



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM (PPGEN) - MESTRADO**

TALITA LUCIO CHAVES VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE E
CICATRIZANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Hyptis pectinata* L. Poit.
(SAMBACAITÁ)**

**MACEIÓ
2015**

TALITA LUCIO CHAVES VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE E
CICATRIZANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Hyptis pectinata* L. Poit.
(SAMBACAITÁ)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas – UFAL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lysete de Assis Bastos

Corientadora: Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto

**MACEIÓ
2015**

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecário
Bibliotecário: Valter dos Santos Andrade

- V331a Vasconcelos, Talita Lucio Chaves.
 Avaliação do potencial antimicrobiano, antioxidante e cicatrizante do extrato etanólico de *Hyptis pectinata* L. Point (Sambacaitá) / Talita Lucio Chaves Vasconcelos. – 2015.
 93 f. : il.
- Orientadora: Maria Lysete de Assis Bastos.
 Coorientadora: Eliane Aparecida Campesatto.
 Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas. Escola de Enfermagem e Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Enfermagem. Maceió, 2015.
- Bibliografia: f. 77-88.
 Anexos: f. 89-90.
 Apêndice: f. 91-93.
1. *Hyptis pectinata*. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Antioxidantes. 4. Cicatrização. 5. Viabilidade celular. I. Título.

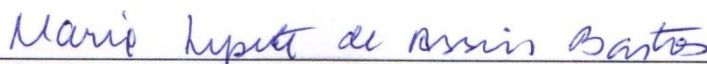
CDU: 616-083:615.28

Folha de Aprovação

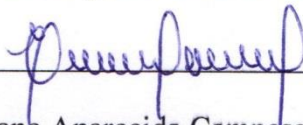
AUTOR: TALITA LUCIO CHAVES VASCONCELOS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE E
CICATRIZANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Hyptis pectinata* L. Poit.
(SAMBACAITÁ)

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa
de Pós-Graduação em Enfermagem da Universidade
Federal de Alagoas e aprovada em 17 de dezembro de
2015.

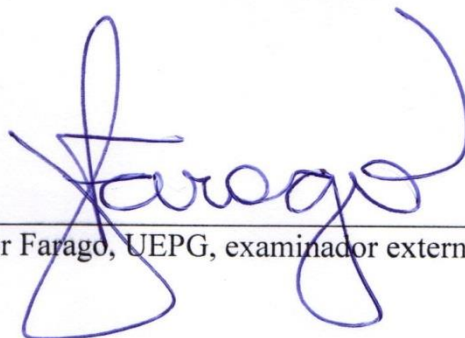


Prof^a Dr^a Maria Lysete de Assis Bastos, UFAL, orientadora

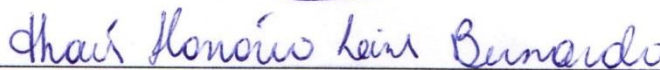


Prof^a Dr^a Eliane Aparecida Campesatto, UFAL, co-orientadora

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, UEPG, examinador externo



Prof^a Dr^a Thais Honório Lins, UFAL, examinador interno

A Deus por ter proporcionado mais uma conquista e pela presença constante nesta caminhada. Aos meus pais por todas as renúncias que realizaram para que eu tivesse a melhor educação. Ao meu esposo Wilbert por sonhar comigo e me levar às nuvens quando minha razão dizia para andar com os pés no chão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por continuar a me surpreender mostrando-me sempre que sou capaz. Obrigada por ouvir o desejo daquela menina que em 2009, ainda no 1º ano de graduação em Enfermagem, se encantou com o universo acadêmico e sussurrou em seu coração “será que um dia serei mestre?”. Dos tantos presentes que recebi de Ti, este está na lista dos inesquecíveis.

Aos meus pais por todo amor dedicado, incentivo e encorajamento. Esta conquista é resultado de todo investimento e abnegação. Aos meus irmãos, minha família e amigos pela torcida, apoio e por entender os momentos de ausência.

Ao meu esposo Wilbert, por estar ao meu lado em mais uma conquista, sendo meu suporte, meu escape e maior incentivador. Obrigada por fazer dos meus sonhos os seus.

À professora Dra. Maria Lysete de Assis Bastos, minha orientadora, pela confiança depositada, pelas orientações e ensinamentos valiosos e pela paz transmitida.

À profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto pela orientação e pelo apoio neste trabalho abrindo as portas do seu laboratório.

Às professoras Dra. Regina Célia Sales Santos Veríssimo, Pós-Dra. Adriana Reis Todaro e Dra. Camila Braga Dornelas pelas sábias considerações no exame de qualificação.

Aos professores Dr. Paulo Vitor Farago e Dra. Thais Honório Lins Bernardo, por aceitarem o convite para comporem a banca de defesa.

Aos professores doutores Lucia Maria Conserva, Magna Suzana, João Xavier e Luciano Aparecido pela permissão no uso dos Laboratórios.

Ao professor Dr. Célio Rodrigues por doar os animais para realização do teste *in vivo* de cicatrização.

Ao patologista Ricardo Luiz Simões Houly pela ajuda e disponibilidade na leitura das lâminas histopatológica das feridas.

Ao Dr. Jésus Costa Ferreira Júnior e ao graduando em química Rossiel Aslan pelo auxílio nos testes de prospecção fotoquímica e antioxidante. Ao doutorando Edeildo Ferreira pela ajuda na partição dos extratos e à doutoranda Ana Carolina Santana pelo auxílio no teste de viabilidade celular.

A todos os que fazem parte do Laboratório de pesquisa e Tratamento de Feridas (LpTF) pelo companheirismo e auxílio na realização dos testes, em especial o teste de cicatrização *in vivo*, pelos cuidados prestados aos animais durante a semana e finais de semana e dedicação nos exaustivos dias de bioensaio.

À mais que especial amiga Msc. Raíssa Fernanda Evangelista pelo apoio, ensinamento, paciência e acolhida no LpTF quando tudo na pesquisa experimental era novo e desconhecido para mim.

À querida amiga Fabiani Tenório, companheira de pesquisa experimental, com quem caminhei, chorei, compartilhei ansiedades, mas também sonhei e juntas vencemos os obstáculos que surgiram durante esses dois anos.

À melhor turma de mestrado da Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL. Compartilhamos momentos de alegria, estresse, diversão, insegurança, conquistas e eles não teriam sido os mesmos sem a presença e companhia de vocês. Estes dois anos foram tão especiais!

Ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem e seu corpo docente pela oportunidade de aprendizado e abertura para diálogo durante todo o mestrado.

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

A todos que contribuíram direta, ou indiretamente e que torceram para esta conquista minha eterna gratidão.

RESUMO

A espécie *Hyptis pectinata* (sambacaitá) é utilizada na medicina tradicional pelas populações para o tratamento de condições como rinofaringite, doenças de pele, distúrbios gástricos, febre e contra infecções causadas por bactérias e fungos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante, citotóxica e cicatrizante do sambacaitá. As partes das plantas foram separadas em folhas e caule e submetidas à extração em etanol por maceração para obtenção dos extratos etanólicos. Posteriormente, esses extratos foram submetidos ao fracionamento para obtenção das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica. Foram realizados testes *in vitro* de prospecção fitoquímica; Citotoxicidade por meio do teste de viabilidade celular pelo MTT; atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH; antimicrobiano pelo método de microdiluição em caldo. A avaliação da capacidade cicatrizante foi realizada *in vivo*, utilizando-se ratos como modelo animal. O teste de prospecção fitoquímica identificou a presença das classes de metabólitos secundários taninos, terpenos, alcaloides e flavonas, flavanóis e xantonas no extrato etanólico das folhas (EEF) e terpenos no extrato etanólico do caule (EEC). Os extratos EEF, suas frações e o extrato EEC não apresentaram citotoxicidade. Já as frações hexânica, clorofórmica e de acetato de etila do EEC apresentaram citotoxicidade evidenciada pela lise celular. Apenas o EEF apresentou capacidade sequestradora do Radical livre DPPH com uma IC₅₀ de 133,32 µg/ml. Os extratos EEF e EEC, bem como suas frações apresentaram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. O EEF inibiu *Staphylococcus aureus* com uma MIC 500 µg/mL e suas frações metanólica e acetato de etila com uma MIC de 250 µg/mL. Já o extrato EEC não foi capaz de inibir este mesmo microrganismo. Sua fração clorofórmica apresentou MIC de 500 µg/mL e sua fração acetato de etila 250 µg/ml. No que se refere ao potencial cicatrizante, o EEF não apresentou atividade cicatrizante quando comparado ao grupo controle positivo. Não houve alterações macroscópicas significativas nos órgãos dos animais após eutanásia, bem como a análise bioquímica da função renal e hepática não evidenciou diferenças significantes entre as médias dos grupos. Também não houve diferenças significantes entre os grupos nos achados histológicos das feridas. Conclui-se que a planta estudada apresentou atividade antimicrobiana moderada frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, capacidade de sequestrar o radical livre DPPH, o que demonstra seu potencial antioxidante e não apresentou atividade cicatrizante. Diante dos resultados encontrados, faz-se necessário o investimento em estudos que explorem cada vez mais o potencial medicinal da mesma.

Palavras-chave: *Hyptis*; Antimicrobianos; Antioxidantes; Viabilidade Celular; Cicatrização

ABSTRACT

Hyptis pectinata species (sambacaitá) is used in traditional medicine by people for the treatment of conditions such as rhinopharyngitis, skin disorders, gastric disorders, fever and infections caused by bacteria and fungi. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity, antioxidant, cytotoxic and healing of sambacaitá. The parts of the plants were separated into leaves and stems and subjected to extraction by maceration in ethanol to obtain the ethanol extract. Thereafter, the extracts were subjected to fractionation to obtain fractions of hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. Tests were performed in vitro phytochemical prospecting; Cytotoxicity via cell viability by the MTT test; Antioxidant activity for the kidnapping of free radical DPPH; Antimicrobial by the microdilution broth method; The evaluation of capacity was carried healing *in vivo* using mice as animal model. The phytochemical screening test identified the presence of classes of secondary metabolites tannins, terpenes, alkaloids and flavones, flavanols and xanthenes in the ethanol extract of the leaves (EEF) and terpenes in ethanol extract of stalk (EEC). The EEF extracts, their fractions and extract the EEC showed no cytotoxicity. Since the fractions hexane, chloroform and ethyl Acetat EEC showed cytotoxicity evidenced by cell lysis. As the EPS showed scavenging capacity of free radical DPPH with an IC₅₀ of 133.32 µg/mL. The EEF and EEC extracts and its fractions showed inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. The EEF inhibited with a *Staphylococcus aureus* MIC 500 µg/mL and its methanolic fractions, ethyl acetate and methanol with an MIC of 250 µg/mL. Since the EEC extract was not able to inhibit this same microorganism. It's chloroform fraction showed MIC of 500 µg/mL and its ethyl acetate fraction 250 µg/mL. As regards the healing potential, the EEF showed no wound healing activity when compared to the positive control group. There were no significant macroscopic changes in the organs of animals after euthanasia and biochemical analysis of renal and hepatic function showed no significant differences between the groups means. There were also no significant differences between the groups in the histological findings of the wounds. We conclude that the plant studied showed moderate antimicrobial activity against the microorganism *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, ability to scavenge the free radical DPPH, demonstrating its antioxidant potential and showed no healing activity. Before found results, the investment is necessary in studies exploring more and more the medicinal potential of it.

Keywords: *Hyptis*; Antimicrobials; Antioxidants; Cell Survival; Wound Healing;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Hyptis pectinata</i> L. Poit.....	22
Figura 2 -	Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo.....	29
Figura 3 -	Processo de obtenção do Extrato Etanólico das Folhas (EEF) e do Extrato Etanólico do Caule (EEC).....	33
Figura 4 -	Procedimento de obtenção das frações dos extratos etanólicos em ordem crescente de polaridade.....	34
Figura 5 -	Esquema da provável separação dos principais metabólitos secundários presentes em plantas.....	34
Figura 6 -	A) Estrutura química do controle positivo (+)-catequina (B) Estrutura química do radical sintético DPPH.....	38
Figura 7 -	Esquema do procedimento para realização do teste de microdiluição em caldo.....	41
Figura 8 -	Esquema de redução do Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium (TTC).....	42
Figura 9 -	Sequência adotada na técnica operatória.....	44
Figura 10 -	Identificação das classes de compostos metabólitos nos EEF e EEC de <i>Hyptis pectinata</i>	48
Figura 11 -	Cromatoplasmas dos ensaios qualitativos da atividade antirradicalar do EEF e EEC de <i>Hyptis pectinata</i> após reação com o radical livre sintético DPPH.....	53
Figura 12 -	Resultado da ação inibitória das frações clorofórmica, acetato de etila e metanólica do EEF de <i>Hyptis pectinata</i> frente à linhagem bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i>	57
Figura 13 -	Resultado da ação inibitória das frações clorofórmica, acetato de etila e metanólica do EEC de <i>Hyptis pectinata</i> frente à linhagem bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i>	58
Figura 14 -	Progressão da cicatrização das lesões de acordo com o tratamento utilizado.....	67
Figura 15 -	Progressão histológica da cicatrização das lesões de acordo com o tratamento utilizado.....	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Levantamento bibliográfico sobre as atividades biológicas comprovadas da espécie <i>Hyptis pectinata</i>	23
Quadro 2 -	Classificação de bactérias de importância médica.....	25

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Efeito do EEC e suas frações no ensaio de MTT.....	51
Gráfico 2 -	Efeito do EEF e suas frações no ensaio de MTT.....	52
Gráfico 3 -	(A) Curva da percentagem do radical livre sintético DPPH remanescente frente ao EEC de <i>Hyptis pectinata</i> (B) curva da percentagem do DPPH remanescente frente ao EEF de <i>Hyptis pectinata</i>	55
Gráfico 4 -	Média dos pesos dos animais durante o ensaio de cicatrização <i>in vivo</i>	60
Gráfico 5 -	Média das temperaturas dos animais durante o ensaio de cicatrização <i>in vivo</i>	61
Gráfico 6 -	Média das áreas das feridas dos animais durante o ensaio de cicatrização <i>in vivo</i>	62
Gráfico 7 -	Média do grau de contração das feridas dos animais durante o ensaio de cicatrização <i>in vivo</i>	63
Gráfico 8 -	Média do peso do fígado dos animais durante o ensaio de cicatrização <i>in vivo</i>	72
Gráfico 9 -	Média do peso dos rins dos animais durante o ensaio de cicatrização <i>in vivo</i>	72
Gráfico 10 -	Média dos valores séricos de AST e ALT dos animais submetidos ao ensaio de cicatrização <i>in vivo</i>	73
Gráfico 11 -	Média dos valores séricos de uréia e creatinina dos animais submetidos ao ensaio de cicatrização <i>in vivo</i>	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Escores utilizados para avaliação do exame histológico.....	46
Tabela 2 -	Rendimento dos extratos etanólicos de <i>Hyptis pectinatae</i> suas frações.....	47
Tabela 3 -	Prospecção fitoquímica do EEF e EEC de <i>Hyptis pectinata</i>	48
Tabela 4 -	Média da absorbância das triplicatas dos valores no t ₆₀ do EEF e <i>Hyptis pectinata</i>	53
Tabela 5 -	Tratamento estatístico da incapacidade sequestradora de radicais livres do EEC de <i>Hyptis pectinata</i>	54
Tabela 6 -	Tratamento estatístico da capacidade sequestradora de radicais livres do EEF de <i>Hyptis pectinata</i>	54
Tabela 7 -	Concentração inibitória mínima (CIM) do EEF e EEC, bem como de suas frações de <i>Hyptis pectinata</i> frente aos microrganismos avaliados.....	57
Tabela 8 -	Valores médios das áreas (cm ²) das feridas dos grupos no dia de pós-operatório (DPO).....	61
Tabela 9 -	Descrição macroscópica das lesões nos DPO e porcentagem (%) dos achados rubor perilesional, exsudato e inflamação.....	64
Tabela 10 -	Descrição macroscópica das lesões nos DPO e porcentagem (%) do achado tecido de granulação.....	65
Tabela 11 -	Descrição macroscópica das lesões nos DPO e porcentagem (%) dos achados fibrina e crosta.....	65
Tabela 12 -	Estudo histológico das feridas.....	67
Tabela 13 -	Descrição histológica da fase inflamatória das lesões no 3ºDPO e porcentagem (%) dos achados (n.3).....	68
Tabela 14 -	Descrição histológica da fase proliferativa no 7º DPO das lesões e porcentagem (%) dos achados (n.3).....	69

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotranferase
AST	Aspartato aminotranferase
C_2H_6O	Etanol
$C_4H_8O_2$	Acetato de Etila
C_5H_8	Isopreno
$CH_3(CH_2)_4CH$	Hexano
$CHCl_3$	Cloroformio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPO	Dia de Pós Operatório
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidazila
E.P.M	Erro padrão da Média
EEC	Extrato Etanólico do Caule
EEF	Extrato Etanólico das Folhas
ET	Experimental Talita
$FeCl_3$	Cloreto de Ferro
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina-eosina
IASP	International Association for the Study of Pain
IMA	Instituto do Meio Ambiente
LaFI	Laboratório de Farmacologia e Imunidade
LPqPN – Fitoquímica/IQB	Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais – Fitoquímica do Instituto de Química e Biotecnologia
LpTF	Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas
MeOH	Metanol
MTT	Metiltetrazólio
NH_4OH	Hidróxido de Amônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PPPM	Programa de Pesquisa de Plantas mMedicinais
Rfs	Fatores de Retenção
COBEA	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SUS	Sistema Único de Saúde
TTC	Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Plantas medicinais e seu uso em pesquisas.....	20
2.2 A espécie <i>Hyptis pectinata</i> L. Poit.....	21
2.3 Microrganismos, infecção e atividade antimicrobiana.....	24
2.4 Feridas e cicatrização.....	27
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Tipo de estudo.....	32
4.2 Local de realização.....	32
4.3 Aspectos éticos.....	32
4.4 Coleta e identificação das amostras.....	32
4.5 Preparo dos extratos etanólicos e seu fracionamento.....	35
4.6 Ensaio biológicos.....	35
4.6.1 Prospecção fitoquímica.....	35
4.6.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT.....	36
4.6.3 Avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres.....	37
4.6.3.1 Ensaio qualitativo.....	37
4.6.3.2 Ensaio quantitativos.....	38
4.6.4 Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	40
4.6.5 Ensaio para avaliação do potencial cicatrizante <i>in vivo</i>	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
5.1 Rendimento dos extratos etanólicos e suas frações.....	47
5.2 Prospecção fitoquímica.....	47
5.3 Ensaio da viabilidade celular pelo método MTT.....	51
5.4 Avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres.....	52
5.4.1 Ensaio qualitativo.....	52
5.4.2 Ensaio quantitativos.....	53
5.5 Concentração Inibitória Mínima.....	51

5.6 Potencial cicatrizante <i>in vivo</i>	59
5.6.1 Observação clínica.....	59
5.6.2 Morfometria.....	61
5.6.3 Avaliação macroscópica das lesões.....	64
5.6.4 Avaliação histopatológica das lesões.....	67
5.6.5 Avaliação macroscópica dos órgãos da função hepática e renal.....	71
6. CONCLUSÃO	72
7. PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	89
APÊNDICES	91

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho tem como objeto de estudo as propriedades biológicas da espécie *Hyptis pectinata* no que se refere à atividade antimicrobiana, antioxidante e cicatrizante de seu extrato etanólico.

O reconhecimento da importância e eficácia do uso de plantas medicinais pela população despertou na comunidade científica o interesse em estudar e comprovar, a partir de estudos científicos, as práticas tradicionais que percorrem gerações (OLIVEIRA et al., 2009). Deste modo, o estudo de plantas medicinais, a partir de sua utilização pela população, pode fornecer informações úteis para estudos farmacológicos e fitoquímicos (BRASILEIRO et al., 2008).

Bruning et al. (2012) afirmam que dois fatores têm influenciado no aumento do uso de medicamentos à base de plantas (fitoterápicos) no Brasil. O primeiro decorre dos avanços advindos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos seguros e eficazes. O segundo é a crescente tendência pela busca de terapias menos agressivas ao organismo pela população.

O uso generalizado dos antimicrobianos na prática médica contribuiu para o surgimento de microrganismos resistentes aos fármacos disponíveis no mercado, havendo, ainda, aqueles que passaram a ser resistentes a múltiplas drogas, constituindo os microrganismos multirresistentes (CALBO, 2012).

Neste contexto, o uso de produtos naturais surge como uma das alternativas no tratamento de diversas infecções e, desta forma, a descoberta de plantas da flora brasileira com potencial terapêutico torna-se cada vez mais relevante, pois a sociedade necessita de novos fármacos que sejam de qualidade e acessíveis economicamente (CARELLI et al., 2011).

No que se refere ao uso de plantas medicinais para o tratamento de feridas, este tem sido incrementado nos últimos anos com a busca de princípios ativos, isolados de plantas, que apresentem efetivo papel no processo de cicatrização (ALMEIDA et al., 2012).

A espécie *Hyptis pectinata* L. Poit, conhecida popularmente como sambacaitá está presente em todo território nacional (HARLEI, 2014). É utilizada pela população para o tratamento de rinofaringite, congestão nasal, doenças de pele, distúrbios gástricos, febre e contra infecções causadas por bactérias e fungos (SANTOS et al, 2008). Suas folhas e caule são usadas em infusão para o tratamento de inflamações na pele e infecções bacterianas (FALCÃO et al., 2013).

Estudos já realizados identificaram no óleo essencial da *Hyptis pectinata* L. Poit compostos que possuem atividade antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória e antimicrobiana desta espécie, evidenciando o potencial biológico desta planta (SERAFINI, 2012; SANTOS 2008).

Diante dos resultados obtidos em estudos anteriores comprovando as ações farmacológicas da *Hyptis pectinata* L. Poit, e a necessidade de ampliar o conhecimento sobre seu uso na terapia complementar, este estudo propõe a avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e cicatrizante do extrato etanólico das folhas e caule de *Hyptis pectinata* L. Poit.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas medicinais e seu uso em pesquisas

Desde os primórdios o poder curativo das plantas tem sido conhecido pela espécie humana. Mesmo de forma empírica, as antigas civilizações já percebiam que muitas plantas continham em suas essências princípios ativos, que ao serem utilizados revelavam seu poder curativo sobre determinadas doenças ou sintomas (BADKE et al., 2011).

Durante o processo evolutivo, o homem aprendeu a selecionar plantas, tanto para seu alimento, quanto para a cura ou alívio de seus males. Tal processo resultou no domínio do conhecimento do uso das plantas medicinais por alguns povos (DE MELO et al., 2012). Este conhecimento tradicional tem sido repassado de geração a geração se constituindo, principalmente, nos países em desenvolvimento, uma das principais formas de tratamento das doenças, conhecido como tratamento tradicional (KOVALSKI, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2013), para milhões de pessoas no mundo o tratamento tradicional à base de plantas medicinais representa a principal fonte de cuidados de saúde, quando não a única.

No Brasil, apesar do avanço técnico-científico na indústria farmacêutica e dos diversos incentivos fornecidos para a utilização de medicamentos industrializados, a maior parte da população ainda se utiliza das plantas medicinais para o cuidado de suas enfermidades (BADKE et al., 2011).

Diante disto, diversos estudos etnobotânicos vêm sendo realizados no Brasil. Em sua maioria, são desenvolvidos na Atenção Básica, pois esta se insere no cotidiano das pessoas e em suas comunidades, sejam elas urbanas ou rurais. Tais estudos evidenciam que as comunidades utilizam grande diversidade de plantas medicinais, as quais geralmente são usadas para a cura da gripe, dor de barriga, parasitoses, febre, inflamações, cuidados no pós-parto, como calmante, entre outras finalidades. No entanto, este uso é, em sua maioria, empírico, sendo necessários estudos que gerem conhecimento científico acerca dessas plantas (FURLAN, 2006; BADKE et al., 2011; BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012; PINTO; AMOROZO; CARVALHO et al., 2013; SOUZA et al., 2013).

A fim de normatizar e harmonizar o uso da medicina tradicional na população brasileira, o Brasil, a partir de 2006 vem investindo em políticas e programas nacionais que promovem a segurança, eficácia e qualidade dos fitoterápicos; aumentam sua disponibilidade e acessibilidade; e fomentam o uso racional tanto pelos provedores quanto pelos consumidores (BRASIL, 2012).

Neste mesmo ano foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que trouxe diretrizes e ações para inserção de serviços e produtos relacionados à medicina tradicional chinesa/acupuntura, homeopatia e plantas medicinais e fitoterapia, assim como para observatórios de saúde do termalismo social e da medicina antroposófica no âmbito do Sistema Único de Saúde/SUS (BRASIL, 2006).

Com o avanço da PNPIC foi criada em 2008 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), a qual aborda e contempla o desenvolvimento de toda a cadeia produtiva de plantas medicinais. Esta política traz como objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional dessas plantas promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Seu fortalecimento tem sido apoiado pelo Ministério da Saúde com a implantação de ações estratégicas, dentre elas, a criação do Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos instituído em 2014 (BRASIL, 2006).

A fim de incentivar a pesquisa de plantas medicinais também foi criado o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais (PPPM) com o objetivo de contribuir com o desenvolvimento de uma terapêutica complementar, com embasamento científico, a partir de pesquisas que confirmassem as propriedades terapêuticas das plantas brasileiras potencialmente medicinais utilizadas em larga escala pela população (BRASIL, 2006).

Diante disto, reflete-se sobre a necessidade de estudos experimentais em todo território brasileiro, com enfoque nas plantas medicinais em maior uso pelas pessoas, a fim de que este uso passe a ser embasado em provas científicas e de forma segura.

2.2 A espécie *Hyptis pectinata* L. Poit

Esta espécie vegetal pertence à família Lamiaceae composta por 250 gêneros, dos quais o maior é o *Hyptis* jacq. com aproximadamente 400 espécies. A espécie *Hyptis pectinata* L. Poit ou *Mesosphaerum pectinatum* (L.) Kuntze (Figura 2), conhecida popularmente como sambacaitá ou canudinho, está presente em todo território nacional, nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado e Floresta atlântica (HARLEI, 2014). É uma planta herbácea com folhas fortemente aromáticas, pequenas flores bilabiais e pode medir de 1 a 2 metros de altura (BASÍLIO et al., 2006).

Figura 1 - *Hyptis pectinata* L. Poit



Fonte: AUSTRALIAN TROPICAL REINFOREST PLANTS, 2015

É amplamente utilizado na medicina tradicional pelas populações locais para o tratamento de condições como rinofaringite, congestão nasal, doenças de pele, distúrbios gástricos, febre e contra infecções causadas por bactérias e fungos (SANTOS et al, 2008). Encontra-se entre as plantas mais comercializadas para fins medicinais em um município do estado de Alagoas (LÓS; BARROS; NEVES, 2012). Suas folhas e cascas são usadas em infusão para o tratamento de inflamações na laringe e na pele, infecções bacterianas, dor e câncer (RAYMUNDO et al., 2011; FALCÃO et al., 2013).

Estudos já realizados identificaram no óleo essencial da *Hyptis pectinata* L. Poit os compostos sesquiterpenoides com altos teores de calamusenone, β -cariofileno, cis- β -guainene e óxido de cariofileno, responsáveis pela atividade antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória e antimicrobiana desta espécie (SANTOS, et al., 2008; SERAFINI, 2012).

Outros estudos realizados *in vivo*, comprovaram a atividade antinociceptica, anti-inflamatória e antibacteriana. (LISBOA et al., 2006; RAYUNDO et al., 2011). O uso de seu óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento de espécies de bactérias Gram negativas como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enteritidis* (SANTOS, et al., 2008).

Também exerce significativo efeito estimulante sobre a regeneração do fígado, estudo comprovado após hepatectomia parcial em ratos (SILVA, 2002). Quanto a sua ação cicatrizante, ainda não existem estudos que possam comprová-la. No entanto, um estudo realizado com a espécie *Hyptis suaveolens*, pertencente ao mesmo gênero e família, mostrou que tal espécie atuou promovendo uma reepitelização mais acentuada em feridas produzidas em ratos (ANTONIO, 2005).

A literatura científica disponível nos últimos dez anos sobre a planta *Hyptis pectinata*, comprova algumas propriedades biológicas, conforme o Quadro 2, evidenciando o excelente potencial dessa espécie para a descoberta de novos compostos com interesse no desenvolvimento de novos produtos terapêuticos.

Quadro 1 - Levantamento bibliográfico sobre as atividades biológicas comprovadas da espécie *Hyptis pectinata*.

Parte da planta estudada	Tipo de extrato/Óleo essencial	Atividade biológica comprovada	Referências
Folhas	Frações Hexânica, Clorofórmica e Acetato de etila.	Ação Antinociceptiva <i>in vivo</i> .	Lisboa et al (2006)
Folhas	Extrato aquoso	Capacidade de estimular a regeneração hepática e leve efeito hepatoprotetor.	Melo et al. (2006)
Folhas	Óleo essencial	Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra cepas de <i>Streptococcus mutans</i> .	Nascimento et al. (2007)
Folhas	Óleo essencial	Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra bactérias Gram (+).	Santos et al. (2008)
Folhas	Óleo essencial	Atividade Antinociceptiva <i>in vivo</i> .	Arrigoni-Blank et al. (2008)
Folhas	Óleo essencial	Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória <i>in vivo</i> .	Raymundo et al. (2011)
Folhas	Óleo essencial	Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> .	Serafini et al. (2012)
Folhas	Extrato etanólico, Fração metanólica, Fração hexânica e Fração acetato de etila	Atividade Leishmanicida <i>in vitro</i> contra formas promastigota de <i>Leishmania braziliensis</i> .	Falcao et al. (2013)
Folhas	Extrato aquoso	Atividade Antioxidante <i>in vitro</i> ; Ação Anti-inflamatória e	Paixão et al. (2013)

Antinociceptiva <i>in vivo</i> .			
Folhas	Extrato Aquoso	Atividade Lesishmanicida <i>in vitro</i> contra formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i>	De-Queiroz et al. (2014)
Folhas	Óleo essencial	Atividade Antinociceptiva <i>in vivo</i> .	Menezes et al. (2015)

Fonte: AUTOR, 2015.

Sua atividade anti-inflamatória se dá pelo seu possível efeito na inibição da produção de prostaglandinas, mediadores químicos responsáveis pela resposta inflamatória, observado em estudo com óleo essencial desta planta (RAYMUNDO et al., 2009). Seu óleo essencial e extrato metanólico também apresentaram atividade antinociceptiva, no qual os autores identificaram e associaram tal propriedade a ação desta planta nos receptores opióides e colinérgicos, demonstrando que sua atuação é a nível central (LISBOA et al., 2006; ARRIGONI-BLANK et al., 2008).

Diante dos resultados obtidos descritos acima que comprovam, por meio de estudos *in vivo* e *in vitro*, as ações farmacológicas da espécie *Hyptis pectinata* L. Poit, e diante da necessidade de expandir o conhecimento sobre seu uso na terapia complementar, com a perspectiva de desenvolvimento futuro de fitoterápicos, justifica-se o presente estudo.

2.3 Microrganismos, infecção e atividade antimicrobiana

Os microrganismos são formas de vida individualmente muito pequenas para que possam ser vistas a olho nu. Fazem parte deste grupo as bactérias, os fungos, protozoários e algas microscópicas. Também estão inclusos os vírus, apesar de serem considerados apenas entidades celulares (TORTORA, 2012).

Quando um determinado microrganismo patogênico (capaz de causar infecção) consegue penetrar em um organismo, de forma que se multiplique ou se desenvolva ocorre o que se chama de infecção. Uma infecção pode ou não evoluir para uma doença infecciosa, que implica na apresentação de manifestações clínicas, os sinais e sintomas (RIBEIRO, 2009).

As bactérias pertencem ao reino dos procariotos e podem ser classificadas em três grupos básicos de acordo com sua forma: cocos, bacilos e espiroquetas. Quanto às bactérias de importância médica, estas se classificam em dois grupos de acordo com a composição de sua parede: Gram positivas e Gram negativas (LEVINSON, 2010).

A parede das bactérias Gram positivas são formadas basicamente por peptidoglicano e não se deixam descorar pelo álcool. Já a parede das bactérias Gram negativas é mais complexa, formada por uma ou poucas camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa formada por dupla camada lipídica e se deixam descorar pelo álcool. A membrana externa confere à bactéria Gram negativa uma barreira adicional que dificulta a passagem de algumas substâncias. Alguns antibióticos, corantes, metais pesados e sais biliares não penetram na parede de Gram negativas com a mesma facilidade que penetram em uma de Gram positivas (TRABULSI, 2008).

Estudos realizados mostram que as bactérias Gram positivas de maior importância médica são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp. e *Enterococcus faecalis* (LEÃO et al., 2007). Das Gram negativas, destacam-se *Escherichia coli*, *Proteus species*, *Salmonella species*, *Shigella species*, *Enterobacter species*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Hemophilus influenzae*, *Bacteroides fragilis*, *Acinetobacter baumannii*, e *Klebsiella pneumoniae* (LEVINSON, 2010; CORTES et al., 2013; GARCIA et al., 2013). O quadro 1 demonstra as principais doenças infecciosas causadas por cada uma dessas bactérias.

Quadro 2 - Classificação de bactérias de importância médica

Gram Positivas	Doenças representadas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Abscesso de pele e outros órgãos
<i>Streptococcus</i> spp	Pneumonia, Infecções do Trato Respiratório, Celulite
<i>Enterococcus faecalis</i>	Infecções severas do Trato Urinário, Endocardite
Gram negativas	
<i>Escherichia coli</i>	Infecção do Trato Urinário, Diarreia
<i>Proteus</i> spp	Infecção do Trato Urinário
<i>Salmonella</i> spp	Enterocolite, Febre Tifóide
<i>Shigella</i> spp	Enterocolite
<i>Enterobacter</i> spp	Infecção do Trato Urinário
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecção do Trato Urinário, Pneumonia
<i>Bacteroides fragilis</i>	Peritonite
<i>Hemophilus influenzae</i>	Meningite
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Infecções do Trato Respiratório, Infecções de Feridas
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Infecção do Trato Respiratório, Infecção do Trato Urinário, Infecção de Feridas

Fonte: LEVINSON, 2010.

Os fungos por sua vez são seres vivos eucariotos e fazem parte de um reino próprio, o Fungi. Podem possuir apenas um núcleo como as leveduras ou multinucleados como os fungos filamentosos ou bolores e os cogumelos (TRABULSI, 2008).

Embora sejam estimados em 250 mil espécies, menos de 150 são considerados patógenos aos seres humanos. Dentre as centenas de espécies descritas, leveduras do gênero *Candida*, em especial a espécie *Candida albicans*, são as maiores agentes de infecção hospitalar (ANVISA, 2004).

Apesar do gênero *Candida* ser, sem dúvida, o mais importante, outros gêneros de fungos apresentam importância para a área médica. São eles *Pichia* spp (*Hansenula* sp), *Rhodotorula* spp, *Trichosporon* sp, *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Acremonium* spp e *Penicillium* spp (ANVISA, 2004).

Ao passo que a ciência evoluiu, foram sendo descobertas substâncias capazes de impedir a morte em decorrência de doenças infecciosas aumentando, assim, a expectativa de vida da população. Tais substâncias são chamadas de antimicrobianos.

Os agentes antimicrobianos possuem a capacidade de inibir vias ou alvos que são essenciais para a replicação e sobrevivência dos microorganismos (GOLAN, 2009). Podem agir matando (bactericidas e fungicidas), ou interferindo em seu crescimento (bacteriostáticos e fungistáticos). A atividade dos agentes antibacterianos pode ser a partir da inibição da síntese de parede celular, da inibição da síntese proteica, do dano à membrana plasmática, da inibição da síntese de ácidos nucleicos e da inibição da síntese de metabólitos essenciais (TORTORA, 2012). Uma vez que a síntese da parede celular encontra-se comprometida, ocorrerá, conseqüentemente, a lise celular (GOLAN, 2009).

Os fungos, por possuírem membrana celular semelhante à das células humanas e carecerem de parede celular, formam um grupo no qual a terapêutica torna-se mais problemática, uma vez que agentes antifúngicos, possivelmente, agirão sobre a célula do hospedeiro (GOLAN, 2009).

A atividade antimicrobiana observada nas plantas medicinais é resultado da presença de diversas substâncias presentes em seus extratos e óleos essenciais. Diversos estudos têm sido realizados a fim de comprovar e identificar tais substâncias, de modo que produtos oriundos dessas plantas possam ser comercializados para o uso como antibacteriano e antifúngico (DUARTE, 2006).

A atividade antimicrobiana tem sido atribuída à presença de pequenos terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos, como timol e flavanoides. Os terpenoides atuam desintegrando a membrana citoplasmática; os alcaloides interagem com a parede celular e o DNA; os compostos fenólicos por sua vez impedem a entrada de substrato na célula e desintegram a membrana citoplasmática (SILVA, 2010).

É neste contexto que cada vez mais a atividade antimicrobiana das plantas deve ser estudada a fim de que fitoterápicos possam cada vez mais atuar como novas formas farmacológicas de tratamento.

2.4 Feridas e cicatrização

Ferida é definida como toda e qualquer ruptura da integridade de um tecido ou órgão. Pode ser causada por agentes químicos, físicos ou biológicos. O dano causado ao tecido a partir da ferida desencadeia a regeneração, um complexo de respostas que envolvem fenômenos químicos, físicos, e biológicos e proliferação celular no interior da ferida, em estágios interdependentes e simultâneos, com vistas à restauração tecidual (CÔRTEZ, 2013).

A cicatrização é o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado, quer a lesão tenha sido traumática, ou necrótica (OLIVEIRA; DIAS, 2012). Tem sido didaticamente dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelagem (HATANAKA; CURI, 2007).

A fase inflamatória inicia-se logo após a ocorrência do ferimento, com dano vascular, caracterizado por hemorragia e perdura por cerca de três dias. Este dano expõe o colágeno da matriz extracelular permitindo a ativação de plaquetas, que preenche a área lesada. Há ativação da cascata de coagulação, liberação de fatores de crescimento e ativação de células parenquimatosas pela lesão (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A ativação destas células parenquimatosas produzem numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos como histamina, serotonina e bradicinina, que por sua vez causam vasodilatação e aumento de fluxo sanguíneo no local e, conseqüentemente, sinais inflamatórios como calor e rubor. Ocorre também o aumento da permeabilidade capilar, causando extravasamento de líquidos para o espaço extracelular, e conseqüente edema. Esses fenômenos vasculares auxiliam no recrutamento das células inflamatórias para o local da ferida (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; PAGNANO et al., 2009).

Estas células inflamatórias são os neutrófilos e monócitos, que migram para o leito da ferida e atuam na fagocitose de bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos. Também produzem fatores de crescimento, que preparam a ferida para a próxima fase da cicatrização, quando fibroblastos e células endoteliais também são recrutados (MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

Os macrófagos, derivados de monócitos, são considerados a célula reguladora mais importante da fase inflamatória, pois a partir da fagocitose contribuem para a progressão da cicatrização para a fase proliferativa, através da indução da angiogênese e da formação de

tecido de granulação. São também responsáveis pela libertação de fatores de crescimento (PDGF, TGF- α , TGF- β), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

A fase proliferativa inicia-se por volta do 4º dia após a lesão tecidual e se estende, aproximadamente, até o término da segunda semana (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). Nesta fase ocorre a reparação do tecido conjuntivo e do epitélio. Na reparação do tecido conjuntivo ocorre a formação do tecido de granulação, com proliferação endotelial e de fibroblastos (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

Os fibroblastos iniciam a síntese e a secreção de componentes da matriz extracelular, como glicosaminoglicanos e fibras colágenas tipo I e III, associadas à proliferação e ao crescimento interno dos capilares (angiogênese). Como consequência da angiogênese, o tecido conjuntivo é formado, recebendo a denominação de tecido de granulação. A partir daí, inicia-se a fase de contração das paredes marginais da lesão. Esta ação é realizada pelos fibroblastos ativados, os quais se diferenciam em miofibroblastos. Estes, por sua vez aproximam as bordas da ferida, forçando as fibras de colágeno a se sobreporem e se entrelaçarem, diminuindo o tamanho da lesão e consequentemente, ocasionando o fechamento da mesma (PAGANELA et al., 2009).

A fase de remodelagem dura meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz. É o período no qual os elementos reparativos da cicatrização são transformados para tecido maduro de características bem diferenciadas (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

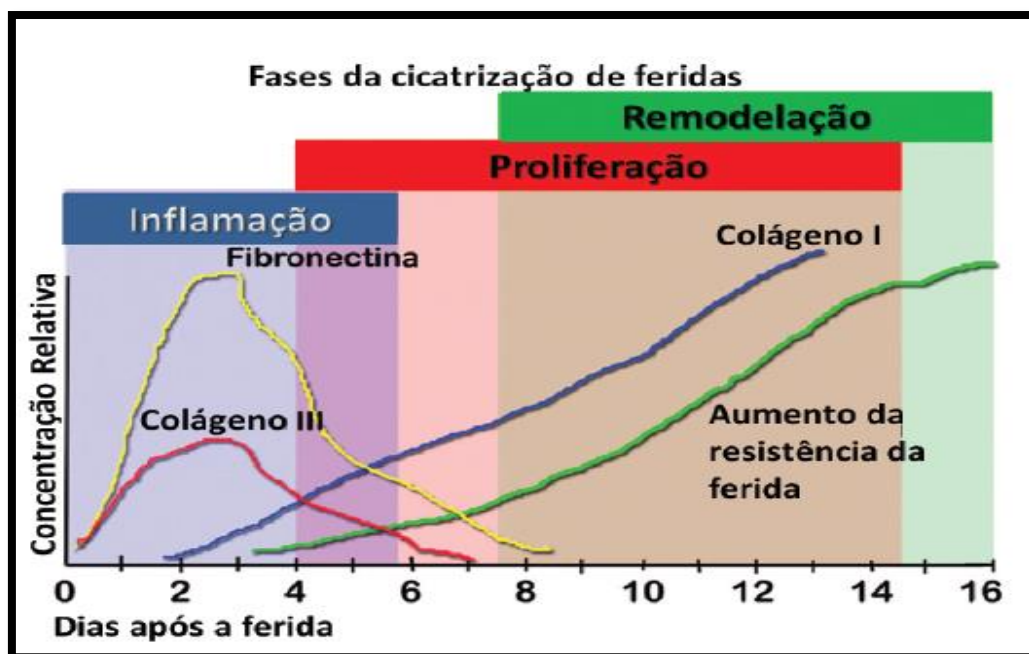
Na fase inicial da remodelagem ocorre deposição de fibronectina, colágeno, ácido hialurônico e proteoglicanos no leito da ferida. Neste momento, o tecido de granulação é rico em colágeno tipo III e vasos, sendo progressivamente substituído por uma cicatriz com predomínio de colágeno tipo I (LORENO; RODRIGUES, 2011).

As fibras de colágeno tipo III começam a ser produzidas cerca de 48 a 72 horas após a lesão, com produção máxima após 5 a 7 dias e um máximo acumulado após 2 a 3 semanas. Ao longo do ano seguinte à lesão, ocorre a substituição progressiva do colágeno tipo III por colágeno tipo I, que por sua vez é estável e semelhante ao pré-lesional. Paralelamente, a força de tensão aumenta após 1 mês correspondendo a cerca de 40% do verificado na pele íntegra e ao fim de 1 ano com um valor máximo de 70% (LORENO; RODRIGUES, 2011).

O processo cicatricial é comum a todas as feridas, independentemente do agente que a causou, é sistêmico e dinâmico e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007). A figura 1 mostra de forma

didática as três fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo.

Figura 2 - Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo.



Fonte: ISAAC et al., 2010.

Apesar dos avanços tecnológicos, o insucesso na prevenção de feridas e em seu tratamento ainda constitui um desafio interdisciplinar que não deve ser subestimado (FEIJÓ; CRUZ; LIMA, 2008).

Desde seu surgimento como profissão, o cuidado em feridas faz parte da assistência em enfermagem, sendo grande o número de estudos publicados com esta temática, demonstrando o importante papel e responsabilidade do enfermeiro nesse processo (FERREIRA et al., 2013).

No cuidado em feridas é fundamental que o enfermeiro busque novas maneiras de cuidar, fundamentada na realidade individual e subjetiva de cada pessoa portadora de ferida, bem como esteja atento às inovações de cuidado nesta área, visando à melhoria da qualidade da assistência (CARNEIRO; SOUZA; GAMA, 2010).

Ainda no contexto da cicatrização de feridas, o uso de plantas medicinais é mencionado desde a pré-história, quando eram utilizadas plantas e extratos vegetais na forma de cataplasmas com o objetivo de estancar hemorragias e favorecer a cicatrização (PIRIZ et al., 2014).

Na atualidade, estudos experimentais à base de plantas medicinais estão sendo desenvolvidos, já existindo, inclusive produtos no mercado derivados de plantas, para fins medicinais (VARGAS et al., 2012). Diante disto, reafirma-se o importante papel da enfermagem no desenvolvimento de novas tecnologias para o tratamento de feridas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial antimicrobiano, antioxidante e cicatrizante dos extratos etanólicos das folhas e caule de *Hyptis pectinata* L. Poit.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar partição dos extratos etanólicos para e obtenção das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica;
- Realizar prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos;
- Verificar a citotoxicidade dos extratos por meio do teste de viabilidade celular;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos, por meio da capacidade sequestradora do radical livre DPPH;
- Qualificar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos frente às bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus epidermidis*, Gram Negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, e ao fungo *Candida albicans*;
- Avaliar a atividade cicatrizante *in vivo* do extrato etanólico das folhas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo:

Pesquisa básica, de abordagem quantitativa do tipo experimental. Este tipo de pesquisa tem como objetivo gerar novos conhecimentos úteis para o avanço da ciência (KAUARK; MANHÃES; MEDEIROS, 2010).

4.2 Locais de realização:

Os testes deste estudo foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas/LpTF da Escola de Enfermagem e Farmácia, em parceria com o Laboratório de Farmacologia e Imunidade/LaFI, o Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais – Fitoquímica do Instituto de Química e Biotecnologia (LPqPN – Fitoquímica/IQB), o Laboratório de Tecnologia de Controle de Medicamentos/LTCM da Escola de Enfermagem e Farmácia e o Laboratório de Biociências Farmacêuticas, todos pertencentes à Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

4.3 Aspectos éticos

O projeto do presente estudo foi encaminhado à Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas, sendo aprovado em 12 de Fevereiro de 2015 com nº do Processo 058/2014 (Anexo A). Os protocolos foram conduzidos respeitando-se os princípios éticos na experimentação animal, seguindo a diretriz brasileira para o cuidado e utilização de animais, determinada pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (COBEA, 2013).

4.4 Coleta e identificação das amostras

As folhas e caule da *Hyptis pectinata* foram coletados no Arboretum da UFAL (Coordenadas Geográfica S 9°33'11,9" W35°46'11,81") em 25/09/2014, às 9:30 horas, em dia ensolarado. Amostra do material vegetal coletado foi encaminhada para o Herbário do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA-AL), onde a exsicata encontra-se depositada sob o MAC nº23601 (Anexo B).

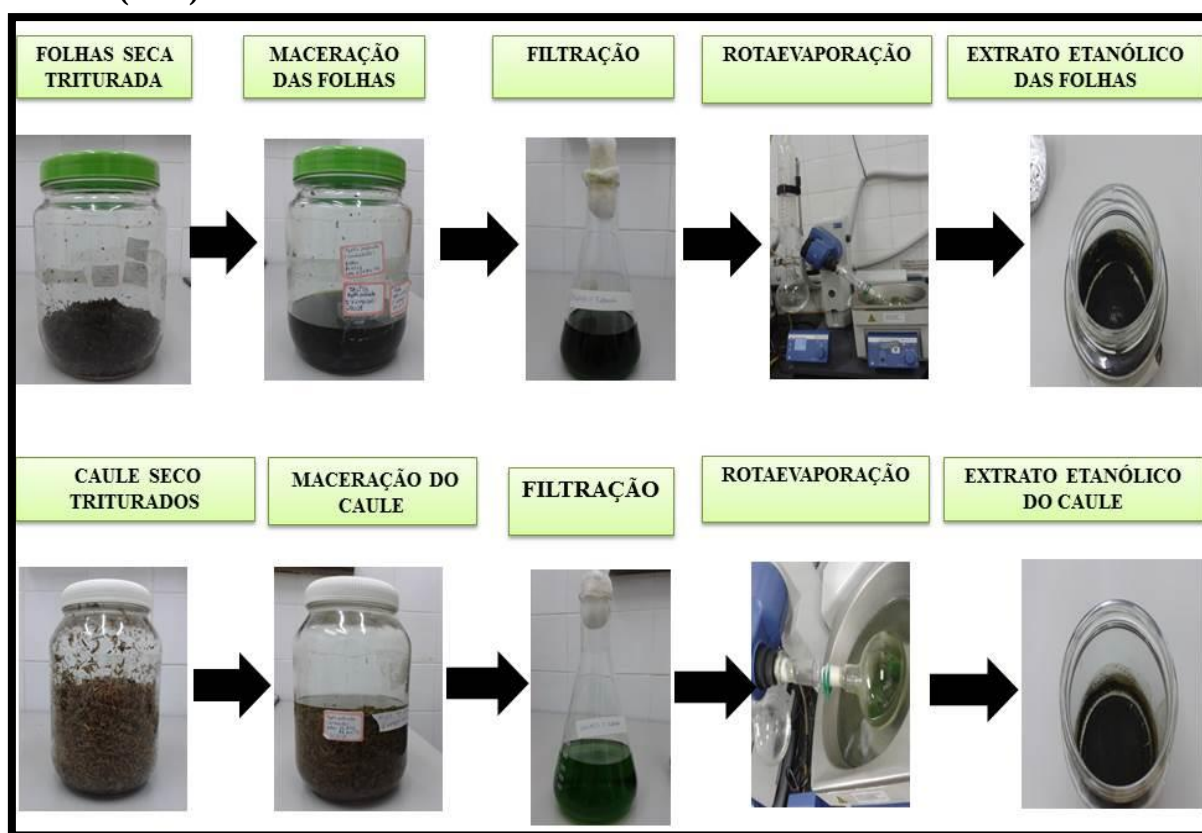
4.5 Preparo dos extratos etanólicos e seu fracionamento

Realizou-se a separação das partes da amostra coletada (folhas e caule), bem como o descarte das folhas visivelmente desgastadas ou com fungos. Logo após, as partes foram

colocadas para secagem, realizada à sombra, com ar circulante durante 30 dias até ser possível identificar que as mesmas estavam secas.

Posteriormente, as partes foram trituradas e submetidas à maceração com Álcool etílico a 97%. A filtragem foi realizada a cada 72 horas até o esgotamento da extração. A cada filtração, a solução com extrato foi concentrada em evaporador rotativo a 40 °C e mantido em dessecador com sílica gel para evaporação do solvente residual e obtenção do extrato etanólico das folhas (EEF) e do extrato etanólico do caule (EEC) (Figura 3).

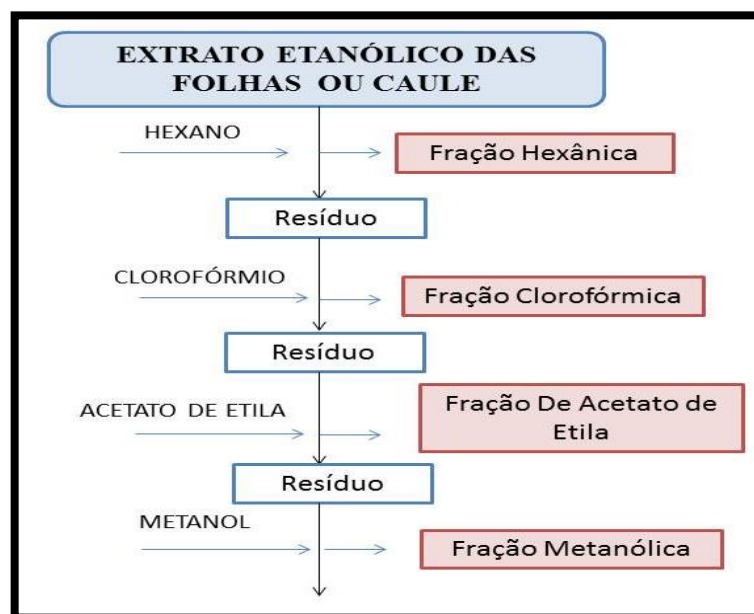
Figura 3 - Processo de Obtenção do Extrato Etanólico das Folhas (EEF) e do Extrato Etanólico do Caule (EEC)



Fonte: AUTOR, 2015.

Após a obtenção do EEF e EEC de *Hyptis pectinata* foi realizado o processo de fracionamento com solventes orgânicos de polaridades crescentes, visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades (FILHO; YUNES, 1997). Os extratos etanólicos foram submetidos à filtração em sílica, utilizando-se os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol (Figura 4), nesta ordem. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e mantidas em dessecador com sílica gel para evaporação do solvente residual (PARACAMPO, 2009).

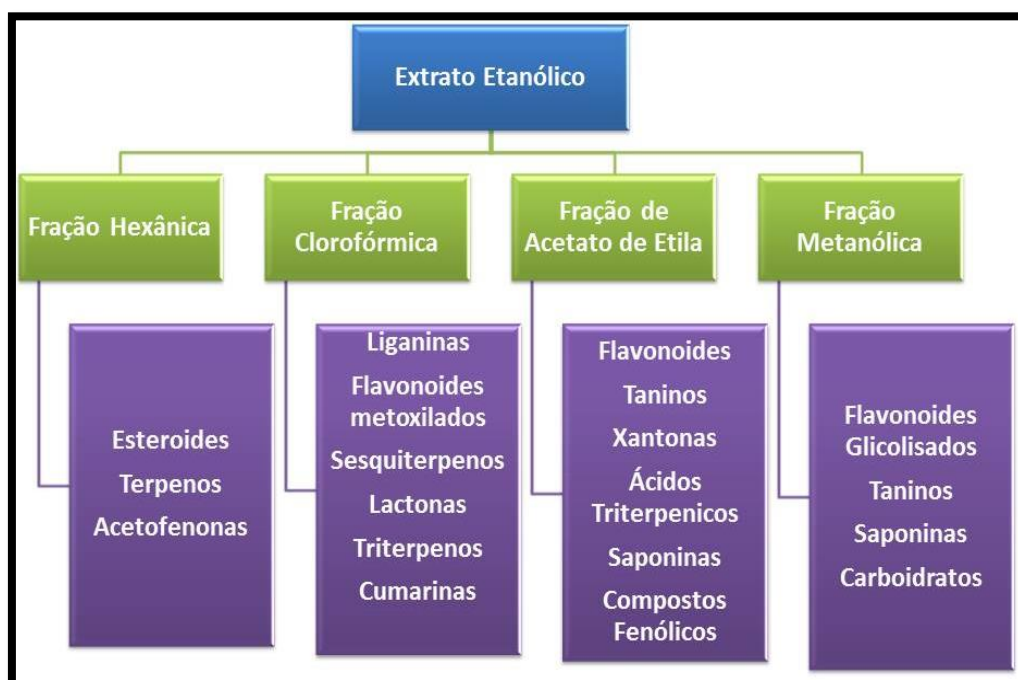
Figura 4 - Procedimento de obtenção das frações dos extratos etanólicos em ordem crescente de polaridade.



Fonte: AUTOR, 2015.

As prováveis classes de metabólitos secundários que se espera separar por meio do fracionamento e semipurificação com solventes orgânicos descritas por Filho e Yunes (1997), encontra-se na figura 5.

Figura 5 - Esquema da provável separação dos principais metabólitos secundários presentes em plantas



Fonte: FILHO; YUNES, 1997.

4.6 Ensaios biológicos

4.6.1 Prospeção fitoquímica

Este teste teve como objetivo identificar as classes dos constituintes químicos bioproduzidos pelo metabolismo secundário contidos nos EEF e EEC de *Hyptis pectinata*. Para tanto, utilizou-se a metodologia de Matos (1997), em que os métodos utilizados são qualitativos. Foi avaliada a presença das seguintes classes:

Alcaloides

Para identificar a presença de alcaloides uma alíquota de 5 mg dos extratos etanólicos de *Hyptis pectinata* foram dissolvidas em 1mL de etanol a 80% e, em seguida, foram adicionados 4 mL de ácido clorídrico (HCl) a 5%. Quatro porções de 1 mL desta solução foram separadas em tubos de ensaio e foram adicionadas gotas do reagente de Dragendorff, $K(BiI_4)$. A precipitação de coloração vermelho-tijolo indicou uma reação positiva.

Ácidos orgânicos

Uma alíquota de 5 mg dos extratos de *Hyptis pectinata* foi dissolvida em 3 mL de água destilada e foram adicionadas gotas de reativo de Páscova de coloração azul-violeta. A descoloração deste reativo pela reação com os extratos indicou uma reação positiva.

Antraquinonas e Naftoquinonas

A presença de antraquinonas foi identificada a partir da dissolução de 5 mg dos extratos de *Hyptis pectinata* em água destilada e, logo após, em 3 mL de benzeno. Foram adicionados 2 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH) a 10% e, em seguida, a solução foi agitada suavemente. A coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indicou uma reação positiva.

Terpenos

Foi dissolvida em 3 mL de água destilada uma alíquota de 5 mg dos extratos de *Hyptis pectinata*. Em seguida, redissolvida em 3 mL de clorofórmio. Adicionou-se 2 mL de anidrido acético, e após agitação suave, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, formando duas fases imiscíveis, uma aquosa e outra clorofórmica. A presença de cores azuis evanescentes, seguida de verde persistente, na fase clorofórmica, indicou a presença desta classe de constituintes.

Saponinas

Uma alíquota de 5 mg dos extratos etanólicos de *Hyptis pectinata* foi dissolvida em 1 mL de etanol 80% e após, diluído em até 15 mL de água destilada. Em seguida, a solução foi agitada vigorosamente durante alguns minutos num tubo de ensaio fechado. A formação de uma camada de espuma, e sua permanência estável por mais de 30 minutos, representou resultado positivo para saponinas.

Taninos

Os taninos presentes foram identificados a partir da dissolução de 5 mg dos extratos etanólicos de *Hyptis pectinata* em 10 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionada uma gota de solução de cloreto férrico (FeCl_3) 1%. A mudança de coloração ou formação de precipitado indicou a presença de taninos.

Flavanoides, Flavanois, Flavonas e Xantonas

Em um tubo de ensaio contendo 5 mg dos extratos etanólicos *Hyptis pectinata* adicionou-se quatro fragmentos de magnésio granulado. Posteriormente, o tubo de ensaio foi acidulado com 0,5 mL de HCl. O aparecimento da cor vermelha foi indicativo da presença de flavanoides. Em seguida, o tubo de ensaio foi alcalinizado com NaOH 1 mol^{-1} . A observação do surgimento de uma coloração amarela no pH alcalino indicou a presença de flavonas, flavanois e xantonas.

4.6.2 Ensaio da viabilidade celular pelo método MTT

O objetivo deste teste foi avaliar o dano induzido pelos EEF e EEG de *Hyptis pectinata* e suas frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica no metabolismo das mitocôndrias celulares. Para tanto, seguiu-se a metodologia de Mosmann (1983) com adaptações. A citotoxicidade é avaliada com a ajuda de um corante, o Metiltetrazólio (brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazólio), por meio da viabilidade de macrófagos da linhagem J774 (ANVISA, 2012).

O Metiltetrazólio ou MTT (sal de tetrazólio) possui coloração amarela. As enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias ativas dos macrófagos são responsáveis pela clivagem do sal de tetrazólio, resultando na formação de cristais de formazan, que por sua vez possui coloração violeta. A quantidade de cristais formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular (PERES et al., 2008; GOES et al., 2012).

Os macrófagos da linhagem J774 foram mantidos em garrafas de cultura em 10 mL de meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% em estufa de CO₂. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI e suplementadas com 10% de SFB.

Logo após, os macrófagos J774 foram plaqueados em placas de 96 poços, na densidade de 2×10^5 células por poço e mantidos em estufa de CO₂ para aderência das células viáveis no fundo dos poços durante uma hora. Após esse período, os extratos EEF e EEC de *Hyptis pectinata* e suas frações, previamente solubilizadas em DMSO a 0,1% nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 µg/mL, foram adicionados nos 96 poços (100 µL/poço). Posteriormente, as placas foram incubadas durante 48 horas em estufa a 37 °C e a 5% CO₂ com os macrófagos aderidos (SILVA; ALBUQUERQUE, 2011).

Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e cada poço recebeu 100 µL da solução de MTT a 10% e, então, as placas foram reincubadas durante 2 horas em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂. Os poços controles continham células cultivadas somente com meio de cultura e células cultivadas na presença do diluente das substâncias DMSO.

Para a quantificação do sal de formazan (coloração violeta) reduzido, as placas foram lidas com o auxílio de um leitor de microplacas no comprimento de onda de 550 nm (ANVISA, 2012).

4.6.3 Avaliação da capacidade sequestradora de radicais livres

O método DPPH é utilizado em mais de 90% dos estudos de avaliação antioxidante de substâncias. É considerado fácil, altamente sensível, preciso, rápido, simples e econômico. Sua avaliação consiste no princípio, no qual um radical sintético (DPPH) é gerado e a capacidade de uma amostra para eliminar ou neutralizá-lo é monitorada através de um espectrofotômetro UV/visível (OLIVEIRA, 2015).

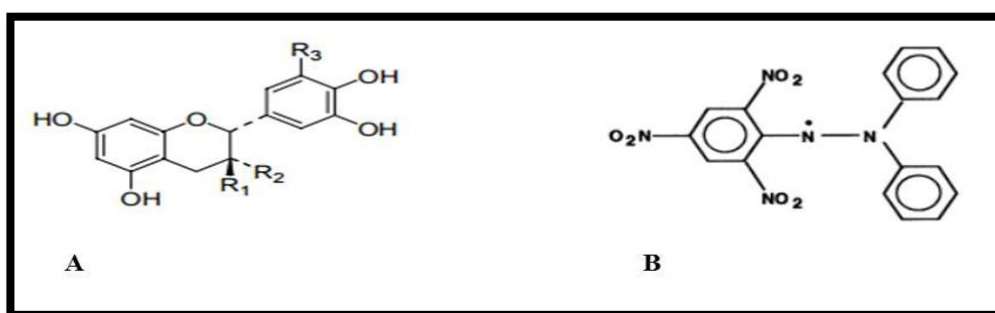
4.6.3.1 Ensaios qualitativos

O EEF e EEC foram submetidos a ensaios para avaliação qualitativa da possível capacidade sequestradora de radicais livres frente ao radical sintético DPPH, seguindo a metodologia de Soler-Rivas et al. (2000).

As amostras dos extratos etanólicos *Hyptis pectinata* foram solubilizadas em Metanol (MeOH). Alíquotas de 2 µL de cada amostra foram aplicadas com auxílio de capilares de vidro em cromatoplasmas 5 x 20 (sílica gel 60 F₂₅₄, Merck) e eluídas em sistemas de solventes adequados.

Após eliminação dos solventes à temperatura ambiente, foi aplicado, conforme mostra a figura 6, o controle positivo, (+)-catequina (2 μ L, 1 mg/mL em clorofórmio), do lado direito da placa a uma altura equivalente à metade da mesma. Em seguida, as cromatoplaças foram imersas, durante 10 segundos, em solução metanólica do radical sintético DPPH (2,2-difenil-1-picrilidazila) e em seguida secas à temperatura ambiente. O surgimento de manchas amareladas sob um fundo roxo nos fatores de Retenção (Rfs) dos extratos avaliados sugere uma possível capacidade sequestradora de radicais livres.

Figura 6 - (A) Estrutura química do Controle Positivo (+)-catequina (B) Estrutura química do Radical Sintético DPPH



Fonte: MOLYNEUX, 2004; MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006.

4.6.3.2 Ensaios Quantitativos

O EEF e EEC, após apresentarem resultado positivo (mancha amarela) no ensaio qualitativo, foram submetidos a ensaios para avaliação quantitativa frente ao radical sintético DPPH. Este ensaio é baseado na capacidade do extrato de sequestrar o radical livre estável (DPPH) por meio da visualização do descoramento de uma solução composta por este radical, que é de cor violeta, quando adicionado o extrato teste (ALVES et al., 2007).

Obtenção da Curva de Calibração

Para realização desse teste foi determinada a curva de calibração do radical DPPH. Inicialmente, preparou-se 50 mL de uma solução estoque de DPPH em metanol (MeOH) grau espectroscópico – HPLC na concentração de 40 μ g/mL~100 μ Mol/L. A partir desta solução, foram feitas diluições seriadas de 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 mg/L para a curva de calibração e submetidas à análise em espectrofotômetro UV/VIS, modelo SP-220 da Biospectro e UV mini-1240 Shimadzu a 515 nm. As medidas foram feitas em triplicata, utilizando-se cubetas de poliestireno com percurso óptico de 1 cm, contendo 1 mL de cada solução. Como controle positivo (branco) utilizou-se MeOH grau HPLC.

A curva calibrada foi construída a partir dos valores médios de absorbância de cada solução do DPPH versus as concentrações usadas (1 a 40 mg/L) por meio da análise de regressão linear utilizando o programa *Microcal OriginPro 8.0*. Esta análise forneceu a equação matemática da curva de calibração: $y = a + b.x$, no qual: a = coeficiente linear; b = coeficiente angular ou inclinação da reta; x = concentração de DPPH aos 60 minutos; com seu desvio padrão e coeficiente de correlação linear (r). A curva obtida encontra-se no apêndice A.

Preparo das soluções e Análise cinética da Reação

O EEF e EEC de *Hyptis pectinata* foram preparados a partir de 2 mg de cada extrato e foram solubilizados em MeOH grau HPLC obtendo-se concentrações de 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (25; 50; 100; 150 e 200 $\mu\text{g/mL}$). Alíquotas de 0,1 mL de cada uma dessas concentrações foram diluídas em 0,9 mL de solução metanólica do radical DPPH (100 $\mu\text{mol/L}$). As soluções foram protegidas da presença de luz, homogeneizadas e as leituras de, no mínimo, cinco diferentes concentrações foram realizadas. A leitura da absorbância de cada uma das seis concentrações, em triplicata foi realizada em um intervalo de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos em espectrofotômetro a 515 nm. A partir da equação matemática $y = a + b.x$ e dos valores de absorbâncias obtidos pela média no tempo de 60 minutos, juntamente com os coeficientes angulares e lineares da reta da curva de calibração, foi possível determinar a percentagem de DPPH que permanece no meio após reação com as amostras, ou seja, a percentagem de DPPH remanescente (% DPPH_{REM}), conforme fórmula descrita por Sánchez-Moreno et al. (1998):

$$\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = \frac{[\text{DPPH}]_{T=t}}{[\text{DPPH}]_{T=0}} \times 100$$

Em que:

%DPPH_{REM} = percentagem da concentração de DPPH_{REM};

[DPPH]_{T=t} = concentração de DPPH aos 60 minutos (t_{60});

[DPPH]_{T=0} = concentração de DPPH inicial no meio (40 mg/L ou 100 $\mu\text{mol/L}$).

A curva das amostras foi construída relacionando a percentagem da concentração de DPPH_{REM} às concentrações avaliadas de cada extrato nas concentrações de 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$, por meio da análise de regressão linear simples. A quantidade de anti-radical necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (CI_{50}) foi obtida usando o modelo matemático $y = a + b.x$, na concentração de DPPH aos 60 minutos. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será sua CI_{50} e maior a sua capacidade de sequestrar

radicais livres. Os extratos que apresentaram valores de $CI_{50} \leq 200 \mu\text{g/mL}$ foram considerados promissores.

4.6.4 Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

Microrganismos utilizados

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas linhagens de microrganismos padronizadas pela American Type Cell Collection – ATCC/Manassas - VA/USA. Foram avaliadas bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 31488) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enterica* (ATCC 1307), e o fungo *Candida albicans* (ATCC 24433).

Preparação do inóculo

As linhagens bacterianas e fúngica liofilizadas foram cultivadas no caldo de cultivo *Brain Heart Infusion* (BHI), que promove a ativação e a propagação dos microrganismos. Para cada linhagem foram adicionados 2,5 mL deste meio de cultura, em tubos de ensaios (15 x 100 mm), e com ajuda de uma pinça estéril, o microrganismo em sua forma inativa foi introduzido. Em seguida, os tubos de ensaio foram levados a uma estufa bacteriológica por 24 h a 35 °C para bactérias e por 48 h a 28 °C para fungos.

Após esse período, com o auxílio de uma alça de platina, os microrganismos foram semeados em placas de Petri com meio de cultivo Ágar Müeller-Hinton (AMH) para propagação de bactérias, e Agar Sabouraud Dextrose (ASD) para fungos. As placas foram reincubadas em estufa bacteriológica nas mesmas condições (NCCLS, 2002; NCLSI 2012).

Para a padronização da densidade do inóculo, foi utilizado o controle de turbidez óptica de bário (BaSO_4), correspondente a uma solução da escala padrão de turvação de Mc Farland do tubo 0,5, que resulta em uma suspensão contendo aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL de bactérias e $1,5 \times 10^6$ UFC/mL de leveduras (NCCLS, 2002; NCLSI 2012).

Determinação da concentração inibitória mínima

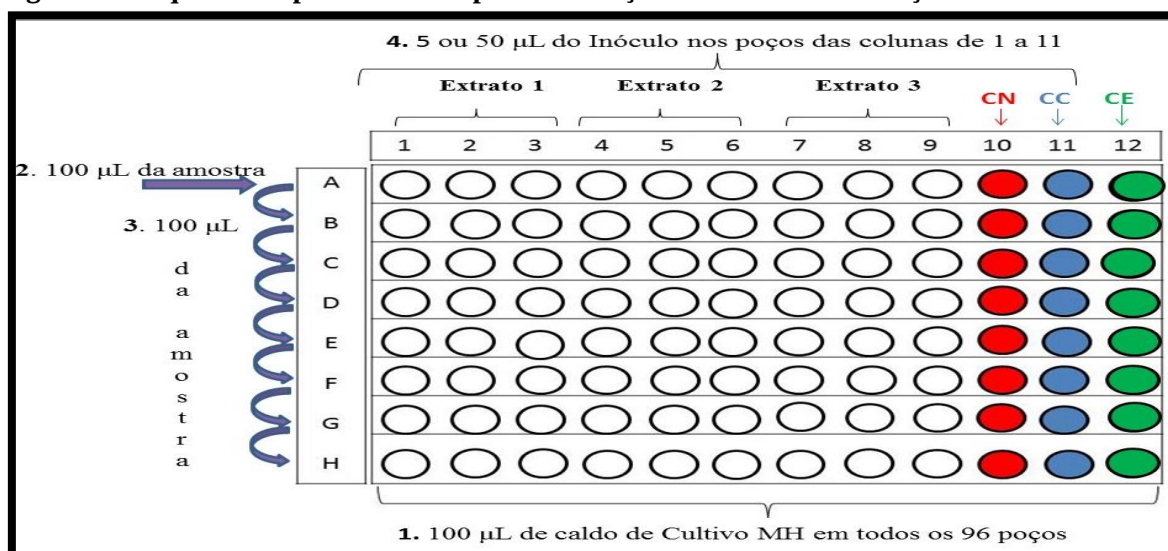
A determinação da Concentração Mínima Inibitória foi avaliada por meio do método de Microdiluição em Caldo, seguindo a metodologia descrita por Ayres et al. (2008), Karaman et al. (2003) e Silva Junior et al. (2009) com adaptações.

Para este teste, as amostras dos extratos EEF e EEC, bem como de suas frações (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica), foram solubilizadas em Cremophor a 2%, obtendo-se uma solução estoque com concentração de 2000 µg/mL (10 mg da amostra/ 5 ml de solução de Cremophor a 2%).

Os inóculos foram preparados em solução salina tamponada 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 a fim de se obter uma diluição 10^7 UFC/mL, sendo a concentração final de bactérias entre 5×10^5 UFC/mL e 5×10^4 UFC/poço ao inocular 5 µL dessa suspensão no caldo. A suspensão fúngica, também determinada pela turvação do tubo 0,5 da escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) foi diluída na proporção de 1:50 a fim de se obter uma diluição 2×10^4 UFC/mL, sendo a concentração final desejada de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL ao inocular 50 µL dessa suspensão em cada poço (NCCLS, 2002; NCLSI 2012).

O teste, conforme mostra a figura 7, foi realizado em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços, com 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A H). Todos os orifícios a partir da linha A foram preenchidos com 100 µL de caldo de cultivo Mueller-Hinton (MH). Um volume de 100 µL da solução estoque, na concentração de 2000 µg/mL, das diversas amostras vegetais testadas foi inoculado, em triplicata, nas colunas de 1 a 9 da linha A, alcançando uma concentração final nesse poço de 1000 µg/mL.

Figura 7 - Esquema do procedimento para realização do teste Microdiluição em Caldo



Fonte: AUTORA, 2015

Legenda: **CN** – Coluna destinada ao Controle Negativo. 100 µL do caldo de cultivo de MH + 100 µL do solvente utilizado para solubilizar a amostra (100 µL de Cremophor + 4,90 ml de SF a 0,9%) + 5 ou 50 µL do inóculo microbiano;

CC – Coluna destinada ao Controle de Crescimento; 100 µL do caldo de cultivo de MH + 5 ou 50 µL do inóculo microbiano;

CE – Coluna destinada ao Controle de Esterilidade da placa. 100 µL do caldo de cultivo de MH;

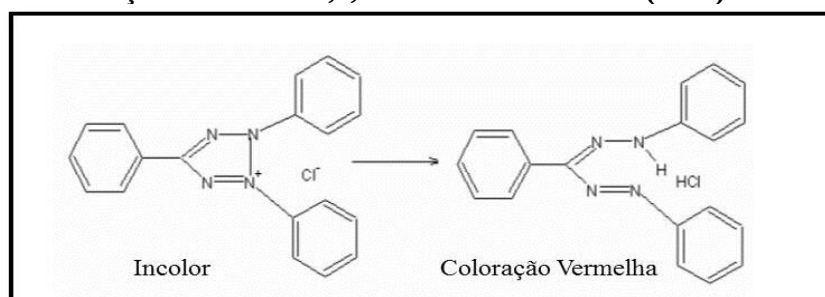
Em seguida, uma alíquota de 100 μL do conteúdo de cada orifício da linha A foi transferido para os orifícios da linha B, e após homogeneização o mesmo volume foi transferido para a linha C, repetindo-se este procedimento até a linha H. Obtendo-se as concentrações decrescentes em $\mu\text{g/mL}$ de 1000 (Linha A); 500 (Linha B); 250 (Linha C); 125 (Linha D); 62,5 (Linha E); 31,2 (Linha F); 15,6 (Linha G) e 7,8 (Linha H).

Posteriormente, em cada orifício foram adicionados 5 μL de inóculo bacteriano e 50 μL de inóculo fúngico. Os orifícios das colunas 10, 11 e 12 foram destinados para os testes de controle do experimento. Para o controle positivo da viabilidade bacteriana, utilizou-se o caldo de cultivo MH e o inóculo microbiano (5 μL ou 50 $\mu\text{g/L}$); o controle negativo foi avaliado por meio da atividade inibitória do solvente Cremophor a 2%; e para o controle de esterilidade, utilizou-se apenas o caldo de cultivo MH.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 18 h para as bactérias e a 28 °C por 48 h para o fungo. Após este período, foram adicionados 20 μL de solução aquosa de Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium (TTC) a 0,5% em cada poço e as placas foram reincubadas por mais 3 h.

O TTC é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido. Os Microrganismos vivos reduzem o TTC por ação enzimática, originando o trifênil formazan (Figura 8), o qual é mantido dentro de grânulos nas células, as quais se tornam vermelhas (RAMOS, PIZZOLITO; PIZZOLITTO, 2008). Assim, mudança de incolor para coloração vermelha significou a presença de microrganismos e a ausência da coloração vermelha significou prova positiva da ação inibitória do extrato sobre os microrganismos testados.

Figura 8 - Esquema de redução do Cloreto 2,3,5 Trifenil Tetrazolium (TTC)



Fonte: VIEIRA, 2008.

O grau de atividade antimicrobiana foi determinado segundo os seguintes critérios: CIM de até 100 $\mu\text{g/mL}$ (Ativa), CIM de 100-500 $\mu\text{g/mL}$ (Atividade Inibitória Moderada), CIM de 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ (Atividade Fraca) e CIM maiores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ (inativos). A validade deste teste é verificada na constatação do crescimento microbiano no controle

positivo e a CIM foi considerada como a menor concentração do extrato em µg/mL capaz de inibir completamente o crescimento microbiano (DALL'ANGOL et al., 2003).

4.6.5 Ensaio para avaliação do potencial cicatrizante *in vivo*

Por ter apresentado melhores resultados nos testes *in vitro* (presença de maior número de metabólitos secundários, atividade antioxidante e baixa citotoxicidade), o Extrato Etanólico das Folhas (EEF) de *Hyptis pectinata* foi selecionado para o teste cicatrizante *in vivo*. Para a realização deste teste, adotou-se a metodologia utilizada por Sarmento (2014) para a construção do protocolo experimental, com certas adaptações.

Animais

Foram utilizados 27 ratos (*Ratus norvegicus albinus* - linhagem Wistar), adultos, fêmeas, pesando entre 160 e 210 gamas, com idade de quatro meses adquiridos no Biotério da Universidade Estadual de Ciências da Saúde - UNCISAL e transferidos para o LpTF, respeitando-se os Princípios Éticos na Experimentação Animal. Os animais ficaram em observação por 21 dias antes do bioensaio para verificação das condições clínicas e identificação de variáveis que pudessem influenciar no resultado do experimento.

Os ratos foram pesados e separados pelo método probabilístico de escolhas aleatórias em 3 grupos (n= 9) e identificados a partir da terapêutica: Controle Positivo (CP); Controle Negativo (CN); Experimental T (ET). Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas de polietileno forradas com serragem, em fotoperíodo de 12 horas de claro e escuro, ruídos mínimos e temperatura ambiente 21 ± 1 °C, mantida por ar condicionado. Alimentação com ração comercial (Nuvilab[®]) e água “*ad libitum*”.

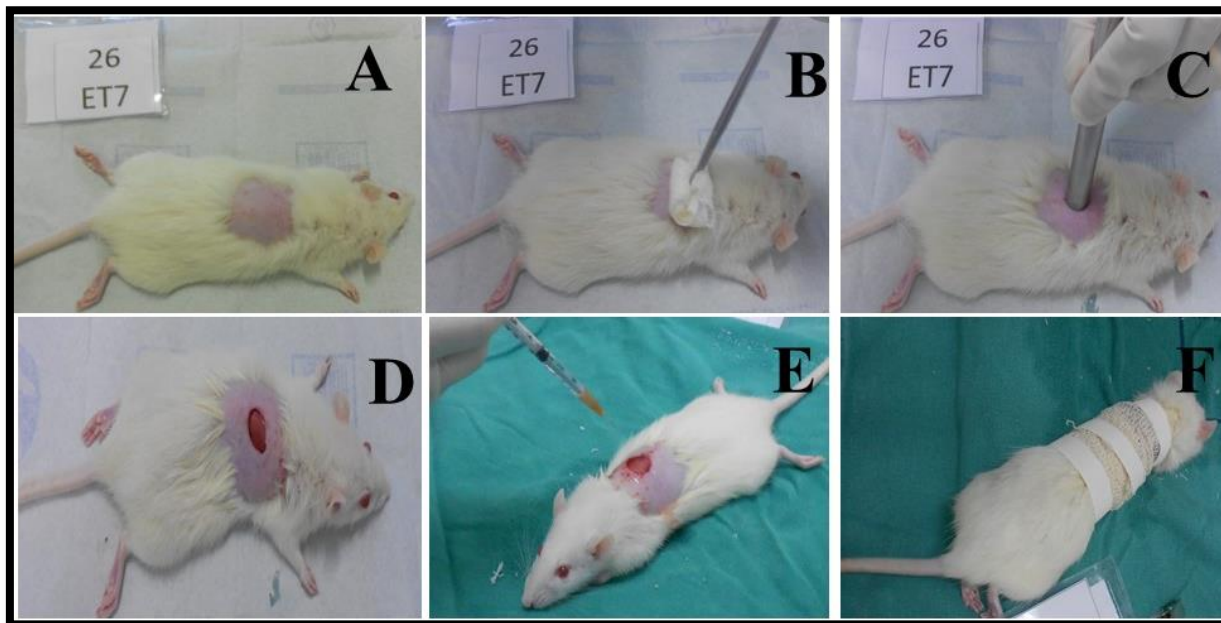
Técnica operatória

Cada animal foi submetido à verificação do peso corpóreo para cálculo da anestesia. O procedimento anestésico foi realizado por via intraperitoneal com 50 mg/Kg de ketamina a 10% e 10 mg/Kg de xilazina a 2 %, administrando-se 0,1 mL para cada 100 g de massa corpórea do animal (UDEGBUNAM et al., 2014).

Em seguida, procedeu-se a verificação da temperatura por via retal, epilação do dorso e antissepsia da pele com clorexidina degermante a 2%. Na área epilada, com um punch n° 12 (12 mm) realizou-se a confecção de uma lesão excisiva no dorso do animal a partir da linha mediana dorsal até o nível do tecido aponeurótico (Figura 9). Em seguida, as lesões foram

limpas com solução fisiológica a 0,9% e cobertas com gases estéreis e ataduras, aguardando-se 24 horas para o início da terapêutica.

Figura 9 - Sequência adotada na técnica Operatória



Fonte: AUTORA, 2015

Legenda: **A**- Epilação do dorso; **B** - Antissepcia com clorexidina degermante a 2%; **C, D**- Confecção da lesão com um punch nº 12 (12 mm); **E**- Limpeza da lesão com SF a 0,95 estéril; **F** – Oclusão da ferida com gaze estéril e atadura;

Tratamento das feridas

Os cremes utilizados neste experimento foram manipulados por um farmacêutico, contendo a mesma base (álcool cetoestearílico, álcool cetoestearílico etoxilado, propilenoglicol, lanolina, óleo de amêndoas doce, oleato de gliceril A, petrolato branco e água purificada), tendo-se o cuidado de seguir técnicas assépticas.

Após 24 horas, iniciou-se o tratamento conforme a especificação de cada grupo, descrita abaixo:

CP (Controle Positivo): Creme base contendo Dexpanthenol a 5%;

ET (Experimental T): Creme base contendo a concentração de 5% do extrato etanólico da folha de *Hyptis pectinata*;

CN (Controle Negativo): Creme base;

Os animais foram avaliados a cada 24 horas por 14 dias (BATISTA et al., 2012; DHAPTE et al., 2014; SARMENTO et al., 2014) para a observação clínica das lesões quanto

à presença de efeitos adversos, irritação perilesional e retração cicatricial. Todos os dados foram registrados em protocolos pré-estabelecidos.

Todas as feridas foram tratadas diariamente, limpas com solução isotônica de Cloreto de Sódio a 0,9% estéril, seguida pela aplicação da cobertura primária contendo a terapêutica específica de cada grupo, seguida pela cobertura secundária com gaze seca estéril e atadura de crepe.

Períodos de Avaliação

Nos 3º, 7º, 11º e 14º dias de pós-operatório (DPO) foi realizada a avaliação macroscópica da ferida de todos os animais segundo protocolo pré-estabelecido (Apêndice B). Nos 3º, 7º e 14º DPO, três animais de cada grupo (totalizando 9 animais por dia) foram eutanasiados para retirada da ferida, dos órgãos (fígado e rins) e do sangue.

Após procedimento anestésico, o animal foi colocado na posição dorsal e submetido à exsanguinação cardíaca, obtendo-se 5 mL de sangue para os seguintes testes séricos: Alanina aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST), uréia e creatinina, a fim de que seja avaliada a função hepática e renal. Posteriormente, foram retirados de cada animal, os rins e fígado, os quais foram pesados e colocados em recipientes identificados, em formol a 10%, para a avaliação histopatológica.

Os animais foram monitorados por meio dos seguintes parâmetros de avaliação:

- A. **Observação clínica:** aspecto geral, peso do animal e temperatura corpórea.
- B. **Análise macroscópica das feridas:** presença ou ausência de tecido de granulação, inflamação, sangramento local, fibrina, exsudato, extensão da crosta ou tecido necrótico (total, parcial ou ausente) e mensuração do tamanho da lesão. Com um paquímetro, mediu-se o maior e menor diâmetro da ferida. A partir dessas medidas, a área da ferida foi calculada por meio da fórmula $A: \pi \times R \times r$, onde A corresponde a área da ferida, R o maior raio, r o menor raio e π uma constante com valor de 3,14 (SILVA, 2006). O grau de contração da ferida foi obtido seguindo a fórmula abaixo, desenvolvida por Agren et al. (1997):

$\% \text{ de Contração no dia da medida: } \frac{(\text{Área inicial} - \text{área do dia da medida})}{\text{Área inicial}} \times 100$
--

- C. **Análise microscópica das feridas:** após a eutanásia, a ferida de três animais por grupo foi coletada, tendo-se o cuidado de abranger todo o leito da ferida e sua borda, acondicionadas em recipiente hermeticamente fechado contendo formaldeído a 10% e

posteriormente foram submetidas a procedimento histológico pela coloração de Hematoxilina-eosina (HE). A leitura das lâminas foi realizada pelo patologista Dr. Ricardo Houly.

A análise do material retirado teve como referência as fases do processo de cicatrização: inflamatória, proliferativa e de remodelação. Para análise quantitativa dos resultados da avaliação histológica, foram eleitos os escores (Tabela 1) com base na literatura e preenchidos em protocolo pré-estabelecido (Apêndice C). A intensidade das variáveis (1+ a 5+) foi multiplicada por fatores positivos ou negativos (constituintes da sétima coluna da tabela) baseados na sua importância para a cicatrização. A soma destes produtos correspondeu ao escore total para cada animal, o qual foi, posteriormente, somado aos escores dos demais animais do grupo e obtida a média. Quanto maior o escore do animal, melhor encontra-se o processo de cicatrização (SARMENTO et al., 2014; MEDEIROS et al., 1999).

Tabela 1 - Escores utilizados para avaliação do exame histopatológico

Variáveis	Ausente	Presente	Discreto	Moderado	Intenso	Fator	Total
Crosta	+1	+2	-	-	-	-1	
Inflamação aguda	-	-	+3	+4	+5	-4	
Colagenização	-	-	+3	+4	+5	+5	
Proliferação fibroblástica	-	-	+3	+4	+5	+5	
Neovascularização	-	-	+3	+4	+5	+5	
Reepitelização	-	-	+3	+4	+5	+5	
Tecido de granulação	+1	+2	-	-	-	+10	
Fibras de colágeno	+1	+2	-	-	-	+10	

Testes estatísticos

A análise estatística foi realizada com o uso do sistema GraphPad Prism[®] 6. Nos testes de citotoxicidade e potencial cicatrizante, as variáveis numéricas foram avaliadas pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) com um fator de interação entre si, com pós-teste de Dunnett para análise do efeito entre os grupos. Para a análise da atividade antioxidante utilizou-se o teste de regressão linear simples. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos extratos etanólicos e suas frações

Após evaporação do solvente residual, obteve-se os extratos EEF e EEC. O rendimento de cada extrato encontra-se descrito na Tabela 2, na qual observa-se que o EEF obteve maior rendimento quando comparado ao EEC. A fração do EEF que apresentou maior rendimento foi a hexânica, enquanto que a do EEC foi a acetato de etila. Observando a Tabela 2, pode-se sugerir que nas folhas tem-se mais metabólitos secundários com menor polaridade que as frações do caule, as quais se apresentaram em menor quantidade. O rendimento das frações do caule foi maior para as frações polares.

Tabela 2 - Rendimento dos extratos etanólicos de *Hyptis pectinatae* suas frações.

Extratos	Rendimentos (g)
EEF	4,62
Fração hexânica do EEF	0,84
Fração clorofórmica do EEF	0,18
Fração acetato de etila do EEF	0,21
Fração metanólica do EEF	0,30
EEC	4,20
Fração hexânica do EEC	0,22
Fração clorofórmica do EEC	0,34
Fração acetato de etila do EEC	0,61
Fração metanólica do EEC	0,43

Fonte: AUTORA, 2015

O maior rendimento da fração hexânica evidenciado no EEF certamente se deu devido a presença de terpenos demonstrada na prospecção fitoquímica, uma vez que esta classe de metabólitos secundários possui afinidade com o hexano, um solvente de baixa polaridade. O mesmo pode ser observado pelo EEC, onde a fração acetato de etila obteve maior rendimento, tendo alguns triterpenoides afinidade com este solvente (FILHO; YUNES, 1997).

5.2 Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica evidenciou a presença de classes de constituintes químicos nos dois extratos etanólicos de *Hyptis pectinata*. Foi possível a identificação de Taninos, Alcaloides, Flavonas, Xantonas e Flavanóis e Terpenos estando apenas este último presente nos dois extratos, enquanto que os demais foram identificados apenas no extrato EEF, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Prospecção fitoquímica dos EEF e EEC de *Hyptis pectinata*.

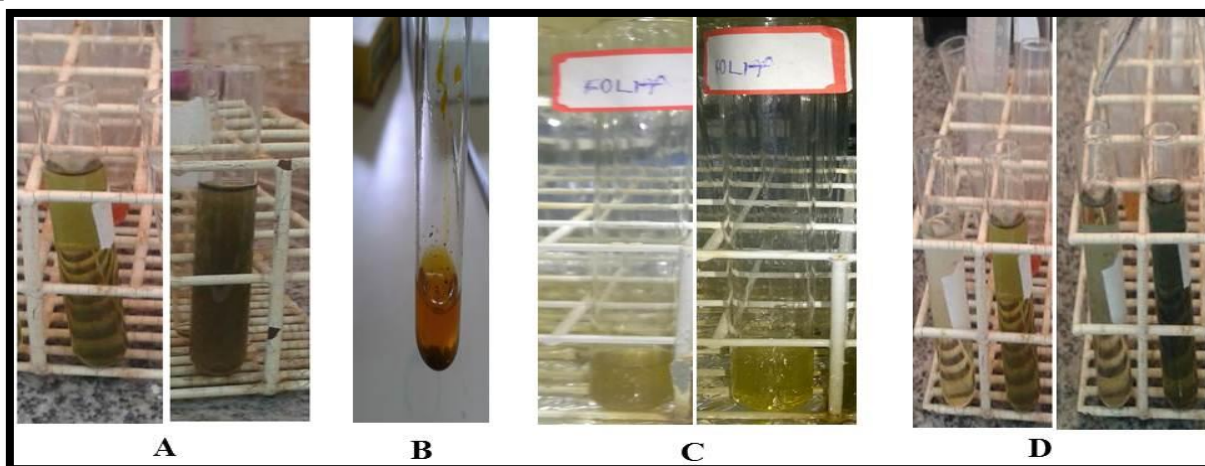
Constituintes Químicos	Extrato Etanólico de <i>Hyptis pectinata</i>	
	Folhas	Caule
Antraquinonas	-	-
Saponinas	-	-
Taninos	+	-
Alcaloides	+	-
Ácidos Orgânicos	-	-
Terpenos	+	+
Flavonas, Flavanóis e Xantonas	+	-

Fonte: AUTORA, 2015

Legenda: (-) Ausente; (+) Presente

Os metabólitos secundários são produtos oriundos do metabolismo das plantas. Sua ação não se limita à atividade biológica exercida nas plantas, pois esses produtos possuem uma imensa atividade farmacológica para saúde humana, o que vem despertando cada vez mais o interesse de pesquisadores (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Diferentemente dos metabólitos primários, que estão presentes em todas as plantas, nem todos os secundários podem ser encontrados em todas as espécies, sendo sua produção muitas vezes restrita a um gênero específico ou uma família (GARCÍA; CARRIL, 2009). No gênero *Hyptis* foram identificados, a partir de estudos de prospecção fitoquímica, a presença dos metabólitos secundários lignanas, alcaloides, flavonoides e terpenos, estando este último em maior quantidade (FRANCO et al., 2011; PICKING et al., 2013; DIAN-HONG XU et al., 2014).

Figura 10 - Identificação das classes de compostos metabólitos nos EEF e EEC de *Hyptis pectinata*

Fonte: AUTORA, 2015

Legenda: **A** - Mudança para coloração verde escuro do EEF de *Hyptis pectinata* após adição de 1 gota de cloreto férrico (FeCl) 1%, evidenciando presença de Taninos no EEF; **B** - Precipitação de coloração vermelho-tijolo no

EEF, evidenciando presença de Alcaloides; **C** – Mudança para coloração amarela do EEF após adição de NaOH, evidenciando presença de flavonas, flavanóis e xantonas; **D** - Mudança para coloração verde persistente dos EEF e EEC após adição de 1 mL de ácido sulfídrico, evidenciando presença de Terpenos;

A evidência de coloração verde escura indicou (Figura 10- A) a presença de Taninos Condensados no EEF de *Hyptis pectinata*. Os taninos são compostos fenólicos que apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 3000 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides (MONTEIRO et al., 2005).

Os taninos condensados são polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol, produtos do metabolismo do fenilpropanol. Sua atividade biológica relaciona-se, principalmente, com suas propriedades adstringente, exercendo efeito antidiarreico e antisséptico. Atua em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, pois possui a capacidade de formar uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, e assim, o processo curativo pode ocorrer naturalmente logo abaixo dessa camada (MONTEIRO et al., 2005).

Os taninos podem ser encontrados em plantas da família Lamiaceae os quais, possivelmente, junto com os flavanoides são responsáveis pela atividade antioxidante dessas plantas (NAKASHIMA, 2004; KOMES et al., 2010; VLADIMIR-KNEŽEVIĆ et al., 2011).

A precipitação de coloração vermelho-tijolo no EEF de *Hyptis pectinata* (Figura 10 - B) indicou a presença de Alcaloides neste extrato. Cerca de 20% das plantas conhecidas acumulam alcaloides. Esta classe de substância de metabolismo secundário é famosa pela acentuada ação sobre o sistema nervoso central, sendo muitos deles utilizados como venenos ou alucinógenos. Dentre as várias atividades biológicas, é atribuída a ação antimalárica, antimicrobiana, anticancerígena, anti-inflamatória, além de poder ser utilizado no tratamento do diabetes, como afrodisíaco, vasodilatador, antisséptico e cicatrizante (OLIVEITA et al., 2009).

Apesar da ocorrência de alcaloides no gênero *Hyptis* ser rara, estudos foram capazes de identificar sua presença em pequena quantidade nas espécies *Hyptis platanifolia* e *Hyptis verticillata* (SILVA; MENDES; GÓES NETO, 2011; FALCÃO; MENEZES, 2013).

A mudança para uma coloração amarela após alcalinização (Figura 10 - C) indicou a possível presença dos metabólitos secundários Flavanóis, Flavonas e Xantona. Estes metabólitos constituem as principais classes dos flavonoides e são conhecidos por suas

atividades biológicas, onde se destaca a atividade antioxidante (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Estas classes de flavonoides têm sido isolados em diversas plantas da família Lamiaceae e relacionados às atividades anti-inflamatória, antioxidante, anticâncer e antimutagênica (GOHARI et al., 2009; ÇULHAOGLU et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014).

A presença de cores azuis evanescentes, seguida de verde persistente na fase clorofórmica (Figura 10 - D) indicou a presença de Terpenos. Estes estão presentes em óleos essenciais de plantas, constituem uma ampla classe de produtos naturais e exercem diversas funções no reino vegetal e na saúde humana. São hidrocarbonetos formados pela fusão de unidades de Isopreno (C_5H_8). A união sucessiva de dois, três, quatro e seis unidades de isopreno dão origem, respectivamente, a monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos (ORMEÑO; FERNÁNDEZ, 2012).

Nesta classe, existem mais de 40 mil estruturas diferentes, que atuam como agentes farmacêuticos, propriedades comprovadas por meio de estudos que evidenciaram atividades biológicas como anti-inflamatória, analgésica e antipirética (SILVA; DUARTE; VIEIRA FILHO, 2014).

Estudos realizados a partir da investigação fitoquímica do óleo essencial de *Hyptis pectinata*, identificaram a presença de monoterpenos e sesquiterpenos entre os metabólitos secundários (CALDAS et al., 2011; KOBAYASHI et al., 2014; MENEZES et al., 2015). Outro estudo realizado por Serafini et al. (2012), também com óleo essencial desta planta, identificou a classe de sesquiterpenos e associou sua presença à atividade antioxidante evidenciada por seu estudo.

Sua presença também foi associada à atividade antinociceptiva, uma vez que o óleo essencial de *Hyptis pectinata*, após prévia identificação de sesquiterpenos como metabólito predominante, foi capaz de reduzir significativamente o número de contorções induzidas por ácido acético, bem como atrasou o tempo de reação à placa quente quando comparado com o grupo controle (ARRIGONI-BLANK et al., 2008). Santos et al. (2008) também atribuiu a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Hyptis pectinata* em seu estudo à presença de sesquiterpenos e monoterpenos.

O timol, um monoterpeno fenólico presente na espécie *Hyptis pectinata*, possui inúmeras atividades biológicas. É capaz de modular a síntese de prostaglandinas e, assim exercer ação anti-inflamatória, bem como exerce ação antioxidante. Estudos também foram capazes de comprovar sua ação cicatrizante, seja pelo recrutamento de macrófagos na fase

inflamatória ou pelo aumento na produção de fibroblastos (FALCÃO; MENEZES, 2003; BARRETO et al., 2014;).

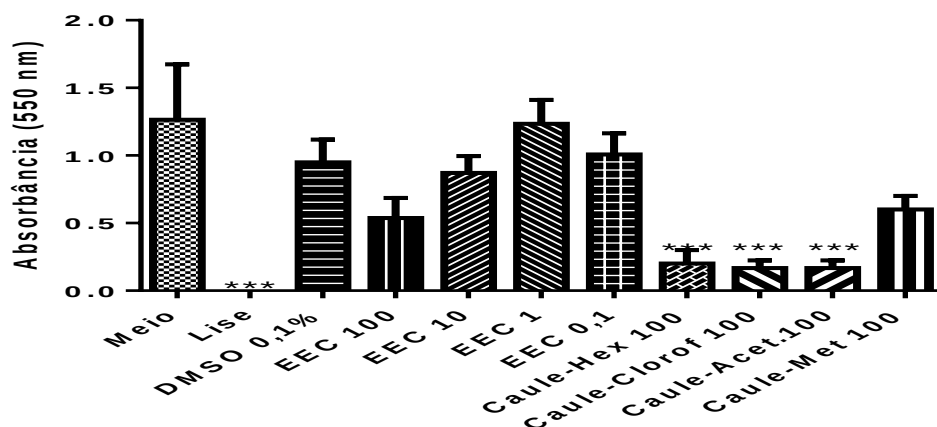
Neste sentido, os resultados encontrados no teste de prospecção fitoquímica, identificaram classes de metabólitos secundários de grande importância biológica. Desta forma, a planta *Hyptis pectinata* torna-se apta para realização de testes que explorem sua atividade antioxidante, antimicrobiana e cicatrizantes, uma vez que os metabólitos encontrados conforme demonstrado na literatura apresentaram tais atividades em estudos anteriores.

5.3 Ensaio de Viabilidade Celular pelo Método MTT

O método MTT foi utilizado para avaliar a possível citotoxicidade dos extratos EFF, EEC e de suas frações. Conforme mostra o gráfico 1, o extrato EEC não apresentou citotoxicidade frente à linhagem celular de macrófagos J774 nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Suas frações hexânica, clorofórmica e de acetato de etila causaram lise celular significativa quando comparada ao grupo controle DMSO 0,1% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, não sendo tóxico nas demais concentrações. Já a fração metanólica não evidenciou citotoxicidade significativa.

Poucos são os estudos sobre a citotoxicidade da espécie *Hyptis pectinata* disponíveis na literatura. A análise da atividade antineoplásica frente à linhagem tumoral HT29 do extrato etanólico do caule desta espécie, demonstrou que este não apresentou ação citotóxica suficiente para ser utilizado como antitumoral (SILVA; ALBUQUERQUE, 2011). Tal dado corrobora com o encontrado no presente estudo.

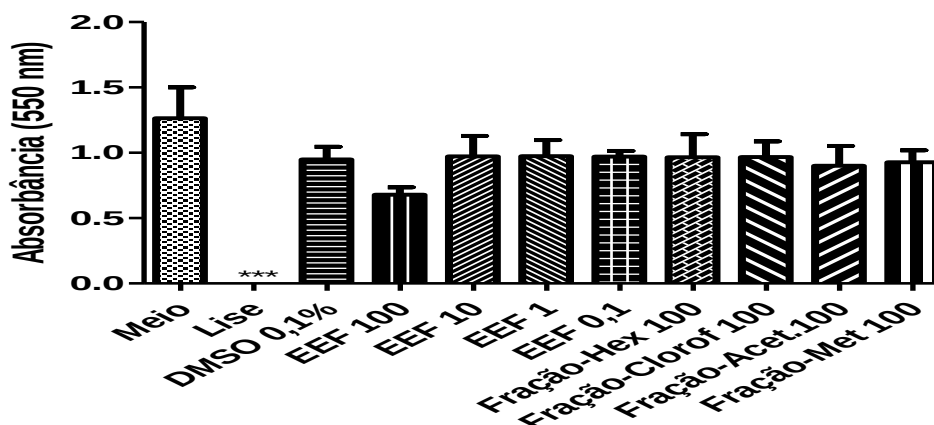
Gráfico 1 - Efeito do EEC e suas frações no ensaio de MTT



Nota: Os dados representam a média $\pm$ e.p.m da absorbância comparados ao controle através de uma Análise de Variância (One-way ANOVA) seguidos do teste de Dunnett, onde ***p <0,001 comparado ao grupo controle DMSO 0,1%.

Já o extrato EEF e suas frações, conforme demonstra o gráfico 2, não apresentou citotoxicidade, pois nas concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ não houve redução da viabilidade celular, bem como nas de suas frações na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico 2 - Efeito do EEF e suas frações no ensaio de MTT



Nota: Os dados representam a média $\pm$ e.p.m da absorbância comparados ao controle através de uma Análise de Variância (One-way ANOVA) seguidos do teste de Dunnett, onde *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle DMSO.

O extrato hidroalcolico de toda planta *H. pectinata* foi submetido ao teste de toxicidade e não se mostrou tóxico contra eritrócitos e células mononucleares do sangue periférico de ratos, bem como não foi identificadas alterações histopatológicas do fígado, rins e baço dos animais submetidos a este extrato (BARBOSA et al., 2012).

Assim, não foram constatados neste estudo sinais de citotoxicidade para o EEF e de suas frações, bem como o EEC, o que faz estes extratos serem promissores para estudos *in vivo*. Já as frações do EEC que apresentaram citotoxicidade, podem ser estudadas como potenciais antitumorais, não descartando seu possível uso para a medicina.

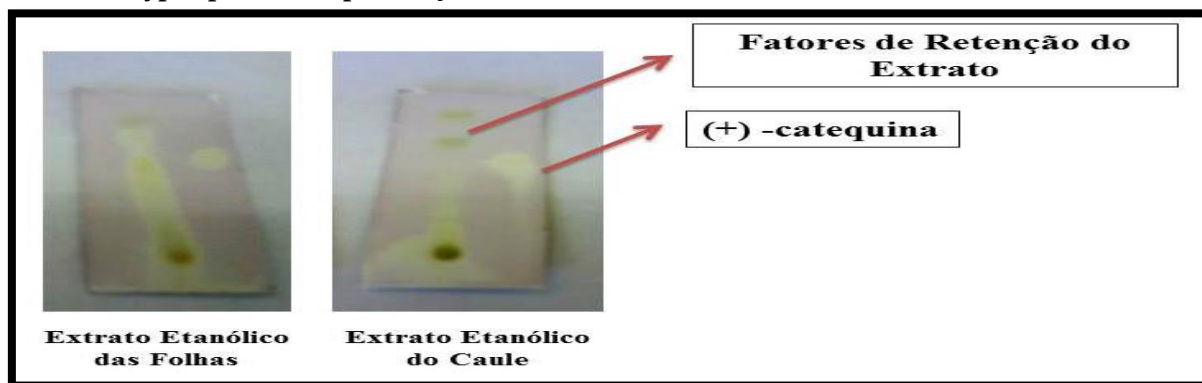
5.4 Atividade da capacidade sequestradora de radicais livres

5.4.1 Ensaio qualitativos

Os extratos EEF e EEC foram expostos a 30 ml no sistema de eluente de solventes, primeiramente em hexano/acetato na proporção 9:1 (27:3 mL), porém não apresentaram eluição. Assim, adicionou-se 3 mL de Acetato e seguiu-se a sequência de 8:2; 7:3 e 6:4.

O extrato EEF eluiu no Hexano/Acetato na proporção 7:3 e o Extrato EEC na de 6:4. As cromatoplasas de sílica gel foram reveladas em lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 365 nm, conforme mostra a figura 11.

Figura 11 - Cromatoplasas dos ensaios qualitativos da atividade antirradicalar dos extratos EEF e EEC de *Hyptis pectinata* após reação com o radical livre sintético DPPH



Fonte: Autora, 2015

Legenda: Fatores de retenção dos extratos: manchas amareladas sob um fundo roxo, sugerindo possível capacidade sequestradora de radicais livres; (+)-catequina: controle positivo padrão.

Os extratos testados sugeriram uma possível capacidade sequestradora de radicais livres, indicada pela presença de manchas amareladas sobre o fundo roxo das cromatoplasas, quando comparadas ao controle positivo (+)-catequina, o que os tornam candidatos ao teste de avaliação quantitativa da atividade antioxidante.

5.4.2 Ensaios Quantitativos

A Tabela 4 mostra as médias das triplicatas dos valores obtidos nas leituras da absorbância das concentrações 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL dos extratos testados aos 60 minutos para posterior cálculo da concentração de DPPH.

Tabela 4 - Média da absorbância das triplicatas dos valores no t_{60} dos EEF e EEC

Concentrações do Extrato (µg/mL)	Média da Absorbância no t_{60}	
	Extrato Etanólico das Folhas	Extrato Etanólico do Caule
200	0,432	0,870
150	0,508	0,808
100	0,653	0,852
50	0,731	0,879
25	0,792	0,846

Fonte: AUTORA, 2015

O Extrato EEC de *Hyptis pectinata* (Tabela 5) não apresentou atividade sequestradora frente ao radical livre de DPPH, uma vez que apresentou uma concentração maior a 200 µg/mL no tempo 60 minutos.

Tabela 5 - Tratamento estatístico da incapacidade sequestradora de radicais livres do EEC de *Hyptis pectinata*

PARÂMETRO	VALOR	ERRO
A	77,61	1,725
B	-0,0232	0,01402
R	SD	N
0,48	2,008	5
		p
		0,19661

Fonte: AUTORA, 2015; Legenda: SD = (Desvio Padrão); N = (Número de concentrações testadas); p = (Nível de significância)

$$Y = A + B \cdot x \Rightarrow 50 = 77,6089 + (-0,0232) \cdot x \Rightarrow x = 50 - 77,6089 / -0,0232 \Rightarrow x = 1190,038 \pm 2,00 \mu\text{g/mL}$$

No que se refere ao extrato etanólico das folhas, este extrato apresentou atividade sequestradora do radical livre com uma concentração de $133,32 \pm 1,59 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 6).

Tabela 6 - Tratamento estatístico da capacidade sequestradora de radicais livres do EEF de *Hyptis pectinata*

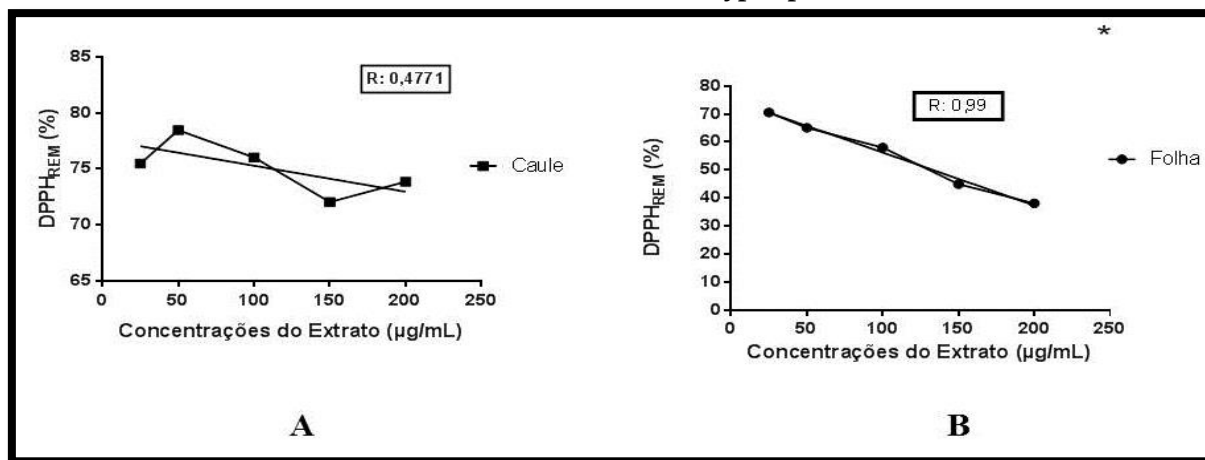
PARÂMETRO	VALOR	ERRO
A	75,21	1,366
B	-0,18913	0,01111
R	SD	N
0,99	1,590	5
		p
		0,00044

FONTE: AUTORA, 2015; Legenda: - SD = (Desvio Padrão); N = (Número de concentrações testadas); p = (Nível de significância)

$$Y = A + B \cdot x \Rightarrow 50 = 75,21486 + (-0,18913) \cdot x \Rightarrow x = 50 - 75,21486 / -0,18913 \Rightarrow x = 133,32 \pm 1,59 \mu\text{g/mL}$$

Extratos de plantas do mesmo gênero de *Hyptis pectinata* como *Hyptis suaveolens*, *Hyptis rhomboidea* e *Hyptis brevipes* também evidenciaram capacidade sequestradora de radicais livres, destacando-se as espécies *Hyptis suaveolens*, que apresentou uma IC_{50} de $12,43 \mu\text{g/mL}$, *Hyptis fasciculata* e *Hyptis fruticosa* ambas com uma IC_{50} de $35 \mu\text{g/mL}$, o que comprova o potencial medicinal deste gênero (SILVA et al., 2009; ANDRADE et al., 2010; D.-H. Xu et al., 2013; GHAFARI et al., 2014).

Gráfico 3 - (A) Curva da percentagem do radical livre sintético DPPH remanescente frente ao Extrato Etanólico do Caule de *Hyptis pectinata*; (B) Curva da percentagem do DPPH remanescente frente ao Extrato Etanólico das Folhas de *Hyptis pectinata*



Fonte: AUTORA, 2015

Nota: Os dados representam a percentagem da concentração de DPPH remanescente (DPPH_{REM} %) nas diferentes concentrações dos extratos através da análise de regressão linear simples. *p= 0,00044

Corroborando com tais resultados, o extrato aquoso das folhas de *Hyptis pectinata* também apresentou moderada ação Antioxidante frente ao radical livre DPPH (PAIXÃO et al., 2013). Em outro estudo dirigido por Serafini et al. (2012), o Óleo Essencial das Folhas de *Hyptis pectinata* também evidenciou significativa atividade antioxidante, atribuída à presença de sesquiterpenos, composto presente de forma majoritária no óleo essencial estudado.

Os radicais livres são átomos e moléculas produzidas pelo organismo resultantes do funcionamento normal do corpo, mas que também podem ter sua produção acentuada por fatores ambientais como radiação, poluição e tabagismo. O excesso de radicais livres no organismo pode levar ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, à oxidação das células e resultar no envelhecimento e desenvolvimento de patologias como diabetes, câncer, aterosclerose, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (VARGAS; HOELZEL; ROSA, 2008).

Os antioxidantes são substâncias capazes de retardar a velocidade de oxidação das células e inibem os radicais livres prevenindo, conseqüentemente, o desenvolvimento de doenças, bem como retardando o envelhecimento. Desta forma, estabilizam ou desativam os radicais livres antes que estes ataquem os alvos biológicos nas células (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Nas plantas, a atividade antioxidante tem sido associada à presença de compostos fenólicos como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. A atividade destes compostos deve-se,

principalmente, às suas propriedades redutoras. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUZA et al., 2007).

No que se refere à cicatrização, a inflamação gerada pela lesão tecidual resulta na formação contínua de metabólitos reativos levando a uma excessiva produção de metabólitos de oxigênio, gerando uma condição de estresse oxidativo que resulta em peroxidação de lipídeos, quebra de DNA e inativação enzimática, com consequente aceleração do processo degenerativo e perda da estabilidade celular (d'ACAMPORA et al., 2007; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Substâncias com atividade antioxidante impedem o dano oxidativo e morte celular eliminando radicais de oxigênio, protegendo contra a peroxidação lipídica e interrompendo a reação em cadeia de formação de radicais livres, prevenindo, assim, a degeneração das células envolvidas da cicatrização, promovendo a contração da ferida e aumentando a formação de capilares e fibroblastos (d'ACAMPORA et al., 2007; PAWAR; TOPPO, 2012).

Por fim, apesar de ser o mais utilizado, o teste do sequestro do radical sintético DPPH não é o único. Outros métodos de determinação de atividade antioxidante *in vitro* estão disponíveis sendo necessário, assim, submeter os extratos de *Hyptis pectinata* estudados a outros métodos que confirmem sua atividade antioxidante (ALVES et al., 2010).

5.5 Concentração Inibitória Mínima

Os extratos EEF e EEC, bem como de suas frações apresentaram melhores resultados frente às bactérias Gram-positivas. A inibição das bactérias Gram-negativas ocorreu somente em concentrações elevadas (1000 µg/mL) (Tabela 7).

O extrato EEF apresentou melhor resultado quando comparado ao extrato EEC, uma vez que apresentou atividade inibitória moderada com uma CIM de 500 µg/mL frente aos microrganismos Gram-positivos *S. aureus* e *S. epidermidis*.

No que se refere às frações, a clorofórmica, acetato de etila e metanólica das folhas apresentaram os melhores resultados, inibindo *S. aureus* em uma concentração de 250 µg/mL (Atividade Inibitória Moderada) (Figura 12). As frações clorofórmica e acetato de etila do extrato EEC também apresentaram atividade inibitória moderada frente *S. aureus*, apresentando uma CIM de 500 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente (Figura 13).

Tabela 7 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos etanólicos de *Hyptis pectinata*, bem como de suas frações frente aos microrganismos avaliados.

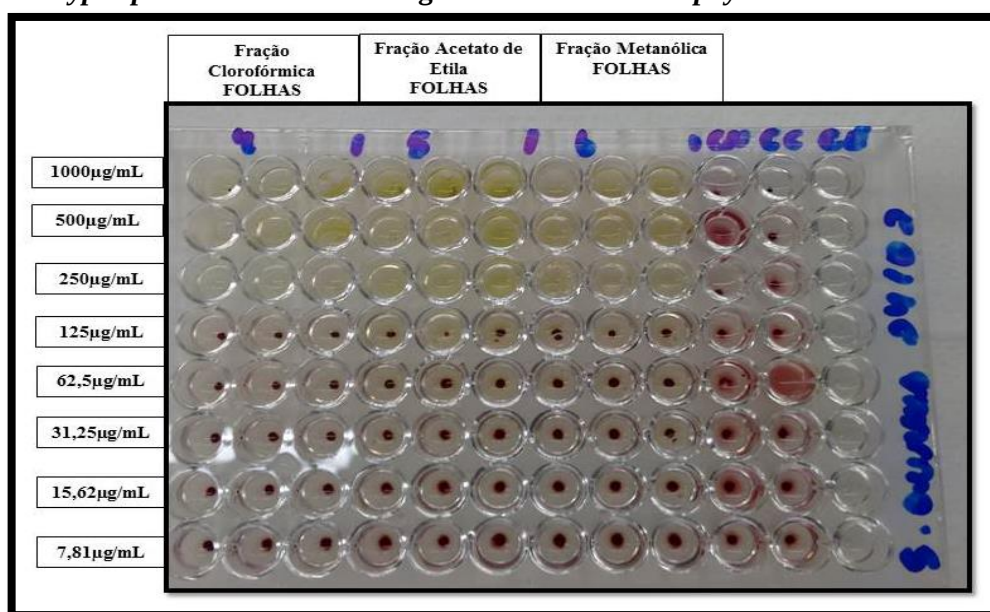
AMOSTRAS TESTADAS	CIM (µg/mL)					
	Microrganismos					
FOLHA	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. entérica</i>	<i>E. faecales</i>	<i>E. coli</i>
Extrato Etanólico	500	500	-	-	-	-
Fração Hexânica	-	-	-	-	-	-
Fração Clorofórmica	250	-	-	-	-	-
Fração Acetato de Etila	250	500	-	-	-	1000
Fração Metanólica	250	-	-	1000	-	1000
CAULE						
Extrato Etanólico	-	-	-	-	-	-
Fração Hexânica	1000	-	-	-	-	1000
Fração Clorofórmica	500	1000	-	-	-	-
Fração Acetato de Etila	250	1000	-	-	-	-
Fração Metanólica	-	-	-	-	-	-

*Os testes foram feitos em Triplicata

Fonte: AUTORA, 2015.

Legenda: - (extrato inativo frente às linhagens de microrganismos testados)

Figura 12 - Resultado da ação inibitória das frações clorofórmica, acetato de etila e metanólica do EEF de *Hyptis pectinata* frente à linhagem bacteriana de *Staphylococcus aureus*



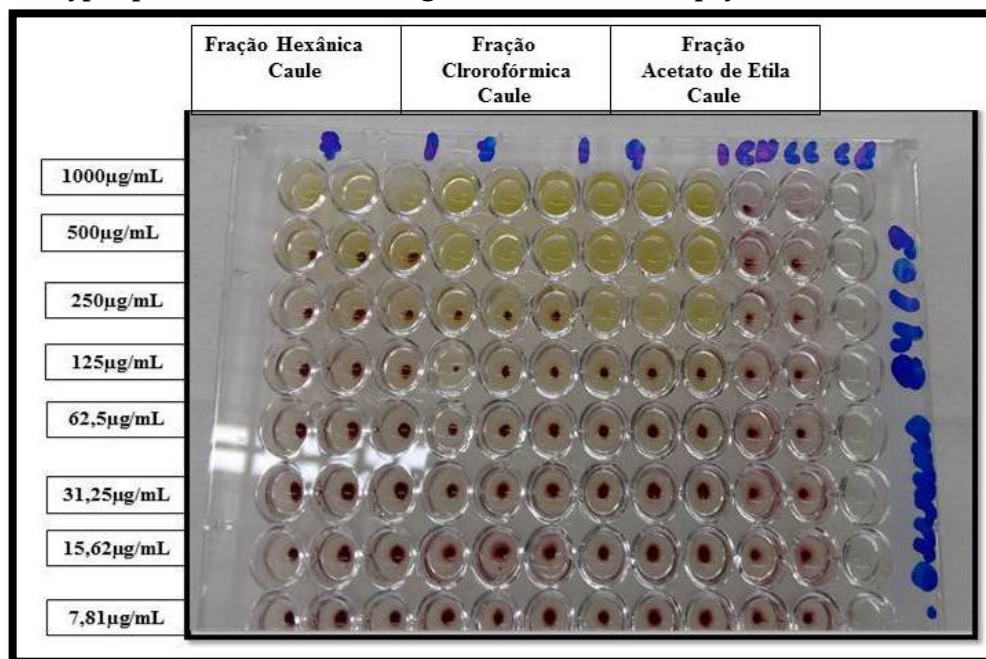
*Os testes foram feitos em triplicata

Fonte: AUTORA, 2015.

Quando comparado com estudos realizados com plantas da mesma família e gênero de *Hyptis pectinata* utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo, os resultados encontrados também se assemelham. O extrato etanólico de *Hyptis sidifolia* apresentou uma CIM de 1000 µg/mL contra *S. aureus*, não sendo evidenciada atividade contra *E. coli* (BUSSMANN et al., 2011).

O extrato etanólico de *Hyptis martiusii* apresentou atividade inibitória contra *S. aureus* com uma CIM de 256 µg/mL. Também foi capaz de inibir *E. coli* e *P. aeruginosa* com MIC de 512 e 1024 µg/mL, respectivamente (COUTINHO, 2008). O extrato etanólico de *Hyptis crenata* foi capaz de inibir as bactérias Gram-negativas *Enterococcus faecalis* em 500 µg/mL e *S. aureus* em 250 µg/mL e, assim como o presente estudo, as frações que apresentaram melhores resultados foram a Clorofórmica e de Acetato de Etila com MIC de 62,5 µg/mL a fração Clorofórmica para *S. aureus* e 31,3 µg/mL a fração de Acetato de Etila para *E. faecalis* (VIOLANTE, 2012).

Figura 13 - Resultado da ação inibitória das frações clorofórmica, acetato de etila e metanólica do EEC de *Hyptis pectinata* frente à linhagem bacteriana de *Staphylococcus aureus*



*Os testes foram feitos em triplicata
Fonte: AUTORA, 2015.

Os dados encontrados assemelham-se a um estudo realizado por Santos (2008), no que se refere à maior atividade inibitória frente à *S. aureus* seguida por *S. epidermidis*. Neste estudo, que avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Hyptis pectinata*, apesar

de ter sido identificado inibição de crescimento bacteriano, este foi com uma CIM de 12.500 µg/mL para *S. aureus* e de 18.750 µg/mL para *S. epidermidis*.

Apesar da referência do teste de Microdiluição em caldo para óleo essencial seja diferente da utilizada para extrato (CIM entre 50-500 µg/mL - elevada atividade; entre 600-1.500 µg/mL – moderada atividade; acima de 1.500 µg/mL – fraca atividade) (SANTURIO et al., 2007), os valores encontrados no estudo anterior mostram apenas sensibilidade dos microorganismos testados ao óleo essencial de *Hyptis pectinata*.

No entanto, outro estudo realizado a fim de identificar a CIM, também do óleo essencial de *Hyptis pectinata*, contra 9 cepas de *Streptococcus mutan* (bactéria Gram-positiva) isoladas a partir de voluntários, este foi capaz de inibir todas as cepas em uma CIM de 200 µg/mL, evidenciando o potencial antimicrobiano desta planta contra bactérias Gram-positivas (NASCIMENTO et al, 2008).

Esta ação inibitória frente ao *S. aureus* pode estar relacionada à ação do Pectinolídeo A, composto isolado da *Hyptis pectinata*, capaz de inibir este microorganismo em 12,5 µg/mL. Outras substâncias isoladas desta planta denominadas Pectinolídeo B e C, bem como a presença do Timol, um monoterpeneo, também apresentam atividade antimicrobiana e antisséptica (FALCÃO; MENEZES, 2003; SABITHA et al., 2013).

Os extratos de *Hyptis pectinata* não apresentaram atividade antifúngica frente à *Candida albicans*.

5.6 Potencial Cicatrizante *in vivo*

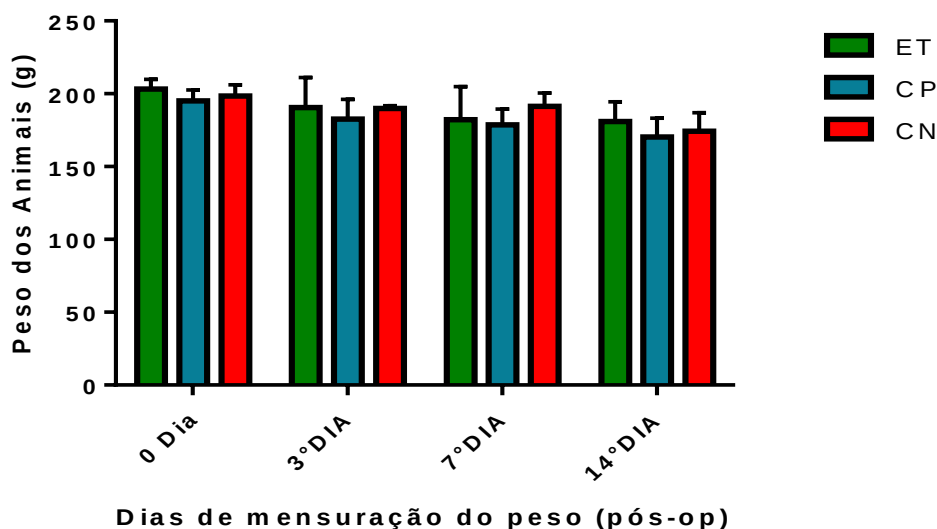
5.6.1 Observação Clínica

5.6.1.1 Peso

Os animais foram pesados no dia da cirurgia (D0), e nos dias de biópsia (D3, D7 e D14). A média dos valores obtidos foi calculada em cada subgrupo de acordo com o dia de mensuração. Conforme mostra o gráfico 4, houve discreta diminuição no peso dos animais conforme decorreram os dias do experimento. A média de peso no D0 foi de $198,9 \pm 1,4$ g, chegando a $175,2 \pm 4,06$ g no D14. A variação das médias dos grupos foi discreta, sendo considerada estatisticamente insignificante ($p= 0,5432$).

A perda de massa corpórea observada nos animais é esperada após um procedimento cirúrgico, pois o incômodo geral gerado pelo ferimento, aliada à dificuldade de locomoção devido ao curativo na parte dorsal do animal diminuem seu acesso à ração.

Gráfico 4 - Média dos pesos dos animais durante o ensaio de cicatrização *in vivo*.



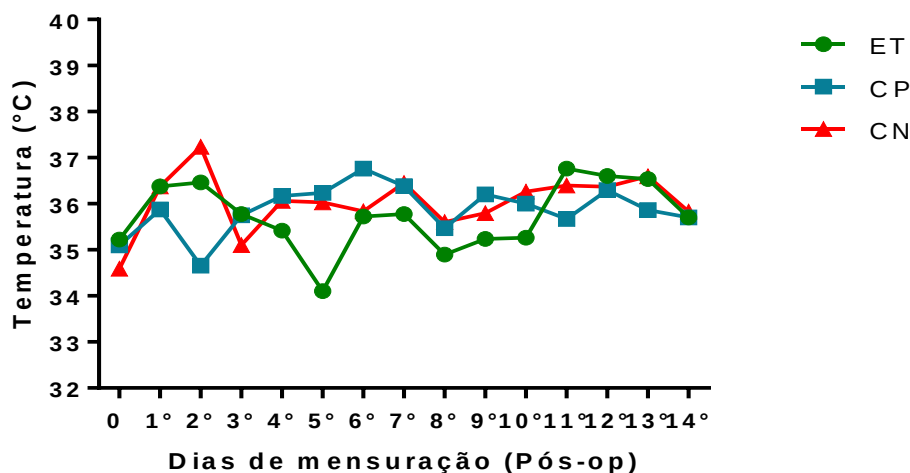
Nota: Os dados representam a média $\pm$ e.p.m dos pesos dos grupos dos grupos ET, CP e CN através da Análise de Variância (One-way ANOVA) seguidos do teste de Dunnett.

A diminuição do peso corporal dos animais nos primeiros dias de pós-operatório também pode estar relacionada ao processo inflamatório nas lesões dos ratos, uma vez que este processo produz citocinas inflamatórias e fator de necrose tumoral. Estes por sua vez causam perda de peso devido à estimulação do aumento sérico de leptina, uma proteína relacionada com a sensação de saciedade. Níveis aumentados desta proteína induzem o organismo ao gasto energético e a uma diminuição no consumo de alimento, resultando em falta de apetite e perda de peso (VIEIRA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2011)

5.6.1.2 Temperatura

A temperatura retal foi mensurada diariamente (D0 – D14) a fim de utilizá-la, juntamente com a avaliação do estado geral, como parâmetro das condições clínica dos animais. De acordo com o gráfico 5, o valor da temperatura corporal dos animais variaram entre 35,2 e 37,5 °C. Apesar dos grupos terem diferenciações nos valores de suas temperaturas durante todo experimento, não houve diferença estatística significativa entre as médias dos grupos nos referidos dias de mensuração ($p=0,4163$).

O aumento acentuado da temperatura nos grupos ET e CN nos três primeiros dias de pós-operatório é esperado e deve-se à elevação do metabolismo e ao processo inflamatório agudo induzido pela lesão. Tal aumento da temperatura corporal é mediado predominantemente por uma citocina, a interleucina-1 (STRACIER, 2008). Nota-se que após o 3º DPO a temperatura dos animais manteve-se entre 36 e 37 °C.

Gráfico 5 - Média das temperaturas dos animais durante o ensaio de cicatrização *in vivo*

Nota: Os dados representam a média das temperaturas dos grupos dos grupos ET, CP e CN através da Análise de Variância (One-way ANOVA) seguidos do teste de Dunnett.

5.6.2 Morfometria

A mensuração do tamanho das feridas foi realizada nos dias D0, D3, D7, D11 e D14. A medição foi feita com o auxílio de um paquímetro, a fim de calcular a área das lesões e observar a contração de suas bordas. A média da área das feridas nos respectivos dias de mensuração pode ser verificada na tabela 8 e no gráfico 6.

Tabela 8 - Valores médios das áreas (cm²) das feridas dos grupos nos dias de pós-operatório (DPO)

DPO	3°			7°			11°			14°		
GRUPOS	ET	CP	CN	ET	CP	CN	ET	CP	CN	ET	CP	CN
Média	1,30	1,33	1,31	1,06	0,77	1,25	0,74	0,30	0,37	0,29	0,16	0,22
D.P.	0,40	0,55	0,36	0,34	0,28	0,35	0,26	0,06	0,09	0,06	0,00	0,07
E.P.	0,13	0,18	0,12	0,15	0,11	0,14	0,15	0,04	0,05	0,03	0,00	0,04
(p≤0,05)	p=0,9856			p= 0,0702			p=0,0365*			p=0,0716		

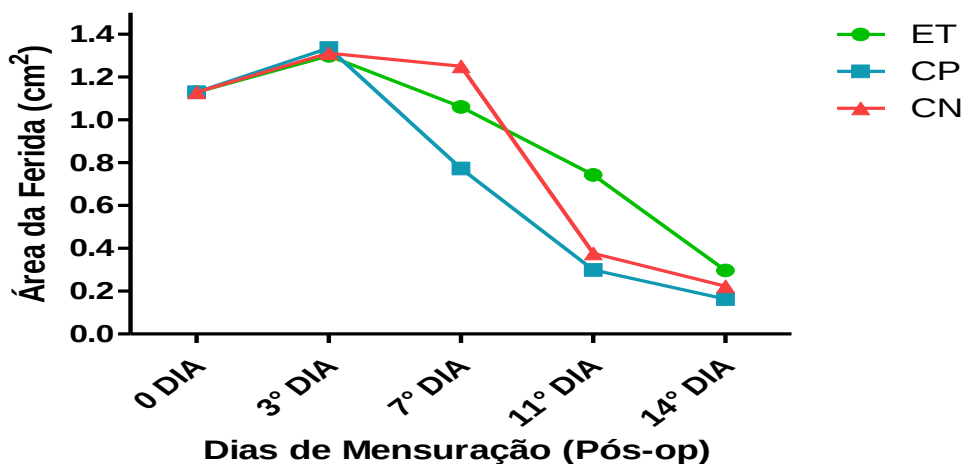
D.P: Desvio Padrão

E.P: Erro Padrão

*O teste de Dunnett evidenciou nível de significância (p=0,0365), quando comparada a média do grupo ET com o CP no 11° DPO, não havendo diferenças significativas entre ET e CN e CP e CN.

Visualizou-se um aumento da área da lesão no 3° dia de pós-operatório, seguido de sua diminuição nos dias subsequentes. Observa-se que os grupos controles CP e CN apresentaram diminuição da área mais acentuada quando comparados ao grupo experimental ET, com uma diferença estatística significante entre as médias dos grupos ET e CP no 11° de pós-operatório (DPO).

Gráfico 6 - Média das áreas das feridas dos animais durante o ensaio de cicatrização *in vivo*.



Nota: Os dados representam a média das áreas das feridas dos grupos ET, CP e CN através da Análise de Variância (One-way ANOVA) seguidos do teste de Dunnett.

O aumento inicial da área da ferida é um fenômeno esperado e ocorre como resultado da retração centrífuga da pele perilesional, pois logo após a retirada de um fragmento cutâneo há uma retração das margens da ferida consequente à ação centrífuga das fibras elásticas da pele, que resulta numa imediata expansão da área lesionada (FALCÃO et al., 2001; SILVA, 2006; MARINHO et al., 2013).

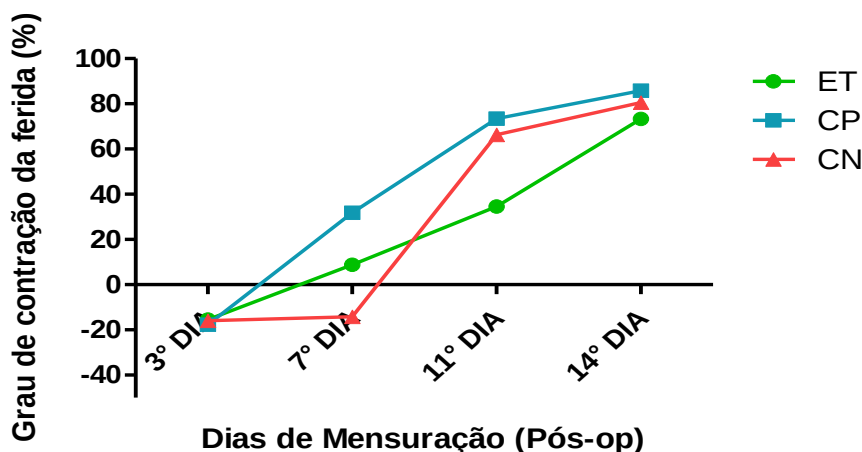
Conforme mostra o gráfico 7, não houve contração da ferida no 3º DPO. Esta passou a ser observada a partir do 7º DPO, onde o grupo ET contraiu em média 9%, o CP 32%, não havendo contração no grupo CN, com diferença estatística significativa entre o CP e CN ($p=0,0040$).

Já no 11º DPO, o grupo CP apresentou melhores resultados contraindo em média 73%, seguido pelo grupo CN com 66% e ET com 34%, com significância entre os grupos CP e ET ($p=0,0270$). No 14º DPO e último dia de experimento, o grupo ET contraiu 73%, o CP 85% e o CN 80%, com diferença significativa entre as médias do grupo ET e CP no 14º DPO ($p=0,0332$).

A contração da ferida pôde ser observada apenas a partir do 7º DPO. Isto porque a fase proliferativa, que se inicia por volta do 4º dia, é responsável pela migração e proliferação dos fibroblastos, que ocorrem a partir das margens livres da ferida. Os fibroblastos são diferenciados em miofibroblastos, que contêm uma quantidade aumentada de filamentos de actina e miosina e possuem a capacidade de se contrair e se expandir, movimentando-se, assim, pelo leito da ferida. Esta capacidade contrátil dos fibroblastos é responsável pelo fechamento das feridas após as lesões. Assim, a contração das feridas, que se inicia por volta

do 4º dia, ocorre pelo movimento do tecido existente na borda da ferida, e não devido à formação tecidual (PAGNANO et al., 2009; ISAAC et al., 2010).

Gráfico 7 - Média do Grau de Contração das feridas (%) dos animais durante o ensaio de cicatrização *in vivo*.



Nota: Os dados representam a média do Grau de Contração das feridas dos grupos ET, CP e CN através da Análise de Variância (One-way ANOVA) seguidos do teste de Dunnett. $p=0,0040$ entre os grupos CP e CN no 7º DPO. $p=0,0270$ entre os grupos CP e ET no 11º DPO. $p=0,0332$ entre os grupos CP e ET no 14º DPO.

Estudo realizado utilizando-se creme de *Hyptis suaveolens*, planta pertencente ao mesmo gênero de *Hyptis pectinata*, no tratamento de lesões cutâneas em camundongos corrobora com os achados na presente pesquisa. No estudo citado, as feridas tratadas com creme de *Hyptis suaveolens* apresentaram uma área maior quando comparada ao grupo controle positivo, observando-se o fechamento tardio das lesões do grupo experimental (ANTÔNIO, 2005).

Deste modo, o presente estudo demonstra que o grupo ET, onde os animais foram tratados com creme do extrato etanólico das folhas de *Hyptis pectinata*, no que se refere ao tamanho da área da ferida e seu grau de contração, não apresentou atividade cicatrizante em relação ao grupo Controle Positivo (CP).

5.6.3 Avaliação macroscópica das lesões

No que se refere às variáveis rubor perilesional, exsudato e inflamação, pôde-se observar que estas estiveram presentes em todos os grupos no 3º DPO. Já no 7º DPO, tais variáveis estiveram presentes apenas no grupo CP. Nos demais dias de DPO não foi possível identificá-las (Tabela 9).

Tabela 9 - Descrição macroscópica das lesões nos DPO e porcentagem (%) dos achados Rubor perilesional, Exsudato e Inflamação.

DPO	3°			7°			11°			14°		
GRUPOS	ET	CP	CN	ET	CP	CN	ET	CP	CN	ET	CP	CN
Rubor	100	66,67	100	-	16,6	50	-	-	-	-	-	-
Perilesional												
Exsudato	22,2	44,4	-	-	16,6	-	-	-	-	-	-	-
Inflamação	100	55,5	100	-	16,6	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: AUTOR, 2015

Legenda: (-) ausência de achados.

Como observado na maior parte dos grupos, a fase inflamatória pode durar de 48 a 72 horas. Nesta fase, podem ser observados sinais clássicos mediados por substâncias químicas liberadas pelas plaquetas e mastócitos, que causam vasodilatação e aumentam a permeabilidade dos vasos favorecendo a migração de neutrófilos e macrófagos, que por sua vez, agirão fagocitando corpos estranhos no leito da ferida. Tais modificações vasculares são responsáveis pelos sinais de inflamação: dor, rubor, calor e edema (HATANAKA; CURI, 2007).

A observação de rubor perilesional e exsudato em todos os ratos no 3° DPO é indicativo deste processo inflamatório esperado, como descrito, para esta fase da cicatrização. O exsudato é um líquido inflamatório com concentração proteica elevada e grande quantidade de restos celulares. Sua presença é esperada para esta fase (NASCIMENTO; NAMBA, 2009).

No entanto, não se esperava encontrar tais achados no 7°DPO, uma vez que segundo a literatura, neste momento a 2° fase da cicatrização, proliferativa, encontra-se em andamento. O prolongamento da inflamação inibe os fibroblastos e, conseqüentemente, a produção de colágeno impedindo a epitelização (CÔRTEZ, 2013). Desta forma o achado rubor perilesional, exsudato e inflamação em 16,6% no grupo CP e 50% de rubor perilesional no grupo CN no 7° DPO representam achados que não condizem com o esperado para o período da cicatrização.

Tecido de granulação foi observado em 33,33% no grupo CP no 3° DPO e todos os grupos a partir do 7° DPO, permanecendo nos dias subsequentes, conforme a Tabela 10.

Tabela 10 - Descrição macroscópica das lesões nos DPO e porcentagem (%) do achado tecido de granulação

DPO	3°			7°			11°			14°		
GRUPOS	ET	CP	CN	ET	CP	CN	ET	CP	CN	ET	CP	CN
Tecido de granulação	-	3,33	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Fonte: AUTOR, 2015

Legenda: (-) ausência de achados.

O tecido de granulação, como esperado conforme a literatura foi observado nos grupos ET, CP e CN a partir do 7º DPO. Este tecido é resultante do crescimento de novos vasos a partir da proliferação de vasos pré-existentes adjacentes à borda da ferida. Também é composto por macrófagos e fibroblastos (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

É um tecido edematoso, que ao ser observado a olho nu sua superfície aparenta conter muitos grânulos, apresenta coloração vermelho vivo, brilhante e úmido. Sua importância consiste na sua capacidade de promover as trocas gasosas e a nutrição das células metabolicamente ativas e que agirão na cicatrização. Lentamente, este tecido é enriquecido com mais fibras colágenas, o que começa a dar à região lesionada a aparência de cicatriz resultante do acúmulo de massa fibrosa (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; NASCIMENTO; NAMBA, 2009).

A formação do tecido de granulação faz parte da última etapa da fase proliferativa. Lentamente, este tecido é enriquecido com mais fibras colágenas, o que começa a dar à região lesionada a aparência de cicatriz resultante do acúmulo de massa fibrosa (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007).

Quanto à presença de fibrina, esta esteve presente em todos os grupos nos 3º e 7º DPO, permanecendo somente nos grupos ET e CN nos dias 11º e 14º. Já a presença de crosta no leito da ferida foi observada apenas no grupo ET em todos os dias de avaliação (Tabela 11).

Tabela 11 - Descrição macroscópica das lesões nos DPO e porcentagem (%) dos achados fibrina e crosta

DPO	3º			7º			11º			14º		
GRUPOS	ET	CP	CN	ET	CP	CN	ET	CP	CN	ET	CP	CN
Fibrina	100	100	100	100	83,3	83,3	100	-	33,3	100	-	33,3
Crosta	44,4	-	-	100	-	-	100	-	-	-	-	-

Fonte: AUTOR, 2015

Legenda: (-) ausência de achados.

O tecido fibrinoso presente nos grupos ET e CN até o dia 14 e no CP até o 7º DPO é um tecido desvitalizado de aparência amarelada, de consistência delgada, macia e que pode ou não estar aderido firmemente ao leito e bordas da ferida, apresentado como cordões ou crostas. É formado por bactérias, fibrina, elastina, colágeno, leucócitos intactos, fragmentos celulares, exsudato e grandes quantidades de DNA (NASCIMENTO; NAMBA, 2009).

Sua presença no leito da ferida interfere no processo de cicatrização, sendo necessária sua remoção até a exposição total do tecido saudável, a fim de que o reparo tecidual ocorra no período esperado (ARAÚJO et al., 2014).

No que se refere à presença de crosta, apenas o grupo ET apresentou crosta superficial parcialmente no leito de suas feridas em todos os dias de avaliação macroscópica (D3, D7 e D11). A partir do D9 as crostas aderidas parcialmente no leito das feridas dos animais do grupo ET começaram a desprender-se espontaneamente durante a realização dos curativos. Não sendo possível observá-las no D14.

Logo após a retirada do fragmento de pele há a formação de uma solução de continuidade e esta é preenchida inicialmente por fibrina, coágulo e exsudato inflamatório, dando origem à crosta (SANTOS et al., 2006).

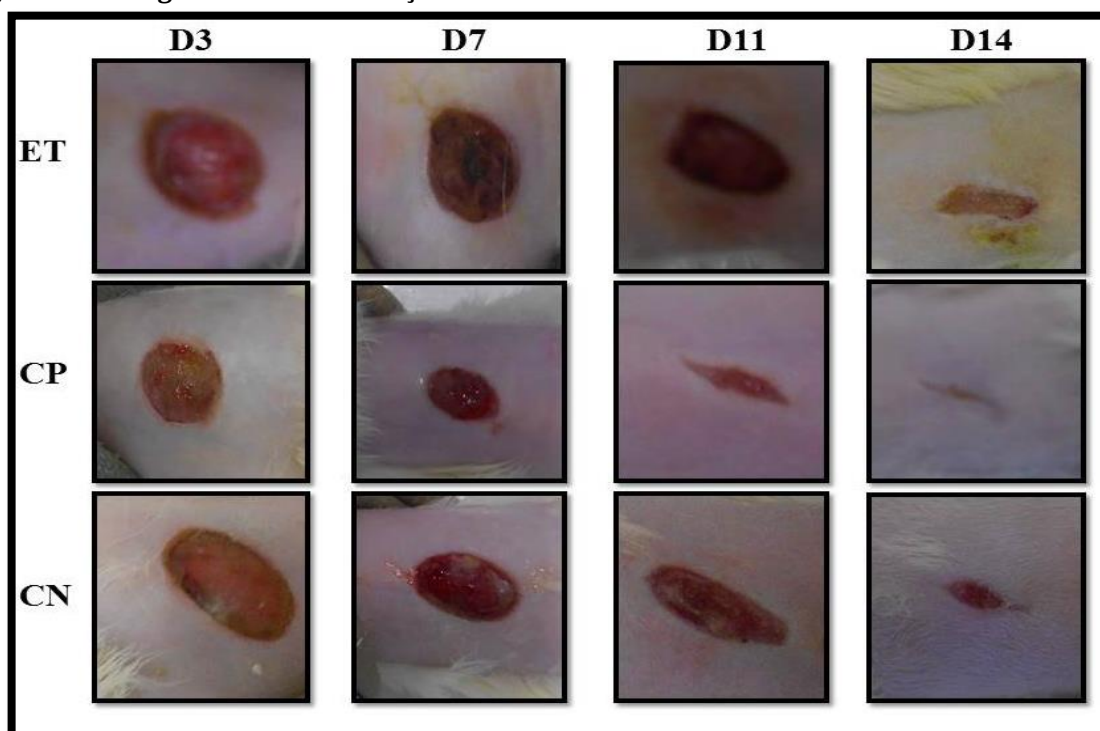
A crosta é uma massa ressecada e consolidada na superfície da ferida, composta de uma combinação de queratina, soro, células mortas e restos de microrganismos. Sua finalidade é de prevenir perda de líquidos e evitar a invasão de bactérias (VIEIRA et al., 2008; CAMARGOS; VIEIRA, 2009).

Estudos realizados para avaliação da atividade cicatrizante de plantas também apresentaram prevalência de crosta no grupo de animais tratados com formulações do extrato das plantas, quando comparados aos grupos controles (SANTOS et al., 2006; VIEIRA et al., 2008; MARTINS et al., 2006; CAMARGOS; VIEIRA, 2008; KOBAYASHI et al., 2015;).

As plantas utilizadas nos estudos citados possuíam em comum, assim como a planta utilizada neste estudo, o metabólito secundário tanino. Entretanto, não há evidências científicas que correlacionem a formação de crosta à presença deste metabólito. No entanto, Oliveira et al. (2010) afirmam que os taninos são responsáveis pela formação de uma película no leito da ferida, uma vez que eles precipitam as proteínas dos tecidos lesados, formando um revestimento protetor que favorece a sua reparação e diminui a permeabilidade e exsudação da ferida.

A figura 14 mostra a progressão da cicatrização das feridas nos diferentes grupos de tratamento. Cada sequência horizontal de fotos corresponde ao tratamento utilizado no respectivo dia de avaliação macroscópica (D3, D7, D11 e D14). Observa-se a presença de fibrina e diminuição progressiva da lesão em todos os grupos, com melhores resultados de contração das bordas acentuados pelo grupo CP.

Figura 14 – Progressão da cicatrização das lesões de acordo com o tratamento utilizado



Fonte: AUTORA, 2015.

5.6.4 Avaliação histopatológica das lesões

A tabela 12 descreve o resultado dos escores do estudo histológico das feridas, onde quanto maior o escore do animal, melhor apresenta-se o processo de cicatrização. É possível observar que a média dos escores nos três dias de biópsia e avaliação mantiveram-se semelhantes entre os grupos, não havendo, a nível histológico, diferença estatisticamente significativa no processo de cicatrização entre os grupos ET, CP e CN.

Tabela 12 - Estudo histológico das feridas

DPO	Escore			p ≤ 0,05*
	Grupo ET	Grupo CP	Grupo CN	
3°	46	41	44,67	0,8458
7°	64	91	90	0,2939
14°	115,7	115,7	119	0,4921
Média	75,23	82,57	84,56	0,9496

Fonte: AUTOR, 2015

A análise histológica nas feridas a fim de avaliar a primeira fase da cicatrização, a fase inflamatória, identificou presença de proliferação vascular moderada em 66,66% dos animais do grupo ET e discreta em 100% dos animais dos grupos CP e CN. Quanto à presença de

células mononucleares (monócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos), ambas estiveram presentes de forma discreta em 100% dos animais dos três grupos (Tabela 13).

Tabela 13 - Descrição histológica da fase inflamatória das lesões no 3ºDPO e porcentagem (%) dos achados (n.3)

Achados	Fase inflamatória			
	Grupo ET		Grupo CP	Grupo CN
	Discreta	Moderada	Discreta	Discreta
Proliferação vascular	33,34	66,66	100	100
Células mononucleares (monócitos)	100	-	100	100
Células Polimorfonucleares (neutrófilos)	100	-	100	100

Fonte: AUTOR, 2015

Os achados histológicos da fase inflamatória comprovam que não houve diferença entre os grupos nesta fase da cicatrização, uma vez que ET, CP e CN apresentaram achados semelhantes e esperados para este primeiro período da cicatrização.

Os neutrófilos presentes nos três grupos de forma discreta são as primeiras células a migrarem dos vasos sanguíneos para o leito da ferida na fase inflamatória. Posteriormente, monócitos do sangue periférico infiltram-se no local da ferida em resposta a agentes quimiotáticos e transformam-se em macrófagos (ISAAC et al., 2010).

O macrófago ativado é considerado a principal célula efetora do processo de reparo tecidual, pois juntamente com os neutrófilos degradam e removem componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanas. Também produz vários fatores de crescimento, dentre eles o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), que se destaca como a principal citocina necessária para estimular a formação do tecido de granulação (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

A análise da fase proliferativa no 7º DPO, conforme demonstra a tabela 14, identificou presença moderada de proliferação fibroblástica em 66,66% dos animais do grupo ET e intensa em 33,34% dos grupos CP e CN. Também foi possível observar neovascularização moderada em 33,34% dos animais do grupo ET, em 100% do grupo CP e 66,66% do grupo CN. Tecido de granulação foi observado em 100% dos animais dos três grupos avaliados. Fibras de colágeno foram observadas discretamente em 33,34% dos animais do grupo ET e 66,66% nos grupos CP e CN.

Tabela 14 - Descrição histológica da fase proliferativa no 7º DPO das lesões e porcentagem (%) dos achados (n.3)

Grupos	Proliferação fibrobástica		
	Discreta	Moderada	Intensa
Grupo ET	33,34	66,66	-
Grupo CP	-	66,66	33,34
Grupo CN	33,34	33,34	33,34
	Neovascularização		
	Discreta	Moderada	Intensa
Grupo ET	66,66	33,34	-
Grupo CP	-	100	-
Grupo CN	33,34	66,66	-
	Colagenização		
	Discreta	Moderada	Intensa
Grupo ET	33,34	-	-
Grupo CP	66,66	-	-
Grupo CN	66,66	-	-
	Tecido de Granulação		
	Presente	Ausente	
Grupo ET	100	-	
Grupo CP	100	-	
Grupo CN	100	-	

Fonte: AUTOR, 2015

Como observado, a proliferação fibroblástica só se inicia após o 3º dia da cicatrização quando os neutrófilos e macrófagos finalizam a limpeza da área traumatizada. Os fibroblastos constituem a principal célula do tecido de granulação e sua principal função é sintetizar colágeno. A partir do seu aumento com a finalidade de produção de colágeno no leito da ferida, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico, processo que é denominado de fibroplasia e, para eficiência deste processo é necessária a ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A neovascularização observada em todos os grupos é um processo fundamental na fase proliferativa, pois estes novos vasos formados a partir de vasos preexistentes são responsáveis pela nutrição do tecido em formação, pelo aumento do aporte das células atuantes na cicatrização, em especial os macrófagos e fibroblastos, e pela formação do tecido de granulação, composto por sua vez de macrófagos, fibroblastos e os vasos neoformados (TAZIMA; VICENTE; MARIYA, 2008; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

O colágeno é a proteína mais abundante e sua classificação e propriedades diferem de acordo com o tipo de organização das fibras que o constituem. A fibra de colágeno tipo III é produzida inicialmente pelos fibroblastos e compõem de 30 a 40% o tecido de granulação.

Este tipo de colágeno está presente na fase proliferativa (CAMPOS; BORGIS-BRANCO; GROTH, 2007).

Os mecanismos de fibroplasia, formação do tecido de granulação e de fibras de colágeno resultam na reepitelização, etapa que levará ao fechamento das superfícies da lesão e que é iniciada pela migração de células epiteliais (queratinócitos) desde as margens da ferida (LAUREANO; RODRIGUES, 2011; OLIVEIRA; DIAS, 2012). A avaliação da fase de remodelamento no 14º DPO foi capaz de identificar reepitelização total, bem como presença de fibras de colágeno em 100% dos animais dos grupos ET, CP e CN.

Na reepitelização ocorre aumento de tamanho, divisão e migração das células da camada basal da epiderme sobre a área de reparação do tecido conjuntivo já formado, sendo possível visualizar por microscópio epitélio recém-formado (OLIVEIRA; DIAS, 2012).

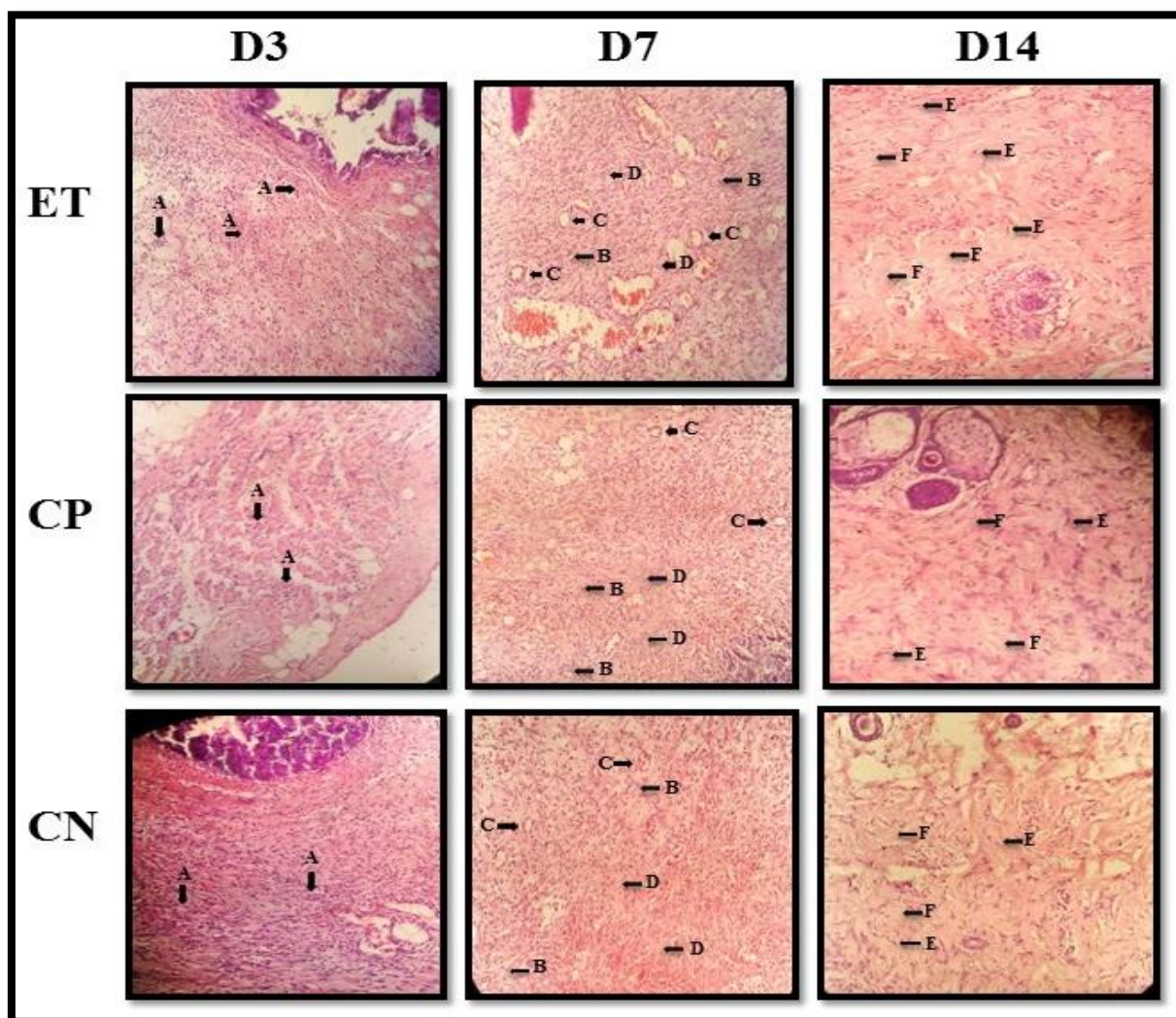
A fase de remodelamento caracteriza-se principalmente pela maturação do tecido de cicatrização e pelo aumento da força de tensão deste. Nesta fase, o tecido de granulação (rico em fibras de colágeno tipo III) é substituído progressivamente por uma cicatriz com predomínio de fibras de colágeno tipo I. Este processo de substituição das fibras do tipo III para o tipo I perdura por meses, podendo levar até 1 ano (TAZIMA; VICENTE; MARIYA, 2008; LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

No que se refere a avaliação histológica do tecido inviável crosta/necrose, este apesar de não ter sido observado macroscopicamente, também esteve presente nos 3º e 7º DPO nos grupos CP e CN, além do grupo ET (descrito na avaliação macroscópica). Já a avaliação microscópica do 14º não identificou a presença de crosta/necrose em nenhum dos animais dos três grupos.

Um estudo que avaliou a ação cicatrizante do extrato etanólico das folhas de *Hyptis suaveolens*, planta pertencente ao mesmo gênero de *H. pectinata*, identificou em sua análise histológica das feridas um aumento significativo de colágeno, quando comparado ao grupo controle. Os autores atribuíram tal resultado à presença de enzimas antioxidantes encontradas no extrato, uma vez que essas são capazes de prevenir danos às células envolvidas na cicatrização causados pelos radicais livres (SHIRWAIKAR et al., 2003).

A figura 15 retrata o progresso histológico das feridas dos três grupos nos respectivos dias de avaliação.

Figura 15 - Progressão histológica da cicatrização das lesões de acordo com o tratamento utilizado



Fonte: AUTOR, 2015.

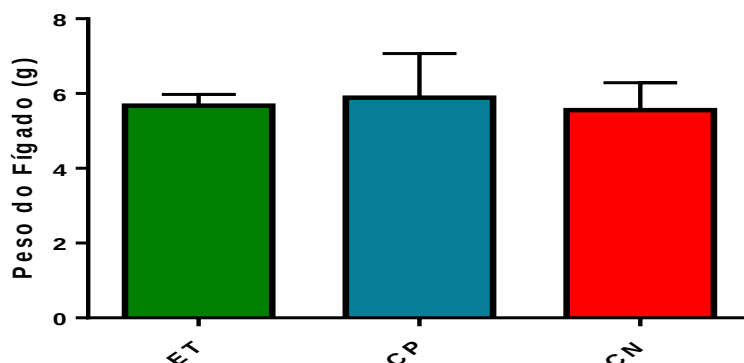
Legenda: D3: A - Infiltrado inflamatório, D7: Tecido de granulação formado por B - Fibroblatos e C - Vasos neoformados; D - Fibras de colágeno, D14: E - Fibroblastos; F - Fibras de Colágeno. Coloração hematoxilina eosina. Aumento 40x.

Os achados da análise microscópica das feridas dos animais dos grupos ET, CP e CN corresponderam ao esperado em cada tempo e fase da cicatrização, com exceção da presença de crosta/necrose nos 3º e 7º DPO, não havendo diferenças significativas entre os grupos.

5.6.5 Avaliação macroscópica dos órgãos e da função hepática e renal

A análise macroscópica do fígado e rins dos animais não evidenciou alteração morfológica nos mesmos. Também não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias do peso dos órgãos dos animais de cada grupo, conforme demonstra os gráficos 8 e 9.

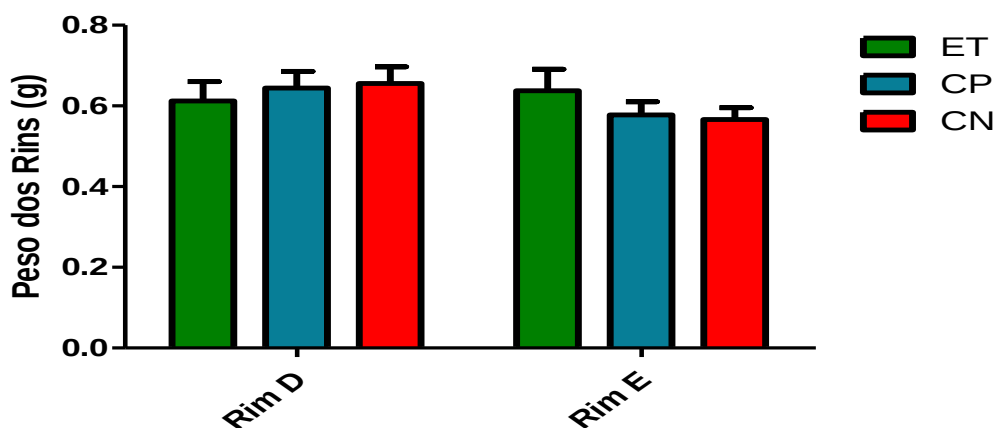
Gráfico 8 - Média do peso do fígado dos animais durante o ensaio de cicatrização *in vivo*.



Nota: Os dados representam a média $\pm$ e.p.m do Peso do Fígado dos grupos ET, CP e CN através da Análise de Variância (One-way ANOVA) seguidos do teste de Dunnett. $p=0,6973$

A média do peso do fígado das fêmeas difere da média encontrada no estudo realizado por Kuntze et al. (2012), onde foi observada uma média de $9,1 \pm 1,83$ g no peso do fígado de fêmeas do grupo controle, que do mesmo modo no presente estudo, não teve diferenças significativas quando comparada com as médias dos grupos experimentais. No entanto, a média do peso corporal das fêmeas observadas por esses autores foi maior ($263,5 \pm 31,3$ g), o que justificaria também o maior peso hepático.

Gráfico 9 - Média do Peso dos Rins dos animais durante o ensaio de cicatrização *in vivo*.



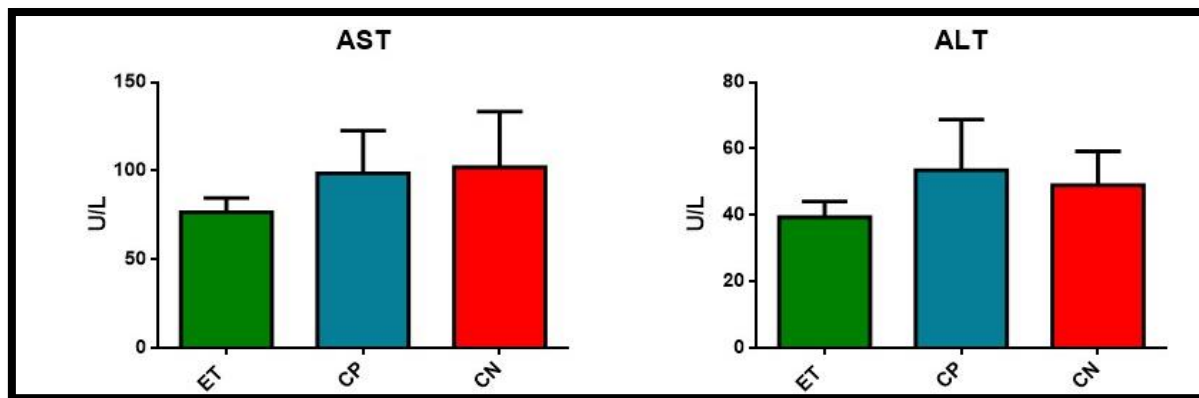
Nota: Os dados representam a média $\pm$ e.p.m do Peso dos Rins dos grupos ET, CP e CN através da Análise de Variância (One-way ANOVA) seguidos do teste de Dunnett. $p=0,8246$ (Rim D). $p=0,2796$ (Rim E).

A média encontrada dos rins dos animais foi semelhante a descrita por Dantas et al. (2006), que descrevem o perfil dos animais do biotério de uma universidade, no qual a média dos rins dos ratos encontrada foi de $0,61 \pm 0,04$ g.

Quanto a avaliação da função hepática dos grupos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos dos valores sérico das enzimas

hepáticas Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT), tendo-se como padrão o CN, conforme demonstra o gráfico 10.

Gráfico 10 - Média dos valores séricos de AST e ALT dos animais submetidos ao ensaio de cicatrização *in vivo*.



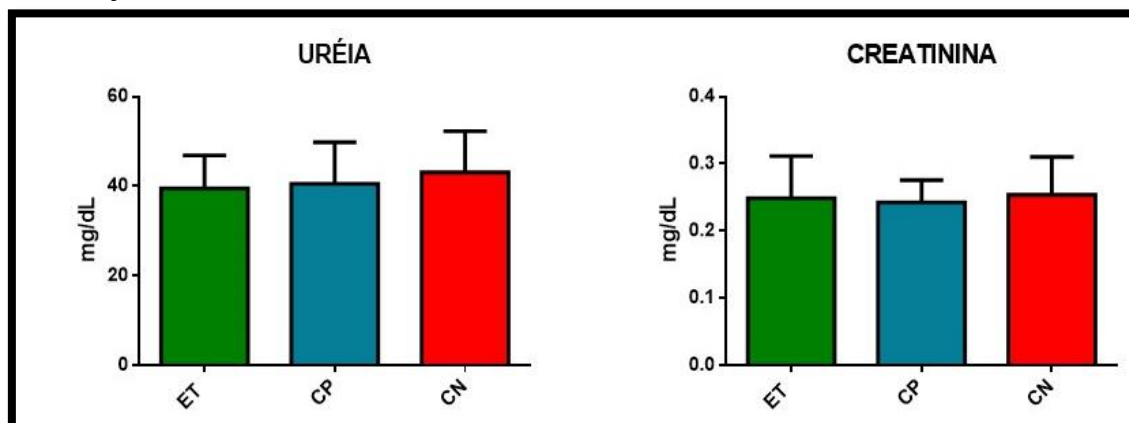
Nota: Os dados representam a média $\pm$ e.p.m dos valores séricos de AST e ALT através da Análise de Variância (One-way ANOVA) seguidos do teste de Dunnett. $p=0,1135$ (AST). $p=0,0856$ (ALT).

A elevação dos níveis séricos dessas enzimas é indicativa de disfunção hepática, decorrente de ruptura de hepatócitos, resultante de necrose ou das alterações da permeabilidade da membrana celular (BORSA et al., 2006). De acordo com o Canadian Council on Animal Care (CCAC, 1993), os valores séricos de AST para ratos da linhagem wistar podem variar entre 39 a 92 U/L e os valores de ALT entre 17 e 50 U/L, observando-se desta forma aumento de AST acima da média esperada nos grupos CP e CN.

No entanto, estudos de perfil de animais de biotério brasileiros foram capazes de identificar níveis séricos semelhantes ao deste estudo. Dantas et al. (2006), obteve uma média de AST de 81U/L e ALT de 51U/L, Castelo Branco et al. (2011) 137 U/L de AST e 54U/L de ALT e Melo et al. (2012) 134,7U/L de AST e 41U/L de ALT.

A avaliação da função renal através dos valores sérico de ureia e creatinina, também utilizando o CN como padrão, não evidenciou diferenças estatisticamente significantes (Gráfico 11). Os dados encontrados corroboram com estudos, em que a média encontrada para os níveis séricos de uréia foram 43,7 mg/dl e 40,4mg/d. Já a média dos valores de creatinina nos três grupos foram inferiores aos encontrados nos estudos supracitados, que apresentaram média de 0,4 mg/dl e 0,5mg/dl (CASTELO BRANCO et al., 2011; MELO et al., 2012)

Gráfico 11 - Média dos valores séricos de uréia e creatinina dos animais submetidos ao ensaio de cicatrização *in vivo*



Nota: Os dados representam a média $\pm$ e.p.m dos valores séricos de uréia e creatinina através da Análise de Variância (One-way ANOVA) seguidos do teste de Dunnett. $p=0,7018$ (Uréia). $p=0,9119$ (Creatinina).

Vale salientar que, apesar de existirem parâmetros fisiológicos, os perfis de animais de diferentes biotérios demonstram que pode haver variações relacionadas com sexo, linhagem, genótipo, que são decorrentes de diversos fatores como idade, dieta, manuseio e ambiente. Além disso, os animais experimentais podem se comportar de modo diferente a depender das condições a que são submetidos, sendo também passíveis de sofrerem influência de fatores ecológicos (CASTELO-BRANCO et al., 2011).

Para que a avaliação hepática e renal sejam conclusivas quanto ao dano ou não causado nesses órgãos pelo extrato EEF, é necessária a avaliação histológica destes de forma que os achados histológicos complementem os achados bioquímicos.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo pôde-se explorar, a partir de testes *in vitro* e *in vivo*, o potencial biológico da espécie *Hyptis pectinata*. Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

- O EEF possui metabólitos secundários como Taninos, Terpenos e Alcaloides e o EEG possui terpenos todos de importância para medicina, pois possuem atividades farmacológicas comprovadas;
- O EEF e EEG não apresentaram citotoxicidade *in vitro* frente aos macrófagos da linhagem J774, diferentemente das frações hexânica, clorofórmica e de acetato de etila do EEG que apresentaram citotoxicidade.
- O EEF apresentou capacidade sequestradora do radical livre DPPH sugerindo que a espécie *Hyptis pectinata* possui atividade antioxidante.
- Os extratos EEF e EEG apresentaram melhores resultados antimicrobianos frente bactérias Gram-positivas, sendo capazes de inibir moderadamente os microorganismos *S. aureus* e *S. epidermidis*;
- As frações que apresentaram melhores resultados para atividade antimicrobiana foram a Clorofórmica e de Acetato de Etila dos extratos EEF e EEG, podendo-se atribuir aos metabólitos Flavonoides, Terpenos e Taninos, que possuem afinidade polar com esses solventes orgânicos;
- Sobre o potencial cicatrizante *in vivo*, o EEF não foi capaz de promover a contração das bordas das feridas de maneira mais rápida, quando comparado ao controle positivo e controle negativo. A avaliação macroscópica dos órgãos dos animais não evidenciou alterações morfológicas significantes, bem como não houve diferenças estatísticas na avaliação hepática e renal. Também não houve diferenças significantes no resultado da avaliação histológica das feridas;

7 PERSPECTIVAS

- Sugere-se a realização em estudos posteriores do método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) a fim de quantificar a presença desses metabólitos;
- Estudos futuros que investiguem a possível atividade antitumoral ou larvícida das frações que apresentaram citotoxicidade;
- A realização de outros testes que avaliem a atividade antioxidante *in vitro* do EEF;
- Recomenda-se a avaliação histológica do fígado e rins dos animais a fim de complementar a avaliação da função hepática e renal obtida por meio dos testes bioquímicos.
- Sugere-se que estudos da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva devam ser realizados para contribuir com o potencial biológico desta planta.

REFERÊNCIAS

- AGREN, M.S et al. A comparative study of three occlusive dressing in the treatment of full-thickness wounds in pigs. **Journal of the American Academy of Dermatology.**, v.36, n.1, p. 53-58, 1997.
- ALMEIDA, L.C.T et al. Potencial antimicrobiano do óleo de coco no tratamento de feridas. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste.**, v.13, n.4, p. 880-7, 2012.
- ALVES, C.Q et al. Avaliação da Atividade Antioxidante de Flavanóides. Diálogos & Ciência – **Revista de Rede de Ensino FTC.**, v.1, n.12, 2007.
- _____. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova.**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANDRADE, A.M et al. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm.ex Benth., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy.**, v.20, n6, p. 962-968, Dez. 2010.
- ANTÔNIO, F.I. **Aspectos macroscópico e microscópicos da reparação de feridas cutâneas em camundongos (Swuiss-Vallée) tratadas com creme de *Hyptis suaveolens* e *Croton urucurana* Baill.** 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2005.
- ANVISA. Detecção e Identificação de Fungos de Importância Médica. In: **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Salvador, 2004.
- ANVISA. **Guia para a avaliação de segurança de produtos cosméticos.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2ª ed. Brasília, 2012.
- ARAÚJO, E.Q.X et al. Papaína-ureia como agente desbridante: revisão de literatura. **Revista Baiana de Saúde Pública.** v.38, n.3, p.636-646 jul./set, 2014.
- ARRIGONI-BLANK, M.F et al. Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine.**, v.1, n.15, p.334-339, (2008).
- AYRES, M.C.C et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v. 1, n. 18, p. 90-97, 2008.
- AUSATRALIAN TROPICAL REINFOREST PLANTS. Disponível em http://keys.trin.org.au/key-server/data/0e0f0504-0103-430d-8004-060d07080d04/media/Html/taxon/Hyptis_pectinata.htm. Acesso em Out. 2014.
- BADKE, M.R et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 132-139, Mar., 2011.

BALBINO, C.A; PEREIRA, L.M; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.**, v. 41, n.1, jan./mar., 2005.

BARBOSA, C.V. et al. Cytotoxic and antitumor activities of *Hyptis pectinata* (sambacaitá) extract. **Pharmacology On line.**, v.3, p.70–4, 2012.

BARRETO, R.S.S et al. A Systematic Review of the Wound-Healing Effects of Monoterpenes and Iridoid Derivatives. **Molecules.**, v.19, p. 846-862, 2014.

BARROS, R.P; NEVES, J.D.S. Comercialização de plantas medicinais: um estudo etnobotânico nas feiras livres do município de arapiraca–al. **Revista de Biologia e Farmácia.** v.7, n.2, 2012.

BASÍLIO, I.J.L.D et al. Estudo Farmacobotânico Comparativo das Folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta farmacéutica bonaerense.**, v. 25. n. 4, 2006.

BORSA, A et al. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.58, n.4, p.675-677, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Resolução n. 1/GM de 30 de maio de 2014. Aprova o Regimento Interno do Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 4 jun. 2014. Seção 1, p. 95.

_____. 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.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos.

Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

BRUNH, J.G; HOLMSTEDT, B. Ethnopharmacology, objectives, principles and perspectives. **In: Natural products as medicinal agents. Stuttgart: Hippokrates, 1982.**

BRUNING, M.C.R; MOSEGUI, G.B.G; VIANNA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 10, Oct. 2012.

BUSSMANN, R.W et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.132, n.1, p. 1001-108, Out, 2010.

CAETANO, G.F. **Biomembrana de quitosana-alginato na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos.** 2012. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Instituto Butantan. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

CALBO, T.F. Multidrug-resistant organisms (MDROs) in healthcare associated infections (H.A.Is): one threat above. **An R Acad Nac Med (Madr).**, v. 129, n.2, p. 477-515, 2012.

CALDAS, G.R.F et al. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology.**, v.137, n.1, p. 886–892, 2011.

CAMARGOS, D.M; VIEIRA, D. Comparação da ação da *Jatropha multiphida* (bálsamo) com o laser AlGaInP na cicatrização em camundongos. **Revista Mineira de Ciências da Saúde Patos de Minas.**, v.1, n.1, p. 42-55, 2009.

CAMPOS, A.C.L; BORGES-BRANCO, A; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva.**, v.20, n.1, p.51-8, 2007.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guide to the care and Use of experimental Animals. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1993.

CARNEIRO, C.M; SOUZA, F.B; GAMA, F.N. tratamento de feridas: assistência de enfermagem nas unidades de atenção primária à saúde. **Revista Enfermagem Integrada.**, Ipatinga: Unileste-MG, v.3, n.2, Nov./Dez, 2010.

CARVALHO, J.S.B et al. Uso popular das plantas medicinais na comunidade da Várzea, Garanhuns-PE. **Revista de Biologia e Ciências da Terra.**, v.13, n.2, 2013.

CASTELO BRANCO, A.C.S.C et al. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento.**, v.15, n.2, p.209-214, 2011.

COBEA. diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA. Ministério da ciência, tecnologia e inovação. Conselho nacional de

controle de experimentação animal. Brasília, 2013.

CORTES, J.A et al., Frequency of microorganisms isolated in patients with bacteremia in intensive care units in Colombia and their resistance profiles. **Brazilian Journal of Infectious Diseases.**, v.17, n.3, p.346–352, 2013.

CÔRTEZ, S.M.S. O Tratamento de Ferida: Um Artigo de Revisão. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires.**, v.1, n.1, p. 55-64, Janeiro-Junho, 2013.

COUTINHO, H.D.M et al. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* *Benth* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy.**, v.18 (Supl.), n.1, p.670-675, Dez. 2008.

ÇULHAOGLU, B et al. Bioactive constituents of *Salvia chrysophylla* Stapf. **Natural Product Research.**, v. 1, p. 1–10, 2012.

CUNHA L.C et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.**, v.19, n.2^a, Abr./Jun. 2009.

DANTAS, J.A et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Sciences.**, v. 28, n. 2, p. 165-170, 2006.

D'ACAMPORA, A.J et al. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Arquivos Catarinenses de Medicina.**, v.36, n.1, 2012.

DALL' AGNOL R et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine.**, v.10, n.1, p.511-516, 2003.

D.-H. Xu et al. The essential oils chemical compositions and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three *Hyptis* species. **Pharmaceutical Biology.** V. 51, n.9, p. 1125-1130, 2013.

DE MELO, D.B et al. Fitoterapia, por que não?. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade.**, v.7, n.1, p.52, Jun, 2012.

De-QUEIROZ, A.C et al. Antileishmanial Activity of Medicinal Plants Used in Endemic Areas in Northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, v.1, n.1 2014.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MultCiência.**, v.1, n.7, Outubro, 2006.

FALCÃO, D. Q; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmácia.** v. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

FALCAO, R.A et al. Antileishmanial Phenylpropanoids from the Leaves of *Hyptis pectinata*

(L.) Poit. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, v.1, n.1, 2013.

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

FEIJÓ, E; CRUZ, I.C.F; LIMA, D.V.M. Wound infection - sistematic literature review. **Online Brazilian Journal of Nursing**, Niterói (RJ), v. 7, n.3, p. Nov 2008.

FERREIRA, A.M et al. Conhecimento e prática de acadêmicos de enfermagem sobre cuidados com portadores de feridas. **Escola Anna Nery.**, v.17, n.2, p. 211-219, 2013.

FILHO, V.C; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **QUÍMICA NOVA.**, v.21, n.1, 1998.

FRANCO, C.R.P. Essential oil composition and variability in *Hyptis fruticosa*. **Revista brasileira de farmacognosia-brazilian journal of pharmacognosy.**, v. 21, n.1, Jan./Feb. 2011

GARCIA, L.M et al. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogarresistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção.**, v.3, n.2, p. 45-49, 2013.

GARCÍA, A.A; CARRIL, E.P. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal.**, v.2, n.3, p.119-145, 2009

GHAFFARI, H et al. Antioxidant and Neuroprotective Activities of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Against Oxidative Stress-Induced Neurotoxicity. **Cellular and Molecular Neurobiology.**, v. 34, n.1 p.323–331, 2014.

GOES, A.M. et al. Viabilidade celular de nanofibras de polímeros biodegradáveis e seus nanocompósitos com argila montmorilonita. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 34-40, 2012

GOLAN, D.E et al. Princípios de Farmacologia Antimicrobiana e Antineoplásica. In: **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia** / Organizadores David E. Golan, Armen H. Tashjian Jr, Ehrin J Armstrong, April W. Armstrong. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOHARI, A.G et al. Bioactive flavonoids from *Satureja atropatana* Bonge. **Natural Product Research.**, v.23, n.17, p.1609-1614. Nov. 2009.

HATANAKA, E; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia** v.88, n.2,p. 53-58, 2007.

HARLEY, R et al. Lamiaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

HUBER, L.S; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores

que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara.**, v.19, n.1, p. 97-108, jan./mar. 2008.

KAUARK, F; MANHÃES, F.C; MEDEIROS, C.H. **Metodologia da pesquisa : guia prático**/Fabiana Kauark, Fernanda Castro Manhães e Carlos Henrique Medeiros. – Itabuna: Via Litterarum, 2010.

KARAMAN, I et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.85, n.1, p.231–235, 2003.

KOMES, D et al. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Some Traditionally Used Medicinal Plants Affected by the Extraction Time and Hydrolysis. **Phytochem. Anal.**, v.22, n.1, p.172–180, 2011.

KOBA, K et al. Chemical Composition of *Hyptis pectinata* L., *H. lanceolata* Poit., *H. suaveolens* (L) Poit and *H. spicigera* Lam. Essential Oils from Togo. **Journal of Essential Oil Bearing Plants.**, v.10, n.5, p. 357 – 364, 2007.

KOBAYASHI, Y.T.S. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia 82érrea*) em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, São Paulo, v. 52, n. 1, p. 34-40, 2015.

KOVALSKI, M.L. **Diálogo entre o saber popular e o conhecimento científico : a etnobotânica das plantas medicinais na escola.** 2011. Dissertação (Mestrado em Educação para a Ciência e a Matemática) – Programa de Pós-Graduação em Educação para Ciência e a Matemática, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2011.

KUNTZE, L.B et al. Estudo comparativo dos efeitos do extrato de *Ginkgo biloba* L. e *Panax ginseng* C.A. Meyer na reprodução de ratos machos e fêmeas Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais.**, Botucatu, v.14, n.1, p.34-42, 2012.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A.M. Cicatrização de feridas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia.**, v.69, n.3, p.355-67, 2011.

LEAO, L.S.N.O et al. Fenotipagem de bactérias isoladas em hemoculturas de pacientes críticos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.**, Uberaba, v. 40, n. 5, Oct., 2007.

LEVINSON, W. Classificação de bactérias de importância médica. In: **Microbiologia médica e Imunologia** / Organizador Warren Levinson. 10.ed. __Porto Alegre: Artmed, 2010.

LISBOA, A.C.C.D et al. Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. **Fitoterapia.**, v.77, n.6, p. 439-42, 2006.

MANTIONE, C.R.; RODRIGUES, R.A. Bradykinin (BK)₁-receptor antagonist blocks capsaicin-induced ear inflammation in mice. **British Journal Pharmacology**, v.99, n.1, p. 516–518, 1990.

MARINHO, P.V.T et al. Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Ximenia americana* no processo cicatricial de feridas cutâneas experimentais em caprinos. **Arquivo Brasileiro de**

Medicina Veterinária e Zootecnia., v.20, n.4, Dez., 2013.

MARTINS, N.L.P et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (BABAÇU). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, v.21, n.3, 2006.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, p. 36-39.

MATSUBARA, S; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.**, v.26, n.2, p. 401-407, abr.-jun., 2006.

MEDEIROS, A.C et al. Topic treatment of rat burns with hyaluronic acid. **Acta Cirurgica Brasileira.**, v.14, n.4, 1999.

MELO, G.B et al. Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, v.21, n.1, 2006.

MELO, M.G.D et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena.**, v. 8, n. 4, 2012.

MENDONÇA, R.J; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia.**, v.84, n.3, p257-62, 2009.

MENEZES, P.P et al. Physicochemical Characterization and Analgesic Effect of Inclusion Complexes of Essential Oil from *Hyptis pectinata* L. Poit Leaves with β -Cyclodextrin. **Current Pharmaceutical Biotechnology.**, V.16, n.5, 2015.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology.**, v. 26, n.2, p. 211-219, 2004.

MONTEIRO, J.M et al. Taninos: uma Abordagem da Química à Ecologia. **Química Nova.**, v.28, n.5, p. 892-896, 2005.

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.

NASCIMENTO, A.R; NAMBA, M. Aspecto da ferida: avaliação de enfermagem. **Revista Enfermagem.**, v. 10, n.2, p. 118-23, 2009.

NASCIMENTO, J.E.A et al. Terapia Nutricional no Perioperatório. **Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral Associação Brasileira de Nutrologia Projeto Diretrizes**. 2011.

NASCIMENTO, P.F.C et al. *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity. **Oral Diseases.**, v. 14, n.1, p. 485–489, 2008.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

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

OLIVEIRA, A.F et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.12, n.3, p.302-310, 2010.

OLIVEIRA, F.C et al. Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.23, n. 2, p. 590-605, 2009.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH[•]: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

OLIVEIRA, I.V.P.M; DIAS, R.V.C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.267-271, 2012.

OLIVEIRA, V.B et al. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.1, p.92-99, 2009.

OLIVEIRA, A.B et al. Efeito analgésico e anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas de trevo-roxo (*Scutellaria agrestis* A. St.-Hil. ex Benth. - Lamiaceae) em roedores. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.2, p.174-181, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Traditional Medicine Strategy:2014-2013**. Word Health Organization. 2013.

ORMEÑO, E; FERNÁNDEZ, C. Los terpenos de las plantas. Investigación y Ciencia, mayo, 2012. Disponível em <http://www.thcterapeutico.com/wp-content/uploads/2013/05/terpenos.pdf> . Acesso em: 30 Mar. de 2015.

PAGANELA, J.C. et al. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **Rev. Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.104 n.569-572, p.13-18, 2009.

PAGNANO, L.O et al. Aspectos básicos do processo cicatricial e fatores gerais relacionados com a reparação tecidual. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. VIII, n.12, 2009.

PAIXÃO, M.S et al. *Hyptis pectinata*: Redox Protection and Orofacial Antinociception. **Phytother**, v.27, n.1, p. 1328–1333, 2013.

PARACAMPO, N.E.N.P. et al. Atividade fitotóxica e fungitóxica de extratos de *Vouacapoua*

cf. americava Aublet (leg.-caesalp.), essência florestal nativa da amazônia. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias.**, Belém, v.1, n. 52, p. 9-22, jul./dez. 2009.

PAWAR, R.S; TOPPO, F.S. Plants that heal wounds. A review. **Herba polonica.**, v.58, n.1, 2012.

PEREIRA, R.J; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity.** v. 3, n.4, p.146-152, Nov. 2012.

PERES, L.A.B et al. Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia.**, v. 30, n.1, p.48-53, 2008.

PICKING, D et al. *Hyptis verticillata* Jacq: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.147, n.1, p.16–41, 2013.

PIRIZ, M.A et al. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: uma revisão de literature. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais.**, Campinas, v.16, n.3, p.628-636, 2014.

PINTO, E.P.P; AMOROZO, M.C.M; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasílica.**, São Paulo, v. 20, n. 4, Dec. 2006.

RAMOS, R.S et al. Atividade antimicrobiana in vitro dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Zeyheria tuberculosa**. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste.**, v.13, n.5, p.1015-24, 2012.

RAMOS, T.Z; PIZZOLITO, E.L; PIZZOLITTO, A,C. Uso do teste com cloridrato de trifetil tetrazólio (CTT) para detecção de bacteriúria sintomática e assintomática. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.38, n.3, p. 197-199, 2006.

RAYMUNDO, L.J et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.134, n.1, p. 725–732, 2011.

RIBEIRO, M.C.S. Entendendo a cadeia de transmissão: conceitos básicos. In: **Vigilância e Controle das doenças transmissíveis** / Organizadoras Zenaide Neto Aguiar, Maria Celeste Soares Ribeiro. 3.ed.__São Paulo: Martinari, 2009.

SABITHA, G et al. First stereoselective total synthesis of pectinolide C and total synthesis of pectinolide A. **Tetrahedron Letters.**, v.54, n.1, p. 1097–1099, 2013.

SANCHEZ-MORENO, C; LARRAURI, J.A; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International.**, v.32, n.6, p. 407-412, 1999.

SANTOS, M.F.S et al. Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira.**, v.21, n.3, 2006.

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

SANTURIO, J.M et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, n.3, mai-jun, 2007.

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

SERAFINI, M.R et al. Determination of chemical and physical properties of *Hyptis pectinata* essential oil and their redox active profile. **E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research.**, v.3, n.1, p. 1-9, March, 2012.

SHIRWAIKAR, A et al. Wound healing property of ethanolic extract of leaves of *Hyptis suaveolens* with supportive role of antioxidant enzymes. **Indian Journal of Experimental Biology.**, v.41, n.3, p. 238-41, Mar, 2003.

SILVA, C.C; ALBUQUERQUE, J.F.C. Determinação da atividade citotóxica do extrato etanólico do caule de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. In: XIX CONIC, III CONITI, VII JOIC, 2011. Anais...Recife, UFPE, 2011.

SILVA, D.A.A; MENDES, C.C; GÓES NETO, A. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de frações do extrato hexânico e diclorometano de *Hyptis platanifolia*. In: XV SEMIC - Seminário de Iniciação Científica. Feira de Santana, 2011. Disponível em <http://www2.uefs.br/semic/upload/2011/2011XV-041DAY930-220.pdf>. Acesso em 17 de Ago.2015.

SILVA, D.T. **Uso do ipê-roxo (*Tabebuia avellanedae*) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos**. 2006. dissertação (Mestrado). Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos. Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2006.

SILVA JUNIOR, I.F et al. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Revista brasileira de farmacognosia-brazilian journal of pharmacognosy.**, v19, n.1B, Jan./Mar. 2009.

SILVA, N.C.C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010.

SILVA, C.C; ALBUQUERQUE, J.F.C. determinação da atividade citotóxica do extrato etanólico do caule de *Hyptis pectinata* (L.) poit. In: XIX CONIC, III CONITI, VII JOIC. UFPE, 2011. Disponível em http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2011/conic/n_pibic/40/114031096SCNP.pdf. Acesso em 17 de Ago.2015

SILVA, C.G et al. *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of

action of isoquercitrin and *Hyptis fasciculata*. **Phytomedicine.**, v.16, n.1, p.761–767, 2009.

SILVA, R.L et al. Efeito do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de hepatócitos após hepatectomia parcial. **Acta Cirurgica Brasileira.**, São Paulo, v. 17, supl. 3, 2002.

SILVA, F.C; DUARTE, L.P; VIEIRA FILHO, S.A. Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com PotencialAtividade Biológica. **Revista Virtual de Química.**, v.l 6, n.5, 2014.

SOLER-RIVAS, C.; et al. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of food stuffs. **Phytochemical Analysis.**, v. 11, n. 5, p. 330-338, Sep./Oct., 2000.

SOUSA, C.M.M et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, v. 30, n.2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, C.M.P et al . Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande - Paraíba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, Botucatu , v. 15, n. 2, 2013.

STRACIER, L.D.S. Cuidados e complicações pós-operatórias. **Medicina (Ribeirão Preto).**, v.41, n.4, p. 465-8, 2008.

TAZIMA, M.F.G.S; VIVENTE, Y.A.M.V.A; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina, Ribeirão Preto.**, v. 41, n.3, p. 259-64, 2008.

TOLEDO, M.G.T, ALQUINI, Y; NAKASJIMA, T. Caracterização anatômica das folhas de *Cunila microcephala* Benth. (Lamiaceae). **Rev. Bras. Cienc. Farm. Braz. J. Pharm. Sci.** v. 40, n. 4, out./dez., 2004

TORTORA, G.J. O mundo microbiano e você. In: **Microbiologia** / Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case ; tradução: Aristóboło Mendes da Silva ... [et al.] ; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca. – 10. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L.R. e cols. Morfologia e Estrutura da célula bacteriana. In: **Microbiologia**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008.

UDEGBUNAM, S.O et al. Wound healing and antibacterial properties of methanolic extract of *Pupalia lappacea* Juss in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine.**, v.14, n.157, 2014.

VARGAS, P.N; HOELZEL, S.C; ROSA, C.S. Determinação do teor de polifenóis totais e atividade antioxidante em sucos de uva comerciais. **Alimentos e Nutrição.**, Araraquara v.19, n.1, p. 11-15, jan./mar. 2008.

VARGAS, N.R.C et al. Plantas medicinais utilizadas na cicatrização de feridas por agricultores da região sul do RS. **Journal of research: fundamental care online.**, v. 6, n.2 p. 550-560, abr./jun. 2014.

VIEIRA, A.P et al. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 65-74, jan./jun. 2008.

VIEIRA, F.T. **COMPOSTOS ORGANOESTÂNICOS COM AÇÃO FARMACOLÓGICA**. 2008. Tese (Doutorado)-. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química. Belo Horizonte. 2008.

VIEIRA, R.C et al. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. **Pesquisa Veterinária Brasileira**., v.28, n.8, p. 358-366, agosto 2008.

VIOLANTE, I.M.P. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**., v. 1, n.1, p. 1302-1308, 2012.

VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S et al. Antioxidant Activities and Polyphenolic Contents of Three Selected Micromeria Species from Croatia. **Molecules**., v.14, n.1, p.1454-1470, 2011.

VOLTARELLI, J.C. Febre e Inflamação. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 27, n. 1/2, p. 7-48, jan./jun. 1994.

XU, D.H et al. The essential oils chemical compositions and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three *Hyptis* species. **Pharmaceutical Biology**., v.51, n.9, p.1125–1130, 2013.

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO

PROJETO Nº 058/2014

TÍTULO: Prospecção do potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, citotóxico e cicatrizante do extrato etanólico de *Hyptis pectinata* L. Poit (Sambacaitá)

RESPONSÁVEL: Maria Lysete de Assis Bastos

OBJETIVO: Investigar o potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, cicatrizante e citotóxico dos extratos brutos das folhas e caule da *Hyptis pectinata* L. Poit.

JUSTIFICATIVA (APROVAÇÃO, PENDÊNCIA, NEGAÇÃO):

A pesquisa proposta é de relevada importância científica apresentando justificativas plausíveis para a utilização de animais. O projeto ressubmetido atendeu a todas as solicitações do parecer consubstanciado.

SITUAÇÃO: Aprovado

PERÍODO DE VIGÊNCIA: 04-05-2015 a 22-12-2015

DADOS DO ANIMAL:

ESPÉCIE	LINHAGEM	QUANTIDADE
Camundongo heterogênico	<i>Swiss</i>	12
Rato heterogênico	<i>Wistar</i>	29

Maceió, 12 de fevereiro de 2015.



Silvana Ayres Martins

Coordenadora da CEUA/UFAL

Profa. Dra. Silvana Ayres Martins
 Coordenadora da Comissão de
 Ética no uso de Animais
 SIAPE 1120858

ANEXO B



**INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE ALAGOAS – IMA
HERBÁRIO MAC**

Av. Major Cícero de Góes Monteiro, 2197, Mutange.
CEP 57017-320, Maceió – AL, Brasil
Site www.ima.al.gov.br email herbariomac.ima@gmail.com

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que a planta utilizada na pesquisa da
mestranda **Talita Lúcio Chaves Vasconcelos**, coletada no Campus A.C. Simões –
Universidade Federal de Alagoas – Maceió, é semelhante a uma mostra da mesma
espécie depositada no Herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente do Estado de
Alagoas. Trata-se de:

Registro MAC	Nº Coletor	Família	Espécie
23601	01	Lamiaceae	<i>Mesosphaerum pectinatum</i> (L.) Kuntze

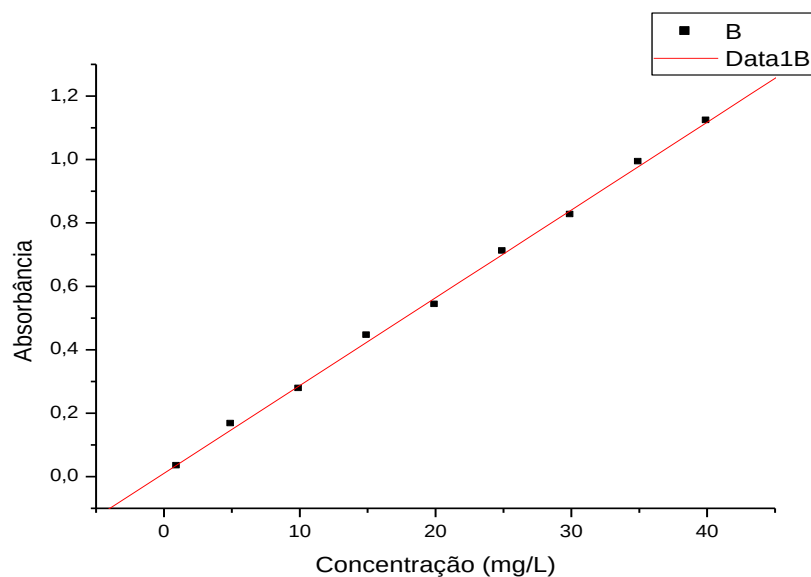
OBS: Recomenda-se a citação, no corpo do trabalho, que a identificação do material
estudado foi efetuada pelos técnicos do Herbário MAC do Instituto do Meio
Ambiente.

Maceió, 29 de setembro de 2014.

Rosângela P. de Lyra Lemos
Rosângela Pereira de Lyra Lemos
Curadora do Herbário MAC

APÊNDICE A

Curva de calibração construída a partir dos valores médios de absorbância de cada solução do radical livre sintético DPPH versus concentrações utilizadas (1 a 40 mg/L) por meio da análise de regressão linear.



Fonte: AUTORA, 2015

APÊNDICE B



PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA/CLÍNICA DAS LESÕES

Número do animal: _____

GRUPO: _____

Critérios		Dias de Avaliação			
		3° (21/05)	7° (25/05)	11° (29/05)	14° (01/06)
1.Tamanho da Lesão					
2.Rubor perilesional	Sim (S)				
	Não (N)				
3.Tecido De Granulação	Sim (S)				
	Não (N)				
4.Extensão da crosta (Total, Parcial ou ausente)					
5.Inflamação	Sim (S)				
	Não (N)				
6.Necrose	Sim (S)				
	Não (N)				
7.Exsudato	Sim (S)				
	Não (N)				
8.Fibrina	Sim (S)				
	Não (N)				

Observações

APÊNDICE C



PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA/HISTOPATOLÓGICA DAS LESÕES

Código do animal: _____

Data: _____

1. PRESENÇA DE CROSTA / NECROSE

() AUSENTE	() PRESENTE
----------------	-----------------

2. FASE INFLAMATÓRIA

2.1 Proliferação Vascular	() AUSENTE	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA
2.2 Células mononucleares (monócitos)	() AUSENTE	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA
2.3 Células polimorfonucleares (neutrófilos)	() AUSENTE	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA

3. FASE PROLIFERATIVA

3.1 Tecido de Granulação	() AUSENTE		() PRESENTE	
3.2 Proliferação Fibroblástica	() AUSENTE	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA
3.3 Neovascularização	() AUSENTE	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA
3.4 Colagenização	() AUSENTE	() DISCRETA	() MODERADA	() INTENSA
3.5 Reepitelização	() AUSENTE	() PARCIAL		() TOTAL

4. FASE DE REMODELAMENTO

4.1 Fibras de colágeno	() AUSENTE	() PRESENTE
------------------------	----------------	-----------------