.

LIRA, A.F. **Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do extrato aquoso e óleo essencial da *Hyptis pectinata* (L.) Poit (sambacaita), em modelo murino de artrite induzida por cristais de urato de sódio**. 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2006.

LORIA, V.; DATO, I.; GRAZIANI, F.; BIASUCCI, L. M. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of Inflammation**, v.1, p. 1-4, 2008.

MACHADO, M. A. B.; et al. Plantas medicinais, características e usos: um estudo no contexto da educação do campo. **Facit Business and Technology Journal**, v.2, n.1, p.31, 2017. Disponível em: <http://revistas.faculdefacit.edu.br/index.php/JNT/article/view/179/180>. Acesso em: 10 Fev. 2017.

MACIEL, A. C.; et al. Uso de biofilme de colágeno hidrolisado associados ao ultrassom terapêutico na reparação tecidual de lesões lacerativas em membros de equinos. **II Amostra Científica Universidade Federal de Pelotas**, RS, Brasil, 2013.

MALAGUTTI, William. **Feridas: conceitos e atualidades**. São Paulo: Martinari, 2015. 280p.

MALAN, K.; PELISSIER, Y.; MARION, C.; BLAISE, A.; BESSIERE, J.M. The essential oil of *Hyptis pectinata*. **Planta Medica**; v. 54, n. 6, p. 531-2, 1988.

MANTHEY, J.A.; BENDELE, P. Anti-inflammatory activity of an orange peel polymethoxylated flavone, 3',4',3,5,6,7,8-heptamethoxyflavone, in the rat carrageenan/paw edema and mouse lipopolysaccharide challenge assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9399-403, 2008. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/275259863\\_356783'4'-Heptamethoxyflavone\\_a\\_Citrus\\_Polymethoxylated\\_Flavone\\_Attenuates\\_Inflammation\\_in\\_the\\_Mouse\\_Hippocampus](https://www.researchgate.net/publication/275259863_356783'4'-Heptamethoxyflavone_a_Citrus_Polymethoxylated_Flavone_Attenuates_Inflammation_in_the_Mouse_Hippocampus). Acesso em: 10 Fev. 2017.

MARMITT, D. J.; REMPEL, C.; GOETTERT, M. I.; SILVA, A. C. As plantas medicinais da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) com potencial antifúngico. **Rev. Bras. Pesq. Saúde**, v.17, n.3, p.151-162, 2015. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/305850896\\_As\\_plantas\\_medicinais\\_da\\_Relacao\\_Nacional\\_de\\_Plantas\\_Medicinais\\_de\\_Interesse\\_ao\\_Sistema\\_Unico\\_de\\_Saude\\_RENISUS\\_com\\_potencial\\_antifungico](https://www.researchgate.net/publication/305850896_As_plantas_medicinais_da_Relacao_Nacional_de_Plantas_Medicinais_de_Interesse_ao_Sistema_Unico_de_Saude_RENISUS_com_potencial_antifungico). Acesso em: 10 Fev. 2017.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 150 p.

MEDEIROS, AC; DANTAS-FILHO AM. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **J Surg Cl Res**. v.7, n.2, p. 87-102. 2016. Disponível em: <https://periodicos.ufrn.br/jscr/article/view/11438/8049>. Acesso em: 29 jul. 2017.

MELO, G.B.; SILVA, R. L.; MELO, V. A.; ANTONIOLLI, A. R.; LIMA, S.O.; SILVA, P.M.; CASTRO-E-SILVA O. JR. Efeitos do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a regeneração hepática após hepactomia parcial de 70%. Resultados preliminares. **Acta Cirúrgica Brasileira**; v. 16, s. 1, 2001. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502001000500005&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502001000500005&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 10 Fev. 2017.

MENEZES, P. P.; et al. Physicochemical characterization and analgesic effect of inclusion complexes of essential oil from *Hyptis pectinata* L. Poit leaves with  $\beta$ -cyclodextrin. **Curr Pharm Biotechnol**, v.6, n. 5, p. 440-50, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25483719>. Acesso em: Acesso em: 10 Fev. 2017.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma Abordagem da Química à Ecologia. **Química Nova**. v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422005000500029](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000500029). Acesso em: 29 jul. 2017.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, p.4050-4063, 2009. Disponível em: [http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev\\_3/P\\_4\\_Palestra\\_Resumo\\_Lilia\\_Ap.pdf](http://www.abhorticultura.com.br/eventosx/trabalhos/ev_3/P_4_Palestra_Resumo_Lilia_Ap.pdf). Acesso em: 07 jun. 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>. Acesso em: 07 jul. 2017.

MOURA, P. A. **Screening das atividades antioxidantes e anticoagulantes de plantas do bioma Caatinga**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade

Federal De Pernambuco, Recife, 2015. Disponível em:  
<http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/16955/Disserta%20de%20Mestrado.Priscilla%20Andrade%20de%20Moura.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.  
Acesso em: 12 nov. 2017.

MUKHERJEE, P.; VERPOORTE, R.; SURESH, B. Evaluation of in-vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v.70, p.315-21, 2000. Disponível em:  
<https://eurekamag.com/pdf/003/003438680.pdf>

MUSCARÁ, M.N. et al. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. **British Journal of Pharmacology**, v.129, p.681-6, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1571897/>. Acesso em: 12 dez. 2017.

NASCIMENTO, M. W. A.; VERÍSSIMO, R.C.S.S.; BASTOS, M.L.A.; BERNARDO, T.H.L. Indicações de plantas medicinais realizadas por raizeiros para tratamento de feridas. **Rev. Eletr. Enf.** v. 18, p. 1-11, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5216/ree.v18.31143>. Acesso em: 12 nov. 2017.

NASCIMENTO, P.F.C.; ALVIANO, W.S.; NASCIMENTO, A.L.C.; SANTOS, P.O.; ARRIGONIBLANK, M.F.; DE JESUS, R.A. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. **Oral Dis.**, n. 14, v. 6, p. 485–9. 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18826378>. Acesso em: 12 nov. 2017.

NELIGAN, P.C.; GURTNER, G. C. **Cirurgia plástica: princípios**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 1077 p.

NUNES, J.T.; ARAÚJO, K.S.; NETO, P.M.M. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando o leite colostro. **Conscientiae Saúde**, v.11, n.3, p.377-382. 2013. Disponível em: <http://www.redalyc.org/html/929/92923694002/>. Acesso em: 07 jul. 2017.

OH, W.K.; et al. Antidiabetic effects of extracts from *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 96, p. 411-415, 2005. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104004660>. Acesso em: 12 mar. 2017.

OLIVEIRA, F. P.; OLIVEIRA, B. G. R. B.; SANTANA, R. F.; SILVA, B.P.; CANDIDO, J. S. C. Classificações de intervenções e resultados de enfermagem em pacientes com feridas: mapeamento cruzado. **Rev Gaúcha Enferm**, v. 37, n. 2, p. 1-9, 2016. Disponível em:  
<http://www.seer.ufrgs.br/index.php/RevistaGauchadeEnfermagem/article/view/55033/37417>. Acesso em: 12 mar. 2017.

OLIVEIRA, C.M.A; SILVA, M.R.R.; KATO, L.; SILVA, C.C.; FERREIRA, H.D.; SOUZA, L.K.H. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, n.5. p.756-759, 2004. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50532004000500023](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532004000500023). Acesso em: 12 mar. 2017.

OLIVEIRA, L.M et al. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth e *Hyptis platanifolia* Mart. ex Benth. (Lamiaceae). **Rev Bras Plantas Med**, v.13, p. 73-78, 2011. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722011000100011](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722011000100011). Acesso em: 06 nov. 2017.

OLIVEIRA, M. P. **Análise *in vitro* da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde)- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <http://repositorio.pucrs.br/dspace/bitstream/10923/4495/1/000417400-Texto%2bCompleto-0.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2017.

OLSON, KENT. **Manual de toxicologia clínica**. 6 ed. Artmed, 2013.

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. **Cienc. Rural**, v. 38, n. 6, p.1662-1666, 2008. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000600026&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000600026&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 18 fev. 2017.

PASSARETTI, T; GUARNIERI, A. P.; FILLIPINI, R.; ALVES, B. C. A.; FONSECA, F. L. A. Eficácia do uso do Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*) no processo de cicatrização em lesões: uma revisão de literatura. **ABCS Health Sci.**, v. 41, n.1, p. 51-54, 2016. Disponível em: <https://www.portalnepas.org.br/abcs/shs/article/view/846/733>. Acesso em: 18 fev. 2017.

PAULINO, N.; ABREU, S.R.L.; UTO, L. et al. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, *Astepillin C*, in Brazilian própolis. **Eur. J. Pharmacol.** v.587, p.1-3, 2008. Disponível em: [http://www.academia.edu/12368910/Anti-inflammatory\\_effects\\_of\\_a\\_bioavailable\\_compound\\_Artepillin\\_C\\_in\\_Brazilian\\_propolis](http://www.academia.edu/12368910/Anti-inflammatory_effects_of_a_bioavailable_compound_Artepillin_C_in_Brazilian_propolis). Acesso em: 05 ago 2017.

PEREDA-MIRANDA, R.; HERNANDEZ, L.; VILLAVICENCIO, M.J.; NOVELO, M.; IBARRA, P.; CHAI, H.; PEZZUTO, J.M. Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro-alpha-pyrones from *Hyptis pectinata*. **Journal of Natural Products**; v. 56, n. 4, p. 583-93. 1993. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np50094a019>. Acesso em: 05 ago 2017.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012. Disponível em: <https://sistemas2.uft.edu.br:8004/index.php/JBB/article/view/386/268>. Acesso em: 15 out. 2017.

PEREIRA, L. C. O. **Caracterização química de óleos essenciais de quatro espécies da família Lamiaceae: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, *Hyptis pectinata* (L.) Poit, *Hyptis martiusii* Benth. e *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer**. 2014. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Univeridade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014. Disponível em: <http://rei.biblioteca.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/893/1/LCOP24022015.pdf>. Acesso em: 15 out. 2017.

PERRUCHON, S. Estudo das propriedades dos flavonóides para cosméticos através do relacionamento função-estrutura. **Cosmetics & Toiletries**, v. 14, p. 74, 2002. 15 out. 2017.

PIETSCHMANN, M.; VOSTROWSKY, O.; BESTMANN, H. J.; PANT, A. K.; MATHELA, C. S. Volatile constituents of *Hyptis pectinata* Poit. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.10, n.5, p.550-552, 1998. Acesso em: 15 out. 2017.

PINTO, L. F. et al. Extração supercrítica com utilização de modificadores e caracterização a partir da semente de cumaru (*dipteryx odorata*). **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, vol. 1 num. p. 16248-16255, 2015. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br/s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1938-16781-145061.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2017.

PIRIZ, M.A. et al. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literatura. **Rev. bras. plantas med.**, v.16, n.3, pp.628-636, 2014. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722014000300020&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000300020&lng=en&nrm=iso&tlng=pt). Acesso em: 10 jan. 2017.

POVOAS, F. T. X.; et al. Topical treatment with yellow-ipe extract (*Tabebuia aurea*) in wound healing by secondary intention in rats. **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 8, n. 1, p. 367-373, 2016. Disponível em: <http://www.jocpr.com/articles/topical-treatment-with-yellowipe-extract-tabebuia-aurea-in-wound-healing-by-secondary-intention-in-rats.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2017.

RAYMUNDO, L. J.; et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **J Ethnopharmacol.**, v. 134, n. 3, p. 725-32, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111000419?via%3Dihub>. Acesso em: 07 de jan 2018.

REZENDE NETO, **Caracterização de membranas de colágeno modificado com extrato de frutos de *Genipa americana* L. e avaliação histomorfológica do efeito sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.** 2011. 75 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT, Aracaju, 2011. Disponível em: [https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/1277/1/JOSE\\_MELQUIADES\\_REZENDE\\_NETO.pdf](https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/1277/1/JOSE_MELQUIADES_REZENDE_NETO.pdf). Acesso em: 15 out. 2017.

ROBBINS. **Patologia básica.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

ROJAS, A.; HERNANDEZ, L.; PEREDA-MIRANDA, R.; MATA, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **The Journal of Ethnopharmacology**; v. 35, n. 3, p. 275-83, 1992. Acesso em: 15 out. 2017.

RUH, A. C.; FERNANDES, D.; ARTONI, R. F.; FAVERO, G. M. Inflamação: entre a regeneração e a cicatrização. **Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde**, v.19, n.1, p. 11-19, 2013. Disponível em: <http://www.revistas2.uepg.br/index.php/biologica/article/view/5565>. Acesso em: 10 jan. 2017.

SALEH, T. S. F; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan.

**Peptides**, v. 20, p. 949-956, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978199000868>. Acesso em: 23 jun 2016.

SALES, J.F. et al. Composition and chemical variability in the essential oil of *Hyptis marrubioides* Epl. **Journal of Essential Oil Research**, v.19, p.552-6, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111000419>. Acesso em: 05 jan 2018.

SANTOS, A. E; PADRÃO, M. L. Levantamento etnobotânico acerca do uso de plantas medicinais no município de Lagarto – SE. **Agroforestalis News**, v. 1, n. 1, p. 31-35, 2016. Disponível em: <https://seer.ufs.br/index.php/AGRO/article/view/5315/4663>. Acesso em: 05 jan 2018.

SANTOS, A. M. A. et al. Fitoterapia popular: passado e presente. **Revista Espacios**. v. 34, n. 11, p. 2013. Pág. 2-7. 2013. Disponível em: <http://www.revistaespacios.com/a13v34n11/13341102.html>. Acesso em: 07 jul. 2017.

SANTOS, T.C.; MARQUES, M.S.; MENEZES, I.A.C.; DIAS, K.S.; SILVA, A.B.L.; MELLO, I.C.M.; CARVALHO, A.C.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ANTONIOLLI, A.R.; MARÇAL, R.M. Antinociceptive effect and acute toxicity of the *Hyptis suaveolens* leaves aqueous extract on mice. **Fitoterapia**, 78: 333-336, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X07000779>. Acesso em: 23 jun 2016.

SANTOS, P.O.; et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Quím. Nova**, v.31, n.7, p.1648-1652, 2008. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422008000700009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000700009). Acesso em: 07 jul. 2017.

SANTOS, W.B. et al. Microbiota infectante de feridas cirúrgicas: análise da produção científica nacional e internacional. **Rev. Sobecc**, v. 21, n. 1, p. 46-51. São Paulo. 2016. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1414-4425/2016/v21n1/a5576.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2017. Acesso em: 07 jul. 2017.

SEDGWICK, A.D.; LEES, P. A comparison of air pouch, songe and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Action.**, v. 18, n. 3-4, p. 439-446, 1986. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01965009>. Acesso em: 07 jul. 2017.

SÉFORA-SOUSA, M.; ANGELIS-PEREIRA, M. C. Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15, n. 4, p. 617-626, 2013. Disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/content/doi/15160572/2013/00000015/00000004/art00020>. Acesso em: 23 jun 2016.

SERAFINI, M.R. Determination of chemical and physical properties of *Hyptis pectinate* essential oil and their redox active profile. **E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**. v. 3, n.1, p. 1-9, 2012. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Daniel\\_Gelain/publication/260516380\\_Determination\\_of\\_chemical\\_and\\_physical\\_properties\\_of\\_Hyptis\\_pectinata\\_essential\\_oil\\_abd\\_their\\_redox\\_act](https://www.researchgate.net/profile/Daniel_Gelain/publication/260516380_Determination_of_chemical_and_physical_properties_of_Hyptis_pectinata_essential_oil_abd_their_redox_act)

ive\_profile/links/5552356e08ae6943a86d6f80/Determination-of-chemical-and-physical-properties-of-Hyptis-pectinata-essential-oil-and-their-redox-active-profile.pdf. Acesso em: 11 fev 2017.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHIRWAIKAR, A.; SHENOY, R.; ADUPA, A.L.; SHETTY, S. Wound healing property of ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* with supportive role of antioxidant enzymes. **Indian Journal Expert Biological**, v. 41, n. 3, p. 238-241. 2003.

SHENOY, C.; PATIL, M.B.; KUMAR, R. Wound healing activity of *Hyptis suaveolens* (L) Poit (Lamiaceae). **International Journal of PharmTech Research**, v.1, n. 3, p. 737-744, 2009.

SILVA, R. L.; MELO, G. B.; ANTONIOLLI, A. R.; LIMA, S. O.; MELO, V. A. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata*, sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. **Acta Cirurgica Brasileira**; v. 17, n.3, p. 101-5. 2002. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502002000900021&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502002000900021&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 16 dez. 2017.

SILVA, R. S.; et al. Práticas populares em saúde: autocuidado com feridas de usuários de plantas medicinais. **Rev enferm UERJ**, v. 22, n. 3, p. 389-95, 2014. Disponível em: <http://www.facenf.uerj.br/v22n3/v22n3a16.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2016.

SILVA, P. S. G. **Avaliação antimicrobiana e cicatrizante de extratos da *Jatropha gossypifolia* L.: estudo *in vitro***. 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017. Disponível em: <http://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/1753/1/Avalia%C3%A7%C3%A3o%20antimicrobiana%20e%20cicatrizante%20de%20extratos%20da%20Jatropha%20gossypifolia%20-%20estudo%20in%20vitro.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2017.

SILVA, W. A.; CAMPOS, V. R. Métodos de Preparação Industrial de Solventes e Reagentes Químicos. **Rev. Virtual Quim**, v. 5, n. 5, p. 1007-1021, 2013. Disponível em: <http://rvq-sub.s bq.org.br/index.php/rvq/article/viewFile/457/376>. Acesso em: 22 dez. 2016.

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

SOUZA, I. C. L. **Desenvolvimento de membranas bioativas de colágeno quimicamente modificado contendo própolis vermelha para aplicação em cicatrização de feridas abertas**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, Aracaju. 2013. Disponível em: [https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/1277/1/JOSE\\_MELQUIADES\\_REZENDE\\_NETO.pdf](https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/1277/1/JOSE_MELQUIADES_REZENDE_NETO.pdf). Acesso em: 13 jan 2017.

SOUZA, P. C. L.; BATISTA, J. S. Avaliação da atividade anti-ulcerogênica do óleo essencial da *Hyptis pectinata*. **VII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Sergipe**. 2005.

SOUZA, S. M. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. 2005. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/102097/221535.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 06 dez. 2016.

TCHOUMBOUGNANG, F.; ZOLLO, P. H. A.; BOYOM, F. F.; NYEGUE, M. A.; BESSIÈRE, J. M.; MENUT, C. Aromatic plants of tropical Central Africa. XLVIII. Comparative study of the essential oils of four *Hyptis* specimens from Cameroon: *H. pectinata* (L.) Poit., *H. lanceolata* Poit., *H. spicigera* Lam. And *H. suaveolens* Poit. **Flavour and fragrance Journal**; v. 20, p. 340-43. 2005.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M.L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enferm**, nv.15, n.1, p.115-21, 2006. Disponível em: <http://www.index-f.com/textocontexto/2006pdf/2006-115.pdf>. Acesso em: 13 jan 2017.

VASCONCELOS, T. L. C et al. Study of the topical use of *Hyptis pectinata* extract (sambacaita) in wound healing in rats. **J. Chem. Pharm. Res.**, v. 8, n. 1, p. 483-490, 2016. Disponível em: <http://www.jocpr.com/articles/study-of-the-topical-use-of-hyptis-pectinata-extract-sambacaita-in-wound-healing-in-rats.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2017.

VAZ, N. M.; RAMOS, G. C.; SAALFELD, K.; MPODOZIS, J. DERIVA. Imunológica: a história natural dos linfócitos. rev. ufmg, belo horizonte, v. 21, n. 1 e 2, p. 60-87, jan./dez. 2014. Disponível em: <https://seer.ufmg.br/index.php/revistadaufmg/article/view/1728/1236>. Acesso em: 06 dez. 2016.

VEDULA, S.R. K. et al. Collective cell migration: a mechanistic perspective. **Physiology**, v. 28, n. 6, p. 370-379, 2013. Disponível em: <http://physiologyonline.physiology.org/content/28/6/370.short>. Acesso em: 28 nov. 2017.

VIGNERON, M; DEPARIS, X; DEHARO, E.; BOURDY, G. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. **The Journal of ethnopharmacology**; v.98, p. 351-60. 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874105001261>. Acesso em: 28 nov. 2017.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, ACR; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. 2010. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR20101886074>. Acesso em: 28 nov. 2017.